

**UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS  
AMÉRICAS**

**CARRERA DE FARMACIA**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL  
(*KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, *SALMONELLA TYPHI*,  
*ESCHERICHIA COLI*, *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*) DE LA  
PLANTA ARVENSES COSTARRICENSE *DYSPHANIA  
AMBROSIOIDES* (EPAZOTE)”**

**PAULO ANDREI CALVO BEJARANO**

**TUTOR: LIC. JAVIER RODRIGO ALPÍZAR CORDERO**

**SAN JOSÉ, COSTA RICA, NOVIEMBRE 2020**

## **Agradecimientos**

Primeramente, agradecerle a Dios por haberme ayudado a finalizar con éxito mis estudios, por brindarme de su mano cuando ya ni fuerzas tenía en momentos críticos y por ser mi guía durante toda mi carrera.

A mis padres Freddy y Mayela por ser un pilar importante durante todo este proceso que tuve que llevar, por siempre estar ahí cuando más los necesitaba y guiarme por el camino correcto con sus buenos consejos del día a día.

A mi hermano Freddy por estar siempre ahí cuando más lo necesité y de igual forma aconsejarme correctamente y darme las palabras de aliento para continuar durante estos años de estudio.

De la Universidad, en primera instancia agradecer a todos aquellos amigos que hice durante todos estos seis largos años, en especial a los más cercanos y con los que tengo más relación que los considero como una familia. A todos los profesores de los que fui alumno y también de los que no los fui, por transmitirme ese valioso conocimiento y por ser guía de mi carrera durante estos años.

Especialmente agradezco a mi tutor Javier Alpízar Cordero, quien es una excelente persona y profesor, por guiarme durante este último proceso, por instruirme correctamente y por toda la paciencia brindada en el transcurso del tiempo.

Al Primo (Don Berny) por siempre tener la disponibilidad de brindarme sus servicios y por tener la disponibilidad de hacerme “ride” hasta el portón de mi casa todos los días que iba de noche.

## **Dedicatoria**

Esto se lo dedico de primero a Dios, a mis padres y a mi hermano.

## Contenido

<b><i>Índice de Figuras</i></b> .....	<b>9</b>
<b><i>Índice de Tablas</i></b> .....	<b>12</b>
<b><i>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN</i></b> .....	<b>13</b>
<b><i>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</i></b> .....	<b>13</b>
Hipótesis de Investigación .....	15
<b><i>OBJETIVOS</i></b> .....	<b>16</b>
Objetivo General.....	16
Objetivos Específicos .....	16
<b><i>JUSTIFICACIÓN</i></b> .....	<b>17</b>
<b><i>ANTECEDENTES</i></b> .....	<b>19</b>
Antecedentes Históricos .....	19
Antecedentes Internacionales .....	20
Antecedentes Nacionales.....	22
<b><i>PROYECCIONES</i></b> .....	<b>25</b>
<b><i>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</i></b> .....	<b>26</b>
<b><i>Generalidades de las Bacterias</i></b> .....	<b>26</b>
Historia de las bacterias .....	26
Clasificación de las bacterias según su morfología .....	28
Clasificación bacteriana por medio de la Tinción de Gram.....	30
<b><i>Familias bacterianas Gram negativas de interés</i></b> .....	<b>31</b>
<b><i>Escherichia coli</i></b> .....	<b>31</b>
Etiopatogenia de la bacteria <i>Escherichia coli</i> .....	33
Tratamiento .....	37

Resistencia bacteriana .....	38
<b><i>Salmonella Typhi</i></b> .....	<b>41</b>
Etiopatogenia de la Bacteria <i>Salmonella typhi</i> .....	42
Factores de Virulencia.....	43
Tratamiento .....	44
Resistencia Bacteriana .....	45
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b> .....	<b>47</b>
Etiopatogenia de la bacteria <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	49
Factores de Virulencia.....	50
Tratamiento .....	51
Resistencia Bacteriana .....	53
<b><i>Familias bacterianas Gram Positivas de Interés</i></b> .....	<b>54</b>
<b><i>Staphylococcus Aureus</i></b> .....	<b>54</b>
Etiopatogenia de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> .....	55
Factores de Virulencia.....	57
Tratamiento .....	58
Resistencia Bacteriana .....	59
<b><i>Pruebas diagnóstico para las infecciones de bacterias</i></b> .....	<b>61</b>
Frotis.....	61
Cultivo.....	61
<b><i>Análisis Microbiológicos</i></b> .....	<b>62</b>
Agar Sangre.....	62
Agar Chocolate.....	62
Agar MacConkey .....	62

Agar Manitol Salado .....	63
Agar Muller-Hinton .....	64
Epsilon Test (E-test) .....	64
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	64
<b><i>Plantas Medicinales</i></b> .....	<b>65</b>
<b><i>Generalidades de la planta <i>Dysphania ambrosioides</i></i></b> .....	<b>66</b>
Características de la planta .....	66
Nota: Rubio (2014).....	67
Clasificación taxonómica de la planta <i>Dysphania ambrosioides</i> .....	67
Actividad farmacológica.....	69
Composición Química .....	70
<b><i>Tamizaje fitoquímico</i></b> .....	<b>71</b>
Metabolitos Secundarios .....	71
Alcaloides.....	72
Terpenos.....	72
Flavonoides.....	73
Cumarinas.....	74
Triterpenos .....	74
Antraquinonas .....	75
Taninos .....	76
Saponinas .....	77
Azucares Reductores.....	77
<b><i>Métodos de Extracción</i></b> .....	<b>78</b>
Extracción por Maceración .....	79
Extracción líquido-líquido .....	79

Destilación a presión reducida (Rota Vapor).....	80
<b><i>Cromatografía para la Detección de Componentes en una Muestra .....</i></b>	<b>81</b>
Nota: Corzo (2019).....	82
Cromatografía de Capa Fina.....	82
<b><i>CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO .....</i></b>	<b>84</b>
Enfoque de la investigación .....	84
Diseño de la investigación.....	84
Variables de la investigación.....	86
<b><i>Instrumentos, materiales y equipos usados para la realización de los extractos de Dysphania ambrosioides.....</i></b>	<b>87</b>
Materiales y Equipos.....	87
Reactivos.....	88
<b><i>Procedimiento y Recursos .....</i></b>	<b>89</b>
Concentración del extracto por destilación con presión reducida (Rotavapor).....	91
Fraccionamiento de los componentes de la planta <i>Dysphania ambrosioides</i> .....	91
Extracción con Éter etílico .....	92
Extracto Acuoso .....	93
Extracto Etéreo .....	94
Pruebas de identificación para el tamizaje fotoquímico .....	95
Prueba de Dragendorff (Identificación de Alcaloides).....	96
Prueba de Shinoda (Identificación de Flavonoides) .....	96
Prueba de KOH (Identificación de Cumarinas) .....	96
Prueba de Liberman Burchard (Identificación de Triterpenos y Esteroles).....	97
Prueba de Bornträger-Kraus (Identificación de Antraquinonas) .....	97
Prueba de Taninos (Determinación de Taninos) .....	98

Prueba de Cromatografía de Capa Fina TLC (Determinación de Terpenos) .....	98
Prueba de Lugol (Determinación de Almidón) .....	100
Prueba de Espuma (Determinación de Saponinas).....	100
Prueba de Benedict (Determinación de Azúcares Reductores) .....	100
Pruebas microbiológicas para la evaluación de la capacidad antibacteriana de los diferentes extractos de la planta <i>Dysphania ambrosioides</i> . .....	100
Concentración y dilución de los extractos de la planta <i>Dysphania ambrosioides</i> .....	102
Cultivo de Cepas Bacterianas en Laboratorio Microlabs .....	103
<b>CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>106</b>
<i>Recolección y fraccionamiento de la planta <i>Dysphania ambrosioides</i> (Epazote) con su respectiva obtención del extracto.....</i>	<b>106</b>
<i>Caracterización fitoquímica de la planta <i>Dysphania ambrosioides</i> (Epazote), por medio del tamizaje fitoquímico para la identificación de los metabolitos presentes en su conformación y estructura.....</i>	<b>111</b>
<i>Deducciones finales de las pruebas microbiológicas, evaluando la actividad antibacteriana de los extractos de la planta <i>Dysphania ambrosioides</i> (Epazote) ante las cepas <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Salmonella typhi</i>, <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>. .....</i>	<b>126</b>
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>139</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>139</b>
<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>141</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>143</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1. Bacteria <i>Bacillus megaterium</i>, ejemplo de bacteria de tipo bacilo.</b> .....	29
<b>Figura 2. Bacteria <i>Staphylococcus</i> formando un racimo irregular similar a las Uvas.</b> .....	29
<b>Figura 3. Tinción de Gram para bacterias Gram negativas y Gram positivas.</b> .....	31
<b>Figura 4. (A) Bacteria <i>Escherichia coli</i> en tinción de Gram. Aumento X 1000, (B) Estructura antigénica de las Enterobacteriaceae.</b> .....	33
<b>Figura 5. Resistencia de <i>Escherichia coli</i> a los antimicrobianos.</b> .....	39
<b>Figura 6. Principales mecanismos de resistencia antibiótica estudiados en <i>Escherichia coli</i>.</b> .....	40
<b>Figura 7. Erupciones máculo-papular producido por la bacteria <i>Salmonella typhi</i>.</b> 43	
<b>Figura 8. <i>Staphylococcus aureus</i> en tinción de Gram, identificando por medio de amplificación original x 1000 los cocos en formación de racimo.</b> .....	55
<b>Figura 9. Factores de virulencia conocidos de <i>Staphylococcus aureus</i>.</b> .....	57
<b>Figura 10. Bacteria <i>Escherichia coli</i> inoculada en Agar MacConkey.</b> .....	63
<b>Figura 11. Bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> inoculada en Agar Manitol Sal.</b> .....	63
<b>Figura 12. Planta <i>Dysphania ambrosioides</i> (Epazote).</b> .....	67
<b>Figura 13. Clasificación taxonómica del Epazote (<i>Dysphania ambrosioides</i>).</b> .....	68
<b>Figura 14. Estructura básica de los Flavonoides.</b> .....	73
<b>Figura 15. Estructura básica de las cumarinas.</b> .....	74
<b>Figura 16. Principales metabolitos de los triterpenos con importante actividad farmacológica.</b> .....	75
<b>Figura 17. Estructura general de las antraquinonas.</b> .....	76
<b>Figura 18. Estructura de un Azúcar Reductor (Glucosa).</b> .....	78
<b>Figura 19. Separación por densidad de las fases y decantación: (A) Disolventes halogenados, (B) Disolventes no halogenados.</b> .....	80
<b>Figura 20. Rotavapor.</b> .....	81
<b>Figura 21. (a) Mikhael Semenovich Tswett; (b) Separación de pigmentos vegetales por cromatografía en papel.</b> .....	82
<b>Figura 22. Cromatografía de Capa Fina</b> .....	83

<b>Figura 23. (A) Planta <i>Dysphania ambrosioides</i> (Epazote), (B) Cantidad de material vegetal para el respectivo extracto.</b> .....	89
<b>Figura 24. Botella color ámbar con el material en maceración y equipo para filtración al vacío del material macerado de la planta <i>Dysphania ambrosioides</i> (Epazote).</b> .....	90
<b>Figura 25. Extractos obtenidos del fraccionamiento en sus respectivos recipientes.</b> .....	92
<b>Figura 26. Extracto Etéreo, AQ1, AQ2, AQ2E almacenados en sus respectivos recipientes.</b> .....	94
<b>Figura 27. Dimensiones de una placa cromatográfica para TLC y Sistema cromatográfico.</b> .....	99
<b>Figura 28. Muestras de los extractos listos en sus respectivas concentraciones (100%, 50% y 25%) y su respectivo blanco.</b> .....	102
<b>Figura 29. Preparación del agar estándar con el método de pocillos para la realización del ensayo microbiológico.</b> .....	103
<b>Figura 30. (A) Cepa de <i>Escherichia coli</i>, (B) Cepa de <i>Klebsiella pneumoniae</i>, (C) Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>, (D) Cepa de <i>Salmonella typhi</i>.</b> .....	104
<b>Figura 31. Incubadora en el cual se incubaron las placas petri con sus respectivas bacterias a una temperatura de 37 °C.</b> .....	105
<b>Figura 32. Planta <i>Dysphania ambrosioides</i> (Epazote) recolectada, seleccionada, lavado y seco, para la elaboración del fraccionamiento y obtención de los extractos.</b> .....	107
<b>Figura 33. (A) Extracto de Hexano, (B) Extracto de Acetato de etilo, (C) Extracto de Diclorometano, obtenidos de la planta <i>Dysphania ambrosioides</i>.</b> .....	108
<b>Figura 34. Determinación de Alcaloides por medio de la prueba de Dragendorff en el extracto etéreo, AQ1 y AQ2E.</b> .....	113
<b>Figura 35. Prueba de Shinoda para la identificación de flavonoides en el extracto etéreo y AQ2E.</b> .....	114
<b>Figura 36. Identificación positiva de Cumarinas para el extracto etéreo y el AQ2E mediante la prueba de KOH.</b> .....	115
<b>Figura 37. Identificación de Triterpenos mediante la prueba de Liberman Burchard para el extracto etéreo y AQ2E.</b> .....	117
<b>Figura 38. Resultado negativo (-) para el extracto etéreo, AQ2 Y AQ2E ante el reactivo de Bornträger-Kraus.</b> .....	118

<b>Figura 39. Prueba de identificación de Taninos para el extracto etéreo y AQ1.....</b>	<b>119</b>
<b>Figura 40. Cromatografía de Capa Fina (TLC) para la identificación de Terpenos presente en el extracto etéreo.....</b>	<b>120</b>
<b>Figura 41. Indicación negativa para el extracto AQ1 mediante la prueba de Lugol para detectar almidón presente en la planta <i>Dysphania ambrosioides</i>.....</b>	<b>122</b>
<b>Figura 42. Prueba de Espuma aplicada en el extracto AQ1 para la identificación de Saponinas presente en la planta Epazote.....</b>	<b>122</b>
<b>Figura 43. Aplicación de la prueba de Benedict para la identificación de azúcares reductores para el extracto AQ1.....</b>	<b>123</b>
<b>Figura 44. Prueba de sensibilidad antimicrobiana frente a la cepa de <i>Escherichia coli</i>. .....</b>	<b>126</b>
<b>Figura 45. Prueba de sensibilidad antimicrobiana ante la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>. .....</b>	<b>130</b>
<b>Figura 46. Prueba de sensibilidad antimicrobiana ante la cepa de <i>Salmonella typhi</i>. .....</b>	<b>132</b>
<b>Figura 47. Prueba de sensibilidad antimicrobiana ante la cepa de <i>Klebsiella pneumoniae</i>. .....</b>	<b>134</b>

### Índice de Tablas

<b>Tabla 1. Operacionalización de variables de la investigación.</b> .....	86
<b>Tabla 2. Pruebas a realizar por cada extracto obtenido, para llevar a cabo el tamizaje fotoquímico.</b> .....	95
<b>Tabla 3. Características organolépticas y cantidad obtenida de los extractos obtenidos a partir del fraccionamiento de la planta <i>Dysphania ambrosioides</i> (Epazote).</b> .....	109
<b>Tabla 4. Masas de las variables por cada extracto y obtención de la concentración de los extractos preparados.</b> .....	110
<b>Tabla 5. Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico realizados a los diversos extractos de la planta <i>Dysphania ambrosioides</i> (Epazote).</b> .....	112
<b>Tabla 6. Resumen de los metabolitos secundarios presentes en la planta <i>Dysphania ambrosioides</i> (Epazote) mediante el tamizaje fitoquímico empleado al extracto etéreo, AQ1, AQ2 y AQ2E.</b> .....	125
<b>Tabla 7. Resultados obtenidos de los extractos aplicados y el control positivo frente a la bacteria <i>Escherichia coli</i>.</b> .....	127
<b>Tabla 8. Sensibilidad del Halo de Inhibición para las Bacterias <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> con respecto al medicamento utilizado (Levofloxacino)</b> .....	129
<b>Tabla 9. Resultados obtenidos del control positivo y los extractos aplicados frente a la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>.</b> .....	129
<b>Tabla 10. Resultados obtenidos del control positivo y los extractos aplicados frente a la bacteria <i>Salmonella typhi</i>.</b> .....	132
<b>Tabla 11. Sensibilidad del Halo de Inhibición para las bacterias <i>Salmonella typhi</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i> con respecto al medicamento Levofloxacino.</b> .....	134
<b>Tabla 12. Resultados obtenidos del control positivo y los extractos aplicados frente a la bacteria <i>Klebsiella pneumoniae</i>.</b> .....	135
<b>Tabla 13. Extracto con mayor relevancia en la actividad antibacteriana de las cepas en estudio.</b> .....	137

## CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se define como Fitoterapia la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal como una finalidad terapéutica, donde la humanidad ha utilizado durante toda su existencia las plantas para su beneficio propio, aunque la incidencia de los productos constantemente ha variado la terapéutica a lo largo de los tiempos con ayuda de los avances científicos que se desarrollan año tras año. (Cañigüeral, Dellacassa, Bandoni, 2003, p.265)

En relación con lo anterior, la diferencia que hay entre un producto fitoterápico y uno de síntesis química es que el producto de síntesis basa su efectividad sobre una molécula ya desarrollada y aislada en el laboratorio, mientras que el producto natural basa su efectividad en los principales principios activos extraídos de una fuente totalmente natural como lo son las plantas; además la fitoterapia actúa como una medicina alopática y se refiere a que utiliza sus principales componentes activos para contrarrestar una problemática como la resistencia bacteriana que hoy en día afecta la salud a nivel mundial, atacando a cualquier población sin distinción de edad, sexo u origen. (Echegaray, Echegaray, Mosquera, Gerrikaetxebarria, 2011)

La resistencia antimicrobiana se produce porque los organismos como bacterias, virus, hongos o parásitos, sufren cambios en su estructura genética que a la hora de aplicar la terapia a la respectiva infección estos adoptan resistencia a la mayoría de los antimicrobianos y dejan de ser eficaces; consecuentemente, esta resistencia a nivel mundial pasa por el uso irracional de los antimicrobianos durante su respectivo tratamiento, muchos pacientes al no ser educados correctamente ante medicamentos de esta índole hacen que las bacterias adopten cierta resistencia a los medicamentos empleados, a tal punto que al transcurrir el tiempo los medicamentos antibacterianos sean ineficientes ante los microorganismos que provocan estas enfermedades. (Serra, 2017)

Resaltando lo anterior, la adaptación de los microorganismos a nuevos nichos ecológicos tiene como consecuencia variaciones de su genoma que derivan de cambios estructurales y funcionales que permiten su mayor sobrevivencia; como fue en el caso de la bacteria *Escherichia coli* al inicio de su origen, el efecto patógeno que producía en las personas era nulo, pero hoy en día

evolució en su conformaci3n gen3tica siendo letal y produciendo mucha resistencia ante los medicamentos antimicrobianos, al igual que *Staphylococcus aureus* bacterias intrahospitalarias que se hicieron resistentes al medicamento meticilino, es una de las bacterias m3s influyentes por el grado de infecci3n que provoca y a la misma vez las decenas de miles de vidas humanas que cobra al a3o debido al creciente de genes de resistencia que adquieren. (O’Ryan, Farf3n, 2014)

Se sabe que las infecciones representan un problema cr3tico para la salud y son de las principales causas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, la aparici3n de resistencia a los antibi3ticos sint3ticos, junto con la toxicidad durante el tratamiento prolongado hace que esto sea una inquietud y que se investigue m3s sobre nuevas sustancias antimicrobianas, antif3ngicas en particular de la *Candida albicans* que es un hongo pat3geno, frecuentemente implicado en infecciones que amenazan la vida de los seres humanos y m3s en aquellos que tienen el sistema inmune comprometido. (Wen, Haddad, Fern3ndez, Espinoza, Ruiz, Neyra, Bustamante, Rojas, 2011)

Existen reportes en la literatura de que numerosas investigaciones est3n encaminadas a la b3squeda de nuevos compuestos con actividades biol3gicas a partir de fuentes naturales, mientras que otras todav3a no se han logrado verificar si sus propiedades se les atribuye alg3n efecto antibacteriano, antif3ngica, antiparasitario y antiviral. En la actualidad uno de los problemas m3s comunes es que existen plantas medicinales que tienen una actividad antimicrobiana no conocida por la poblaci3n, en el cual no han sido del todo determinado sus beneficios, pasado muchas veces por la ignorancia. (Azuelo, Jaramillo, San Mart3n, D’Armas, 2016)

La mayor3a de la poblaci3n con la que se trata tiene altas expectativas a lo que es el origen natural a base de las plantas medicinales, todo esto trascendiendo durante a3os y siglos; en la actualidad todav3a se sigue observando que gran cantidad de las personas le tienen confianza a los productos hechos a base de extractos naturales el cual esperan que estos mismos tengan el efecto deseado para la mejora de su patolog3a y de una calidad de vida deseable, por lo tanto, el conocimiento de compuestos nuevos o ya presentes en las planta resulta positivo para crear nuevas alternativas de tratamientos que ayuden a optimizar la actividad antimicrobiana y antif3ngica de la planta *Dysphania ambrosioides*. (Arias, Sandoval, Camargo, S3nchez, 2010)

Lo que nos lleva a plantearnos la siguiente pregunta de investigación ¿Existe la posibilidad de actividad antimicrobiana en las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* que lleguen a optimizar los microorganismo estudiados por medio de los componentes principales de la planta *Dysphania ambrosioides*?

### **Hipótesis de Investigación**

La planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote), sí tiene actividad antibacterial ante las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar la actividad antibacterial del extracto frente a las cepas *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella tiphi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* de la planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote).

### Objetivos Específicos

Desarrollar un fraccionamiento de los componentes presentes en la planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote), utilizando los disolventes hexano, diclorometano y acetato de etilo.

Elaborar un tamizaje fitoquímico de *Dysphania ambrosioides* con el fin de identificar la naturaleza química de los metabolitos principales que presenta la planta.

Comprobar la actividad y sensibilidad antibacterial de los componentes activos de la planta *Dysphania ambrosioides* ante las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella tiphi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

## JUSTIFICACIÓN

Las plantas gracias a su maravilloso y complejo metabolismo, constituyen un verdadero arsenal químico, en el cual solo se conoce con éxito un tercio de toda la variedad de especies existentes a nivel mundial y de aquellas inexploradas hasta el día de hoy, sin considerar aquellas especies que ya han sido extintas de su hábitat; además de que hoy en día la realidad terapéutica está regida por la química sintética, pero lo que se sabe es que estas exitosas moléculas sintéticas no son sino copias mejoradas de sustancias químicas que la naturaleza de forma espontánea creó. (Avello, Cisternas, 2010)

Un aspecto a resaltar es que incluir la práctica de la medicina herbaria por sus propiedades terapéuticas que resaltan en cada planta medicinal puede llegar hoy en día a ser utilizada para sustituir o ser combinada con tratamientos sintéticos ya establecidos en la actualidad, si bien la medicina herbaria desde tiempos remotos ha sido utilizada para curar o aliviar las enfermedades en la actualidad por la fuerte relevancia que se le ha dado a sus componentes naturales químicos en la última década, darle un espacio a los fitofármacos como alternativa a tratamientos permite un beneficio a la población en la atención primaria con el fin de identificar opciones terapéuticas menos riesgosas y efectivas para generar nuevos protocolos de atención médica que permitan su incorporación al sistema de salud. (Gallegos, 2016)

Avello y Cisternas (2010) hacen referencia a que las plantas medicinales son de suma importancia en el tratamiento y prevención de múltiples enfermedades, como también la relevancia a nivel económico al ser una fuente de descubrimiento de nuevas drogas que en algunos casos tiene un costo muy inferior a los fármacos de origen sintético. El interés científico que se ha desarrollado sobre las plantas medicinales, investigando su riqueza y variabilidad química, ha impulsado una revalorización de su empleo en muchas partes del mundo, representando una forma complementaria de curar, en que el empirismo de la terapia queda atrás en función de la evidencia científica, armonizando la medicina tradicional con las terapias oficiales de cada país.

Vázquez en el 2015, establece que las acciones farmacológicas de las plantas han determinado la presencia de determinados compuestos químicos (fitoquímicos) denominados compuestos bioactivos o compuestos con actividades funcionales, estas se encuentran también en

la gran industria alimentaria como en frutas, aceites, condimentos, entre otros más. También estos componentes bioactivos son utilizados en la industria farmacéutica en donde se produce cosméticos, esencias y perfumes; inclusive en investigaciones realizadas por las industrias han demostrado que mucho de los productos fabricados tienen cierta actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral y antioxidante.

Lezama en el 2019, establece que la planta *Dysphania ambrosioides* se le atribuyen propiedades farmacológicas como antibacterial, antifúngica, antihelmíntica y antiparasitaria, esto se debe a la gran variedad de principios activos que contiene. A esta planta se le confiere uno de los principios activos más importantes que es el Ascaridol, el cual se encuentra en el aceite esencial extraído de la las hojas del Epazote, resaltando su alto poder antiparasitario; al igual que el isoascaridol, p-cimeno, alfa-terpineno y limoneno en un porcentaje menor pero igual de efectivo.

Como se menciona, los efectos farmacológicos que se le atribuyen a la planta se deben a su composición fitoquímica, entre ellos también se destacan: triterpenos, alcaloides, cumarinas, flavonoides. Los efectos positivos que han encontrado y evidenciado mejoras al calmar el dolor de estómago, nerviosismo, contra la gastritis, artritis, hinchazón, resfriados, enfermedades, abscesos dentales, antitusígeno, antidiarreico, además investigaciones farmacológicas más profundas reportan su uso como cardiaco depresor, hipotensor, antiulceroso, antipalúdico, antifúngico, relajante muscular y antibacteriano. (Lazama, 2019)

Por lo comentado anteriormente, en esta investigación se pretende demostrar que la planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote) a base de hallazgos en las moléculas o componentes que pueda tener la planta ante una gran diversidad de evidencia de efectos positivos contra una gran variedad de enfermedades, se espera positivamente una actividad antimicrobiana contra las cepas en estudio. Además de guiar las investigaciones más a fondo hacia la fitoterapia y que llegue a tener una fuerte relevancia en la trascendencia económica y social, su importancia clínica y epidemiológica en altas tasas de morbilidad y mortalidad, consecuentemente, como lo describen muchos artículos científicos la actividad que presenta la planta ante gran variedad de bacterias gram negativas y gram positivas es excelente, inhibiendo gran porcentaje de las mismas. (Sá, Santana, Silva, Soares, Randau, 2016)

## ANTECEDENTES

### Antecedentes Históricos

El autor Raymundo, P., (2015), en su trabajo final de graduación “Uso tradicional del Apazote como planta medicinal en la comunidad Primavera, aldea Salquil Grande, municipio de Nebaj, departamento de Quiché” hace referencia que el origen del uso de las plantas medicinales para curar enfermedades se remonta unos 8.000 años a. C. y fue en el continente asiático, en China; en Egipto unos 5.000 años más tarde, cuando se pone de moda las plantas medicinales, gracias al interés que tenían los faraones hacia las drogas y demás sustancias curativas extraídas de las plantas se le atribuía un carácter sagrado y misterioso.

Desde tiempos muy remotos se ha experimentado las cualidades antisépticas de las plantas tanto las aromáticas y las medicinales donde sus extractos han sido reconocidos desde la antigüedad, mientras que los intentos de caracterizar las propiedades más importantes que contienen las plantas en el laboratorio se remontan apenas empezando el siglo XX sin mucha relevancia de la gran cantidad de componentes químicos naturales que contiene la flora hasta la actualidad. (Boutkhil, Idrissi, Amechrouq, Chbicheb, Chakir, Badaoui, 2013).

Los mismos autores Boutkhil, et al (2013), en su publicación titulada “Chemical composition and antimicrobial activity of crude, aqueous, ethanol extracts and essential oils of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants” hace referencia que en Marruecos la planta *Dysphania ambrosioides* es de origen americano y que tiene un aroma característico, además que se ha utilizado por muchos siglos como antirreumático, analgésico y en gran potencia como antihelmíntico. También se habla que en Marruecos la planta fue utilizada en infusiones o jugo fresco para afecciones gastrointestinales, disentería, ulceraciones y heridas purulentas.

Oliveros, M., (2016), en su trabajo final de graduación “Determinación el rendimiento y caracterización fisicoquímica del aceite esencial del Apazote (*Chenopodium ambrosioides* L.) obtenido de plantas cosechadas en diferentes etapas de desarrollo a nivel laboratorio” donde menciona que el aceite esencial de la planta Apazote fue y es aún oficial en varios países, en 1820 hasta 1947 en Estados Unidos de Norteamérica estuvo en la farmacopea, además en Francia fue

introducida en la farmacopea en 1949; también estuvo presente en países como España, México, Portugal, Argentina, India, Italia y Turquía.

### **Antecedentes Internacionales**

La publicación de Oliveira, Relinson, Limaverde, Figueredo, Campina, Lima, (2018). Titulada “Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and  $\alpha$ -terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*” hace referencia a su principal objetivo que fue evaluar el aceite esencial de la planta mediante una extracción de las hojas por medio de un equipo de tipo Clevenger por hidrodestilación obteniendo un rendimiento de 0.1355%, además de la obtención del  $\alpha$ -terpinene.

Una vez que se extrae el aceite esencial de la planta se determina el porcentaje de rendimiento del extracto acuoso, cuyo resultado fue de 0.1355%, y de ahí utilizar uno de los principales componentes como es el  $\alpha$ -terpinene, este se comparó con norfloxacin que tiene resistencia a *Staphylococcus aureus*, obteniendo como resultado que este metabolito presente en el aceite esencial de la planta no tiene o no presentó gran diferencia en comparación con el medicamento, el cual da a entender que no tiene efecto inhibitorio ante la cepa de *Staphylococcus aureus* 1199B con la cepa 1199 de tipo salvaje. (Oliveira et al. 2018).

Aguilera, Solorio, Zapata, Ruiz y Ramírez (2017) en el artículo publicado llamado “Emulsión De Aceite Esencial de *Dysphania ambrosioides*” tienen como propósito evaluar la actividad antimicrobiana contra bacterias gram positivos y gram negativos del aceite esencial de *Dysphania ambrosioides* al ser integrado en una forma farmacéutica (emulsión), se realizó la emulsión a base de lecitina que resultó ser la más estable por un periodo de 24 horas usando la combinación de 2.5% de tween 20 y 2.5% de tween 80 y además 2% de lecitina.

Una vez obtenida la emulsión se llevaron a cabo las pruebas microbiológicas en cepas de *E. coli* y *S. aureus* utilizando el cultivo de muller-hilton y se agregó las emulsiones del extracto de Epazote en el cual se incubó a 37 °C, durante 12 horas; al finalizar las observaciones al cabo de las 12 horas, no fueron las deseadas ya que no se observó actividad antimicrobiana por error al no

secarse bien la materia prima de la planta, dando como punto final positivo, la emulsión fue un éxito lo que sugieren que puede ser aplicada en materiales grasos. (Aguilera et al. 2017).

Los autores Villalobos, Gonzáles, Salazar, Santiago y Ramírez (2016) en su publicación científica llamada “Efecto antioxidante de epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.) en carne molida cruda de bovino” en Oaxaca, México, tuvieron como objetivo principal evaluar el efecto antioxidante que tiene la planta *Chenopodium ambrosioides* sobre la carne cruda de bovino almacenada durante 9 días a una temperatura de 4 °C. Se determinaron características principales para los disolventes en agua (IE) y Etanol (EtOHE) antes de que fuera a adicionarse a la carne, entre ellos están el pH, actividad antioxidante, polifenoles totales y flavonoides totales.

En el mismo estudio los autores mencionan como resultado y conclusión final que el efecto antioxidante para IE y EtOHE sobre los lípidos de la carne puede atribuirse a la actividad antioxidante de los compuestos polifenólicos, haciendo énfasis en los flavonoides y a compuestos orgánicos como el ácido cítrico, dando a conocer que por primera vez se reporta el efecto antioxidante del epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.), bajo las condiciones experimentales utilizadas, en una carne molida de res, posiblemente debido a los flavonoides presentes tanto en la infusión como en el extracto etanólico. Además de que el epazote conservó la carne de bovino durante su almacenamiento en refrigeración dando a entender que se puede usar la planta para ser un antioxidante natural seguro en los productos cárnicos. (Villalobos et al. 2016).

En el artículo “Antifungal Properties of *Chenopodium ambrosioides* Essential Oil Against *Candida Species*” de los autores Goka, Keilah, De Dieu, Kuate, Tane, Vilarem, (2010) hace referencia sobre la extracción del aceite esencial obtenido de la parte aérea de la planta por medio del método de hidrodestilación, teniendo esto como objetivo principal ser parte por la identificación de 14 componentes que van a representar el 98% de la extracción del aceite esencial de la planta donde los componentes principales fueron  $\alpha$ -terpinene (51.3%), p-cymene (23.4%) y p-mentha-1,8-diène (15.3%), además las propiedades antifúngicas de este aceite esencial se investigaron in vitro mediante los métodos de difusión de pozos y microdilución de caldo.

El estudio tiene como resultado que a medida que se aumenta el aceite esencial de la planta en referencia al perfil de los ácidos grasos de las bacterias estudiadas como en este caso son las *Candidas*, el aumento del aceite esencial a una mayor concentración de 0,0625 mg / ml de pentadecanoato y pentadecenoato estos ácidos grasos ya no estaban presentes en el extracto de hongos; los resultados sugieren que el microorganismo lucha contra el aceite mediante el uso de estos ácidos grasos para reforzar la impermeabilidad de la membrana, pero la mayor concentración de aceite parece inhibir las enzimas involucradas en su síntesis, concluyendo el efecto del aceite esencial sobre el perfil de ácidos grasos ATCC 1663 de *C. albicans*; este aceite tiene un efecto dependiente de la dosis relativamente importante en el perfil de ácidos grasos. (Goka et al. 2010).

Según Kumar, Kumar, Dubey, Tripathi (2006) en el estudio publicado por International Journal of Food Microbiology llamado “Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity”, donde el objetivo fue extraer el aceite esencial de la planta *Chenopodium ambrosioides*; con un sistema de hidrodestilación mediante un aparato Clevanger, se pudo extraer el aceite que contiene las propiedades de la planta para poder llevar a cabo el proceso de identificación de los metabolitos más importantes los cuales sirven para la inhibición de los microorganismos.

Los autores Kumar, Kumar, Dubey, Tripathi (2006) dan a conocer que el aceite inhibió completamente el crecimiento micelial a una concentración de 100 µg / ml, además de que el aceite exhibió un amplio espectro fungitóxico contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Macrophomina phaseolina*, *Cladosporium cladosporioides*, *Helminthosporium oryzae* y *Pythium debaryanum* a 100 µg / ml; también el aceite mostró una eficacia significativa en la inhibición de la producción de aflatoxinas B1 por la cepa aflatoxigénica de *A. flavus* y antioxidante en el cual concluyen que también se puede utilizar en la preservación de alimentos beneficioso para la salud humana.

### **Antecedentes Nacionales**

Según el autor Madrigal, A., (2016) en su trabajo final de graduación “Formulación de un cremigel con acción antibacteriana a base del aceite esencial del *Chenopodium ambrosioides*” cuyo objetivo fue crear un cremigel antibacteriano a base del extracto del aceite esencial del Apazote

(*Chenopodium ambrosioides*), donde se extrajo el aceite esencial mediante un método de extracción por maceración de las hojas del Apazote y añadiéndole 900ml de cloroformo dejándolo por una semana y agitándolo una vez por día, después para separar el aceite esencial se usa el rota vapor a temperatura de 64 °C y a 55 rpm, junto con éter etílico para que la separación del aceite esencial sea más rápido.

El mismo autor menciona que mediante la extracción del aceite se obtiene tres componentes importantes que mediante pruebas de identificación de los metabolitos activos como prueba de Baeyer, Espectroscopía infrarroja y GC-MS; entre los componentes que se encontraron está el Ascaridol en un porcentaje de 17%, alfa ionona, carvacrol en donde estos dos últimos tienen actividad antifúngica contra la *Candida albicans* y por último los alfa y gamma terpineno que tienen efecto contra cepas de *C. krusei*, finalizando con la preparación del cremigel como un tratamiento alternativo a los productos antibacterianos que se encuentran en el mercado. (Madrigal, 2016)

En el trabajo final de graduación “Identificación de Compuestos Bioactivos en Hojas de *Chenopodium Ambrosioides* con Posibilidades de Potenciar la Acción Antihelmíntica de esta Planta” a cargo de Fallas, M., Vásquez, A. en el año 2016, plantearon como objetivo principal hacer una evaluación fitoquímica exhaustiva de los metabolitos secundarios principales que sintetiza esta planta, en el cual utilizaron hojas secas y a la vez molidas poniéndolas en un equipo soxhlet con solventes de polaridad creciente como hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol, esto para distribuir los componentes de la planta según su polaridad. Aplicando la técnica de arrastre con vapor de agua obtuvieron aceites esenciales de las hojas y de las semillas.

Fallas, M., Vásquez, A., autores del trabajo antes mencionado también hacen mención de que se encontraron metabolitos como el ascaridol, carvacrol, alfa terpineno y un derivado del ascaridol llamado cis-ascaridol, se dice que tiene actividad antibacteriana, antifúngica y antihelmíntica; además ratifican que el aceite esencial extraído fue probado **in vivo** en peces en donde fue más letal los compuestos ascaridol y carvacrol para eliminar parásitos como *Áscaris lumbricoides* y *Giardias*.

En el año 2012 los autores Rodríguez, X., Llanos, A., en su trabajo final de graduación “Determinación de nuevos compuestos con potencial bacteriostático y antihelmíntico en *Chenopodium ambrosioides* (Apazote)” mencionan que su objetivo de la investigación es la determinación de compuestos con potencial bacteriostático y antihelmíntico mediante una extracción de la planta Apazote, además por medio de pruebas de identificación como lo es la cromatografía de capa fina con fase estacionaria de sílica gel.

Al evaluar los aceites esenciales de apazote por medio de la cromatografía de capa fina obtuvieron una mancha fucsia que sugiere la presencia de compuestos fenólicos cuyo potencial es bacteriostático el cual aseguran que está documentado en *L. graveolens* con carvacrol y en *T. vulgaris* con el timol. También concluyen que los compuestos fenólicos de la planta apazote ayuda a que crezca en nuestro país además un potencial antihelmíntico. (Rodríguez, X., Llanos, A., 2012)

## PROYECCIONES

Evidenciar la actividad antibacterial por medio de los extractos obtenidos de la planta *Dysphania ambrosioides* en las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Conocer los distintos metabolitos secundarios que presenta la planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote) con ayuda del tamizaje fitoquímico.

Se pretende obtener exitosamente los extractos de la planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote), con los cuales se realizará la respectiva investigación.

Desarrollar más experiencia y conocimiento en el ámbito de estudio del poder natural químico que tienen las plantas a partir de técnicas de extracción y de identificación de sus principales componentes, ya que en la última década ha tomado de nuevo más fuerza este tipo de investigaciones para un tratamiento alternativo más eficaz y menos tóxico.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### Generalidades de las Bacterias

#### Historia de las bacterias

La curiosidad que ha tenido el ser humano desde que se ha asentado en la tierra ha sido mucha, ya que ha logrado sobrevivir, adaptarse y hasta modificar el ambiente en el que se vive; esa curiosidad ha sido responsable de que el aumento de conocimiento y entendimiento del mundo en el que vivimos surjan nuevas interrogantes de las formas de vida microscópicas como las bacterias, de las que hasta hace pocos siglos nadie sabía nada. Por medio de los instrumentos que aunque en las épocas anteriores han sido muy rudimentarias, en su tiempo fueron de mucha ayuda para sentar las bases microbiológicas y que los microorganismos empezaran a ser estudiados a profundidad. (Castillo, 2016)

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**, aunque en sus fundamentos que describió nunca mencionó las bases para determinar de dónde provenían las especies; aún así, estableció una idea universal aplicable y válida hasta hoy día, 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. Consecuentemente para esas décadas el científico no estaba interesado en desarrollar una mayor investigación en la gran diversidad microbiana, ya que en su lupa como método de identificación de los microorganismos solamente se veían como simples bolitas y bastoncillos. (Guerrero, Berlanga, 2009)

En los años que Darwin desarrolló sus grandiosas ideas, ignoraba la relevancia que tenían los microorganismos y la importancia que tenían las bacterias en el desarrollo de la vida y la sostenibilidad que le daría al planeta, dejando grandes dudas de cómo esas bolitas y bastoncillos tienen utilidad y cuáles beneficios darían en un futuro. (Guerrero, Berlanga, 2009)

Durante el paso del tiempo en el siglo XVIII el francés Louis Joblot describió una gran variedad de microorganismos que denominó anguilas del vinagre, más tarde el gran microscopista danés Otto Federico Müller fue el que clasificó exitosamente los microorganismos denominados infusorios o animalículos, donde este nombre ocuparía una posición prominente en el campo de la

bacteriología, además el mismo Müller introdujo otro grupo denominándolos con el término *Vibro*, derivado del verbo latino *vibro*. (Osorio, 2017)

Christian Ehrenberg continúa lo que había dejado Müller en su década y designa a los infusorios dentro de la clase *Polygastrica*, esto porque postula que poseen varios estómagos y otros diversos órganos, organizándose como animales perfectos y completos al igual que los grandes animales, el científico hizo referencia en la clase *Vibriona* donde incluye cinco géneros como *Bacterium*, *Vibrio*, *Spirochaeta*, *Spirillum* y *Spirodiscu*; esta familia contenía principalmente bacterias con morfología alargada o bacilar. Dada la trascendencia Ehrenberg a los años denomina el género *Bacterium* que al final viene significando el término Bacteria y que también denominan como bastoncito. (Osorio, 2017)

Finalmente el científico Cohn confirmó y denominó este grupo especial de seres vivos como Bacterias y no como Vibriones, esto seguramente por consideraciones psicológicas, lingüísticas, históricas y de otra índole que contribuyeron a la toma de decisión por el respectivo nombre. Otros científicos acusan de que la palabra “Bacteria” el cual también significa bastoncitos, se quejan porque a los cocos también se le denominan como bacterias, el cual hacen referencia a una analogía poco coherente que es como mencionar o clasificar a los cuerpos esféricos dentro de la clase de cuerpos cuboidales o viceversa; recordando que los “cocos” tienen forma de bolita, al final se trató de cambiar la palabra bacteria y clasificar de forma distinta a estos dos grandes grupos, en donde al final los términos que determinó y reafirmó Cohn fueron los que se quedaron y es como se le conoce hoy en día. (Osorio, 2017)

Aunque para muchos las bacterias pasen inadvertidas, tienen un papel en la historia humana importante exponiendo casos que en la actualidad ya no se recuerdan de gran manera por la relevancia que causaron entre ellos:

La tuberculosis fue una de las enfermedades que ha plagado el hombre desde tiempos inmemorables, y su presencia puede rastrearse hasta la Edad de Hierro; en Alemania y Dinamarca mostraron como la bacteria puede afectar huesos, deja trazas en las costillas y en los cuerpos de las vértebras lumbares, donde recibió el nombre de “la plaga blanca” creciendo desde la Edad Media hasta el descubrimiento de los antibióticos, el cual se agravó de una peor manera con la pandemia

del sida y en donde los medicamentos empleados fueron resistentes a las bacterias que afectaban a la humanidad. (Serrano, Hernández, 2016)

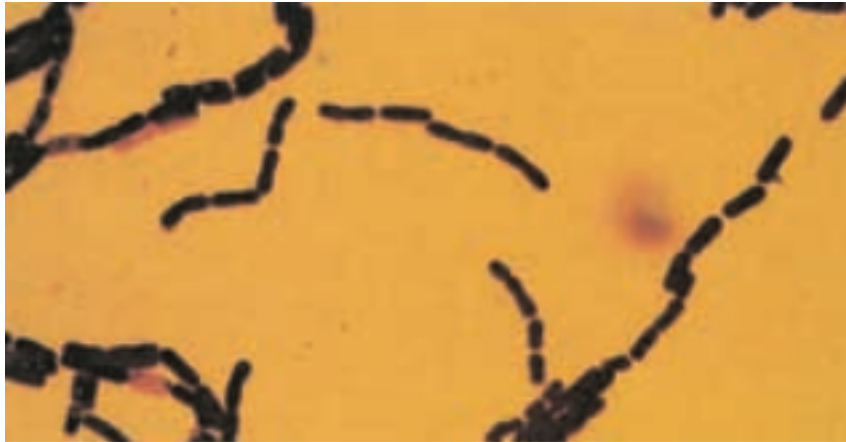
Robert Koch uno de los fundadores de la bacteriología excelente en su profesión descubre la bacteria que producía la plaga blanca en 1882 y años más tarde en 1876 reveló también la transmisión del ántrax entre animales por medio de esporas bacterianas que habitan en el suelo, en 1883 el mismo científico descubre la bacteria *Vibrio cholerae* causante de la enfermedad del cólera. Con el empleo de los métodos experimentales desarrollados por Koch, los investigadores formados por él consiguieron identificar un gran número de bacterias causantes de enfermedades en el hombre, entre ellas: la Peste Bubónica, el Tétanos y la Sífilis, entre otras más. (Serrano, Hernández, 2016)

Si bien las bacterias tienen una importancia notable en la salud y la enfermedad humana, estas antecedieron al hombre en el planeta, y han convivido con, sobre y dentro de él y han sido responsables de epidemias e infecciones que han modelado y truncado la vida de personalidades y pueblos. Son numerosos los ejemplos de enfermedades que han afectado al hombre en el transcurso de toda su vida en el cual aún hoy en día sigue evolucionando cada día más con una mayor fortaleza. (Serrano, Hernández, 2016)

### **Clasificación de las bacterias según su morfología**

Los autores Prescott, Klein y Harley (2004), en su libro Microbiología quinta edición, mencionan que la mayoría de las bacterias conocidas presentan forma de coco o de bacilo. Los bacilos que también son denominados bastoncillos, varían considerablemente en la proporción entre longitud y diámetro, siendo los cocobacilos tan cortos y anchos que parecen cocos. La forma de los bacilos varía entre especies, en donde pueden ser de tipo redondeada, plana, en forma de puro o bifurcada.

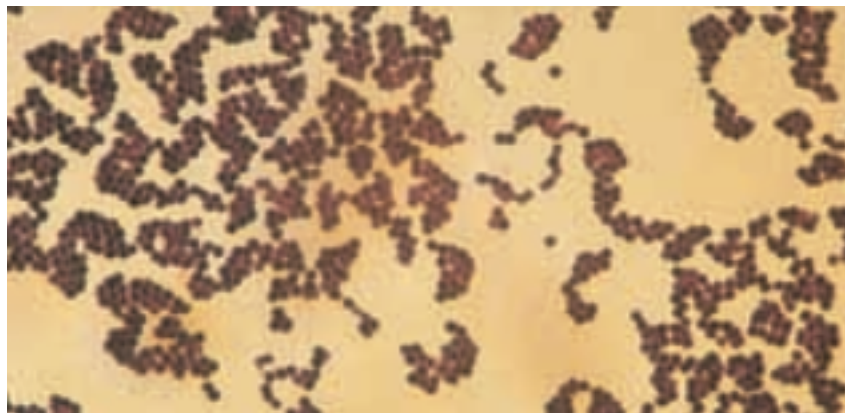
**Figura 1. Bacteria *Bacillus megaterium*, ejemplo de bacteria de tipo bacilo.**



Nota: Prescott, Klein, Harley (2004, p.44)

Así mismo la otra forma en la que se clasifica las bacterias por su morfología es de tipo cocos donde son células casi que esféricas, pueden existir como células individuales, pero se asocian en agrupaciones, los diplococos se forman cuando los cocos se dividen y permanecen juntos en pares (*Neisseria*) cuando las células después de dividirse en un mismo plano no se separan sino que forman largas cadenas de cocos (*Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactococcus*) algunas se dividen en planos aleatorios para generar racimos irregulares (*Staphylococcus*). (Prescott, Klein, Harley, 2004).

**Figura 2. Bacteria *Staphylococcus* formando un racimo irregular similar a las Uvas**



Nota: Prescott, Klein, Harley (2004, p.44)

También las bacterias se clasifican en:

Bacterias aerobias estrictas: En este grupo se encuentran las bacterias del género *Campylobacter*, que son bacilos espirales curvados y móviles, donde tiene como especies: *C. fetus*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. rectus*, *C. mucosalis* entre otras. Otra bacteria que está en el mismo género es *Helicobacter pylori*, que afecta el epitelio gástrico humano, produciendo úlceras gastroduodenales. Al grupo de los bacilos y cocos aerobios Gram negativos pertenecen las familias de las *Pseudomonas*, que poseen flagelos polares y generalmente se encuentran en el suelo, y pueden ser patógenas en animales y plantas. (Mollinedo y Gonzáles, 2014).

Bacterias anaerobias facultativas: Las bacterias que pertenecen a esta división son la familia de Enterobacteriaceae. Estas fermentan los carbohidratos en ausencia de oxígeno y forman ácido y gas. Los principales géneros y especies que pertenecen a esta familia *Escherichia* es la especie llamada *E. coli* que es capaz de O y K, generando resistencia a sustancias bactericidas y la otra familia de *Shigellas* se encuentran: *S. dysenteriae* y *S. sonney* que desencadenan la disentería bacilar. Por último se encuentra *Klebsiella* que dentro de las más destacadas se encuentra la *Klebsiella pneumoniae* que da lugar a infecciones como neumonía. (Mollinedo y Gonzáles, 2014).

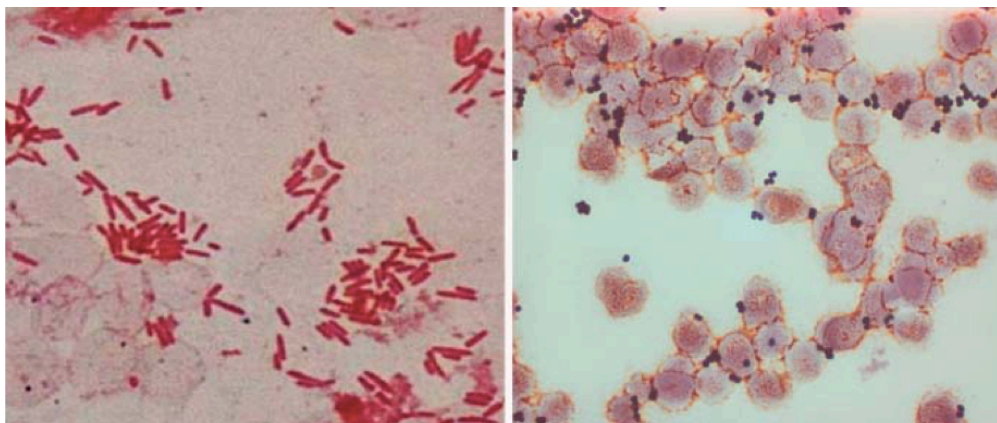
### **Clasificación bacteriana por medio de la Tinción de Gram**

Esta tinción es un procedimiento de gran utilidad empleado en los laboratorios donde se manejan pruebas microbiológicas. Es definida como una tinción diferencial, ya que utiliza dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: Gram Positivas y Gram Negativas. Fue desarrollado por el científico danés Hans Christian Gram en 1884; hoy en día sigue siendo una de las tinciones más utilizadas universalmente debido a lo económico, sencillo y eficaz que resulta. (López, Hernández, Colín, Ortega, Cerón, Cendejas, 2014).

La tinción se basa en un primer paso que consiste en el frotis, se tiñe con el colorante básico violeta de genciana, a continuación, se trata con una solución yodada que actúa como mordiente, el yodo aumenta la interacción entre la célula y el colorante, de tal forma que se tiñe más intenso. Segundo paso se decolora el frotis lavándolo con etanol o acetona, este paso produce el aspecto diferencial de la tinción de Gram, las bacterias Gram positivas retienen el cristal violeta, mientras que las Gram negativas lo pierden y aparecen incoloras. Finalmente, el frotis se tiñe de nuevo con un colorante básico de diferente color al cristal violeta, la safranina es el colorante de contraste más

común y tiñe las Gram negativas de un color rosa o rojo, dejando las Gram positivas de color violeta. (López et al, 2014).

**Figura 3. Tinción de Gram para bacterias Gram negativas y Gram positivas**



**Figura 2.**

Fotomicrografía donde se observan bacterias Gram negativas en cultivo directo (izquierda) y Gram positivas en hemocultivo (derecha) (aumento 100x).

**Imagen en color en:** [www.medigraphic.com/rid](http://www.medigraphic.com/rid)

Nota: López et al (2014, p.13)

### **Familias bacterianas Gram negativas de interés**

#### ***Escherichia coli***

La *Escherichia coli* es el microorganismo que más se ha estudiado durante años. Su descubrimiento se remonta en el año 1885, gracias al médico pediatra Theodor Escherich quien aisló la bacteria de las heces de uno de sus pacientes; desde entonces se utiliza este tipo de bacteria en estudios más a fondo como su clonación del material genético de otros varios microorganismos como parte de procedimientos para aprender más acerca de los mecanismos que la bacteria ofrece en su entorno normal y alterado, con el fin de tener un mayor control del mismo. (Hernández, Domínguez, Gonzaga, 2015)

A la bacteria en sus inicios de su descubrimiento se le otorgó con el nombre de *Bacterium coli commune* o también denominado *Bacillus coli communis*, según dice los primeros textos de referencia; además los microbiólogos e investigadores Topley y Wilson en 1929 hacen referencia de que *Escherichia coli* es una bacteria de la microflora comensal normal de la porción distal (final o terminal) del tracto intestinal de las personas y animales de sangre caliente, en algunos casos

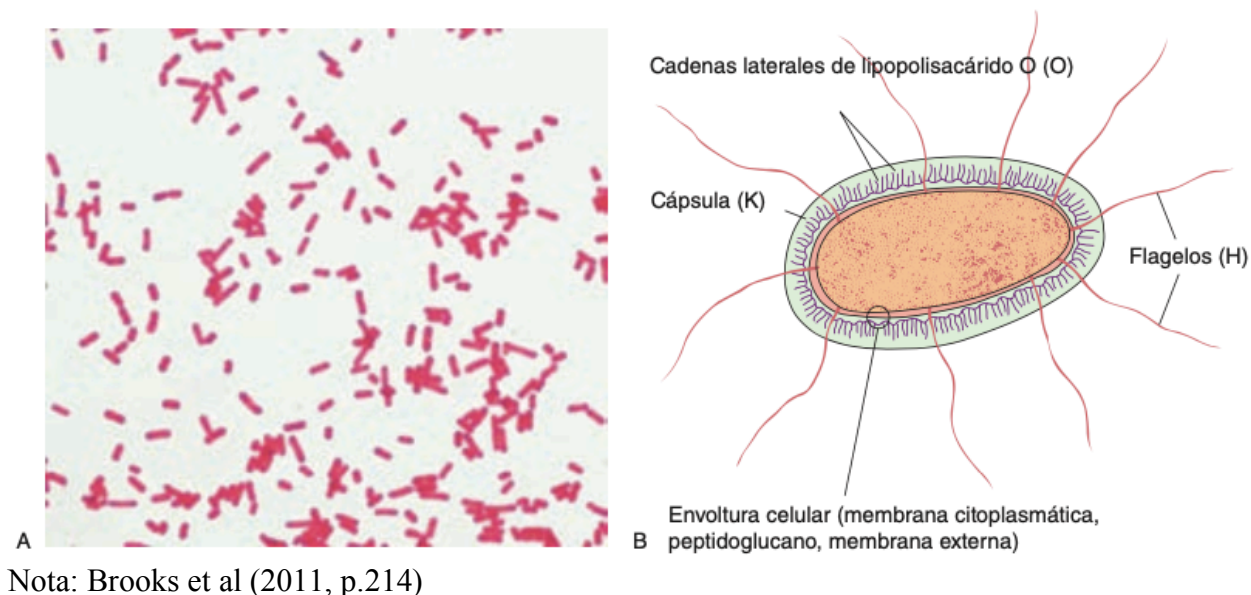
puede que la bacteria se vea alterada y produzca en el huésped algún tipo de enfermedad que sea mortal y llegue a complicar al individuo. (Huerta, 2019)

Este microorganismo pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* en donde se le considera un grupo heterogéneo y extenso de bacilos gram negativos cuyo hábitat natural y más común es el intestino del ser humano y de los animales. Se les considera bacilos móviles con flagelos, peritricosos, proliferan en medios aerobios o anaerobios (la mayoría son anaerobios facultativos), algunas especies se les ha encontrado la característica de su poca movilidad o del todo inmóviles; la *Escherichia coli* se caracteriza por ser bacilos rectos de 1.1- 1.5  $\mu\text{m}$  de ancho y de 2-6  $\mu\text{m}$  de largo y normalmente se pueden encontrar aislados o en pares. (Brooks, Carroll, Butel, Morse, Mietzner, 2011)

Dicha bacteria está conformada por una estructura antigénica un poco compleja, pero es probablemente la forma más útil de subdivisión que pueda tener la *Escherichia coli*; la literatura dice y se basa en las diferentes propiedades y estructuras superficiales que en términos serológicos se expresan en antígenos somáticos (O), capsular o microcapsular (K) y flagelar (H). El patrón antigénico que sigue una cepa bacteriana se informa con el número de antígenos que pueda presentar, en el cual se puede representar de la siguiente manera: O111 K58 H2. De esta bacteria se reconocen más de 150 antígenos O, más de 100 antígenos K y más de 50 antígenos H. (Basualdo, Coto, De Torres, 2006)

Estos antígenos se encuentran en distintas partes de la estructura que conforman a la *Escherichia coli*, donde el antígeno O se ubica en la parte más externa del lipopolisacárido de la pared celular, el antígeno K corresponde a un polisacárido de tipo capsular en donde más de una cepa puede llegar a tener dos de estos antígenos K bien definidos; algunos pueden ser polisacáridos y otros pueden ser proteínas, el antígeno H es una proteína y están situados en los flagelos, son desnaturalizados o eliminados mediante calor o alcohol, estos antígenos H en un serotipo puede haber uno o dos formas que se le denominan fase 1 (designado por una letra minúscula) y fase 2 (designado por letras arábigo). (Basualdo et al, 2006)

**Figura 4. (A) *Bacteria Escherichia coli* en tinción de Gram. Aumento X 1000, (B) Estructura antigénica de las Enterobacteriaceae**



Nota: Brooks et al (2011, p.214)

### **Etiopatogenia de la bacteria *Escherichia coli***

Según los autores Djordjević, Folić, Ninković, Vasiljević, Janković (2019) en el artículo Antimicrobial susceptibility among urinary *Escherichia coli* isolates from female outpatients: Age-Related differences hace referencia:

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son problemas comunes en las mujeres y un motivo importante para visitar a los médicos de atención primaria, la ITU ocurre cuatro veces más frecuentemente en las mujeres que en hombres debido a diferencias anatómicas y la mayor incidencia se da entre los 16 y 35 años de edad; además alrededor del 10% de las mujeres padecen una infección cada año y más del 40 al 60% adquieren la infección en cualquier momento de sus vidas. (p. 245)

Jiménez, Carballo, Chacón (2017) en su artículo **Manejo de infecciones del tracto urinario** definen la infección del tracto urinario (ITU) como una enfermedad muy frecuente que suele tener el ser humano la cual se le caracteriza por ser dolorosa y también asintomática,

queriendo decir que es una infección subclínica o sintomática cuando produce enfermedad, además de que responde de forma correcta y rápida al tratamiento de antibióticos.

Una de las infecciones más comunes y frecuentes en la población que provoca la *Escherichia coli* se le conoce con el nombre de Cistitis aguda, ya que esta bacteria se aísla aproximadamente entre un 70-95% en la orina, este microorganismo presenta diversas estructuras el cual ayuda a favorecer la adhesión a las paredes del tracto urinario. Entre las que valen la pena mencionar son las proteínas como la hemaglutinina ubicada al exterior de la membrana celular, las fimbrias tipo 1 capaces de ligarse a estructuras ricas en manosa como la proteína de Tamm Horsfall (ubicada en la orina humana); además de la presencia de hemolisinas y el factor necrotizante citotóxico favorecen en fuerte medida la patogenicidad de esta bacteria. (Jiménez, Carballo, Chacón, 2017)

La bacteria *Escherichia coli* también se le conocen cepas que se le caracterizan por su poder diarreogénico que según las características de sus propiedades que tenga cada una causa distintas enfermedades por diferentes mecanismos de acción; entre ellas se puede clasificar en 6 categorías bien definidas, las cuales son las siguientes: Enteropatógeno, Enterotoxigénico, Enteroinvasivo, Enterohemorrágico, Enteroagregativo y de adhesividad difusa. (Bustos, 2012)

*Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC) es una causa importante de diarrea en los niños menores de 2 años, sobre todo en los países que están en vías de desarrollo, esta bacteria principia por adherirse a la mucosa intestinal, por lo que produce aplanamiento de las vellosidades con cambios inflamatorios, esto induce a una alteración histopatológica conocida como lesión de adherencia/eliminación (A/E), el cual induce a la degeneración de las microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical del enterocito; se cree que el cambio en la configuración del enterocito reduce enzimáticamente y consecuentemente la hidrólisis y absorción de nutrientes en el intestino. Por lo tanto produce una diarrea líquida con mucosidad, vómitos y fiebre. (Morales, Huerta, 2010)

La *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ECET) es el agente más frecuente asociado a la enfermedad diarreica aguda (EDA) infantil en el mundo y el que está más asociado con mayor

mortalidad y morbilidad en niños bajo 5 años de edad, además se le reconoce como el agente más frecuente asociado a diarrea del viajero o de origen alimentario por alimentos importados, muy frecuente en países subdesarrollados. Estas cepas de *E. coli* se adhieren a la mucosa del intestino delgado, no la invaden, y se produce la liberación de las enterotoxinas (Termolábil “LT” y Termoestable “ST”) que son capaces de colonizar mediante factores de colonización y el cual son responsables del cuadro clínico evidenciado por una diarrea líquida profusa, sin sangre ni material purulento y ausencia de fiebre. (Gómez, 2014)

El grupo de *Escherichia coli* Enteroinvasivo (ECEI) se distingue porque sus características genéticas, bioquímicas y clínicas son muy parecidas a las de *Shigella*, por lo que causa la diarrea sanguinolenta en niños y adultos (cuadros enterocolitis). Estas cepas son móviles pero no son fermentadoras de lactosa, además de la diarrea sanguinolenta puede haber cuadros de fiebre y dolores abdominales; también a este tipo de cepas se le pueden confundir con la enfermedad producida por ECET, nada más que en comparación a la Enterotoxigénica la Enteroinvasiva no produce las toxinas LT y ST, siendo difícil diferenciarla. (Bustos, 2012)

Morales y Huerta (2010) en su artículo *Escherichia coli* diarreogénica. Conocimientos vigentes cita:

El mecanismo de patogenicidad son todos aquellos que intervienen en la invasividad de los gérmenes, en las enterobacterias se inician con la adherencia de la bacteria a las microvellosidades de la mucosa del intestino que en el caso de la *Shigella* corresponde al intestino grueso; después, la adhesión va seguida por la entrada a las células desencadenan un proceso de inflamación y la aparición de la diarrea con moco y sangre (disentería), muy similar a la producida por *Shigella*. La mayoría de pacientes manifiestan diarrea acuosa y sólo algunos tienen disentería: con evacuaciones con sangre, moco, dolor abdominal, pujo, tenesmo, fiebre alta y evidencia de toxicidad sistémica. (p.274)

*Escherichia coli* Enterohemorrágico (ECEH) es caracterizada por su tipo de transmisión que es abarcado desde la ingesta de carne de res mal cocida o contaminada hasta consumo de frutas y vegetales crudos, leche cruda, carnes procesadas o de caza; la transmisión de persona a persona

de este tipo de enfermedad es un modo más de diseminación, y causa de brotes aislados en guarderías. Esta bacteria produce una o ambas citotoxinas que se denominan toxina *Shiga-LIKE* (SLT I y SLT II) y estas son llamadas verotoxinas; la lesión que ocasiona está mediada por las proteínas íntimas de la membrana externa, la adhesión permite la producción directa de SLTs hacia la superficie del enterocito y la acción de estas toxinas da lugar a necrosis hemorrágica de las vellosidades. (Morales, Huerta, 2010)

Morales, Huerta (2010), mencionan que las manifestaciones que presenta el individuo una vez tengan presente esta bacteria alterada en su tracto gastrointestinal van a ser caracterizadas por una diarrea acuosa con intenso dolor abdominal, seguidamente por evacuaciones sanguinolentas o por colitis francamente hemorrágica; cabe mencionar y hacer énfasis que estos pacientes que presentan esta patología no van a tener fiebre.

Existe un subgrupo que se le denomina *Escherichia coli productora de toxina Shiga* (ECTS) que se le caracteriza por provocar diarrea con sangre en hospederos susceptibles, y en algunos pacientes, especialmente en edades extremas puede inducir también a síndrome hemolítico urémico, caracterizado por hemolisis, falla renal y trombocitopenia. Este tipo de bacteria es reconocida por expresar una toxina genéticamente y fenotípicamente similar a la bacteria *Shigella dysenteriae* tipo 1 que actúa inhibiendo la síntesis de proteínas en células eucariotas. (Gómez, 2014)

Uno de los mecanismos de acción que induce a la patología y afecta directamente a pacientes de corta edad alrededor de 4 años y a individuos de 65 años para arriba es que se incluye la inducción de apoptosis mediante la activación directa o indirecta de las cascadas de caspasas y la activación de la expresión o liberación de citoquinas como la IL-8, el factor estimulante de granulocitos y fagocitos (GM-CSF) y el factor de necrosis tumoral (FNT). Estos mecanismos resultan en la destrucción de la mucosa intestinal y como consecuencia, la microtrombosis del endotelio vascular en varios órganos blanco incluyendo intestino, riñón, sistema nervioso central, pulmón y corazón. (Gómez, 2014)

Finalmente la *Escherichia coli* *Enteroagregativa* (ECEAg) se caracteriza por poseer un patrón agregativo de adherencia a células HEP-2 de la mucosa intestinal, esta bacteria se asocia con síntomas de diarrea persistente (mayor de 14 días), poca fiebre y vómitos ocasionales o no inexistentes, además de que estos síntomas son visibles en niños y en adultos en países de desarrollo como también como un agente importante de diarrea del viajero. La adherencia agregativa sobre las superficies celulares o no celulares semeja el patrón de ladrillos de pared, este tipo de adherencia favorece no solo a la colonización intestinal por este patotipo sino que también la formación de biopelículas sobre superficies no biológicas. (Bustos, 2012)

## **Tratamiento**

No se dispone de algún tratamiento individual específico, pero antes de especificar algún medicamento es importante saber la susceptibilidad y las pruebas del laboratorio para conocer la susceptibilidad que tiene esta bacteria ante los antibióticos, las cefalosporinas, las fluoroquinolonas y los aminoglucósidos tienen efectos antimicrobianos considerables contra este grupo de enterobacterias. Muchos de los trastornos producidos por esta bacteria y que son de gran complejidad necesitan de una intervención quirúrgica, por ejemplo el alivio de la obstrucción de vías urinarias, el cierre de una perforación de un órgano abdominal. (Brooks et al, 2011)

Por otra parte Solano, Solano, Ramírez (2019) en su artículo **Actualización del manejo de infecciones de las vías urinarias no complicadas** hacen mención que para las patologías que produce la *Escherichia coli* la principal meta que deben tener con el paciente es el alivio sintomático con el apropiado manejo de antibióticos. Además mencionan que para un cuadro de cistitis la respuesta clínica debe de ser en 24 horas y en las primeras 48 y 72 horas para pielonefritis, estos pacientes deben de recibir una terapia con agentes bajos en toxicidad y con bajo riesgo de alterar la flora intestinal.

En las cistitis agudas no complicadas anteriormente se administraba o se recomendaba el TMP-SMX como primera línea, pero las tasas de resistencia en los últimos años en Costa Rica rebasan el 20%, el cual no se recomienda como su uso como terapia empírica. De tal manera ante esta situación los medicamentos antibacterianos de primera elección que existen son pautas cortas

con fosfomician-trometamol y nitrofurantoina (durante 5-7 días); las fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino, norfloxacino) son altamente eficaces en los regímenes de 3 días, pero de igual manera hay que tener precaución con su uso y usarlos de manera alternativa debido a su alto daño colateral. (Solano, Solano, Ramírez, 2020)

De tal manera los autores Solano, Solano, Ramírez (2020) hacen referencia que para la cistitis aguda no complicada se puede aplicar los siguientes esquemas: Fosfomicina 3g VO dosis única, Nitrofurantoína 100mg VO dos veces al día por tres días. Seguidamente mencionan que se puede usar fármacos alternativos como amoxicilina/clavulanato 500/125mg VO cada 8 horas por 5-7 días, ciprofloxacina 250mg VO dos veces al día por 3 días y levofloxacina 250-500mg VO al día por tres días; para la Pielonefritis no complicada la pauta para pacientes no ambulatorios es con antibióticos como ciprofloxacina 500mg VO dos veces al día por 7 días o levofloxacina 750mg VO dos veces al día por 5 días.

Para el tratamiento de las diarreas se ha propuesto la ingestión diaria de suspensión de subsalicilato de bismuto y dosis periódicas de tetraciclinas u otros antimicrobianos por periodos limitados. Puesto que ninguno de estos métodos es por completo eficaz ni carece de efectos adversos, se recomienda en general tener precaución y a la vez educar a la población que el consumo de alimentos y bebidas en zonas donde las condiciones sanitarias del medio ambiente son deficientes puede ser perjudicial ya que este tipo de bacterias se aprovechan de esos factores para poder desarrollarse y hacer daño. (Brooks et al, 2011)

### **Resistencia bacteriana**

Los autores Expósito, Bermellón, Lescaille, Delgado, Aliaga (2019) en su artículo **Resistencia antimicrobiana de la *Escherichia coli* en pacientes con infección del tracto urinario** hacen referencia que este microorganismo ha incrementado su resistencia durante los últimos años por medio de múltiples mecanismos relacionados con el uso masivo e irracional de antibióticos, lo que dificulta el tratamiento en la práctica médica. Un patrón alarmante que se ha dado en los últimos años de resistencia microbiana es el grupo de fármacos llamados

Carbapenémicos, situación que ha sido señalada por la Organización Mundial de la Salud cuando la incluyó en una lista de bacterias para las que se necesita rápidamente nuevos antibióticos.

Estudios recientes en el municipio de Guantánamo, Cuba en pacientes ambulatorios adultos con problemas de ITU, se les hizo un urocultivo positivo en donde se aisló la *E. coli*, se probaron distintos grupos de fármacos antimicrobianos reflejado en la figura 5, y se encontró resistencia menor del 18 % para cefalexina, gentamicina, kanamicina, ciprofloxacina y la nitrofurantoina. Los antibióticos betalactámicos (ampicillin y amoxicilina) y macrólidos (azitromicina) mostraron resistencia de 61.6, 64.6 y 54.5 % respectivamente, además de la resistencia alta de los antibióticos cotrimoxazol y ácido nalidíxico osciló entre 25.0 al 28.6 %. Finalizado el estudio la poca resistencia que tuvo la nitrofurantoina fue relevante. (Expósito et al, 2019)

**Figura 5. Resistencia de *Escherichia coli* a los antimicrobianos**

<b>Antimicrobianos</b>		<b>Resistencia antimicrobiana</b>	
		<b>No.</b>	<b>%*</b>
Penicilinas	Ampicillin	210	61,6
	Amoxicilina	221	64,8
Cefalosporinas	Cefalexina	60	17,6
Macrólidos	Azitromicina	186	54,5
Aminoglucósidos	Gentamicina	55	16,1
	Kanamicina	31	9,1
Inhibidores del folato	Cotrimoxazol	85	25,0
Quinolonas	Ácido nalidíxico	97	28,6
	Ciprofloxacina	61	17,9
Nitrofuranos	Nitrofurantoina	24	7,1

Nota: Expósito et al (2019, p.760)

Para la mayoría de episodios diarreicos que son las patologías que con más frecuencia provoca la *Escherichia coli*, se sabe que no es recomendado el tratamiento con antibióticos, ya que durante las últimas décadas el incremento de la resistencia bacteriana ha aumentado a nivel mundial y el mal uso que le ha dado la población provoca aún más la resistencia bacteriana; así mismo en

casos específicos como la diarrea del viajero o la diarrea producida por *Escherichia coli* *Enteropatógena* su uso es recomendado. Por otro lado, el estudio de los mecanismos moleculares de resistencia en *E. coli* comensales, propias de la flora intestinal, es importante porque estas estarían actuando como reservorio de los genes de resistencia antibiótica distribuida en la comunidad siendo un reflejo de la exposición comunitaria a los antibióticos. (Mosquito, Ruiz, Bauer, Ochoa, 2011)

**Figura 6. Principales mecanismos de resistencia antibiótica estudiados en *Escherichia coli***

Familia de antibióticos	Mecanismo de acción	Mecanismos de resistencia	Genes implicados
Betalactámicos	Interfiere en las últimas fases de la síntesis del peptidoglicano, componente necesario en la formación de la pared bacteriana	Betalactamasas: enzimas que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo betalactámico, inactivando de esta manera el antibiótico	Genes que codifican betalactamasas: <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> SHV, <i>bla</i> CARB, <i>bla</i> OXA, <i>bla</i> CTX-M y <i>bla</i> GES.
Quinolonas	Inhibe la acción de las topoisomerasas y de la ADN girasa bacterianas	Mutaciones puntuales que generan el cambio de aminoácidos en la enzima blanco del antibiótico Sistemas de expulsión Presencia de genes plasmídicos de resistencia antibiótica	Mutaciones a nivel de <i>gyrA</i> (gen que codifica una subunidad de la ADN girasa) y <i>parC</i> (gen que codifica una subunidad de la topoisomerasa IV). AcrAB-like (sistemas presente en diferentes enterobacterias) Familia de genes <i>qnr</i> (A, B, C, D S) que codifican proteínas Qnr que impiden estericamente la unión del antibiótico al blanco. Gen que codifica la variante cr de la acetiltransferasa 6' (AAC (6')-Ib-cr), capaz de acetilar fluoroquinolonas
Tetraciclinas	Se unen al ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis de de proteínas	Presencia de bombas de eflujo específicas para tetraciclinas	Genes <i>tetA</i> y <i>tetB</i> que codifican sistemas de eflujo
Cloramfenicol	Inhibidor de la biosíntesis de las proteínas, previene la elongación de la cadena de péptidos al unirse al centro de la peptidiltransferasa del ribosoma 70S	Inactivación enzimática por acetilación Exportadores específicos de cloramfenicol	Gen <i>cat</i> que codifica a la enzima cloramfenicol acetiltransferasa Genes <i>floR</i> y <i>cmlA</i>
Trimetoprim-Sulfametoxazol	Inhibe la síntesis de la enzima dihidropteroato sintasa (sulfametoxazol) y de la enzima dihidrofolato reductasa (trimetoprim), las cuales son enzimas necesarias en la ruta del ácido fólico.	Presencia de genes que codifican formas mutantes de la enzima blanco	Genes <i>sul1</i> y <i>sul2</i> (sulfametoxazol) y genes <i>dhfr</i> (trimetoprim)

Nota: Mosquito et al (2011)

### **Salmonella Typhi**

Esta bacteria se caracteriza por ser un serotipo del género *Salmonella spp*, el cual recibe el nombre en honor al microbiólogo americano Daniel Elmer Salmon quien junto a Theobald Smith, conocido por su trabajo con anafilaxis, fueron quienes descubrieron los gérmenes designados como salmonelas, aislándolos de cerdos con cólera. Los primeros aislamientos fueron denominados según la especie animal de la cual habían sido obtenidas por ejemplo: *Salmonella serotipo typhi*, *Salmonella serotipo choleraesuis*, *Salmonella serotipo typhimurium*; esta nomenclatura implicaba la limitación de la patogenicidad a un huésped de especie definida, luego a otras especies se les dio el nombre de ciudades o regiones en las cuales fueron aisladas por primera vez, por ejemplo: *S. Panamá*, *S. Montevideo*. (Pachón, 2009)

A partir de 1966 los nuevos serotipos fueron designados simplemente por la determinación antígeno O y H. La Organización Mundial de la Salud en 1997 formuló a los serotipos o serovares con lo que hoy en día se le llama nombre científico, poniendo de ejemplo en mayúscula y en letra romana (no itálica): *Salmonella serotipo typhimurium* o *Salmonella typhimurium* o, por ejemplo, *Salmonella serotipo typhi* o *Salmonella typhi*. (Basualdo et al, 2006)

Este microorganismo se caracteriza por ser Gram-Negativos con 0.7-1.5 diámetro x 2-5  $\mu\text{m}$  de largo, no formadores de esporas, son fermentadores de glucosa pero no fermentan lactosa, reducen nitratos y reducen la oxidasa. Además son móviles ya que contienen flagelos peritricos; la temperatura óptima para el crecimiento es entre 35 y 37 °C, abarcando un rango mínimo de 7°C y un máximo de 45°C, también el crecimiento se reduce a temperaturas inferiores de 15°C. (Quirós, 2016)

La *Salmonella typhi* también se va a caracterizar porque los humanos son la única fuente de estas bacterias en donde no se han registrado reservorios en animales o ambientales; siendo así la bacteria se clasifica en el serogrupo D, con un antígeno O (9-12), antígeno H monofásico (d) y antígeno Vi. Los antígenos somáticos (O) son termoestables y alcohol-resistentes, y además forman parte de LPS, los antígenos flagelares (H) son de naturaleza proteica y termolábiles; donde la flagelina (proteína estructural de los flagelos) es un antígeno importante; y por último el antígeno

capsular (K) que es el único que se le conoce a este serotipo de bacteria es el Vi, el cual es un polímero lineal que puede estar acetilado. (Marín, 2018)

### **Etiopatogenia de la Bacteria *Salmonella typhi***

La *salmonella typhi* es el organismo causal de la reconocida fiebre tifoidea (o entérica), el cual por su serotipo se identifica como una infección más grave que la que produce la propia *Salmonella spp* o sus otros tipos; durante las últimas décadas esta enfermedad produce 26 millones de casos nuevos por Fiebre tifoidea en todo el mundo, causando 215.000 muertes. Como ya antes se mencionó este tipo de bacteria es solamente reservorio del hombre, de igual manera la fiebre es adquirida por los seres humanos a través del consumo de agua o alimentos que han sido contaminados por heces de una persona agudamente infectada o convaleciente o un portador crónico asintomático. (Achipia, 2017)

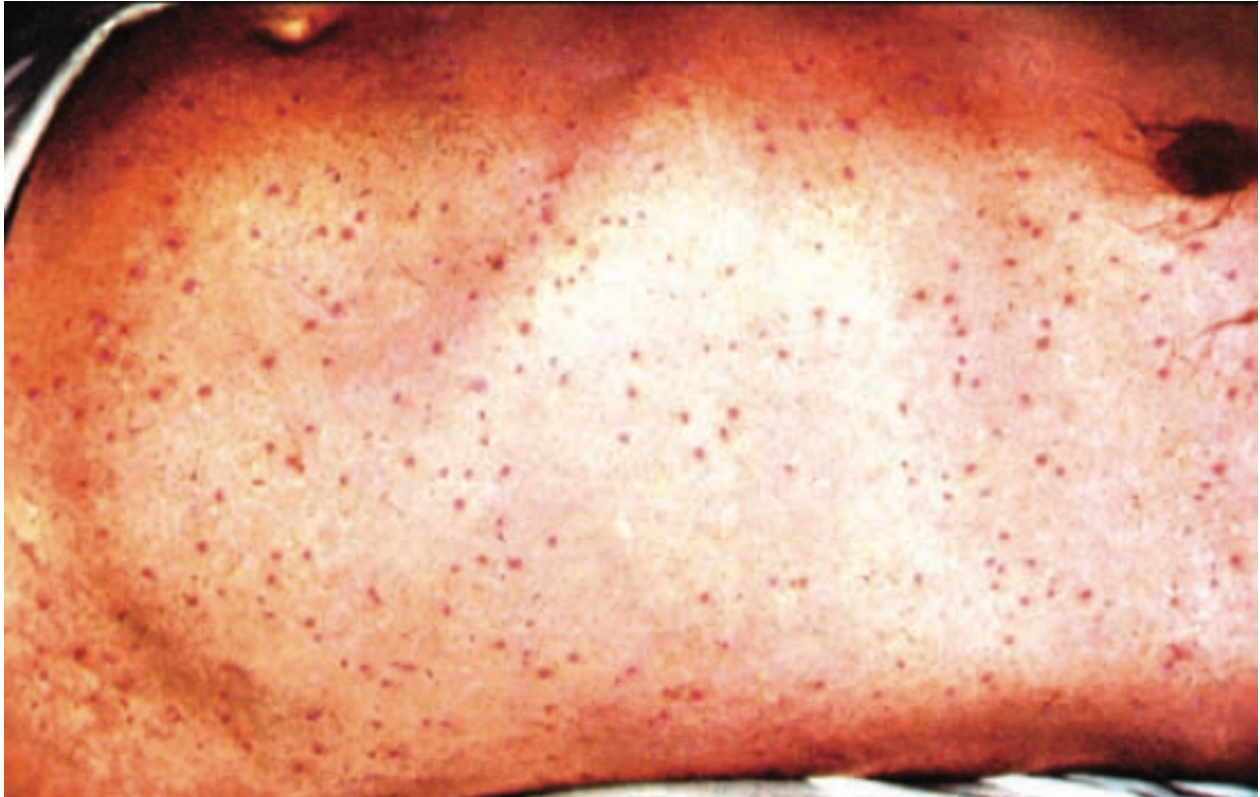
Escobar, Puig, Zaldívar, Gallegos, Agüero, Gandarilla (2016) en su artículo **Erradicación de fiebre tifoidea en Holguín. Logro de la Medicina Cubana** describe a la Fiebre Tifoidea como:

La fiebre tifoidea es una enfermedad bacteriana sistémica que se caracteriza por comienzo insidioso, con fiebre continua, cefalalgia intensa, malestar general, anorexia, bradicardia relativa, esplenomegalia, manchas rosadas en el tronco (figura 7) en 25% de los enfermos de la raza blanca y tos no productiva en los comienzos de la evolución. La constipación es típica en adolescentes y adultos, mientras la diarrea puede ocurrir en niños; aproximadamente el 10% de los pacientes tratados con antibióticos manifiestan una recaída clínica en la cual la enfermedad es muy leve. (p.981)

También se describe esta enfermedad, como productora de la ulceración de las placas de Peyer en el íleon que pueden producir hemorragia o perforación intestinales (entre el 0.5 y 1% de los casos), especialmente en los cuadros tardíos no tratados. Además la tasa de letalidad del 10 % puede disminuir al 1% o menos con la administración inmediata de antibióticos. La distribución de la enfermedad es a nivel mundial, aunque es más frecuente en los países subdesarrollados, en la América Latina continua siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad, aunque no existe

información fidedigna que refleje su magnitud, debido a la notificación incompleta y muy variable de los diferentes países. (Escobar et al, 2016)

**Figura 7. Erupciones máculo-papular producido por la bacteria *Salmonella typhi***



Nota: Carrada (2007, p.449)

### **Factores de Virulencia**

La *Salmonella typhi* presenta un polisacárido capsular que cubre la superficie de la bacteria y que actúa como factor de virulencia ya que le permite sobrevivir en el ambiente ácido del estómago poco después de la infección, inhibiendo la muerte mediada por el complemento y además es responsable de la resistencia a la fagocitosis. Además se le conocen tres factores más de virulencia que se les llama enterotoxinas, las cuales se describen como sustancias liberadas al intestino y que ocasionan síntomas gastrointestinales como cólicos y diarreas, las endotoxinas que hacen parte de la membrana externa de la bacteria y cuya actividad biológica está asociada con los lipopolisacáridos (LPS) y por último, las citotoxinas que están asociadas con la superficie celular,

las cuales inhiben la síntesis proteica en la célula hospedadora y puedan estar implicadas en la adherencia a las células epiteliales. (Marín, 2018)

A la *Salmonella typhi* también se le ha reconocido la formación de pseudópodos en la célula hospedera, lo que trae como resultado la internalización de la bacteria en vesículas endocíticas; además, la producción de adhesinas que incluyen fimbrias codificadas por el plásmido de virulencia pSLT, permiten la unión de la bacteria a las microvellosidades de los enterocitos, fimbrias polares largas que se encargan de la unión de la bacteria a las placas de Peyer, y las fimbrias agregativas delgadas llamadas *curli* que también pueden estar implicadas en la unión a las vellosidades de los enterocitos. (Marín, 2018)

Marín (2018) describe que este microorganismo está relacionado con la adherencia los polisacáridos de superficie celular (O) y el antígeno Vi, que como se mencionó anteriormente es un polisacárido capsular compuesto de N-acetilglucosaminurónico el cual se le caracteriza también por prevenir la fagocitosis de la bacteria misma ayuda a protegerla de las formas reactivas de oxígeno al interior de los fagocitos, las cepas negativas para el antígeno Vi son menos infecciosas y virulentas que las positivas para este antígeno. Finalmente la bacteria tiene capacidad de ser tolerable con el ácido, lo que le permite al microorganismo atravesar el ambiente ácido del estómago con facilidad, requisito necesario para la infección.

## **Tratamiento**

Por más de 40 años el cloranfenicol fue el fármaco de primera línea ante la fiebre tifoidea, hasta que se reportó que este medicamento presentaba alta resistencia ante la *Salmonella typhi*, en los años 70 vino a sustituir ciprofloxacino al cloranfenicol; del mismo modo el reto continúa con la aparición de múltiples antibióticos resistentes a las bacterias, la diseminación de las betalactamasas de espectro amplio, factores de sensibilidad locales y otros como los costos, disponibilidad y severidad de la enfermedad. (Román, 2015)

El tratamiento de primera línea por el momento para tratar la patología es una fluoroquinolona (ciprofloxacino, gatifloxacino, levofloxacino u ofloxacino) por 5-7 días, y la

segunda opción a la cual se puede acudir va a ser el cloranfenicol y el trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX). También se puede utilizar la azitromicina que tiene ciertas ventajas, entre ellas se encuentra que la vía de administración es oral, tiene una concentración intracelular prolongada y que se puede utilizar en niños. (Román, 2015)

Es importante recalcar que en los países que existe la resistencia bacteriana más pronunciada como en Centroamérica, Sudamérica y el continente africano, las fluoroquinolonas siguen siendo la primera opción. Al contrario en el continente asiático la resistencia está más diseminada y encuentra resistencia completa por las fluoroquinolonas, la opción a la que recurren es que el tratamiento de primera opción va a ser el ceftriaxone junto con cefixima y azitromicina; otra opción que se llega a considerar es el uso de Carbapenémicos. (Román 2015)

Román (2015) también hace mención que para el tratamiento por *Salmonella typhi* cuando la enfermedad es severa con cepas sensibles se debe usar fluoroquinolonas por 10-14 días más cloranfenicol, amoxicilina o trimetoprim-sulfametoxazol; además que los pacientes que son portadores se pueden tratar con amoxicilina o ampicilina más probenecid, TMP-SMX o ciprofloxacino, generalmente por varios meses y si es necesario en algunos casos hacer colecistectomía, especialmente si hay litos biliares.

## **Resistencia Bacteriana**

Barreto, Castillo, Retamal (2016) en su artículo denominado *Salmonella entérica: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile*, justifica la resistencia bacteriana como:

Un fenómeno que va progresivamente afectando las alternativas terapéuticas por diversos factores que han contribuido a tener un impacto mayor en enfermedades potencialmente letales, la prescripción muchas veces innecesaria de antimicrobianos por parte de los médicos, la automedicación y el mal uso de estos fármacos como promotores del crecimiento en la industria animal son causas principales del problema. Por ello, la OMS ha definido una lista de antimicrobianos denominados críticamente importantes, que deben

ser utilizados prudente y preferentemente con ciertos patógenos y bajo ciertas condiciones específicas. (p.550)

Asimismo Barreto, Castillo, Retamal (2016) describe que en Chile el Centro de Control de Enfermedades de E.U.A. (CDC) en su último reporte identifica a los antibióticos ceftriaxona y ciprofloxacina como las resistencias de preocupación, pero además el surgimiento de cepas multiresistentes a cinco o más clases de antimicrobianos. De la misma forma la presencia de niveles de resistencia con el serotipo Enteritis (*S. typhi*) es baja con un 2%, siendo de mayor relevancia la situación observada con *S. typhimurium*, que presenta más de 15% de cepas resistentes a los antibióticos como ciprofloxacina y al ácido nalidíxico, especialmente en los aislados extra-intestinales.

La Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud (2018) en un su artículo llamado Alerta Epidemiológica *Salmonella entérica serovar typhi* haplotipo H5, describe que hay que tener una estricta vigilancia con este serotipo de la bacteria, se debe fortalecer la vigilancia y la capacidad de diagnóstico de laboratorio, con el objetivo de favorecer la detección temprana de casos de fiebre tifoidea con resistencia extendida, ya que se ha encontrado este haplotipo H58 con resistencia extendida a la fluoroquinolonas y cefalosporinas.

De tal manera la OMS/OPS (2018) refieren que la aparición de estas cepas de *S. typhi* con resistencia extendida, es decir, resistencia a antimicrobianos de primera línea (ampicilina, cloranfenicol y trimetoprim-sulfametoxazol, y a fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación) asociados con el haplotipo H58, es causa de preocupación. En efecto, desde noviembre de 2006 se registra en Pakistán un brote por *S. typhi* con resistencia extendida; la circulación de esta cepa con resistencia plantea un riesgo para la salud pública debido a la reducción de antimicrobianos disponibles para el tratamiento de la fiebre tifoidea. Hasta la fecha se ha identificado a un solo antimicrobiano oral restante, la azitromicina, como opción de tratamiento para esta cepa con resistencia extendida.

En el 2018 en Canadá se informó sobre la detección de *S. typhi* a partir de la muestra de un paciente pediátrico,

la cual contiene plásmidos conjugativos que portan genes de resistencia incluyendo ampicilina, cefalosporinas de espectro extendido, fluoroquinolonas, cloranfenicol y TMX-SMX; en el mismo año en Estados Unidos se notificó dos casos de fiebre tifoidea, con resistencia extendida en viajeros provenientes de Pakistán, donde se registró un brote por *S. typhi* H58. (OMS/OPS, 2018)

También se hace mención que en el año 2016 por medio de la Red Latinoamericana de Vigilancia de Resistencia a los Antimicrobianos (ReLAVRA) a la circulación de *S. typhi* en Latinoamérica y Caribe es limitado, en efecto, Argentina, Bolivia, Chile, Costa Rica, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, República Dominicana, Uruguay y Venezuela no reportan aislamientos por esta bacteria. En Brasil, Cuba y Perú reportaron menos de diez aislamientos por país, todos ellos sensibles a las fluoroquinolonas y cefalosporinas de tercera generación. (OMS/OPS, 2018)

Por último el Ecuador reportó 8 aislamientos, 4 de los cuales fueron resistentes a ciprofloxacina y uno a cefalosporinas de tercera generación, en Guatemala se reportó 13 aislamientos, 2 de los cuales presentaron resistencia a fluoroquinolonas y ninguno a cefalosporinas de tercera generación. Colombia reportó 204 aislamientos y el Salvador 298 aislamientos por dicha bacteria, presentando porcentajes altos de resistencia a las fluoroquinolonas (12.7 y 40%) pero sin resistencia a cefalosporinas de tercera generación. (OMS/OPS, 2018)

### ***Klebsiella pneumoniae***

Esta bacteria fue observada por primera vez en 1875 por el patólogo alemán Edwin Klebs, el cual identificó la presencia de estas bacterias en las vías aéreas de pacientes fallecidos a causa de neumonía, sin embargo las escrituras describen que no está claro si Klebs observó realmente la *Klebsiella* o si era *Streptococcus pneumoniae*, ya que esta última bacteria es la primera causa de neumonía bacteriana. En 1882 el patólogo Carl Friedländer, reconoció que había bacterias en los pulmones de la mayoría de pacientes que morían de neumonía y detectó ausencia de bacterias en los pacientes que tenían otra causa de muerte; con este hallazgo el patólogo concluyó que dichos

microorganismos encontrados serían la causa de la neumonía y las denominó Bacilo de Friedländer. (Cubero,2015)

En el mismo año de 1882 se aisló la primera cepa de *Klebsiella sp.* de un paciente con rinoscleroma (*Klebsiella rhinoscleromatis*), tres años más tarde en 1885, el científico Trevisan dio nombre a uno de los géneros más representativos de la familia *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella*) e identificó al Bacilo de Friedländer como *Klebsiella pneumoniae*, en honor al científico patólogo Edwin Klebs. Desde el año 1957 la séptima edición de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, define a la familia *Enterobacteriaceae* como una de las más importantes en patología humana; debido a la importancia que ha desarrollado la *Klebsiella* se han ido realizando diferentes clasificaciones a lo largo del tiempo. (Cubero, 2015)

*Klebsiella pneumoniae* es un bacilo gram-negativo, no móvil, anaerobio facultativo y usualmente encapsulado que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Dentro del género de *Klebsiella* es la especie más importante ya que por su clínica es la que más reconocida y perjudicial para el ser humano, también hace parte de nuestra flora intestinal normal en el cual coloniza en el ser humano sano con un intervalo de porcentaje que va desde los 5-35% en el colon y un 1-5% en la orofaringe, siendo la piel colonizada transitoriamente; además este tipo de bacteria fuera del organismo se puede encontrar en lugares diferentes como lo son el agua y el suelo. (Florez, Charry, Cuellar, 2011)

Al respecto, Echeverri y Cataño (2010) hablan en su artículo *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia, que la tasa de colonización se incrementa hasta tres veces en el ambiente hospitalario, en forma directamente proporcional a la duración de la estancia y, especialmente, a la presión selectiva que ejercen los antibióticos sobre la flora comensal. Además es así como describen los siguientes porcentajes de colonización en pacientes hospitalizados: en materia fecal con un 77%, en la faringe un 19% y en las manos un 42%; esta alta frecuencia de colonización intrahospitalaria está definitivamente asociada con el uso de antibióticos de amplio espectro más que con factores asociados al cuidado de la salud.

## **Etiopatogenia de la bacteria *Klebsiella pneumoniae***

La *Klebsiella pneumoniae* se considera una bacteria patógena que causa enfermedades infecciosas oportunistas, siendo la segunda enterobacteria oportunista más importante como causa de infecciones nosocomiales y comunitarias, después de la *Escherichia coli*. Este microorganismo causa gran variedad de infecciones siendo importante como patógeno urinario, abdominal y respiratorio. Además en los últimos años se ha observado, especialmente en Asia, un incremento de abscesos piogénicos hepáticos causados por *K. pneumoniae*. (Cubero, 2015)

Las infecciones del tracto urinario (ITU) se clasifican en varios tipos, como por ejemplo la ITU no complicada que son las que ocurren en pacientes sanos con síntomas de vía urinaria baja (cistitis, disuria, polaquiuria, urgencia miccional, dolor suprapúbico), o de vía urinaria alta (pielonefritis: fiebre, dolor en fosa renal, puñopercusión positiva), pueden ser esporádicas o recurrentes. Las ITU complicadas se presentan en pacientes que presentan alguna de las condiciones que determinan mayor riesgo de evolución desfavorable como por ejemplo pacientes con obstrucción, inmunosuprimidos, insuficiencia renal, trasplante renal, etc.; también el ITU asociado a catéter, el cual consiste en presencia de un catéter urinario permanente, sin evidencia de otras fuentes de infección. (Delgado, 2019)

Delgado (2019) también hace referencia que la bacteria *Klebsiella pneumoniae* puede estar presente en infecciones del tracto urinario no complicadas como también en las complicadas respetando siempre que la que mayor incidencia en provocar estas infecciones es la *E. coli*, en lo que es el ITU asociado a catéter ya va más a nivel hospitalario en donde por medio de sondas y demás aparatos el cual estén en uso frecuente con los pacientes internados pueden provocarle la infección y agravar la patología por la que este internado el individuo. Tomando en cuenta que la resistencia que puede adquirir la bacteria a nivel hospitalario es cada vez más fuerte ya que cambia su frecuencia y patrón cada vez que se altere en su habitud natural.

Otra de las infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* son las neumonías intrahospitalarias en donde comienzan después de 48 horas de ingreso hospitalario, esta neumonía está asociada a la ventilación mecánica, ya que esta infección es la que aparece en pacientes tratados

con este tipo de ventilación mecánica; esta neumonía se le reconocen dos subgrupos, entre ellos están: La neumonía temprana es cuando se manifiesta en tiempos que varían entre menos de 4 y 7 días y la tardía cuando se desarrolla después de los 7 días y en los dos subgrupos colonizan habitualmente la orofaringe. (Echeverri, Cataño, 2010)

La colonización por flora normal o patógenos hospitalarios como es en el caso de la *Klebsiella pneumoniae* procede al desarrollo de la neumonía, los gérmenes presentes en la orofaringe y estructuras contiguas colonizan las secreciones bronquiales después de la entubación endotraqueal de forma más rápida. La aspiración de secreciones contaminadas es el principal mecanismo por el que los gérmenes alcanzan el parénquima pulmonar; otros mecanismos son la inhalación de material aerosolizado, la siembra hematógena y la diseminación desde estructuras contiguas. (Echeverri, Cataño, 2010)

### **Factores de Virulencia**

Las fimbrias son un factor crítico en el proceso infeccioso en la proximidad del microorganismo a las superficies del huésped, el cual se adhieren a los tejidos del huésped. *Klebsiella pneumoniae* tiene dos tipos de fimbrias, la primera de tipo 1 está compuesta por la subunidad FimA confieren adhesión a las moléculas gliconjugadas del huésped que contiene manosa, estas actúan como factor de virulencia en el tracto urinario únicamente; las fimbrias de tipo 3 están codificadas y formadas por subunidades de la proteína MrkA y la proteína de adhesión MrkD, estas se pueden adherir a las células endoteliales, epitelio del tracto respiratorio y células del tracto urinario. (Martínez, 2014)

Seguidamente las proteínas de membrana externa tienen aproximadamente un 50% de la membrana externa, las OMPs (Outer membrane proteins) pueden ser lipoproteínas o proteínas integrales de membrana con estructura barril beta, esta última es importante para el microorganismo ya que mantienen la integridad de la permeabilidad selectiva de la membrana y su adaptación al organismo del huésped. Las funciones que se cumplen con este factor de virulencia son las resistencias al suero o que forman los canales de las bombas de flujo, también son proteolíticas que lo que hacen es degradar péptidos antimicrobianos. (Martínez, 2014)

Consecuentemente Martínez (2014) en su tesis de grado titulada: Papel del Lípido A de *Klebsiella pneumoniae* en el control de la respuesta inmune, hace referencia del polisacárido capsular de la siguiente forma:

El CSP de *Klebsiella spp.* Es una estructura polisacárido que se organiza en capas sobre la superficie celular dando lugar a una matriz altamente hidratada. Se trata de un compuesto con carga negativa compuesto por repeticiones de un oligosacárido formado por 4-6 subunidades de azúcares neutros y ácidos urónicos, en distinta combinación. Además se ha observado una correlación entre la cantidad de CPS expresada y la virulencia del aislado, siendo los serotipos K1 y K2 los que presentan mayor cantidad de cápsula y los más virulentos en el modelo murino de infección y los más frecuentes aislados en infecciones nosocomiales y adquiridas en la comunidad. Además el tipo y cantidad de azúcar presente en el CPS también están relacionados con virulencia.

Por último se encuentra el lipopolisacárido (LPS) que es el encargado de mantener la homeostasis en la membrana externa, filtrando moléculas tóxicas y estableciendo el espacio periplasmático donde se retiene enzimas hidrolíticas, proteínas de unión a diferentes sustratos y quimiorreceptores. También se encuentra el antígeno O que es la parte más externa del LPS y se encarga de la resistencia frente al efecto bactericida del suero enmascarando otras estructuras de la superficie bacteriana, y el Lípido A es la región hidrofóbica del LPS donde se ha encontrado que estas modificaciones son importantes para la supervivencia de *K. pneumoniae* en el pulmón. (Martínez, 2014)

## **Tratamiento**

El tratamiento antimicrobiano óptimo para *Klebsiella pneumoniae* aún no ha sido definido y depende de la susceptibilidad de cada aislamiento, pero lo que sí es claro es lo limitado de las opciones, por ello se han reflatado viejos antibióticos como las polimixinas, la fosfomicina y el cloranfenicol, además se han desarrollado nuevas drogas como la tigeiclina, aunque estas presentan problemas, y su farmacodinámica de estos nuevos fármacos aún no se conoce en su

totalidad, así como los efectos adversos y los regímenes de dosificación aún no están claramente establecidos. (Paciel, Seija, Vignoli, Medina, Savio, 2011)

Consecuentemente la fosfomicina actualmente se está incluyendo en el vademecum oficial de Uruguay, su formulación intravenosa recientemente fue reintroducida en el mundo dado su potencial utilidad para el tratamiento de infecciones por bacilos Gram negativos multirresistentes, en el cual frente a estos microorganismos actúa de una manera bacteriostática. No se ha establecido con precisión si su actividad antimicrobiana es concentración o tiempo dependiente. En cuanto a la *Klebsiella pneumoniae* pertenecientes al clon hiper-pandémico ST258 productor de KPC, las mismas fueron sensibles a la fosfomicina, solo superada por tigeciclina con 98% de sensibilidad. (Paciel et al, 2011)

Los autores Corso et al (2019) en su publicación llamada **Consenso latinoamericano para** definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes, describen que en el consenso realizado en Montevideo, Uruguay, permitió estandarizar las definiciones de los diferentes niveles de resistencia a los antimicrobianos en bacterias de importancia en salud pública. Dentro de las bacterias que se incluyeron está la *Klebsiella pneumoniae* ya que durante las últimas décadas ha tomado una gran relevancia a nivel intrahospitalario y por ende una mayor resistencia a los medicamentos de uso frecuente, con el fin de encontrar la clave para el tratamiento de infecciones causadas por estas patógenos que presentan multirresistencia o resistencia extendida.

Como propuesta piloto se eligieron tres microorganismos Gram negativos, en el cual está incluido la *Klebsiella pneumoniae*, definieron los siguientes fármacos que se deberían usar para dicho microorganismo: Amoxicilina-Ácido Clavulánico o Ampicilina-Sulbactam, Piperacilina/Tazobactam, Ceftazidima o Cefotaxima/Ceftriazona o Cefepima, Imipenem o Meropenem, Aztreonam, Gentamicina, Amikacina, Ciprofloxacino, TMX-SMX, Fosfomicina, Tigeciclina, Colistina; siendo esta la propuesta señalada por el consenso el cual va a ser actualizada cada 2 años. (Corso, 2019)

Para el tratamiento de ITUs va a depender de la complicación que presente el paciente, por lo cual para el ITU no complicado se puede dar una cefalosporina de tercera generación como la Ceftriaxona o una de segunda generación; en pacientes con riesgo de infección por gérmenes multirresistentes (ITU complicado) se puede aplicar Meropenem o Piperacilina/Tazobactam y en casos graves con sepsis grave o “shock” séptico, se puede recurrir a la combinación de Meropenem junto a Amikacina. En pacientes portadores de sonda vesical o patología valvular cardiaca, añadir también un fármaco que cubra *Enterococcus*, por ejemplo, Vancomicina. (Delgado, 2019)

### **Resistencia Bacteriana**

Dentro de los miembros de la especie *Klebsiella pneumoniae* en sus últimos años ha habido gran relevancia, ya que esta bacteria toma la característica de distintas enzimas que pueden llegar a producir Beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE), estas son homogéneamente resistentes a penicilinas (Ampicilina, Amoxicilina, Piperacilina y Tircacilina) y presentan resistencia variable a otros grupos de antibióticos. Además estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar las cefalosporinas (Cefotaxima, Ceftriaxona, Ceftazidima, Cefepime) y monobactámicos (Aztreonam), pero no las cefamicinas (cefoxitina). Aun así estas enzimas no han logrado hidrolizar los Carbapenémicos como Imipenem, Meropenem y Ertapenem. (Cubero, 2015)

Las cepas de *K. pneumoniae* también son resistentes a los Carbapenémicos el cual es un problema reciente en todo el mundo, que limita aún más las opciones terapéuticas. Estas cepas a menudo albergan también mecanismos adicionales de resistencia, como producción de BLEEs, mutaciones en genes, expresión de bombas de flujo, enzimas modificantes de aminoglucósidos, etc. (Paciel et al, 2011)

También se le conocen mecanismos de acción a la *K. pneumoniae* que son resistentes a las fluoroquinolonas en donde los más conocidos son las mutaciones puntuales en la zona conocida como quinolone resistance-determining region (QRDR) de la ADN girasa (genes *gyrA* y *gyrB*) y de la topoisomerasa IV (genes *parC* y *parE*); la primera diana de resistencia a las quinolonas es el gen *gyrA*. Una mutación en este gen genera resistencia de bajo nivel, varias mutaciones en el gen

van a generar gradualmente un aumento al nivel de resistencia bajo, pero la resistencia de alto nivel surge a la presencia de mutaciones simultáneas en el gen *gyrA* y en *parC*. (Cubero, 2015)

## **Familias bacterianas Gram Positivas de Interés**

### ***Staphylococcus Aureus***

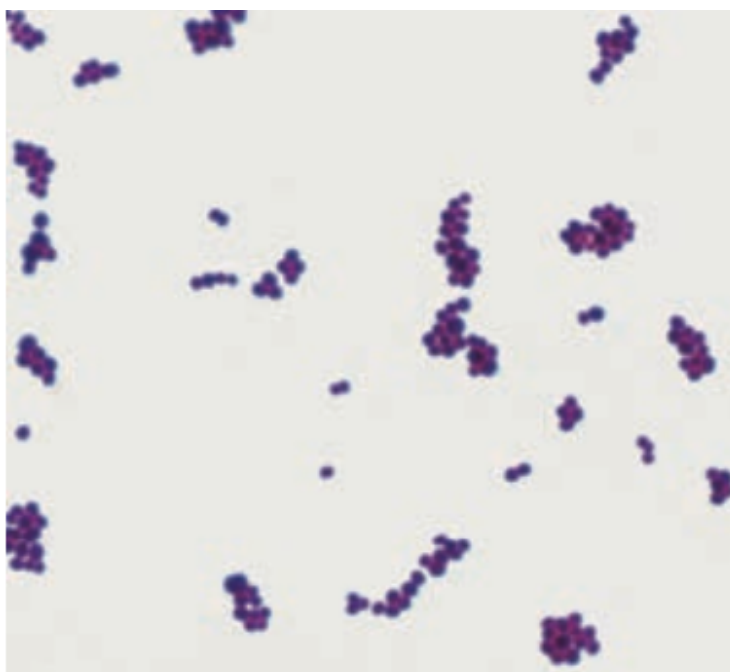
Los autores Brooks, Carrol, Murse, Mietzner (2011), en su libro Microbiología Médica se refieren a los estafilococos de la siguiente manera:

Los estafilococos son células esféricas Gram positivas por lo general dispuestas en racimos irregulares parecidos a las uvas. Se desarrollan rápidamente en muchos tipos de medios y tienen actividad metabólica, fermentan carbohidratos y producen pigmentos que varían desde un color blanco hasta un amarillo intenso. Algunos son miembros de la microflora normal de la piel y las mucosas del ser humano; otros producen supuración, formación de abscesos, diversas infecciones piógenas e incluso septicemia mortal. Los estafilococos patógenos suelen producir hemólisis, coagular el plasma y producir diversas enzimas y toxinas extracelulares. El tipo de intoxicación alimentaria más frecuente se debe a una enterotoxina estafilocócica termoestable. Los estafilococos desarrollan con rapidez resistencia a muchos antimicrobianos y pueden plantear problemas terapéuticos difíciles. (p.185)

El microorganismo *Staphylococcus aureus* es una bacteria que fue descubierta en 1880 por el cirujano Escocés Alexander Ogston, quien encontró que el pus producido en las heridas quirúrgicas era generado por esta bacteria, al observar un absceso de uno de sus pacientes al microscopio. Posteriormente, en 1882, Ogston le dio el nombre de “*Staphylococcus*”, del griego “Staphylo” que significa “racimo de uvas”. Consecuentemente en 1884, el cirujano alemán Anton J. Rosenbach identificó dos cepas de *Staphylococcus*, las nombró de acuerdo con las pigmentaciones que producían: *Staphylococcus aureus*, del latín “aurum” para el pigmento color oro, y *Staphylococcus albus* (actualmente conocido como *Staphylococcus epidermidis*), del latín “albus” para el pigmento blanco. (Pasachova, Ramírez, Muñoz, 2019)

La caracterización de la bacteria *Staphylococcus aureus* aparte de que es Gram positivo, pertenece al orden *Bacillales*, familia *Staphylococcaceae*, género *Staphylococcus*. Dentro de este género se han descrito al menos 48 especies distintas, los miembros de este género *Staphylococcus* se diferencian de los Gram negativos por su forma de cocos, además son inmóviles y crecen en racimos (Figura 8). Estos microorganismos son capaces de crecer en un amplio rango de pHs y temperaturas, además *S. aureus* a altas concentraciones de cloruro sódico. (Porrero, 2014)

**Figura 8. *Staphylococcus aureus* en tinción de Gram, identificando por medio de amplificación original x 1000 los cocos en formación de racimo**



Nota: Brooks et al (2011)

### **Etiopatogenia de la bacteria *Staphylococcus aureus***

Las enfermedades que producen la bacteria *Staphylococcus aureus* van asociadas a lesiones cutáneas, traumáticas o quirúrgicas que favorecen la penetración de la bacteria desde la piel a los tejidos profundos, también son supurativas y tienden a producir abscesos. Debido a su amplia versatilidad, esta bacteria es capaz de causar enfermedades de amplio espectro como infecciones menores de la piel e infecciones invasoras serias como: Bacteriemia, infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y

el síndrome de choque tóxico, así como infecciones gastrointestinales. (Cervantes, García, Salazar, 2014)

*Staphylococcus aureus* destaca como uno de los tres principales agentes causales de infecciones intrahospitalarias a nivel mundial, las cepas implicadas son conocidas como HA-MRSA (Health-Care-Acquired Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*), agravan las condiciones de millones de internos cada año, afectando a todo el espectro de edades y en cualquier pabellón de los nosocomios. Es importante enfatizar en que su transmisión y diseminación ocurren predominantemente a través del personal del propio hospital y que en consecuencia a las HA-MRSA no sólo se les detecta en las diversas áreas sino también en otros centros médicos de salud con los que se comparte a la plantilla de médicos, paramédicos, enfermeros, etc. (Garza, Zúñiga, Perea, 2013)

El *Staphylococcus aureus* destaca por ser uno de los patógenos que con más frecuencia ataca al ser humano, entre las enfermedades que produce se destaca la neumonía que bien se sabe la neumonía se puede dar por múltiples microorganismos, pero uno en especial y antes dicho es el de mayor prevalencia, siendo de tal forma una infección primaria o el resultado de la diseminación hematógena en otra parte del cuerpo (infección por catéter IV, endocarditis, infección de tejidos blandos) o el uso de drogas inyectables, además es una causa frecuente de neumonía intrahospitalaria adquirida por ventilación mecánica. (Bush, Pérez, 2019)

Consecuentemente, también se puede contraer infección Endocarditis, que se puede desarrollar mayoritariamente por adictos a las drogas intravenosas y en pacientes con válvulas cardíacas protésicas, dado en el aumento de uso de catéteres vasculares y en el implante de dispositivos cardíacos. También el *Staphylococcus aureus* puede producir Osteomielitis el cual sucede más a menudo en niños y causa escalofríos, fiebre y dolor de huesos afectados; la mayoría de infecciones de las vértebras y discos intervertebrales en adultos involucra a *S. aureus*. (Bush, Pérez, 2019)

También en las mujeres el uso de tampones vaginales o como cualquier tipo de complicación que tenga puede producir un Síndrome del Shock Tóxico, una infección de una herida

quirúrgica, una quemadura de la piel, etc.; por poner ejemplos de cómo se puede dar este tipo de infección por *S. aureus*. Una intoxicación alimentaria es causada por la ingestión de una enterotoxina estafilocócica preformada, que es estable frente al calentamiento. Muchos alimentos pueden actuar como medios de cultivo, y además de la contaminación que pueda producir esta enterotoxina los alimentos conservan su sabor y aroma normales; en un intervalo de 2-8 horas comienza a afectar el organismo y los síntomas recurrentes como náuseas, vómitos y diarreas comienzan a surgir. (Bush, Pérez, 2019)

## Factores de Virulencia

**Figura 9. Factores de virulencia conocidos de *Staphylococcus aureus***

Factores de virulencia	Función y efecto de su actividad para el patógeno y/o el hospedador
<b>Componentes estructurales</b>	
Cápsula externa o glucocalix	Adherencia y actividad antifagocitaria
Peptidoglicano	Actividad endotóxica y tolerancia osmótica
Ácidos teicoicos	Adherencia y actividad antifagocitaria
Adhesinas	Adherencia y evasión del sistema inmune
<b>Factores extracelulares</b>	
<b>Enzimas</b>	
Catalasa	Supervivencia en fagocitos
Coagulasa	Formación de abscesos y actividad antifagocitaria
Hialuronidasa	Invasión tisular
Lipasa, nucleasa, proteasa	Invasión y colonización
<b>Toxinas citolíticas</b>	
Hemolisinas <sup>a</sup>	Lisis celular
Leucocidinas <sup>b</sup>	Lisis celular
PSMs <sup>c</sup>	Lisis celular y actividad intracelular
<b>Superantígenos</b>	
Toxinas exfoliativas	Epidermólisis
Toxina TSST-1	Shock tóxico
Enterotoxinas	Actividad emética
<b>Proteínas de acción antiinflamatoria</b>	
CHIPS	Bloquea la quimiotaxis de los neutrófilos
SCIN	Inhibición del complemento
FLIPr	Inhibición del complemento

Nota: Gomes (2018)

La patogenicidad de *S. aureus* se considera un proceso complejo y multifactorial de estudiar, resultado de la acción combinada de un arsenal de factores de virulencia que son expresados coordinadamente durante las diferentes fases de la infección (colonización, evasión de las defensas del hospedador, multiplicación y diseminación). Estos factores de virulencia que suele presentar *S. aureus* incluyen componentes estructurales que facilitan la adherencia a los tejidos del hospedador y evitan la fagocitosis; también factores extracelulares secretados que actúan en la invasión de los tejidos. (Gomes, 2018)

## **Tratamiento**

La autora Cáceres (2016) en su tesis de grado titulada **Evolución de la resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus***, se refiere a los antibióticos de la siguiente manera:

Los antibióticos presentan un mecanismo de acción dirigido a estructuras y procesos que son únicos e importantes para las bacterias, tales como la pared celular, ADN, ARN, maquinaria de síntesis de proteínas e incluso metabolismo intermedio. A su vez, los antibióticos pueden ejercer su acción de forma bacteriostática (inhibiendo temporalmente el crecimiento de la bacteria) o bactericida (destruyendo la viabilidad celular). (p.4)

Según experiencia clínica y disponibilidad, los betalactámicos constituyen el primer grupo terapéutico en la lucha de las infecciones contra *S. aureus*. Se menciona que las penicilinas isoxazólicas han demostrado ser hasta 8 veces más activas que la meticilina (ha provocado en los últimos años gran resistencia a *Staphylococcus aureus*), por lo que son consideradas como el tratamiento de elección en infecciones de gravedad moderada o alta. En pacientes alérgicos a los betalactámicos se considera tratarlos con vancomicina, este medicamento se caracteriza por tener actividad bactericida tiempo dependiente, más lenta que la observada con betalactámicos. (Cáceres, 2016)

Vedia, López, Scapellato, Lopardo, Clara, Lista (2014) en su artículo denominado Tratamiento de las infecciones invasivas por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad, se refiere a la vancomicina que: “en las guías de la *Infectious Diseases Society of*

*America* (IDSA) para el manejo de las infecciones por SAMR, se sugiere el uso vancomicina como un terapia de elección en el caso de bacteriemias, tanto complicada como no complicada. Del mismo modo, vancomicina es una de las drogas recomendadas en pacientes con neumonía por SAMR” (p.54).

Los autores Vedia et al (2014) refieren que la vancomicina presenta un inconveniente en la cual no solo posee la capacidad de inducir la expresión y liberación de exotoxinas en cepas toxigénicas, sino también la pérdida de eficacia en condiciones de anaerobiosis, lo que la hace poco a poco o nada activa frente a poblaciones bacterianas intracelulares o en el seno de biopelículas. (Vedia et al, 2014)

Por otro lado, una alternativa a estos fármacos antes mencionados es el linezolid que presenta actividad bacteriostática en cepas tanto sensibles como resistentes a la meticilina, la ventaja que presenta este antibiótico es que en España el 99,8% de los aislados resistentes a la meticilina son sensibles ante este medicamento, por lo que se posiciona como un antimicrobiano de elección sobre todo en patologías como neumonía, meningitis y endoftalmis. Otros medicamentos que se pueden usar como alternativa son: los aminoglucósidos (gentamicina), las fluoroquinolonas (levofloxacino), en infecciones urinarias se puede usar cotrimoxazol y en infecciones de la piel leve-moderadas se recurre a mupirocina. (Cáceres, 2016)

## **Resistencia Bacteriana**

La evolución de este patógeno ha ido desarrollando resistencia a los antimicrobianos de forma vertiginosa, el primer aislamiento de *Staphylococcus aureus* se produjo por resistencia a la meticilina (MRSA) fue descrito en Inglaterra en el año 1961, y se consideró como un patógeno asociado a los cuidados de salud. Consecutivamente, en 1963, se reportó el primer brote de epidémico de MRSA nosocomial, en 1997 se describe en Japón la primera cepa de *S. aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina (VISA o GISA), y en el año 2002 aparece en Estados Unidos la primera cepa resistente a la Vancomicina (VRSA). (Álvarez, Ponce, 2012)

Álvarez y Ponce (2012) hacen referencia a que de acuerdo con datos del Centro para Control de Enfermedades (CDC), en los Estados Unidos, la proporción de infecciones resistentes a los antibióticos ha ido en aumento, el Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales (NNIS), también de los Estados Unidos, determinó que la prevalencia de cepas MRSA en pacientes hospitalizados se incrementó del 4% en 1980, al 31,9% en 1996, en el 2001 un 55% y para el 2004 llegó a un 63%. En el 2005 el MRSA provocó más daño con 94000 infecciones potencialmente mortales y casi 19000 muertes en los Estados Unidos, la mayoría de las cuales estuvieron vinculadas a instituciones de salud.

De acuerdo con los resultados publicados en el Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales en España (EPIME) correspondiente al año 2011, las infecciones nosocomiales por *Staphylococcus aureus*, tuvieron una prevalencia del 8.1% y de estos aislamientos, el 43.0% resultaron ser meticilino resistentes. Se describe que el origen del MRSA adquirida en la comunidad está sujeto a debate, se piensa que su origen no es debido a la diseminación del hospital hacia la comunidad, sino que este nuevo agente nace de la asociación de 2 genotipos: el genotipo resistente de un *Staphylococcus epidermidis* y el genotipo de un *Staphylococcus aureus* meticilina sensible más virulento, es decir, a consecuencia de un intercambio genético entre estafilococos. (Álvarez, Ponce, 2012)

En los Estados Unidos en el año 2002 se publicaron los primeros aislamientos de *Staphylococcus aureus* resistentes a Vancomicina, los mecanismos de resistencia a este medicamento estaban asociados a la conjugación de genes de resistencia del tipo Van A de *Enterococcus faecalis*. Hasta el año 2012 se notificaron 11 aislamientos de SARV, 9 de los cuales se aislaron en los Estados Unidos, uno en Irán y otro en la India. De los 9 que se aislaron en Estados Unidos la mayoría ha sido principalmente de piel y partes blandas en pacientes con enfermedades crónicas subyacentes. También se encuentran reportes sobre el hallazgo de SARV en Brasil y también el primero en América Latina, según la Universidad de São Paulo, Brasil. (Organización Panamericana de la Salud, 2013)

Por medio de un análisis de hemocultivo en un paciente de 35 años sexo masculino, diagnosticado con síndrome de Sézary, diabético, con diferentes infecciones asociadas para las que

había recibido tratamiento previo a la vancomicina y teicoplanina, se trató con daptomicina y los síntomas fueron controlados, tiempo después el paciente empeora y los episodios infecciosos aumentaron, el paciente muere después del aislamiento por SARV. Estudios realizados molecularmente del aislamiento se encuentra el gen Van A que fue detectado en *S. faecalis* encontrado en un hisopado de vigilancia realizado al mismo paciente, partiendo de esto como el causante de la resistencia bacteriana. (OPS, 2013)

### **Pruebas diagnóstico para las infecciones de bacterias**

#### **Frotis**

Se denomina frotis a la extensión que se realiza sobre un portaobjetos de una muestra o cultivo con un determinado objeto para separar lo más posible los microorganismos, ya que si aparecen agrupados en la preparación es muy difícil obtener una imagen clara y nítida de lo que se quiere llegar a observar. Este frotis debe ser fijado al vidrio del portaobjetos para poder aplicar los métodos habituales de tinción que permiten la observación al microscopio de las bacterias sin que la muestra sea arrastrada en los sucesivos lavados, la fijación de una extensión bacteriana hace que las bacterias queden inactivadas y adheridas al vidrio alterando lo menos posible la morfología bacteriana. (Silverio, 2015)

#### **Cultivo**

Los autores Junco, Rodríguez (2015) en su artículo Cultivo y crecimiento de los microorganismos describen un cultivo como el proceso de propagar los microorganismos, proporcionándoles las condiciones ambientales adecuadas. En fase de crecimiento de los microorganismos realizan réplicas de sí mismos y requieren de los elementos que se encuentran en su composición química, se le deben brindar los elementos nutritivos en una forma accesible desde el punto de vista metabólico, además los microorganismos requieren energía metabólica con el objetivo de sintetizar macromoléculas y conservar los gradientes químicos esenciales a través de sus membranas.

## Análisis Microbiológicos

En los laboratorios microbiológicos para identificar gran variedad de microorganismos como lo son las bacterias, ya sea Gram Negativos o Gram Positivos, existe una variedad de cultivos o pruebas en el cual estas bacterias se pueden desarrollar y multiplicar con el fin de poder identificar qué tipo de microorganismos es con el que se está tratando y entre otras características específicas, a continuación se describen los más habituales en microbiología clínica:

### 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)

### Agar Chocolate

Es un medio enriquecido muy parecido al agar sangre, lo que lo diferencia a este último mencionado 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 fundido a la sangre, de tal forma la hemólisis le confiere un color marrón característico parecido al chocolate, de ahí su nombre. Este agar permite el crecimiento de la mayoría de las bacterias, incluidas algunas que no crecen en el agar sangre como *Haemophilus* y algunas cepas de *Neisseria* patógenas. (Barrero, 2016)

### 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 10. Bacteria *Escherichia coli* inoculada en Agar MacConkey**

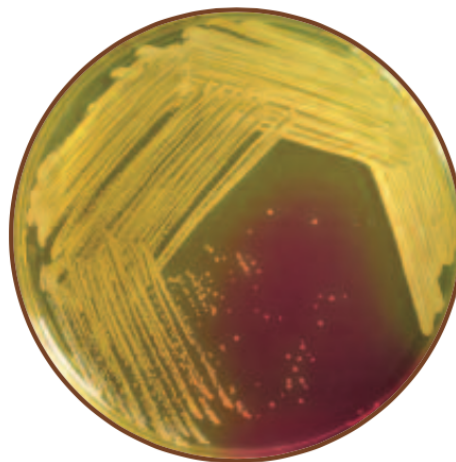


Nota: Leboffe, Pierce (2011)

### **Agar Manitol Salado**

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 11. Bacteria *Staphylococcus aureus* inoculada en Agar Manitol Sal**



Nota: Leboffe, Pierce (2011)

### **Agar Muller-Hinton**

Se trata de un medio recomendado para estudios convencionales de sensibilidad bacteriana. Su composición está bien definida e incluye extractos de ternera y caseína, sales, cationes divalentes y almidón soluble necesario para que los resultados sean reproducibles. (Murray, Rosenthal, Pfaller, 2013)

### **Epsilon Test (E-test)**

La autora López (2016) en trabajo de grado titulado, Determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante el método automatizado y su relación con el método de difusión en disco en muestras de urocultivo en el Hospital Regional Docente Ambato en el período octubre 2015- febrero 2016, hace referencia al método de Epsilon Test de la siguiente manera:

El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión de disco. En el método E-test podemos mediante lectura directa, determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI). Consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco. Siguiendo el método de difusión, una vez inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de E-test sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. (p.12)

### **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

La concentración mínima inhibitoria es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación. La CIM es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos. Las CMI puede ser útil también para definir el tipo de antimicrobianos a utilizar, lo que a su vez reduce la oportunidad de resistencia microbiana a agentes antimicrobianos específicos. (López, 2016)

## **Plantas Medicinales**

Desde el inicio de la civilización el uso de prácticas de salud complementarias es tan antiguo como la aparición de la especie humana, desde tiempos remotos las plantas medicinales son parte de la práctica de atención familiar y comunitaria. Este tipo de plantas que tienen un fin terapéutico ocupan un lugar destacado en la sociedad ya que fue el principal recurso terapéutico utilizado para tratar la salud de las personas y sus familias. Con el paso del tiempo y el advenimiento de la medicina moderna, este conocimiento vino a ser devaluado por profesionales de la salud que han estado trabajando con énfasis en medicamentos industrializados introducidos gradualmente en la vida cotidiana de la sociedad. (Heisler et al, 2015)

En esta última década ha habido un notable crecimiento del interés por los fitomedicamentos, lo que no se limita solo, a los países en desarrollo y consecuente, los mercados nacionales e internacionales, sino que las autoridades sanitarias y la opinión pública se han interesado por la inocuidad y la calidad de medicamentos a base de extractos de plantas medicinales. El 80 % de la población mundial, más de cuatro mil millones de personas, utiliza plantas medicinales como principal remedio medicinal, según señala la Organización Mundial de la Salud (OMS). (Escalona, Tase, Estrada, Almaguer, 2015)

Gran parte de la sociedad desconoce muchas propiedades que tienen las plantas, incluso la mayoría no saben que ciertas plantas que son de uso poco frecuente pueden que presenten compuestos medicinales para tratar ciertas enfermedades específicas. Para avanzar en el conocimiento de la gestión tradicional de los recursos naturales de origen vegetal y las relaciones entre sociedades humanas y las plantas, se realizan estudios etnobotánicos que son de gran relevancia en los últimos años, ya que compañías farmacéuticas en los últimos años comienzan a interesarse en las plantas como gran potencial, para la obtención de fármacos de origen natural que pueden llegar a ser útiles en el tratamiento de enfermedades que más afectan a las comunidades. (Escalona, Tase, Estrada, Almaguer, 2015)

De tal manera las plantas medicinales son todas aquellas plantas o especies vegetales en las que el todo o una parte de la misma (hojas, flores, frutos, cortezas, tallos, o raíces) está dotada de

actividad farmacológica, en el cual ayuda a tratar enfermedades abarcando desde el ser humano hasta diferentes tipos de animales. Esta acción terapéutica que ejerce las plantas medicinales se debe a sustancias químicas que tienen las mismas llamadas principio activo, que son sustancias que ejercen efecto sobre el organismo vivo, una acción farmacológica beneficiosa o perjudicial para el ser vivo. (Salvador, 2017)

### **Generalidades de la planta *Dysphania ambrosioides***

De primera instancia la planta *Dysphania ambrosioides* es reconocida como una maleza, se considera un tipo de planta Arvenses, en donde se atribuye que las plantas que pertenecen a este grupo son superiores por crecer junto o sobre plantas cultivadas, suelos baldíos y ambientes controlados por el ser humano, además perturban o impiden el desarrollo normal, encarecen el cultivo y merman sus rendimientos o calidad. Una planta es arvenses si, en cualquier área geográfica específica, sus poblaciones crecen sin que sean cultivadas con deliberación. (Blanco, 2016)

### **Características de la planta**

El Epazote (*Dysphania ambrosioides*) se caracteriza por ser una hierba anual o perenne, erguida o ascendente, fuertemente olorosa, de 40 cm a 1 metro de alto, puede ser de tallo simple o ramificado. Las hojas son pecioladas, oblongas, lanceoladas, estas mismas con un tamaño de 3 a 10 cm de largo por 1 a 5 cm de ancho, gradualmente reducidas hacia la parte superior, subenteras o dentadas. También el Epazote contiene inflorescencia en forma de espigas con numerosas flores, dispuestas en panícula piramidal, cada uno con cinco sépalos; el cáliz persistente circunda al fruto y las semillas son negras y no mayores que 0.8 mm de longitud; además *Dysphania ambrosioides* tiene la particularidad de que crece en suelos húmedos y bajos. (Ibarra, Paredes, 2013)

El hábitat y distribución que presenta el Epazote es por todo el continente americano ya que esta planta se desarrolla en un clima templado que le favorece su crecimiento fácilmente, se halla neutralizada en todas las regiones de 0 a 2700 m.s.n.m. Se ha encontrado en países como Guatemala, Bolivia, Argentina, Perú, Estados Unidos, Brasil, Ecuador y Paraguay, México entre

otros más. En Costa Rica, el crecimiento del Epazote es muy fácil por las condiciones climáticas del país que lo caracterizan por ser un clima cálido y templado, lo cual permite que la planta se desarrolle con facilidad a lo largo y ancho del territorio nacional. Además esta planta ha sido exportada y adaptada en el viejo continente y Asia desde principios del siglo XVII, para utilizarla como té. (Madrigal, 2016)

A la *Dysphania ambrosioides* durante décadas se le ha llamado de distintas maneras en los diferentes países en los que se ha descubierto este tipo de planta, por ejemplo los sinónimos vulgares que se le otorgan a esta planta son: Pazote, Pozote, Epazote, Apazote, Paico, Guaránitupí, Hierba Santa, Hierba de Santa María, Hierba Hedionda, Té de los Jesuitas. (Madrigal, 2016)

**Figura 12. Planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote)**



Nota: Rubio (2014)

**Clasificación taxonómica de la planta *Dysphania ambrosioides***

**Figura 13. Clasificación taxonómica del Epazote (*Dysphania ambrosioides*)**

**Reino:** Plantae

**Phylum:** Tracheophyta

**Clase:** *Magnoliopsida*

**Orden:** *Carophyllales*

**Familia:** *Amaranthaceae*

**Subfamilia:** *Chenopodioidae*

**Género:** *Dysphania*

**Especie:** *Dysphania ambrosioides*

Nota: Chávez (2019)

Chávez (2019) en su artículo titulado como Estudio del potencial insecticida del epazote (*Dysphania ambrosioides*) para el control sustentable del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) J.E. SMITH, menciona que recientemente existió una reclasificación de la familia *Chenopodiaceae* (actualmente familia *Amaranthaceae* y subfamilia *Chenopodioidae*), entre las especies reclasificadas fue la especie vegetal arvenses conocida comúnmente como Epazote, la cual era conocida como *Chenopodium ambrosioides*, y que actualmente está clasificada como *Dysphania ambrosioides*, esta fue una de las que actualmente se reclasificaron.

También en un artículo publicado en el 2016 los autores Sá, Santana, Silva, Soares, Randau mencionan que estudios que incluyen investigaciones filogenéticas asocian y aseguran que representantes de la familia *Chenopodiaceae* en la familia *Amaranthaceae* y especies del género *Chenopodium* fueron transferidas al género

*Dysphania*, como *Chenopodium ambrosioides*, que actualmente se conoce como *Dysphania ambrosioides*.

### **Actividad farmacológica**

Entre su actividad farmacológica que se ha estudiado para el Epazote en sus extractos de sus hojas están implicados en la modulación de las respuestas inmunes e inflamatorias, además se le adjudica actividad antioxidante, y en el percolado de la planta completa presenta actividad anti-osteoporotica evitando el desgaste de los huesos. (Gutiérrez, 2017)

También se destaca que *Dysphania ambrosioides* posee gran actividad insecticida por medio del extracto del aceite esencial, reportando actividad contra *Blattella germánica* y *Plutella xylostella*; además el extracto etanólico metanólico reduce el número de larvas de *Schistosoma mansoni*. Consecuentemente los extractos crudos del epazote presentan inhibición o efecto antifúngico frente a *Aspergillus niger*, *Aspergillus parasiticus*, *Trycophyton horzianum* entre otros más descritos. (Gutiérrez, 2017)

Consecuentemente el epazote destaca por su efecto antihelmíntico especialmente contra áscaris, tenias y otros parásitos intestinales, siendo considerado uno de los mejores vermífugos vegetales. Se destaca por ser útil para tratar padecimientos del aparato digestivo como cólicos, diarreas, empachos, disentería, indigestión y también como tónico estomacal, además se dice que ayuda a regular la menstruación. Investigaciones más profundas describen que esta planta es muy buena para tratar problemas de la piel como granos, verrugas, sarna, pústulas, hongos y cicatrización de heridas. (Rubio, 2014)

Asimismo, estudios recientes describen que la planta *Dysphania ambrosioides* por medio de sus distintos extractos que se le han realizado, tanto a las hojas, tallos, frutos etc., se ha encontrado importante actividad antibacteriana ante distintas cepas que generalmente le producen una constante infección al ser humano, entre los extractos se encuentra el aceite esencial del Epazote en donde se ha reportado actividad ante *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, para los extractos del epazote que se efectúan por medio de extractos hidroalcoholicos también se le

reporta sensibilidad en las pruebas in vitro ante las cepas antes mencionadas. Consecuentemente se menciona que la actividad antimicrobiana del epazote también tiene actividad farmacológica ante más cepas gram negativas y gram positivas. (Aquino, 2017)

### **Composición Química**

En la planta *Dysphania ambrosioides* se ha encontrado y reportado distintos metabolitos que la caracterizan y dan a reflejar la composición química que tiene la planta en los diferentes órganos del epazote, se destaca que en la flor del epazote hay aceite esencial, componentes fenólicos, ácidos ferúlico y vanílico, en sus frutos contiene kaempferol, flavona, y aceite esencial, dentro de sus semillas se ha descrito los componentes como esteroides, monoterpenos, ascaridol, *p*-cimeno y otros compuestos como salicilato de metilo y limoneno; en sus hojas se reportan los compuestos como el ambrosido y ramnosido de kaempferol y en su raíz se ha reportado metabolitos como las saponinas, geraniol, mirceno, alcanfor, *p*-cimeno, terpineno, ácido butírico, espinasterol y otros como urea y limoneno. (Chávez, 2019)

Dentro de la composición del Epazote se encuentran los aceites esenciales que son parte importante de todas las plantas, en el cual unos tienen gran relevancia por sus efectos farmacológicos, *Dysphania ambrosioides* contiene un aceite esencial peculiar ya que dentro de sus componentes se encuentra el metabolito ascaridol que es uno de los responsables de atribuir actividad farmacológica en distintos microorganismos, el ascaridol es el que se presenta con mayor porcentaje en este aceite esencial, además se reporta metabolitos dentro de este mismo aceite esencial como el *p*-cimeno, limoneno, alcanfor, artasona, safrol, N-docosano, N-hentriacontano, Nheptacosano, N-heptacosano, Beta-pineno, metadieno, Salicilato de metilo, dimetil sulfoxido, d-terpineol y otros componentes más. (Díaz, 2018)

Consecuentemente se describe que mucho de estos compuestos generan gran actividad farmacológica en microorganismos que hoy en día están afectando con más frecuencia al ser humano, en el cual se han estudiado y han generado buenos resultados, dentro de las características que tiene el epazote es que genera un olor peculiar, donde investigaciones que se le han realizado a la planta describen que el responsable de este olor es el Ascaridol, además describen que un excesivo uso de estos metabolitos de *Dysphania ambrosioides* puede llegar a generar graves

intoxicaciones a la hora de ser aplicadas, esto a su excesiva dosificación a la que es aplicada, también se ha descrito que en seres humanos a la hora de ser aplicada en grandes cantidades puede llegar a irritar las mucosas del tracto gastrointestinal. (Díaz, 2018)

### **Tamizaje fitoquímico**

El tamizaje fitoquímico es una de las etapas en el cual permite al investigador determinar cualitativamente los principales grupos químicos que contiene la planta en estudio, por medio de la extracción previamente realizada con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación, el cual debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Este tamizaje fitoquímico nos llevará a la identificación de los principales metabolitos secundarios que la planta contiene. (UNID, 2016)

### **Metabolitos Secundarios**

Según los autores Ramos, Portal (2017) en su artículo llamado Metabolitos secundarios de las plantas, los describen de la siguiente manera:

Los metabolitos secundarios presentan gran diversidad química, y se han identificado más de 200 000 estructuras químicas diversas. Estos metabolitos se caracterizan por tener funciones internas en las plantas y también participan en la comunicación de estas con el ambiente, como es el ejemplo de la producción de compuestos químicos amargos o tóxicos que sirven como antialimentadores. Además los metabolitos secundarios también se pueden liberar por medio de la raíz hacia la rizosfera para atraer microorganismos beneficiosos del suelo. Cabe mencionar que los metabolitos secundarios no se encuentran en todos los grupos de plantas, se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida en una determinada familia, género o incluso en algunas especies de las plantas. (p.2)

## **Alcaloides**

Este tipo de metabolito es uno de los más abundantes y de los cuales hay en gran variedad en los organismos vivos, además de que presentan una colección de tipos de estructuras, rutas biosintéticas y actividades farmacológicas importantes. Se ha descrito que los alcaloides en donde más frecuente se han aislado es en las plantas, esto en comparación con animales, insectos, invertebrados marinos y microorganismos, en el cual los antes mencionados se encuentran en menor proporción. (Yáñez, 2014)

Reciben esta denominación los compuestos nitrogenados heterocíclicos, constituidos además por carbono e hidrógeno, muchos llevan oxígeno, lo que les confiere una serie de propiedades físicas (sólida, cristalizable), raramente suelen tener azufre. Estos acostumbra ser sustancias que provienen de metabolitos secundarios y sintetizados a partir de aminoácidos. Consecuentemente, tienen la característica de ser amargos en el gusto, solubles en alcohol, éter, cloroformo o hexano pero son poco solubles en agua. La actividad biológica de los alcaloides es amplia y se localiza en tejidos periféricos de corteza, raíces, hojas, frutos y semillas; el mecanismo de acción parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo. (Yáñez, 2014)

## **Terpenos**

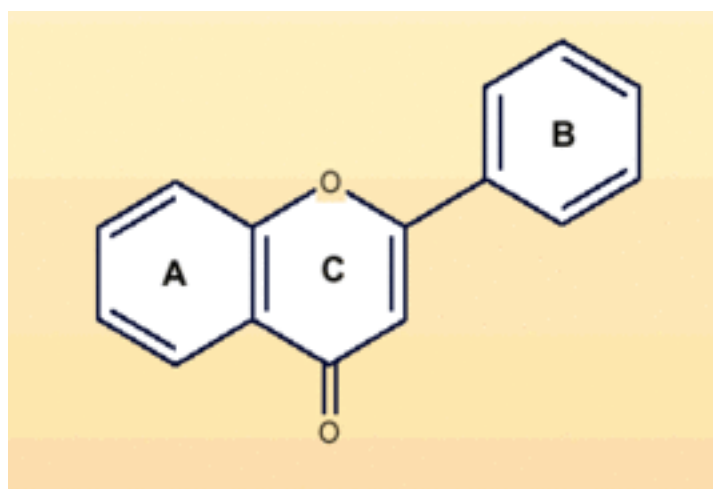
Este tipo de metabolitos se caracterizan por ser insolubles en agua, volátiles, derivados de las unidades de isopreno, en el cual la combinación de dos isoprenos conforma la unidad de terpeno. Dicho compuesto desempeña acciones importantes en las plantas como acarreadores de electrones, esteroides, etc., los terpenos son los metabolitos secundarios que aportan características organolépticas en las plantas (aroma y sabor) además constituyen la mayor parte de aceites esenciales. Dentro de las funciones que se les confieren a los terpenos, la mayoría son farmacológicas en donde desempeñan funciones como antitumorales, insecticidas, antibióticos, analgésicos, antibacterianos, antihepatotóxicos y antioxidantes. (Cuesta, Mogrovejo, 2020)

## Flavonoides

Los flavonoides son los 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)

Este componente de las plantas es de suma relevancia ya que son las responsables de las coloraciones de muchas flores, frutos y hojas, y por ello intervenir en la polinización atrayendo insectos, también participan en la vida vegetal ejerciendo importantes funciones como por ejemplo proteger a la planta de los efectos nocivos de la radiación ultra violeta (UV) y ejercer una eficaz actividad antioxidante y antimicrobiana. 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 (en el caso de los isoflavonoides). (Yáñez, 2014)

*Figura 14. Estructura básica de los Flavonoides*

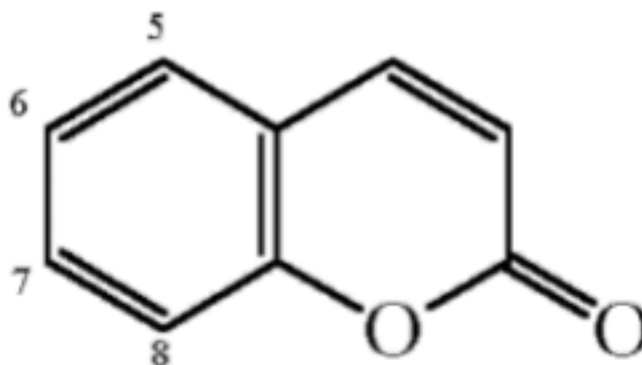


Nota: López (2002)

## Cumarinas

Este tipo de 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-benzopirán-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)

*Figura 15. Estructura básica de las cumarinas*



Nota: Yáñez (2014)

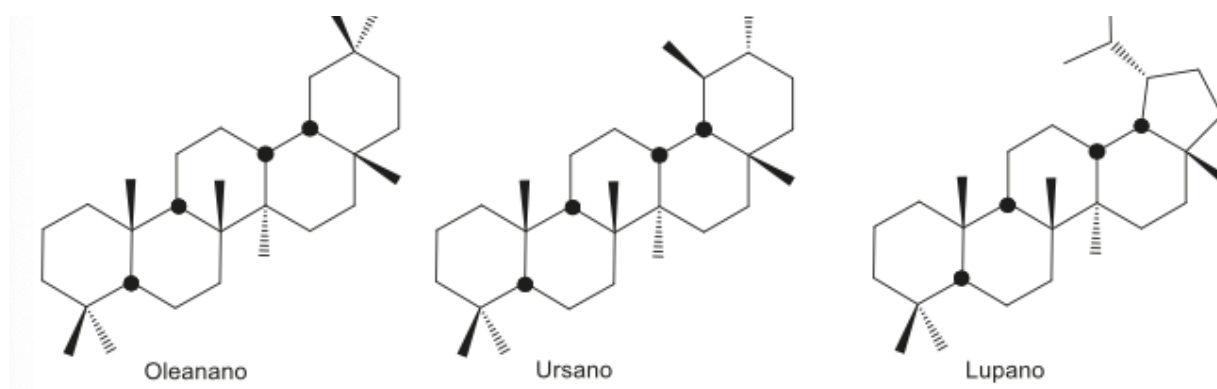
## Triterpenos

Los triterpenos (30 átomos de carbono) son compuestos naturales que se construyen a partir de seis unidades de isopreno. Los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y desempeñan un papel importante en la naturaleza, dentro de los triterpenos los esqueletos más importantes y con acción farmacológica se dice que son el olaneano, ursano y lupano. Hasta ahora se conocen alrededor de 100 diferentes tipos de esqueletos en la naturaleza y cientos de derivados han sido sintetizados; entre los efectos farmacológicos y biológicos que produce estos tipos de

triterpenos encontramos acción anti-tumoral, anti-inflamatoria, anti-VIH, anti-microbiana, hepato y cardioprotectores, analgésicos, anti-micóticos, anti-quimiopreventivos, entre otros más. (Cano, 2013)

Consecuentemente, se menciona que los efectos farmacológicos anti-VIH y anti-quimioterapéuticos o quimiopreventivos la mayoría son derivados de moléculas químicas y son aproximaciones sintéticas, en el cual se menciona que hoy en día es un proceso complejo ya que la biotransformación de estos metabolitos se torna complejo por los métodos químicos que se proceden a hacer en estos mismos antes mencionados. (Cano, 2013)

**Figura 16. Principales metabolitos de los triterpenos con importante actividad farmacológica**



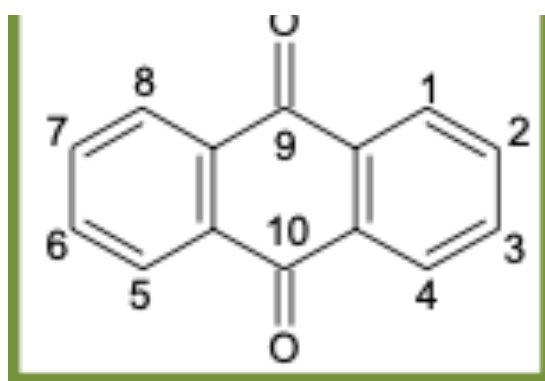
Nota: Cano (2013)

### **Antraquinonas**

Este grupo se considera uno de los más importantes y extensos de las quinonas, ya que es fuente de una importante gran cantidad de colorantes; las antraquinonas tienen dos grupos que son ceto-, y la basal; puede ser sustituida de varias formas, resultando en una gran diversidad de estructuras. Además se le han atribuido numerosas investigaciones biológicas o farmacológicas con gran cantidad de actividades biológicas. (Vélez, Villa, 2012)

Las antraquinonas son solubles en solventes orgánicos como lo es el éter, cloroformo, alcohol caliente, benceno. También se le ha reportado a este grupo de metabolitos una amplia gama de actividades biológicas incluyendo entre estas antifúngico, antimicrobiano, anticancerígeno y antioxidante; consecuentemente también se reporta que funciona como analgésicos y poseen potentes propiedades antibióticas, tanto para virus como para bacterias. (Vélez, Villa, 2012)

**Figura 17. Estructura general de las antraquinonas**



Nota: Vélez, Villa (2012)

## **Taninos**

Los taninos son sustancias no nitrogenadas, de estructura polifenólica, solubles en agua, alcohol, acetona, poco soluble en éter, de sabor astringente y con una propiedad peculiar de proteger la piel haciéndola imputrescible e impermeable. Estos metabolitos son una clase de polímeros fenólicos vegetales con propiedades defensivas; los taninos vegetales sirven como defensas contra microorganismos, por ejemplo, la parte central de muchos árboles contiene elevadas concentraciones de taninos que ayudan a prevenir la podredumbre producida por hongos o bacterias. (Yáñez, 2014)

Principalmente los taninos se encuentran en las raíces, la corteza y de vez en cuando en las hojas de la planta, estos compuestos tienen propiedades antibacterianas, astringentes y antisépticas. Entre su actividad farmacológica externa que aporta los taninos está la vasoconstricción (para hemorragias) y cicatrizantes (quemaduras), además de ser astringentes. Internamente los taninos

son antidiarreicos y antídoto ante intoxicaciones; se reporta que los taninos suelen ser compuestos que protegen contra infecciones debido a que provocan desnaturalización de las proteínas del microorganismo. (Yáñez, 2014)

### **Saponinas**

Las saponinas son esteroides y glicósidos triterpénicos, y su nombre se debe a sus propiedades jabonosas, la presencia en una única molécula de elementos solubles en lípidos (el esteroide o triterpeno) y en agua (el azúcar) confiere a las saponinas propiedades detergentes en el cual ayuda a formar una cubierta jabonosa cuando se agitan en agua. Se cree que la capacidad de las saponinas en humanos es debida a su capacidad para formar complejos con esteroides, donde las saponinas pueden interferir con la absorción de los esteroides en el aparato digestivo o bien romper membranas celulares una vez incorporadas al torrente sanguíneo. (Yáñez, 2014)

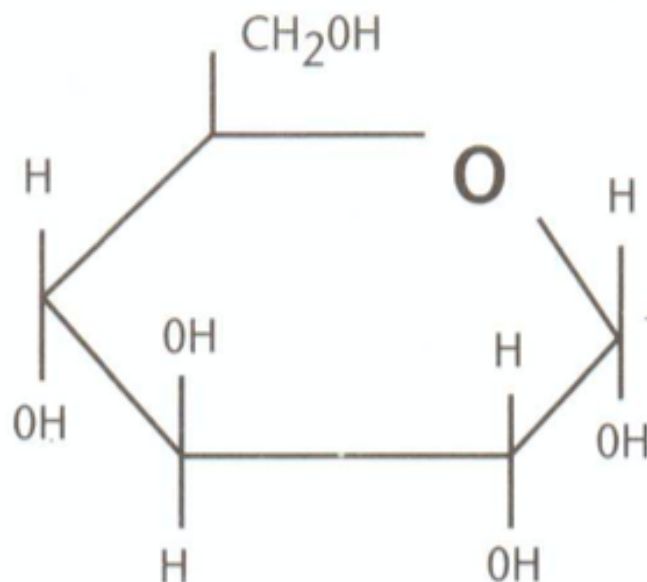
Algunas características que se le confieren a las saponinas es que este metabolito tiene actividad antiprotozoaria en el cual funcionan uniéndose al colesterol y otros esteroides de la membrana celular de los protozoos causando su inestabilidad, lisis y muerte celular, además también ayuda pero con una menor carga tener una actividad antiviral y por último sirve como antibacteriano debido a que reducen la tensión superficial y actúan sobre los lípidos de la membrana provocando alteraciones de las mismas, lo que conlleva a la muerte celular. (Yáñez, 2014)

### **Azúcares Reductores**

Los azúcares reductores comúnmente son clasificados como carbohidratos o también conocidos como hidratos de carbono, estos azúcares se caracterizan por encontrarse en los monosacáridos, son simples, es decir, que ya no tienen posibilidad de descomponerse en moléculas más pequeñas, dentro de sus características de estos azúcares reductores, es que producen efecto sobre las proteínas alterándolas debido a que se genera una reacción de Glucosilación sin acción enzimática, que consiste en la unión de estos azúcares para alterar la estructura física y química de la proteína, alterando su función. (Pérez, Gómez, Pazmiño, Jaque, Alexander, 2017)

Estos azúcares poseen un grupo carbonilo y que a través del mismo puede reaccionar con otras moléculas, ya que al menos tiene un OH hemiacetálico libre, además en su estructura incluye un átomo de carbono anomérico libre como glucosa, fructuosa, maltosa y fructuosa, también utilizan el extremo libre para reducir el oxígeno en reacciones químicas mediante la donación de electrones a la otra molécula. (Pérez, Gómez, Pazmiño, Jaque, Alexander, 2017)

**Figura 18. Estructura de un Azúcar Reductor (Glucosa)**



Nota: Pérez, Gómez, Pazmiño, Jaque, Alexander (2017)

### Métodos de Extracción

Los autores Ramos y Portal (2017) mencionan que los métodos de extracción es un paso muy importante en la obtención de extractos de plantas, pues los resultados finales dependerán de la eficiencia de este proceso que se explica. Muchas veces las concentraciones de estos compuestos del extracto pueden ser afectadas por factores como el tipo de disolvente en el cual se va a utilizar para ayudar a extraer esos componentes principales de la planta, la temperatura en la cual se trabaja, el tiempo de contacto y el tamaño de las partículas, debido a esto, es muy importante validar las técnicas de extracción para cada compuesto en particular.

Consecuentemente los mismos autores hacen referencia que los disolventes que se escogen o que se emplean durante la extracción también pueden influir en la concentración de los metabolitos secundarios, lo cual se debe a que la solubilidad de estos compuestos es afectada por la polaridad de los disolventes. Por lo tanto, a veces sé es difícil desarrollar un procedimiento de extracción para la obtención de todos los compuestos fenólicos de la planta, puesto que la selección de la técnica de extracción de compuestos naturales no es simple, ya que cada una presenta ventajas y desventajas. (Ramos, Portal, 2017)

### **Extracción por Maceración**

Este tipo de extracción consiste en utilizar el material vegetal pulverizado en un recipiente con el disolvente, donde permanece en contacto con el disolvente por varios días u horas. Durante este tiempo que se encuentra en reposo el material soluble se transfiere desde la muestra sólida al disolvente; comúnmente esta técnica se lleva a cabo a la temperatura del cuarto o a medio ambiente, protegiendo el material de la luz sin embargo, a temperaturas más altas que se encuentre el material puede que se vea afectado en consecuencia de la degradación de compuestos termoestables. (Yáñez, 2014)

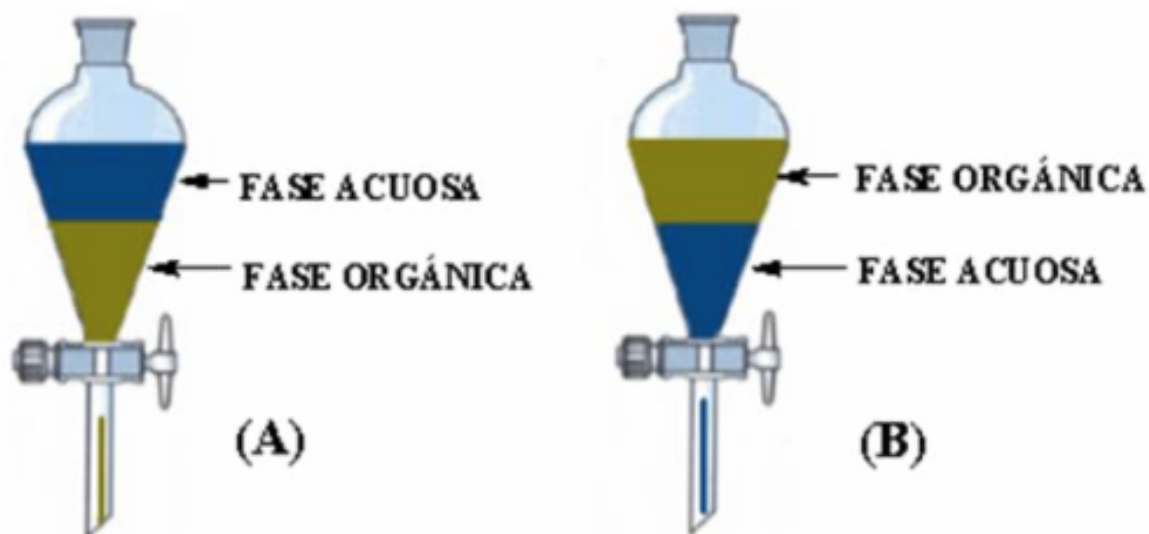
Normalmente los disolventes que se utilizan en este proceso son bastantes pero los más comunes en el cual los metabolitos pueden ser más afines son el agua, alcohol, aceite, entre otros más descritos. Durante los días que el material vegetal se encuentre con el solvente, se puede estar agitando de forma moderada para que los componentes sean más afines al respectivo solvente, a este proceso también se le puede llamar maceración dinámica, además, también el material se puede mantener estáticamente que de igual manera va a funcionar. (Yáñez, 2014)

### **Extracción líquido-líquido**

Es un método que ayuda a transferir una sustancia de una fase a otra, aunque también se utilizan técnicas de extracción sólido-líquido, la que más se utiliza es la líquido-líquido que también es conocida como extracción, este proceso se lleva a cabo mediante dos líquidos inmiscibles utilizando un embudo de decantación en donde se logra observar dos tipos de fases, la fase acuosa

y la fase orgánica, donde en la acuosa es la que contiene agua o dilución acuosa y la orgánica contiene el disolvente orgánico inmiscible con el agua. (García, 2012)

**Figura 19. Separación por densidad de las fases y decantación: (A) Disolventes halogenados, (B) Disolventes no halogenados**



Nota: Castillo, Mendoza (2015)

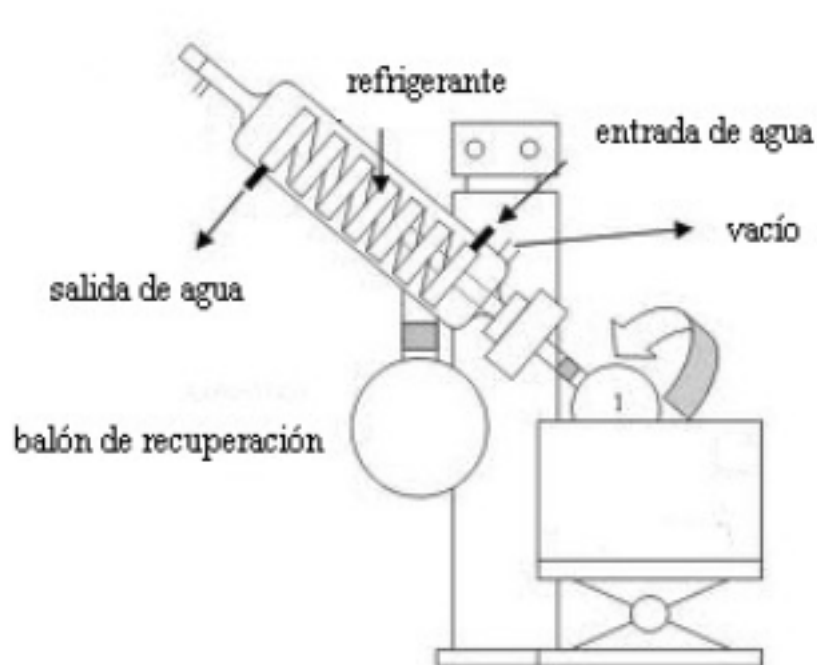
### **Destilación a presión reducida (Rota Vapor)**

Este proceso es realizado por el evaporador rotatorio o Rotavapor que es un aparato de destilación a un baño María, es usado principalmente en laboratorios de síntesis químicas. Se utiliza principalmente para separar una sustancia del solvente orgánico en la que esta disuelta, por medio de evaporación suave de ese solvente a presión reducida; dado que la separación que se realiza del solvente puede ocurrir antes de llegar al punto de ebullición, no se trata de una verdadera destilación ya que generalmente el solvente no llega a su punto de ebullición pero se evapora al ser calentado en baño María al mismo tiempo que el balón gira, condensando los vapores en un recipiente colector. (Niemevz, 2019)

La sustancia de interés permanece dentro del balón recolector que está girando parcialmente sumergido en el baño María, es fundamental que el operador que maneje el Rotavapor conozca de

antemano los puntos de ebullición del solvente para no sobrecalentar el sistema. Además este sistema tiene la característica de que se reduce la presión atmosférica mediante la aplicación de vacío, que facilitan la evaporación, y permiten que el calentamiento necesario sea más suave para lograr la evaporación deseada, algo especialmente útil en caso de sustancias orgánicas sensibles al calor. (Niemevz, 2019)

**Figura 20. Rotavapor**



Nota: Niemevz (2019)

### **Cromatografía para la Detección de Componentes en una Muestra**

El botánico ruso Mikhael Semenovich Tswett estableció en 1906, las ventajas de la técnica, adoptó la terminología y definió los procesos experimentales básicos para esta técnica. Tswett publicó dos trabajos describiendo sus experiencias en la separación de los componentes de extractos de hojas y de yema de huevo, para lo cual usó columnas de vidrio rellenas con varios sólidos finamente divididos y arrastró los componentes con éter de petróleo. Como el botánico separó compuestos coloreados (pigmentos) denominó a la técnica con el nombre de cromatografía,

ya que este término deriva de las palabras griegas “*chrom*” (color) y “*graphe*” (escribir): escribir en colores. (Corzo, 2019)

La cromatografía es una técnica o método físico de separación excepcionalmente versátil que en una o varias de sus formas es usada por casi todos los químicos en investigación. Entre los métodos de análisis modernos ocupa un lugar destacado debido a su facilidad para la separación, identificación y cuantificación de diversas especies químicas, ya sea por sí sola o asociada a otras técnicas instrumentales de análisis como, por ejemplo, la espectrofotometría o la espectrometría de masas. Además, este tipo de proceso no depende de que los compuestos a separar posean color, pero sí de que puedan colorearse a través de una reacción química para poder visualizar su ubicación una vez separados. (Corzo, 2019)

**Figura 21. (a) Mikhael Semenovich Tswett; (b) Separación de pigmentos vegetales por cromatografía en papel**



Nota: Corzo (2019)

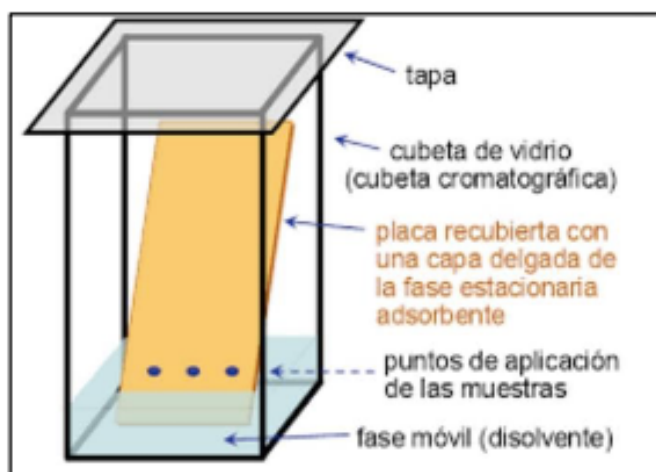
### **Cromatografía de Capa Fina**

Este tipo de cromatografía consiste en la funcionalidad de una fase estacionaria y una fase móvil en el cual el principio de separación es el mismo, la sustancia de interés será retenida por la

fase estacionaria o se moverá con la fase móvil, recorriendo una distancia que es inversamente proporcional a su afinidad por la fase estacionaria. Este proceso de separación está fundamentado principalmente en el fenómeno de la adsorción. Sin embargo, usando fases estacionarias tratadas, puede ocurrir una partición o intercambio iónico, lo que permite su empleo en la separación de sustancias hidrofóbicas así como de sustancias hidrofílicas. (Corzo, 2019)

En el mercado se dispone de una gran variedad de adsorbentes para la fase estacionaria, entre los cuales los más utilizados son la sílica, alúmina, celulosa y poliamida. Seguidamente, la fase móvil puede ser un solvente como agua, un solvente orgánico o una mezcla entre ambos; la superficie del soporte donde se trabaja la fase estacionaria puede ser una placa de aluminio, vidrio, plástico o papel, además esta superficie puede ser rígida o flexible. Dentro del proceso la placa se coloca en una cubeta cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (eluyente o fase móvil), a medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los productos presentes en la muestra, entre el disolvente y el adsorbente. (Corzo, 2019)

**Figura 22. Cromatografía de Capa Fina**



Nota: Corzo (2019)

## CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

### Enfoque de la investigación

La investigación tendrá un tipo de enfoque cuantitativo, donde Hernández, Fernández y Baptista (2014), en su libro “Metodología de la Investigación”, definen este tipo de enfoque como secuencial y probatorio, la cual parte de una idea que va acotándose, se delimita y derivan objetivos y preguntas hasta llegar a establecer una hipótesis y determinar las variables de la investigación que pueden ser medibles en un determinado tiempo. Además, se requiere instrumentos para la recolección de datos, se analizan las mediciones obtenidas y se extrae una serie de conclusiones. (p.4).

Se pretende realizar un fraccionamiento completo de la planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote) con distintos disolventes de diferentes cualidades, para obtener las partes deseadas de la planta. Además, se realiza un tamizaje fitoquímico por medio de distintas pruebas de identificación para determinar los metabolitos secundarios que presente la planta y probar la actividad antibacterial contra las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Klebsiella pneumoniae*.

### Diseño de la investigación

El primer diseño de la investigación será explicativo, responde la causa de los fenómenos y eventos de interés y explica por qué ocurre un fenómeno; donde se pretende investigar cómo es que se da la resistencia bacteriana de las cepas a estudiar en la última década, y que eventos adversos van provocando que se salen de control que sean de interés, ante las consecuencias investigadas se estudia una posible solución en plantas arvenses como lo es *Dysphania ambrosioides* con posible solución encontrada en su composición natural química que ayudará a solventar los problemas dados por las bacterias. (Hernández, Fernández, Baptista, 2014)

El segundo diseño de esta investigación es de tipo experimental donde Hernández, Fernández y Baptista (2014), hacen referencia al diseño experimental como un estudio en el que se manipulan intencionalmente una o más variables independientes, para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre las variables dependientes, donde el investigador tiene el control la situación. Queriendo decir que las causas antecedentes se pueden manipular intencionalmente

por medio de las distintas variables, provocando efectos consecuentes bajo un ambiente de control para el investigador.

Por la razón anterior es que se involucra la extracción completa de la planta *Dysphania ambrosioides* para la obtención de los metabolitos secundarios que pueda presentar en los distintos extractos, por medio de las distintas pruebas de identificación, y de tal manera medir la capacidad antimicrobiana de estos principios activos sobre las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Klebsiella pneumoniae* con el fin de detectar si alguno de estos componentes activos tienen actividad o no contra las cepas patógenas antes mencionadas.

## Variables de la investigación

**Tabla 1. Operacionalización de variables de la investigación**

Objetivo Específico	Variable	Definición conceptual	Indicador	Instrumento
<p>Desarrollar un fraccionamiento de los componentes presentes en la planta <i>Dysphania ambrosioides</i> (Epazote), utilizando los disolventes hexano, diclorometano y acetato de etilo.</p>	<p>Fraccionamiento químico</p>	<p>Separación de los componentes que hay en una misma mezcla de distinta naturaleza, en el cual pueden ser reextraídos eliminando una proporción de las sustancias de la mezcla. (Luján,2017)</p>	<p>Medición de la concentración de sólidos totales en cada uno de los extractos, para obtener las polaridades entre el disolvente y el extracto.</p>	<p>Embudo separador mediante extracción líquido-líquido.</p>
<p>Elaborar un tamizaje fitoquímico de <i>Dysphania ambrosioides</i> con el fin de identificar la naturaleza química de los metabolitos principales que presenta la planta.</p>	<p>Tamizaje Fitoquímico</p>	<p>Permite analizar y estudiar las propiedades terapéuticas que contienen las plantas como los principios activos o metabolitos secundarios por medio de solventes apropiados (Cárdenas, 2017)</p>	<p>Comparar la coloración obtenida de las pruebas contra un patrón para evidenciar la presencia de metabolitos secundarios en los extractos de la planta.</p>	<p>Realización cuantitativa de las pruebas colorimétricas: Shinoda. Dragendorff. KOH (cumarinas). Borntrager. Kraus. Benedict. Taninos. Vainillina. Lugol. Espuma.</p>

Comprobar la actividad y sensibilidad antibacterial de los componentes activos de la planta <i>Dysphania ambrosioides</i> ante las cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Salmonella tphi</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Sthaphylococcus aureus</i> .	Actividad y sensibilidad antibacteriana	Determina que un componente químico natural o sintético tiene poder inhibitorio contra el crecimiento de los microorganismos. (Usano, Palá, Díaz, 2014)	Porcentaje de inhibición.	Placa Petri. Medio de cultivo. Bacterias <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Salmonella tphi</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Sthaphylococcus aureus</i> Incubadoras
---	---	---	---------------------------	---

Nota: Elaboración propia (2020)

### **Instrumentos, materiales y equipos usados para la realización de los extractos de *Dysphania ambrosioides***

#### **Materiales y Equipos**

- ⇒ Planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote).
- ⇒ Botella grande color ámbar.
- ⇒ Embudo separador.
- ⇒ Goteros.
- ⇒ Espátulas acanaladas.
- ⇒ Pizeta.
- ⇒ Aros metálicos.
- ⇒ Soportes universales.
- ⇒ Erlenmeyers de distintos tamaños.
- ⇒ Beakers de distintos tamaños.
- ⇒ Rota Vapor Yamato, modelo BM500.
- ⇒ Bomba Zeny, modelo VP 125.
- ⇒ Embudo Büchner.

- ⇒ Matraz Kitasato.
- ⇒ Probetas.
- ⇒ Viales.
- ⇒ Balanza granataria, marca Ballar WTB 2000g  $\pm$  0,01g.
- ⇒ Papel filtro.

## Reactivos

- ⇒ Etanol al 96%.
- ⇒ Diclorometano.
- ⇒ Acetato de etilo.
- ⇒ Hexano.
- ⇒ Éter etílico.
- ⇒ HCl al 2%.
- ⇒ Reactivo de Dragendorff.
- ⇒ Metanol.
- ⇒ Limaduras de magnesio.
- ⇒ HCl concentrado.
- ⇒ KOH 0.5 mol/L.
- ⇒ Cloroformo.
- ⇒ Anhídrido acético.
- ⇒ Ácido sulfúrico concentrado.
- ⇒ Hidróxido de amonio 25%.
- ⇒ FeCl<sub>3</sub> 1%.
- ⇒ Reactivo de Vainillina 1%.
- ⇒ Reactivo de Lugol.
- ⇒ Reactivo de Benedict.
- ⇒ NaOH al 10%.
- ⇒ Propilenglicol.
- ⇒ Mentol.

- ⇒ Sacarosa.
- ⇒ Sulfato de Sodio.
- ⇒ Agua destilada.

### Procedimiento y Recursos

La recolección de la planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote), se realizó el día 28 del mes de agosto del año 2020. La planta fue recolectada en el plantel del MOPT ubicado en Santo Domingo, Heredia, Costa Rica; se recolectó aproximadamente 1 kilogramo de la planta completa, la cual se procedió a lavarla, se escurrió y posteriormente se colocó en una bolsa grande, se selló correctamente y se almacenó en un congelador hasta su respectivo uso. De todo el material recolectado se utilizó alrededor de 121,09 g para la realización del extracto.

**Figura 23. (A) Planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote), (B) Cantidad de material vegetal para el respectivo extracto**



Nota: Elaboración propia (2020)

Se procedió previamente a sacar la planta del congelador y ponerla a descongelar, una vez seca se picó el material vegetal finamente y después se pesó 121,09 gramos de la planta *Dysphania ambrosioides*, el cual una vez pesada se introdujo en una botella grande de color ámbar; seguidamente se procedió a verter el disolvente etanol al 70%, en donde se tuvo que preparar obteniendo 650 mL de etanol al 96% mezclándolo con 271 mL de agua destilada.

Se procedió a cerrar el frasco y se colocó en un armario oscuro a temperatura ambiente durante una semana, agitándolo ocasionalmente, mínimo una vez al día, hasta cumplir la semana requerida. Seguidamente después de transcurrir la semana se procedió a filtrar la solución utilizando el embudo Büchner y el matraz Kitasato con el papel filtro de marca Fisherbrand y una bomba de vacío marca Zeny, modelo VP 125, hasta lograr separar todos los compuestos sólidos del extracto, posteriormente se colocó la solución en un Erlenmeyer de 500 mL limpio y seco.

**Figura 24. Botella color ámbar con el material en maceración y equipo para filtración al vacío del material macerado de la planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote)**



Nota: Elaboración propia (2020)

### **Concentración del extracto por destilación con presión reducida (Rotavapor)**

Se utilizó el Rotavapor de marca Yamato modelo BM500, donde se introdujo la solución obtenida después de la filtración a un matraz de 500 mL; el Rotavapor se calibró a una temperatura de 60 °C y a una velocidad del equipo de rotación a 100rpm, esto con el fin de poder eliminar el etanol que hay en exceso y que quede el concentrado del extracto crudo. Una vez que ya no destilara más cantidad de etanol se procedió a finalizar el proceso.

Se obtuvieron 150 mL del extracto crudo concentrado, el cual se dividió en dos partes: la primera parte de 50 mL se utilizaron para el tamizaje fitoquímico donde se guardó en una botella color ámbar, y los otros 100 mL se emplearon para el fraccionamiento.

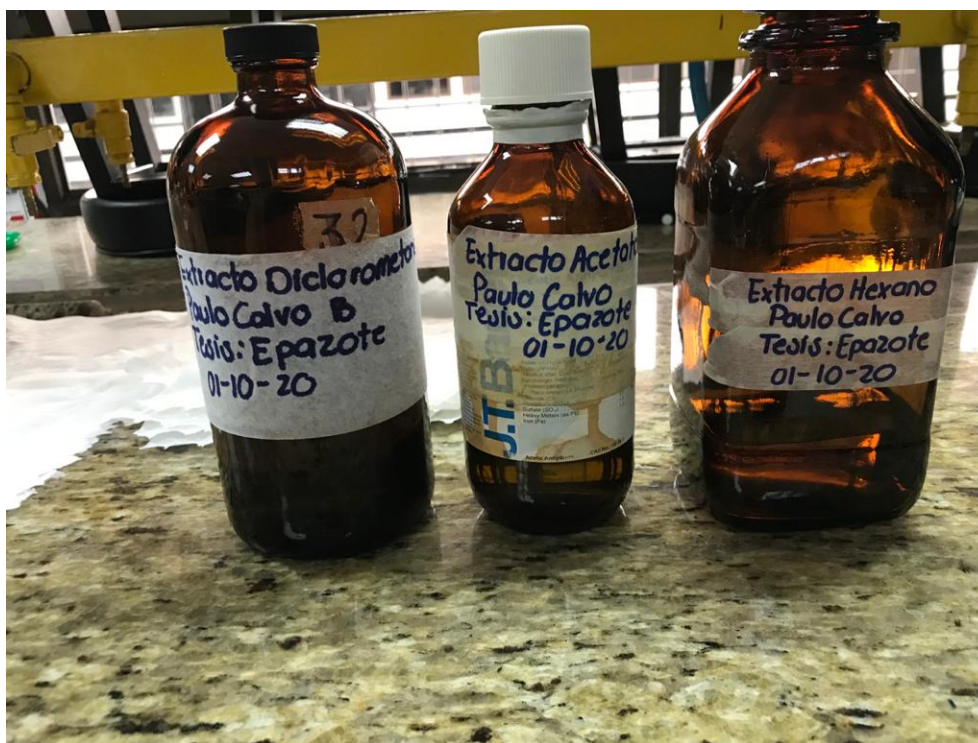
### **Fraccionamiento de los componentes de la planta *Dysphania ambrosioides***

#### **Extracción con Hexano, Diclorometano y Acetato de etilo**

1. Se tomaron 100 mL del extracto crudo concentrado y se vertió en un embudo separador, donde posteriormente se le adiciona 50 mL de hexano.
2. Se mezcló agitando el embudo levemente sin generar emulsión, y liberando poco a poco el gas de forma continua, abriendo la llave del embudo, hasta lograr equilibrar las presiones hasta que ya no saliera más gas.
3. Se colocó el embudo separador en el soporte y se retiró la tapa del embudo.
4. Se dejó reposar hasta lograr la separación de las fases; en el fondo se logra observar la parte más densa (acuosa) y la fase menos densa en la superficie (hexano).

5. Se retiró, por la llave del embudo 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 repitieron los pasos del 1 al 6, pero utilizando los disolventes de diclorometano y acetato de etilo.
8. Las fracciones se rotularon y fueron guardadas.

**Figura 25. Extractos obtenidos del fraccionamiento en sus respectivos recipientes**



Nota: Elaboración propia (2020)

### **Extracción con Éter etílico**

1. Se tomaron 50 mL del extracto crudo, se colocaron en un embudo separador y se les agregó 25 mL de éter etílico. Esto se agitó suavemente hasta liberar todo el gas que contiene el embudo, lo cual se hizo abriendo suavemente la llave del embudo.
2. Se colocó el embudo de separación en el soporte metálico, y se retiró 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, y la fase menos densa en la superficie (éter etílico).
3. Se recolectaron las dos fases en recipientes diferentes; la fase más densa (el extracto acuoso) se retiró por medio de la llave de abajo que contiene el embudo; y 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 cada extracto etéreo se le fue añadiendo sulfato de sodio anhidro, además 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 dividió en dos recipientes de volúmenes iguales, rotulados como AQ1 y AQ2.
2. Al extracto AQ2 se le añadieron 15 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 cinco 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 concentró, hasta un volumen no mayor de 30 mil.
2. Posteriormente, se realizaron diferentes pruebas de identificación de metabolitos secundarios, utilizando el extracto anteriormente concentrado.

**Figura 26. Extracto Etéreo, AQ1, AQ2, AQ2E almacenados en sus respectivos recipientes**



Nota: Elaboración propia (2020)

### Pruebas de identificación para el tamizaje fotoquímico

**Tabla 2. Pruebas a realizar por cada extracto obtenido, para llevar a cabo el tamizaje fotoquímico**

Tipo de Extracto	Extracto Etéreo	Extracto Acuoso (AQ <sub>1</sub> )	Extracto Acuoso (AQ <sub>2</sub> )	Extracto Acuoso Etéreo (AQ <sub>2</sub> E)
<b>Pruebas a realizar</b>	-Prueba de Dragendorff. -Prueba de Shinoda -Prueba de KOH (Cumarinas) -Prueba de Liberman Burchard -Prueba de Bornträger-Kraus -Prueba de Taninos -Prueba de Terpenos por medio de CCF.	-Prueba de Lugol -Prueba de Espuma -Prueba de Benedict -Prueba de Taninos -Prueba de Dragendorff	-Prueba de Bornträger	-Prueba de Dragendorff -Prueba de Shinoda -Prueba de KOH (Cumarinas) -Prueba de Liberman Burchard -Prueba de Bornträger

Nota: Elaboración Propia (2020)

### **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 Hall 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 Shinoda (Identificación de Flavonoides)**

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 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).
4. Si hay presencia de flavonoides se debe generar una coloración roja oscura (si no es alta la concentración de este metabolito puede ser un color rosa).
5. Esta prueba se repite para AQ2E.

### **Prueba de KOH (Identificación de Cumarinas)**

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 Liberman Burchard (Identificación de Triterpenos y Esteroles)**

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 Borntráger-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 AQ2, 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 (Determinación de Taninos)**

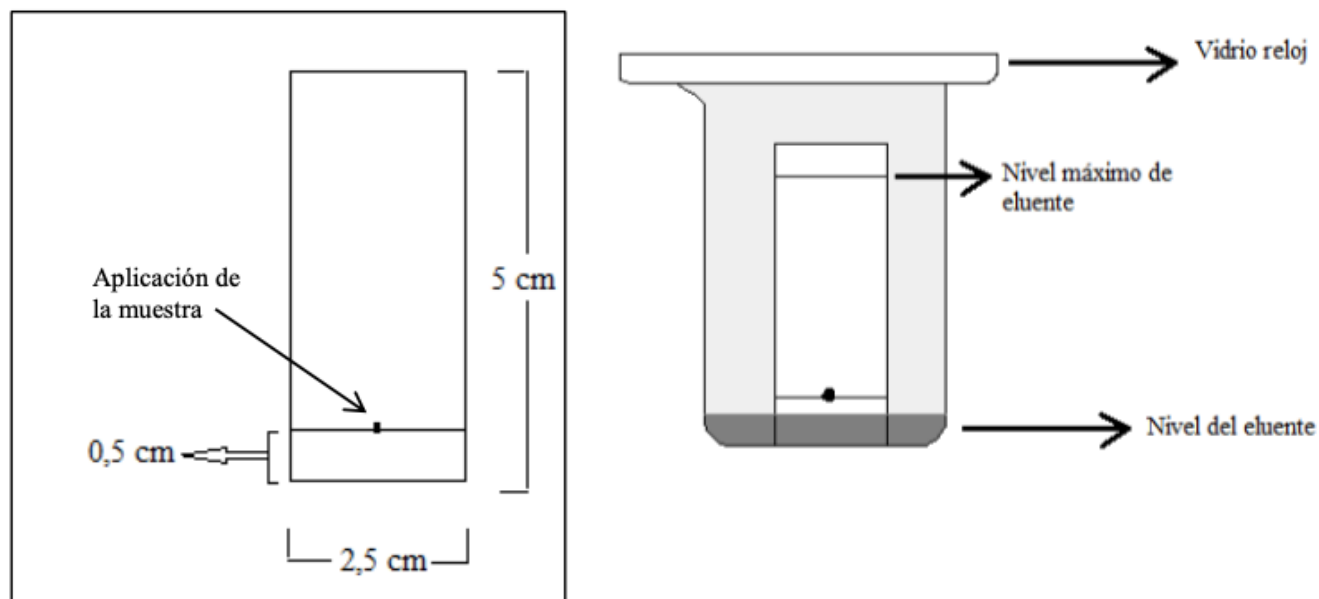
1. Se tomaron 4 mL del extracto etéreo y se colocaron en un tubo de ensayo; usando el baño María se evaporó el disolvente (éter).
2. Al residuo obtenido se le añadieron cinco gotas de cloruro de hierro III al 1%.
3. Si la prueba es positiva en este metabolito, la disolución se tornará de un color azul (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 cromatografía 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 N° 27; 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 27. 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 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.

**Prueba de Benedict (Determinación de Azúcares Reductores)**

1. Se agregaron 3 mL de AQ1 a un tubo de ensayo.
2. Se le añadieron 10 gotas del reactivo de Benedict, agitando un poco.
3. Se colocó el tubo de ensayo en un baño María y se esperó 5 minutos.
4. La prueba es positiva si hay formación de un precipitado rojo ladrillo.

**Pruebas microbiológicas para la evaluación de la capacidad antibacteriana de los diferentes extractos de la planta *Dysphania ambrosioides*.**

**Materiales y Equipo**

- ⇒ Micropipeta.
- ⇒ Puntas de micropipeta.
- ⇒ Cámara de flujo laminar.
- ⇒ Torundas estériles, marca Medline, ref MDS202000.
- ⇒ Jeringas de plástico desechables de 5 mL.
- ⇒ Filtro para jeringa, 0.22 Micron X 25mm SE-AF2501-22.
- ⇒ Incubadora.
- ⇒ Torundas estériles.
- ⇒ Viales.

### Reactivos

- ⇒ Placas de Agar estándar.
- ⇒ Cepa *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*.
- ⇒ Extracto de la planta *Dysphania ambrosioides* obtenido por hexano, diclorometano, acetato de etilo y extracto acuoso.
- ⇒ Reactivos de hexano, diclorometano, acetato de etilo.
- ⇒ Agua destilada.
- ⇒ Levofloxacino (Primeris 25mg/mL), marca de laboratorio Panalab.

Se evaluó la posible actividad antibacteriana de los diferentes extractos obtenidos a partir de la planta *Dysphania ambrosioides* (acuoso, hexano, diclorometano y acetato de etilo) frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*. Las cepas se obtuvieron del Laboratorio de Microbiología Microlabs, ubicado en Guadalupe, San José, Costa Rica, los análisis microbiológicos se desarrollaron en el mismo laboratorio, bajo la supervisión y guía del Dr. Ronald Ajún (microbiólogo). Todos los materiales, insumos y equipo fueron adquiridos en Selpro Equipos y Servicios S.A., Yire Medica HP.S.A y la Universidad Internacional de las Américas.

Se utilizaron primeramente los extractos en una concentración al 100% de primera instancia, como control positivo se utilizó Levofloxacin a una concentración de 0.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se aplicaron, como blanco los solventes utilizados para las extracciones, con el objetivo de comprobar si pudieron intervenir o no en el ensayo.

### **Concentración y dilución de los extractos de la planta *Dysphania ambrosioides***

De primera instancia los extractos que se obtuvieron y que estaban previamente guardados se sometieron a evaporación para obtener el extracto libre del disolvente, se llevaron a un volumen de 20 mL, y ese volumen madre se tomó 1 mL y se adicionó al vial a una concentración de 100%, seguidamente para obtener la segunda concentración al 50% se tomó 0.5 mL del volumen madre y se le adicionó 0.5% de del disolvente; por último para llegar a la concentración de 25% se vierte 0.25 mL de la solución madre y se le adicionó 0.75% mL del disolvente. Posterior a esto se tomó 1 mL de cada disolvente puro y de agua destilada y se adicionaron a un vial.

Antes de adicionar el volumen de 1 mL por cada vial, se debió filtrar las muestras con la utilización de jeringas y filtros de trompo, para garantizar que no fueran trazas de material de la planta. Este procedimiento también se repitió para el extracto acuoso, todas las disoluciones en sus respectivos viales fueron pesadas y rotuladas respectivamente, el extracto acuoso se guardó en refrigeración hasta que se llevara el uso del mismo en las pruebas microbiológicas.

**Figura 28. Muestras de los extractos listos en sus respectivas concentraciones (100%, 50% y 25%) y su respectivo blanco**

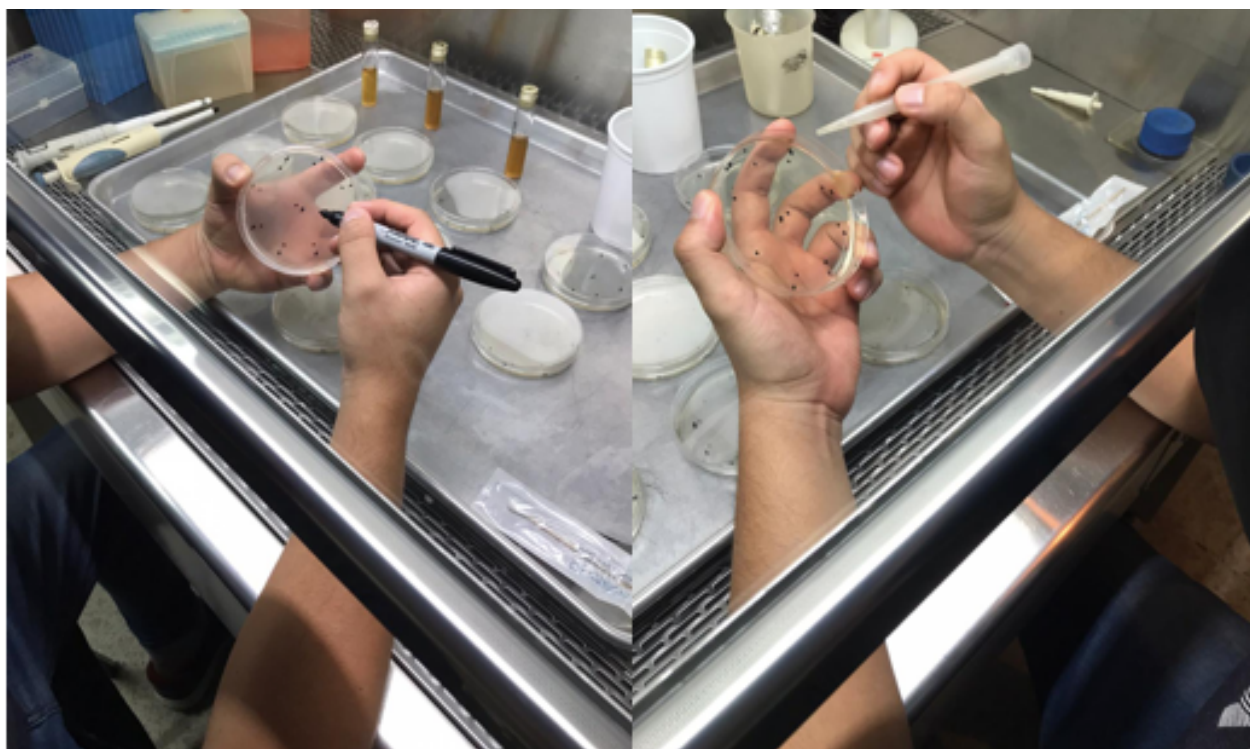


Nota: Elaboración propia (2020)

### **Cultivo de Cepas Bacterianas en Laboratorio Microlabs**

El método que se realizó en el laboratorio, fue escoger el agar estándar y realizar el método de formación de pocillos en el agar de un tamaño igual a grosor del agar de 4 mm de espesor, cada uno con un diámetro de 0.5 cm y el cual se adicionó la cantidad de 10  $\mu$ L, por cada placa se realizaron nueve pocillos, ocho pocillos para adicionar los diversos extractos y uno con una concentración del antibiótico. Posterior a esto se enumeraron los pocillos, todo esto se llevó a cabo en una cámara de flujo laminar.

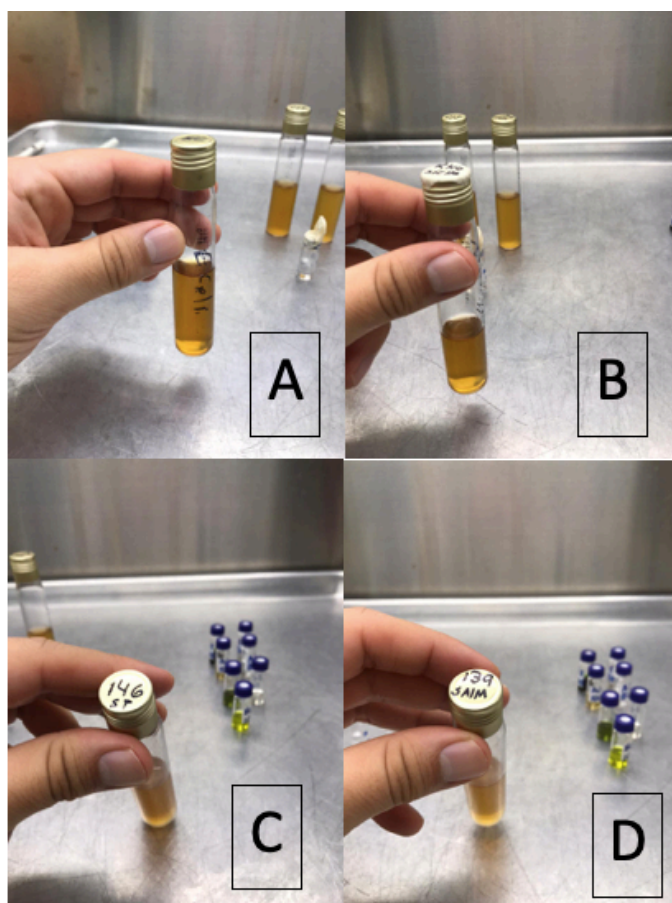
**Figura 29. Preparación del agar estándar con el método de pocillos para la realización del ensayo microbiológico**



Nota: Elaboración propia (2020)

Se tomaron las colonias aisladas de la cepa con una torunda estéril, se estandarizó la concentración de bacterias; se introdujo la torunda estéril en los tubos con las cepas, a esta se le eliminaron excesos dentro del mismo tubo presionándola contra la pared del tubo. Después de esto se procedió a realizar rayados de la cepas estandarizadas con torundas estériles en la placa de Petri que contiene el agar estándar, tomando el caldo preparado del tubo de ensayo con la punta de la torunda, con un movimiento de lado a lado, logrando así cubrir toda la placa, se realizan cuatro rayados por placa en distintas direcciones. Este procedimiento se realizó por cada cepa bacteriana *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*.

**Figura 30. (A) Cepa de *Escherichia coli*, (B) Cepa de *Klebsiella pneumoniae*, (C) Cepa de *Staphylococcus aureus*, (D) Cepa de *Salmonella typhi***



Nota: Elaboración propia (2020)

Se incubaron las placas petri por 24 horas, con una temperatura de 37 °C , finalizado el tiempo de incubación se observó el crecimiento de las bacterias en las placas, y se evaluó si los extractos tuvieron o no efecto antimicrobiano, por medio del diámetro del halo. Cuando se recolectaron todas las muestras, se determinó un promedio por cada halo de inhibición.

**Figura 31. Incubadora en el cual se incubaron las placas petri con sus respectivas bacterias a una temperatura de 37 °C**



Nota: Elaboración propia (2020)

## CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el siguiente capítulo se expondrán los resultados obtenidos durante el proceso de investigación, los cuales comprenden el orden y el desarrollo de las variables derivadas de los objetivos planteados, el cual conlleva la explicación de cómo se obtuvo el extracto de la planta *Dysphania ambrosioides*, mediante el método seleccionado con sus respectivos disolventes adecuados para su correcta elaboración y extracción, además de la identificación de sus respectivos metabolitos secundarios que tiene el Epazote a través de un tamizaje fitoquímico que por medio de varias pruebas ayuda a identificar estos metabolitos secundarios presentes en la planta, y finalmente la comprobación de los extractos obtenidos ante las cepas de interés, mediante técnicas microbiológicas para la verificación de la inhibición y sensibilidad de los extractos ante las bacterias de interés propuestas.

### **Recolección y fraccionamiento de la planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote) con su respectiva obtención del extracto**

De primera instancia se procedió con la recolección de la planta en el cual se fue más específico en aquellas que se visualizaran con el material vegetal más sano, nos referimos a que la planta no estuviera “marchita”, que las hojas no presentaran orificios, ni que los tallos estuvieran torcidos o quebrados, esto con el fin de que la planta estuviera en buenas condiciones y con los cuidados necesarios para obtener resultados confiables y seguros. Estas muestras se recolectaron en el mes de agosto del año 2020.

Una vez que se obtuvo el material vegetal deseado, antes de ser utilizado se tuvo que realizar un adecuado lavado, eliminándole las impurezas que pudieran tener la planta tanto en sus tallos, hojas, frutos y raíces. Posterior al lavado, la planta se dejó secando al aire libre y a condiciones de temperatura normal, una vez seco el material vegetal se procedió a almacenarlo en una bolsa bien sellada y someterla a congelación hasta el día de utilización de la misma para el extracto o el fraccionamiento previo a realizar.

**Figura 32. Planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote) recolectada, seleccionada, lavado y seco, para la elaboración del fraccionamiento y obtención de los extractos**



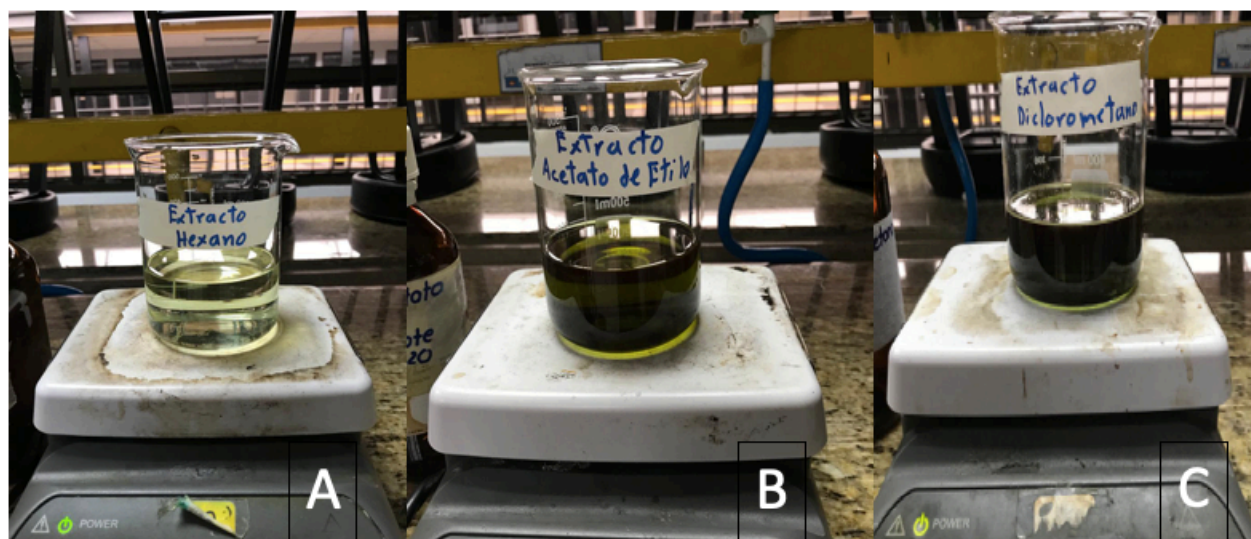
Nota: Elaboración propia (2020)

Cabe mencionar que antes de usar el material vegetal para el respectivo fraccionamiento, se tuvo que sacar de congelación y poner a secar al aire libre hasta que todas las partes de la planta que se vayan a utilizar se encuentren secas. Consecuentemente el método de extracción usado en la respectiva investigación fue maceración, el cual se trituro cuidadosamente el material y mantuvo durante una semana con Etanol al 70 % como lo referencia Alves et al (2018), donde describe que los constituyentes de la planta van a permanecer de una mejor manera. La solución va a contener componentes tanto polares como no polares que ayuden a brindar mejores resultados en el proceso de extracción de metabolitos activos.

Seguidamente, como lo menciona Niemevz (2019), para la separación del extracto de interés (solvente orgánico), del solvente etanólico se emplea el uso del Rotavapor el cual permite por medio de una rotación suave y a presión reducida, evapora el etanol y deja únicamente el medio acuoso con el material extraído, dispuesto para la extracción líquido-líquido con distintos disolventes.

Posteriormente, por medio del método de extracción líquido-líquido, el extracto crudo que se obtuvo después de estar en el Rotavapor se sometió a separación de sus componentes por medio de la mezcla con cuatro extractos en diferentes disolventes, lo que resultó en la obtención de extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo y por último el acuoso; donde se toma como referencia a Andrioli et al (2012) y aplica el mismo método para la obtención de los principales compuestos químicos en los distintos tipos de extractos.

**Figura 33. (A) Extracto de Hexano, (B) Extracto de Acetato de etilo, (C) Extracto de Diclorometano, obtenidos de la planta *Dysphania ambrosioides***



Nota: Elaboración propia (2020)

La aplicación de este tipo de técnica de separación hace que el proceso sea sencillo y eficiente en la extracción de los componentes principales que contiene el material vegetal. Seguidamente esto se emplea con el fin de que los propios disolventes cuando se le aplica su

respectivo lavado, los componentes más polares se vayan clasificando y siendo más afin a un determinado disolvente, al igual que los no polares, basándonos en Andrioli et al (2012) el cual referenciándonos en el respectivo método, en donde describe que el procedimiento es seguro y eficiente, obteniendo resultados confiables.

Una vez que se obtuvo los diferentes extractos, se diferencian a simple vista con distintas características organolépticas (Tabla 2. Se resumen estas características), en el caso del hexano su apariencia fue transparente, con un color verde claro y la consistencia es totalmente líquida, además no presenta partículas en la solución. El extracto del acetato de etilo presentó características organolépticas en su consistencia que fue totalmente líquida, con un color verde oscuro y con una apariencia transparente y sin partículas visibles en la solución.

En el extracto con diclorometano se logra observar características en su apariencia, ya que se nota con un poco de partículas en la solución, la consistencia es líquida y con un color totalmente verde oscuro intenso, por último el extracto acuoso se nota una apariencia transparente, con un color amarillo claro y con una consistencia totalmente líquida y libre de partículas en su solución.

**Tabla 3. Características organolépticas y cantidad obtenida de los extractos obtenidos a partir del fraccionamiento de la planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote).**

<b>Extractos</b>	<b>Características Organolépticas</b>	<b>Volumen (mL)</b>
<b>Hexano</b>	<b>Color:</b> Verde Claro <b>Apariencia:</b> Transparente <b>Consistencia:</b> Líquida	175 mL
<b>Acetato de Etilo</b>	<b>Color:</b> Verde oscuro <b>Apariencia:</b> Transparente <b>Consistencia:</b> Líquida	183 mL
<b>Diclorometano</b>	<b>Color:</b> Verde oscuro intenso <b>Apariencia:</b> Transparente	150 mL

	<b>Consistencia:</b> Líquida con partículas visibles	
<b>Acuoso</b>	<b>Color:</b> Amarillo claro <b>Apariencia:</b> Transparente <b>Consistencia:</b> Líquida	129 mL

Nota: Elaboración propia (2020)

Seguidamente tras la obtención de los extractos con sus respectivos volúmenes, se procede a determinar la cantidad de sólidos disueltos en los extractos y la obtención de la concentración de cada extracto. Se tabularon (tabla 3.) las masas de los viales vacíos y con tapa, posteriormente añadido el mililitro en el vial de cada extracto obtenido se procede a volver a pesar los viales, por diferencia se obtiene los miligramos (mg) de sólidos; para obtener estos miligramos se divide el volumen que se adicionó (1 mL) por vial y se obtiene la concentración de cada extracto, donde estos extractos se utilizaran para el ensayo microbiológico.

**Tabla 4. Masas del extracto obtenido a partir de la eliminación de disolvente de 1 mL de muestra colocada en un vial**

<b>Extracto</b>	<b>Muestra</b>	<b>Masa de los viales vacíos con tapa (g)</b>	<b>Masa de los viales más sólidos disueltos con tapa (g)</b>	<b>Masa obtenida de la diferencia de pesos (g)</b>	<b>Concentración (mg/mL)</b>
<b>Hexano</b>	<b>Concentrado</b>	2,8220	3,8823	1,0603	1060,3
<b>Acetato de Etilo</b>	<b>Concentrado</b>	2,7440	3,6542	0,9102	910,2
<b>Diclorometano</b>	<b>Concentrado</b>	2,3402	3,9900	1,6498	1649,8
<b>Acuoso</b>	<b>Concentrado</b>	2,7855	3,7730	0,9875	987,5

Nota: Elaboración propia (2020)

En la tabla anterior (tabla 4), se presentan las respectivas concentraciones con las que se trabajarán en el campo microbiológico, siendo de tal forma, donde se logra observar que el extracto de mayor concentración es el diclorometano (1649 mg/mL), seguidamente el hexano con una concentración de 1060,3 mg/mL, siendo estos dos los más concentrados y consecuentemente el extracto acuoso con una concentración de 987,5 y el acetato de etilo con 910,2 mg/mL.

**Caracterización fitoquímica de la planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote), por medio del tamizaje fitoquímico para la identificación de los metabolitos presentes en su conformación y estructura.**

Para la identificación de los compuestos químicos o metabolitos secundarios que presenta la planta *Dysphania ambrosioides*, se lleva a cabo por medio del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico, en el cual por medio de pruebas específicas se analizó la presencia de: alcaloides, flavonoides, cumarinas, triterpenos, antraquinonas, taninos, triterpenos, almidón, saponinas y azúcares reductores. Por medio de los procedimientos descritos se analizaron los extractos: etéreos, acuosos (AQ<sub>1</sub> y AQ<sub>2</sub>) y a partir del AQ<sub>2</sub> se fraccionó para obtener el AQ<sub>2</sub>E y el AQ<sub>2</sub>.

Seguidamente, para los resultados que se obtienen de las pruebas que se le realiza a cada extracto analizado (Tabla 4), se describen de la siguiente manera: Muy positivo (+++); Positivo (++); Levemente Positivo (+); Negativo (-). De acuerdo con los resultados obtenidos y con base en observaciones realizadas, tanto como coloración, precipitados e interacciones que se produjeron, se clasificará según la simbología antes descrita para su mejor entendimiento; basándonos en la descripción de las pruebas y respectivos resultados del Manual de Laboratorio de Farmacognosia de Alpízar (2018).

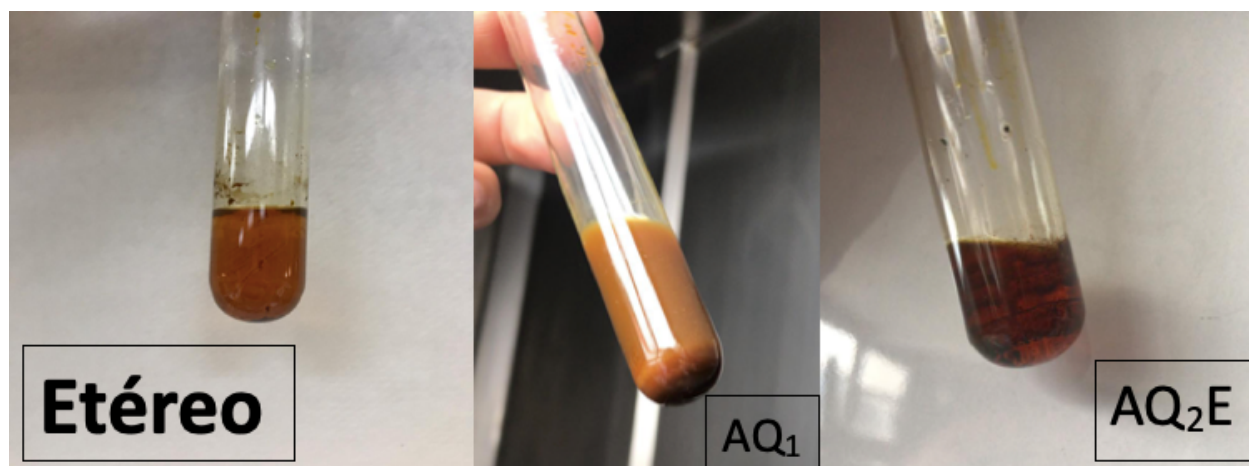
**Tabla 5. Resultados obtenidos del tamizaje fitoquímico realizados a los diversos extractos de la planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote)**

<b>Prueba</b>	<b>Identificación</b>	<b>Resultado de presencia positiva</b>	<b>Extracto analizado</b>	<b>Resultado</b>
<b>Dragendorff</b>	Alcaloides	Precipitado Naranja	Etéreo	(-)
			AQ <sub>1</sub>	(+++)
			AQ <sub>2</sub> E	(-)
<b>Shinoda</b>	Flavonoides	Coloración rojo, rosado o rojo oscuro	Etéreo	(-)
			AQ <sub>2</sub> E	(+++)
<b>KOH</b>	Cumarinas	Coloración verde alrededor	Etéreo	(+)
			AQ <sub>2</sub> E	(+++)
<b>Liberman Burchard</b>	Triterpenos	Coloración rojo marrón o verde esmeralda	Etéreo	(+)
			AQ <sub>2</sub> E	(+)
<b>Bornträger-Kraus</b>	Antraquinonas	Coloración rojo oscuro	Etéreo	(-)
			AQ <sub>2</sub>	(-)
			AQ <sub>2</sub> E	(-)
<b>Taninos</b>	Taninos	Coloración verde o coloración azul	Etéreo	(+++)
			AQ <sub>1</sub>	(-)
<b>Cromatografía Capa Fina (TLC)</b>	Terpenos	Manchas verdes, azules o moradas	Etéreo	(+++)
<b>Lugol</b>	Almidón	Coloración Azul	AQ <sub>1</sub>	(-)
<b>Espuma</b>	Saponinas	Presencia de Espuma	AQ <sub>1</sub>	(-)
<b>Benedict</b>	Azúcares Reductores	Precipitado rojo ladrillo	AQ <sub>1</sub>	(-)
<b>Muy positivo (+++); Positivo (++); Levemente Positivo (+); Negativo (-)</b>				

Nota: Elaboración propia (2020).

## Identificación de Alcaloides

**Figura 34. Determinación de Alcaloides por medio de la prueba de Dragendorff en el extracto etéreo, AQ1 y AQ2E**



Nota: Elaboración propia (2020)

Como se refleja en la tabla 4, se realizó para los extractos etéreos, AQ<sub>1</sub> y AQ<sub>2</sub>E la prueba de Dragendorff, dicha prueba ayudó a determinar la presencia de los metabolitos secundarios como lo es los alcaloides, dicho lo anterior, en la misma tabla y en la figura 34 se describe y se logra observar que para el extracto etéreo la prueba que se aplicó muestra un resultado negativo (-), de igual manera para el extracto AQ<sub>2</sub>E al aplicarle la respectiva prueba se puede observar que el resultado es negativo (-). Seguidamente al observar la prueba de Dragendorff que se le realizó al extracto AQ<sub>1</sub> se nota bien la formación de un precipitado en el fondo del tubo de ensayo y una turbidez de color naranja, dándonos como resultado muy positivo (+++) la identificación de alcaloides para el respectivo extracto.

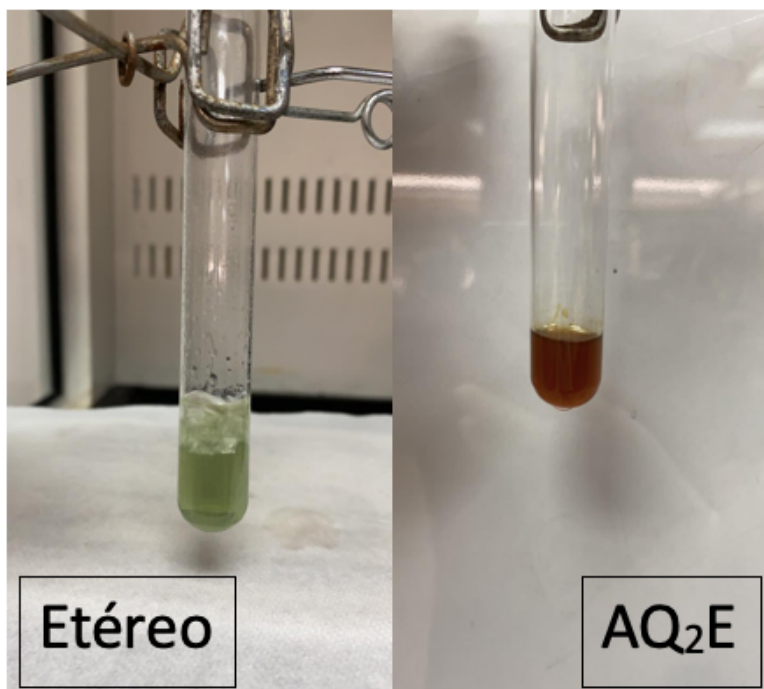
Consecuentemente, se determinó que el extracto etéreo y el AQ<sub>2</sub>E son negativos por la simple visualización que se puede denotar en comparación con el AQ<sub>1</sub>, se establece que los extractos negativos no dan el resultado correcto ya que a pesar de que tornan a un color rojo, no forman una turbidez que identifique que ese color rojo ladrillo sea positivo para alcaloides; basándonos en lo que dice los autores Hernández y Morataya en el 2017 describen que un extracto como el mencionado anteriormente positivo para alcaloides debe presentar una coloración

anaranjada con un pequeño precipitado o que presente un grado de turbidez y de la misma forma un rojo ladrillo.

El autor Aquino en el 2017 en su investigación que trata de ver la actividad antibacterial de *Dysphania ambrosioides* en conjunto de otras plantas y bacterias gram negativas, hace referencia que el extracto que se obtuvo de la planta Epazote dio positivo de la misma forma antes descrita y con el mismo método utilizando el reactivo de Dragendorff para su identificación. También Yáñez en el 2014, describe que los alcaloides tienen una actividad biológica y farmacológica muy amplia en donde ayuda a inhibir microorganismos como lo es a las bacterias por medio de un mecanismo de acción que se le confiere a los alcaloides, atacando a las bacterias mediante una intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo bacteriano.

### Identificación de Flavonoides

**Figura 35. Prueba de Shinoda para la identificación de flavonoides en el extracto etéreo y AQ2E**



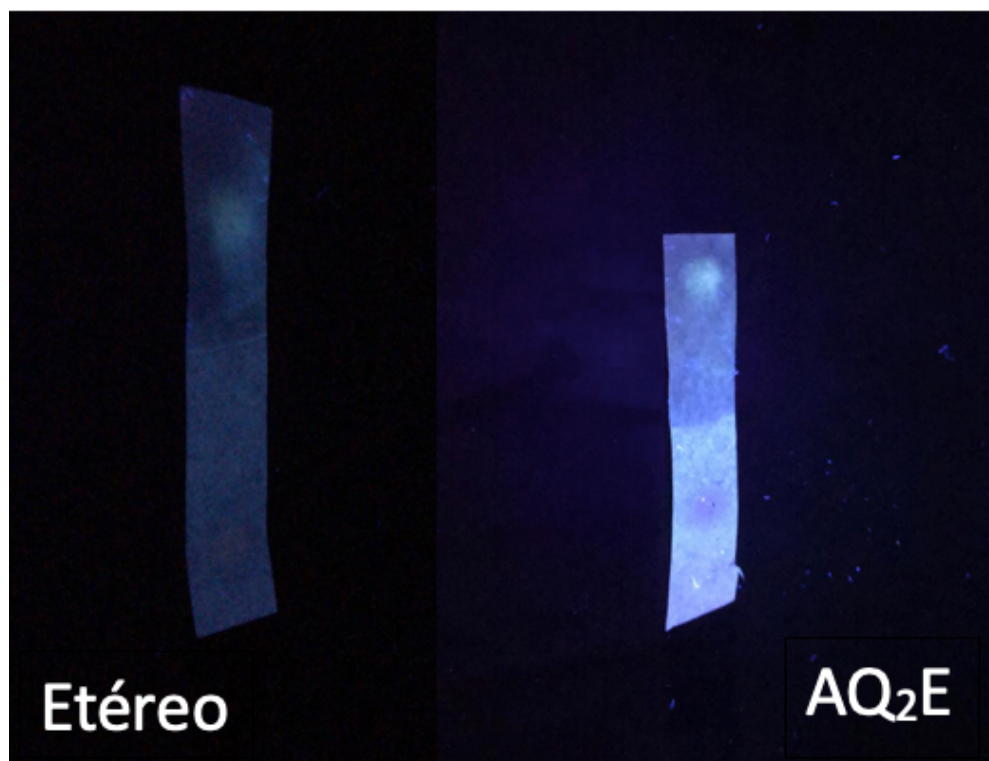
Nota: Elaboración propia (2020)

Para la identificación de flavonoides se le aplicó la prueba de Shinoda para el extracto etéreo y para el extracto AQ<sub>2</sub>E, en donde según lo tabulado en la tabla 4 y lo observado en la imagen izquierda de la figura 35 el resultado torno de manera negativa (-) para el extracto etéreo, posterior a la visualización del respectivo extracto, se procedió a observar el resultado del extracto AQ<sub>2</sub>E que se encuentra de en la misma imagen (figura 35) del lado derecho, presentándonos un resultado muy positivo (+++) en la identificación de flavonoides del respectivo extracto en la planta Epazote.

Se tomó en cuenta para determinar el resultado negativo del extracto etéreo que la coloración correcta al aplicar todo el método correspondiente a la prueba de Shinoda es de color rojo según lo describe Hernández y Morataya (2017), se observa que para el respectivo extracto no se obtuvo la coloración deseada o indicada, dando así la referencia del resultado negativo; caso contrario para para el extracto AQ<sub>2</sub>E que al aplicarle la prueba su tonalidad del extracto inicial era de una coloración verdusca y a la hora de aplicar correctamente los pasos para identificación de flavonoides, torna a una tonalidad rojiza que era el resultado indicativo para probar que si habían metabolitos secundarios como los flavonoides presentes en el respectivo extracto vegetal de la planta *Dysphania ambrosioides*.

Cabe mencionar que la presencia de flavonoides es un punto importante ya que en el mundo vegetal cumplen con funciones específicas como dar coloración a las flores, frutos y hojas; además, de ser agente protector contra diversos microorganismos entre ellos las bacterias. En lo descrito por el por el autor Yáñez (2014) se le confiere a los flavonoides un mecanismo de acción que actúa contra las bacterias formando complejos con las proteínas solubles, extracelulares y con las proteínas bacterianas ayudando a limitar y a inhibir el crecimiento bacteriano.

**Figura 36. Identificación positiva de Cumarinas para el extracto etéreo y el AQ<sub>2</sub>E mediante la prueba de KOH**



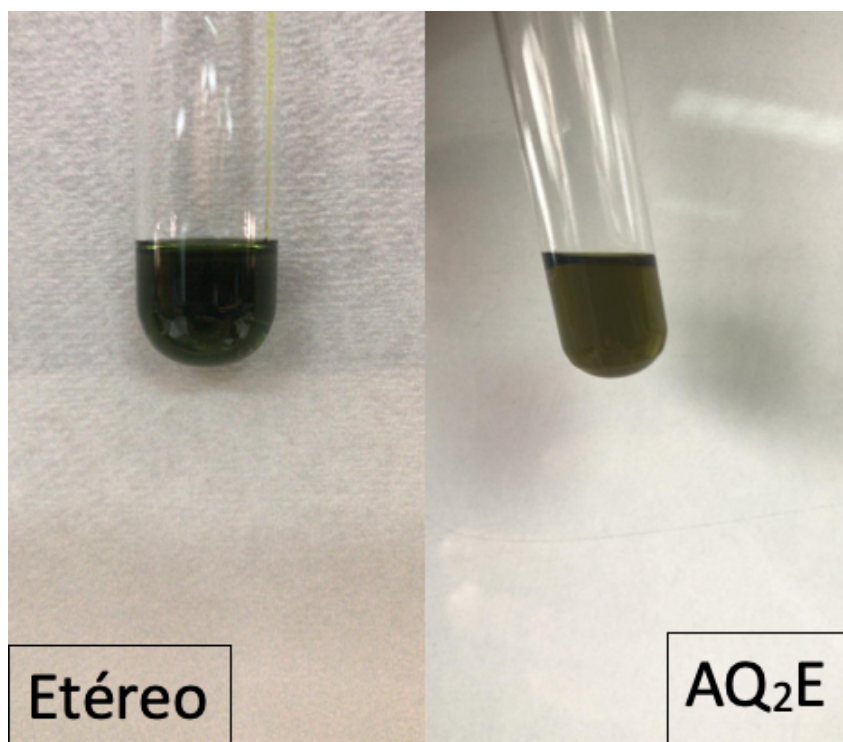
Nota: Elaboración propia (2020)

Como se visualiza en el en el extracto etéreo (figura 36) al aplicar las gotas del respectivo extracto en los extremos, dando a notar que están bien separadas, al aplicar las gotas de KOH sobre un extremo que contiene extracto de la planta, se nota en la foto de la izquierda que la parte superior se colorea levemente una tonalidad verduzca, siendo así identificando de una forma levemente positiva (+), de la misma manera se aplicó el mismo método para el extracto AQ<sub>2</sub>E donde se visualiza que al aplicar las gotas de KOH en la parte inferior del papel filtro sobre la muestra del extracto, se observa como se pone una tonalidad verde muy pronunciado alrededor de la muestra, queriendo indicarnos que la presencia de Cumarinas es muy positivo (+++).

Con base en lo indicado por Alpízar (2018), el cual describe que para la prueba de KOH indicadora de Cumarinas, debe existir la presencia de un color verde alrededor de la muestras, en el cual para el extracto etéreo se nota levemente un color verde alrededor de la muestra indicándonos que para este extracto si hay cumarinas en cantidades mínimas, por otra parte el extracto de AQ<sub>2</sub>E se confirma la gran presencia de Cumarinas dándose a notar con gran relevancia el color deseado (verde) alrededor de la muestra. De ante mano, se ratifica, ya que el autor Aquino (2017) identifica la presencia de cumarinas para la respectiva planta en estudio (Epazote).

## Prueba de Liberman Burchard

**Figura 37. Identificación de Triterpenos mediante la prueba de Liberman Burchard para el extracto etéreo y AQ<sub>2</sub>E**



Nota: Elaboración propia (2020)

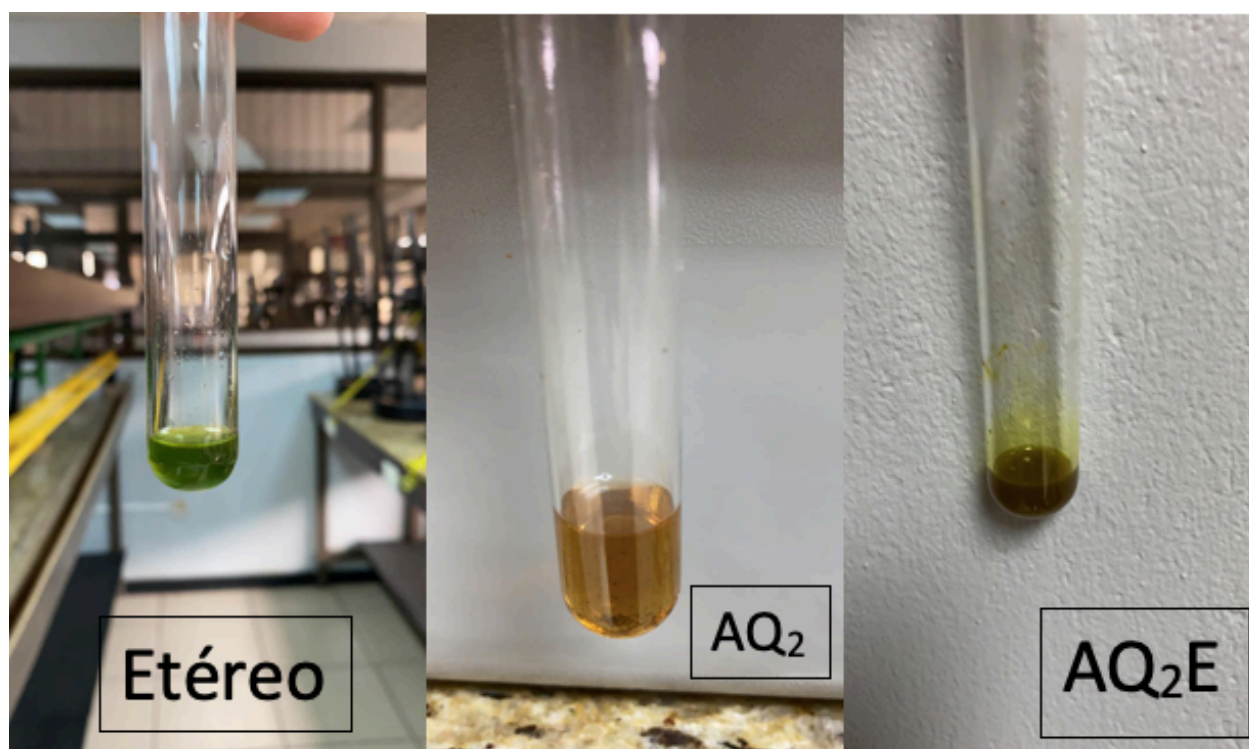
Para la identificación de Triterpenos se utilizó la prueba de Liberman Burchard en la cual para detectar la presencia de Triterpenos en los respectivos extractos de la planta Epazote, debe tornar una coloración rojo-marrón o una tonalidad verde-esmeralda, esto basándonos en Alpízar (2018); consecuentemente como se encuentra tabulado en la tabla 4 el extracto etéreo dio resultado levemente positivo (+) como se logra visualizar en la figura 37. De igual manera para el extracto AQ<sub>2</sub>E el resultado que se pudo observar fue la presencia leve de triterpenos, dándonos un resultado levemente positivo (+).

Se basó en la publicación del autor Gutiérrez (2017) donde el mismo describe que la prueba de Liberman Burchard a la hora de reaccionar con el extracto puede llegar a tornar una coloración verde-oscura (como se nota en la figura 37), dándonos a entender que los resultados para los

respectivos extractos son positivos. Seguidamente el mismo autor describe en su estudio que le hizo a la planta *Dysphania ambrosioides* la presencia de triterpenos en las plantas por el mismo método de extracción, dando como resultado al aplicar la prueba de Liberman Burchard a uno de sus extractos etanólicos una coloración verde -oscura.

### Prueba de Bornträger-Kraus

**Figura 38. Resultado negativo (-) para el extracto etéreo, AQ2 Y AQ2E ante el reactivo de Bornträger-Kraus**



Nota: Elaboración propia (2020)

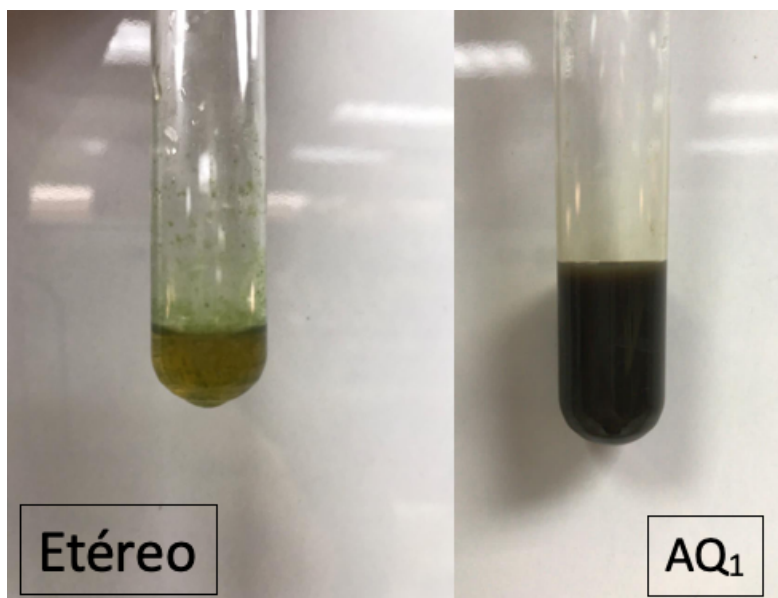
Se obtuvo el resultado del extracto etéreo el cual se observa que la coloración presente en el tubo de ensayo con el respectivo extracto y la prueba aplicada dan una coloración verde muy pronunciada, el resultado es negativo (-), de igual manera para el extracto AQ<sub>1</sub> al aplicar la prueba se nota que el cambio de color no fue el esperado y se tornó a un color café claro, en el cual se llega a decir que para este extracto antes mencionado el resultado es negativo (-), para el extracto AQ<sub>2</sub>E

también el resultado que se logra observar en la figura 38, es negativo (-) ya que aunque se tornó de un color oscuro parecido al rojo oscuro que se busca en dicha prueba, se considera negativo, por la tonalidad del resultado tira a un café oscuro.

Para la determinación de si había o no presencia de Antraquinonas se basó en lo que dice Alpízar (2018), que al aplicar la prueba de Bornträger-Kraus los respectivos extractos tienden a una tonalidad roja-oscura, va a ser indicativo positivo para metabolitos secundarios como las Antraquinonas. Además, en otros estudios realizados por Hernández y Morataya en el 2017, describen haber hecho una prueba distinta, utilizando una cromatografía de capa fina con un indicador de hidróxido de potasio al 5% y los respectivos extractos etanólicos de la planta *Dysphania ambrosioides*, obteniendo un resultado negativo (-) para antraquinonas, visualizando en la placa como los extractos al correr la capa fina no les tornó el color deseado indicativo, que era un rosado intenso.

### Prueba de Taninos

**Figura 39. Prueba de identificación de Taninos para el extracto etéreo y AQ1.**



Nota: Elaboración propia (2020)

Para la identificación de Taninos como se observa en la figura 39, el extracto etéreo da una tonalidad de color verde en el cual a la hora de aplicar correctamente la prueba de taninos da un resultado muy positivo (+++), indicando la presencia de Taninos en el respectivo extracto,

seguidamente, en la misma figura (39) se analiza el extracto AQ<sub>1</sub> con la misma prueba, la cual al observarse la tonalidad en el tubo de ensayo de un color muy oscuro tirando a casi negro, se define que el extracto antes mencionado no es positivo para la prueba de identificación de Taninos.

Seguidamente, se analizó el porqué el extracto etéreo es positivo para la prueba de Taninos, esto confiere a que al aplicar el reactivo el extracto debe tornar una tonalidad de color verde o color azul, por lo tanto al tornar un color verde quiere decir que hay presencia de Taninos y además son taninos catéquicos, donde según lo describe la prueba realizada al tornar este característico color es que se encuentran este tipo de taninos. (Alpizar, 2018). Además, los autores Hernández y Morataya (2017), hacen referencia a que la realización de la prueba de taninos a los extractos hidroalcoholicos presentan una coloración de tonalidad verdusca, la cual confieren a un resultado positivo de la presencia de estos metabolitos secundarios en la planta Epazote.

El autor Yáñez en el 2014 describe que los taninos normalmente se encuentran en las raíces de las plantas, hojas y en la corteza; además que a este metabolito secundario se le atribuye un efecto antimicrobiano por lo que respecta, provocando un mecanismo de defensa contra las bacterias al defenderse de infecciones provocadas por las mismas y además que los propios taninos actúan provocando la desnaturalización de las proteínas de las bacterias, siendo de tal forma un posible ayudante para inhibir la potencia de la bacteria.

### **Cromatografía de Capa Fina (TLC)**

#### **Figura 40. Cromatografía de Capa Fina (TLC) para la identificación de Terpenos presente en el extracto etéreo**



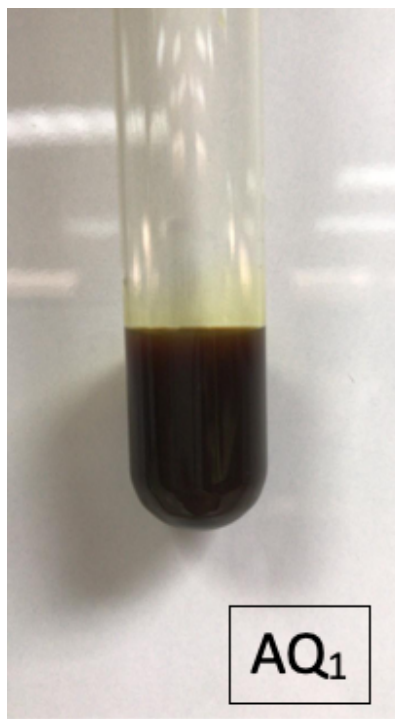
Nota: Elaboración propia (2020)

Puede emplearse la Cromatografía de Capa Fina para la búsqueda de los metabolitos secundarios tipo Terpenos, se puede lograr a través de este método en donde la identificación de terpenos esto se da por medio del reactivo de vainillina que es el que logra identificar si hay o no hay ese tipo de metabolitos, en el cual se utiliza una plantilla calentadora a una temperatura muy baja, esto conforme se vaya calentando despacio y a temperaturas bajas va a ir corriendo el extracto etéreo y al final del proceso se debe observar una coloración azulada, morada o roja basándonos en el procedimiento descrito por el autor Alpízar (2018).

El resultado del extracto es totalmente positivo en donde se nota en la figura 40, el extracto logra correr casi que toda la placa y se pronuncia con una coloración morada moderada, en el cual sí se confirma la presencia de terpenos en el extracto etéreo de la respectiva planta en estudio. Apoyándonos en lo que dice Aquino (2017), confirmando que por medio de la presente prueba el resultado da positivo si se torna una coloración azulada, morada o roja. También Cuesta y Mogrovejo (2020), mencionan que los terpenos son metabolitos que se caracterizan por ser insolubles en agua, por tal motivo se da un razonamiento lógico que la presencia de dichos metabolitos opte por presentarse en los extractos etéreos con una mayor afinidad.

### **Prueba de Lugol**

**Figura 41. Indicación negativa para el extracto AQ1 mediante la prueba de Lugol para detectar almidón presente en la planta *Dysphania ambrosioides***

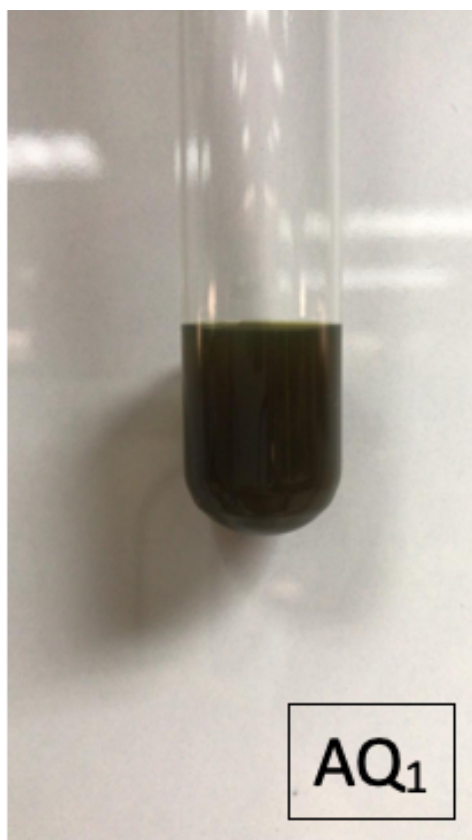


Nota: Elaboración propia (2020)

Para la identificación de almidón en la planta del Epazote, se opta por utilizar la prueba de Lugol en la cual al verter el reactivo en el extracto deseado va a tornar una coloración azulada indicando la presencia de almidón en el respectivo extracto. Como se observa en la figura 41 el extracto al cual se le realizó la prueba, el resultado final es negativo (-) ya que no hubo presencia del color azul como se observa en el tubo de ensayo, sin embargo esa tonalidad oscura que presenta se debe a la utilización del reactivo el cual es de color anaranjado.

### **Prueba de Espuma**

**Figura 42. Prueba de Espuma aplicada en el extracto AQ1 para la identificación de Saponinas presente en la planta Epazote**

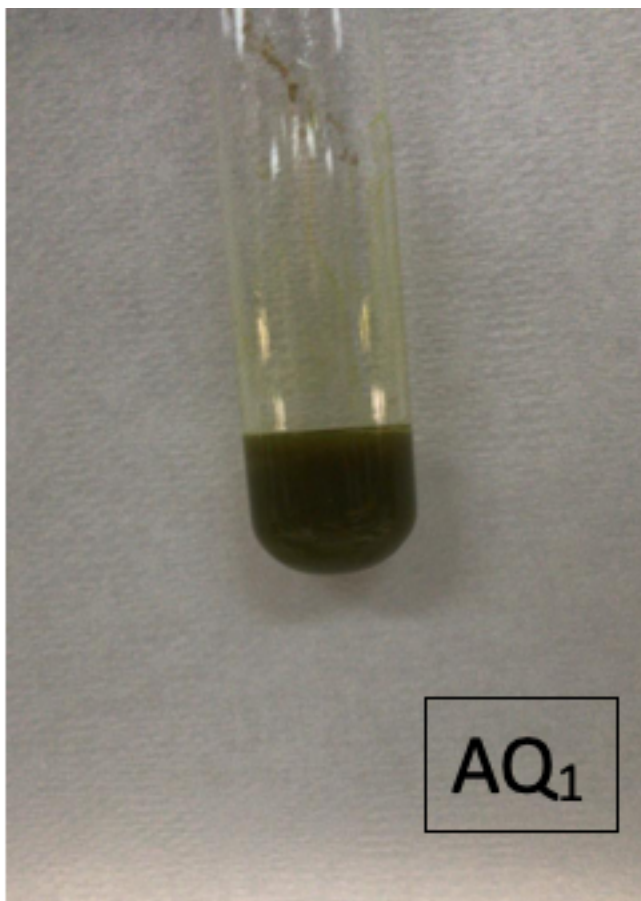


Nota: Elaboración propia (2020)

Para la identificación de saponinas en el extracto AQ<sub>1</sub> se utilizó la prueba de espuma en el cual se empleó solamente el mismo extracto que consistía en agitar fuertemente, la presencia de saponinas en el AQ<sub>1</sub> como se muestra en la figura 42, dio totalmente negativa (-) no se observa una presencia de espuma durante un periodo de 20 minutos que fueron los que se dejó reposar el tubo de ensayo una vez realizado la agitación. Basándonos en el estudio realizado por Gutiérrez (2017) sobre los extractos obtenidos de la planta *Dysphania ambrosioides* y al aplicar la prueba de espuma para la determinación de saponinas, resulta de igual manera negativo sin presencia de una sola espuma en su respectiva prueba.

### **Prueba de Benedict**

**Figura 43. Aplicación de la prueba de Benedict para la identificación de azúcares reductores para el extracto AQ1**



Nota: Elaboración propia (2020)

Como se visualiza en la figura 43, la presencia de azúcares reductores en el extracto empleado (AQ<sub>1</sub>) no se demuestra, ya que para la detección de estos compuestos a la hora de verter el reactivo de Benedict en la solución del extracto AQ<sub>1</sub> no se concibe el color rojo ladrillo deseado con lo que se está representando en la imagen. Consecuentemente se llega a decir que la presencia de azúcares reductores es negativa (-).

Mediante el amplio análisis que se elaboró a cada extracto obtenido de la planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote) para la determinación de sus metabolitos secundarios se presentará un resumen (Tabla 5) de estos compuestos químicos encontrados en la respectiva planta, como resultado del tamizaje fitoquímico realizado anteriormente.

**Tabla 6. Resumen de los metabolitos secundarios presentes en la planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote) mediante el tamizaje fitoquímico empleado al extracto etéreo, AQ1, AQ2 y AQ2E**

<b>Planta <i>Dysphania ambrosioides</i> (Epazote)</b>	<b>Metabolitos secundarios presentes en el Epazote.</b>
	Alcaloides
	Flavonoides
	Cumarinas
	Triterpenos
	Taninos
	Terpenos

Nota: Elaboración propia (2020)

Dentro de los metabolitos secundarios importantes encontrados en el tamizaje fitoquímico que se le realizó a la planta destacan los Flavonoides, Taninos, Triterpenos, Terpenos; que como bien lo destaca Fallas y Vásquez (2016), en su estudio de identificación de compuestos bioactivos de la planta Epazote, destacan que en los extractos hidroalcohólicos realizados en las hojas y frutos lograron identificar en sus extractos metabolitos secundarios como los antes ya mencionados, confirmando así que esta planta si se le confieren estos estos metabolitos.

Además, en otro estudio realizado por Flores en el 2015, el tamizaje fitoquímico que le realizó a las hojas del Epazote para observar efectos espasmódicos en *cabia porcellus*, determinó que la planta contiene en gran proporción alcaloides, triterpenos, flavonoides, cumarinas y taninos, esto por medio de extractos hidroalcohólicos; coincidiendo estos datos con el tamizaje realizado anteriormente, dando positivo para los mismos metabolitos secundarios.

**Deducciones finales de las pruebas microbiológicas, evaluando la actividad antibacteriana de los extractos de la planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote) ante las cepas *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.**

Posterior a la caracterización química de los extractos obtenidos de la planta *Dysphania ambrosioides* (Epazote), se procedió a realizar los ensayos microbiológicos con cada uno de los extractos obtenidos de la planta de interés, se efectuó la comprobación en las cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

El proceso que se llevó a cabo para determinar dicha actividad de las bacterias ya antes mencionadas, se realizó en el Laboratorio Microlabs, bajo la supervisión del especializado microbiólogo el Dr. Roldan Ajún, se utilizó extractos de Hexano, diclorometano, acetato de etilo y el respectivo acuoso, todos a una concentración del 100% con su respectivo blanco. Además, como control positivo para generar una comparación de la sustancia utilizada (extractos) y el antibiótico con efecto conocido y que es de amplio espectro para bacterias gram negativo y gram positivo se utilizó Levofloxacino a una concentración 0.50 µg/mL. También, cada cepa que se adquirió en Microlabs se incubó por un tiempo de 24 horas.

Para la realización de estos ensayos microbiológicos se procedió a hacer pocillos y posteriormente identificarlos para facilitar su lectura y evitar posibles confusiones entre los extractos a aplicar una vez realizado las pruebas, a continuación, se expondrán los respectivos resultados.

**Resultados obtenidos en la actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*.**

**Figura 44. Prueba de sensibilidad antimicrobiana frente a la cepa de *Escherichia coli***



Nota: Elaboración propia (2020)

**Tabla 7. Resultados obtenidos de los extractos aplicados y el control positivo frente a la bacteria *Escherichia coli***

Pocillo	Extracto	Halo de Inhibición (mm)
1	Hexano 100%	0
2	Blanco de Hexano	0
3	Diclorometano 100%	0
4	Blanco Diclorometano	0
5	Acetato de Etilo 100%	1
6	Blanco de Acetato de Etilo	0
7	Extracto Acuoso 100%	10

8	Blanco del Extracto Acuoso	0
9	Levofloxacino	35

Nota: Elaboración propia (2020)

Como se puede visualizar en la figura 44 la bacteria *Escherichia coli* previamente incubada en un medio de agar estándar, se evidencia que en el pocillo 5 perteneciente al extracto de Acetato de etilo con una concentración al 100 %, presenta un halo de inhibición de 1mm; para el pocillo número 7 que corresponde al extracto Acuoso con una concentración del 100% presenta un halo de inhibición de 10 mm, también se probaron los blancos de cada uno de los extractos que presentaron una actividad antibacteriana (Extractos de Acetato de etilo y Acuoso) en la cual al no reaccionar contra la cepa de *Escherichia coli* indica que no hubo interferencia del reactivo y que estos extractos que presentaron un halo de inhibición presentan un grado de actividad contra la cepa antes mencionada.

Consecuentemente, se llegó a analizar el pocillo número 9 donde se vertió el control positivo (Levofloxacino), dando un resultado totalmente positivo en el cual el halo de inhibición ante la bacteria fue de 35 mm, de tal manera nos podemos basar en el rango de la tabla 7, donde los datos fueron proporcionados por Picazo en el 2013, tras analizar el rango de concentración mínima inhibitoria en el medicamento Levofloxacino ante la sensibilidad que tiene sobre *Escherichia coli*, se estableció que para esta bacteria el halo de inhibición que se debe formar para ser sensible debe de ser mayor o igual a 17 mm.

Tras revisar los parámetros correspondientes tabulados en la tabla 7, se determina que para los extractos de acetato de etilo y acuoso en concentraciones al 100% formando un halo de inhibición de 1mm y 10 mm presentes con cierto grado de inhibición hacia la bacteria en estudio, se cataloga que la bacteria es resistente ante los respectivos extractos por ser menor o igual a 13 mm de lo indicado, referenciándonos del estudio que realizó Picazo (2013) donde establece este rango de resistencia.

De tal manera, para el control positivo se considera sensible ya que basándose en lo mostrado en la tabla 7 para que sea afectivo a la bacteria *Escherichia coli* el halo de inhibición

debe ser mayor o igual a 17 mm, en el cual tras la evaluación y la medición del halo en el pocillo 9 como se observa en la figura 44, el resultado es positivo con una medición de su halo de 35 mm puesto que la bacteria en estudio no presenta resistencia al medicamento.

**Tabla 8. Sensibilidad del Halo de Inhibición para las Bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con respecto al medicamento utilizado (Levofloxacino)**

Microorganismo	Resistente	Intermedio	Sensible
<i>Staphylococcus aureus</i>	$\leq 13$	14-16	$\geq 17$
<i>Escherichia coli</i>	$\leq 13$	14-16	$\geq 17$

Nota: Picazo (2013)

**Resultados obtenidos en la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*.**

**Tabla 9. Resultados obtenidos del control positivo y los extractos aplicados frente a la bacteria *Staphylococcus aureus***

Pocillo	Extracto	Halo de Inhibición (mm)
1	Hexano 100%	0
2	Blanco de Hexano	0
3	Diclorometano 100%	0
4	Blanco Diclorometano	0
5	Acetato de Etilo 100%	5
6	Blanco de Acetato de Etilo	0
7	Extracto Acuoso 100%	10
8	Blanco del Extracto Acuoso	0
9	Levofloxacino	23

Nota: Elaboración propia (2020)

**Figura 45. Prueba de sensibilidad antimicrobiana ante la cepa de *Staphylococcus aureus***



Nota: Elaboración propia (2020)

Al analizar los resultados obtenidos y al determinar la actividad contra el *Staphylococcus aureus*, se observa en la figura 45 los pocillos número 5 y 7 que conforme lo tabulado (tabla 8) para el pocillo 5 perteneciente al extracto acetato de etilo con una concentración al 100 %, logró frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* un halo de inhibición de 5 mm; posteriormente se observó el pocillo número 7 referente al extracto acuoso con un porcentaje de concentración al 100% se logra identificar un halo de inhibición más grande con un diámetro de 10 mm.

Al revisar los blancos utilizados para los respectivos extractos que mostraron cierta actividad frente a la bacteria, se logra visualizar en la tabla 8 que no mostraron actividad frente a la cepa, resultando un halo de 0 mm en su respectivo pocillo. Por lo tanto el extracto de acetato de

etilo a concentración del 100% y el extracto acuoso de igual manera a una concentración del 100 %, presentan cierta actividad antimicrobiana contra la cepa de *Staphylococcus aureus*.

Una vez que se analizaron dichos extractos, se lleva a identificar el control positivo, el cual se ubica en el pocillo 9, se logra apreciar que su halo de inhibición es bastante grande con un diámetro de 23 mm. De igual manera en comparación con los rangos de sensibilidad y resistencia, descritos por Picazo en el 2013 en el mismo estudio que había hecho para el Levofloxacino ante la bacteria de *Escherichia coli*, lo hizo para *Staphylococcus aureus*, se puede describir que el control positivo es sensible ante la cepa bacteriana por sobrepasar el rango representado (tabla 7) de 17 mm, siendo así la bacteria no presenta ningún tipo de resistencia.

Cabe mencionar que esta bacteria en los últimos años ha tomado gran relevancia por su gran resistencia vertiginosa que va desarrollando conforme pasa el tiempo (Álvarez y Ponce, 2012), se puede apreciar como el control de la cepa de *Escherichia coli* con el mismo medicamento (Levofloxacino) presenta menos resistencia que la de *Staphylococcus aureus*, comprobándolo en su diámetro del halo de inhibición reflejados en las figuras 44 y 45 correspondientemente.

Analizando el extracto de acetato de etilo y el acuoso conforme a la sensibilidad y resistencia representado en la tabla 7, el extracto de acetato de etilo con concentración al 100 %, se puede establecer que la bacteria presenta resistencia ante este extracto ya que se encuentra inferior a 13 mm, con respecto al extracto acuoso aunque se nota un halo de inhibición mayor con un diámetro de 10 mm, el microorganismo en estudio sigue siendo resistente al respectivo extracto.

Se puede establecer un grado de actividad por parte de los extractos, aunque estos no se puedan catalogar como sensibles contra la bacteria, se puede establecer que parte de esa presencia que inhibió ciertos milímetros al microorganismo, se le puede otorgar a los metabolitos secundarios antes ya estudiados (tabla 5) donde muchos de estos se les concede varios mecanismos de acción que reflejan como inhiben a las bacterias, como es el ejemplo de los flavonoides donde su mecanismo de acción para actuar ante los microorganismos es formando complejos en las proteínas solubles, extracelulares de las bacterias ayudando a limitar y a inhibir el crecimiento bacteriano. (Yáñez, 2014)

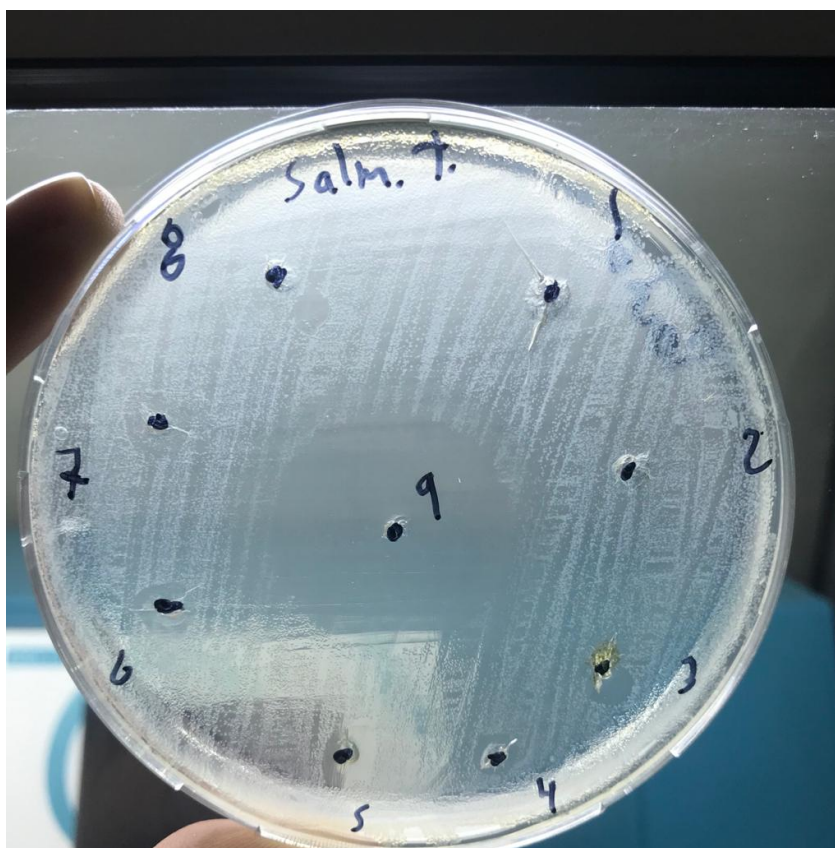
**Resultados obtenidos en la actividad antibacteriana frente a *Salmonella typhi*.**

**Tabla 10. Resultados obtenidos del control positivo y los extractos aplicados frente a la bacteria *Salmonella typhi***

<b>Pocillo</b>	<b>Extracto</b>	<b>Halo de Inhibición (mm)</b>
1	Hexano 100%	0
2	Blanco de Hexano	0
3	Diclorometano 100%	1
4	Blanco Diclorometano	0
5	Acetato de Etilo 100%	2
6	Blanco de Acetato de Etilo	0
7	Extracto Acuoso 100%	7
8	Blanco del Extracto Acuoso	0
9	Levofloxacino	30

Nota: Elaboración propia (2020)

**Figura 46. Prueba de sensibilidad antimicrobiana ante la cepa de *Salmonella typhi*.**



Nota: Elaboración propia (2020)

De igual forma por el método de pocillos se determinó los halos de inhibición que pudieran presentar los extractos aplicados ante la bacteria, de primera instancia se comprobó que el pocillo 3 presentó un halo de inhibición mínimo de 1 mm, este atribuido al extracto de diclorometano al 100%, consecuentemente el pocillo número 5 donde se aplicó el extracto de acetato de etilo al 100% presentó un halo de inhibición de 2 mm y para el pocillo número 7 donde se aplicó el extracto acuoso al 100%, su halo inhibió un diámetro de 7 mm respectivamente.

En la tabla 10, se demostró el rango de sensibilidad para la bacteria *Salmonella typhi*, donde estableció que para esta bacteria sea catalogada como sensible, el halo de inhibición debe ocasionar superioridad o igualdad a 17 mm respectivamente a lo mencionado por Sacsquispe y Velásquez (2002) al realizar un manual de procedimientos para determinar la sensibilidad de las bacterias, en el cual se comprobó en bastantes controles positivos como es el ejemplo también del Levofloxacino.

En este caso se clasificó a la bacteria *Salmonella typhi* como resistente ante los extractos aplicados, observando la tabla 10 y analizando el pocillo 3 (extracto de diclorometano al 100%) y el 5 (extracto de acetato de etilo al 100%) se catalogan dentro del rango de resistencia ya que referenciándonos de la tabla antes mencionada estar en el rango de menor o igual a 13 mm es sinónimo de resistencia ante la bacteria en estudio. Para el pocillo número 7 del extracto acuoso al 100%, al visualizar en la figura 46 y conforme al diámetro tabulado (tabla 9) de 7 mm, se cataloga resistente a la bacteria, de igual forma referenciándonos en el rango de sensibilidad visualizado en la tabla 10.

Los blancos aplicados en los respectivos pocillos antes mencionados, solo interfieren con respecto a los extractos de los pocillos número 4 (Blanco de diclorometano) y el pocillo 6 (Blanco de acetato de etilo) con halos de inhibición de 5 mm y 5 mm en el respectivo orden, esto determinando que parte de la actividad mínima que se le atribuye a estos extractos es también atribuida por los blancos antes mencionados el cual pudo haber interferido en los resultados finales. Consecuentemente a esto tampoco no es válido descartar la posible inhibición por parte de los extractos que si dieron un halo de inhibición, puesto que los metabolitos encontrados para el respectivo estudio de la planta se les confiere un alto porcentaje de inhibición frente a las bacterias. (Yáñez, 2014)

**Tabla 11. Sensibilidad del Halo de Inhibición para las bacterias *Salmonella typhi* y *Klebsiella pneumoniae* con respecto al medicamento Levofloxacino**

Microorganismo	Resistente	Intermedio	Sensible
<i>Salmonella typhi</i>	$\leq 13$	14-16	$\geq 17$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$\leq 13$	14-16	$\geq 17$

Nota: Sacsquispe, Velásquez (2002)

**Resultados obtenidos en la actividad antibacteriana frente a *Klebsiella pneumoniae*.**

**Figura 47. Prueba de sensibilidad antimicrobiana ante la cepa de *Klebsiella pneumoniae*.**



Fuente: Elaboración propia, (2020)

**Tabla 12. Resultados obtenidos del control positivo y los extractos aplicados frente a la bacteria *Klebsiella pneumoniae***

Pocillo	Extracto	Halo de Inhibición (mm)
1	Hexano 100%	5
2	Blanco de Hexano	0
3	Diclorometano 100%	0
4	Blanco Diclorometano	10
5	Acetato de Etilo 100%	7
6	Blanco de Acetato de Etilo	14
7	Blanco del Extracto Acuoso 100%	0
8	Extracto Acuoso	7

9	Levofloxacino	33
---	---------------	----

Nota: Elaboración propia, (2020)

De igual forma para esta bacteria se analizan los extractos que dieron cierto halo de inhibición en el cual se observa que en el pocillo 1 aplicado el extracto de hexano con una concentración al 100% el halo de inhibición representado levemente midió 5 mm, para el extracto de acetato de etilo al 100% expuesto en el pocillo 5 presenta un halo de inhibición de 7 mm y en el pocillo 8 que corresponde al extracto acuoso se observó un halo de inhibición de 7 mm. Todo lo descrito anteriormente se puede visualizar en la figura 47.

Para el pocillo 9 el cual se vertió el control positivo (Levofloxacino), se pudo visualizar que su halo de inhibición fue bastante efectivo pues su tamaño fue de 33 mm. Tras observar estos datos tabulados (tabla 11) se evidenció mediante los rangos de sensibilidad para la bacteria *Klebsiella pneumoniae* (tabla 10), que los extractos de los pocillos 1 (Hexano al 100%), 5 (Acetato de etilo al 100%) y 8 (Acuoso al 100%) la bacteria se presenta resistente ante los extractos aplicados, puesto que el rango para que se obtenga una sensibilidad considerable ante esta bacteria debe ser mayor o igual a 17 mm. Caso contrario para el control positivo (pocillo 9) que su halo de inhibición supera los 17 cm con una medición de 33 mm a su favor, en el cual se puede decir que la bacteria es sensible ante el Levofloxacino.

Para los pocillos 4 (Blanco de diclorometano) y 6 (Blanco de acetato de etilo) el cual se nota que hubo cierta inhibición por parte de los mismos ante la cepa *Klebsiella pneumoniae*, queriéndonos indicar que parte de la inhibición que obtuvo en este caso el extracto acetato de etilo, fue por el respectivo reactivo, pudiendo interferir en la concentración del extracto y la eficacia con la que este pudo actuar.

No obstante tampoco se le puede quitar méritos al extracto de acetato de etilo en relación con su efecto antibacterial ya que como antes se había mencionado por el autor Yáñez (2014) que los metabolitos que se identifican en un extracto vegetal pueden atribuir mecanismos de acción contra distintas cepas de bacterias, un ejemplo claro es el de los alcaloides en donde el mismo autor

menciona que se le confiere la habilidad atacar mediante intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo bacteriano, de tal forma que lo detenga o lo inhiba por completo.

Analizando los resultados de las pruebas antimicrobianas con respecto a los extractos utilizados ante las distintas cepas bacterianas, se establece que no cumple con los requisitos según la referencia que se proporcionó para las distintas bacterias, refiriéndonos a su rango de sensibilidad y resistencia, ya que ninguno de los extractos a pesar de que algunos si presentaron cierta inhibición el halo no fue suficientemente extenso para cumplir con los estándares proporcionados. A pesar de que se presentan estos resultados, se puede considerar que aumentando la concentración en la cual se hicieron los extractos, la actividad puede que incremente relativamente, consecuentemente esto no se va a poder asegurar hasta que no se demuestre nuevamente mediante más pruebas microbiológicas.

De tal manera los resultados atribuidos de la planta *Dysphania ambrosioides*, varios de los extractos como el acetato de etilo y el extracto acuoso que fueron los de mayor relevancia tras presentar un halo de inhibición ante las distintas cepas, se considera que la presencia de los metabolitos secundarios que presenta el Epazote pueden llegar a inhibir parte del aceleramiento de producción de estos microorganismos, no obstante los resultados negativos se pudieron ver afectados por el tipo de disolvente que se utilizó, la concentración en la que se aplicó, el tiempo de preparación de los respectivos extractos y en las condiciones en las que se trabajaron; además de las técnicas aplicadas en la parte microbiológica que pudieron no ser las correctas, como en los pocillos que el diámetro de los mismos fueran más grandes, al igual a las cantidades de disolución añadida a los orificios.

**Tabla 13. Extracto con mayor relevancia en la actividad antibacteriana de las cepas en estudio.**

	<b>Bacteria</b>	<b>Halo de Inhibición (mm)</b>
<b>Extracto Acuoso</b>	<i>Escherichia coli</i>	10
	<i>Staphylococcus aureus</i>	10
	<i>Salmonella Typhi</i>	7
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7

Nota: Elaboración propia, (2020)

Analizando los resultados de las cuatro bacterias en estudio, el extracto con mayor relevancia fue el acuoso, en donde se evidencia en la tabla 13 sus halos de inhibición por cada bacteria, de la misma manera se puede evidenciar de que el extracto acuoso tiene metabolitos importantes que ayudan a inhibir la proliferación de las bacterias basándonos en el estudio que realizó Fallas y Vásquez en el año 2016, en donde analizaron los componentes bioactivos de la planta epazote en donde al extracto acuoso le evidenciaron metabolitos como los flavonoides, terpenos, triterpenos y taninos. Además Almeida et al (2019), menciona que el extracto a una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$  es capaz de inhibir bacterias gram positivas como fue el caso de *Staphylococcus aureus*.

Por otra parte Hewis et al (2020) referencia a Brahim (2015), donde este expositor menciona que la bacteria *Escherichia coli* fue inhibida a una concentración de 0,31 mg/mL de su respectivo extracto acuoso, pero que para la bacteria *Klebsiella pneumoniae* el extracto se presenta poco sensible. Seguidamente, Abarca (2011), confiere actividad antimicrobiana del extracto a la bacteria *Salmonella typhi* produciendo en ella un halo de inhibición de 7 mm a una concentración de 20  $\mu\text{l/mg}$ . Finalmente el autor Almeida et al, hace referencia en su estudio que los metabolitos que presentan actividad antibacteriana pueden desintegrar las membranas citoplasmáticas, así como desestabilizar la fuerza motriz, el flujo de electrones, el transporte activo de las bacterias.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### CONCLUSIONES

Tras la finalización y la ejecución de los resultados de la presente investigación, se pueden realizar las siguientes conclusiones:

Se logró la separación del etanol del extracto vegetal de la planta *Dysphania ambrosioides* que se esperaba, obteniendo una cantidad de 150 mL del mismo, el cual fue utilizado para el fraccionamiento, en el tamizaje fitoquímico y la preparación de los distintos extractos aplicados en el procedimiento microbiológico.

Los extractos que se obtuvieron, luego del fraccionamiento con hexano, acetato de etilo y el diclorometano, fueron los correctos y deseados, donde se demostró la separación correcta de los metabolitos secundarios presentes en la planta *Dysphania ambrosioides*.

La concentración que se obtuvo del extracto del hexano fue de 1060,3 mg/mL, el de diclorometano fue de 1649,8 mg/mL, además el de acetato de etilo fue de 910,0 mg/mL y el del extracto acuoso fue de 987,5 mg/mL respectivamente.

Para el tamizaje fitoquímico realizado a la planta *Dysphania ambrosioides* los metabolitos que presentan una fuerte presencia están los Alcaloides (en el extracto AQ<sub>1</sub>) Flavonoides (en el extracto AQ<sub>2E</sub>), Cumarinas (en el extracto AQ<sub>2E</sub>), Taninos (en el extracto etéreo) y Terpenos (en el extracto etéreo).

Para el extracto etéreo y AQ<sub>2E</sub>, tras el tamizaje fitoquímico empleado se le identifica el metabolito secundario llamado Triterpeno tras aplicarle la prueba Liberman Burchard.

Para el extracto AQ<sub>1</sub> al aplicarle la prueba de Lugol, Espuma y Benedict, no presentan metabolitos secundarios de Almidón, Saponinas y Azúcares reductores en el respectivo orden.

Para los extractos etéreos, AQ<sub>2</sub>, AQ<sub>2</sub>E al aplicarle la prueba de Borträger-Kraus la planta *Dysphania ambrosioides* no reporta la presencia de Antraquinonas.

Para el extracto etéreo al aplicar la prueba de Dragendorff y Shinoda, no presenta presencia de los metabolitos de Alcaloides y Flavonoides en su orden respectivo.

El extracto AQ<sub>2</sub>E no presenta presencia del metabolito secundario de Alcaloides y para el extracto AQ<sub>1</sub> no reporta presencia de taninos.

Para el control positivo (Levofloxacin) se determinó que para una concentración de 0.50 µg/mL que fue lo que se aplicó, presentó una inhibición bacteriana efectiva ante las cepas en estudio, siendo así que para *Escherichia coli* el halo de inhibición fue de 35mm, para *Staphylococcus aureus* fue de 23mm, para *Salmonella typhi* fue de 30mm y para *Klebsiella pneumoniae* fue de 33mm respectivamente.

Para la Bacteria *Escherichia coli* el extracto de acetato de etilo (1mm) se ve evidenciado que generan cierta inhibición de la cepa bacteriana pero por datos ya escritos se dice que un halo de inhibición menor o igual de 13 mm para la bacteria *Escherichia coli*, por lo tanto el resultado que se le otorga a los respectivos extractos es que el microorganismo es resistente, de igual forma para los extractos de hexano y diclorometano que no evidenciaron un halo de inhibición.

El extracto de acetato de etilo (5mm) fue uno de los que realizaron una inhibición en la cepa de *Staphylococcus aureus*, el cual se considera que esta bacteria es resistente ante estos extractos por el motivo que su rango de sensibilidad dice que para que un halo de inhibición sea resistente tiene que ser menor o igual a 13mm, estos extractos que tuvieron una leve actividad frente a la cepa no son lo suficiente para tener una sensibilidad ante la cepa bacteriana, de igual manera para los extractos de hexano y diclorometano que no efectuaron ninguna actividad al respecto.

Para la bacteria *Salmonella typhi* los extractos de diclorometano (1mm), acetato de etilo (2mm), mostraron cierta actividad antibacteriana frente a la cepa antes mencionada, el cual se cataloga a la bacteria como resistente ante estos extractos ya que su rango según se evidencia en la literatura para que un halo tenga resistencia el valor debe ser menor o igual a 13mm, el cual así fue

respectivamente con esos extractos, de igual manera para el hexano que no presento halo de inhibición.

Los extractos de hexano (5mm), acetato de etilo (7mm) expuestos frente a la cepa bacteriana *Klebsiella pneumoniae*, presentan un grado de inhibición con una concentración al 100%, la bacteria presenta resistencia ya que su rango de sensibilidad indica que para que un halo sea resistente tiene que ser menor o igual a 13mm y los extractos antes mencionados no presentan un grado de inhibición importante, al igual que el extracto de diclorometano al no presentar halo de inhibición.

Para los extractos acuosos, su halo de inhibición en las distintas bacterias en estudio fue notable, ya que estos mismos presencia una actividad en sus metabolitos secundarios expuestos en diferentes estudios y pruebas como lo es el tamizaje fitoquímico y en evidencia con otros autores sobre su actuación ante los distintos microorganismos, por lo tanto al extracto acuoso se le puede otorgar cierta responsabilidad de inhibición y actividad antimicrobiana ante las cuatro bacterias que se mantuvieron en estudio.

## RECOMENDACIONES

Para los estudiantes que desean reproducir la investigación sería útil que empleen otro método de extracción u otro tipo de técnicas para poder comparar resultados y eficiencias.

Se recomienda para futuras investigaciones implementar el mismo método que se utilizó en esta investigación y efectuarlo en cepas distintas para ver si su grado de inhibición de los extractos es considerable sensible.

También es importante y recomendable fomentar la reproducibilidad en el proceso microbiológico, para tener distintos resultados y tener una mejor comprobación de los extractos ante las cepas en estudio.

Se recomienda tanto a futuros estudiantes y profesionales de la salud a fomentar la investigación sobre la gran variedad de plantas existentes para comprobar efectos antimicrobianos ante las cepas que se están haciendo resistentes con facilidad a los medicamentos sintéticos, en especial las plantas Arvenses en las que se encuentran gran variedad de metabolitos secundarios que podrían ayudar a contrarrestar los efectos causados por estas bacterias.

Motivar a la Universidad Internacional de las Américas para que puedan invertir en un laboratorio de microbiología con las condiciones óptimas para la realización de este tipo de estudios, ya que se considera injusto estar invirtiendo en lugares que no son propios de la universidad para la realización de este tipo de investigaciones de tesis finales.

A la Universidad Internacional de las Américas, fortalecer los laboratorios de química para que los tesis y estudiantes tengan las herramientas adecuadas como un fácil acceso a equipos requeridos para poder realizar con mayor facilidad este tipo de investigaciones.

Es recomendable fomentar más a los estudiantes a que realicen este tipo de trabajos, ya que si generan un aporte científico importante, utilizando la biodiversidad del país y bajo óptimas condiciones de trabajo.

También es recomendable la obtención de un Gases/Masas o HPLC masas para poder identificar los principales componentes de los extractos positivos y de esta manera analizar si ese compuesto tiene estudios contra las bacterias trabajadas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, J., Solorio, C., Zapata, J., Ruiz, A., Ramírez, M. (2017). Emulsión de Aceite Esencial de *Dysphania ambrosioides*. Vol. 3no. 2, Verano de la Investigación Científica.
- Almeida, J., Rodríguez, A., Audiliene, M., Rodríguez, F., Amaro, M., Pereira, A., Thassya, A., Vieiralves, K., Melo, H., De Lima, R., Bezerra, M. (2019). Chemical composition Antimicrobial, modulator and antioxidant activity of essential oil of *Dysphania ambrosioides* (L.), Mosyakin y Clemants. El Sevier. Vol. 65, p-p. 58-64.
- Álvarez, I., Ponce, J. (2012) *Staphylococcus aureus*, evolución de un viejo patógeno. Scielo. Vol. 84 (2), p-p. 383-391
- Alves, C., Jesus, R., Piana, M., Freitas, R., Brum, T., Belke, B., Mossmann, N., Cruz, R., Santos, R., Dalmolin, T., Bianchini, B., Campos, M., Bauermann, L. (2018). In vitro antimicrobial and antimycobacterial activity and HPLC-DAD screening of phenolics from *Chenopodium ambrosioides*. Scielo. Vol. 49, p-p. 296-302.
- Abarca., S., Vargas, D., Leyva, M. (2011). Analisis preliminar, actividad antioxidante y actividad antimicrobiana de plantas aromaticas del estado de guerrero. Universidad Autónoma de Guerrero. México.
- Alpizar, J. (2018). Manual de Laboratorio de Farmacognosia. Universidad Internacional de las Américas, p-p 5-40.
- Arias, M., Sandoval, N., Camargo, A., Sánchez, S. (2010). Los Microorganismos: pequeños gigantes. Redalyc. Ciencia y cultura, Vol. 17, Núm. 77. 15-23.
- Andrioli, J., Sousa, Z., Faustino, F., Oliveira, A., Mattos, L., Rossi, M., Da Silva J. (2012). Biological activities of extracts from *Chenopodium ambrosioides* Lineu and *Kielmeyera neglecta* Saddi. BioMed.
- Avello, M., Cisternas, I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. Scielo. Rev. Med. Chile; 138: 1288-1293.
- Azuero, A., Jaramillo, C., San Martin, D., D'Armas, H. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. Dialnet. Vol. 9, No 20. Pp.11-18.
- ACHIAPA, Ministerio de agricultura (2017). *Salmonella* entérica serovar *typhi* (*S. Typhi*). Versión 01, No 06, p-p. 1-7.

- Aquino, E. (2017). Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Chenopodium ambrosioides*, *Artemisia absinthium*, *Caiophora cirsiifolia* sobre bacterias gram negativas *Staphylococcus aureus* y su toxicidad en *Artesemia salina*. Tesis para optar la licenciatura en Biología. Universidad Nacional del Altiplano, Perú.
- Barreto, M., Castillo, M., Retamal, P. (2016). *Salmonella entérica*: una revisión de la trilogía agente, hospedero y ambiente, y su trascendencia en Chile. Scielo. Vol. 33 (5), p-p. 547-557.
- Barrero, L. (2016). Microbiología Clínica. Editorial Sintesis.
- Basualdo, J., Coto, C., De Torres, R. (2006). Microbiología Biomédica. Atlante S.R.L.
- Blanco, Y. (2016). El rol de las arvenses como componente en la biodiversidad de los agroecosistemas. Scielo. Vol. 37, No. 4, p-p. 34-56
- Brooks, G., Carrol, K., Morse, S., Mietzner, T. (2011). Microbiología Médica. McGraw-Hill.
- Bonilla, M., Pajares, S., Viguera, J., Sigala, J., Le Borgne, S. (2016). Manual de prácticas de microbiología básica. División de ciencias naturales e ingeniería, UAM-Cuajimalpa.
- Bustos, A. (2012). Diarreas bacterias. Mediographic. Revista de enfermedades infecciosas en Pediatría, p-p. 149-153.
- Boutkhil, S., Idrissi, M., Amechrouq, A., Chbicheb, A., Chakir, S., Badaoui, K. (2013). Chemical composition and antimicrobial activity of crude, aqueous, ethanol extracts and essential oils of *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants. Acta Bot. Gallica, 156 (2), 201-209.
- Cáceres, C. (2016). Evolución de la resistencia a antibióticos en *Staphylococcus aureus*. Tesis para optar por el grado doctoral. Universidad Complutense, España. <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MARIA%20DEL%20CARMEN%20DE%20CACERES%20VELASCO.pdf>
- Cárdenas, W. (2017). Tamizaje fitoquímico, polifenoles totales, antocianinas y capacidad antioxidante, del hongo comestible (*Auricularia aurícula*). Departamento académico de ciencia, tecnología e ingeniería de alimentos. Recuperado de: [http://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/UNAS/1270/CSW\\_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/UNAS/1270/CSW_2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Cano, A. (2013). Biotransformación de triterpenos con diferentes microorganismos. Redalyc. Vol. 2, No. 44, p-p. 7-16.

- Cañigueral, S., Dellacassa, E., Bandoni, A. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicaciones de Dependencia o Factores de Desarrollo? *Lat. Am. J. Pharm.* 22 (3): 265-78.
- Castillo, N., Mendoza, J. (2015). Manual de prácticas para el Laboratorio de Química Orgánica I. UNAM, México.
- Castillo, I. (2016). Las bacterias, estudio y cambios a lo largo de la historia. Vol. 17, Num. 5, 1607-6079.
- Carrada, T. (2007). Fiebre tifoidea: caso clínico, estudio epidemiológico, patogenia, diagnóstico y tratamiento. *Mediographic.* Vol. 23 (5), p-p. 447-457.
- Cervantes, E., García, R., Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Mediographic.* Vol. 63 (1), p-p. 28-40
- Chávez, B. (2019). Estudio potencial insecticida del epazote (*Dysphania ambrosioides*) para el control sustentable del gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) J.E. Smith. Tesis para optar por la maestría en Ingeniería ambiental. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.  
<http://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/1005/CARBSL05T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Corzo, A. (2019). Técnicas de análisis en química orgánica: Cromatografía. UNSE.
- Coy, C., Parra, J., Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (rutaceae). Obtenido de: Dialnet.
- Cuberp, M. (2015). Epidemiología molecular, factores de virulencia y caracterización de los mecanismos de resistencia de *Klebsiella pneumoniae*. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona, España.  
[https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/392721/MCG\\_TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/392721/MCG_TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Cuesta, J., Mogrovejo, V. (2020). Evaluación del método y solvente de extracción más eficientes para la obtención de metabolitos secundarios responsables de una actividad antioxidante y antibacteriana de 9 plantas medicinales en la ciudad de Cuenca-Ecuador. Tesis para optar por el grado de Bioquímico Farmaceutico. Universidad de Cuenca, Ecuador.

- Delgado, P. (2019). Infecciones Urinarias. Pubmed. P-p. 1-24
- Djordjević, Z., Folić, M., Ninković, V., Vasiljević, D., Janković, S. (2019). Antimicrobial susceptibility among urinary *Escherichia coli* isolates from female outpatients: Age-Related differences. *Cent Eur J Public Health*; 27 (3): 245-250.
- Duarte, F., Rodríguez, M., Gómez, M., Granados, M., Vargas, A. (2015). Uso adecuado de antimicrobianos en pediatría en un hospital de tercer nivel. *Revista médica Inst. Mex. Seguro Soc.*; 53(2):150-7.
- Díaz, D. (2018). Actividad antimicótica del extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* (Paico), sobre *Candida albicans* Cepa ATCC 10231. Tesis para optar por el grado de Químico Farmacéutico. Universidad Privada Autónoma del Sur, Perú.
- Echegaray, J., Echegaray, P., Mosquera, A., Gerrikaetxebarria, J. (2011). Fitoterapia y sus aplicaciones. *ElSevier*. XXII (6): 258 – 267.
- Echeverri, L., Cataño, J. (2010). *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia. *Scielo*. Vol. 23 No. 3, p-p. 240-249
- Escalona, L., Tase, A., Estrada, A., Almaguer, M. (2015). Uso tradicional de plantas medicinales por el adulto mayor en la comunidad serrana de Corralillo Arriba. *Guisa, Grana. Scielo*. Vol. 20, No. 4, p-p. 429-439
- Escobar, M., Puig, O., Zaldivar, A., Gallegos, G., Agüero, A., Gandarilla, L. (2016). Erradicación de fiebre tifoidea en Holguín. Logro de la Medicina cubana 1972-2016. *Scielo*. ISSN 1560-4381, p-p. 979-989.
- Expósito, L., Bermellón, S., Lescaille, L., Delgado, N., Aliaga, I. (2019). Resistencia antimicrobiana de la *Escherichia coli* en pacientes con infección del tracto urinario. EBSCO. ISSN 1028-9933. <http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=0&sid=9b3a4d49-95ee-411a-acc9-076497159c21%40sessionmgr103>
- Fallas, M., Vásquez, A. (2016). Identificación de Compuestos Bioactivos en Hojas de *Chenopodium Ambrosioides* con Posibilidades de Potenciar la Acción Antihelmíntica de Iberoamérica en Costa Rica.
- Flores, L. (2015). Efecto antiespasmódico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* “Paico” en íleon aislado de *Cavia porcellus* “cobayo”

- Ayacucho 2013. Tesis para optar por la licenciatura en Químico Farmacéutico. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Perú.
- Florez, D., Charry, J., Cuellar, L. (2011). Caracterización epidemiológica de *Klebsiella pneumoniae* en las UCIS del Hospital Universitario de Neiva en el año 2009 y de Enero a Septiembre de 2010. Tesis para optar por el Doctorado. Universidad SurColombiana, Colombia.  
<https://contenidos.usco.edu.co/salud/images/documentos/grados/T.G.Medicina/327.T.G-Daniel-Andrés-Florez-Dussan,-Juan-Carlos-Charry-D%C3%ADaz,-Luis-Andrés-Cuellar-Castro-2010.pdf>.
- Gallejos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. Scielo. An Fac med. 77(4): 327-332.
- Garza, R., Zúñiga, O., Perea, L. (2013). La importancia clínica actual de Staphylococcus aureus en el ambiente intrahospitalario. Scielo. No. 24 (1), p-p 8-13.
- García, I. (2012). Estudio del sistema In (III)-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-líquido iónico PJMTH<sup>+</sup>HSO<sub>4</sub><sup>-</sup> Mediante una tecnología avanzada de membranas líquidas. Tesis para optar por la Maestría en Ingeniería Química y ambiental. Universidad Rey Juan Carlos, España.
- Pasachova, J., Ramirez, S., Muñoz, L. (2019). Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización velular. Scielo. Vol. 17 (32), p-p. 25-38
- Gomes, M. (2018). Infecciones respiratorias por Staphylococcus aureus: implicación clínica de factores de virulencia y persistencia. Tesis para optar por el doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona, España.  
[https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2018/hdl\\_10803\\_663955/mgf1de1.pdf](https://ddd.uab.cat/pub/tesis/2018/hdl_10803_663955/mgf1de1.pdf)
- Goka, M., Keilah, P., De Dieu, J., Kuate, J., Tane, P., Vilarem, G., Cerny, M. (2010). Antifungal Properties of Chenopodium ambrosioides Essential Oil Against Candida Species. PubMed. 3, 2900-2909; doi: 10.3390/ph309290.
- Gómez, O. (2014). Enfermedad diarreica aguda por *Escherichia coli* enteropatógenas en Colombia. Scielo. Vol. 31 (5), p-p. 577-586.
- Gutierrez, C. (2017). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos etánicos de Paico (*Chenopodium ambrosioides*), Khoa (*Clinopodium bolivianum*) y Ruda (*Ruta graveolens*) frente a *Moniliophthora spp* aislada a partir de muestras de cacao con moniliasis, la Paz-

- Bolivia, 2015). Tesis para optar por el grado de Licenciatura. Universidad Mayor de San Andres, Bolivia.
- Heisler, R., Budó, E., Denardin, M., Badke, M., Ceolin, M., Heck, S. (2015). Uso de las plantas medicinales en el cuidado de la salud: la producción científica de tesis y disertaciones de enfermería brasileña. Scielo. No. 39, p-p. 390-403
- Hewis, L., Daeli, G., Tanoto, C., Triavika, A. (2020). A review of botany, phytochemical, and pharmacological effects of *Dysphania ambrosioides*. Dialnet. Vol. 2, No. 2, p-p. 70-82.
- Hernández, S., Domínguez, E., Gonzaga, L. (2015). Magnetic field influence in *E. coli* and *S. cerevisiae* growth and the ability of *Pseudomonas sp* and *Bacillus sp* to be phosphorus solubilizers for industrial usage. Scielo, Vol. 19, p-p. 109-121.
- Hernández, R., Fernández, C., Baptista, P. (2014). Metodología de la investigación. México. 6ta Edición. Editorial McGraw-Hill.
- Hernández, S., Morataya, M. (2017). Análisis fitoquímico y determinación de metales pesados, minerales y oligoelementos, en plantas medicinales comercializadas en el Mercado Central de San Salvador. Tesis para optar por el grado de Licenciatura. Universidad del Salvador, El Salvador.
- Huerta, N. (2019). *Escherichia coli*. Una revisión bibliográfica. Ocronos. Revista médica y de enfermería. INSS n° 2603-8358: <https://revistamedica.com/escherichia-coli-revision-bibliografica/>
- Ibarra, V., Paredes, E. (2013). Eficacia antibacteriana in vitro de Marco (*Ambrosia arborences* Mill.) y Paico (*Chenopodium ambrosioides*) en una formulación cosmética. Tesis para optar por ingeniería en biotecnología de recursos naturales. Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito, Ecuador.
- Jiménez, J., Carballo, K., Chacón, N. (2017). Manejo de infecciones del tracto urinario. Revista Costarricense de Salud Pública. Vol. 26 (1), p-p. 1-10.
- Junco, R., Rodríguez, C. (2015). Cultivo y crecimiento de los microorganismos. Research Gate, p-p. 45-54.
- Kumar, R., Kumar, A., Dubey, N., Tripathi, Y. (2006). Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. Elsevier: International Journal of Food Microbiology 115, 159–164.
- Leboffe, M., Pierce, B. (2011). A photographic atlas for the microbiology laboratory. Morton.

- Lezama, M. (2019). Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de *Chenopodium ambrosioides* (L.) (Paico) sobre *Staphylococcus aureus*. Tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico. Universidad Católica Los Ángeles Chimbote, Perú.
- Lizarbe, A. (2009). Bacterias y virus ¿Cómo nos defendemos? Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat. Vol. 103, Número 1, pp. 115-172.
- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G., Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. Mediographic. Vol. 3, Núm. 1, pp.10-18.
- López, M. (2016). Determinación de la concentración mínima inhibitoria mediante el método automatizado y su relación con el método de difusión en disco en muestras de urocultivo en el Hospital Regional Docente Ambato en el período octubre 2015- febrero 2016. Tesis para optar la Licenciatura en Laboratorio Clínico. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador.  
<https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/22436/2/LOPEZ%20ESTRELLA%2C%20MARIA%20TERESA.pdf>
- López, M. (2002). Flavonoides. El Sevier. Vol. 21, No. 4, p-p. 108-113.
- Lujan, 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/COMPL-TEORICO-UNIDAD-2-M%C3%A9todos-de-Separaci%C3%B3n-2017-FARGNOSI-FCN-UNPSJB.pdf>.
- Madrigal, A. (2016). Formulación De Un Cremigel Con Acción Antibacteriana A Base Del Aceite Esencial Del *Chenopodium ambrosioides*. Tesis para optar para el grado académico de Licenciatura en la Universidad Internacional de las Américas en Costa Rica.
- Martínez, V. (2014). Papel del lípido A de *Klebsiella pneumoniae* en el control de la respuesta inmune. Tesis para optar por Doctorado. Universitat De Les Illes Balears, España.  
<https://core.ac.uk/download/pdf/33010161.pdf>.
- Marín, E. (2018). Fiebre Tifoidea y factores de virulencia de *Salmonella* entérica serotipo *typhi*. Tesis Doctoral. Universidad de Complutense, España.  
<http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ELENA%20MARIN%20RODRIGUEZ.pdf>.

- Mollinedo, M., Gonzáles, C. (2014). Bacterias Gram Negativas. Revista Actualización Clínica, 2609-2613.
- Morales, V., Huerta, J. (2010). *Escherichia coli* diarreogénica. Conocimientos vigentes. Mediographic. Vol. 77 Núm. 6, p-p. 271-276.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J., Ochoa, T. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. EBSCO. Vol. 28 (4), p-p. 648-656.
- Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. (2013). Microbiología Médica. El Sevier.
- Niemevez, F. (2019). Destilación. Dialnet. Vol. 54, No. 3, p-p. 20-27.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS) (2013). Alerta epidemiológica: *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina. Revista de la OPS, p-p. 1-4
- Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud (OMS/OPS) (2018). Alerta Epidemiológica *Salmonella entérica serovar typhi* haplotipo H58. [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&view=download&category\\_slug=2018-9582&alias=46631-10-de-octubre-de-2018-salmonella-enterica-serovar-typhi-alerta-epidemiologica&Itemid=270&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=2018-9582&alias=46631-10-de-octubre-de-2018-salmonella-enterica-serovar-typhi-alerta-epidemiologica&Itemid=270&lang=es).
- Oliveira, C., Relinson, S., Limaverde, P., Figueredo, F., Campina, F., da Cunha, F., da Costa, R., Silvino, P., Lima, L., de Matos, Y., Melo, H., Siqueira, J., Blbino, V., Gonçalves, T. (2018). Inhibition of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L. and  $\alpha$ -terpinene on the NorA efflux-pump of *Staphylococcus aureus*. EL SEVIER. Food Chemistry 262. 72-77.
- Oliveros, M. (2016). Determinación del rendimiento y caracterización fisicoquímica del aceite esencial de Apazote (*Chenopodium ambrosioides* L.) obtenido de plantas cosechadas en diferentes etapas de desarrollo a nivel laboratorio. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. <https://core.ac.uk/download/pdf/45359553.pdf>
- Osorio, C. (2017). Sobre el origen del término bacteria: una paradoja semántica. Scielo. Revista Chilena Infectol; 34 (3): 265-269.
- O’Ryan, M., Farfán, M. (2014). Impacto De La Investigación Infectológica En La Salud Y El Bienestar Del Ser Humano. Rev. Med. Clin. Condes - 2014; 25(3) 397-401.
- Paciel, D., Seija, V., Prieto, J., Vignoli, R., Medina, J., Savio, E. (2011). Enterobacterias productoras de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa). Dialnet. 46 (7), p-p. 1-9
- Pachón, D. (2009). Aislamiento, Identificación, Serotipificación de enterobacterias del género *Salmonella* en una población de *Crocodylus intermedius* y testudinos mantenidos en

- cautiverio en la estación de biología tropical Roberto Franco E.B.T.R.B de la facultad de Ciencias- Universidad Nacional de Colombia En Villavicencio- Meta. Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.  
<https://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis198.pdf>.
- Prescott, L., Klein, D., Harley, J. (2004). Microbiología 5 edición. McGraw-Hill Interamericana.
- Pearson, M., Galas, M., Corso, A., Hormazábal, J., Duarte, C., Salgafo, N., Ramón, P., Melano, R. (2019). Consenso latinoamericano para definir, categorizar y notificar patógenos multirresistentes, con resistencia extendida o panresistentes. Revista Panamericana Salud Publica. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6705331/#B10>.
- Pérez, B., Gómez, A., Pazmiño, J., Jaque, S., Alexander, A. (2017). Azúcares reductores y no reductores. Dialnet. Vol. 35, No. 4, p-p. 1-8.
- Porrero, C. (2014). Detección y caracterización de *Staphylococcus aureus* procedentes de animales y aguas. Tesis para optar por el grado de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid, España. <https://www.visavet.es/data/tesis/deteccion-caracterizacion-staphylococcus-aureus-animales-aguas.pdf>
- Picazo, J. (2013). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Dialnet.
- Quirós, S. (2016). Infecciones por bacterias del género *Salmonella*: Relevancia en la práctica clínica. Mediographic. Vol. 6, No IV, p-p. 11-21.
- Ramos, K., Portal, O. (2017). Metabolitos secundarios de las plantas. Académica Española.
- Rodríguez, X., Llanos, A., (2012). Determinación de Nuevos Compuestos con Potencial Bacteriostático y Antihelmíntico en *Chenopodium ambrosioides* (Apazote). Tesis para optar para el grado académico de Licenciatura en la Universidad de Iberoamérica en Costa Rica.
- Román, M. (2015). Estudio de las características clínicas de los pacientes y de la utilización de antibióticos en las infecciones extra intestinales por *Salmonella*. Tesis de Maestría. Universidad de Costa Rica, Costa Rica.  
<http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/3163/1/38886.pdf>
- Raymundo, P. (2015). Uso tradicional del apazote como planta medicinal en la comunidad Primavera, aldea Salquil Grande, municipio de Nebaj, departamento de Quiché. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.  
[http://biblioteca.usac.edu.gt/EPS/07/07\\_5678.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/EPS/07/07_5678.pdf)

- Rubio, D. (2014). Efecto de la radiación UV-C sobre la flora nativa y la capacidad antioxidante de la mezcla para té compuesto por Toronjil (*Melissa officinalis*), Ortiga (*Urtica dioica*), Perejil (*Petroselinum sativum*) y Paico (*Chenopodium ambrosioides*) de la zona andina de Cotacachi. Tesis para optar por ingeniería en alimentos. Universidad Tecnológica Equinoccial, Ecuador.
- Sá, R., Santana, A., Silva, F., Soares, L., Randau, K. (2016). Anatomical and histochemical analysis of *Dysphania ambrosioides* supported by light and electron microscopy. El Sevier. Revista Brasileira de Farmacognosia. 26 (2016) 533-543.
- Sacsquispe, R., Velásquez, J. (2002) Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Ministerio de Salud Pública del Perú.
- Salvador, I. (2017). Plantas medicinales en España. Uso, propiedades y precauciones en la actualidad. Trabajo final de grado para optar por la licenciatura en farmacia. Universidad Complutense, España.
- Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. Revista Habanera de Ciencias Médicas. Scielo. 16(3): [402-419].
- Serrano, R., Berlanga, M. (2009). Darwin y la enorme diversidad microbiana. Revista de divulgación científica-Ambiociecias.
- Serrano, O., Hernández, J. (2016). Las bacterias en la historia y cultura humana. Infomed. Vol.41, número 10.
- Silverio, C. (2015). Microbiología General para Investigaciones de Laboratorio. Tesis para optar por el Doctorado. Universidad Técnica de Machala, Ecuador.
- Solano, A., Solano, A., Ramírez, X. (2020). Actualización del manejo de infecciones de las vías urinarias no complicadas. Revista Médica Sinergia. Vol. 5 Num: 2.
- Solsona, N. (2015). Los instrumentos de vidrio en los tratados de Nicaise Le Fèvre y Marie Meurdrac. Universidad Autónoma de Barcelona, España. El Sevier.
- Usano, J., Palá, J., Díaz, S., (2014). Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. Reducta (Biología). Serie Botánica. 7 (2): 60-70.
- Universidad Interamericana para el Desarrollo (UNID). Tamizaje y Screening Fitoquímico. Dialnet. Vol. 4, No. 2, p-p. 2-16

- Vázquez, E. (2015). Actividades biológicas de extractos de plantas y de sus combinaciones. Tesis para optar por el grado de Doctorado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Vedia, L., López, M., Scapellato, P., Lopardo, G., Clara, L., Lista, N. (2014). Tratamiento de las infecciones invasivas por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad. Vol. 22, No. 85, p-p. 53-63
- Vélez, M., Villa, N. (2012). Identificación y cuantificación de antraquinonas u cromonas en plantas de *Aloe vera* cultivadas en municipios de Risaralda por cromatografía líquida de alta eficacia. Tesis para optar por licenciatura en química industrial. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.  
<http://recursosbiblioteca.utp.edu.co/tesisd/textoyanexos/5430894V436.pdf>
- Villalobos, L., Gonzáles, E., Salazar, A., Santiago, J., Ramírez, J. (2026). Efecto antioxidante de epazote (*Chenopodium ambrosioides L.*) en carne molida cruda de bovino. Dialnet. Nacameh Vol. 10, No. 2, pp. 35-48.
- Wen, L., Haddad, M., Fernández, I., Espinoza, G., Ruiz, C., Neyra, E., Bustamante, B., Rojas., R. (2011). Actividad Antifúngica de Cuatro Plantas Usadas en la Medicina Tradicional Peruana. Aislado de 3'-Formil-2',4',6'-Trihidroxidihidrochalcona, Principio Activo de *Psidium acutangulum*. Scielo. Rev. Soc. Quím. Perú. 77 (3) 2011.
- 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.