

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS
AMÉRICAS**

FACULTAD DE FARMACIA

**ESTUDIO *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS EN HEXANO,
DICLOROMETANO, ACETATO DE ETILO Y ACUOSO DE LAS
HOJAS DE LA PLANTA *VERNONIA PATENS* EN CEPAS DE
*SALMONELLA DIARIZONAE***

**MODALIDAD DE TESIS PARA OPTAR POR EL GRADO
DE LICENCIATURA EN FARMACIA**

LINCY DELGADO VALVERDE

TUTOR:

LIC. JAVIER RODRIGO ALPÍZAR CORDERO

SAN JOSÉ, COSTA RICA, AGOSTO, 2021

Tabla de contenido

Tablas	7
Figuras	8
Resumen	13
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	14
Planteamiento del problema	14
Hipótesis de la investigación	16
Objetivos	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos	16
Justificación	16
Antecedentes	19
Históricos	19
Internacionales	20
Nacionales	21
Proyecciones	24
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	25
Generalidades de las bacterias	25
Historia	27
<i>Salmonella diarizonae</i>	28
Clasificación taxonómica de la <i>Salmonella diarizonae</i>	31
Familia <i>Enterobacteriaceae</i>	33
Etiología de las infecciones	33

Condiciones de vida de la <i>Salmonella</i>	34
Epidemiología	35
Transmisión de la bacteria <i>Salmonella sp</i>	35
Infecciones asociadas a la <i>Salmonella diarizonae</i>	36
Resistencia antimicrobiana por <i>Salmonella diarizonae</i>	37
Tratamiento para la <i>Salmonella diarizonae</i>	38
Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (antibiograma)	39
Plantas medicinales	39
Extractos de plantas	41
Generalidades de la planta <i>Vernonia patens</i>	42
Composición química de la <i>Vernonia patens</i>	46
Usos más comunes de la planta <i>Vernonia patens</i>	48
Actividad farmacológica y biológica	48
Tamizaje fitoquímico	49
Metabolitos secundarios	50
Fenoles	52
Taninos	54
Terpenos	55
Saponinas	56
Alcaloides	57
Cumarinas	58
Flavonoides	59
Antraquinonas	60
Métodos de extracción	62
Método por maceración	62

Método por percolación	62
Cromatografía de capa fina	62
Extracción de Soxhlet	63
Destilación a presión reducida (rotavapor)	63
Pruebas, métodos y análisis microbiológicos para la evaluación de capacidad antimicrobiana de los extractos de plantas y ácidos orgánicos	65
Método Kirby Bauer	66
Métodos en agar	67
Agar Mueller Hinton	67
Agar tripticasa soya (TSA)	68
Agar sangre	68
Agar MacConkey	70
Agar Sabouraud dextrosa (SDA)	71
Agar manitol sal	72
Enfoque de la investigación	74
Diseño de la investigación	74
Variables de la investigación	77
Instrumentos, materiales y equipos usados para la realización de los extractos de <i>Vernonia patens</i>	79
Fraccionamiento de las hojas de la planta <i>Vernonia patens</i>	79
Materiales	79
Equipos	80
Reactivos	80
Recolección del material botánico, procedimientos y recursos	82
Concentración del extracto por destilación a presión reducida	83

Fraccionamiento de los componentes de las hojas de planta <i>Vernonia patens</i>	84
Extracción con hexano, diclorometano y acetato de etilo	84
Extracción con éter etílico	86
Extracto acuoso	86
Extracto etéreo	87
Pruebas de identificación para el tamizaje fitoquímico	88
Prueba de identificación de cumarinas (KOH)	89
Prueba de identificación de flavonoides (Shinoda)	89
Prueba de Liberman Burchard (identificación de triterpenos y esteroides)	89
Prueba de Borntrager-Kraus (identificación de antraquinonas)	90
Prueba de taninos (identificación de taninos)	90
Prueba de cromatografía de capa fina TLC (determinación de terpenos)	90
Prueba de Lugol (determinación de almidón)	92
Prueba de Benedict (determinación de azúcares reductores)	92
Prueba de espuma (determinación de saponinas)	92
Pruebas microbiológicas para la evaluación de la capacidad antibacteriana de los diferentes extractos de las hojas de la planta <i>Vernonia patens</i>.	92
Materiales y equipo	92
Reactivos	93
Procedimientos	94
Concentración y dilución de los extractos de las hojas de la planta <i>Vernonia patens</i>	96
Comprobación de cepa bacteriana <i>Salmonella diarizonae</i>	97
Cultivo de la cepa bacteriana <i>Salmonella diarizonae</i> en el laboratorio	98
Figura 45. Incubadora utilizada en el ensayo microbiológica, a temperatura 37 °	100
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS	101

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	128
Conclusiones	128
Recomendaciones	129
REFERENCIAS	131

Tablas

Tabla 1. Parámetros de vida de <i>Salmonella sp</i>	35
Tabla 2. Estudio de las dimensiones de las hojas de <i>V. patens</i>	45
Tabla 3. Taxonomía de la planta <i>Vernonia patens</i>	45
Tabla 4. Composición química de <i>Vernonia patens</i>	46
Tabla 5. Interpretación del método Kirby Bauer.....	66
Tabla 6. Diferentes tipos de medios de cultivo	73
Tabla 7. Cuadro de operacionalización de variables.....	77
Tabla 8. Pruebas para realizar por cada extracto obtenido, para llevar a cabo el tamizaje fitoquímico	88
Tabla 9 . Extractos característicos y volúmenes obtenidos a partir del fraccionamiento de las hojas de la planta <i>Vernonia patens</i> (tuete).....	106
Tabla 10. Masas de las variables por cada extracto y obtención de la concentración de los extractos preparados	107
Tabla 11. Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico realizados a los diversos extractos de las hojas de la planta <i>Vernonia patens</i> (tuete)	108
Tabla 12. Tipos de metabolitos detectados mediante el tamizaje fitoquímico en las hojas de la planta de <i>Vernonia patens</i>	110
Tabla 13. Lectura de halos de inhibición en milímetros por extracto, concentración y número de réplica	120
Tabla 14. Valores de inhibición calculados a partir de la fórmula y la medición de halos.....	121

Figuras

Figura 1. Morfología bacteriana. Imágenes obtenidas por microscopia electrónica (A) cocos (B) bacilos y (C) espirilos	28
Figura 2. Serotipos para cada subespecie de Salmonella	29
Figura 3. Antígenos de superficie de la <i>Salmonella</i>	30
Figura 4. <i>Salmonella diarizonae</i>	31
Figura 5. Clasificación taxonómica de la <i>Salmonella diarizonae</i>	31
Figura 6. Salmonella entérica vista por medio de Tinción de Gram	32
Figura 7. Bacterias frecuentemente halladas en los alimentos	34
Figura 8. Ciclo de transmisión de Salmonella sp.	36
Figura 9. Porcentajes de cepas resistentes de <i>Salmonella entérica</i>	38
Figura 10. Plantas medicinales, extractos y aceites.....	41
Figura 11. Fotografías de planta <i>Vernonia patens</i> , Mercedes norte de Puriscal	43
Figura 12. Características macro morfológicas de las hojas de <i>V. patens</i>	44
Figura 13. Estructura química del Sesquiterpeno.....	47
Figura 14. Molécula 8-alfa- angeloliloxicompactiflorido	47
Figura 15. Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas.	51
Figura 16. Estructura química del fenol	53
Figura 17. Estructura química del ácido cumárico de un polifenol.....	53
Figura 18. Estructura química del ácido gálico, un tanino	54
Figura 19. Estructura química de la hormona (giberlinas) un terpeno	55
Figura 20. Estructura química del medicamento dioscina, una saponina.....	57
Figura 21. Estructura química de la cafeína, un alcaloide estimulante	58
Figura 22. Estructura química de una cumarina simple	59
Figura 23. Estructura química de la flavona, un flavonoide.....	60
Figura 24. Estructura química del antraceno, antraquinona	61
Figura 25. Equipo de destilación a presión reducida mediante rotavapor, Yamato BM500	64
Figura 26. Agar Mueller- Hinton.....	68

Figura 27. Placa de agar sangre	69
Figura 28. Placa de agar chocolate	70
Figura 29. Placa de agar MacConkey	71
Figura 30. Placa de Agar Sabouraud dextrosa (SDA).....	71
Figura 31. Placa de Agar Manitol Sal	72
Figura 32. Hojas de <i>Vernonia patens</i> para la elaboración del proyecto	82
Figura 33. Equipo para filtración al vacío del material macerado de las hojas de <i>Vernonia patens</i> y beacker con el extracto	83
Figura 34. Rotavapor con el extracto en proceso de destilación	84
Figura 35. Extractos obtenidos del fraccionamiento, recipientes rotulados	85
Figura 36. Extractos obtenidos, rotulados y en sus respectivos recipientes	87
Figura 37. Dimensiones de una placa cromatográfica para TLC y Sistema cromatográfico	91
Figura 38. Cepa de <i>Salmonella diarizonae</i> en agar sangre	94
Figura 39. Discos de antibiótico ciprofloxacina.....	95
Figura 40. Fotografía de control negativo o blancos realizada a cada solvente para probar que no poseen actividad bactericida por sí solos.....	95
Figura 41. Muestras de los extractos listos, en sus diferentes concentraciones 100%, 75%, 25% y su blanco respectivo.....	96
Figura 42. Placas rayadas para comprobación de cepa en buen estado.....	97
Figura 43. Discos de papel filtro Whatman Schleicher & Schuell.....	98
Figura 44. Placas listas para incubación, con la cepa y las disoluciones respectivas por triplicado.....	99
Figura 45. Incubadora utilizada en el ensayo microbiológica, a temperatura 37 °.....	100
Figura 46. Hojas de <i>Vernonia patens</i> , lavada, secada y cortada, lista para la obtención del extracto	102
Figura 47. Extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo y acuoso, obtenidos en el fraccionamiento del extracto crudo de las hojas de la planta <i>Vernonia patens</i> (tuete)	103
Figura 48. Extracto de hexano obtenido en el fraccionamiento del extracto crudo de las hojas de la planta <i>Vernonia patens</i> (tuete)	104

Figura 49. Extracto de acetato de etilo obtenido en el fraccionamiento del extracto crudo de las hojas de la planta <i>Vernonia patens</i> (tuete).....	105
Figura 50. Aplicación de pruebas de identificación de alcaloides con reactivo Dragendorff, extractos: Etéreo, AQ1 y AQ2E.....	111
Figura 51. Aplicación de pruebas de identificación de flavonoides con reactivo: Etéreo y AQ2E.....	112
Figura 52. Aplicación de pruebas de identificación de cumarinas con reactivo KOH, extractos: Etéreo y AQ2E.....	113
Figura 53. Aplicación de pruebas de identificación de Triterpenos y Esteroles con reactivo de Liberman Burchard, extractos: Etéreo y AQ2E	114
Figura 54. Aplicación de pruebas de identificación de antraquinonas con reactivo de Bornträger- Kraus, extractos: Etéreo, AQ2E y AQ2.....	115
Figura 55. Aplicación de pruebas de identificación de taninos, extractos: Etéreo y AQ1	116
Figura 56. Aplicación de prueba de identificación de terpenos por medio de cromatografía de capa fina, reveladas con vainillina.....	116
Figura 57. Aplicación de prueba de identificación de almidón con reactivo de Lugol, extracto: AQ1	117
Figura 58. Aplicación de prueba de identificación de saponinas (espuma), extracto: AQ1	118
Figura 59. Aplicación de prueba de identificación de azúcares reductores con reactivo de Benedict, extracto: AQ1	119
Figura 60. Fotografía donde se evidencia que no existió halo inhibitorio en los extractos acuoso y de hexano	122
Figura 61. Fotografía donde se evidencia la existencia de halo inhibitorio en el extracto de diclorometano al 100% con un valor de 9 mm.....	123
Figura 62. Fotografía donde se evidencia la existencia de halo inhibitorio en el extracto de acetato de etilo al 100% con un valor de 10 mm	124
Figura 63. Blanco positivo del antibiótico ciprofloxacino en tubo e implantado en el agar durante 24 horas	125

Agradecimientos

Primero quiero darle gracias a Dios, por darme las fuerzas, la capacidad intelectual y emocional para poder ver realizado el sueño de mi vida.

A mis padres, Alfonso Delgado y Xinia Valverde, por apoyarme y respetar mis decisiones en todo momento, darme la ayuda con el cuidado de mis hijas y decirme las palabras de aliento que necesitaba en todo momento.

Quiero darle las gracias a Lic. Javier Alpízar Cordero, por ser mi tutor y estar a mi lado “hombro a hombro”.

A Ricardo Rodríguez Barth, por financiar gran parte de mi carrera y ser parte de mi vida por 17 años, en los cuales siempre obtuve su cariño, respeto y comprensión.

A mis hijas Ana Victoria y Sofía, por alegrar mi vida, enseñarme a ser más fuerte para ellas y siempre alegrar mi corazón con una simple mirada de complicidad y cariño.

A mi hermana Verónica y mi tío Celso, por confiar en mí y ser mis fiadores en Conape, para poder culminar mi carrera.

A Vinicio Mora Madrigal, por su apoyo y comprensión, gracias por darme las palabras que más necesitaba en el momento justo.

A mis amigos(as) que siempre estuvieron brindándome su mano, Ariana, Vanessa, Josué, Fernanda, y Endrina. Los llevaré siempre en mi corazón.

Quiero darles las gracias a mis profesores queridos, que con mucha dedicación me transmitieron su valioso conocimiento. A Marisol Flores, Luis Carlos Monge, Idalia Valerio, Cinthia Salgado, Yerlin Romero, Gustavo Sáenz, Luis Diego Brenes, Edgar Hernández, Javier Alpízar, Adam Amey, Melissa Martínez, Carlos Mora y muchos otros que me brindaron su mano. Dios los bendiga.

Dedicatoria

Este Trabajo Final de Graduación se lo dedico a mis padres, que siempre creyeron en mí, sobre todo mi papá.

A mi ángel en el cielo, mi abuelita Rosario Alpízar; a mis dos pilares, mis hijas, por las que llegue hasta el final, quienes siempre han estado a mi lado brindándome apoyo incondicionalmente durante mi proceso de formación académica.

Le dedico esta tesis a todos los que creyeron en mí, a esos amigos que lucharon noches enteras por obtener este mismo título.

“Al principio es difícil de entender que el objetivo no es vencer al resto de corredores, con el tiempo comprendes que la lucha es contra la pequeña voz en tu interior que quiere hacerte abandonar...”

Resumen

Las enfermedades causadas por microorganismos patógenos han ido en incremento acelerado año tras año, constituyendo un factor de riesgo para la salud pública, de ahí que se buscan fuentes naturales que inhiban el crecimiento bacteriano. Por esta razón, el presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de planta *Vernonia patens* (tuete de Costa Rica), contra la bacteria *Salmonella diarizonae*.

Este proyecto se realizó mediante la elaboración de un procedimiento de extracción de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de la planta *Vernonia patens*, en los laboratorios de la Universidad Internacional de las Américas (UIA), y las pruebas microbiológicas se llevaron a cabo en el Laboratorio Microbiológico Dra. Arroyo, ubicado en Santiago de Puriscal, San José.

El extracto crudo se obtuvo a partir de un proceso de maceración de las hojas de la planta *Vernonia patens*, con una disolución de etanol al 70% durante una semana. A partir de este extracto, se procedió a un fraccionamiento utilizando hexano, diclorometano y acetato de etilo como disolventes de partición.

A partir de los extractos obtenidos, se determinó la actividad antimicrobiana frente a la *Salmonella diarizonae*, mediante el método de difusión en discos por agar, por triplicado, utilizando los extractos en concentraciones de 100%, 75% y 25%, obteniendo de esta manera la concentración mínima inhibitoria, en caso de que se presentara.

Los resultados de las pruebas microbiológicas indicaron que los extractos presentaron actividad inhibitoria contra la bacteria *Salmonella diarizonae*. Sus halos de inhibición deberían exceder los 6 mm, en este caso el extracto acuoso y hexano no presentaron, sin embargo, los halos de inhibición de los extractos de acetato de etilo y diclorometano frente a la *Salmonella diarizonae* fueron de 10,0mm y 9,00 mm respectivamente. La fracción con mayor inhibición fue la de acetato de etilo con un valor inhibitorio de 2 en una concentración de 40.20 mg/ml.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que, en el mundo, la incidencia anual de diarreas es de 1500 millones de casos, y 3 millones de niños menores de cinco años mueren a causa de ellas. Esta constituye uno de los problemas sanitarios más comunes que aquejan la salud de las personas y afectan con mayor severidad a niños, mujeres embarazadas y ancianos provocan disentería y variedad de enfermedades, debido a las infecciones bacterianas, las cuales son frecuentes y afectan principalmente a los grupos sociales de bajos recursos (Zúñiga & Caro, 2017).

Según Serrano & Hernández (2016), las bacterias son abundantes y variadas, no obstante, las enfermedades que las bacterias provocan en el hombre son muchas, y tienen una notable capacidad para adaptarse a los cambios, por esta razón pueden hacerse resistentes a los antibióticos usados para su eliminación. A lo largo de la historia han fulminado a miles de seres humanos y animales, por lo tanto, la gran batalla para poder combatir las ha ido en crecimiento debido a la gran preocupación por la resistencia a los antimicrobianos.

La *Salmonella* es un género que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y está considerada como una de las cuatro principales causas de enfermedades diarreicas. Todos los serotipos pueden causar la enfermedad en el ser humano que suele causar gastroenteritis, el *S. entérico* serotipo *Enteriditis* y *S. entérica* serotipo *Typhimurium* transmitida de animales a humanos, pueden provocar una enfermedad sistémica grave y aguda, pudiendo provocar la muerte en personas, sobre todo a adultos mayores y niños (Castro, 2020).

Como ya se mencionó, la *Salmonella sp* está afectando a nivel mundial tanto personas como animales, según estudios obtenidos, la *Salmonella entérica diarizonae*, el serotipo 61; k:1.5 (7) es un microorganismo saprófito de las ovejas que produce enfermedades a estos animales y parece haberse incrementado en los últimos años, con el número de informes de RCP en publicaciones y conferencias internacionales en aumento (Figueras, Ferrer, González, Bueso, Ramos, Rubira, Burian & Lacasta, 2020).

El estudio del reino *Plantae* ha sido primordial a lo largo de toda nuestra historia, la adquisición de conocimientos botánicos ha permitido el desarrollo y mejoras en la acción conjunta de varios de ellos, en la medicina natural, en la agricultura y en el cuidado de la naturaleza. Una de

las partes más complejas que los científicos han tenido que comprender es que las plantas medicinales sus compuestos cambian en su calidad y cantidad a través de las diferentes edades de la planta, las partes que se utilicen, la época del año y las condiciones del lugar donde se desarrolla (Faúndez, Faúndez, & Flores, 2017).

Las plantas medicinales son aquellas que presentan distintos principios activos en sus órganos, que a su vez son los responsables de los efectos curativos de las enfermedades de los humanos y animales en general. Se estima que de las 260.000 especies de plantas que se conocen en la actualidad, solo el 10% ha sido investigado dentro de los estudios médicos actuales y en épocas pasadas. En la actualidad, el estudio de los diferentes compuestos de las plantas medicinales se focaliza en las sustancias que ejercen acción farmacológica sobre los seres vivos (Cosme, 2008).

En la actualidad, la *Vernonia Patens* se conoce como una planta biológicamente activa en el consumo mundial de medicinas naturales, a pesar de sus usos tradicionales, son muy escasos los estudios químicos que se han realizado sobre esta especie, solo se conoce la ausencia de lactonas sesquiterpénicas y la presencia de hidrocarburos sesquiterpenos en las partes aéreas. Sin embargo, no existen antecedentes de otras investigaciones farmacológicas ni químicas para la especie (Moreno, 2018).

Debido a estas inquietudes respecto al gran aumento en los casos de resistencia a los antibióticos por parte de muchos microorganismos y además de la actividad antimicrobiana presente en los distintos extractos de plantas, específicamente las hojas, surge la interrogante de la investigación: ¿Posee la planta *Vernonia patens* (tuete de Costa Rica) actividad antibacterial para poder combatir la bacteria *Salmonella diarizonae*?

Tomando en cuenta la pregunta formulada, se postula la siguiente hipótesis: “Las hojas de la planta *Vernonia Patens* presentan actividad antimicrobiana contra la bacteria *Salmonella diarizonae*”.

Hipótesis de la investigación

Las hojas de la planta *Vernonia Patens* presentan actividad antimicrobiana contra la bacteria *Salmonella diarizonae*.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de planta *Vernonia patens* contra la bacteria *Salmonella diarizonae*.

Objetivos específicos

Elaborar los extractos y el fraccionamiento de la planta *Vernonia patens*.

Realizar un tamizaje fitoquímico completo para determinar qué clase de metabolitos secundarios se encuentran en las hojas de la planta *Vernonia patens*.

Comprobar la actividad antibacterial *in vitro* de los extractos de la planta *Vernonia patens* contra la bacteria *Salmonella diarizonae*.

Justificación

La resistencia a antimicrobianos es la habilidad de los microorganismos para evitar que los antibióticos actúen en contra de ellos. Entre las principales causas que señalan la resistencia a los antimicrobianos, está su uso indiscriminado, lo cual es el éxito de las bacterias con resistencia a antimicrobianos (AMR), debido a su capacidad de mutar e intercambiar material genético, entre la variedad de especies bacterianas.

Debido al reto que en la actualidad presenta el control bacteriano mediante el uso de fármacos, es necesario encontrar alternativas que estén disponibles para toda la población y garanticen una protección duradera (Contreras, Medrano, Ibarra, Martínez, Chaidez & Castro, 2018).

A nivel mundial existen diferentes enfermedades causadas por bacterias, virus o parásitos que complican la salud de los humanos y animales, dado que han causado un incremento importante en las patologías infecciosas.

La familia *Enterobacteriaceae* está constituida por un conjunto de microorganismos con las siguientes características: bacilos Gram negativos, se encuentran en el intestino de humanos y animales, suelo, agua, plantas. Para contrarrestar este efecto negativo se ha visto elevado el uso de tratamientos alternativos para combatirlos y si fuera posible a su vez prevenirlas; una posibilidad que ha tomado fuerza es la utilización de plantas naturales para estas situaciones (Alcares, Satorres, Mattana, Centorbi, Aliendro & Echenique, 2017).

En la actualidad, las plantas son utilizadas en la medicina, pero la ciencia moderna, analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, para conocer los principios activos responsables de aliviar o curar las enfermedades, las propiedades curativas de las plantas se atribuyen a la presencia de un “principio activo”, el cual produce un efecto fisiológico.

Un gran porcentaje de estos principios activos son: alcaloides, esteroides, terpenoides, flavonoides, aceites esenciales, gomas, resinas y taninos, que pueden encontrarse distribuidos por toda la planta (Moreno, 2018).

La *Salmonella entérica diarizonae* se aísla con frecuencia del medio ambiente - reptiles de sangre fría, ovejas y humanos-; sin embargo, solo unos pocos estudios describen el aislamiento de esta subespecie de infecciones humanas invasivas. Los factores que contribuyen a este comportamiento inusual se desconocen actualmente.

Se están haciendo estudios para poder identificar por qué está mutando, en Bolivia se están realizando análisis del genoma para poder identificar su virulencia (Lamia, Vinuesa, Betancor, Silva, Bisio, Soletto, Chabalgoity & Puentes, 2019).

Se ha evidenciado que nuestros antepasados utilizaron los vegetales en el tratamiento de sus enfermedades, muchos investigadores están haciendo estudios en el laboratorio a fin de comprobar los efectos de ciertas plantas sobre los microorganismos causantes de enfermedades infecciosas que afectan al ser humano, dado que la flora es muy rica en especies a las que la medicina tradicional atribuye eficaces propiedades terapéuticas, las que sin embargo aún no son investigadas convenientemente en cuanto a todas sus propiedades curativas, como es el caso de la *Vernonanthura patens* (Moreno, 2018).

Según García & Morales (2001), la flora del mundo se ha ido extinguiendo a un ritmo acelerado. Muchos pueblos tradicionales han vivido en armonía con la naturaleza y han utilizado los diferentes productos para cubrir sus necesidades.

Estas comunidades tienen conocimientos profundos acerca de las plantas locales y sus beneficios, con la desafortunada realidad de pérdida debido al cambio ambiental, cultural, social y económico a nivel mundial, demostrando claramente la importancia de estudiar científicamente las plantas, especies silvestres que son desconocidas para la ciencia médica.

Además, se conoce que las plantas enteras o partes de estas, como lo son las flores, frutos, hojas y raíces, son los medios que permiten obtener la mayor cantidad de los compuestos activos de las plantas medicinales que son efectos benéficos para la salud, ya sean en estado crudo o elaborado como cataplasmas, infusiones, té y entre otras.

Sin embargo, es necesario realizar una caracterización química a las plantas medicinales y a sus extractos, para establecer, mediante estudios e investigaciones preclínicas, su toxicidad y eficacia presentes, así como analizar las actividades biológicas en ensayos clínicos en humanos. (Cornejo, 2016).

Antecedentes

Históricos

De acuerdo con Redondo (2017), en México se refiere que la *Vernonanthura patens* (tuete) es una planta medicinal abundante la cual crece y se distribuye en trópicos y subtropicos de ambos hemisferios; en América su distribución abarca desde el sur de Canadá hasta el centro de Argentina. Tiene una altitud de 5-2200, forma biológica árboles, fenología todo el año.

En los países en desarrollo, el uso de este tipo de plantas tiene un beneficio muy marcado, ya que ayuda a la reducción de la importación de los medicamentos. Lo que se pretendía con esta información era fomentar a la población costarricense para que protegiera adecuadamente esa fuente de riqueza, con el fin de que las compañías hicieran las inversiones en la realización de estudios en las plantas naturales, para obtener nuevas alternativas farmacológicas (Redondo, 2017).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2013, elaboró la estrategia sobre medicina tradicional 2014-2023, desarrollada en respuesta a la resolución de la Asamblea Mundial de la Salud sobre medicina tradicional.

Los objetivos de la estrategia consisten en prestar apoyo a los Estados Miembros a fin de que: aprovechen la contribución potencial de la medicina tradicional y complementaria (MTC), el bienestar y la atención de salud centrada en las personas, y promuevan la utilización segura y eficaz de la MTC a través de la reglamentación y la investigación, así como mediante la incorporación de productos, profesionales y prácticas en los sistemas de salud.

Se menciona que desde el año 1945 se previeron los riesgos que se podrían dar por la utilización de los antibióticos. Cuando se empleaban estos en gran escala, las bacterias resistentes se podían seleccionar; desde esa época se empezó a detectar la resistencia a los antibióticos, tales como penicilina y estreptomina.

Ya para los años ochenta se dio a conocer que los enterococos podían adquirir una resistencia a los aminoglucósidos, y así sucesivamente, al pasar los años se ha demostrado el aumento de más resistencias a diversos medicamentos, y cada vez toman más fuerza los microorganismos, para no dejar que los antibióticos actúen inhibiendo su actividad (Hohmann, 2021).

Internacionales

Moreno (2018), en su tesis “Actividad antimicrobiana “*IN VITRO*” del extracto hidroalcohólico de las hojas *Vernonanthura Patens* (laritaco) en cepas de *Salmonella spp*” en los Andes Ecuador, destaca que el objetivo principal de su investigación fue, mediante la extracción y tamizaje de las hojas, evaluar la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de las hojas de la *Vernonanthura patens* en cepas de *Salmonella spp*.

Se realizó en solvente hidroalcohólico donde se mostró cierta actividad, positivo para fenoles, flavonoides, terpenos y auronas, que son metabolitos con potencial actividad antimicrobiana. Una conclusión relevante fue que el extracto de la hoja presentó efecto antimicrobiano *in vitro* contra la *Salmonella spp*.

Castro (2020), en su tesis “Internalización de bacterias asociadas a enfermedades de transmisión alimentaria en *Cándida albicans* y levaduras aisladas desde alimentos”, demostró no solo las altas incidencias o impactos económicos que producen las bacterias, sino que además tienen la capacidad de diseminarse por el ambiente a través de animales de producción asintomáticos o a través de alimentos.

Adicionalmente a esto, la *Salmonella* presenta en la actualidad resistencia a cinco antimicrobianos (ampicilina, cloranfenicol, estreptomomicina, sulfas y tetraciclinas), lo que agrega importancia a su control en los alimentos. El autor que realizó este trabajo indica que el fin era de conocer cómo la bacteria puede sobrevivir durante varias semanas en un ambiente seco y varios meses en agua, resiste a altas concentraciones de sal (9%) y es capaz de sobrevivir hasta 3 semanas.

Manzano, Miranda, Montes, Orellana, Abreu & Peralta (2013) mencionan en su artículo “Estudio químico de los compuestos lipídicos de las hojas, tallos y flores de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. (*Asteraceae*)” demuestran que, a pesar de la complejidad de los componentes informados para el género, para la especie *V. patens* existe poca información, sus usos terapéuticos de la planta son muchos (lavar heridas en humanos y animales por su poder cicatrizante y antimicrobiano, es analgésico, antiinflamatorio, antiparasitario, fungicida y para combatir ciertos tipos de cáncer). Concluyen que los beneficios en potencial no están completamente definidos, pero sí sus propiedades son de más alta concentración en las hojas.

En el artículo “Algunos parámetros farmacognósticos de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. (*Asteraceae*) endémica de Ecuador” de los autores Manzano, Orellana, Miranda, Abreu, Ruiz y Peralta (2013), se tiene como objetivo principal determinar los parámetros físico-químicos de calidad de las flores, hojas y ramas de la especie en estado de fructificación, y los metabolitos secundarios presentes en estos órganos vegetales a través del tamizaje fitoquímico.

Los resultados obtenidos evidenciaron diferencias significativas para algunos índices numéricos y en los resultados del tamizaje fitoquímico entre los diferentes órganos vegetativos, el autor concluyó que las flores en términos generales presentan mayor porcentaje de sustancias solubles en agua y alcohol, menor humedad residual y mayor abundancia en metabolitos secundarios que las hojas y tallos.

Nacionales

Para la recolección de los antecedentes nacionales, al consultar en las bibliotecas de la Universidad Nacional (UNA), Universidad de Ciencias Médicas (UCIMED), Biblioteca Nacional, Biblioteca Nacional de Salud y Seguridad Social (Binass) y Universidad de Costa Rica (UCR) entre otros, únicamente se encontró resultados de información o estudios de la planta *Vernonanthura Patens* (tuete) en la Biblioteca Luis Demetrio Tinoco en la Universidad de Costa Rica.

Las únicas dos tesis encontradas mencionan el estudio de dicha planta con otras propiedades, lo que indica que esta sería la primera investigación realizada a nivel nacional de la planta *Vernonia patens* para determinar si tiene propiedades antibacteriales contra la *salmonella diarizonae*. A raíz de la falta de estudio de la *Vernonia patens* se menciona a continuación algunas de las plantas de la familia *Asteraceae* que han demostrado con estudios positivos su actividad antibacterial.

En el año 2000, en la Universidad de Costa Rica (UCR), Jiménez y Rodríguez, en su tesis de grado para licenciatura en Farmacia, realizaron una investigación titulada “Inhibición de la actividad hemorrágica y proteolítica del veneno de *Bothrops asper* por extractos de las plantas: *Buddleja americana*, *Cissampelos pareira*, *Echinacea purpurea*, *Mikania guaco*, *Piper darienense* y *Vernonia patens*”, la cual tuvo como objetivo determinar la actividad antihemorrágica y antiproteolítica de los extractos acuosos liofilizados de las hojas de las plantas, *Buddleja americana*

(*Loganiaceae*), *Cissampelos pareira* (*Minispermaceae*) *Mikania guaco* (*Asteraceae*), *Piper darianense* (*Piperaceae*) y *Vernonia patens* (*Asteraceae*) y la raíz de la *Echinacea purpurea* (*Asteraceae*), utilizando técnicas que evalúan la actividad de las metaloproteinasas (hemorragias) tanto *in vitro* como *in vivo* (en ratones).

La metodología usada en esta investigación fue a través del método de maceración y extracción, evaporado parcialmente por un rotavapor y sometido al proceso de liofilización, empleando en todos los casos muestras secas y molidas de cada una de las plantas recolectadas. Se llevó a cabo la prueba biológica con actividad antihemorrágica *in vivo*, se llevó a cabo inyectando vía intradérmica en la región abdominal 0,1 ml del extracto.

La segunda prueba realizada para la inhibición de la actividad proteolítica por hemorragias: actividad *in vitro* se realizó mediante placas con disolución albumina aplicando 100 μ L del extracto. Como resultado de esta investigación, se obtuvo satisfactoriamente la disminución del efecto hemorrágico en el extracto de las hojas en estudio, aplicado *in vivo*, también se obtuvieron los resultados *in vitro*, mediante la técnica de cuantificación de la proteólisis, indican que ninguno de los extractos utilizados en la investigación es aptos para inhibir la actividad proteolítica inducida por el veneno de *Bothrops asper* (Jiménez & Rodríguez, 2000).

En el año 2001, en la Universidad de Costa Rica (UCR), Ramírez y Solera realizaron una investigación titulada “Estudio de la inhibición de la actividad mionecrótica e inflamatoria inducida por el veneno de *Bothrops asper* de extractos acuosos de las plantas *Buddleja americana*, *Cissampelos pareira*, *Echinacea purpurea*, y *Vernonia patens*”, la cual tuvo como objetivo determinar la actividad antiinflamatoria y antimionecrótica de los extractos acuosos liofilizados de las hojas de: *Buddleja americana*, *Cissampelos pareira*, *Vernonia patens* y de la raíz de *Echinacea purpurea*, mediante técnicas *in vivo* e *in vitro*.

La metodología empleada en este estudio fue el modelo de edema de pata de rata (*in vivo*), para establecer el efecto antimionecrótico, se midió la actividad de creatinquinasa (CK) (*in vivo*), obteniendo un efecto dosis-respuesta en el intervalo de dosis 50:1 y 250:1. Para medir la actividad de la fosfolipasa A2, PLA2, se realizaron 2 métodos *in vitro*: Dole y hemolisis radial.

Como resultado de esta investigación se demostró que los animales tratados con los extractos acuosos presentaron inhibición del edema provocado por el veneno. El extracto acuoso de *Vernonia patens* fue el que presentó la mayor inhibición mionecrótica.

Con respecto a las plantas medicinas de la familia *Asteraceae* y su relevancia histórica en Costa Rica, se indica la participación en validaciones científicas a través del centro de investigación de la Universidad de Costa Rica, Escuela de Medicina, Laboratorio de Ensayos Biológicos LEBi, UCR-Costa Rica, en el año 2014, dicho centro de investigación trabajó en colaboración con otras instituciones internacionales en la elaboración de la Farmacopea Vegetal Caribeña, con el objetivo de poner a disposición a los pueblos y personal paramédico de base, conocimientos prácticos para el tratamiento con plantas medicinales, sus usos en algunas afecciones comunes en el primer nivel de atención a la salud (Germosén, 2014).

El autor Zúñiga, en el año 2016 en Costa Rica, en su tesis de investigación titulada “Caracterización de la vegetación nativa para la restauración ecológica y foresta urbana de la microcuenca del río Torres, Costa Rica” señala que su objetivo principal fue caracterizar la vegetación nativa para la restauración ecológica y foresta urbana de la microcuenca del río Torres, tomando en cuenta que la familia de la planta *Vernonanthura patens* ha adquirido gran importancia en la multiplicación y conservación de especies en peligro de extinción o amenazadas, la propagación vegetativa se orienta a la reproducción idéntica de plantas con características deseables como la alta productividad, calidad superior o tolerancia al estrés biótico o abiótico y como tal, es muy importante en la permanencia de una característica ideal de una generación a otra.

A manera de conclusión se detectó la necesidad de la participación de la comunidad en este tipo de proyectos, que puede estar sujeto a la introducción de nuevos aspectos y la eliminación de otros, donde se dé importancia y se utilice al máximo el conocimiento empírico de la comunidad, ya que ellos son los que conviven en las áreas degradadas y saben cuáles son los problemas allí presentes y las especies que se pueden utilizar para recuperarlas.

Proyecciones

Se pretende extraer adecuadamente los diversos extractos de las hojas de la planta de *Vernonia patens*, con los cuales se llevará a cabo la parte experimental de la investigación.

Con esta investigación se pretende conocer cuáles son los metabolitos secundarios presentes en la planta *Vernonia patens*, con la ayuda del tamizaje fitoquímico.

Se desea aportar evidencia científica para futuras investigaciones, en las que se pueda formular un medicamento extraído de la planta *Vernonia patens* para combatir la *Salmonella diarizonae*.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

Generalidades de las bacterias

Las bacterias son organismos pertenecientes al reino procariota; son microorganismos unicelulares que se reproducen de manera asexual. Están rodeadas por una pared celular compleja, y existen dos formas: una pared celular Gram positiva con una gruesa capa de peptidoglucanos y una pared celular Gram negativa, con una delgada capa de peptidoglucanos (Barquero, 2011, p. 40).

Se conocen cinco bacterias o sepas contaminantes y son las más comúnmente investigadas en medicamentos y cosméticos: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium spp* y *Salmonella sp*. En primer lugar, la *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo Gram negativo, y es uno de los más importantes patógenos en su género, con respecto al número y tipo de infecciones que causa. Se adapta perfectamente a diferentes ambientes, por esta razón causan infecciones superficiales y graves (Cerra, 2013, p.17).

Entre las infecciones superficiales destacan la foliculitis, las infecciones del canal auditivo, las infecciones en ojos, que están relacionadas con el uso de lentes de contacto y de soluciones de lavado de lentes de contacto contaminadas (estas podrían provocar úlceras de córnea y derivar a la pérdida de la función ocular, si no se tratan correctamente). Entre las infecciones más graves, se puede nombrar la endocarditis por administración endovenosa de medicamentos, que al ser inyectados están disueltos o suspendidos en vehículos acuosos contaminados (Cerra, 2013, pp. 17-18).

Las *Pseudomonas aeruginosa* y otras bacterias Gram negativas son capaces de colonizar los sistemas de purificación de agua por la formación de *biofilms*. Los *biofilms* son masas de microorganismos vivos o muertos, que se acumulan dentro de los reservorios de agua, cañerías u otras superficies inertes, como acero inoxidable de equipos; una vez formadas, son muy difíciles de remover con el uso de agentes sanitizantes. Por este motivo, es importante investigar la presencia de *P. aeruginosa* en las diferentes formas farmacéuticas (Cerra, 2013, p. 18).

Como segundo ejemplo está la *Escherichia coli*, que es parte del microbiota fecal normal del ser humano. No obstante, algunas cepas pueden producir infecciones del tracto urinario, de heridas y entéricas; ocasionalmente pueden producir septicemia y meningitis. Debido al lugar

donde normalmente se encuentra dentro del ser humano, su presencia en las diferentes formas farmacéuticas implicaría contaminación fecal (Cerra, 2013).

En tercer lugar, *Staphylococcus aureus* corresponde a un coco Gram positivo. Es un patógeno oportunista en el ser humano. Sus células son de forma esférica y sus colonias se distribuyen en grupos irregulares a manera de racimo de uvas. Son microorganismos no móviles. No forman esporas. Proliferan fácilmente en la mayor parte de los medios bacteriológicos bajo condiciones aerobias y contienen polisacáridos y proteínas en su estructura celular (Cubero, 2013).

La mayoría de las infecciones causadas por *S. aureus* afectan la piel, como la celulitis, el impétigo y las infecciones postoperatorias en diferentes sitios. Además, pueden ocasionar infecciones mayores como bacteriemia, neumonía, osteomielitis, endocarditis aguda y meningitis. Este microorganismo se encuentra principalmente en la boca, sangre, glándulas mamarias, intestino, tracto genitourinario y vías aéreas respiratorias de sus huéspedes. Por lo tanto, su presencia en un producto farmacéutico, cosmético o en una materia prima, revela que la fuente de contaminación puede ser humana, aunque también puede ser transportado por el polvo, piel, ropa y microgotas de humedad que se generan al moverse, hablar y estornudar (Cerra, 2013, p. 18).

En cuarto término, el *Clostridium spp* es una bacteria que se caracteriza por ser anaerobia, es decir, que no requiere oxígeno para su desarrollo. Se han estudiado más de 150 especies, pero solo aproximadamente 30 han sido asociadas con infecciones en seres humanos; la *Clostridium perfringens* es la especie más frecuente (Cerra, 2013, p. 20).

Este género de bacterias puede causar diversas infecciones en la piel y tejidos blandos. Las más importantes y graves son la celulitis por *Clostridium* o celulitis crepitante, y la necrosis por *Clostridium* o gangrena gaseosa. Los microorganismos anaerobios, especialmente el género *Clostridium*, suelen encontrarse en materias primas de origen natural, talco, almidón y otros; también en hierbas medicinales y medicamentos fitoterápicos (Cerra, 2013, p. 20).

En quinto y último lugar, la *Salmonella sp.*, cuyos elementos son bacilos Gram negativos anaerobios facultativos. Existen más de 2 000 serotipos; sin embargo, las salmonelas que afectan al hombre constituyen un número reducido. Una enfermedad más común producida por la *Salmonella* es la enterocolitis autolimitante, que presenta episodios febriles y diarrea, generalmente con una duración de siete días. (Cerra, 2013, p. 20).

Este microorganismo es parte del microbiota normal del tracto gastrointestinal de animales y humanos. Además, se encuentra abundantemente en la naturaleza; por lo tanto, su presencia puede ser usual en materias primas de origen natural. Las salmonelas poseen una gran habilidad para multiplicarse en un extenso rango de temperatura. También son transmitidas fácilmente de persona a persona, por este motivo su investigación en materias primas de origen natural es sumamente importante (Cerra, 2013, p. 20).

Historia

Los primeros microscopistas pudieron observar y describir los microorganismos que crecían en infusiones y diversas muestras ambientales, en ese momento no se había establecido ninguna clasificación formal. Fue el holandés Antoine van Leeuwenhoek (1632-1723) quien, a través de una lupa, descubrió el microcosmos de los animalículos y les denominó originalmente en holandés “pequeños animales”. A inicios del siglo XVIII, el francés Louis Joblot publicó su obra *Descriptions et usages de plusieurs nouveaux microscopes*, en la cual describió gran variedad de microorganismos que denominó “anguilas del vinagre” (Osorio, 2017).

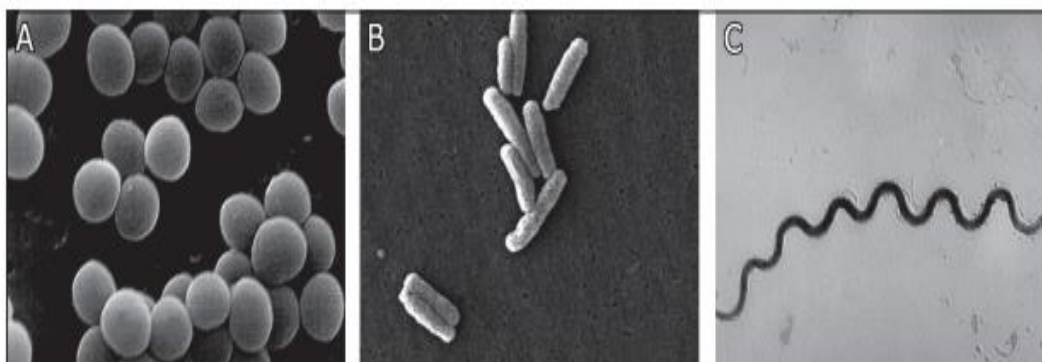
El microscopista danés Otto Federico Müller (1730-1784) fue el primero en clasificar exitosamente los microorganismos denominados infusorios o animalículos. En el año 1773, se publica su obra titulada *Vermium terrestrium et fluviatilium* (Sobre gusanos terrestres y fluviales), en ella se describió por primera vez un microorganismo infusorio que fue denominado Monas, se deriva de la palabra griega μονάς –monas-, (unidad), y que ocuparía una posición prominente en el campo de la bacteriología (Osorio, 2017).

Guerrero & Berlanga (2009) exponen que, hace 150 años, el científico Charles Robert Darwin presentó pruebas de la evolución de los seres vivos en su obra *El origen de las especies*, pero nunca mencionó las bases para determinar de dónde provenían las especies; aun así, estableció una idea universal aplicable y válida hasta hoy, que hace referencia a que todas las especies provienen de predecesores relacionados y que toda la vida está conectada a lo largo del tiempo por formas de vida preexistentes.

El reino procariota presenta bacterias que son microorganismos que presentan capacidad de reproducirse mediante fisión binaria, que al replicar al tiempo su ADN, ocasiona que tengan el mismo genoma cada célula hija. Aunque no se diferencian de manera significativa cuando se

observan en el microscopio, se pueden distinguir tres formas básicas: a las de forma esférica se les conocen como cocos, las alargadas son bacilos, las curvadas y de forma espiral se conocen como espirilos, espiroquetas, comas o vibriones con diferentes características entre ellas.

Figura 1. Morfología bacteriana. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica (A) cocos (B) bacilos y (C) espirilos



Nota: Manual de Microbiología y Parasitología (2013).

Salmonella diarizonae

Según la Farmacopea Europea, la *Salmonella sp.* es una familia de microorganismos muy diversa, se encuentra entre las cuatro causas principales de enfermedades diarreicas. La salmonelosis se estima que afecta anualmente a decenas de millones de personas en todo el mundo y provoca más de 100.000 defunciones. Esta familia de bacterias es la causa de millones de hospitalizaciones en el mundo, aumentando este número hasta 30 veces si se tuviesen en cuenta aquellas infecciones que no llegan a diagnosticarse, ya que comúnmente puede causar un proceso diarreico normal.

De la *Salmonella sp.*, cuyos elementos son bacilos Gram negativos anaerobios facultativos, existen más de 2 000 serotipos; sin embargo, las salmonelas que afectan al hombre constituyen un número reducido. Una enfermedad común producida por la *Salmonella* es la enterocolitis autolimitante, que presenta episodios febriles y diarrea, generalmente con una duración de siete días (Cerra, 2013, p. 20).

En la actualidad se reconocen dos especies: *Salmonella entérica*, la que incluye las subespecies I, II, IIIa, IIIb, IV y VI, y la *Salmonella bongori*, con la subespecie V. Dentro de estas existen más de 2500 serotipos.

El serotipado es un método que se utiliza para diferenciar cepas de *Salmonella* más allá del nivel de subespecie, las cuales se clasifican de acuerdo con el antígeno flagelar (H) y el antígeno somático (O); algunas cepas presentan un tercer antígeno llamado K o Vi (Soto, Pérez & Estrada, 2016, p.107).

Figura 2. Serotipos para cada subespecie de Salmonella

Especie	Subespecie	Numero de serotipos
<i>Salmonella enterica</i>	<i>entérica</i> (I)	1 531
	<i>salamae</i> (II)	505
	<i>arizonae</i> (IIIa)	99
	<i>diarizonae</i> (IIIb)	336
	<i>houtenae</i> (IV)	73
	<i>indica</i> (VI)	13
<i>Salmonella bongori</i> (V)		22
Total		2 579

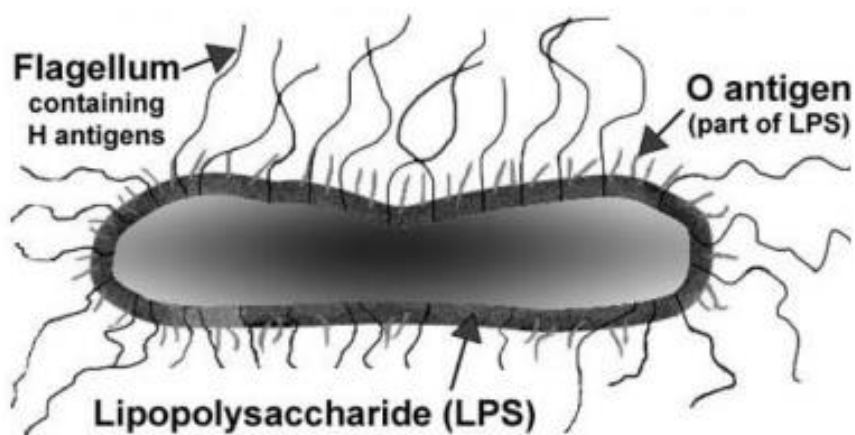
Nota: https://www.synapticpg.com/dinf_bac_salm_fisiop.html.

Alfaro (2018) menciona la caracterización de los antígenos de la siguiente manera:

El antígeno somático O: son antígenos de la pared bacteriana, con una naturaleza de polisacárido, siendo la porción externa un polisacárido (LPS). Está compuesto por 4 o 6 azúcares y epítomos específicos, dentro de este se dividen en dos categorías: 1- Antígenos del grupo O: estos se asocian con la configuración del azúcar que representa el núcleo de la estructura del antígeno O. 2- Antígenos de O auxiliares: son hidratos de carbono adicionales que se agregan a la estructura del núcleo O. Antígeno flagelar H: es la parte filamentosa del flagelo bacteriano; que se compone de subunidades de proteína llamadas flagelinas. La *Salmonella* es la única entre las bacterias entéricas que puede expresar dos antígenos diferentes de flagelina, a los

cuales se les conoce como Fase I y Fase II. Antígeno K o Vi: Únicamente existe en *S. typhi*, *S. paratyphi* y *S. dubli*. La presencia de este antígeno hace posible la aglutinación de suero anti O, además la expresión de este factor es dependiente de la expresión conjunta de dos genes (ViA Y ViB). (p.112).

Figura 3. Antígenos de superficie de la *Salmonella*



Nota: Herrera y Jabid (2015).

Este microorganismo es parte del microbiota normal del tracto gastrointestinal de animales y humanos. Además, se encuentra abundantemente en la naturaleza; por lo tanto, su presencia puede ser usual en materias primas de origen natural.

Las salmonelas poseen una gran habilidad para multiplicarse en un extenso rango de temperatura. También son transmitidas fácilmente de persona a persona; por este motivo su investigación en materias primas de origen natural es sumamente importante (Cerra, 2013, p. 20).

Figura 4. *Salmonella diarizonae*

Nota: Castro (2014).

Clasificación taxonómica de la *Salmonella diarizonae*

La *Salmonella sp* presenta una clasificación de cinco especies: *Salmonella diarizonae*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi* y *Salmonella typhimurium*. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que existen solo dos especies, la *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*, las anteriormente expuestas se reconocen como subespecies (Pachón, 2009, p. 22).

Figura 5. Clasificación taxonómica de la *Salmonella diarizonae*

Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	Salmonella
Especie	Entérica

Nota: Tomado de Melo (2015)

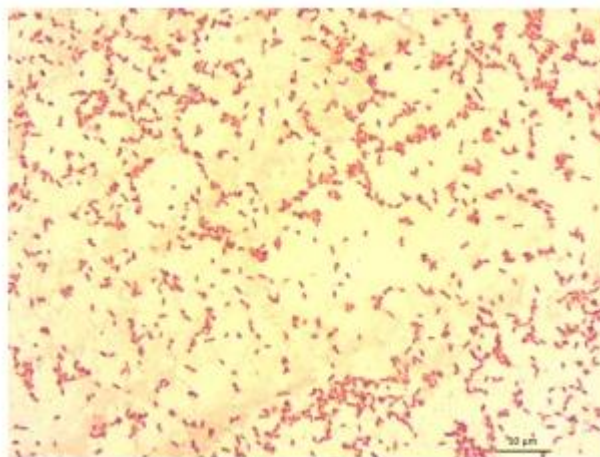
Bacteria Gram negativa para el estudio

Las enterobacterias son bacilos Gram negativos cortos. Se han ideado muchos medios complejos para la identificación de las bacterias entéricas. Uno de esos medios es triple agar azúcar-hierro (TSI), a menudo ayuda a diferenciar salmonelas y shigelas de otras bacterias Gram negativas entéricas. La *salmonella* y *shigelas* típicamente producen una inclinación alcalina y un tope ácido. Se pueden identificar por su coloración roja en el medio urea de Christensen. (Brooks, Butel, Carroll, Mietzner, & Morse, 2013).

Según han mencionado Mollinedo & González (2014), gracias al bacteriólogo danés Hans Christian Joachim Gramen (1844), que desarrolló la técnica de coloración denominada Tinción de Gram, se establece que una característica de las bacterias Gram negativas es que estas poseen una pared celular delgada, además de que está unida por lipoproteínas a otra membrana plasmática externa, la cual es soluble en solventes orgánicos y la capa de peptidoglucano es muy delgada y no retiene el complejo de cristal violeta, y por lo tanto no es posible su tinción azul violácea.

Los bacilos Gram negativos son los agentes más importantes en el deterioro de los alimentos y al mismo tiempo los patógenos más relevantes de origen entérico transmitidos por alimentos. Dentro de la enterobacteria se destaca el género *Salmonella*. Es considerada como una especie llamada *Salmonella* entérica con sus seis subespecies y diversos serotipos (Black, 2012).

Figura 6. *Salmonella* entérica vista por medio de Tinción de Gram



Nota: <https://cepariounicach.wordpress.com>

Familia *Enterobacteriaceae*

Chaves, García & Roja (2006) mencionan que las especies pertenecientes a esta familia, por lo general, tienen una característica en común, la cual es que todos son Gram negativos; cabe recalcar que este tipo de especies se puede encontrar en general en todos los sitios, tales como: plantas, suelo, aguas y en los intestinos, tanto de los animales como de las personas.

Según Alcaráz, Aliendro, Centorbi, Echenique, Mattana & Satorres (2017), las especies de estas familias se conforman, por ejemplo, la *Salmonella typhi* solo se encuentran en los humanos, y en el caso de *Klebsiella pneumoniae*, la cual sí esta diseminada a nivel del ambiente, y no solo en específico en humanos.

Esta familia se subdivide en ocho géneros, en los cuales se clasifican los tipos de bacteria en cada género; esto se hace de acuerdo con las características morfológicas, bioquímicas, genéticas, entre otras, de cada cepa bacteriana; también se recalca la existencia de diversos métodos a nivel de laboratorio, los cuales tienen como objetivo realizar la clasificación de estas cepas.

Etiología de las infecciones

Se refiere con la aparición de condiciones patológicas asociadas a *Salmonella*, el consumo de alimentos contaminantes como es el caso del huevo, la carne cruda, los mariscos, así como frutas y verduras sin lavar. Las aves infectadas pueden contaminar vía transovárica los huevos, no siendo la cascara suficiente barrera para evitar la contaminación. En cuanto a las frutas y vegetales, se pueden contaminar por su lavado con agua contaminada o a la hora de la coacción por el contacto con otros alimentos (contaminación cruzada). (Alfaro, 2018).

Figura 7. Bacterias frecuentemente halladas en los alimentos

Alimentos	Microorganismos
Carnes rojas y aves	<i>Acinetobacter, Aeromonas, Alcaligenes, Campylobacter, Corynebacterium, Enterobacteriaceae, Flavobacterium, Kocuria, Listeria, Micrococcus, Moraxella, Pseudomonas, Psychrobacter, Shewanella, Vagococcus</i>
Carnes procesadas	<i>Acinetobacter, Bacillus, Brochothrix, Clostridium, Enterococcus, Lactobacillus, Pseudomonas, Proteus, Staphylococcus, Weissella</i>
Huevos y subproductos	<i>Acinetobacter, Aeromonas, Alcaligenes, Enterobacter, Escherichia, Flavobacterium, Micrococcus, Pseudomonas, Proteus, Salmonella, Serratia, Staphylococcus</i>
Pescados y mariscos	<i>Aeromonas, Moraxella, Pseudomonas, Proteus, Psychrobacter, Shewanella, Vibrio</i>
Leche	<i>Alcaligenes, Bacillus, Clostridium, Flavobacterium, Lactobacillus, Micrococcus, Pseudomonas, Staphylococcus, Streptococcus</i>
Frutas y hortalizas	<i>Bacillus, Corynebacterium, Clostridium, Paenibacillus, Pantoea, Pectobacterium, Pseudomonas, Streptomyces</i>
Zumos de frutas y hortalizas	<i>Acetobacter, Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus</i>
Cereales y harinas	<i>Bacillus</i>

Nota: Black, J. (2012).

Condiciones de vida de la *Salmonella*

Son organismos delicados, su multiplicación puede darse en diversas condiciones ambientales fuera de los anfitriones en que viven, puede crecer en presencia de 0,4 a 4%, la mayoría requiere de los serotipos de *Salmonella* se desarrolla en un rango de temperatura de 5° C a 47 °C, siendo 35 °C a 37 °C su óptima, sobreviven a un pH con rangos de 4-9. La *Salmonella* es sensible al calor y con frecuencia mueren a temperaturas de 70 °C o superiores (Alfaro, 2018).

Tabla 1. Parámetros de vida de *Salmonella sp*

Parámetro	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura	2-4 °C	35-37 °C	54 °C
pH	4	6,5-7,5	9
NaCl	0,4%	---	4%
Actividad acuosa	0,94	0,99	0,99<

Nota: Alfaro (2018, p.113).

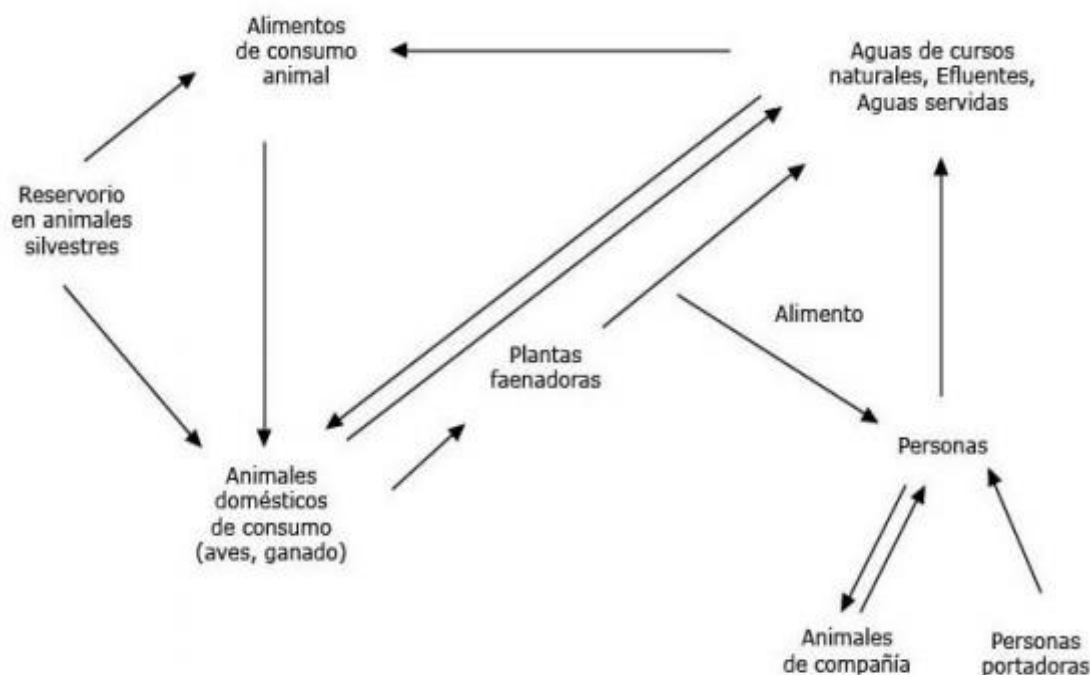
Epidemiología

A nivel epidemiológico, las infecciones causadas por *Salmonella* varían ampliamente dependiendo del tipo de *Salmonella spp.* La *S. typhi* y la *S. paratyphi* son las causantes de la fiebre tifoidea que a su vez es causante de una enfermedad muy grave y con desenlace mortal, afecta principalmente a las comunidades en naciones de muy largas distancias donde la población es un poco olvidada y poco visitada.

Las infecciones causadas por *Salmonella NO-typhi* (NTS) son autolimitantes y esto ocasiona mayor prolongación, afectando comunidades a nivel mundial. Los países de alta incidencia (más de 100 casos por 100 000 habitantes) coinciden con naciones ubicadas en el Centro y Sur de Asia, así como en el suroeste de ese mismo continente. (Alfaro, 2018).

Transmisión de la bacteria *Salmonella sp*

Existen dos tipos de *Salmonella* que colonizan a los humanos, la *S. typhi* y la *S. paratyphi*, lo cual es indispensable para la transmisión la presencia de casos humanos o de portadores crónicos. En los países en desarrollo es donde se observa la mayor cantidad de casos con fiebre tifoidea, debido al rápido crecimiento de la población, sus malos hábitos de higiene, manejo inapropiado de desechos y fuentes de agua potable mal tratadas. La salmonelosis no-typhi se presenta como resultado del consumo de alimentos de origen animal contaminados con dichos microorganismos. En la siguiente figura se puede observar el ciclo de transmisión de *Salmonella sp*.

Figura 8. Ciclo de transmisión de *Salmonella* sp.

Nota: Vargas (2011).

Infecciones asociadas a la *Salmonella diarizonae*

Según Rincón, Ramírez & Vargas (2011), las infecciones de origen alimentario causadas por *Salmonella* son más frecuentemente asociadas al serotipo *Enteritidis*, y tienen distribución a nivel mundial, solo en los Estados Unidos se presentaron un total de 121 brotes de *Salmonella* sp. en el año 2006, causando más de 3300 casos reportados por el Sistema de información del Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades.

En los Estados Unidos los alimentos a base de huevo o que contienen huevo como parte de sus ingredientes han sido descritos como la fuente del 75% de los brotes alimentarios como vehículos confirmados desde 1985 a 2006. Las enfermedades de transmisión alimentaria por *Salmonella* sp. aparecen como la segunda causa más frecuente de enfermedad transmitida por alimentos.

Resistencia antimicrobiana por *Salmonella diarizonae*

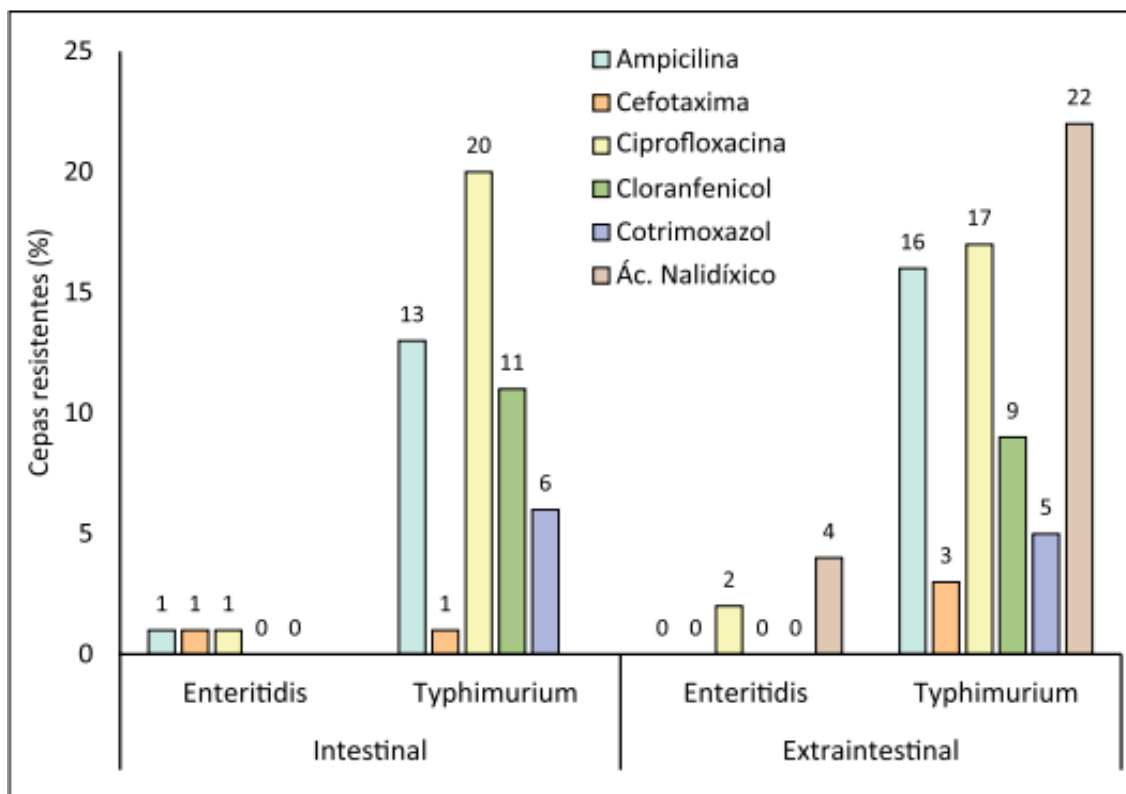
La resistencia antimicrobiana se ha considerado como una amenaza creciente a nivel global, esto se debe a la variedad de antimicrobianos que son prescritos de manera inadecuada y a la automedicación desmedida, en la medicina humana y animal, facilitando de esta manera la dispersión de patógenos resistentes a estos fármacos.

La OMS ha definido una lista de antimicrobianos que deben usarse de forma prudente y preferiblemente con ciertos patógenos y bajo ciertas condiciones específicas para cada paciente (Barreto, Castillo & Retamal, 2016).

En los últimos años, diferentes estudios han reportado un aumento de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella spp* aisladas de alimentos de origen animal. La acelerada resistencia antimicrobiana de *Salmonella spp* ha sido atribuida al uso extenso de antibióticos, tanto en la terapia humana como animal. En el comercio pecuario en particular, los antibióticos no solo se usan con fines terapéuticos, sino que además se utilizan como promotores de crecimiento en dosis terapéuticas durante largos periodos. (Quesada, Reginatto, Ruiz, Colantorio & Burrone, 2016).

De acuerdo con Alfaro (2018), en la actualidad existen reportes en humanos de *S. typhi* y *S. paratyphi* resistentes a antibióticos como: cloranfenicol, β -lactámicos, TMP-SMX, azitromicina y un crecimiento mayor de resistencia a fluoroquinolona.

Entre 2001 y 2003 se analizaron 786 aislamientos obtenidos de materia fecal o sangre en diversos centros médicos de América del Norte y América Latina mediante micro dilución en caldo de cultivo, de estas 89 (11,3 %) de las muestras eran resistentes a ácido nalidíxico. Durante el año 2001, nueve localidades aportaron 11 (2,9 %) de las cepas que tenían resistencia a los antibióticos aztreonam, ceftazidima o ceftriaxona. La presencia de cepas multirresistentes varía entre países, pudiendo establecerse en un rango de 16-37 %.

Figura 9. Porcentajes de cepas resistentes de *Salmonella entérica*

Nota: Barreto, Castillo & Retamal (2016, p.550).

Tratamiento para la *Salmonella diarizonae*

El tratamiento para las infecciones por *Salmonella* varía de acuerdo con los síntomas que se presentan, la terapia antibiótica se deja para última opción, en caso de gastroenteritis complicadas no se recomienda. Cuando se complica y se vuelve sistémica se recomienda antibióticos que se concentren en el sistema linfático, como el cloranfenicol y la ampicilina.

Para los portadores crónicos se recomienda en primera línea ciprofloxacina 500 mg cada doce horas o levofloxacino, el tratamiento por 7-10 días, la ampicilina o amoxicilina también es de elección. En ocasiones el tratamiento se basa en líquidos y electrolitos, control de náuseas, vómitos y dolor abdominal.

Entre los nuevos antimicrobianos estudiados se destacan las quinolonas y las cefalosporinas de tercera generación. Las 4-fluoroquinonas constituyen una terapia adecuada en todas las formas de salmonelosis (Herrera & Jabid, 2015).

Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (antibiograma)

La resistencia de las bacterias es el principal obstáculo para una terapia con antibióticos eficaz, esto debido no solo a que puede anular la acción curativa si se manifiesta en el transcurso del tratamiento, sino que a la larga tiene consecuencias aún más graves para los pacientes, provocando la desaparición de las cepas susceptibles y la propagación de las resistentes. De ahí la importancia de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos y la necesidad de crear conciencia del uso racional y para preservar la eficacia de este grupo tan valioso de agentes terapéuticos (Pedrique, 2002).

Los antibiogramas son métodos *in vitro* que establecen la susceptibilidad de los microorganismos a una variedad de agentes antimicrobianos, bajo condiciones de laboratorio específicas y estandarizadas. Lo que se busca es ofrecer al clínico algunas recomendaciones sobre la terapia que puede ser más apropiada y cuáles son los pacientes y la infección específica.

En el método seleccionado, lo más importante va a ser el medio de cultivo por emplear, que permita un buen desarrollo del microorganismo cuya sensibilidad se determina y además no debe ejercer ningún efecto inhibitorio sobre la actividad antibacteriana de los antibióticos (Pedrique, 2002, p 3).

Usualmente se utiliza el agar Mueller-Hinton en las pruebas de sensibilidad de microorganismos aeróbicos de rápido crecimiento. De los métodos existentes, el más popular es el del disco de papel. La variante más utilizada en este método es la de Kirby Bauer, la cual consiste en utilizar una sola concentración de antibiótico y medir el tamaño de la zona de inhibición.

Plantas medicinales

Desde la Antigüedad, el descubrimiento de un hombre que apareció congelado en Los Alpes con más de 3500 años de fallecido, que se encontraba perfectamente conservado y contenía entre sus pertenencias, varios frutos de *Piptous betulinus*, identificado con actividad antifúngica, antiparasitaria y frente a especies del género *Mycobacterium*, conduce a una idea del conocimiento empírico del habitante de aquellas épocas sobre el beneficio que producía el consumo de algunas plantas (Shiva, 2007, p.14).

El uso de las plantas con propiedades medicinales se remonta al principio de la historia de la humanidad, 3000 años antes de Cristo fue redactado el libro más antiguo sobre plantas medicinales en China; los sumerios, 2500 años antes de Cristo, usaron las plantas con fines curativos; los asirios conocieron un poco más de 250 plantas medicinales. En Colombia y muchos países esta práctica tiene sus raíces en una amplia herencia cultural gracias al legado de diversas culturas (indígenas, africanas y europeas) que durante años en sus rituales medicinales y gastronómicos han utilizado las plantas con fines curativos, aromáticos o culinarios (Sierra, Barros, Gómez, Mejía & Suarez, 2018).

Las plantas medicinales representan alrededor del 25% del total de las recetas médicas en los países comerciales. En los países en desarrollo se usan las plantas medicinales en un porcentaje del 80% terapéuticamente. Las plantas medicinales son utilizadas como materia prima para la elaboración de extractos o para aislar las sustancias puras.

Los países en desarrollo -donde vive el 75% de la población mundial- consumen menos del 15% del mercado total de medicamentos por el difícil acceso. Por tal razón, el uso de plantas medicinales es su único recurso terapéutico disponible (Martínez, Bernal & Cáceres, 2000, p 67).

Los autores Martínez, Bernal & Cáceres (2000) hacen mención al concepto de planta medicinal, al describir lo siguiente:

El concepto de planta medicinal es bastante amplio si tomamos en consideración que la mayoría de especies de plantas superiores tiene un potencial de uso terapéutico. Se puede decir que una planta medicinal es aquella especie silvestre, cultivada o manejada que ha sido utilizada por el hombre a través del tiempo porque se han descubierto en ella propiedades que ayudan en el tratamiento o prevención de una enfermedad o padecimiento.

El efecto medicinal de una planta este contenido en sus principios activos, los cuales son un complejo de compuestos químicos entre los que pueden mencionarse los glucósidos, alcaloides, aceites esenciales, taninos, y otros que la planta ha desarrollado a través de la evolución orgánica y los produce como un

mecanismo de defensa o sobrevivencia y que tienen un efecto sinérgico en su acción como droga. (p.2).

Resulta de carácter urgente documentar el conocimiento sobre especies útiles, dar a conocer nombres comunes y todo tipo de información de sus usos populares en diversas sociedades que tienen la historia natural y la utilización de las plantas. La riqueza de conocimiento acumulado durante milenios por la medicina folclórica se ha convertido en la moderna disciplina de la etnofarmacología, el estudio crítico de las medicinas nativas, que recientemente ha alcanzado un nivel independiente (León & Poveda, 2000).

Figura 10. Plantas medicinales, extractos y aceites



Nota: Sierra, Barros, Gómez, Mejía & Suarez (2018).

Extractos de plantas

Los extractos de plantas medicinales se han utilizado desde hace siglos para combatir un gran número de procesos patológicos. En la actualidad, los extractos naturales de plantas son una industria que mueve millones de euros en el mundo entero. Se reconocen aproximadamente 1.340 plantas como potenciales fuentes de componentes antimicrobianos, pero se conocen más de 250.000 especies de plantas que contienen una amplia diversidad de componentes bioactivos.

Solo en el año 1999 el negocio global de la venta de suplementos naturales de plantas en humanos excedió los 15 billones de dólares, de los cuales 7 billones fueron en Europa, 2,4 billones en Japón, 2,7 billones en el resto de Asia y 3 billones en Norte América (Shiva, 2007, p.15).

Los extractos naturales deben su actividad biológica al sinergismo entre sus diversos compuestos ya que por separado la actividad es mucho menor que cuando son potenciados. En cuanto a la toxicidad de los extractos, es menor cuando se encuentran todos los compuestos que cuando se encuentran purificados, esto se denomina *buffering*. Los mecanismos de acción exactos de la mayoría de los extractos naturales no se conocen de forma exhaustiva, pero se sabe que, generalmente, deben su actividad bacteriostática o bactericida a la sobrecarga a la que someten a la membrana celular de los microorganismos. (Martínez, Bernal & Cáceres, 2000, p.80).

En diferentes zonas de Ecuador, los pobladores emplean los extractos de la planta *Vernonia patens* para lavar y desinfectar heridas, dadas sus propiedades cicatrizantes, así como también contra el dolor de cabeza en los humanos con sus propiedades de acción analgésica. Uno de sus usos más comunes por los habitantes del Cantón Marcabeli, provincia de El Oro, es su poder antiinflamatorio, además antitusivo y para combatir algunos tipos de carcinomas (Manzano, 2018).

Generalidades de la planta *Vernonia patens*

La planta de *Vernonia patens* (tuete) pertenece a la familia *Asteraceae*, esta planta crece desde México hasta el sur de América, es originaria de México y Suramérica, encontrándose distribuida en México, Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, Venezuela, Bolivia, Colombia, Ecuador y Perú.

Es muy común en el Valle Central de nuestro país. Generalmente se encuentra cerca del nivel del mar, pero también aparece hasta aproximadamente 1500 m de elevación en áreas tupidas.

Es un arbusto de 3 m de altura, ramas erectas, hijas cortas pecioladas; peciolo de 2-10 cm de largo, las hojas son de lanceoladas a estrechamente oblongadas, agudas o acuminadas en el ápice, obtusas en la base, de 3-15 cm de largo y 1,3 cm de ancho, rugosas y casi glabras, con venas laterales de 8-20 pares. Inflorescencia en las ramas, corimbos con 21-27 flores, sin peciolo o semi pecioladas, están sin follaje (Moreno, 2018).

Figura 11. Fotografías de planta *Vernonia patens*, Mercedes norte de Puriscal

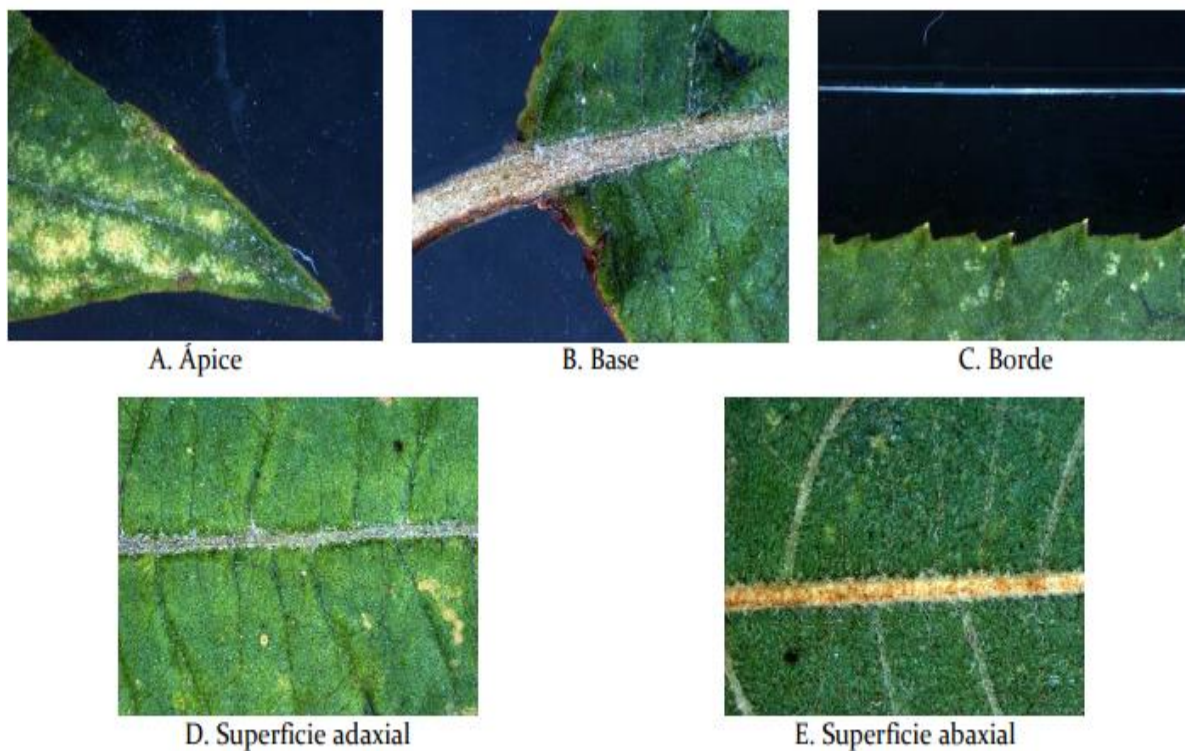


Nota: Elaboración propia (2021).

Los autores Manzano, Miranda, Gutiérrez, Santos & Scull (2014) mencionan en su artículo que Durante la evaluación morfológica de las hojas de *V. patens*, específicamente la lámina foliar, exhibió un tono color verde claro más brillante por el haz, con superficie glabra; al revés pubescente de color verde intenso, forma lanceolada, penninervia, peciolada con presencia de tricomonas, aserrada en los bordes, de base redondeada y ápice acuminado.

Respecto a las dimensiones de las hojas, en la población estudiada varían de 7,0 17,6 cm para el largo y de 2,2 a 5,8 cm para el ancho. En la Figura 12 se observan las características macromorfologías de las hojas de *V. patens*, con detalle.

Figura 12. Características macro morfológicas de las hojas de *V. patens*



Nota: Manzano, Miranda, Gutiérrez, Santos & Scull (2014).

De acuerdo con el artículo de los autores Manzano, Miranda, Gutiérrez, Santos & Scull (2014), se observa claramente las dimensiones de las hojas de la planta *V. patens*, es un dato muy interesante debido a que los países donde se encontró información fueron Ecuador, Cuba, Colombia y Costa Rica. En el siguiente cuadro se refleja que la hoja con diámetro más pequeño es la de Costa Rica.

Tabla 2. Estudio de las dimensiones de las hojas de *V. patens*

Parámetros (cm)	Observado <i>V. patens</i> Ecuador					Referenciado <i>V. patens</i> Colombia Costa Rica	
	Media \pm IC	Mínimo	Máximo	Curtosis	Asimetría	Blair y Madrigal, 2005	Rodríguez, 2005
Largo	12,85 \pm 0,76	7,00	17,60	-0,567	-0,116	7 - 15	1 - 22
Ancho	4,21 \pm 0,23	2,20	5,80	-0,312	-0,059	1,3 - 4,2	0,3 - 7,5

Nota: Manzano, Miranda, Gutiérrez, Santos & Scull (2014).

Tabla 3. Taxonomía de la planta *Vernonia patens*

Nombre común	Tuete
Nombre científico	<i>Vernonanthura patens</i>
Reino	<i>Plantae</i>
Familia	<i>Asteraceae</i>
Subfamilia	<i>Cichoriodeae</i>
Género	<i>Vernonanthura</i>
Clase	<i>Magnoliophyta</i>
Especie	<i>Patens</i>
Orden	<i>Asterales</i>
Phylum	<i>Magnoliophyta</i>
Sinonimia	<i>Vernonia patens</i>

Nota: Moreno (2018).

Composición química de la *Vernonia patens*

Estudios realizados en el Cantón Marcabeli, Provincia de El Oro, Ecuador, presentan los siguientes resultados: en las flores, hojas y ramas de la planta *Vernonia patens*, en el estudio fitoquímico realizado se detectó presencia de catequinas, lactonas, triterpenos-esteroides, fenoles y taninos, aminoácidos y flavonoides, sin embargo, se observaron diferencias en las intensidades y coloración a la reacción respecto al órgano vegetal. Para las hojas las saponinas, lactonas y compuestos reductores resultaron negativos (Moreno, 2018).

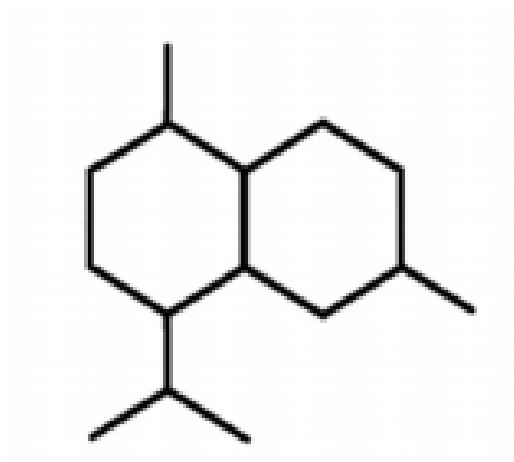
La planta *Vernonia patens* ofrece una amplia cantidad de sesquiterpenos, aunque en sus hojas hay ausencia de lactonas sesquiterpénicas. En la siguiente tabla se muestra su composición química (Jiménez & Rodríguez, 2000).

Tabla 4. Composición química de *Vernonia patens*

8-alfa-(2-metilacrililoixi) compactiflorido.
8-alfa- angeloliloxiccompactiflorido.
13-O-acetato, 8-alfa-angeloiloxi-10-alfa-hidroxi-1-desoxihirsutinolido.
13-O-acetato, 8- alfa – angeloiloxihirsutinolido.
13-O-acetato, 8-alfa -angeloiloxi-4-alfa-5-alfa-epoxi jacalguayanolido.
8-alfa-angeloiñoxi-4-alfa-5alfa-epoxi-13-O- metiljacalguayanolido.
8-alfa-angeloiloxi-4-alfa-5-alfa-epoxijacalguayanilido.
8-O-angelato-vernopatensolido.

Nota: Rodríguez (2000).

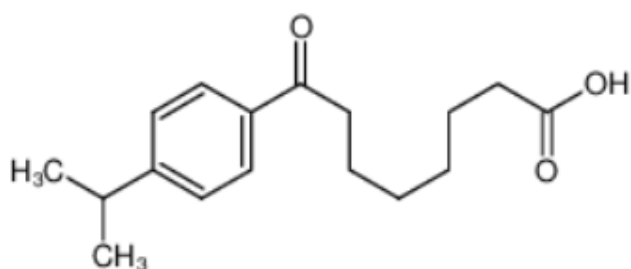
Figura 13. Estructura química del Sesquiterpeno



Nota: Silva, Cruzado, González, García, Ruiz, Villareal & Gamarra (2018).

Dentro de los isoprenoides se destacan varios grupos, como hemiterpenos (formados solamente por una unidad isoprenica, monoterpenos (formados por dos unidades isoprenicas y engloban a la mayoría de las sustancias volátiles, como aceites esenciales), sesquiterpenos (formados por tres unidades isoprenicas), entre otros (Palma, 2019, p.13).

Figura 14. Molécula 8-alfa- angeloliloxicompactiflorido



Nota: Jiménez y Rodríguez (2000).

Usos más comunes de la planta *Vernonia patens*

La medicina tradicional y popular utiliza las cocciones de las hojas de la planta *Vernonia patens* con el fin de combatir y disminuir los síntomas de paludismo, dolores de parto, post parto y estomacales, erupciones en la piel diarreas y como antihelmíntico, se ha utilizado en la práctica veterinaria, en curaciones de heridas infectadas de animales a través del lavado con mezclas de plantas en las que se incluyen las hojas de la planta *Vernonia patens* (Manzano, 2018).

En países como Ecuador, donde la planta tiene mucho uso, los pobladores de la parte suroeste de Loja la utilizan para lavar heridas, debido a su poder cicatrizante, así como su acción analgésica, también para el dolor de cabeza. Ha demostrado muchas propiedades antiinflamatorias, como antitusivo, y para combatir ciertos tipos de cáncer. Reportes han confirmado su acción curativa para la leishmaniasis, es usado en la preparación de suero antiofídico, y las hojas para combatir el pie de atleta, entre otros usos (Moreno, 2018).

Las hojas se usan en forma de infusión, como antiinflamatorio y hemostático. Las flores, en maceración preparada similar al anterior, se emplean como estimulante en atonía intestinal. La corteza, en forma de lavados intestinales, se usa contra el estreñimiento. En Panamá las hojas y flores de capullo se utilizan como antipirético. (Gupta, 1996).

Actividad farmacológica y biológica

La especie *Vernonia patens*, de la familia *Asteraceae* ha presentado actividad fototóxica frente a *Bacillus subtilis* (ATCC-6633) en tallos de plantas jóvenes de *V. patens*. Los tallos y hojas también mostraron actividad antiinflamatoria y potencial bactericida (Pérez, Muñoz Pérez & García, 2008). El extracto acuoso de las hojas produjo disminución, a un nivel leve, de la actividad antihemorrágica (Badilla, Chávez, Poveda, Jiménez y Rodríguez, 2006).

La especie *Vernonanthura patens* recoge información sobre su composición química desde 1975, en Ecuador se ha utilizado de manera casera por sus propiedades para lavar heridas en humanos y animales por su poder antimicrobiano, entre otras; sin embargo, es compleja la información de los componentes para la especie *V. patens* en particular, existe poca información (Manzano, Miranda, Montes, Orellana, Abreu & Peralta (2013).

En el año 2018, Moreno menciona en su trabajo de investigación que el extracto hidroalcohólico de las hijas de *Vernonanthura patens* mostró efecto antimicrobiano *in vitro* contra la *Salmonella spp.* Asimismo, recomienda realizar estudios en otras partes de la planta, para verificar si podrían tener mayor actividad antimicrobiana frente a la *Salmonella spp.* u otras bacterias.

Algunas especies de la familia *Asteraceae* han presentado actividad antibacteriana, como es el caso de *Tagetes lucida*, el extracto acuoso de la flor seca *in vitro* contra *Escherichia coli* entero patógena, *Salmonella enteritidis*, *S. typhi*, *Shigella dysenteriae* y *S. flexneri*, a raíz de estos datos se busca identificar propiedades antibacterianas en las hojas de *V. patens*. (Germosén, 2014, p.353).

Tamizaje fitoquímico

Las plantas medicinales sintetizan, a partir de su metabolismo primario, sustancias químicas conocidas como metabolitos secundarios, a los cuales también se les llama principios activos. Los metabolitos secundarios ejercen acción farmacológica, ya sea beneficiosa o perjudicial sobre el organismo. Es de gran interés el tamizaje fitoquímico ya que brinda la oportunidad de encontrar nuevos agentes activos en las plantas a partir de una fuente de materia prima renovable (Remón, Alarcón, Almeida, Viera, Ramos & Bazan, 2012).

El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta o material vegetal con solventes apropiados y la aplicación apropiada con las reacciones de coloración establecidas, esta debe permitir la evaluación rápida con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo.

Con los resultados del tamizaje fitoquímico únicamente se da una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados del tamizaje farmacológico. Entre los metabolitos secundarios encontrados frecuentemente en las plantas se puede mencionar a los terpenos, esteroides, flavonoides, cumarinas, quinonas, alcaloides, terpenos, entre otros (Cruz & Gutiérrez, 2015).

Metabolitos secundarios

Las plantas producen una amplia gama de compuestos orgánicos que no están involucrados en el metabolismo primario, no poseen roles reconocidos en los procesos de asimilación, respiración, transporte y diferenciación y que también difieren de los metabolitos primarios, por su distribución restringida en el reino vegetal, lo que significa que un metabolito secundario generalmente se halla en una sola especie, como medio de defensa al ataque de insectos, microorganismos y para su misma adaptación a ambientes adversos, como altas temperaturas, humedad, intensidad de luz, sequias, etc.

En la actualidad se reportan más de 200.000 estructuras definidas de compuestos secundarios, lo que demuestra el gran escenario que aún se requiere ser investigado. (Vélez, Campos & Sánchez, 2014, p 490).

Los metabolitos secundarios se agrupan en cuatro clases principales: terpenos, compuestos fenólicos, alcaloides y glucósidos. También hay, en menor cantidad, hidrocarburos, aldehídos, alcoholes, ácidos grasos, amidas, y ésteres, que son en gran medida responsables de muchos aromas en las plantas, posible actividad biológica, o son precursores de otros metabolitos secundarios (Martin, 2017, p.83).

Cuando una planta demuestra mezcla de metabolitos secundarios se debe tener el conocimiento de que es única para cada especie, presentando variaciones a lo largo del año, ya que los diferentes factores, como la radiación, el estado fenológico de la planta, la edad, nutrición, el estrés hídrico, procedencia geográfica, precipitación, interacción con herbívoros, condiciones de recolección del vegetal, entre otros, influyen para que generen mecanismos de adaptación entre ellos (Sepúlveda, Torres, Sandoval, Martínez & Chan, 2018, p 82).

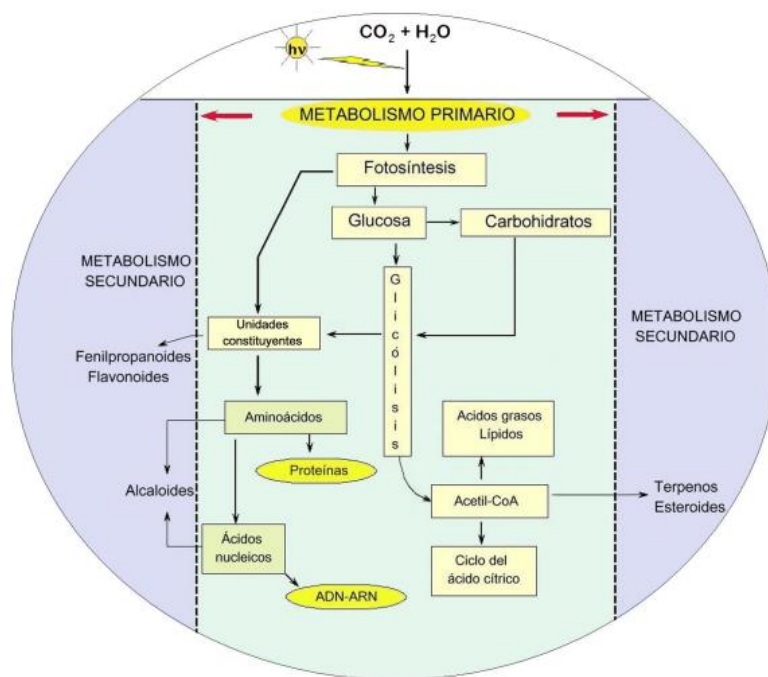
Los autores Sierra, Barros, Gómez, Mejía & Suarez (2018) indican:

A través del tiempo, la población ha usado los metabolitos secundarios en diferentes campos con la finalidad en el uso como saborizantes, colorantes, fragancia, insecticidas, drogas medicinales y adictivas, y cosméticos. Los metabolitos secundarios que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos,

aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinalatos. Los no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, polocéticos y fenilpropanoides.

La síntesis de metabolitos secundarios depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos, se incrementan como respuesta al estrés abiótico o biótico. Este aumento en los niveles se deriva del metabolismo primario y porque algunos compuestos son tóxicos para la misma planta. (p. 11).

Figura 15. Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas.



Nota: Avalos & Pérez (2009).

Fenoles

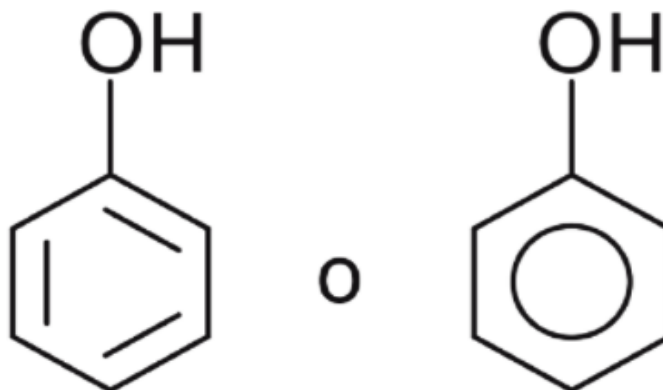
Los compuestos fenólicos forman parte de uno de los grupos más abundantes dentro de los metabolitos secundarios. Estos se biosintetizan en las plantas por medio de rutas como la del ácido shikímico y la del acetato-malonato. Gracias a su variedad en estructura química se presentan algunos resultados de investigaciones donde se estudia la actividad biológica de los polifenoles, como reportes de actividades antioxidante, antimicrobiana, anticáncer y otras actividades biológicas (Martin, 2017, p.81).

Los fenoles son compuestos de estructura aromática con uno o varios grupos hidroxilo, libres o sustituidos. El compuesto básico es el fenol, pero la mayor parte son polifenoles. Entre los polifenoles vegetales, en la actualidad se conocen más de 8000, figuran las quinolonas fenólicas, las cumarinas, los lignanos, los estilbenos y los flavonoides.

Además de estructuras monoméricas y diméricas existen importantes grupos de polímeros fenólicos, como las ligninas y los taninos. Este tipo de componentes fenólicos constituyen uno de los grupos de micronutrientes presentes en el reino vegetal, que forman parte importante de la dieta humana.

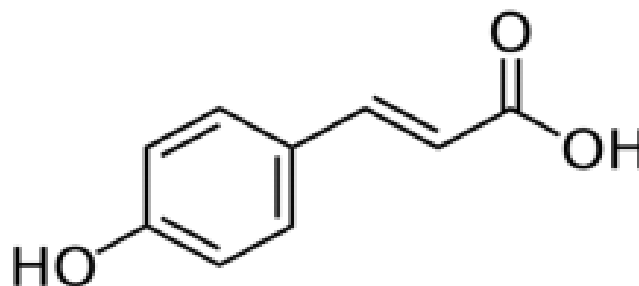
El estudio de los metabolitos secundarios es de gran interés, debido a las propiedades antioxidantes, su participación en procesos sensoriales de los alimentos naturales y procesados, además de sus posibles aplicaciones beneficiosas para la salud y tratamientos anticancerígenos (Sierra, Barros, Gómez, Mejía & Suarez, 2018, p 14).

Figura 16. Estructura química del fenol



Nota: Sierra, Barros, Gómez, Mejía & Suarez (2018).

Figura 17. Estructura química del ácido cumárico de un polifenol



Nota: Larrazabal (2016).

La mayoría de los polifenoles no son muy solubles en solventes acuosos u orgánicos. Son ricos en propiedades antioxidantes, igualmente en los procesos de fermentación bacteriana también pueden modificar la actividad del polifenol, y estas reacciones microbianas tienen una considerable variabilidad, según las diferencias en la flora de cada persona. En general, no se conoce mucho sobre las formas bioactivas de los polifenoles *in vivo* y sus mecanismos de acción, debido a que la mayoría de los estudios son *in vitro* en cultivos o en animales (Larrazabal, 2016, p 10).

Taninos

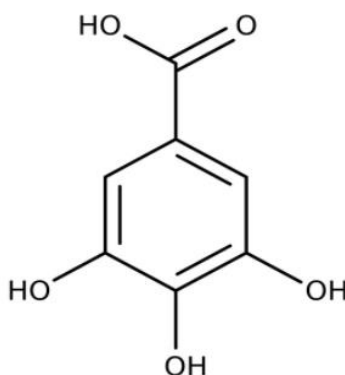
Los taninos son compuestos químicos de carácter fenólico, tiene alto peso molecular, no cristalizables, que con el agua forman soluciones coloidales de reacción ácida y de sabor muy astringente. Se pueden encontrar en la madera de encina y roble, en el quebracho colorado, en la corteza de quina, hijas de té, etc.

Sintéticamente se obtienen por reducción del cloruro de cianidina con hidrógeno, naciente, obteniéndose la catequina que luego se condensa para obtener el tanino (Sierra, Barros, Gómez, Mejía & Suarez, 2018, pp. 40-41).

Los metabolitos de los taninos se pueden clasificar según se encuentran en la naturaleza en dos clases: los hidrolizados y los condensados, esto de acuerdo con las diferencias que presentan en su estructura química.

La característica por la cual se pueden diferenciar es que los taninos que son hidrolizados son más pequeños que los condensados y también se pueden hidrolizar, como bien lo describe su nombre, de una manera mucho más fácil que los condensados. Algunos de los usos y beneficios que poseen los taninos es que sirven como antioxidantes, antimicrobianos y hasta se describe que pueden tener función antiséptica (Jaramillo, Lemus & Rojas, 2015).

Figura 18. Estructura química del ácido gálico, un tanino



Nota: Miño (2007).

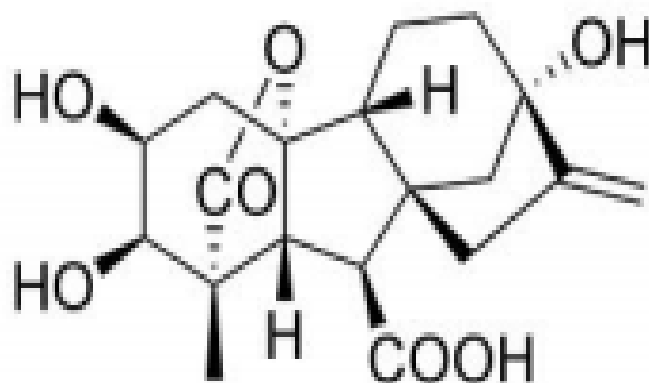
Terpenos

Los terpenos son compuestos volátiles, con un bajo y alto peso molecular dependiendo de la estructura. Sistemas acíclicos, mono, tri- y tetracíclicos, por lo general, son neutros. La solubilidad varía y pueden encontrarse en forma libre o como glicósidos (saponinas). Por lo general obedecen la “regla del isopreno”, porque se pueden localizar varias unidades consecutivas de isopreno (Pérez, 2014).

En el caso de los terpenos, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios. Existen alrededor de 40.000 moléculas diferentes; se clasifican por el número de unidades de isopreno (5 carbonos); por ejemplo, los terpenos contienen 10 carbonos, los triterpenos 30 carbonos, o cuando contienen más de 8 unidades de isopreno se habla de politerpenos.

Muchos terpenoides son de interés comercial por su uso en aromas y fragancias como, por ejemplo, el limoneno, citral y mentol, por mencionar algunos, además de poseer propiedades medicinales importantes como anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas (Ávalos y Pérez, 2009. pp.122-124).

Figura 19. Estructura química de la hormona (giberlinas) un terpeno



Nota: Pérez (2014).

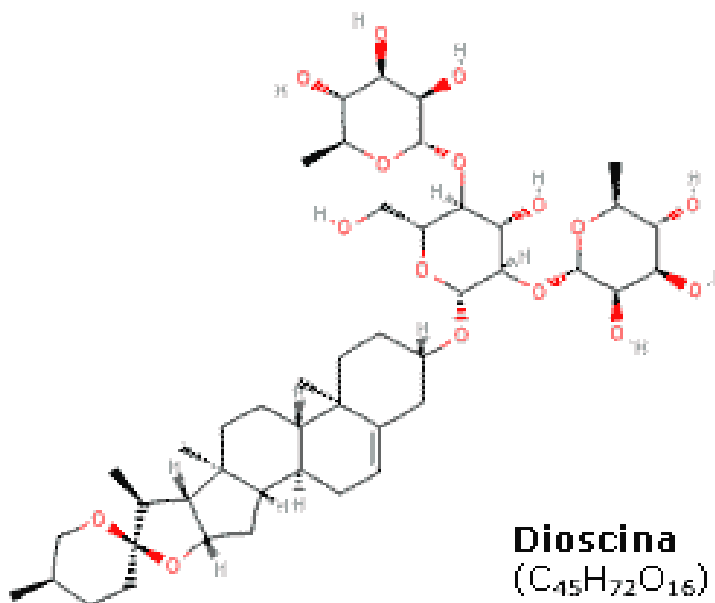
Saponinas

Son sustancias muy polares y es posible extraerlas tanto a temperatura alta como a baja temperatura con agua o alcohol de bajo peso molecular. Se conocen dos tipos: saponinas esteroides y saponinas triterpenoides, se parecen estructuralmente a las hormonas antiinflamatorias endógenas, por ejemplo, los glucocorticoides. A esto se debe los efectos antiinflamatorios que poseen muchas plantas medicinales (Wink, 2015).

Los autores Campos, Sánchez & Vélez (2014) definen a las saponinas como “compuestos bioactivos encontrados principalmente en plantas, pero también en algunos organismos marinos e insectos. De acuerdo con el carácter químico de la anglicana (conocido como sapogenina), las saponinas se dividen en esteroides y triterpenoides” (p. 491).

Los esteroides predominan en las plantas y son compuestos que tienen 27 átomos de carbono que conforman la estructura central. Por otra parte, los triterpenoides están compuestos principalmente por anglicanas con 30 átomos de carbono.

Figura 20. Estructura química del medicamento dioscina, una saponina



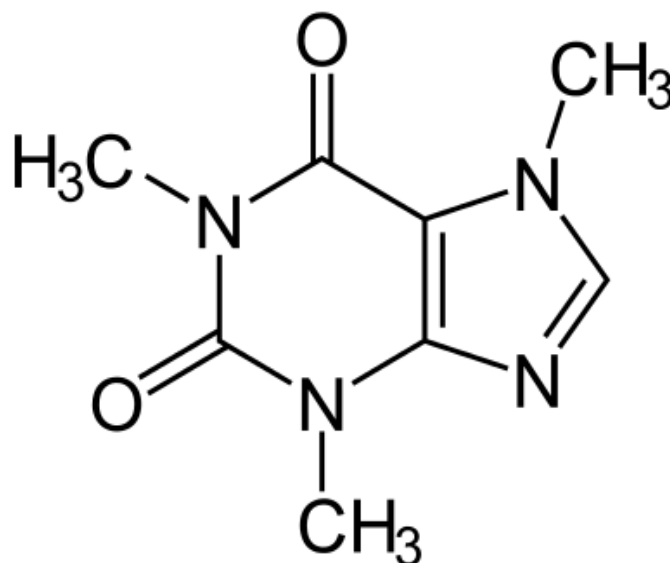
Nota: Zúñiga (2015).

Alcaloides

Muchos de los grupos de alcaloides se destacan en su uso en el área de medicina y algunos de esos ya se han nombrado fármacos. Pertenecen a una gran familia de metabolitos secundarios que tienen en común tres características: solubilidad en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica.

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas por su interacción con neurotransmisores; a dosis altas, esos son muy tóxicos; sin embargo, a dosis bajas tienen alto valor terapéutico como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos; por ejemplo, la morfina y la codeína son alcaloides que pertenecen a un grupo denominado alcaloides (Ávalos y Pérez, 2009, pp.139-140).

Figura 21. Estructura química de la cafeína, un alcaloide estimulante



Nota: Murray (2016).

Cumarinas

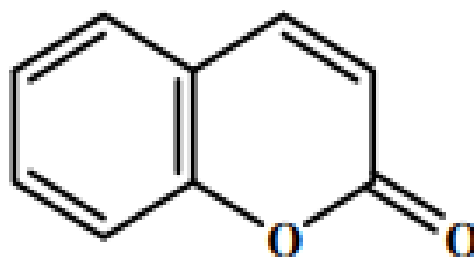
Las cumarinas son un metabolito se caracteriza por ser benzo-alfa-pironas; con este nombre de cumarinas se conoce un grupo muy extenso de principios activos fenólicos que se encuentran en las plantas medicinales y tienen en común una estructura química de 2H-1-benzopiran-2-ona, a esta estructura o nombre estructura se le llama cumarina.

Las cumarinas son aromatizantes, tienen propiedades vitamínicas, disminuyen la permeabilidad capilar y aumentan la resistencia de las paredes de capilares (protegen la fragilidad capilar y actúan como tónico venoso), a algunos tipos de cumarinas se les confiere la acción de y propiedades de ser sedantes, como la angelicina, y otros pueden tener propiedades hipotónicas y también antibacterianas (Yáñez, 2014).

Las cumarinas pertenecen a la familia de lactonas, se han identificado más de 1500 en las de 800 especies de plantas, con propiedades que actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación. Algunas son fototóxicas frente a insectos, al activarse por la luz UV,

un ejemplo es el caso del psoraleno. La cumarina más simple se encuentra como constituyente en el aceite de bergamota, y se pueden identificar las más tóxicas en hongos como el *Aspergillus flavus* (Ávalos y Pérez, 2009, pp. 132-133).

Figura 22. Estructura química de una cumarina simple



Nota: Villegas, Araya & Castro (2015).

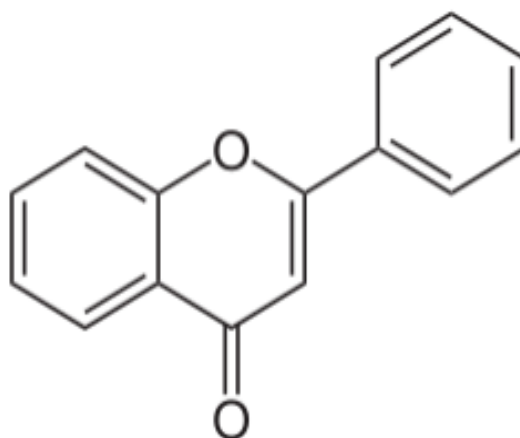
Flavonoides

Los flavonoides son compuestos que poseen bajo peso molecular, ellos comparten un esqueleto común de difenil-piranos (C₆-C₃-C₆), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C (heterocíclico). Esta estructura básica permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. Existen 13 subclases de flavonoides con un total de 5000 compuestos conocidos aproximadamente. Los átomos de carbono en los anillos C y A se enumeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 1 al 6, como se aprecia en la Figura 23 (Herrera, 2014, p 20).

Con los flavonoides se va a obtener pigmentos amarillos derivados de la fenil-benzo y pirona o fenil cromona. Estos metabolitos secundarios se dan mucho en el reino vegetal, normalmente en forma de heterósidos. Su estructura básica molecular es del tipo C₆- C₃- C₆, además se les considera una familia muy diversa en relación con sus compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua (Yáñez, 2014).

Es un componente característico de las plantas y es de suma relevancia ya que son las responsables de las coloraciones de muchas flores, frutos y hojas, y por ello intervienen en la polinización atrayendo insectos, también participan en la vida vegetal ejerciendo importantes funciones, por ejemplo, proteger a la planta de los efectos nocivos de la radiación ultravioleta (UV) y ejercer una eficaz actividad antioxidante y antimicrobiana. A muchos de los derivados de los flavonoides como las flavonas e isoflavonoides se les asignan actividades frente a microorganismos formando complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las proteínas de la pared bacteriana (en el caso de las flavonas) y también ayudan a limitar la invasión de las bacterias y hongos (Yáñez, 2014).

Figura 23. Estructura química de la flavona, un flavonoide



Nota: Avalos y Pérez (2009).

Antraquinonas

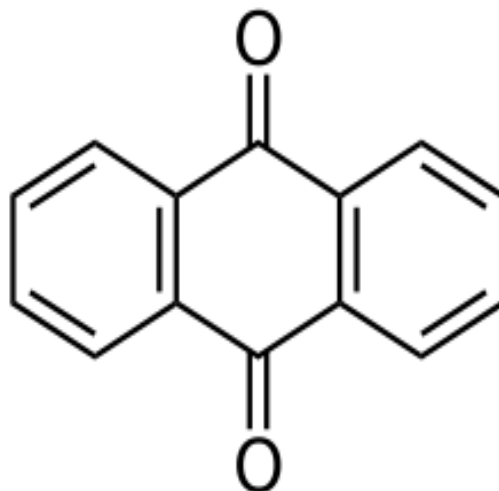
Las quinonas son muy abundantes en la naturaleza, en el Reino Vegetal se encuentran tanto en vegetales como en hongos y bacterias. De acuerdo con el grado de complejidad en su estructura química se pueden clasificar en benzoquinonas, naftoquinonas o antraquinonas si son monocíclicas, bicíclicas o tricíclicas.

Las antraquinonas son quinonas tricíclicas derivadas del antraceno y constituyen el grupo más interesante de las quinonas. La quinona o benzoquinona es uno de los dos isómeros de la ciclohexanodiona o bien un derivado (Miño, 2007).

Los derivados antraquinónicos suelen ser compuestos de color rojo-anaranjado, por lo general son solubles en agua caliente o alcohol diluido. El ensayo de Bornträger suele emplearse para su detección.

La droga pulverizada se macera con un disolvente orgánico no miscible, se recomienda el éter, se filtra y se le añade en disolución acuosa, apareciendo en la capa acuosa, tras agitación, un color rosa, rojo o violado, que indica la presencia de derivados antraquinónicos libres (Castañeda, Pusari, Rafaeli y Rojas, 2014).

Figura 24. Estructura química del antraceno, antraquinona



Nota: Devia (2016).

Métodos de extracción

Los métodos de extracción son técnicas que se pueden dividir de acuerdo con el disolvente utilizado, su mayor utilidad es la separación de los componentes de las mezclas, y su purificación, los disolventes deben ser orgánicos, y se deben someter al contacto con otro disolvente, en este caso de carácter acuoso.

En la mayoría de extracciones los disolventes son con agua (infusión, destilación por arrastre con vapor o extracción) o con solventes orgánicos (como maceración, percolación o extracción Soxhlet), alcoholes, ácidos estos con características polares, los que son menos polares como éter etílico, y no polar como hexano, entre otros. (González, 2004, p.3).

Método por maceración

Según González (2004), es una extracción que se efectúa a temperatura ambiente. Consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente, hasta que penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa, preferiblemente de vidrio; en este se colocan el material vegetal con el disolvente, se tapa y se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica.

Luego se filtra el líquido, se recupera el solvente en un rotavapor y se obtiene el extracto. Dentro de los disolventes más usados están: hexano, diclorometano, cloroformo, metanol y etanol (pp.8-9).

Método por percolación

Este método es uno de los procesos más utilizados pues se puede realizar con disolventes orgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener el material. Consiste en colocar el material fragmentado en un embudo o recipiente cónico, y hacer pasar un disolvente adecuado a través de este, de igual manera se recupera el disolvente por medio de un rotavapor y se obtiene el extracto (González, 2004, p.9).

Cromatografía de capa fina

La cromatografía de capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. Los requisitos esenciales son, pues,

un adsorbente, placas de vidrio, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas.

Es preciso también poder guardar con facilidad las placas preparadas y una estufa para activarlas. La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares. (Sharapin, 2000).

Presenta una serie de ventajas frente a otros métodos cromatográficos (en columna, en papel, en fase gaseosa) ya que el utillaje que precisa es más simple. El tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor y la separación es generalmente mejor. Pueden usarse reveladores corrosivos, que sobre papel destruirían el cromatograma. El método es simple y los resultados son fácilmente reproducibles, lo que hace que sea un método adecuado para fines analíticos (Alpízar, 2018).

Extracción de Soxhlet

La extracción Soxhlet consiste en el lavado sucesivo de una mezcla sólida con un determinado solvente (etanol) que va “lavando o extrayendo” de la mezcla, los componentes más solubles en él. Mediante el lavado sucesivo de una mezcla se puede extraer de ella componentes cuya solubilidad en el solvente extraído es muy baja, debido al efecto acumulado de las múltiples extracciones.

El equipo Soxhlet tiene como función recircular los vapores condensados con ayuda de un sifón a la fuente de disolvente que se encuentra en evaporación continua, arrastrando consigo los principios activos de la materia prima (Caldas, 2012).

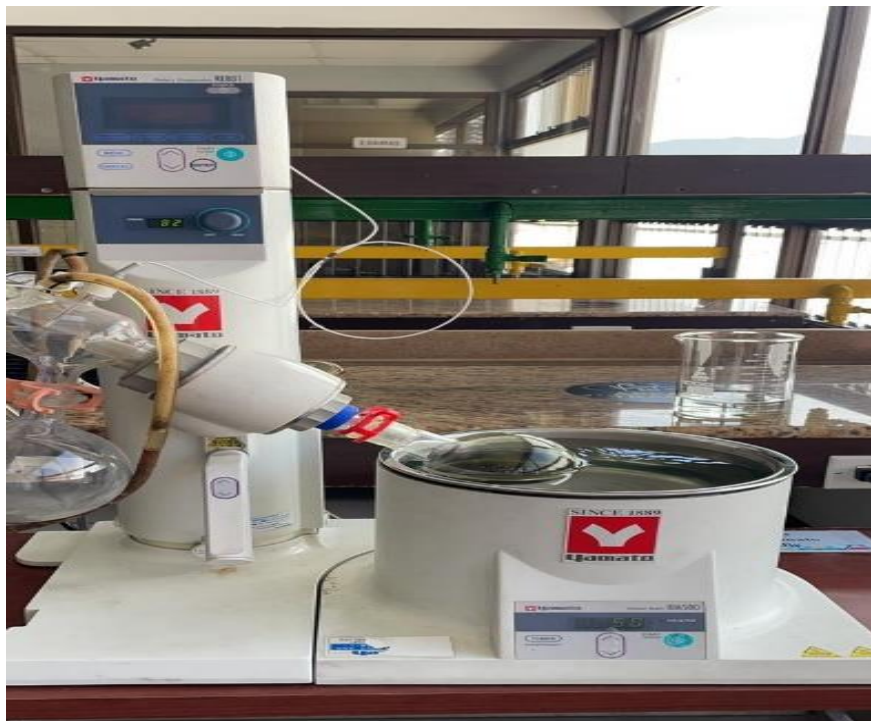
Destilación a presión reducida (rotavapor)

Cuando se habla de tamizaje el rotavapor es una técnica muy útil y empleada en lo concerniente a las destilaciones, porque se utiliza para generar vapor, esto ocasiona que se separe el disolvente del extracto. Como principio de este equipo está la aplicación de calor hasta llegar a ebullición y, además, emplear una bomba de vacío para reducir la presión en el interior del matraz

de destilación. Con esto se da la separación de las sustancias buscadas de las que no son necesarias. (Peña, 2019).

Este equipo puede lograr la optimización de las destilaciones realizadas. Las temperaturas varían dependiendo del disolvente utilizado, estas pueden bajar o subir al igual que la presión utilizada, con el fin de aumentar las concentraciones del extracto. La bomba de vacío se utiliza para mejorar el desempeño de la extracción, al reducir la presión dentro del matraz de destilación, al dar el cambio de líquido a gaseoso (Peña, 2019).

Figura 25. Equipo de destilación a presión reducida mediante rotavapor, Yamato BM500



Nota: Elaboración propia (2021).

Pruebas, métodos y análisis microbiológicos para la evaluación de capacidad antimicrobiana de los extractos de plantas y ácidos orgánicos

Las plantas son ricas en una amplia variedad de metabolitos secundarios, como taninos, terpenoides, alcaloides y flavonoides, que se ha encontrado *in vitro* que tienen propiedades antimicrobianas (Cowan, 1999).

El tamizaje inicial de posibles compuestos antibacterianos y antifúngicos de las plantas se puede realizar con sustancias puras o extractos brutos. Los métodos utilizados para los dos tipos de organismos son similares. Los dos cribados más utilizados para determinar la susceptibilidad a los antimicrobianos son el ensayo de dilución en caldo y el ensayo de difusión en disco o pocillo de agar.

Los microbiólogos clínicos están muy familiarizados con estos ensayos y sus aplicaciones (Cowan, 1999), estos métodos son sencillos y rápidos y son utilizados para generar datos cualitativos y cuantitativos, según el método elegido (Ávalos y Pérez, 2009, p. 25).

Método de difusión por discos

El método de las pruebas de difusión por disco tuvo sus inicios hace más de 70 años en los laboratorios de microbiología. El médico microbiólogo Alexander Fleming, en sus estudios, varió la técnica cuando estaba investigando la penicilina en los años cincuenta, gracias a sus estudios implementó esta técnica ya que se ponían en práctica muchos procedimientos elegidos por los microbiólogos. Varios doctores -Bauer, Kirby, Sherris y Turck- se tomaron el tiempo de probar todas las variaciones de este método, llámase medios de cultivo, temperatura y espesor del agar (Moreno, 2018, p. 41).

En 1996, los cuatro doctores antes mencionados publicaron un estudio donde describieron los resultados de la prueba y la patentaron para usarla. Además, el Comité Nacional para la Normalización de Laboratorios Clínicos (NCCLS) aprobó los pasos básicos del procedimiento que los doctores en su estudio presentaron como resultados, el estudio Bauer se adoptó como referencia para difusión por disco. Desde ese momento se ha usado de forma detallada para obtener los resultados más precisos posibles (Moreno, 2018).

Método Kirby Bauer

El método de Kirby Bauer se utiliza de la siguiente manera: el microorganismo es inoculado en la superficie de la placa de agar, donde se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35-37 °C. Mientras se da la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, y así su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. Llega un punto donde la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I o R). (Pedrique, 2002, p.3).

Tabla 5. Interpretación del método Kirby Bauer

Agente antimicrobiano	Contenido del disco	Diámetro de la zona de inhibición en mm		
		Resistente < o =	Intermedi o	Sensibl e > o =
BETALACTÁMICOS, PENICILINAS				
Ampicillina Enterobacteriaceae	10 µg	13	14-16	17
Ampicillina	10 µg	28	---	29
Ampicillina	10 µg	16	---	17
Ampicillina	10 µg	18	19-25	26
Mezlocillina	75 µg	15	---	16
Mezlocillina	75 µg	17	18-20	21
Oxacillina	1 µg	10	11-12	13
Oxacillina	1 µg	---	---	20
Penicillina	10 U	28	---	29
Penicillina	10 U	14	---	15
Penicillina	10 U	19	20-27	28
Piperacillina	100 µg	17	---	18
Piperacillina Enterobacteriaceae	100 µg	17	18-20	21
QUINOLONAS				
Ciprofloxacina	5 µg	15	16-20	21
Fleroxacina	5 µg	15	16-18	19
Nalidíxico Ácido	30 µg	13	14-18	19
Norfloxacina	10 µg	12	13-16	17
Ofloxacina	5 µg	12	13-15	16
Trovafloxacina	10 µg	13	14-16	17

Nota: Pedrique, 2002.

Métodos en agar

Los métodos en agar son muy utilizados por su forma sencilla y rápida en la lectura de resultados. El método de difusión por discos es el más utilizado y se basa en el principio descrito por Bauer.

El inicio del método implica la aplicación de una determinada cantidad de un antimicrobiano u otra sustancia en un sustrato, en una superficie del agar sobre el cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en estudio, se formará así, por difusión un gradiente de concentración del producto alrededor del disco, y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano (Shiva, 2007, p. 25).

El diámetro obtenido dependerá tanto de la sensibilidad del microorganismo como de la carga del disco, además del espesor de la capa de agar, del pH y la de la composición del medio de cultivo, la capacidad de difusión del producto en ese medio, la temperatura y la atmosfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana, y del tamaño del inóculo y fase de la bacteria o microorganismo en estudio.

En el caso de evaluación de antibióticos el medio más utilizado es el Agar Mueller Hinton, y en la evaluación de extractos de plantas se utiliza variedad de medios, siendo los más utilizados, el Agar Mueller Hinton, Agar Triptona Soja, Agar Nutritivo, Agar Infusión Cerebro Corazón (Shiva, 2007 p 25-26).

Agar Mueller Hinton

El Agar Mueller Hinton es un medio no selectivo ni diferencial, lo que significa que cualquier microorganismo cultivado crecerán en su superficie; es rico en nutrientes, por lo cual es empleado en las pruebas de sensibilidad y antibiogramas, debido a su alta reproducibilidad, su bajo contenido de sustancias inhibidoras, el crecimiento satisfactorio que presentan los patógenos, y permite una mejor difusión de los antibióticos, cumpliendo con los requerimientos de la Organización Mundial de la Salud, y está especificado en la FDA (Casado, Torrico y Medina, 2012, p.24).

Figura 26. Agar Mueller- Hinton



Nota: Casado, Torrico y Medina (2012)

Agar tripticasa soya (TSA)

Las placas de agar tripticasa soya son un medio de cultivo general utilizado para el enriquecimiento y aislamiento de microorganismos fastidiosos con o sin sangre. Es un medio excelente para el aislamiento de microorganismos anaerobios y, por lo tanto, para determinar el recuento total aerobio (RTA) (Novachem del Ecuador, 2020).

Además, es un medio utilizado para diferentes propósitos, entre ellos, mantenimiento de cultivos de reserva, el recuento de placas y el aislamiento de microorganismos de una variedad de tipos de muestras, y como base para medios que contienen sangre (Novachem del Ecuador, 2015).

Agar sangre

Permite el crecimiento de la mayoría de las bacterias con importancia clínica (Gram negativas y Gram positivas) y también hongos (mohos y levaduras). Está compuesto por un medio base rico en nutrientes más un suplemento de sangre desfibrinada animal en una proporción del 5-10%. Es un medio peculiar y diferente ya que permite comprobar si las bacterias son hemolíticas, es decir, si tienen capacidad para romper los glóbulos rojos presentes en el medio (Barrero, 2016).

Figura 27. Placa de agar sangre



Nota: Choy (2020) y Barrero (2016).

Agar chocolate

Es un medio enriquecido muy similar al agar sangre; la diferencia es que los glóbulos rojos están lisados y liberan al medio nutrientes como la hemoglobina, factor X (hemina) y factor V (NAD). La lisis se produce cuando se añade el agar base del chocolate, de ahí su nombre. La hemólisis le confiere un color marrón característico parecido al del chocolate. Se utiliza para el cultivo de bacterias exigentes que necesitan estos factores para su desarrollo, como es el caso de *Neisseria gonorrhoeae* (agente causal de la gonorrea) y varias especies del género *Haemophilus* (Barrero, 2016).

Figura 28. Placa de agar chocolate

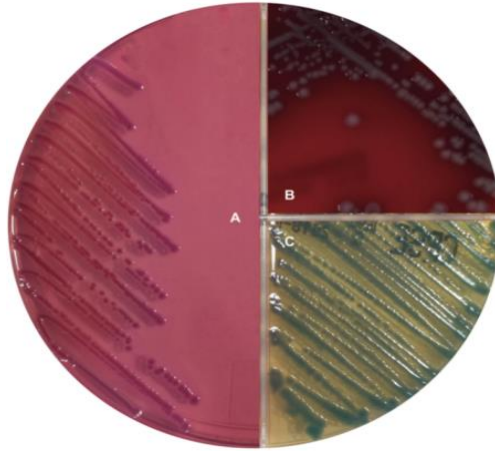


Nota: Sanjuan (2019).

Agar MacConkey

Es un medio diferencial y selectivo muy utilizado para el aislamiento e identificación de enterobacterias (bacilos Gram negativos). Su composición se basa en sales biliares y cristal violeta que inhiben el crecimiento de Gram positivos y hongos, también contiene lactosa y rojo neutro como indicador de pH. Las bacterias fermentadoras de lactosa (lactosa+) acidifican el medio y adquieren un color rosado (*Escherichia coli* es un ejemplo), mientras que las no fermentadoras de lactosa (lactosa -) aparecen incoloras (*Salmonellas* son ejemplo de estos) (Barrero, 2016).

Figura 29. Placa de agar MacConkey



Nota: Martínez (2018).

Agar Sabouraud dextrosa (SDA)

Consiste en un medio no selectivo para el cultivo y mantenimiento de hongos patógenos y no patógenos y levaduras, en especial de los dermatofitos. Para lograr la selectividad de este medio, se utiliza cloranfenicol, que inhibe el crecimiento de bacteria debido a su amplio espectro. En la Figura 30 se observa un medio de cultivo con placa SDA. (Becton, Dickinson and Company, 2015, p. 1).

Figura 30. Placa de Agar Sabouraud dextrosa (SDA)



Nota: Becton, Dickinson and Company (2015, p. 3).

Agar manitol sal

Contiene, además de nutrientes, una concentración de sal al 7,5% que impide el crecimiento de la mayoría de las bacterias, permitiendo el crecimiento selectivo de estafilococos. El agar también contiene extractos de caseína y tejidos animales digeridos, extracto de ternera, manitol, sales y rojo fenol. Este medio de cultivo puede ser selectivo por su alta concentración de sal que permite que los estafilococos como el *Staphylococcus aureus* pueda fermentar el manitol, lo que produce colonias amarillo en este agar (Barrero, 2016).

Figura 31. Placa de Agar Manitol Sal



Nota: Claros (2016).

Tipos de medios de cultivo

Se clasifican según la proporción de agar y existen tres tipos: líquidos (caldos), sin ningún agente gelificante, por lo que los microorganismos crecen en todo el medio, su crecimiento es más rápido.

El segundo es el sólido formado con una proporción de agar del 1,5%, el crecimiento se desarrolla en la superficie del medio. Con este tipo de medios se puede realizar en placa de Petri o en tubos de ensayo.

Por último, los semisólidos son aquellos que contienen una proporción de agar menor al 0,5%, son utilizados en pruebas bioquímicas y de movilidad (Barrero, 2016).

En el campo microbiológico existen cuatro tipos, según su utilidad: los nutritivos o no selectivos, que van a permitir el crecimiento de la mayoría de los microorganismos por ser muy generales. Los enriquecidos contienen sus componentes adicionales, además de los básicos, para permitir el crecimiento de microorganismos exigentes. Los selectivos contienen algún componente que impide el desarrollo de microorganismos no deseados y los últimos son los diferenciales, que contienen sustancias que resaltan alguna característica de la especie o grupo de microorganismos. En la Tabla 6 se puede observar los diferentes tipos, medios y el objetivo.

Tabla 6. Diferentes tipos de medios de cultivo

Tipo	Medios de Cultivo (ejemplos)	Objetivo
No selectivos	Agar sangre	Recuperación de bacterias y hongos
	Agar chocolate	Recuperación de bacterias, incluidas <i>Haemophilus</i> y <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
	Agar Mueller-Hinton	Medio para estudio de la susceptibilidad bacteriana
	Caldo tiogliconato	Caldo enriquecido para las bacterias anaerobias
	Agar dextrosa de Sabouraud	Recuperación de hongos
Selectivos , diferenciales	Agar MacConkey	Selectivo para las bacterias gramnegativas; diferencial para las especies que fermentan la lactosa
	Agar sal manitol	Selectivo para los estafilococos, diferencial para <i>Staphylococcus aureus</i>
	Agar xilosa-lisina-desoxicolato	Agar diferencial selectivo para <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> en cultivos entéricos
	Medio de Lowenstein-Jensen	Selectivo para micobacterias
	Agar Middlebrook	Selectivo para micobacterias
	CHROMagar	Selectivo, diferencial para bacterias seleccionadas y levaduras
Especializados	Agar inhibidor de hongos filamentosos	Selectivo para los hongos filamentosos
	Agar extracto de levadura con carbon vegetal tamponado (BCYE)	Recuperación de <i>Legionella</i> y <i>Nocardia</i>
	Agar cistina-telurito	Recuperación de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
	Caldo de cultivo Lim	Recuperación de <i>Streptococcus Agalactiae</i>
	Agar sorbitol de MacConkey	Recuperación de <i>Escherichia coli</i> O157
	Agar Regan Lowe	Recuperación de <i>Bordetella pertussis</i>
	Agar sacarosa, sales biliares, tiosulfato y citrato (TCBS)	Recuperación del género <i>Vibrio</i>

Nota: Murray, Pfaller & Rosenthal (2017).

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

En este capítulo se desarrollan las técnicas para realizar la recolección de datos, también se define el tipo de investigación y se establece cuál es el enfoque, diseño, variables, instrumentos y los procesos de recopilación de datos de este trabajo.

Enfoque de la investigación

El enfoque utilizado para el desarrollo del tema de investigación es cuantitativo. Tal como lo mencionan Hernández, Fernández y Baptista (2014), el enfoque cuantitativo mide variables a través de un grupo de procesos y se prueban estas mediciones, las cuales van a ser obtenidas a través recolección de datos numéricos, trazas, fórmulas y modelos analíticos, que están estandarizados mediante un orden riguroso. Se cumple, así, cada etapa de la investigación que se ha planteado (p. 4).

Lo definen como secuencial y probatorio, pues se da la utilización de diferentes variables, las cuales pueden ser medibles en un determinado tiempo. También, se requiere de los instrumentos para recolectar datos; estos datos serán traducidos a datos numéricos y establecidos en tablas, para poder generar una hipótesis, y con dicha premisa establecer las diversas conclusiones.

Al ser una investigación cuantitativa, se efectuará un fraccionamiento de la totalidad de las hojas de la planta *Vernonia patens*, utilizando diferentes disolventes (hexano, diclorometano, acetato de etilo y acuoso) para poder obtener diferentes extractos.

Se llevará a cabo un tamizaje fitoquímico, cromatografía al extracto obtenido de la planta de *Vernonanthura patens* (tuete), con el fin de poder identificar los metabolitos secundarios y propiedades que se encuentran presentes en las hojas, y poder probar la actividad antimicrobiana frente a *Salmonella diarizonae*.

Diseño de la investigación

El diseño de esta investigación es de tipo experimental, según los autores Hernández, Fernández y Baptista (2014) este tipo se utiliza cuando el investigador busca establecer un posible efecto de una causa que se pueda manipular intencionalmente con las variables independientes; en otras palabras: “La esencia de la concepción de experimento es que se requiere la manipulación

intencional de una acción para analizar sus posibles resultados, teniendo alcances iniciales y finales correlacionales y explicativos” (p.153).

Esto se da ya que se involucra la obtención del extracto obtenido de la planta *Vernonia patens* por medio de los diferentes disolventes, también la identificación y medida de sólidos en los extractos de las hojas de la planta, para poder determinar la capacidad antimicrobiana que esta posee frente a la bacteria *Salmonella diarizonae*, con el fin de poder indicar si alguno de los extractos obtenidos de las hojas de la planta *Vernonia patens* demuestra actividad antimicrobiana positiva y en que cantidad .

También se señala que este estudio es secuencial, cada etapa de la investigación anticipa a la siguiente; se busca probar una hipótesis con los resultados obtenidos de los análisis, con lo cual se formarán conclusiones.

Dentro de las investigaciones cuantitativas se encuentra a su vez, el tipo explicativo, es el que va más allá de solo la descripción de conceptos o fenómenos. En este diseño, el interés se centra en explicar por qué sucede un fenómeno y en qué condiciones se manifiesta, así como por qué se relaciona con dos o más variables.

Por otra parte, las investigaciones con este tipo de diseño son más estructuradas y brindan un sentido de entendimiento del fenómeno en estudio (Hernández, Fernández y Baptista, 2014).

La presente investigación es también del tipo explicativo mencionado anteriormente, debido que explica la causa de los fenómenos, por qué se dan estos y los eventos de interés relacionados con ellos para el problema que se ha venido dando a lo largo de los años, como lo es la resistencia bacteriana, en el caso en específico con la bacteria *Salmonella diarizonae*, a lo cual se pretende darle una solución con una alternativa natural, aprovechando las propiedades que tiene la planta *Vernonia patens* (tuete) y que se pueda usar como producto antibacteriano.

Fuentes de información

Fuentes primarias

Según Hernández, R. *et al.* (2014), las fuentes primarias se presentan cuando el investigador conoce su tema y está familiarizado con el campo de estudio y tiene acceso a ellas (puede utilizar material de bibliotecas, filmotecas y bancos de información), proveen los datos de primera mano ya que son documentos que incluyen resultados de los estudios correspondientes, los cuales se obtienen de especialistas.

Por otra parte, es recomendable iniciar la revisión de la literatura consultando a uno a varios especialistas en el tema (algún profesor, por ejemplo) y buscando en internet fuentes primarias en centros o sistemas de información y bases de referencias y datos que estén estrechamente relacionadas con el problema específico que se va a investigar (pp. 61-62).

Entre las fuentes primarias para este proyecto de investigación se comenzó con alguna información obtenida por opinión de profesionales, un botánico y biólogo, un agrónomo, dos microbiólogas y un químico, a partir de ahí se inició un proceso de investigación bibliográfica la cual fundamenta y se complementa con lo mencionado por los profesionales.

Fuentes secundarias

Según Soberón (2009), las fuentes secundarias, parten de datos preelaborados, como pueden ser datos obtenidos de anuarios estadísticos, de Internet, de medios de comunicación, de bases de datos procesadas con otros fines, artículos y documentos relacionados con la enfermedad, libros, tesis, informes oficiales, etc.

De acuerdo con lo anterior, las fuentes secundarias con las que se lleva a cabo este estudio comprenden tanto tesis como artículos de revistas científicas que puedan brindar datos preelaborados. Asimismo, se entrevistó a funcionarios del herbario del Museo Nacional, al botánico pionero en su campo en Costa Rica, Lic. Luis Jorge Poveda Álvarez, quien aportó mucho conocimiento y artículos de gran interés para el estudio.

Criterios de inclusión y exclusión

Esta investigación se basa en artículos, tesis revistas, bases de datos, entre otros, con un rango de no más de diez años de antigüedad, comprendiendo el período del 2011 al 2021, tanto en idioma inglés como en español. Se utilizarán aquellos artículos u otras fuentes de información que estén dentro de este período, y que contengan toda la información relacionada con la planta *Vernonia patens*, sus usos y propiedades medicinales y su actividad antimicrobiana contra la *salmonella diarizonae*.

Así mismo, se excluyeron los artículos que mostraban información no actualizada. Por lo tanto, se excluyó toda la información poco confiable y que no se encuentre disponible en español o inglés.

Variables de la investigación

Tabla 7. Cuadro de operacionalización de variables

Objetivo	Variable	Indicador	Definición conceptual	Definición Operacional	Instrumento
Elaborar los extractos y el fraccionamiento de la planta <i>Vernonia patens</i> .	Fraccionamiento	Diferencias de polaridad entre el disolvente y extracto, medidas en g/ml.	Separación de una mezcla en sucesivas etapas, de una de las sustancias de la mezcla (Luján, 2017).	Mediante la extracción, separación y filtración.	Embudo separador y mediante extracción líquido-líquido.

Objetivo	Variable	Indicador	Definición conceptual	Definición Operacional	Instrumento
Realizar un tamizaje fitoquímico completo para determinar qué clase de metabolitos secundarios se encuentra en las hojas de la planta <i>Vernonia patens</i> .	Tamizaje fitoquímico	Identificación colorimétrica de la presencia de los metabolitos secundarios en los extractos de las hojas de <i>Vernonia patens</i> .	Permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta por medio de solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación (Calle, 2017).	Determinación de metabolitos secundarios, en los diferentes extractos.	Observación cualitativa de las pruebas colorimétricas Alcaloides Terpenos Flavonoides Cumarinas Fenoles Taninos Saponinas
Comprobar la actividad antibacterial <i>in vitro</i> de los extractos de la planta <i>Vernonia patens</i> contra la bacteria <i>Salmonella diarizonae</i> .	Actividad antibacterial	Porcentaje de inhibición	Determina que un componente químico natural o sintético tiene poder inhibitorio contra el crecimiento de los microorganismos (Usano, Palá, Díaz, 2014).	Se obtienen valorando ensayos	Placa de Petri Medios de cultivo Bacteria <i>Salmonella diarizonae</i> Incubadora

Nota: Elaboración propia (2021).

Instrumentos, materiales y equipos usados para la realización de los extractos de *Vernonia patens*

Se describe de seguido diversos métodos, técnicas e instrumentos por utilizar en la realización de esta investigación, los métodos y procedimientos se llevaron a cabo en las instalaciones de la Universidad Internacional de las Américas (UIA) dirigido por el tutor, Lic. Javier Alpízar, y en el Laboratorio de Microbiología Dra. Claudia Arroyo, bajo la vigilancia y seguimiento de la Dra. Claudia Arroyo. Cabe mencionar que la cepa de la bacteria *Salmonella* fue donada por Servicios de Microbiología de la Universidad de Costa Rica (UCR).

Fraccionamiento de las hojas de la planta *Vernonia patens*

Materiales

- *Vernonanthura patens* (tuete)
- Botellas de vidrio calor ámbar.
- Espátulas acanaladas.
- Embudo separador.
- Aros metálicos.
- Pizeta con agua destilada.
- Goteros.
- Soportes universales.
- Calentadores-agitadores marca Corning
- Erlenmeyers de distintos tamaños.
- Balón aforado de 500 mL.
- Beakers de 2000 mL, 1000 mL. 100 mL y 50 mL.
- Termómetros de mercurio.
- Papel parafilm.
- Agitador de vidrio.

- Soportes para termómetros de mercurio.
- Pipeta de 1 mL y 2 mL.
- Buchner.
- Kitasato.
- Probetas de 1000 mL y 25 mL.
- Viales de 1 mL y 5 mL.
- Balanza granataria marca Ballar 2000,00 g \pm 0,01 g.
- Papel filtro.
- Coladores medianos.
- Tabla para picar.
- Embudos de espiga larga.
- Papel toalla.
- Pinzas largas.
- Tubos de ensayo.
- Estufa.
- Mangueras de caucho para conexiones.

Equipos

- Rotavapor marca Yamato modelo BM500.
- Bomba Zeny, modelo VP 125

Reactivos

- Etanol al 70%.
- Hexano.
- Diclorometano.
- Acetato de etilo.

- Éter etílico.
- HCl al 10%.
- Reactivo Dragendorff.
- Metanol.
- Limaduras de magnesio.
- HCl concentrado.
- KOH 0,5 mol/L.
- Cloroformo.
- Anhídrido acético.
- Ácido sulfúrico concentrado.
- Hidróxido de amonio 25%.
- FeCl₃ 1%.
- Reactivo de Vainillina 1%.
- Reactivo de Lugol.
- Reactivo de Benedict.
- NaOH al 10%.
- Propilenglicol
- Mentol.
- Sacarosa.
- Agua destilada.
- Sulfato de sodio.

Recolección del material botánico, procedimientos y recursos

Las hojas de *Vernonia patens* se recolectaron en una finca ubicada en Mercedes sur de Puriscal, San José, Costa Rica durante el mes de marzo del 2021. La planta se identificó en su sitio de recolección por el taxónomo Lic. Luis Jorge Poveda.

Se juntó todo el material, alrededor de un kilogramo de las hojas, las cuales se lavaron, se dejó escurrir y posteriormente se colocó en un lugar frío; se utilizó 417,27 g para la realización del extracto.

Figura 32. Hojas de *Vernonia patens* para la elaboración del proyecto



Nota: Elaboración propia (2021).

El material recolectado, seco y picado fue tratado de la siguiente manera: se pesó 223 g de *Vernonia patens* en un beaker de 500 mg y 194,27 g en otro beaker, para un total 417,27 g. Seguidamente, se procedió a colocarlos por separado en una botella grande de color ámbar. A las hojas picadas se les agregó el disolvente, que en este caso era etanol al 70%, donde se midieron 1400 mL de etanol al 100%, con 600 mL de agua destilada por duplicado, ya que se usaron dos botellas una con 223 g de material más 2 litros del disolvente al 70% y la otra botella con 194,27 g más 2 litros del disolvente previamente preparado al 70%.

Las botellas se taparon y se les colocó cinta blanca, se almacenaron en un armario oscuro, seco y fresco durante ocho días. Luego de la semana se filtró, utilizando el Büchner, Kitasato, papel filtro marca Fisherbrand, y una bomba de vacío, hasta lograr separar todos los compuestos sólidos del extracto, se determinó lo filtrado y se obtuvo 3,5 litros en total, posteriormente se colocaron en botellas de vidrio color ámbar.

Figura 33. Equipo para filtración al vacío del material macerado de las hojas de *Vernonia patens* y beacker con el extracto



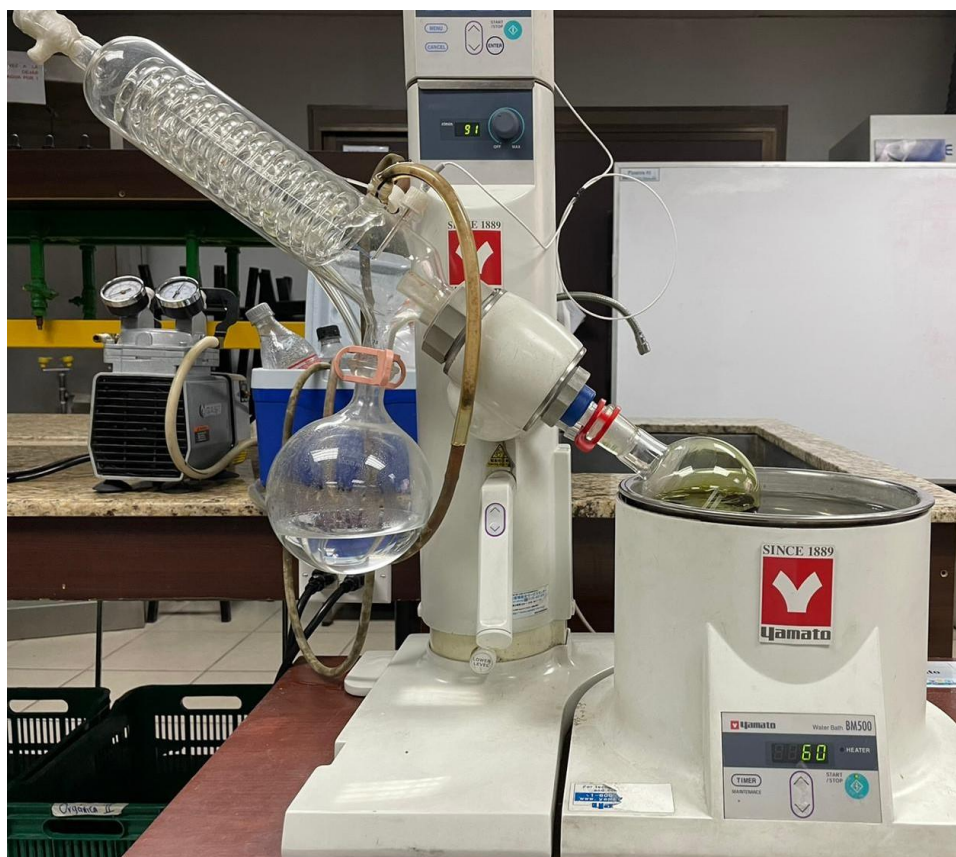
Nota: Elaboración propia (2021).

Concentración del extracto por destilación a presión reducida

El extracto obtenido fue reducido en volumen en un rotavapor marca Yamato modelo BM500, donde se concentró, el filtrado se colocó en un matraz de destilación de 500 mL este proceso se repitió siete veces ya que el contenido total era de 3,5 litros; se calibró la temperatura no superior a 60 °C y la velocidad del equipo de rotación a 100 rpm, para concentrar el extracto, eliminando el etanol. El proceso concluyó hasta eliminar la totalidad del etanol.

Se obtuvo 1850 mL del extracto concentrado de las hojas de *Vernonia patens*, el cual se dividió en dos partes: se utilizó 100 mL para el tamizaje fitoquímico, lo cual se guardó en una botella color ámbar, y los otros 1750 mL se emplearon para el fraccionamiento.

Figura 34. Rotavapor con el extracto en proceso de destilación



Nota: Elaboración propia (2021).

Fraccionamiento de los componentes de las hojas de planta *Vernonia patens*

Procedimiento

Extracción con hexano, diclorometano y acetato de etilo

1. Tomar 200 mL del extracto concentrado y dividir en cuatro partes; por lo tanto, se utiliza cuatro embudos separadores, donde a cada uno se le colocan 50 mL del extracto concentrado y se le agrega 25 mL de hexano.

2. Mezclar levemente, sin generar emulsión, y liberando el gas de forma continua por la llave del embudo, hasta lograr equilibrar las presiones y que no se emane más gas.
3. Colocar el embudo separador en el soporte, y se retira la tapa del embudo.
4. Dejar reposar hasta lograr la separación de las fases. En el fondo se logra observar la fase más densa (acuosa) y la fase menos densa en la superficie (hexano).
5. Retirar, por la boquilla de abajo, la fase acuosa, y por la boquilla de arriba el hexano. Al extracto acuoso se le realizaron cuatro extracciones, hasta obtener una coloración muy clara.
6. Se obtuvo la fracción del hexano, se colocó en una botella ámbar y se rotuló.
7. Se repitió los pasos del 1 al 6, pero utilizando diclorometano y acetato de etilo.
8. Las fracciones se rotularon y se guardaron en la refrigeradora.

Figura 35. Extractos obtenidos del fraccionamiento, recipientes rotulados



Nota: Elaboración propia (2021).

Extracción con éter etílico

1. Se tomó 50 mL del extracto crudo, se colocó en un embudo separador y se le agregó 25 mL de éter etílico, este paso se realizó por triplicado. El contenido se agitó suavemente (se liberó constantemente el gas), lo cual se hizo abriendo suavemente la llave del embudo.
2. Colocar el embudo de separación en el soporte y retirar la tapa del embudo. Se deja reposar hasta que se dé la división clara de las dos fases. La fase más densa estará en el fondo (fase acuosa), y la fase menos densa en la superficie (éter etílico).
3. Se recolectó las dos fases en beaker de 150 ml diferentes; la fase más densa (el extracto acuoso) se retiró de primera por la boquilla de abajo. En otro recipiente rotulado se colocó el extracto etéreo, el cual se retiró por la boca superior del embudo.
4. Se volvió a colocar el extracto acuoso en el embudo separador, y se agregaron de nuevo 25 mL de éter etílico (este proceso se realizó tres veces). A esto se le añadió sulfato de sodio anhidro; se colocaron todos los extractos etéreos en el recipiente rotulado como extracto etéreo, y el acuoso se recuperó en el recipiente rotulado como extracto acuoso.
5. Al finalizar quedaron dos recipientes: uno con el extracto acuoso y otro con el extracto etéreo.

Extracto acuoso

1. El extracto acuoso se separó en dos recipientes de volúmenes iguales, para ser exactos 50 ml de cada uno, rotulados como AQ1 y AQ2.
2. Al extracto AQ2 se le añadieron 25 mL de HCl 3 mol/L; se agitó bien y se calentó durante 20 minutos.
3. Se dejó enfriar, y la muestra fría se colocó en el embudo separador. Se procedió a realizarle tres extracciones con el éter etílico, de igual manera que se realizó con el extracto original.
4. Se separó el extracto etéreo como AQ2E, y al acuoso como AQ2.

5. La muestra AQ1 se guardó en refrigeración, para más adelante realizar las respectivas pruebas.

Extracto etéreo

1. Se procede a concentrar, hasta un volumen no mayor de 30 mL.
2. Posteriormente, se realizaron diferentes pruebas de identificación de metabolitos secundarios, utilizando el extracto anteriormente concentrado.

Figura 36. Extractos obtenidos, rotulados y en sus respectivos recipientes



Nota: Elaboración propia (2021).

Pruebas de identificación para el tamizaje fitoquímico

Tabla 8. Pruebas para realizar por cada extracto obtenido, para llevar a cabo el tamizaje fitoquímico

Tipo de Extracto	Extracto Etéreo	Extracto Acuoso (AQ1)	Extracto Etéreo (AQ2E)	Extracto Acuoso (AQ2)
Pruebas para realizar	<ul style="list-style-type: none"> ●Prueba de Dragendorff (Identificación de alcaloides) ●Prueba de Shinoda (Identificación de flavonoides) ●Prueba de Bornträger-Kraus (Identificación de antraquinonas) ●Cromatografía de capa fina TLC (Determinación de Terpenos) ●Prueba de KOH (Identificación de cumarinas) ●Prueba de Liberman Burchard (Identificación de triterpenos) ●Prueba de Taninos (Determinación de taninos). 	<ul style="list-style-type: none"> ●Prueba de Lugol (Determinación de Almidón) ●Prueba de Espuma (Determinación de saponinas) ●Prueba de Benedict (Determinación de azúcares reductores) ●Prueba de Taninos (Determinación de taninos) ●Prueba de Dragendorff (Identificación de alcaloides). 	<ul style="list-style-type: none"> ●Prueba de Dragendorff (Identificación de alcaloides) ●Prueba de Shinoda (Identificación de flavonoides) ●Prueba de KOH (Identificación de cumarinas) ●Prueba de Liberman Burchard (Identificación de triterpenos) ●Prueba de Bornträger-Kraus (Identificación de antraquinonas) 	<ul style="list-style-type: none"> ●Prueba de Bornträger-Kraus (Determinación de antraquinonas).

Nota: Elaboración propia (2021).

Prueba de Dragendorff (identificación de alcaloides)

1. Se tomaron 4 mL del extracto etéreo y se colocó en un tubo de ensayo; usando el baño María, se evaporó el disolvente (éter).
2. El residuo resultante se disolvió en 3 mL de HCl al 2%; luego se le agregaron 3 gotas del reactivo de Dragendorff; este reactivo se agregó por las paredes del tubo de ensayo.
3. Si hay presencia de alcaloides se forma un precipitado anaranjado.
4. Esta prueba se repite para AQ2E y AQ1, con la excepción de que al AQ1 no se coloca en baño María, sino que se le adicionan los reactivos después de colocar los 4 mL en el tubo de ensayo.

Prueba de identificación de cumarinas (KOH)

1. Se tomaron 4 mL del extracto etéreo y se colocó en un tubo de ensayo; usando el baño maría, se evaporó el disolvente (éter).
2. El residuo obtenido se disolvió en 1 mL de agua hirviendo.
3. Se colocaron 2 gotas separadas con ayuda de un capilar a un papel filtro, de la solución que estaba en el tubo de ensayo.
4. Se observaron las gotas del papel filtro usando la lámpara UV a una longitud de onda de 366 nm, luego se le agregó KOH a las gotas y se volvió a observar en la lámpara.
5. Si hay presencia de este metabolito, se debe observar una coloración verde alrededor de la muestra, inmediatamente después de aplicado el KOH.
6. Esta prueba se repite para AQ2E.

Prueba de identificación de flavonoides (Shinoda)

1. Se colocaron en una gradilla dos tubos de ensayo, se tomaron 4 mL del extracto etéreo y de AQ2E; usando el baño María, se evaporó el disolvente (éter).
2. El residuo resultante se disolvió en 2 mL de metanol y se calentó nuevamente en baño María.
3. Se le adicionó una punta de espátula de limaduras de magnesio; se llevó la muestra a la capilla de extracción, con mucho cuidado, y por las paredes del tubo de ensayo se le agregó 1 mL de HCl concentrado, se agitó suavemente (se iba a generar un burbujeo violento).
3. Si hay presencia de flavonoides, se debe generar una coloración rojo oscuro (si no es alta la concentración de este metabolito puede ser un color rosa).

Prueba de Liberman Burchard (identificación de triterpenos y esteroides)

1. Se tomaron 4 mL del extracto etéreo y se colocaron en un tubo de ensayo; usando el baño María se evaporó el disolvente (éter).
2. Se llevó el tubo de ensayo a la capilla y se le agregó al residuo obtenido: 1 mL de cloroformo.

3. Luego se le adicionó 1 mL de anhídrido acético, y se agitó el tubo de ensayo con cuidado.

4. Al tener el tubo inclinado y sin agitar, se le agregaron lentamente 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado.

5. Si la prueba es positiva en este metabolito, se formará un anillo en medio de las dos fases, de color rojo marrón o verde esmeralda.

6. Esta prueba se repite para AQ2E.

Prueba de Borntrager-Kraus (identificación de antraquinonas)

1. Se tomaron 4 mL del extracto etéreo y se colocaron en un tubo de ensayo; usando el baño María se evaporó el disolvente (éter).

2. El residuo obtenido se disolvió en 1 mL de hidróxido de amonio al 25%.

3. Si la prueba es positiva en este metabolito, la disolución se tornará de un color rojo oscuro.

4. Esta prueba se repite para AQ2E y AQ2A, con la excepción de que al AQ1 no se coloca en baño María, sino que se le adicionan los reactivos después de colocar los 4 mL en el tubo de ensayo.

Prueba de taninos (identificación de taninos)

1. Se tomaron 4 mL del extracto etéreo y se colocaron en un tubo de ensayo; usando el baño María se evaporó el disolvente (éter).

2. Al residuo obtenido se le añadieron cinco gotas de cloruro de hierro III al 1%.

3. Si la prueba es positiva en este metabolito, la disolución se tornará de un color azul (taninos gálicos) o color verde (taninos catéquicos).

4. Esta prueba se repite para AQ1, omitiendo el paso número 1.

Prueba de cromatografía de capa fina TLC (determinación de terpenos)

1. Se tomó, con un capilar, una muestra del extracto etéreo, y se aplicó una pequeña gota en una placa cromatográfica de capa fina (sílica gel con fluorescencia a 254 nm); esta fue la fase estacionaria.

2. Para la elaboración de la fase móvil o eluyente se usaron 18 mL de hexano y 2 mL de acetato de etilo (9:1).

3. Se armó el sistema cromatográfico, igual que se muestra en la Figura 37; se tuvo el cuidado de que la cantidad de eluyente realizada no estuviera por encima del punto de aplicación de la muestra.

4. Una vez ajustado el sistema, se colocó la placa dentro, se cubrió y se retiró la placa cuando el eluyente llegó a la marca de 0.5 cm de la parte superior.

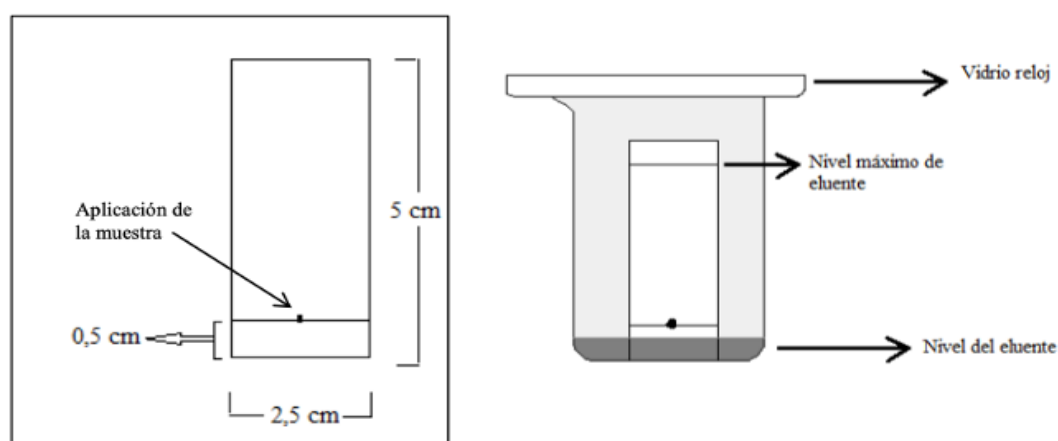
5. Se dejó secar bien y se observó con la luz UV a 254 y 365 nm.

6. A la placa se le agregó el reactivo vainillina-ácido sulfúrico en etanol, hasta que quedó bien impregnada. Se realizó desde la parte superior de la placa y se dejó correr en línea recta. Se dejó secar.

7. La placa se reveló quemándola en el calentador-agitador con la parte metálica en contacto con el calentador, y se retiró cuando la coloración se observó intensa.

8. Se repitió el proceso para otra placa, con la variación que se reveló utilizando yodo metálico.

Figura 37. Dimensiones de una placa cromatográfica para TLC y Sistema cromatográfico



Nota: Alpízar (2018).

Prueba de Lugol (determinación de almidón)

1. Se tomaron 2 mL del extracto AQ1 y se colocó en un tubo de ensayo.
2. Se le añadió gota a gota el reactivo de Lugol, hasta observar que hay un cambio de color; se puede agregar un máximo de 2 mL del reactivo.
3. Para que la prueba dé positivo a almidón, debe cambiar a color azul.

Prueba de Benedict (determinación de azúcares reductores)

1. Se agregaron 1 mL de AQ1 a un tubo de ensayo.
2. Se le añadieron 7 ml del reactivo de Benedict, agitando un poco.
3. Se colocó el tubo de ensayo en un baño maría y se esperó 20 minutos.
4. La prueba es positiva si hay formación de un precipitado rojo ladrillo.

Prueba de espuma (determinación de saponinas)

1. Se agregaron 3 mL de AQ1 a un tubo de ensayo.
2. Se tapó el tubo con papel parafina y se agitó por un minuto; se dejó reposar por 20 minutos.
3. La prueba es positiva si la solución presenta espuma.

Pruebas microbiológicas para la evaluación de la capacidad antibacteriana de los diferentes extractos de las hojas de la planta *Vernonia patens*.**Materiales y equipo**

- Micropipeta marca DLab de 200 μ L.
- Micropipeta marca DLab de 1000 μ L.
- Gradillas.
- Tubos de ensayo.
- Placas de Petri.
- Discos de papel filtro Whatman Schleicher & Schuell (6 mm).
- Asas estériles.

- Embudos.
- Papel filtro.
- Probetas.
- Jeringas de plástico desechables 5 ml.
- Filtro para jeringa, 0.22 Micron X 25mm SE-AF2501-22.
- Incubadora.
- Viales.
- Torundas estériles.
- Nefelómetro.
- Lámparas de alcohol.
- Guantes.
- Pinzas.

Reactivos

- Placas de agar Müller-Hinton.
- Cepa de *Salmonella diarizonae*.
- Reactivos hexano, acetato de etilo y diclorometano.
- Agua tridestilada.
- Extractos de la planta *Vernonia patens* obtenido por hexano, diclorometano, acetato de etilo y acuoso.
- Disco de ciprofloxacino CIP 5 µg.

La cepa de *Salmonella diarizonae* fue facilitada por el Laboratorio de Bacteriología Médica de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, solicitada por la microbióloga Dra. Claudia Arroyo. En cuanto a los discos del antibiótico de ciprofloxacino, fueron facilitados por la Dra. Idalia Valerio, del Departamento de Investigación de la Universidad de Ciencias

Médicas (UCIMED). Los demás materiales, equipos e insumos fueron adquiridos por la Universidad Internacional de las Américas y el Laboratorio Dra. Claudia Arroyo.

Figura 38. Cepa de *Salmonella diarizonae* en agar sangre



Nota: Elaboración propia (2021).

Para la evaluación de las pruebas antibacterianas de los diferentes extractos obtenidos a partir de las hojas de la planta *Vernonia patens*, en los diferentes diluyentes (hexano, diclorometano, acetato de etilo y acuoso), frente a la cepa de *Salmonella diarizonae*, se desarrollaron las pruebas microbiológicas en el Laboratorio Clínico Dra. Claudia Arroyo, ubicado en Santiago de Puriscal, bajo su supervisión y de la mano con el tutor, Lic. Javier Alpízar, y la cooperación de la Dra. Idalia Valerio.

Procedimientos

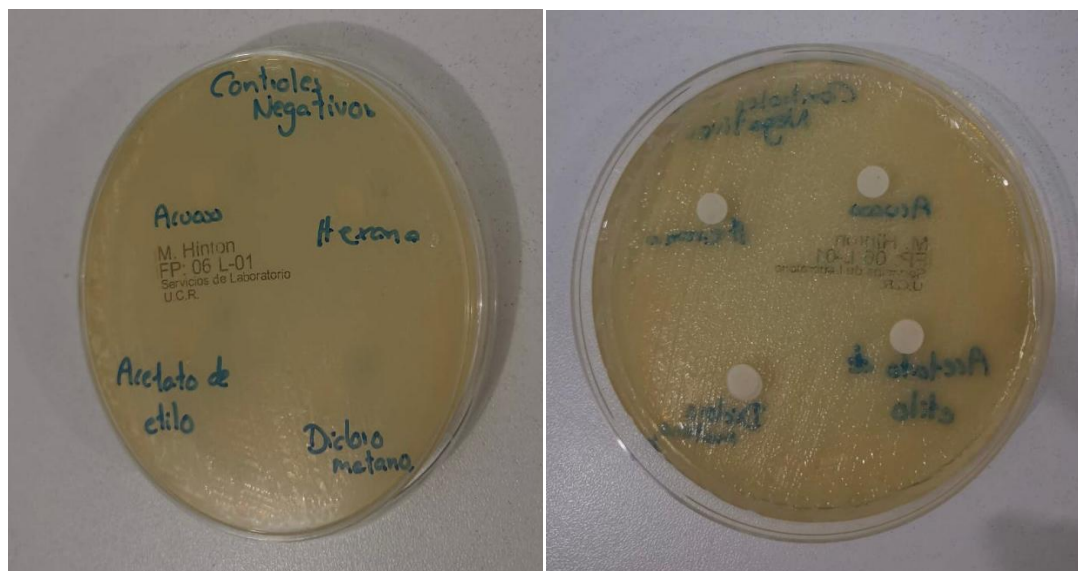
Para iniciar con las pruebas se preparó una suspensión bacteriana al 0.5 en la escala McFarland, se procedió en primer lugar a montar el control positivo, para el cual se utilizaron los discos de ciprofloxacina con la concentración de 5 µg y para control negativo y blanco en este caso se expusieron los solventes utilizados para las extracciones, con el fin de comprobar si pudieron intervenir o no en el ensayo, estos se sembraron en las placas de agar Müller-Hinton.

Figura 39. Discos de antibiótico ciprofloxacina



Nota: Elaboración propia (2021).

Figura 40. Fotografía de control negativo o blancos realizada a cada solvente para probar que no poseen actividad bactericida por sí solos



Nota: Elaboración propia (2021).

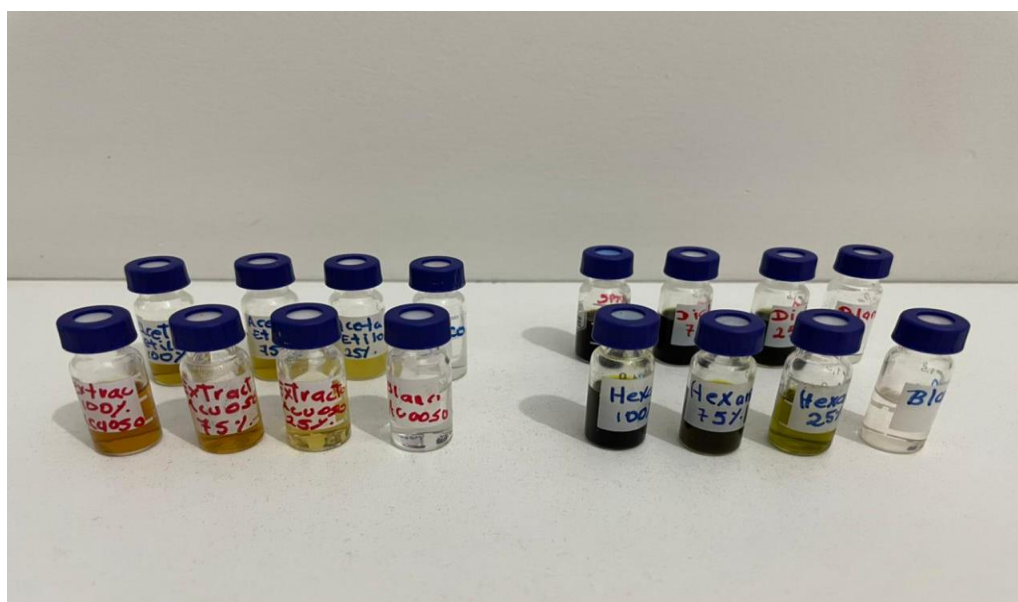
Concentración y dilución de los extractos de las hojas de la planta *Vernonia patens*

Al finalizar la recolección de los extractos (hexano, diclorometano, acetato de etilo y lo que quedó de concentración en acetato de etilo fue 48 mL, hexano 43 mL, diclorometano 23 mL y acuoso no se concentró y el volumen era de 333 mL.

A partir de los extractos madre se prepararon diluciones en concentraciones de 75% y 25% para exponer la bacteria a diferentes concentraciones de los extractos. En viales de 1 ml se prepararon las soluciones, se tomó 0,75 ml del volumen concentrado y 0,25 ml del disolvente para obtener soluciones de los extractos al 75%, y para la concentración al 25% se tomó 0,75 ml de disolvente y 0,25 ml de volumen madre.

Los extractos fueron filtrados antes del proceso de concentración a través de filtros de trompo, y jeringas, con el fin de garantizar la pureza del material, esto se repitió para los cuatro extractos. Las disoluciones se llevaron a cabo en el laboratorio microbiológico con pipetas graduadas y en cada llenado se cambió la punta para evitar la contaminación cruzada.

Figura 41. Muestras de los extractos listos, en sus diferentes concentraciones 100%, 75%, 25% y su blanco respectivo

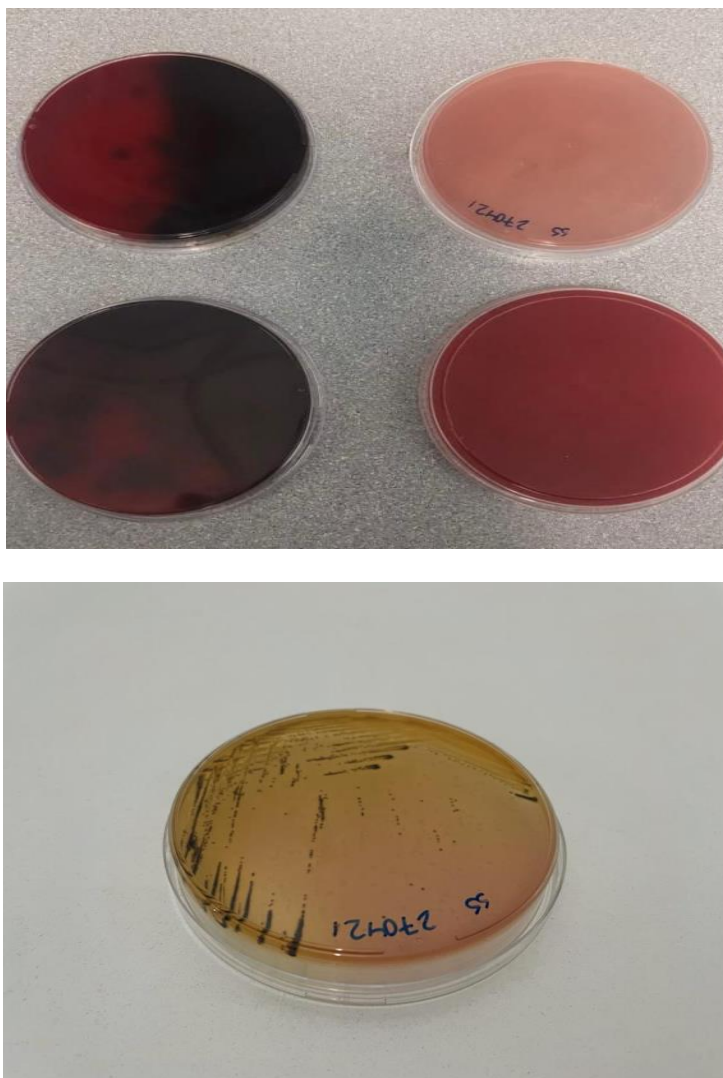


Nota: Elaboración propia (2021).

Comprobación de cepa bacteriana *Salmonella diarizonae*

Para comprobar que la cepa de la bacteria *Salmonella diarizonae* que fue enviada de la UCR llegó en buen estado y es formadora de H₂S, se le realiza un repique para comprobar que está en las condiciones óptimas. Se raya en agar *salmonella shiguella* y en agar sangre, el Agar *salmonella shiguella* es para comprobar que sea H₂S positiva y el agar sangre para mantenerla fresca. Este procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio microbiológico. Los resultados fueron satisfactorios.

Figura 42. Placas rayadas para comprobación de cepa en buen estado



Nota: Elaboración propia (2021).

Cultivo de la cepa bacteriana *Salmonella diarizonae* en el laboratorio

El método utilizado fue el de difusión por discos en agar descrito por Bauer y modificado por Calvo y Asencio en 1999. Las placas de Petri utilizadas fueron de agar Mueller Hinton con un diámetro de 90 mm y con un espesor de 5 mm.

La cepa fue preparada en una escala de 0.5 McFarland y comprobada por medio de un nefelómetro, para el rayado de la cepa bacteriana se depositaron 0.1 ml de la suspensión en las placas y se rayó con asas estériles, el método de rayado fue en todas las direcciones para lograr el crecimiento de la bacteria en toda la placa.

Simultáneamente se esterilizaron y prepararon discos de 6 mm de papel filtro Whatman Schleicher & Schuell diseñados para procedimientos de ensayo de antibióticos y fines de investigación interna, los cuales se impregnaron de cada extracto en las tres concentraciones de 100%, 75% y 25%. Se eliminó el exceso con la ayuda de una placa de pocillos y se inocularon de forma central en cada placa con la ayuda de una pinza previamente esterilizada.

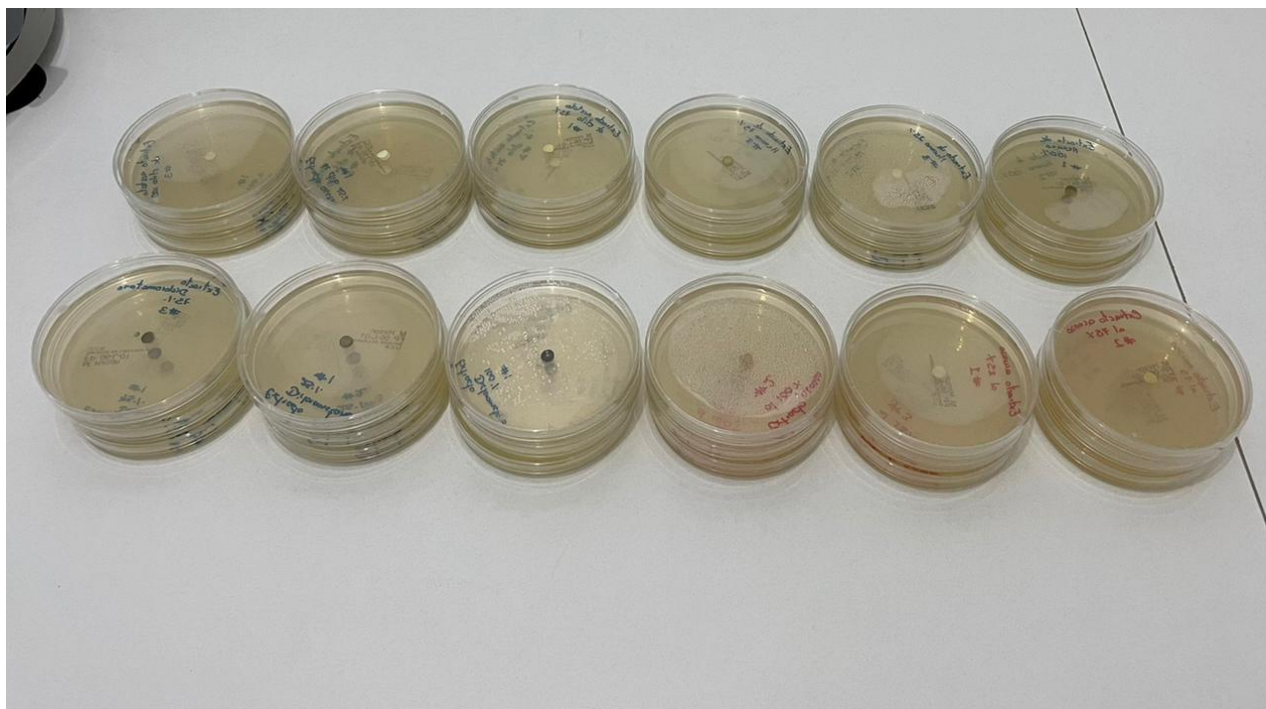
Los ensayos de cada extracto se realizaron por triplicado, y se llevaron a incubación por 24 horas a 37 °C para su posterior lectura. Se montaron en paralelo los controles, tanto positivos como negativos.

Figura 43. Discos de papel filtro Whatman Schleicher & Schuell



Nota: Frómata, Marreno, Gonzales, Lugo, Fernández & Doménech (2020).

Figura 44. Placas listas para incubación, con la cepa y las disoluciones respectivas por triplicado



Nota: Elaboración propia (2021)

Las placas se incubaron todas juntas con la temperatura correspondiente, a las 24 horas se observó el crecimiento de las bacterias en las placas, y se llevó a cabo la evaluación de los extractos en las placas, se tomaron medidas de los halos. Al finalizar todas las placas, se determinó un promedio por cada halo de inhibición, según lo indica la literatura.

Figura 45. Incubadora utilizada en el ensayo microbiológica, a temperatura 37 °



Nota: Elaboración propia (2021).

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este apartado se explican los resultados obtenidos en el proyecto de investigación, se considera importante hacer una descripción de las etapas por orden de los tres objetivos específicos detallados en el primer capítulo. Esto llevó a la realización de los procedimientos de extracción y fraccionamiento de las hojas de la planta *Vernonia patens*, se realizaron pruebas de tamizaje fitoquímicas para determinar qué clase de metabolitos secundarios contienen las hojas de la planta *Vernonia patens* en sus hojas, y pruebas microbiológicas para la comprobación de actividad antibacterial ante la *Salmonella diarizonae*.

Fraccionamiento de las hojas de la planta *Vernonia patens* (tuete) y obtención del extracto.

Las hojas de la planta *Vernonia patens* fueron recolectadas y seleccionadas para que no existiera ninguna picada o en mal estado. En una pila de cemento se llevó a cabo el lavado del material, posteriormente las hojas de la planta *Vernonia patens* se colocaron en un manteado de tela (hilo), al aire libre y se dejaron secar toda la noche, el corte y picado se hacen después del secado para evitar la pérdida por volatilización de principios activos según lo mencionan los autores Vicente, Yesid y Cásares (2000), al día siguiente se juntó y se colocó en una bolsa de tela, debido a que ese día fue llevado al laboratorio de la Universidad Internacional de las Américas, donde fue picado finamente de forma manual con un cuchillo, como se puede ver en la Figura 46.

Figura 46. Hojas de *Vernonia patens*, lavada, secada y cortada, lista para la obtención del extracto



Nota: Elaboración propia (2021).

El método utilizado para la extracción del material vegetal en este proyecto de investigación fue mediante la maceración de las hojas en etanol a una concentración del 70% con un tiempo de ocho días.

El principio de esta técnica consiste en la obtención de extractos gracias al tiempo de contacto que el solvente debe tener con el material vegetal para lograr una mayor superficie de contacto con el solvente, este proceso se realizó a temperatura ambiente.

Se recomienda realizar agitaciones frecuentes para homogenizar el producto y así tratar de influenciar el rendimiento de la extracción del material vegetal; es conveniente la protección del recipiente de extracción de la luz solar, ya que esta puede llegar a descomponer sustancias fotolábiles (Moreno, 2018).

A la semana siguiente, la mezcla se filtró en el equipo correspondiente y el disolvente se concentró mediante el equipo evaporador rotativo a presión reducida a una temperatura no mayor de 60 °C, así lo mencionan Ramírez & Solera (2001), en su trabajo de investigación, el método de rotavapor es el más indicado, fácil de manejar y el resultado el más preciso, la eliminación del etanol es casi completa y así se obtiene el extracto crudo esperado.

El material crudo se trabajó con tres diferentes disolventes de polaridad distinta a la del agua, de esta manera se puede dar la separación de los compuestos del extracto crudo según la afinidad en los disolventes, hexano diclorometano y acetato de etilo. El fraccionamiento realizado se llevó a cabo la semana siguiente de la filtración, los pasos se llevaron a cabo en el orden establecido con el fin de ir incrementando poco a poco la polaridad.

Una vez eliminado todo el etanol, se procedió a la obtención de los extractos diclorometano, hexano, acetato de etilo y acuoso, este último se elabora por medio de la extracción líquido-líquido, proceso que se ha utilizado para los extractos de las hojas de *Vernonia patens*, según Moreno (2018), donde se da la transferencia de una o varias sustancias desde una fase líquida a otra líquida que es inmisible con la primera, debido al reparto entre las dos fases de compuestos de diversas polaridades. Generalmente una de las fases es acuosa y la otra es orgánica.

Figura 47. Extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo y acuoso, obtenidos en el fraccionamiento del extracto crudo de las hojas de la planta *Vernonia patens* (tuete)



Nota: Elaboración propia (2021).

Los cuatro diferentes extractos buscados se obtuvieron mediante la técnica recomendada, y sus volúmenes fueron distintos, su apariencia fue un líquido fluido. El extracto de hexano presentó características organolépticas como color amarillo brillante, la consistencia líquida y apariencia

translúcida. En el extracto de diclorometano, sus características organolépticas fueron un color amarillo oscuro, apariencia translúcida y consistencia líquida.

En el acetato de etilo sus características fueron el color amarillo claro, con apariencia translúcida con partículas visibles y consistencia líquida, y por último, el extracto acuoso con una tonalidad amarillo brillante, apariencia translúcida y consistencia líquida.

Figura 48. Extracto de hexano obtenido en el fraccionamiento del extracto crudo de las hojas de la planta *Vernonia patens* (tuete)



Nota: Elaboración propia. (2021).

Figura 49. Extracto de acetato de etilo obtenido en el fraccionamiento del extracto crudo de las hojas de la planta *Vernonia patens* (tuete)



Nota: Elaboración propia, (2021).

Tabla 9. Extractos característicos y volúmenes obtenidos a partir del fraccionamiento de las hojas de la planta *Vernonia patens* (tuete)

Disolvente de Extracción	Volumen del extracto (mL)	Característica Organoléptica		
		Apariencia	Color	Consistencia
Hexano	321 mL	Traslúcida	Amarillo brillante	Líquida
Diclorometano	347 mL	Translúcida	Amarillo oscuro	Líquida
Acetato de etilo	390 mL	Translúcida con partículas visibles	Amarillo claro	Líquida
Acuoso	333 mL	Translúcida	Amarillo brillante	Líquida

Nota: Elaboración propia (2021).

Luego de obtenidos y caracterizados los extractos elaborados, se procede a determinar la cantidad de los sólidos disueltos en los extractos y así alcanzar la concentración de cada extracto. Los cálculos de las concentraciones se observan en la Tabla 10, los obtenidos mediante la determinación de la masa por diferencia, anotando las masas de los viales vacíos y posteriormente con el residuo de material contenido en 1 mL y 2 mL del extracto. La masa de los residuos fue cuantificada en mg y la concentración, por mL de extracto.

Tabla 10. Masas de las variables por cada extracto y obtención de la concentración de los extractos preparados

Extracto	Muestra	Masa de los viales vacíos con tapa (mg)	Masa de los viales + sólidos disueltos con tapa (mg)	Masa obtenida de a diferencia de pesos (mg)	Volumen administrado al vial (mL)	Concentración (mg/mL)
Acuoso	Concentrada	9847,9	9922,8	74,90	2,00 mL	37,45 mg/mL
Acetato de Etilo	Concentrada	2502,8	2543,0	40,20	1,000 mL	40,20 mg/mL
Diclorometano	Concentrada	2491,7	2528,4	36,70	1,000 mL	36,70 mg/mL
Hexano	Concentrada	2549,6	2581,1	31,50	1 mL	31,50 mg/mL

Nota: Elaboración propia (2021).

La determinación de la concentración masa/volumen de los extractos obtenidos y los cuales se muestran en la Tabla 10, se realizó mediante la utilización de la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = \frac{\text{masa (mg)}}{\text{volumen (mL)}} : \frac{\text{masa sólidos disueltos en miligramos(mg)}}{\text{Volumen administrado al vial (mL)}}$$

Caracterización de los extractos de las hojas de la planta *Vernonia patens* mediante tamizaje fitoquímico

Seguidamente, para llevar a cabo la caracterización de los compuestos activos que poseen las hojas de la planta *Vernonia patens* se procede a realizar el tamizaje fitoquímico para el extracto etéreo donde se analizaron las pruebas para verificar la presencia de metabolitos secundarios: flavonoides, taninos, saponinas, cumarinas, terpenos, triterpenos y esteroides, antraquinonas, almidón y azúcares reductores. Las pruebas se les realizaron a los extractos, identificados de la siguiente manera: etéreos (E), acuosos (AQ1 Y AQ2) y del extracto AQ2 se fraccionó para obtener

(AQ2E y AQ2), estos extractos se obtuvieron de acuerdo con el procedimiento ya descrito en la metodología de la investigación.

En la Tabla 11 se muestran los resultados generales del tamizaje fitoquímico por cada extracto analizado, donde se describen los resultados de la siguiente forma: (+++) = muy positivo, (++) = positivo, (+) levemente positivo, (-) negativo. Se realiza esta clasificación de acuerdo con las observaciones realizadas a las coloraciones obtenidas en las pruebas y las reacciones que se produjeron, según lo menciona Alpízar (2018), en su Manual de Laboratorio de Farmacognosia.

Tabla 11. Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico realizados a los diversos extractos de las hojas de la planta *Vernonia patens* (tuete)

Prueba	Identificación	Resultado de presencia positiva	Extracto analizado	Resultado
Dragendorff	Alcaloides	Precipitado naranja	Etéreo	(+)
			AQ2E	(-)
			AQ1	(-)
Shinoda	Flavonoides	Coloración rojo, rosado o rojo oscuro	Etéreo	(+++)
			AQ2E	(+)
KOH	Cumarinas	Coloración verde alrededor	Etéreo	(+++)
			AQ2E	(+++)
Liberman Burchard	Triterpenos y Esteroles	Coloración rojo marrón o verde esmeralda	Etéreo	(-)
	Antraquinonas		AQE2	(-)
			Etéreo	(-)

Bornträger-Kraus		Coloración rojo oscuro	AQ2E	(-)
			AQ2	(-)
Taninos	Taninos	Coloración verde o coloración azul	Etéreo	(++)
			AQ1	(+++)
Cromatografía capa fina	Terpenos	Manchas verdes, azules o moradas.	Etéreo	(-)
Lugol	Almidón	Azul	AQ1	(-)
Espuma	Saponinas	Espuma	AQ1	(+)
Benedict	Azúcares reductores	Precipitado rojo	AQ1	(+++)

(+++)= muy positivo; (++)= positivo; (+) levemente positivo; (-) negativo.

Nota: Elaboración propia (2021).

Realizadas las pruebas y con los datos mostrados en la Tabla 11, esto indica, según la cantidad de pruebas obtenidas por cada extracto trabajado y analizado, el extracto etéreo y AQ1, tienen una mayor presencia de metabolitos secundarios, lo que arroja que en la mayoría los compuestos que presentan las hojas de la planta *Vernonia patens* son característicamente con baja polaridad, ya que el éter disuelve favorablemente los componentes no polares. El otro extracto que mostró una cantidad significativa de metabolitos secundarios fue el extracto AQ1 reafirmando su polaridad.

Para observar mejor y resumir los datos de los metabolitos secundarios que poseen las hojas de la planta *Vernonia patens*, en la Tabla 12 se pueden ver los resultados finales del tamizaje fitoquímico previamente realizado. Comparando con otras investigaciones de la planta, se asimilan los que dieron positivos.

Tabla 12. Tipos de metabolitos detectados mediante el tamizaje fitoquímico en las hojas de la planta de *Vernonia patens*

Extracto	Metabolitos secundarios presentes en el extracto				
	Alcaloides	Cumarinas	Taninos	Flavonoides	Azúcares reductores
AQ1			X		X
AQ2E		X		X	
E	X	X	X	X	

Nota: Elaboración propia (2021).

Con los resultados obtenidos en los las pruebas de tamizaje se puede confirmar que las hojas de la planta *Vernonia patens* empleadas en la investigación poseen los siguientes metabolitos secundarios: cumarinas, flavonoides, taninos, azúcares reductores y en baja cantidad, pero presentes, los alcaloides. Esto se relaciona con los tamizajes fitoquímicos elaborados por Moreno (2018), donde se mencionan resultados positivos para la identificación de flavonoides, Terpenos, auronas y fenoles.

Según Manzano y colaboradores (2013) en su estudio en flores, hojas y ramas de la planta *Vernonia patens*, evidenciarón realizado la presencia de 29 compuestos de los cuales 23 se encontraban en las hojas, ácido graso en toda las partes analizadas de la planta, además los compuestos insaponificables presentes en las fracciones lipídicas, fueron analizados en cromatogramas gaseosos analíticos, y se vio la presencia de triterpenoides, este segundo artículo reafirma los metabolitos encontrados.

En los análisis que se muestran a continuación se van a detallar los resultados para cada metabolito secundario por separado, dando a conocer sus propiedades por medio de la presencia y ausencia en las hojas, específicamente.

Identificación de alcaloides

Para llevar a cabo la identificación de los alcaloides en este extracto vegetal se les realizó las pruebas a los extractos etéreos, AQ1y AQ2E. Es necesario indicar que la prueba debe dar un tono naranja para clasificar como positivo el resultado; en el trabajo de campo realizado solo el extracto etéreo dio un leve color naranja, lo que indica en la Figura 50 que en los extractos AQ1 y AQ2E la prueba resultó negativa, ya que la coloración dio amarillo con anillo naranja y café, en este caso las pruebas no arrojaron ningún precipitado.

El resultado era el esperado, debido a que en las tesis y artículos leídos se indica que los resultados no eran positivos en las pruebas de alcaloides; además, para estar más seguros a la hora de los resultados, el Lic. Luis Poveda -botánico y biólogo- recomendó el estudio de la familia de la planta debido a que no se han realizado investigaciones a gran escala de la planta *Vernonia patens*. Según el autor Germosén (2014), en la Farmacopea Vegetal Caribeña, las especies de la familia *Asteraceae* no poseen alcaloides, se evidencia cuando describe que las plantas *Tagetes lucida* (hierba de San Juan), *Tanacetum parthenium* (altamiza) familia de la *Vernonia patens* por mencionar algunas, son ricas en metabolitos secundarios.

Figura 50. Aplicación de pruebas de identificación de alcaloides con reactivo Dragendorff, extractos: Etéreo, AQ1 y AQ2E



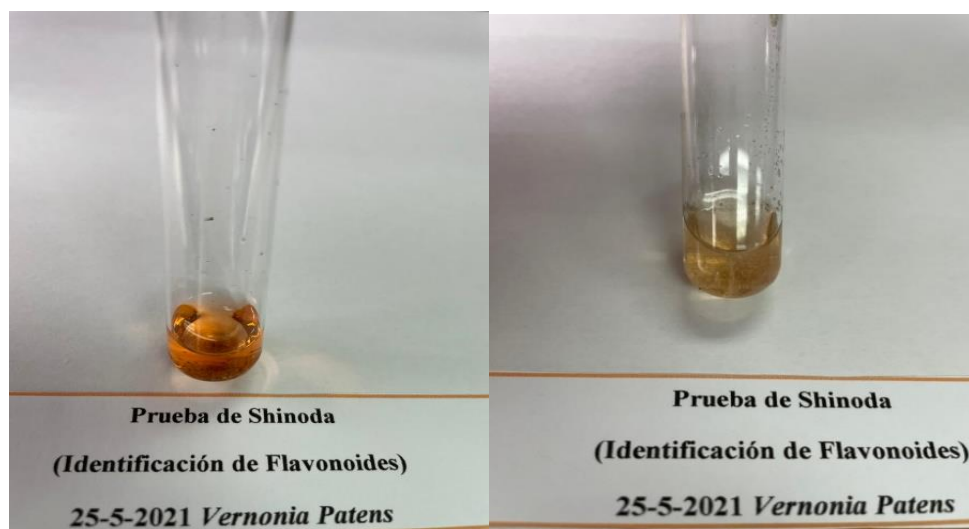
Nota: Elaboración propia (2021).

Identificación de flavonoides

Para llevar a cabo la identificación de los flavonoides se realizó la prueba de Shinoda, para poder comprobar que la prueba es positiva, la coloración a la hora del cambio es de color rojo o también rosado claro. En esta prueba los extractos usados fueron los AQ2E y el extracto etéreo, como se puede observar en la Figura 51, los dos presentan un resultado positivo, inicialmente la coloración de los extractos era amarillo claro, por este motivo fue muy evidente el cambio de coloración, que sí fue el adecuado según lo menciona la literatura.

Moreno *et al.* (2018), en su tesis Actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas *Vernonanthura patens* (lariaco) en cepas de *Salmonella spp*, demuestra que en la composición fitoquímica de la planta *Vernonia patens* sí existe la presencia del metabolito secundario flavonoide.

Figura 51. Aplicación de pruebas de identificación de flavonoides con reactivo: Etéreo y AQ2E



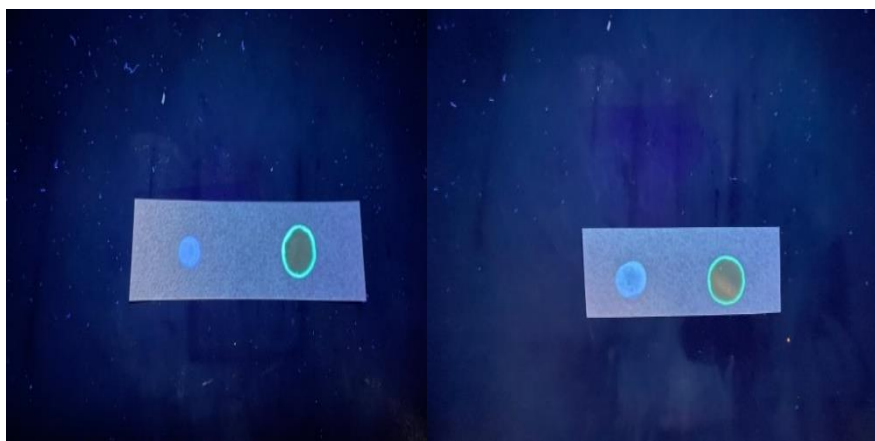
Nota: Elaboración propia (2021).

Identificación de Cumarinas

Las pruebas para la identificación de cumarinas fueron aplicadas al extracto etéreo y AQ2E, se identifica la presencia de cumarinas con ayuda del reactivo KOH, según lo indica Alpízar (2018), la presencia del metabolito revela una tonalidad verde alrededor con la ayuda de la lámpara UV visible, que el caso de los dos extractos se observó muy fuerte. Se refleja en la Figura 52 como la coloración es intensa, obteniendo el resultado positivo ante un solo extracto.

Esta prueba fue un gran aporte también para la parte microbiológica, ya que según Miño (2007) las cumarinas son utilizadas en terapias para el tratamiento de la soriasis, también tienen propiedades antibacterianas, y en este estudio se busca demostrar que los extractos poseen poder inhibitorio contra la especie de la bacteria *salmonella diarizonae*.

Figura 52. Aplicación de pruebas de identificación de cumarinas con reactivo KOH, extractos: Etéreo y AQ2E

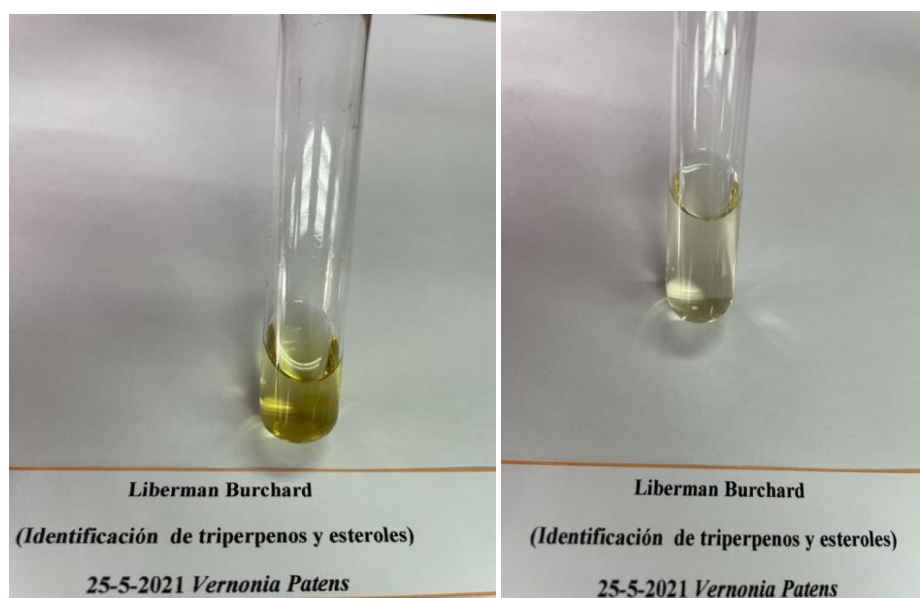


Nota: Elaboración propia (2021).

Identificación de triterpenos y esteroides

La prueba para identificación de los grupos de triterpenos y esteroides se realizó mediante la prueba de Liberman Burchard, por medio de la cual se realiza un procedimiento que debe maniobrase rápido y preciso, debido al manejo de ácido sulfúrico concentrado, si los resultados son positivos la coloración debe dar tonos verde esmeralda o rojo marrón, pero en la Figura 53 se muestra como la tonalidad no cambió, dando resultados negativos.

Figura 53. Aplicación de pruebas de identificación de Triterpenos y Esteroides con reactivo de Liberman Burchard, extractos: Etéreo y AQ2E

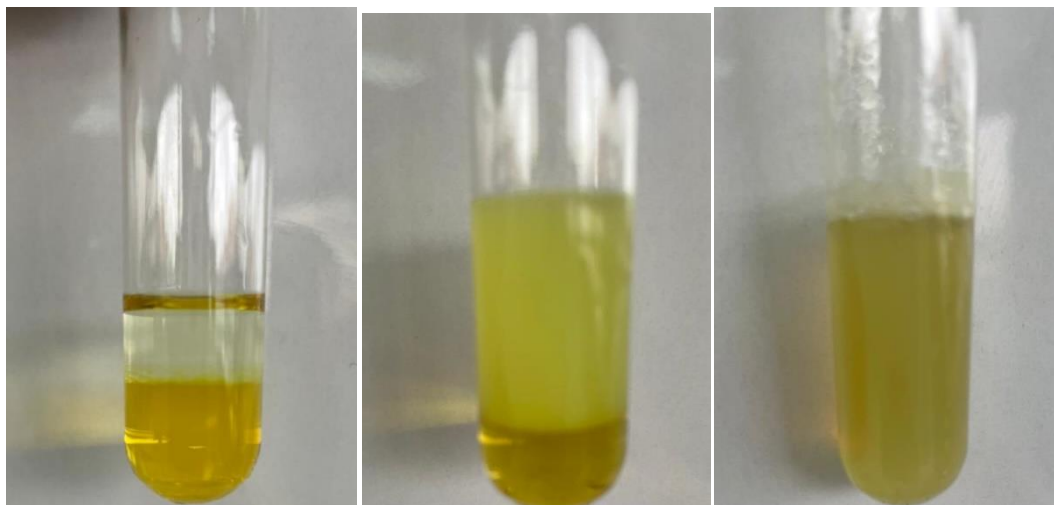


Nota: Elaboración propia (2021).

Identificación de antraquinonas

En la Figura 54, se puede observar los resultados obtenidos para los extractos etéreos, AQ2E, AQ2, los cuales son tonalidades amarillas; en esta prueba los resultados esperados son tonalidades rojo oscuro, por ende, se descarta que posea antraquinonas. En la bibliografía revisada no se encuentran datos de estudios anteriores que indiquen que el tamizaje evidencie la presencia de antraquinonas.

Figura 54. Aplicación de pruebas de identificación de antraquinonas con reactivo de Bornträger- Kraus, extractos: Etéreo, AQ2E y AQ2



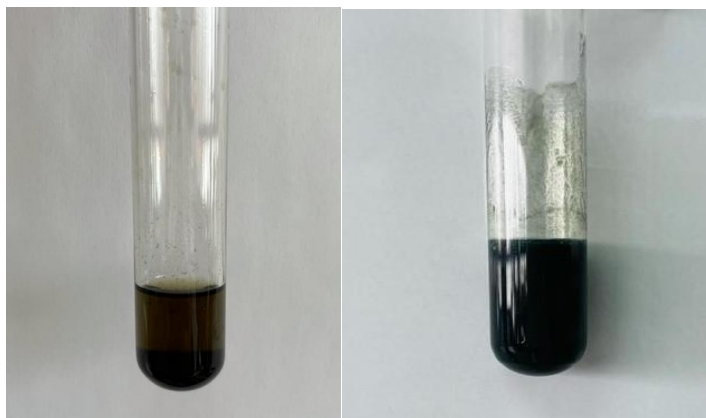
Nota: Elaboración propia (2021).

Identificación de taninos

Las pruebas para la identificación de taninos se realizaron en los extractos AQ1 y etéreo de la las hojas de la planta *Vernonia patens*, para la identificación de la prueba la coloración positiva es azul ante la presencia de taninos gálicos, y una coloración verde para los taninos catéquicos.

En el caso de esta prueba y según lo observado en el laboratorio y en la Figura 55, el resultado es positivo en ambos extractos, la tonalidad ha sido identificada por Manzano (2013), quien en su artículo describe que los resultados verdes oscuro se deben a que este órgano vegetal es positivo.

Figura 55. Aplicación de pruebas de identificación de taninos, extractos: Etéreo y AQ1

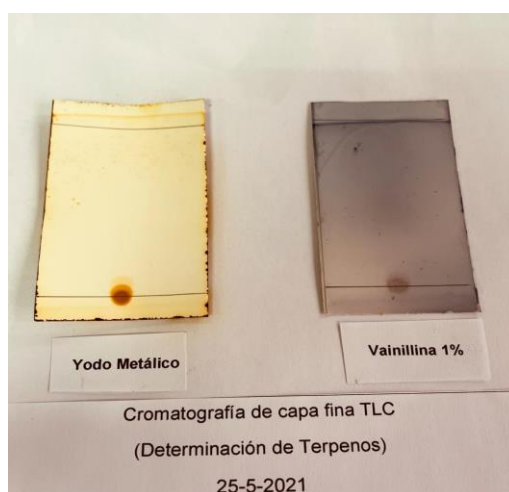


Nota: Elaboración propia (2021).

Identificación de terpenos

La realización de esta prueba se tuvo que repetir en dos ocasiones, es compleja, debido a que se humedece con el reactivo de vainillina que se prepara en el momento, además el quemado debe ser muy controlado y a bajas temperaturas, donde se espera que aparezcan tonalidades entre fucsia y morado. En las dos ocasiones que se realizaron dio negativos, como se muestra en la Figura 56.

Figura 56. Aplicación de prueba de identificación de terpenos por medio de cromatografía de capa fina, reveladas con vainillina

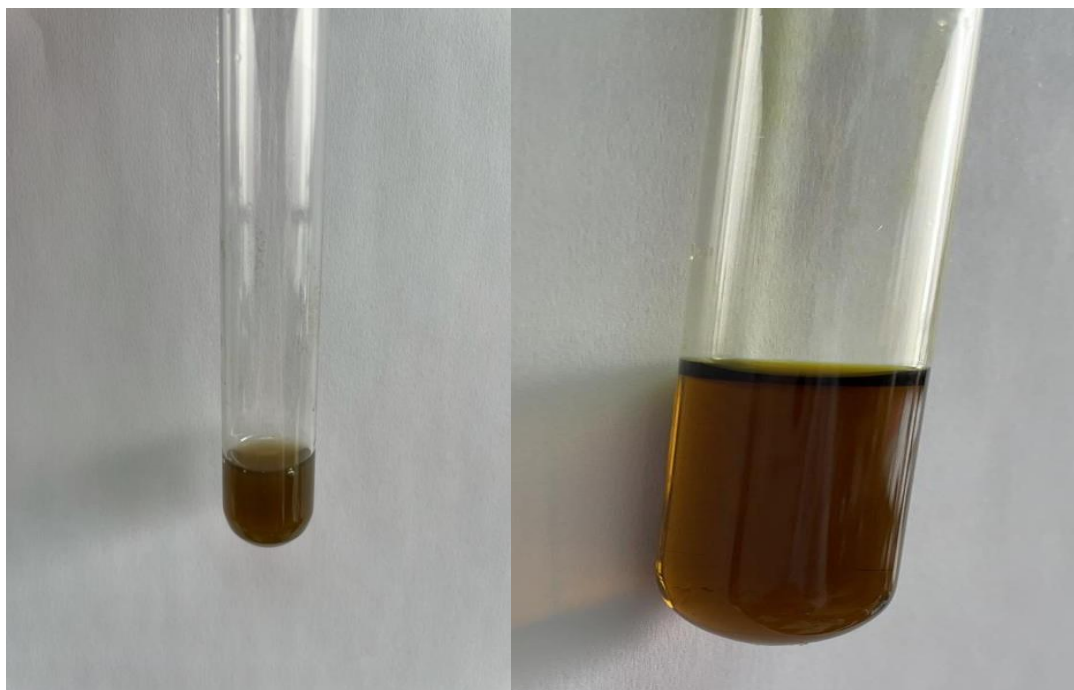


Nota: Elaboración propia (2021).

Identificación de almidón

Los extractos en esta prueba deben presentar un cambio de coloración que tiende al color azul para que sea positiva. La prueba de identificación de almidón se llevó a cabo en el extracto AQ1, con el reactivo de Lugol, los resultados en este caso fueron de una tonalidad café, dando un resultado negativo, el cual se puede observar con la claridad en la Figura 57.

Figura 57. Aplicación de prueba de identificación de almidón con reactivo de Lugol, extracto: AQ1

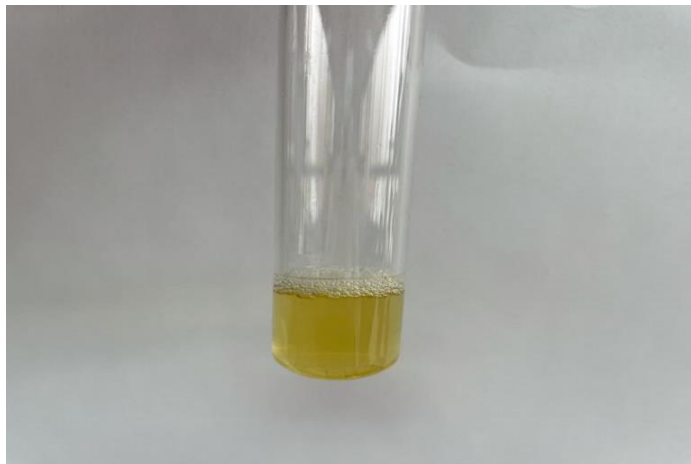


Nota: Elaboración propia (2021).

Identificación de saponinas

Para la prueba de saponinas se trabajó el extracto AQ1; para clasificar la prueba como positiva, según el Manual de farmacognosia de Alpízar (2018), debe verse después del procedimiento, en la base, presencia pronunciada de espuma, por ende, en las pruebas se muestra su ausencia al final, descartando positiva esta prueba.

Figura 58. Aplicación de prueba de identificación de saponinas (espuma), extracto: AQ1

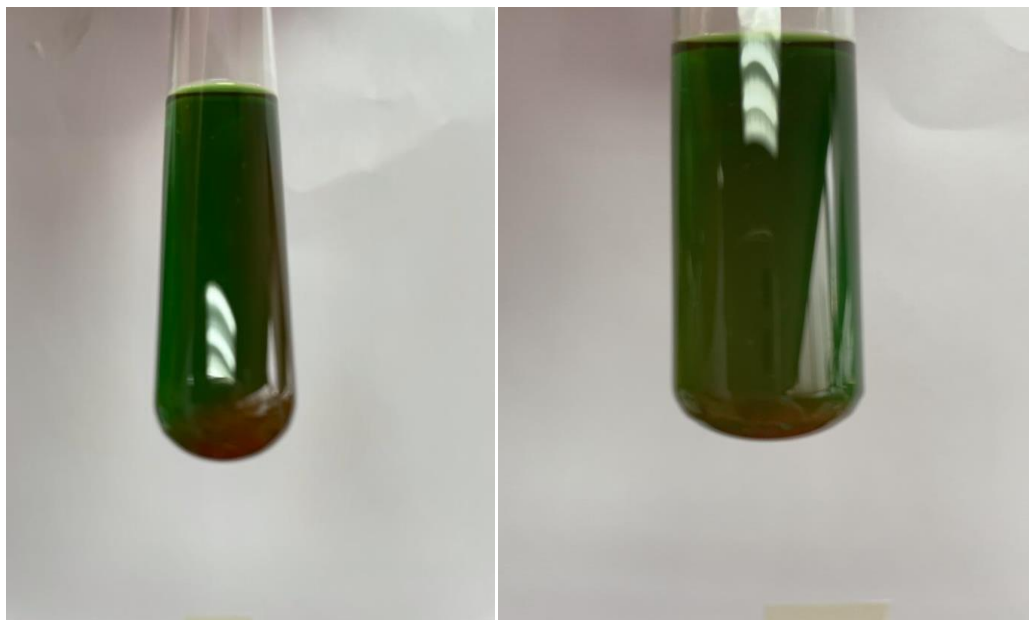


Nota: Elaboración propia (2021).

Identificación de azúcares reductores

El extracto utilizado para esta prueba es el AQ1, en este caso, si posee azúcares reductores se forma un precipitado naranja (Alpizar, 2018). En la Figura 59 se observa con detalle el precipitado que se formó a la hora de adicionar el reactivo de Benedict, resultando la prueba positiva.

Figura 59. Aplicación de prueba de identificación de azúcares reductores con reactivo de Benedict, extracto: AQ1



Nota: Elaboración propia (2021).

Con los resultados obtenidos anteriormente se puede conocer la presencia de los metabolitos secundarios que componen las hojas de la planta *Vernonia patens*, dando positivos alcaloides, azúcares reductores, cumarinas, flavonoides y taninos, estos últimos tres son derivados de los fenoles, el autor Martín (2017) mediante su artículo sobre la actividad antibacteriana de estos, que se basan en inhibir el crecimiento, reproducción, respiración y cualquier otra función vital de los microorganismos.

Esta acción la realizan mediante mecanismos como oxidación de enzimas específicas, que van a inhibir alguna función vital, como la respiración. También se reporta que estos metabolitos secundarios se pueden unir a las cadenas de ADN interrumpiendo la reproducción o la síntesis de proteínas y elementos vitales para los microorganismos de extractos acuosos, metabólicos y cetónicos de algunas bacterias, entre esas la *Salmonella pooni*, *Salmonella enteritidis*, y otras Gram negativas (p. 97).

Diclorometano	9.0 <i>mm</i>	9.0 <i>mm</i>	0.0 <i>mm</i>	7.0 <i>mm</i>	7.0 <i>mm</i>	7.0 <i>mm</i>	0.0 <i>mm</i>	0.0 <i>mm</i>	0.0 <i>mm</i>	m m
Acetato de etilo	0.0 <i>mm</i>	10.0 <i>mm</i>	10.0 <i>mm</i>	8.0 <i>mm</i>	8.0 <i>mm</i>	8.0 <i>mm</i>	7.0 <i>mm</i>	7.0 <i>mm</i>	7.0 <i>mm</i>	
Blanco positivo	20.0 <i>mm</i>	20.0 <i>mm</i>	20.0 <i>mm</i>	20.0 <i>mm</i>	20.0 <i>mm</i>	20.0 <i>mm</i>	20.0 <i>mm</i>	20.0 <i>mm</i>	20.0 <i>mm</i>	
Blanco Negativo	0.0 <i>mm</i>	0.0 <i>mm</i>	0.0 <i>mm</i>	0.0 <i>mm</i>	0.0 <i>mm</i>	0.0 <i>mm</i>	0.0 <i>mm</i>	0.0 <i>mm</i>	0.0 <i>mm</i>	

Nota: Elaboración propia (2021).

Después de la lectura de cada halo se procedió a aplicar la fórmula para obtener el valor de inhibición, los cuales se muestran en la Tabla 14 después de su correspondiente cálculo.

$$\text{Valor de inhibición} = \frac{\text{Diámetro de inhibición en mm} - \text{Diámetro del disco (6mm)}}{2}$$

Tabla 14. Valores de inhibición calculados a partir de la fórmula y la medición de halos

EXTRACTOS	CONCENTRACIONES UTILIZADAS									INHIBICIÓN
	100%			75%			25%			
NÚMERO DE RÉPLICA	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
ACUOSO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
HEXANO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
DICLOROMETANO	1.5	1.5	0	0.5	0.5	0.5	0	0	0	
ACETATO DE ETILO	0	2	2	1	1	1	0.5	0.5	0.5	

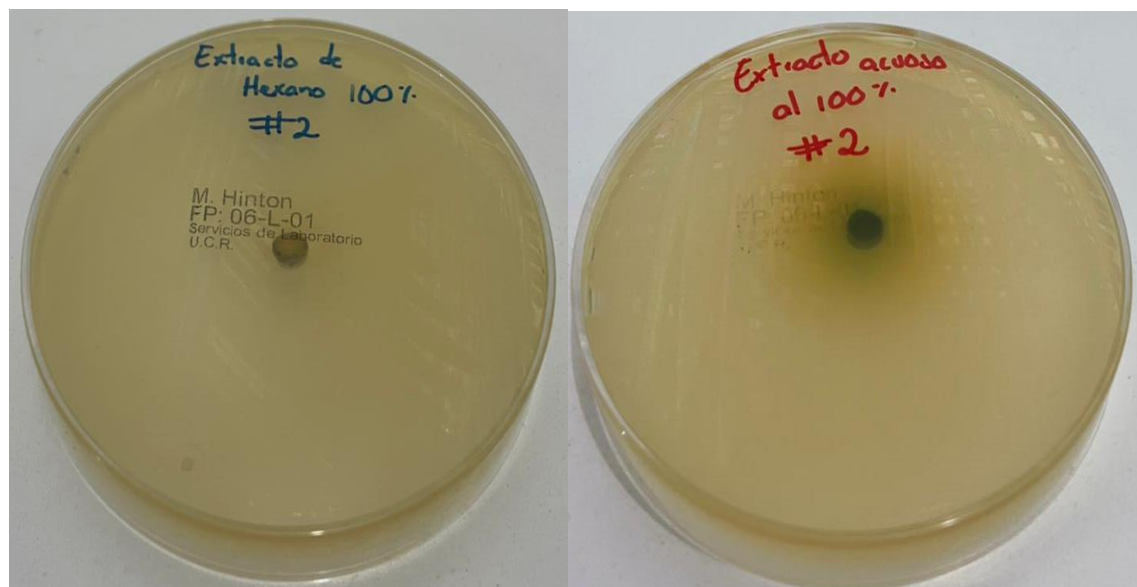
Nota: Elaboración propia (2021).

El tercer objetivo de esta investigación fue comprobar el efecto antimicrobiano de los extractos de las hojas de la planta *Vernonia patens*. En la Tabla 13 se muestra el valor en milímetros de la medición de cada halo, la cual se realizó utilizando una regla y se posicionó de extremo a extremo pasando por encima del disco impregnado con cada extracto, por lo cual posterior a la medición se aplicó la fórmula para calcular el valor de inhibición, valores que se muestran en la Tabla 14.

Analizando los valores de inhibición, se puede denotar que las pruebas con extracto acuoso en las tres concentraciones probadas todos los valores obtenidos son cero, por lo que se concluye que en este extracto no se muestra alguna actividad antimicrobiana de la planta.

Para el extracto en hexano como disolvente se obtiene los mismos resultados en las tres concentraciones, por lo que tanto en el extracto acuoso como en hexano se demuestra que la planta no se posee propiedades bactericidas (Figura 60).

Figura 60. Fotografía donde se evidencia que no existió halo inhibitorio en los extractos acuoso y de hexano

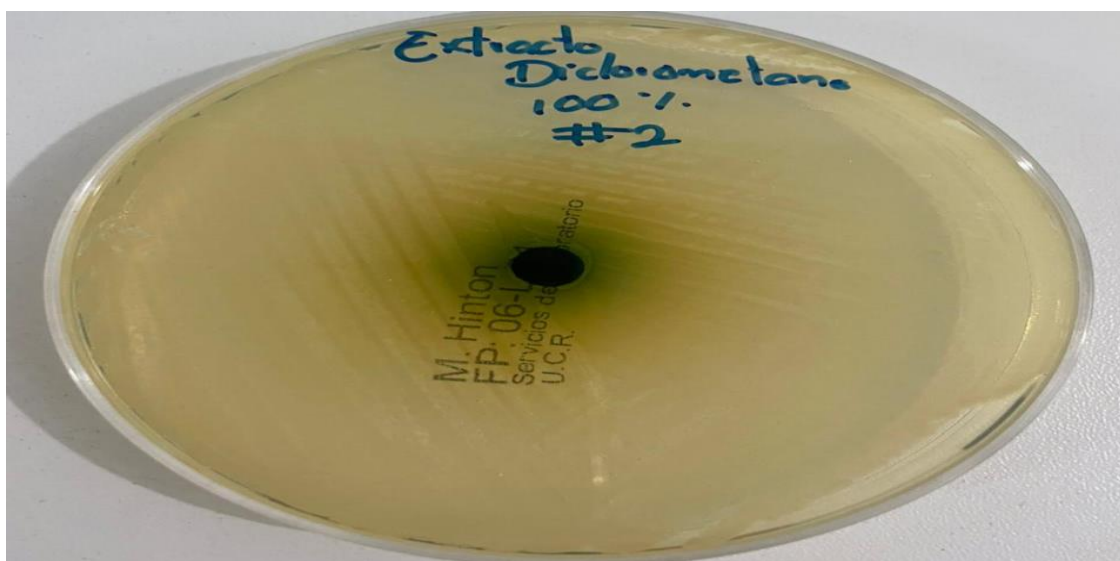


Nota: Elaboración propia, 2021.

Sin embargo, en el extracto con diclorometano se obtienen halos inhibitorios visibles (Figura 54) con 9 mm de amplitud en la réplica 1 y 2 de la concentración al 100%, obteniendo un valor de inhibición de 1,5. En las réplicas probadas con una concentración de 75% del extracto de diclorometano se obtienen halos inhibitorios de 7 mm en las 3 réplicas, para un valor final de 0,5 de inhibición.

Y para las pruebas al 25% se obtienen valores de cero, por lo que se demuestra un descenso en la capacidad antimicrobiana según es la concentración de extracto, por lo que en pruebas futuras se podría concentrar aún más el extracto y quizá obtener halos inhibitorios de mayor tamaño.

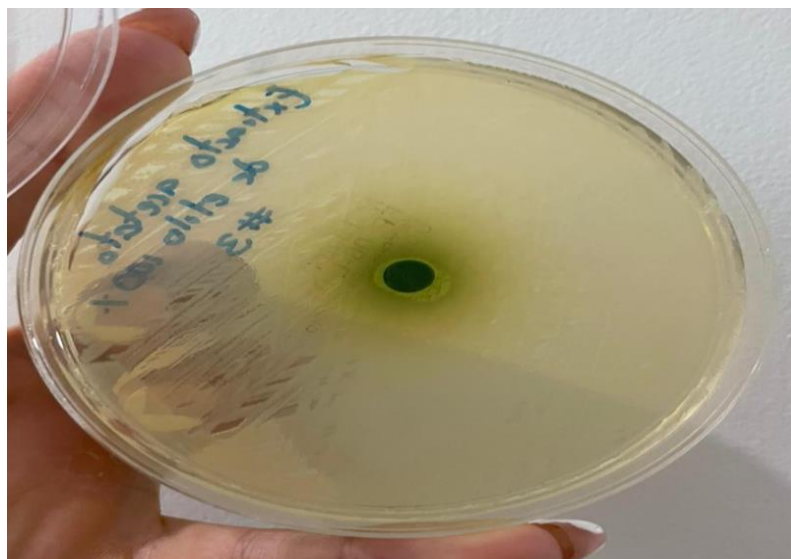
Figura 61. Fotografía donde se evidencia la existencia de halo inhibitorio en el extracto de diclorometano al 100% con un valor de 9 mm



Nota: Elaboración propia, 2021.

El último extracto probado fue el de acetato de etilo, el cual fue el extracto con mayor inhibición mostrada, obteniendo halos de inhibición en las tres concentraciones ensayadas. Valores de inhibición de 2 en las réplicas 2 y 3 en la concentración a 100%, de 1 en la concentración al 75% y por último de 0.5 en la concentración al 25%, mostrando también un descenso en los valores inhibitorios según descendida la concentración del extracto.

Figura 62. Fotografía donde se evidencia la existencia de halo inhibitorio en el extracto de acetato de etilo al 100% con un valor de 10 mm



Nota: Elaboración propia (2021).

En la Figura 63 se muestra el control positivo, en el cual se expuso la bacteria a un disco de ciprofloxacina, antibiótico que se utiliza como terapia de elección en las infecciones por *Salmonella diarizonae*. El control muestra un halo inhibitorio de 20 mm, si se compara con los datos obtenidos, se denota con gran diferencia.

Por ello se puede decir que la planta sí posee actividad bactericida según sea el disolvente utilizado; no obstante, se necesitan más pruebas para determinar la concentración exacta necesaria para que sea utilizada como terapia de infecciones provocadas por dicha bacteria.

A pesar de no se estableció la concentración mínima inhibitoria, se observó que a la concentración del 25% que corresponde a 10,05 mg/ml, en el extracto de acetato de etilo si hubo sensibilidad lo que se evidencio con un halo de inhibición de 7.0mm.

Estudios realizados en Ecuador probaron la capacidad antimicrobiana de dicha planta con resultados satisfactorios (Moreno, 2018) y a su vez se puede afirmar, con el trabajo de investigación finalizado y analizados los resultados, que la planta posee metabolitos secundarios que llevan a que

la planta tenga propiedades antibacterianas, entre otras. Es un gran aporte lo que se recolectó, y quedan grandes indicios para poder llevar a cabo variedad de investigaciones que desarrollen con mayor profundidad los vacíos del estudio.

Figura 63. Blanco positivo del antibiótico ciprofloxacino en tubo e implantado en el agar durante 24 horas



Nota: Elaboración propia (2021).

Al analizar globalmente los resultados obtenidos, se puede comprobar por medio de la Tabla 13 de resultados de la inhibición por extracto y la Tabla 14 de medición de halos, que el extracto de acetato de etilo elaborado a una concentración de 40,20 mg/mL mostró actividad frente a la bacteria *Salmonella diarizonae*, generando un halo de inhibición de 10,0 mm en el extracto al 100%, 8,0 mm en el de 75% y 7,00 mm en el de 25%, debido a que se realizó por triplicado, por tal motivo se puede decir que el extracto de acetato de etilo presenta actividad antibacteriana contra el microorganismo *Salmonella diarizonae*.

De igual manera el extracto de diclorometano elaborado a una concentración de 36,70 mg/mL mostró actividad frente a la bacteria *Salmonella diarizonae*, generando un halo de inhibición de 9,0 mm al 100% y uno de 7,00 mm al 75%, por tal motivo se puede decir que presenta actividad antibacteriana contra la *Salmonella diarizonae*.

Mediante la utilización del control positivo se obtuvo un diámetro de inhibición de 20,00 mm, el medicamento fue el elegido debido a que estudios incluidos 46 antibióticos diferentes reportaron que las cepas de *Salmonella spp* analizadas fueron sensibles a todos los antibióticos, entre ellos tetraciclinas y ácido nalidíxico, por lo cual Quesada, Reginatto, Ruiz, Colantorio, & Burrone (2016), evidencian que en la nueva alternativa ante la resistencia que ha adquirido *Salmonella diarizonae* se han utilizado nuevos antimicrobianos de primera línea, como la ciprofloxacina 500 mg.

Las hojas de planta *V. patens* arrojaron su metabolito más positivo en las cumarinas, las cuales se sabe poseen reconocida actividad antimicrobiana, según lo mencionan los autores Vicente, Yesid & Cáceres (2000).

Ellos describen que en la planta *Mikania laevigata* -también conocida como “guaco”- desarrollaron el método cromatográfico para el extracto fluido y caracterizaron más de 18 sustancias, principalmente cumarina, es importante mencionar que es familia *Asteraceae* es la misma de *V. patens* (309-310).

En las pruebas realizadas de tamizaje los taninos resultaron muy positivos para el extracto AQ1, lo cual colabora de gran manera con los resultados que se esperaban, la autora Rodríguez (2011), indica que compuestos fenólicos han demostrado tener actividad antimicrobiana, los taninos y el ácido tánico, inhibiendo diferentes familias de bacterias, entre esas la *Salmonella*. (p. 165).

Asimismo, en la Farmacopea Vegetal Caribeña (2014) se menciona las propiedades de la planta *Tagetes lucida* (*Asteraceae*), la cual en las partes aéreas contiene flavonoides: glicosilados de 3-0-arabinosil-galactosidos de patuletina, taninos, cumarinas, entre otros, en la actividad biológica el extracto acuoso de la flor seca fue activo *in vitro* contra la bacteria *Salmonella enteritidis*, *S. typhi*, *Shigella dysenteriae* y *S. flexneri* (pp 352-353).

Otra planta de la familia *Asteraceae*, la *Tanacetum parthenium*, contiene en las hojas flavonoides, y en las hojas y rama cumarinas: eleuterósido B, además como actividad biológica según lo muestra la farmacopea, la maceración alcohólica ensayada frente a cinco enterobacterias, solo fue activa contra *Salmonella entérica* (Germosén, 2014 p. 358).

Gupta (2008) aporta información de la planta *Centaurea calcitrapa L* de la familia *Asteraceae*; indica que la planta, en sus constituyentes bioactivos más conocidos de las flores que se han aislado muestra los flavonoides, alcaloides, entre otros. Esta planta también ha demostrado actividad antimicrobiana contra la *Salmonella entérica*. (pp. 95-96).

En la literatura consultada se pudo evidenciar que gran parte de la familia de la planta *Vernonia patens* posee metabolitos secundarios principalmente en sus partes aéreas (flores y hojas) iguales a los evidenciados en este trabajo de investigación con propiedades antimicrobianas e inhibición bacteriana de la bacteria en estudio, la *Salmonella entérica* y parte de su familia.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Al finalizar la investigación y discutir los resultados obtenidos en el trabajo, donde se buscaba evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de planta *Vernonia patens* contra la bacteria *Salmonella diarizonae*, se presentan a continuación las siguientes conclusiones:

La técnica utilizada para la obtención del extracto crudo y el fraccionamiento fue segura y eficaz debido a que se logró obtener cada uno de ellos, sin formación de grumos y con suficiente material para poder realizar las pruebas microbiológicas.

El tamizaje fitoquímico realizado al extracto de las hojas de la planta *Vernonia patens* resultó positivo para flavonoides, cumarinas, taninos, alcaloides y azúcares reductores, todos con gran potencial antibacteriano. Según la literatura encontrada, estos grupos de metabolitos presentes en la familia *Asteraceae* evidencian la capacidad antimicrobiana contra la *Salmonella entérica* y parte de su familia.

Una vez evaluada la bacteria *Salmonella diarizonae* frente al extracto hidroalcohólico, específicamente a una concentración alcohólica del 70% de la planta *Vernonia patens*, y dicho extracto en sus fracciones en diclorometano, hexano, acetato de etilo y la fracción acuosa, se prueba que efectivamente los extractos de las hojas de la planta poseen actividad antimicrobiana frente a la bacteria.

Los resultados de la fracción con mayor inhibición fueron la de acetato de etilo con un valor inhibitorio de 2 en una concentración de 40.20 mg/mL. Se pudo determinar que a una concentración al 25% de acetato de etilo se provocó un halo de 7.0 mm, 10,05 mg/ml. Y en el caso del diclorometano, se pudo determinar que la concentración mínima sería al 75%, con un halo de 8.0 mm, 27,53 mg/ml.

En un estudio realizado en Ecuador se prueba la capacidad antimicrobiana de la planta frente a la familia de la *Salmonella sp.*, se prueba alta efectividad en la capacidad antibacteriana (Moreno, 2018), y en esta investigación se prueba esta capacidad en una especie de dicha familia, la *Salmonella diarizonae*, específicamente obteniendo resultados eficientes. Hilando más fino se concluye que la planta puede poseer menor efectividad en sus efectos antimicrobianos según sea la especie de la bacteria por enfrentar.

Recomendaciones

A la Universidad Internacional de las Américas

Se recomienda mantener un grupo de docentes actualizados en los cursos de mayor relevancia investigativa: toxicología, farmacognosia, botánica, microbiología, por mencionar algunos, con el fin de incorporar en los programas de cada curso, trabajos de campo donde el estudiante tenga contacto con la manipulación de técnicas microbiológicas, pruebas de antibióticos con extractos naturales, con el fin de concientizar e informar a los futuros encargados de la salud pública sobre cómo evitar el consumo desmedido de antibióticos.

La Universidad debe realizar convenios oportunos con diferentes instituciones como UCIMED, UCR, INCIENSA, con el fin de ofrecer al estudiantado equipos, materiales e instalaciones de punta para realizar sus investigaciones, debido a que esos trabajos tienen la finalidad de identificar compuestos responsables para las actividades antimicrobianas, que son de un problema a nivel mundial que crece constantemente.

A los estudiantes de Farmacia

Incentivar más al estudiante que desea realizar investigaciones en la misma línea, continuar el estudio de las plantas naturales, específicamente si es sobre la estabilidad natural implica mínimo 3 años de estudio, debido a que es un proyecto integral, el cual no solamente pone en práctica los contenidos de un programa, sino que en estas prácticas se integra a la vida laboral, a las relaciones interpersonales, las cuales son de gran importancia para cualquier ser humano.

A los futuros investigadores

Realizar investigaciones en extractos de diferentes partes de la planta *Vernonia patens*, en esta investigación se evaluó únicamente el extracto obtenido de las hojas, por lo que las otras partes como flores, tallo, raíz podrían tener mayor actividad antimicrobiana frente a la especie *Salmonella diarizonae* u otras bacterias.

Asimismo, se debería realizar combinaciones de extractos, purificar y aislar los metabolitos para probarlos con la *Salmonella spp* y otras variedades de bacterias.

Respecto a la creación de un producto nuevo, se necesitan terapias alternativas, no solo para combatir la resistencia antimicrobiana, sino también para encontrar productos con menor toxicidad y efectos secundarios. Esta planta es muy promisoriosa y se ha utilizado empíricamente desde la antigüedad, por lo se le debe estudiar más.

Se recomienda a los futuros investigadores continuar con estudios similares a estos, buscando cómo volver más eficientes los resultados. En esta investigación, por ejemplo, se propone continuar las pruebas concentrando aún más los extractos para probar la existencia o no de halos inhibitorios de mayor tamaño.

REFERENCIAS

- Alcares, L., Satorres, S., Mattana, C., Centorbi, H., Aliandro, O., Echenique, D. (2017). *Material Didáctico para Estudiantes. Bacteriología y Virología*. Facultad Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis. Recuperado de: <http://www.fqbf.unsl.edu.ar/mda.html/>
- Alfaro, R. (2018). Aspectos relevantes sobre *Salmonella sp* en humanos. *Revista Cubana de Medicina Integral*. Volumen 34, Número 6.
- Alpízar, J. (2018). *Manual de Laboratorio de Farmacognosia*. Universidad Internacional de las Américas (pp. 5-40).
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolitos secundarios. Fisiología vegetal. *Revista Reduca (Biología)*. Vol.2. pp. 119-145.
- Barquero, C. (2011). *Validación del proceso de limpieza para el área de producción de encapsulados en el Laboratorio de Tecnologías Biointegrales S.A., durante los meses de mayo a agosto del año 2011*. (Tesis de pregrado). Universidad Internacional de las Américas. Costa Rica.
- Barrero, L. (2016). *Microbiología clínica*. Universidad Europea de Madrid. Editorial Síntesis, S.A. (P.44).
- Barreto, M., Castillo, M. & Retamal, P. (2016). *Salmonella entérica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su transcendencia en Chile*. *Scielo*. Vol. 33 (5) (p-p. 550-557).
- Becton, Dickinson and Company. (2015). *BBL Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol*. Dublín, Irlanda. Recuperado de: <https://www.bd.com/resource.aspx?IDX=22894547-557>.
- Black, J. (2012). *Microbiology principles and explorations* (8 th ed.). Wiley.

- Brooks, G., Butel, J., Carroll, K., Mietzner, T. & Morse, S. (2013). *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology* (26th ed.). McGraw-Hill.
- Caldas, A. (2012). *Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido*. Universidad de Cuenca. Ecuador. Recuperado de: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2468/1/tq1111.pdf>.
- Calle, A., León, I., Tarranco, M., Grados, S. y Soto, M. (2017). *Tamizaje y screening fitoquímico*. Facultad de Farmacia y Bioquímica: Farmacognosia. Universidad Internacional para el Desarrollo. Recuperado de: https://www.academia.edu/25502053/TAMIZAJE_FITOQUIMICO
- Casado, C., Torrico, G. y Medina, M. (2012). *Medios de Cultivo en un Laboratorio de Microbiología*. Recuperado de: <https://libros.laboratorio.files.wordpress.com/2012/09/medios-de-cultivo-en-un-laboratorio-demicrobiologic3ada.pdf>.
- Castañeda, E., Pusari, M. Rafaeli, R y Rojas, L. (2014). *Quinonas-Antraquinonas*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Química e Ingeniería Química.
- Castro, S. (2020). *Internalización de bacterias asociadas a enfermedades de transmisión alimentaria en *Cándida albicans* y levaduras aisladas desde alimentos*. Universidad de Concepción Chillan-Chile.
- Cerra, H., Fernández, M., Horak, C., Lagomarsino, M., Torno, G., y Zarankin, E. (2013). *Manual de microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos*. Asociación Argentina de Microbiología. Argentina.
- Contreras, M., Medrano, F., Ibarra, J., Martínez, J. Chaidez. Q & Castro, N. (2018). *Los últimos 50 años de Salmonella en México: Fuentes de aislamiento y factores que influyen en su prevalencia y diversidad*. Recuperado de: <http://revistabiociencias.uan.edu.mx>.

- Cornejo, A. (2016). *Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones de Bidens pilosa L. y Xylosma flexuosum (H. B. & K.) Hemsl y estudio quimiométrico de la actividad antituberculosa de los perfiles cromatográficos de Bidens pilosa L.* Tesis para obtener el grado de Maestra en Química Bioorgánica. Universidad Veracruzana.
- Cosme, I. (2008). El uso de las plantas medicinales. *Revista Intercultural*. Universidad Veracruzana Intercultural.
- Cruz, J. & Gutiérrez, K. (2015). *Evaluación Fitoquímica de los metabolitos secundarios para la determinación de la DL50, en la raíz de la especie vegetal mata de piedra (Anthurium cúbense)*, Tilgüe, Isla de Ometepe. Febrero-junio. Managua.
- Faúndez, A., Faúndez, L., & Flores, R. (2017). *Apuntes de Botánica Aplicada*. Universidad de Chile Facultad de Ciencias Agronómicas.
- Farmacopea Europea. *Análisis Microbiológicos en la Industria Farmacéutica. Procedimiento acorde*. Eur.Ph. 2.6.12 y 2.6.13.
- García, M. & Morales, C. (2001). *Análisis de la literatura sobre plantas medicinales en Costa Rica*. Universidad de Costa Rica.
- Germosén, L. (2014). *Farmacopea Vegetal Caribeña*. Tercera Edición. Mérida, Yucatán, México.
- González, A. (2004). *Obtención de Aceites Esenciales y Extractos Etanólicos de Plantas del Amazonas*. Trabajo de Graduación para optar por la Licenciatura en Ingeniería Química. Universidad Nacional Sede Bogotá, Colombia.
- González, J., Hernández, E., Pereira, N., Soto, Z. & Villareal, J. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella spp.* y herramientas moleculares para su detección, *Revista Salud Uninorte*. (pp.75-76).
- Gupta, M. (2008). *270 plantas Medicinales Iberoamericanas*. CYTED. Santafé de Bogotá D.C. Colombia.

- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación*. 6ta edición. México: Editorial McGraw-Hill.
- Herrera, B. y Jabid, R. (2015). Salmonelosis, zoonosis de las aves y una patogenia muy particular. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, vol.16. p15.
- Herrera, O. (2014). *Efecto antioxidante y antitumoral in vitro del extracto etanólico de la raíz de Waltheria ovata Cav. "lucraco" en línea celular de cáncer de próstata DU-145*. Universidad Mayor de San Marcos, Lima-Perú. pp. 20-21.
- Hohmann, E. (2021). *Salmonella no tifoidea: Microbiología y Epidemiología*. P4-5.
- Jaramillo, C., Lemus, M. & Rojas, L. (2015). *Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios*. Universidad Técnica de Machala (pp.15-21).
- Jiménez, S. & Rodríguez, G. (2000). *Inhibición de la actividad hemorrágica y proteolítica del veneno de Bothrops asper por extractos de las plantas: Buddleja americana, Cissampelos pareira, Echinacea purpurea, Mikania guaco, Piper darienense y Vernonia patens*. Universidad de Costa Rica. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San José, Costa Rica.
- Lamia, J., Vinuesa, P., Betancor, L., Silva, C., Bisio, J., Soletto, L., Chabalgoity, J. & Puentes, J. (2019). Análisis del genoma de Salmonella entérica sub sp. Diarizonae aislados de infecciones humanas invasivas revelan un enriquecimiento de funciones relacionadas con la virulencia en el linaje ST1256. *BMC Genomics*. 31 de enero de 2019: 20 (1);99.
- Larrazabal, B. (2016). *Efecto positivo de los polifenoles del vino*. Universidad Complutense. Facultad de Farmacia UCM. p 10.
- León, J. y Poveda, L. (2000). *Nombres Comunes de las Plantas en Costa Rica*. Editorial Guayacán, San José, Costa Rica, Primera edición.

- Luján, M. (2017). *Unidad 2. Métodos de Separación. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco*. Facultad de Ciencias Naturales y Ciencias de la Salud. Recuperado de: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/farmacognosia/wp-content/uploads/2017/03/COMPLTEORICO-UNIDAD-2-M%C3%A9todos-de-Separaci%C3%B3n-2017-FARGNOSIFCN-UNPSJB.pdf>
- Martin, D. (2017). Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. Universidad pedagógica y tecnológica de Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. (pp 81-83).
- Manzano, P., Miranda, M., Montes, R., Orellana, T., Abreu, J. & Peralta, E. (2013). *Estudio químico de los compuestos lipídicos de las hojas, tallos y flores de Vernonthura Patens (Kunth) H. Rob. (Asteraceae)*. Instituto de Medicina del Deporte. La Habana, Cuba.
- Manzano, P. Miranda, M. Gutiérrez, Y. Santos, E. & Scull, R. (2014). *Estudio morfo-anatómico e identificación genética de Vernonthura patens (Kunth) H. Rob.* Asociación de Académicos de Ciencias Farmacéuticas de Antofagasta, Chile.
- Martínez, J., Bernal, H. & Cáceres, A. (2000). *Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de plantas Medicinales Iberoamericanas*. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el desarrollo de Química fina Farmacéutica. Bogotá. D.C. Colombia.
- Miño, G. (2007). *Investigación fitoquímica e identificación de principios activos en seis especies del género Baccharis*. Trabajo de graduación para optar por el grado de licenciatura en Ingeniería en Biotecnología. Universidad de las Fuerzas Armadas. Ecuador. Recuperado de: <http://repositorio.espe.edu.ec/xmlui/handle/21000/1226>.
- Moreno, A. (2018). *Actividad antimicrobiana "IN VITRO" del extracto hidroalcohólico de las hojas Vernonthura Patens (laritaco) en cepas de salmonella spp.* Ambato-Ecuador.
- Musto, A. (2013). *Manual de Microbiología y Parasitología*. Segunda Edición. Universidad Nacional.


- Novachem de Ecuador. (2020). *Agar Trypticasa Soya (TSA)*. Quito, Ecuador. Recuperado de: <https://www.novachem.com.ec/producto/agar-tripticasa-soya-tsa/>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*.
- Osorio, C. (2017). Sobre el origen del término bacteria: una paradoja semántica. *Revista Chilena de Infectología*. (pp. 265-266).
- Palma, N. (2019). *Implicación de los isoprenoides y la prenilación de las proteínas en la enfermedad de Alzheimer y su posible uso en la terapia de esta enfermedad*. Universidad de Sevilla.
- Pedrique, M. (2002). *Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (Antibiograma)*. Recuperado de: <https://docplayer.es/15396799-Trabajo-practico-no-3-introduccion-objetivo-determinacion-de-la-sensibilidad-de-las-bacterias-a-los-antibioticos-antibiograma-fundamento.htm>.
- Pérez, N. (2014). *Terpenos Farmacognosia y Medicamentos Herbarios*. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Farmacia.
- Quesada, A. Reginatto, G. Ruiz, A. Colantorio, L. & Burrone, M. (2016). Resistencia antimicrobiana de *Salmonella spp* aislada de alimentos de origen animal para consumo humano. *Revista Peruana de Medicina y Salud Pública*.
- Ramírez, A. & Solera, R. (2001). *Estudio de la inhibición de la actividad minecrótica e inflamatoria inducida por el veneno de Bothrops asper de extractos acuosos de las plantas Buddleja amaricana, Cissampelos pareira, Echinacea purpurea, y Vernonia patens*. Universidad de Costa Rica. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San José, Costa Rica.
- Redonda, R. (2017). *Diversidad y distribución de la tribu Vernonieae (Asteraceae) en México*. Acta Botánica Mexicana, Instituto de Ecología, A.C.

- Remón, H., Alarcón, A., Almeida, M., Viera, Y., Ramos, M. y Bazan, Y. (2012). Tamizaje fitoquímico y actividad antimicrobiana de los extractos secos de tinturas al 20% de *Mammea americana* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Universidad de Granma, Bayamo, Cuba.
- Rincón, D., Ramírez, R. & Vargas, J. (2011). Transmisión de *Salmonella* entérica a través de huevos de gallina y su importancia en salud pública. *Revista de la Universidad Industrial de Santander*, Colombia.
- Rodríguez, E. (2011). *Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas*. Universidad Autónoma Indígena de México.
- Sepúlveda, J., Torres, J., Sandoval, C., Martínez, J. & Chan, J. (2018). La importancia de los metabolitos secundarios en el control de nematodos gastrointestinales en ovinos con énfasis en Yucatán, México. *Journal of the Selva Andina Animal Science*. Bolivia. 5 (2): 79-75.
- Serrano, O. y Hernández, J. (2016). Las bacterias en la historia y la cultura Humanas. *Revista Electrónica Dr. Zoila E. Marínelo*. Vol.41, número 10.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de P-productos fito terapéuticos*. Área de Ciencia y Tecnología del Convenio Andrés Bello. Colombia.
- Shiva, C. (2007). *Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y Ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento*. Universidad Autónoma de Barcelona, p 14.
- Sierra, M., Barros, R., Gómez, D., Mejía, A. & Suarez, D. (2018). *Productos Naturales Metabolitos Secundarios y Aceites Esenciales*. Fundación Universitaria Agraria de Colombia-UNIAGRARIA. Bogotá D.C-Colombia. p 7.
- Soberón, U. y Acosta, E. (2009). *Fuentes de información para la recolección de información cuantitativa y cualitativa*. Manuscrito inédito, Facultad de Medicina. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica, Perú.

- Soto, Z., Pérez, L., & Estrada, D. (2016). *Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia*. Salud Uninorte. Barranquilla.
- Torres, K. (2019). *Determinación in vitro de la actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios presente en la pulpa de cocos nucifera (coco) sobre el staphylococcus aureus*. Universidad Internacional de las Américas.
- Usano, J., Palá, J., Díaz, S. (2014). Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *Reducta (Biología)*. Serie Botánica. 7 (2): 60-70.
- Vélez, M., Campos, R. & Sánchez, H. (2014). *Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal*. Tropical and Subtropical Agroecosystems. Universidad Autónoma de Yucatán México. P 490.
- Vicente, J. Yesid, H. Cáceres. A. (2000) *Fundamentos de Agrotecnología de Cultivo de plantas Medicinales Iberoamericanas*. CYTEC. Santafé de Bogotá, D.C, Colombia.
- Wink, M. (2015). Modes of Action of Herbal Medicines and Plant Secondary Metabolites. *Medicines (Basilea)*. Sep; 2 (3); 251-286.
- Yáñez, G. (2014). *Investigación de la actividad antimicrobiana y fitoquímica de extractos de plantas medicinales frente a microorganismos patógenos Escherichia coli y Candida albicans*. Tesis para optar por el grado de Ingeniería Bioquímica. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.
- Zúñiga, I., & Caro, J. (2017). Enfermedades transmitidas por los alimentos: una mirada puntual para el personal de salud. *Enfermedades infecciosas y Microbiología*. Vol. 37, núm.3, julio-setiembre 2017.
- Zúñiga, M. (2016). *Caracterización de la vegetación nativa para la restauración ecológica y foresta urbana de la microcuenca del río Torres*. Costa Rica. Universidad Estatal a Distancia UNED.

ANEXOS

ANEXO #1

 UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS
BITÁCORA DE TUTORÍAS MODALIDAD DE GRADUACIÓN

Fecha: 10/3/2021 Hora de inicio: 8:00 am Hora de finalización: 12:00 md.

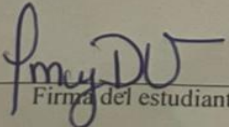
Lugar de la atención: _____ Nombre del tutor: Luis Poveda

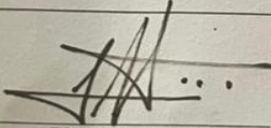
Nombre del estudiante: Lincy Delgado Valverde

Objetivos de la sesión de trabajo
Recolección Vernonia Patens, Puniscol, Mercedes
Sur. Identificación de las hojas de la planta
Vernonia Patens

Acuerdos tomados
Las hojas de la planta Vernonia Patens
fueron recolectadas en una finca, en
Mercedes Sur, de Puniscol.
Las mismas se identificaron en su sitio
de recolección por el taxónomo Lic. Luis
Jorge Poveda.

Vernonia Patens


Firma del estudiante


Firma del tutor

C. : 3-0166-0182