

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS AMÉRICAS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA DE FARMACIA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL
(*KLEBSIELLA PNEUMONIAE*, *SALMONELLA TYPHI*,
ESCHERICHIA COLI Y *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*) DE LA
PLANTA ARVENSE COSTARRICENSE *BIDENS PILOSA*
(ROMERILLO O MURISECO)**

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

MARCOS DAVID ALFARO GUILLÉN

TUTOR

LIC. JAVIER ALPÍZAR CORDERO

SAN JOSÉ, COSTA RICA, MAYO, 2020

Agradecimientos

Primeramente, quiero agradecerle a Dios por permitirme llegar a este día tan especial y fundamental para un futuro próximo. Por regalarme 7 años de lucha, sacrificio y salud, para poder intentar poco a poco llegar hasta esta meta. Muchas gracias Diosito por mis altibajos vividos durante todo este tiempo ejercido como estudiante.

Agradezco a mi papá Marco Vinicio y mi mamá María de los Ángeles, que son la base fundamental de mis actitudes y aptitudes por buscar siempre a lograr, que, sin ellos, mi vida no tendría un sentido específico. Les agradezco su sacrificio, no sólo económico, sino también físico y de tiempo, porque sin ellos y sin su granito de arena, todo esto no hubiese sido posible y alcanzado. Además, ellos me han enseñado el amor, el respeto y el esfuerzo por obtener las metas, sin importar las dificultades. Gracias a ustedes soy quien soy actualmente y todo esto me ha permitido forjarme para intentar ser una persona mejor que la de antes, día con día. Los amo demasiado.

Agradezco a mi hermana Daniela y mi hermano Gabriel, por soportar cada uno de los sacrificios que realicé cada día de mi universidad, por comprender las situaciones complicadas e incómodas que se conviven día tras día y por siempre darme ese aliento y anhelo de superación como hermano mayor, para inculcarles el mejor de los ejemplos posibles. Los amo muchísimo.

Agradezco a mi abuelo Marco Tulio, a mi abuela Zoraida y a mi tía Karla Yahaira, por siempre estar ahí cuando necesité de muchos sacrificios e inconvenientes universitarios, por ser amorosos, respetuosos, alcahuetas y atentos, por siempre velar por mi bienestar y por siempre esperarme con los brazos abiertos. Los amo muchísimo.

Agradezco a mi novia Hilary Geovanna Marín Otárola, por ser la persona que siempre esperé y quise en mi vida, por ser esa compañera de vida y de universidad, que siempre estuvo a mi lado fomentando y apoyándome en cada momento de estrés que salí adelante, por ser una mujer especial e incondicional. También, por caminar de mi mano, enseñándome las cosas bonitas de la vida y por soportar cada una de mis locuras académicas. Gracias a sus papás por aceptarme y tratarme como se debe en su hogar. Gracias por ayudarme en todo lo que quisiste y pudiste amor. Gracias por ser mi novia, te amo.

Agradezco a mis amigos, profesores, compañeros y allegados de universidad por integrar mi parte académica, por brindarme su apoyo, compañerismo y sinceridad, y darme un excelente crecimiento profesional.

Marcos David Alfaro Guillén

Dedicatoria

Esta investigación está dedicada a mis padres, mis hermanos, mis abuelos y mi tía, que han sido mis pilares para luchar e ir paso a paso con este sueño por cumplir y desarrollar laboralmente.

A mis padres, que a ellos les debo prácticamente todo en la vida, sin su apoyo incondicional esta Licenciatura no habría sido concluida.

También, dedico esta investigación a mi novia Hilary Geovanna Marín Otárola, que ella ha soñado más que yo el ver cumplirse este día tan bonito y satisfactorio. Por sus sacrificios, colaboraciones y jaladas de oreja para continuar en pie por este título en Farmacia.

Además, quiero dedicarle esta tesis a mi amigo Andrés Eduardo Badilla Vargas por creer en mi palabra, confiar en la realización de una carrera, siempre ser una persona carismática, humilde y noble, y siempre haber sido y ser como un hermano para mí. Lo quiero mucho “Pipa”.

Asimismo, quiero dedicarle esta meta a mi prima Yadith Barboza, por colaborar en mi proceso de universidad, sin importar lo difícil o complicado que pueda ser y querer involucrarse en mi crecimiento personal como profesional en el área de la salud.

Para finalizar, quiero dedicar este triunfo a todos mis amigos y todas las demás personas que en este momento no me alcanza el tiempo y que no me alcanzaría la tesis para darles mis más sentidas y sinceras muestras de agradecimiento y cariño, por todo lo que han hecho y hacen siempre por mí.

Marcos David Alfaro Guillén

Contenido

Agradecimientos	2
Dedicatoria.....	3
Contenido de figuras	8
Contenido de tablas.....	10
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	12
Planteamiento del problema.....	12
Objetivos	14
Objetivo General	14
Objetivos Específicos	14
Justificación.....	15
Proyecciones	16
Antecedentes	17
Histórico	17
Internacionales	17
Nacionales.....	19
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	20
Bacterias.....	20
Bacterias Gram Positivas	24
Bacterias Gram Negativas	29
Resistencia Bacteriana	36
Características	36
Mecanismo de Acción	39
Alternativas Terapéuticas	40
Medicamentos a Bases de Extractos Naturales.....	41
Microbiología	42
Generalidades	42
Cultivo Microbiano.....	44
Agar.....	45
Pruebas de Sensibilidad	49
Concentración Mínima Inhibitoria	51
Método de Macrodilución	52
Plantas Medicinales	53
Generalidades	53
Identificación Fisicoquímico	62
Tamizaje Fisicoquímico	62

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	67
Enfoque	67
Diseño	68
VARIABLES	69
Proceso de Recolección y Análisis	71
Proceso de Recolección de la Planta	72
<i>Bidens pilosa</i>	72
Procedimiento y Recursos	73
Extracción por Maceración de la planta <i>Bidens pilosa</i>	76
Extracción de la <i>Bidens pilosa</i>	78
Procedimiento para la Preparación de los Fraccionamientos	79
Preparación para la Concentración de los Extractos	95
Pruebas Antimicrobianas del Extracto Acuoso (Acetato de Etilo, Diclorometano y Hexano) de la planta <i>Bidens pilosa</i> Frente a las Bacterias <i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Salmonella typhi</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	96
Cultivos de las Distintas Cepas de las Bacterias <i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Salmonella typhi</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	97
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS	99
Recolección de la planta <i>Bidens pilosa</i>	99
Extracción de la Planta <i>Bidens pilosa</i>	99
Extracción Etanólica a partir de la <i>Bidens pilosa</i>	100
Fraccionamiento del Extracto Crudo a partir de la <i>Bidens pilosa</i>	100
Fracción de Acetato de Etilo a partir de la <i>Bidens pilosa</i>	100
Fracción Diclorometano a partir de la <i>Bidens pilosa</i>	101
Fracción Hexano a partir de la <i>Bidens pilosa</i>	101
Fracción Acuosa a partir de la <i>Bidens pilosa</i>	101
Tamizaje Fitoquímico para la Identificación de los Metabolitos Secundarios presentes en los Fraccionamientos Acuoso y Etéreos de la <i>Bidens pilosa</i>	102
Prueba Börntrager-Krauss (Identificación de Antraquinonas) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la <i>Bidens pilosa</i>	103
Prueba de Dragendorff (Identificación de Alcaloides) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la <i>Bidens pilosa</i>	104
Prueba de KOH (Identificación de Cumarinas) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la <i>Bidens pilosa</i>	105
Prueba de Liebermann-Burchard (Identificación de Triterpenos) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la <i>Bidens pilosa</i>	105
Prueba de Shinoda (Identificación de Flavonoides) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la <i>Bidens pilosa</i>	106

Prueba de Taninos (Determinación de Taninos) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la <i>Bidens pilosa</i>	107
Cromatografía de Capa Fina TLC (Determinación de Terpenos) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la <i>Bidens pilosa</i>	108
Fraccionamiento del Extracto Acuoso a partir de la <i>Bidens pilosa</i>	109
Fracción del Extracto Acuoso uno (AQ₁) a partir de la <i>Bidens pilosa</i>	109
Prueba de Benedict (Determinación de Azúcares Reductores) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la <i>Bidens pilosa</i>	110
Prueba de Dragendorff (Identificación de Alcaloides) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la <i>Bidens pilosa</i>	110
Prueba de Espuma (Determinación de Saponinas) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la <i>Bidens pilosa</i>	111
Prueba de Lugol (Determinación de Almidón) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la <i>Bidens pilosa</i>	112
Prueba de Taninos (Determinación de Taninos) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la <i>Bidens pilosa</i>	113
Fracción del Extracto Acuoso dos (AQ₂) a partir de la <i>Bidens pilosa</i>	114
Prueba Börntrager-Krauss (Identificación de Antraquinonas) para la Fracción Acuosa dos (AQ₂) de la <i>Bidens pilosa</i>	114
Fracción del Extracto Acuoso dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) a partir de la <i>Bidens pilosa</i>	115
Prueba de Börntráger-Krauss (Identificación de Antraquinonas) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la <i>Bidens pilosa</i>	115
Prueba de Dragendorff (Identificación de Alcaloides) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la <i>Bidens pilosa</i>	116
Prueba de KOH (Identificación de Cumarinas) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la <i>Bidens pilosa</i>	117
Prueba de Liebermann-Burchard (Identificación de Triterpenos) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la <i>Bidens pilosa</i>	118
Prueba de Shinoda (Identificación de Flavonoides) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la <i>Bidens pilosa</i>	119
Concentración de las Fracciones en los Viales	120
Pruebas de Actividad Antibacteriana de las Fracciones de Extracto Acuoso y Extractos Etéreos de la Planta <i>Bidens pilosa</i> Mediante Pruebas In Vitro Frente a <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella typhi</i> por Medio de Difusión Agar	121
<i>Staphylococcus aureus</i>	122
<i>Escherichia coli</i>	124
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	126
<i>Salmonella typhi</i>	128

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	130
Conclusiones	130
Recomendaciones	133
BIBLIOGRAFÍA	134

Contenido de figuras

Figura 1. Darwin y las bacterias	21
Figura 2. Constitución de la Pared Bacteriana	21
Figura 3. Formas de las Bacterias en el Reino Procariota	22
Figura 4. Estructura de la Pared Celular en Bacterias Gram-positivas	25
Figura 5. Microorganismo Staphylococcus aureus	28
Figura 6. Estructura de la Pared Celular en Bacterias Gram-negativas	29
Figura 7. Microorganismo Klebsiella pneumoniae	31
Figura 8. Microorganismo Escherichia coli	33
Figura 9. Microorganismo Salmonella typhi	34
Figura 10. Resistencia Bacteriana	37
Figura 11. Microbiología	42
Figura 12. Cultivo Microbiano	44
Figura 13. Agar	45
Figura 14. Agar-agar	46
Figura 15. Pruebas de Sensibilidad	49
Figura 16. Concentración Mínima Inhibitoria	51
Figura 17. Tubos Estériles	52
Figura 18. Plantas Medicinales	53
Figura 19. Bidens pilosa	55
Figura 20. Aceites Esenciales	58
Figura 21. Maceración	60
Figura 22. Equipo de Destilación a Presión Reducida Mediante Rotavapor	61
Figura 23. Estructura Molecular de la Antraquinona	63
Figura 24. Estructura Molecular de los Alcaloides	63
Figura 25. Estructura Molecular de las Cumarinas	64
Figura 26. Estructura Molecular de los Flavonoides	64
Figura 27. Estructura Molecular de los Taninos	65
Figura 28. Estructura Molecular de las Saponinas	66
Figura 29. Estructura Molecular del Almidón	66
Figura 30. Muestra de la Planta de Bidens pilosa	73
Figura 31. Fragmentos de la planta de Bidens pilosa	77
Figura 32. Planta Bidens pilosa Macerada	78
Figura 33. Volumen obtenido en el Rotavapor	79
Figura 34. Prueba Börntrager-Krauss (Identificación de Antraquinonas) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la Bidens pilosa	103
Figura 35. Prueba de Dragendorff (Identificación de Alcaloides) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la Bidens pilosa	104
Figura 36. Prueba de KOH (Identificación de Cumarinas) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la Bidens pilosa	105
Figura 37. Prueba de Liebermann-Burchard (Identificación de Triterpenos) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la Bidens pilosa	106

Figura 38. Prueba de Shinoda (Identificación de Flavonoides) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la Bidens pilosa	107
Figura 39. Prueba de Taninos (Determinación de Taninos) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la Bidens pilosa	108
Figura 40. Cromatografía de Capa Fina TLC (Determinación de Terpenos) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la Bidens pilosa	109
Figura 41. Prueba de Benedict (Determinación de Azúcares Reductores) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la Bidens pilosa	110
Figura 42. Prueba de Dragendorff (Identificación de Alcaloides) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la Bidens pilosa	111
Figura 43. Prueba de Espuma (Determinación de Saponinas) para la fracción Acuosa uno (AQ₁) de la Bidens pilosa	112
Figura 44. Prueba de Lugol (Determinación de Almidón) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la Bidens pilosa	113
Figura 45. Prueba de Taninos (Determinación de Taninos) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la Bidens pilosa	114
Figura 46. Prueba Börntrager-Krauss (Identificación de Antraquinonas) para la Fracción Acuosa dos (AQ₂) de la Bidens pilosa	115
Figura 47. Prueba de Börntráger-Krauss (Identificación de Antraquinonas) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la Bidens pilosa	116
Figura 48. Prueba de Dragendorff (Identificación de Alcaloides) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la Bidens pilosa	117
Figura 49. Prueba de KOH (Identificación de Cumarinas) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la Bidens pilosa	118
Figura 50. Prueba de Liebermann-Burchard (Identificación de Triterpenos) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la Bidens pilosa	119
Figura 51. Prueba de Shinoda (Identificación de Flavonoides) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la Bidens pilosa	120
Figura 52. Halos de Inhibición de la Placa Agar Estándar de la Bacteria Staphylococcus aureus del Fraccionamiento de la Planta Bidens pilosa	124
Figura 53. Halos de Inhibición de la Placa Agar Estándar de la Bacteria Escherichia coli del Fraccionamiento de la Planta Bidens pilosa	126
Figura 54. Halos de Inhibición de la Placa Agar Estándar de la Bacteria Klebsiella pneumoniae del Fraccionamiento de la Planta Bidens pilosa	128
Figura 55. Halos de Inhibición de la Placa Agar Estándar de la Bacteria Salmonella typhi del Fraccionamiento de la Planta Bidens pilosa	129

Contenido de tablas

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de <i>Staphylococcus aureus</i>	28
Tabla 2. Clasificación Taxonómica de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	31
Tabla 3. Clasificación Taxonómica de <i>Escherichia coli</i>	34
Tabla 4. Clasificación Taxonómica de <i>Salmonella typhi</i>	35
Tabla 5. Resumen de Características de cada Fracción Realizada a la Planta <i>Bidens pilosa</i>	101
Tabla 6. Resumen de las Pruebas Fitoquímicas de los Fraccionamientos Etéreos y Acuosos de la Planta <i>Bidens pilosa</i>	102
Tabla 7. Determinación de la Concentración de las Fracciones en los Viales	120
Tabla 8. Medición Microbiológica de los Halos de Inhibición de las Bacterias <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Salmonella typhi</i>...	122

Resumen

Este trabajo de investigación tiene como principal objetivo evaluar la actividad antibacterial (*Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) de la planta arvense costarricense *Bidens pilosa* (Romerillo o Muriseco), buscando de esta manera establecer una alternativa natural para combatir las patologías que estas bacterias generan en los seres humanos.

Para desarrollar la investigación, se efectuaron todos los procedimientos de extracción en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas. Además, de la correspondiente caracterización fitoquímica. A lo que se refiere a las pruebas microbiológicas, se llevaron a cabo en el Laboratorio MicroLabs, ubicado en Guadalupe.

En la elaboración del extracto de *Bidens pilosa*, se utilizó dos disolventes distintos, etanol al 70% y agua destilada, y se desarrolló por medio del método de maceración. En el caso del extracto de la planta, se tomó la muestra y se cortó en trozos más pequeños, posteriormente se adiciona el disolvente correspondiente y se dejó reposar por 7 días. Con respecto al extracto acuoso, se le añadió agua como disolvente y de igual manera se dejó reposar por 3 días.

Posteriormente, para las muestras obtenidas por ambos disolventes, se procedió a colocarlas en un equipo de destilación a presión reducida mediante el rotavapor, para eliminar la mayor cantidad de los disolventes anexos. El extracto resultante, se liofilizó para obtener un extracto seco con ausencia de residuos y así lograr analizar sus diferencias visiblemente, entre los extractos líquidos y el sólido resultantes.

En lo concerniente a la caracterización fitoquímica de la planta *Bidens pilosa*, se demuestra la presencia de: Antraquinonas, Alcaloides, Cumarinas, Triterpenos, Flavonoides, Taninos y Terpenos. Además, se comprobó mediante pruebas de difusión agar, que los extractos de Acetato de Etilo son los que presentan mayor actividad antibacteriana, debido a que se observó un efecto inhibitorio superior por parte de este.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

Según la Organización Mundial de la Salud [OMS], la resistencia antimicrobiana refleja un problema de salud a nivel mundial, este puede afectar a cualquier ciudadano de variada edad y que habita en distintos países. Por esta razón, los avances de los fármacos van enfocados en la búsqueda y mejoramiento de nuevos productos naturales para el tratamiento de problemas en la salud de cada paciente diagnosticado con alguna de estas patologías, se desarrollan como métodos alternos para su eficacia terapéutica. (Moncayo, Santos y Soto, 2015)

Como se mencionó, a nivel mundial, existe un inconveniente muy serio y progresivo producido por la resistencia bacteriana y comúnmente consta por dos agentes aislados como lo son: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; sin embargo, se ha denotado que la *Klebsiella pneumoniae* ha incrementado desproporcionadamente como un agente de prevalencia dentro de este grupo específico de bacterias. (Cataño y Echeverría, 2010)

Según Cauna y Coronado en el 2018, un exceso en el uso de antibióticos ha puesto en peligro la eficacia y efectividad hacia la prevención, control y tratamiento de infecciones causadas por bacterias. Además de fomentar una problemática o amenaza importante para la salud a nivel mundial, que necesita de medidas por parte de las entidades y sectores públicos de salubridad. Esto es requerido por la falta de avances científicos de nuevos tratamientos con acción bactericida, para combatir a los microorganismos más resistentes.

La resistencia que presentan las bacterias contra sus agentes y mecanismos, es definida primordialmente por la acción de ineficacia que puedan verse reflejados en los tratamientos utilizados para contrarrestarlas, generando que se produzca un impacto en la salud de cada paciente. Adicionalmente, es importante conocer que hay bacterias multirresistentes que proceden a partir de animales y que se pueden transmitir de animal-ser humano provocando también un problema zoonótico. (Cruz y Rodríguez, 2010)

Como se estableció, esta resistencia bacteriana es un fenómeno que es utilizado como mecanismo de defensa por algunos microorganismos bacterianos y que es conocido desde que se descubrió los antibióticos y su uso. Sin embargo, este se ha visto intensificado por el factor denominado “presión selectiva” contra las bacterias, que es considerado como uno de los

factores más relevantes para la aparición y diseminación de la resistencia a los antibióticos. (González et al, 2014)

Serra en el 2017, menciona que la presión selectiva es una cualidad que ha permitido que la resistencia microbiana incremente, mediante procesos o mecanismos de resistencia que generan la pérdida de tratamientos alternativos que sean eficaces para combatir la multiresistencia que presentan gran cantidad de bacterias. No obstante, esta reducción de posibles soluciones para las enfermedades, modifica el tiempo de agonía que presentan los pacientes y los obliga a buscar métodos altamente costosos para su tratamiento, lo que aumenta el porcentaje de mortalidad para los mismos.

Se considera como un factor anómalo, la resistencia que provocan las bacterias y que estas pueden perjudicar específicamente a los agentes bacterianos y también de una forma generalizada a una gran mayoría de los miembros y especies de microbios y parásitos existentes, los cuales podrían ser transferidos al ser humano por medios como lo es: el ambiente, específicamente ejemplificando la cadena alimentaria. (Espino, Leyva y Puig, 2011)

Algunos de los mecanismos descritos acerca de la resistencia antimicrobiana son: expulsión del antibiótico mediante bombas de eflujo, alteración de la permeabilidad, modificación del blanco terapéutico y/o inactivación del antibiótico. Además, si se quiere utilizar una alternativa efectiva y determinada antibacteriana, se ha acudido a la utilización de plantas que poseen un rango de acción biológica y que son posibles fuentes ricas en metabolitos secundarios. (Heredia, Martín, Orozco y Pérez, 2019)

En el 2018 la Organización Mundial de la Salud [OMS], anunció que se realizaron las primeras investigaciones referentes a la resistencia bacteriana hacia los antibióticos. Este comunicado mencionó que esta problemática se da en todo el mundo sin importar el grado de desarrollo de los mismos. Específicamente establecieron que la *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, seguida de *Salmonella spp* son las bacterias que mayormente han presentado este tipo de resistencia.

En la actualidad en el área de la producción de antibióticos se ha observado que su elaboración ha ido disminuyendo de una forma secuencial y considerable, generando que se dé una problemática a partir de consecuencias impredecibles motivadas por la iniciación de

mecanismos defensivos con el fin de eludir la acción destructiva en las bacterias, hongos, protozoarios y virus. (Fernández, López, Machado y Ponce, 2003)

Debido a estas inquietudes referentes al aumento en los casos de resistencia a los antibióticos por parte de bacterias, y además de la actividad antibacteriana presente en los distintos extractos de plantas, surge la interrogante de la investigación: ¿Presenta el extracto de *Bidens pilosa* actividad antibacteriana en contra de *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*?

Adicionalmente, al conocer las propiedades antimicrobianas que se le han atribuido a esta planta, emerge la hipótesis de la investigación: “El extracto de *Bidens pilosa* presenta actividad antibacteriana frente a las bacterias *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*”.

Objetivos

Objetivo General

- Evaluar la actividad antibacteriana del extracto de *Bidens pilosa* (Romerillo o Muriseco), sobre las bacterias *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Objetivos Específicos

- Elaborar un fraccionamiento de los componentes presentes en la planta *Bidens pilosa*, utilizando los disolventes Acetato de etilo, Diclorometano y Hexano para la determinación de su actividad.
- Realizar un tamizaje fitoquímico del muriseco, para la identificación de los metabolitos secundarios presentes en la planta.
- Comprobar la actividad antibacteriana del extracto de romerillo contra las bacterias *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Justificación

Desde la antigüedad se ha conocido que la sociedad ha obtenido por parte de la naturaleza los recursos necesarios e indispensables para desarrollar su evolución, pero el proceso de exploración sobre los recursos naturales ha aumentado con el avance de los años. La flora mundial ha sobrepasado el interés como un auxilio adicional para la solución con productos medicinales, debido a que existe una alta comprobación de efectividad en su acción en contra de enfermedades y para la prevención de las mismas. Es considerado una de las principales soluciones disponibles por parte del recurso medicinal. (Damé, Hartwig, Lambrecht, Silveira y Voigt, 2011)

Un aspecto importante es la determinación de propiedades medicinales que poseen las plantas que están basadas principalmente en el conocimiento profundo del entorno y en la observación que se presente y una experiencia característica. Este conocimiento se ha traspasado a través de las generaciones y ha permitido enriquecer de una forma integral y cultural a los habitantes nativos y emigrantes, conocer que, en la medicina popular y la herboristería actual, existen conceptos debidamente sintetizados, con el fin de permitir una posible resolución de parte de los problemas de salud de la población que son menos favorecidos y que se ubican alejados de la vida moderna. (Alonso, 2019)

Mamani en el 2017, establece que, los líquidos: extractos alcohólicos, los aceites esenciales y las decocciones, se obtienen por medio de diferentes partes de las plantas y además, son utilizados para una amplia industria alimentaria de condimentos, saborizantes, entre otros. También, se han usado en industrias farmacéuticas, cosméticas y tabacaleras como esencias y perfumes. Sin embargo, avanzadas investigaciones han mostrado que algunos o inclusive varios de estos productos poseen una actividad antitóxica, antibacteriana, antifúngica, antiviral y antioxidante.

En el caso de los aceites esenciales, estos son producidos a partir de las plantas, para diferentes fines. Ejemplo de ello, es para proteger la planta de las plagas, enfermedades e inclusive de la invasión de otras plantas aledañas, para la atracción de aves e insectos polinizadores. A partir de estas cualidades de atracción y protección, es posible ver reflejadas las propiedades antisépticas, antiinflamatorias, afrodisíacas y antidepresivas, entre otras, que se

pueden encontrar en una proporción significativa en la totalidad de los aceites. (Ferrer, Martínez, Nava, Ojeda de Rodríguez y Sulbarán de Ferrer, 2003)

Ramos en el 2019, estableció, que existen propiedades farmacológicas que se le atribuyen a la *Bidens pilosa*, estas se deben a los abundantes principios activos que contienen. A esta planta se le confieren principalmente los grupos de: los poliacetilenos, los cuales son los que inhiben los patógenos y los flavonoides que se les confiere actividad contra la inflamación. Sin embargo, los poliacetilenos también presentan acción antiinflamatoria, aunque con un mecanismo distinto.

Como se mencionó, sus efectos farmacológicos se deben a su composición fitoquímica, entre ellos: polienos, flavonoides, fenilpropanoides, ácidos grasos y fenólicos. Entre los efectos positivos se ha evidenciado mejoras en el tratamiento de tumores, inflamación/modulación inmune, diabetes, virus, microbios, protozoos, enfermedades gastrointestinales, hipertensión y enfermedades cardiovasculares. Además, de una actividad antibacteriana y antifúngica contra distintas bacterias y hongos. (Reisancho, 2019)

Además, se conoce que en las plantas enteras o partes de estas como lo son las flores, frutos, hojas y raíces son los medios que permiten obtener los compuestos activos de las plantas medicinales que son efectos benéficos para la salud, ya sean en estado crudo o elaborado como cataplasmas, infusiones, té y entre otras. Sin embargo, es necesario realizar una caracterización química a las plantas medicinales y a sus extractos, para establecer mediante estudios e investigaciones preclínicas sobre su toxicidad y eficacia presentes, así como, analizar las actividades biológicas en ensayos clínicos en humanos. (Cornejo, 2016)

Proyecciones

- Se evidenciará la actividad antibacteriana que posee la planta *Bidens pilosa* contra las bacterias correspondientes, para la búsqueda de una alternativa farmacéutica eficiente como tratamiento.
- Se demostrará la utilidad al utilizar plantas naturales para contrarrestar patologías causadas por bacterias con resistencia al tratamiento vigente.

- Se desarrollará una investigación que inculque el conocimiento de las propiedades más importantes para el ser humano de la planta *Bidens pilosa*, como herramienta de solución de problemas de salud o alternativa terapéutica.

Antecedentes

Histórico

En la tesis “Evaluación del efecto de una dieta utilizando *Bidens pilosa* y otras materias primas en las etapas de levante y engorde en pollos línea cobb en condiciones experimentales en el municipio de la plata” elaborada por Marín y Silva en el 2007, establecieron que la *Bidens pilosa* es una hierba anual, lampiña o algo pubescente de 30 cm a 100 cm de altura y ramificada. Es hojas opuestas a veces alternas en la parte superior peciolada, 3-partidas, sus segmentos de ovados a lanceolados, de 2 cm a 8 cm de alto, aserrados, agudos o acuminados. También es de cabezuelas florales terminales, compuestas por flores tubulares y radiadas de color amarillo intenso y las radicales con sobresalientes pétalos blancos. Tiene un tallo erguido, tetragono; hojas pennado-partidas, 1-3 yugadas, raramente simples; inflorescencia en capítulos discoideos, amarillos, con las lígulas lineales, tetragonas, lampiñas o con las pestañitas del margen dirigidas hacia arriba.

En el 2019 Barreto y Estrella presentaron la tesis “Efecto de una dieta hipocalórica suplementada con extracto de *Bidens pilosa* sobre radicales libres en hígado y cerebro de ratas seniles”, donde establecieron como una especie de suma importancia a la *Bidens pilosa* L, perteneciente a la familia Asteraceae, originaria de América del Sur y distribuida en casi todos los países de regiones tropicales y subtropicales del continente. También, existen aportes que demuestran que los extractos vegetales de *Bidens pilosa* exhiben una actividad antioxidante significativa y un efecto inhibitorio sobre la producción de óxido nítrico en los macrófagos.

Internacionales

En el artículo científico “Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* Y *Silybum marianum*” elaborado por Cruz, Rodríguez C. y Rodríguez N. en el 2010, establecieron mediante extractos etanólicos, a partir de las hojas secas de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*, los

cuales, fueron sometidos a un análisis microbiológico in vitro, para establecer su actividad antibacteriana y sus concentraciones mínimas inhibitoria y bactericida, en respuesta a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, se demostró actividad contra *S. aureus*. Además, se determinó que la hoja seca exhibió mejor actividad antibacteriana fue *B. pilosa* y *L. cámara*. También se estableció que *S. molle* y *S. marianum* manifestaron una capacidad moderada para inhibir el crecimiento de *S. aureus*. Por lo tanto, se concluyó que las plantas seleccionadas anteriormente tienen actividad frente a *S. aureus*.

Según Charimba, Falowo, Hugo y Muchenje en el 2016, publicaron el artículo científico “In vitro antimicrobial activities of *Bidens pilosa* and *Moringa oleifera* leaf extracts and their effects on ground beef quality during cold storage”, establecieron mediante extractos de hoja de *B. pilosa* y *M. oleifera* en los recuentos microbianos de ternera triturada durante 6 días de almacenamiento en frío, que los resultados de los contenidos fitoquímicos revelaron que el extracto de *M. oleifera* tenía un mayor contenido fenólico y de flavonoides en comparación con el extracto de *B. pilosa* ($p > 0,05$).

De igual manera se evidenció una apreciable actividad de amplio espectro frente a las bacterias examinadas con concentraciones inhibitorias mínimas utilizando rangos entre 0,6 y 10,0 mg/mL. Además, la adición de extracto de hoja de *M. oleifera* a la muestra de ternera triturada disminuyó el recuento total viable de bacteria ácido-láctica ($p < 0,05$) más que en la muestra control y los tratamientos de BHT en tercer día de almacenamiento. Se concluyó que a partir de los resultados expuestos de la hoja de *M. oleifera*, esta podría ser utilizada como un aporte eficaz e importante como agente antimicrobiano natural para nuevos productos.

En la tesis “Influencia del método de extracción del aceite esencial de hojas de amor seco (*Bidens pilosa* L.) en la actividad antimicrobiana” elaborada por Reisancho en el 2019, estableció mediante la técnica de microdilución en pocillos sobre los microorganismos: el aceite esencial extraído por destilación por arrastre de vapor de la localidad Tumbaco a una concentración de 8 µg/mL presenta una mejor actividad contra *Escherichia coli*, el aceite esencial extraído por destilación por arrastre de vapor de la localidad Rumipamba a una concentración de 8 µg/mL presenta una mejor actividad contra *Pseudomonas aeruginosa*, el aceite esencial extraído por fluidos supercríticos de la localidad Rumipamba a una concentración de 8 µg/mL presenta una mejor actividad contra *Staphylococcus aureus* y el

aceite esencial extraído por fluidos supercríticos de la localidad Tumbaco a una concentración de 64 µg/mL presenta una mejor actividad contra *Candida albicans*.

Por lo anterior en este trabajo se concluyó firmemente que la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Bidens pilosa L.* depende del microorganismo en estudio, presentando porcentajes determinados de *Candida albicans* 79,45%, *Escherichia coli* (96,38%), *Staphylococcus aureus* (98,44%) y *Pseudomona aeruginosa* (99,48%). Es decir, no tienen una diferencia estadísticamente significativa entre sí. Por lo tanto, el porcentaje de inhibición es mejor frente a bacterias en relación con la levadura.

Nacionales

En la tesis “Determinación de la actividad antimicrobiana de la broza del *Coffea arábica* (café) variedad caturra y catuaí mediante la prueba de sensibilidad antimicrobiana in vitro y su aplicación en la industria farmacéutica” elaborada por Valverde en el 2018, estableció que la investigación fue evaluar la actividad antimicrobiana de la broza del *Coffea arábica* (café) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, microorganismos que reportan ser de mayor virulencia y gran resistencia a los antibióticos, en lo que respecta a la población costarricense. Para la determinación de la capacidad antimicrobiana se empleó la prueba de sensibilidad antimicrobiana (PSA), a través de una placa de microtitulación, también se utilizó medio de cultivo tioglicolato, inóculos bacterianos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y extracto puro de broza de café. Se concluyó que la prueba dio como resultado la capacidad del extracto de la broza de *Coffea arábica* de inhibir microorganismos mencionados anteriormente.

En la tesis “Evaluación de las propiedades antimicrobianas de los extractos de *Cinnamomum verum* (canela), *Origanum vulgare* (orégano) y *Ocimum basilicum* (albahaca), para su estudio sinérgico y comprobar su efecto en *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* elaborada por Mora y Vargas en el 2018, establecieron que se evaluó la actividad antibacteriana de los tres aceites frente a *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, mediante el proceso de microdilución y obteniéndose la concentración mínima inhibitoria de cada aceite frente a cada una de las bacterias. Se concluyó que se obtuvieron los porcentajes de concentración mínima inhibitoria para cada una de las bacterias, tales como: *Staphylococcus*

aureus, la CMI del aceite esencial de albahaca fue de 6.25%, canela fue de 0.19% y orégano 6.25%. Por otra parte, las CMI de los aceites esenciales de albahaca, canela y orégano frente a *Escherichia coli*, fueron de 6.25%, 0.19% y 1.56%, respectivamente. Los aceites esenciales de albahaca, canela y orégano mostraron CMI de 1.56%, 0.19% y 6.25% respectivamente, frente a *Salmonella enterica*. Para *Pseudomona aeruginosa*, los aceites esenciales de albahaca, orégano y canela mostraron CMI de 50%, 6.25% y 0.19%, respectivamente.

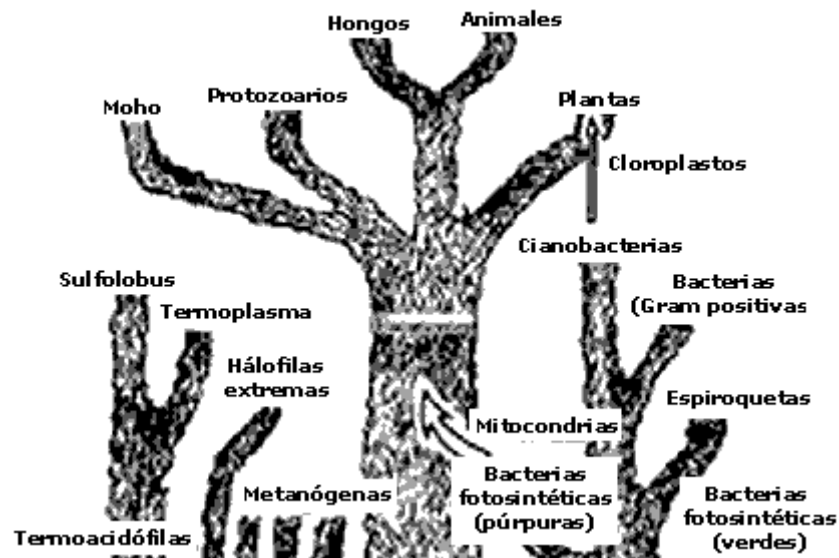
En la tesis “Evaluación de las propiedades antimicrobianas de los extractos de corteza y de las hojas de *Byrsonima crassifolia* (nance) frente a bacterias gram positivo y gram negativo y valoración de su posible actividad antifúngica frente a *Candida albicans*”, elaborado por Elizondo y Marín en el 2020, establecieron mediante pruebas microbiológicas que tanto los extractos acuosos como etanólicos de hojas y corteza del nance presentaron actividad antimicrobiana y antifúngica frente a los patógenos analizados, así mismo demostraron que al aumentar la concentración del extracto acuoso de corteza, se incrementa de forma análoga la inhibición que provoca en las bacterias y el hongo. Como conclusión más relevante establecieron que el extracto acuoso de corteza se cataloga como de amplio espectro al inhibir tanto el *Staphylococcus aureus* (gram positivo) como en la *Pseudomona aeruginosa* (gram negativo).

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

Bacterias

Hace más o menos 3800 millones de años se cree inició la vida en el planeta, sin embargo, se estima que estuvo habitado únicamente por bacterias en los primeros 2000 a 2500 millones de años, que las mismas evolucionaron por las condiciones expuestas y esto ayudó que aparecieran formas más complejas de vida. Así como también desarrollar variaciones en su nutrición. (Antolinez, Bohórquez, Constanza y Corredor, 2015)

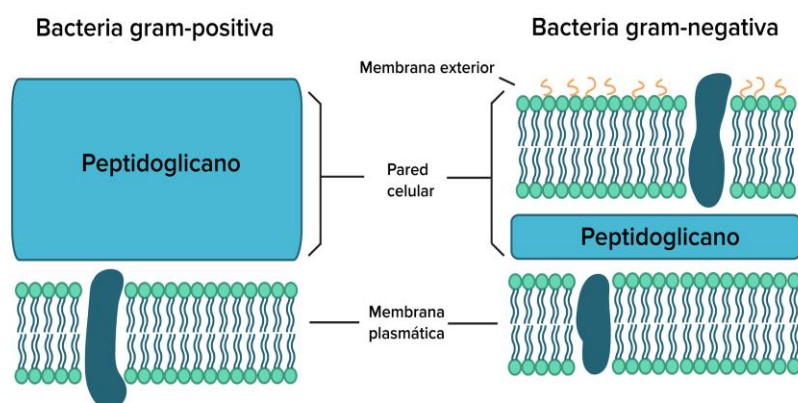
Figura 1. Darwin y las bacterias



Fuente: Ledermann, 2008.

Patiño en el 2003, menciona que las bacterias son microorganismos bastante complejos, que cuando estas se relacionan en los tejidos de mamíferos ocupan sostener su integridad en el momento que infectan al ser humano, por eso han evolucionado mejorando su pared celular rígida. La inhibición de la síntesis de la pared bacteriana tiene habitualmente un efecto bactericida. La pared de estos microorganismos se encuentra constituida por una estructura llamada comúnmente peptidoglicano, la cual está dividida por tres destacadas etapas y cada una de estas es inhibida por un determinado grupo de antibióticos.

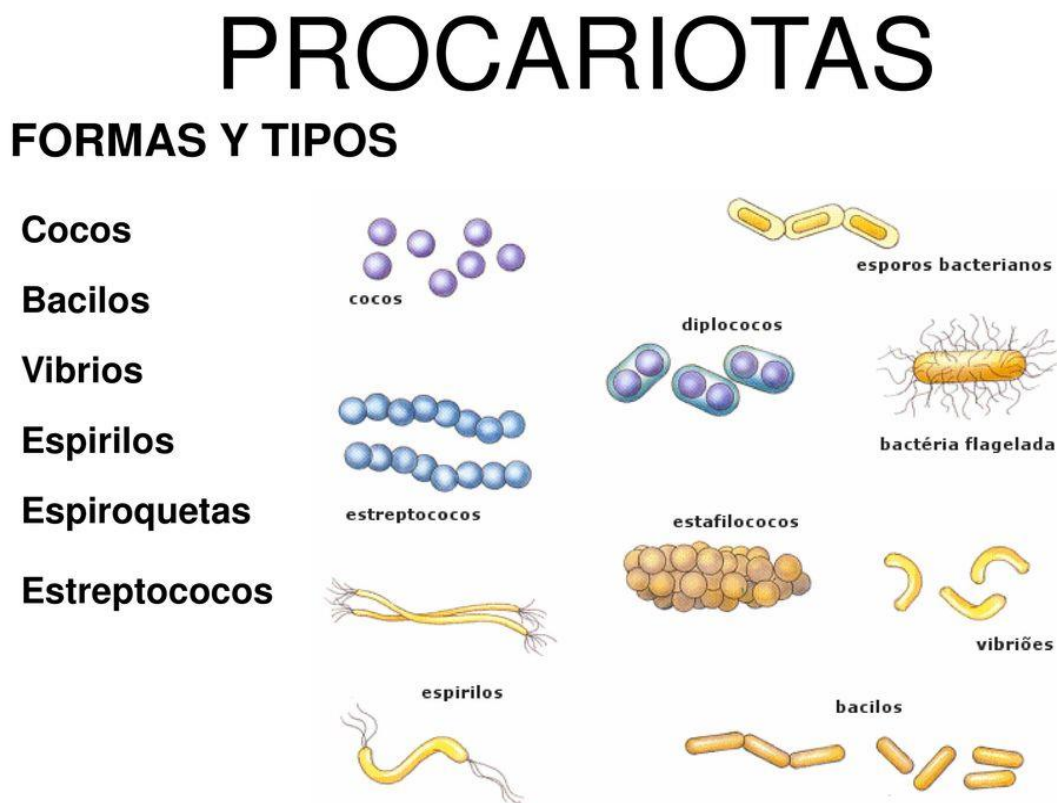
Figura 2. Constitución de la Pared Bacteriana.



Fuente: Caín, 2011.

El reino procariota, es la clasificación de los seres vivos que presenta a las bacterias, las cuales tienen la capacidad de reproducirse mediante una técnica llamada fisión binaria, la cual consiste en hacer replications de su ADN en el tiempo, lo anterior ocasiona que estas presenten el mismo genoma reproducido a cada célula progenitora. No existe una diferencia fácilmente distinguible cuando se realiza un análisis mediante microscopio, pero se puede observar la detección de tres formas: las figuras esféricas denominadas cocos, las espirales llamadas espirilos, espiroquetas, comas o vibriones que presentan diferentes cualidades entre ellas y las alargadas mencionadas bacilos. (Kuno y Vargas, 2014)

Figura 3. Formas de las Bacterias en el Reino Procariota.



Fuente: Parra, 2018.

Según lo que establece Romero en el 2007, en general:

Las bacterias miden entre 1 y 6 micras de longitud y solo algunos espirilos o filamentosos llegan a medir 40 o 50 micras. Las principales estructuras que posee una bacteria son la cápsula, pared, membrana citoplasmática, citoplasma, mesosoma, flagelos, pilis, núcleo, plásmidos, vacuolas y las esporas.

Kuno y Vargas en el 2014, mencionan las formas específicamente esféricas, que son microorganismos que poseen agrupaciones homólogas, con un tamaño aproximado de 0.8m y 0.10m, es importante recalcar que estas células por su característica de mantenerse unidas, alcanzan a tomar diversas figuras o formas, posterior a la división celular. También, mencionan que entre ellas se encuentran los seres vivos diplococos, tétradas, sarcinas, estreptococos y estafilococos.

El grupo característico denominado bacilos, permite las formaciones y agrupaciones suficientemente heterogéneas, debido a que se caracterizan por tener una gran variedad de tipos y subtipos morfológicos correspondientes. Algunas de las formas que se pueden destacar son: cilíndricas, largas y delgadas, con figura de bastón, afilada o redondeada y con extremos rectos. De igual manera presentan la tendencia de unir a las células varias figuras o formas y podemos mencionar algunos ejemplos como: empalizado y formas filamentosas, diplobacilos y estreptobacilos. (Kuno y Vargas, 2014)

Además, comentan que también hay un tipo de microorganismo en las bacterias que es apodado como espirilos, el cual puede poseer una característica de que puede desarrollar todas las figuras o formas, ya sean de una o varias curvaturas y que hasta inclusive presentan formas de hélice. Además, entre las células mencionadas, hay desviaciones con respecto a sus cualidades propias, es decir, vibriones, espirilos y espiroquetas. (Kuno y Vargas, 2014)

La vida en el planeta tierra se mantiene gracias a las bacterias y aunque es solamente conocido un 1% de la diversidad que poseen, muchas de estas bacterias pueden ser beneficiosas para actividades agrícolas, biomédicas y de biorremediación, entre otros ámbitos. Actualmente a nivel mundial existe un interés en descubrir y analizar más a las viejas y nuevas especies de estos microorganismos, para estudiar las funciones que desempeñan los genes de algunas de

estas en interés, mediante procesos de mutagénesis y secuenciación. No obstante, es necesario que existan métodos para preservar las bacterias para estudios a futuro en las mismas. (De la Torre et al, 2010)

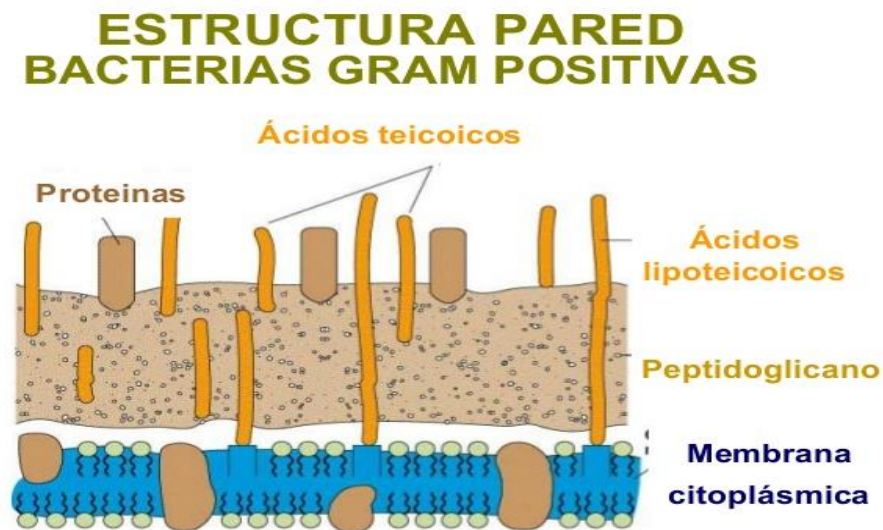
Estas bacterias como todos los seres vivos exhiben mecanismos biológicos, que las facultan para adecuarse a diversas presiones ambientales. Aunque la resistencia a los antibióticos es una expresión natural de la evolución y genética bacteriana, ciertos factores también contribuyen al aumento de la expresión y diseminación de esta característica inherente. El incremento en el uso de antibióticos y la respectiva presión selectiva que ejercen, es el factor más importante que contribuye a la aparición de diversas clases de resistencia bacteriana. En los últimos sesenta años se ha hecho notorio el impacto de la respuesta de estos microorganismos a la presión selectiva que ejercen los antisépticos y desinfectantes, así como los compuestos quimioterapéuticos más utilizados en los brotes de infecciones en los hospitales del mundo. (Cabrera, Gómez y Zúñiga, 2007)

Según Mora en el 2012, existen diversos fundamentos para la diferenciación de los dos grupos pertenecientes a las bacterias, los cuales son bacterias gram positivas y bacterias gram negativas que se basan íntegra y exclusivamente en las características distintivas de las paredes celulares entre los dos grupos anteriormente mencionados. El peptidoglicano es el componente clave y más conocido para la pared celular, porque permite formar una gruesa capa en las bacterias gram positivas, mientras que tienen una capa delgada en las bacterias gram negativas.

Bacterias Gram Positivas

La prueba de tinción de Gram es una herramienta que permite denominar a las bacterias gram positivas, cuando todas aquellas son capaces de mantener la tinción de color azul-violeta durante la prueba. Esto se observa porque estas bacterias presentan una pared gruesa compuesta de peptidoglucanos y polímeros y que, además, son impermeables, lo que genera que estas puedan resistir la decoloración durante el examen. (Arenas y Rodríguez, 2018)

Figura 4. Estructura de la Pared Celular en Bacterias Gram-positivas



Fuente: Aparicio, 2014.

Según Barrera y Méndez en el 2016, comentan que estas bacterias son agentes etiológicos que han ido elevando su permanencia y prevalencia durante el desarrollo de enfermedades, formando parte como algunos de los microorganismos principales de estos, podemos mencionar al *Staphylococcus aureus*. El *Staphylococcus aureus* y el *Streptococcus pyogenes* presentan en sus componentes partículas que se determinan como algunos patrones moleculares que se pueden relacionar o asociar como patógenos, ejemplo de esto es el caso del peptidoglicano, las lipoproteínas, el ácido teicoico y los llamados superantígenos que permiten la activación del sistema inmune adaptativo.

Asimismo, Barrera y Méndez (2016), también mencionan específicamente a los peptidoglicanos que poseen las bacterias gram positivas, estas disponen de unas 40 a 80 capas, son consideradas grandes macromoléculas, que alrededor de la célula forman un sáculo, el cual lo conforman cadenas con enlaces beta 1-4 entre moléculas de glicanos alternadas del tipo N-Acetilglucosamina (GlcNAc) y Ácido N acetilmurámico (MurNAc). El ácido teicoico con la adición de azúcares como α -galactosa o N-acetil glucosamina, además de la alteración de la cadena peptídica o de las moléculas de glicanos (8 NAM – NAG) del peptidoglicano, se consideran algunos de los mecanismos de evasión del sistema inmune con que cuentan las bacterias gram positivas.

Staphylococcus aureus

La bacteria anaerobia facultativa *Staphylococcus aureus* o estafilococo dorado, fue determinado por primera vez en el año 1880 por medio del Dr. cirujano Alexander Ogston, el cual lo encontró como un agente causal de una gran mayoría de abscesos ubicados en las partes blandas de los pacientes examinados. Se dice que este elemento puede generar enfermedades o patologías caracterizadas por presentar signos de lesiones inflamatorias con contenido purulento, pudiendo progresar hasta estructuras más profundas y llegar diseminando hasta el torrente sanguíneo, produciendo lesiones similares, pero en cualquier sitio del cuerpo del paciente. (Echeverría, 2003)

Según Cervantes, García y Salazar en el 2014, establecen sobre *Staphylococcus*, que pertenecen al género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 μm , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Ogston introdujo el nombre de *Staphylococcus*, del griego staphyle que significa racimo de uvas, para describir a los cocos responsables de inflamación y supuración. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas.

Como se mencionó, son cocos, gram positivos, aerobios facultativos, así como catalasa positiva por esto se pueden distinguir de los otros que pertenecen al género de cocos. Crecen en concentración de sal elevada hasta un 10%, sobreviven en temperaturas entre los 7°C hasta los 48°C y a un pH de 4 a 10. Sin embargo, se ha observado que para su desarrollo óptimo es de 37°C de temperatura y un pH de 5.20. (Vargas, 2015)

Estos géneros presentan una gran capacidad de adaptación, afectando a todas las demás especies conocidas de mamíferos, incluyendo a los roedores comunes que se utilizan en los laboratorios para su uso en pruebas científicas. Esta es una característica que permite a estas bacterias ser fáciles para su propagación, debido a que pueden transmitirse de una especie hacia otra, siendo una de las opciones más frecuentemente humano-animales o a su inversa. Es por esto que es importante conocer mejor a estos patógenos y además, su mecanismo de invasión utilizado. (Avalos, Soto y Zendejas, 2014)

Jawetz, Melnick y Adelberg en el 2011, mencionan que el *S. aureus* pueden provocar patologías en los humanos gracias a las variadas proteínas que producen y le otorgan su capacidad de colonizar en las personas, fabrican enzimas como nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasas, y además hemolisinas tipo alfa, beta, gamma y delta. La función de estas sustancias es la degradación de los tejidos locales del huésped y convertirlos en nutrientes para las bacterias.

En los neonatos, niños y adultos las infecciones provocadas por este patógeno tienen un desarrollo normal, estas se colonizan y el microorganismo se alberga generalmente en la nasofaringe, piel y poco común en la vagina. Este tipo de bacteria se puede contagiar de persona a persona, por aerosoles, mucosas o piel. (Cervantes, García y Salazar, 2014)

Según Galiana en el 2003, el *Staphylococcus aureus* es una causa frecuente de infección, tanto en el ámbito comunitario como en el hospitalario. Porque produce una amplia gama de enfermedades, desde infecciones cutáneas superficiales a infecciones de partes blandas y osteoarticulares como abscesos profundos, celulitis, infección de heridas quirúrgicas, osteomielitis, etcétera; de las cuales es el agente más frecuentemente aislado, pudiendo estas infecciones alcanzar situaciones de gravedad extrema con riesgo de vida. También es un agente de sepsis, neumonías, endocarditis e infecciones del sistema nervioso central. Algunas cepas de este microorganismo causan enfermedades mediadas por toxinas, como toxi-infecciones alimentarias, síndrome del shock tóxico y síndromes escarlatiniformes.

El *S.aureus* es considerado en el ser humano como flora normal, colonizando diferentes lugares como lo son la mucosa nasal, piel y nasofaringe, aunque se sopesa que generalmente su infección cursa sin mayores complicaciones, se puede deducir que en personas con inmunosupresión se puede desarrollar como grave y provocar abscesos, septicemias, gastroenteritis y endocarditis. (Vargas, 2015)

Generalmente este microorganismo se desarrolla más fácilmente en zonas húmedas como lo son pliegues inguinales y axilares, así como en la nasofaringe. Se ha observado que en ciertas ocasiones las personas pueden ser portadores ya sea permanentes o intermitentes, además, se conoce que este patógeno se transmite de igual manera por alimentos. (Vargas, 2015)

Figura 5. Microorganismo *Staphylococcus aureus*



Fuente: Canet, 2019

Clasificación Taxonómica

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de *Staphylococcus aureus*

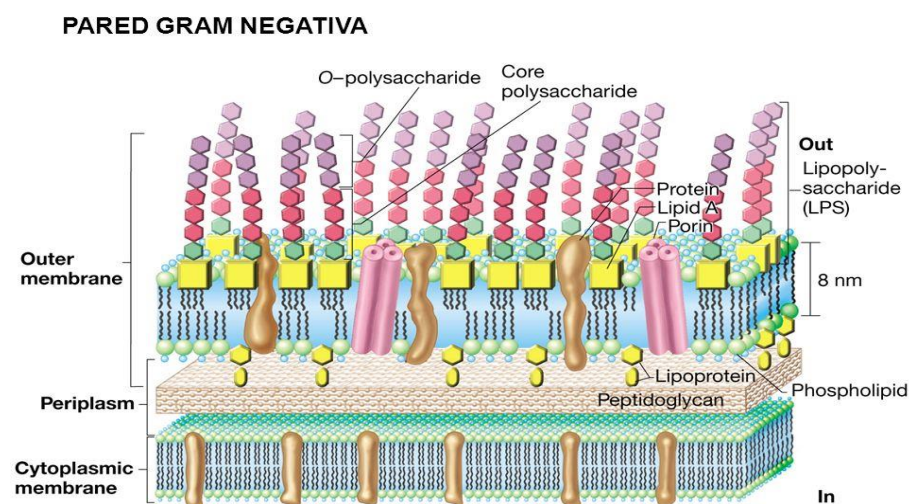
Categoría taxonómica	Clasificación científica
Dominio	Bacteria
Reino	Prokaryotae
División	Firmicutes
Clase	Bacili
Orden	Bacillales
Familia	Micrococcaceae
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>S.aureus</i>

Fuente: Cordero *et al*, 2007

Bacterias Gram Negativas

Según Mollinedo y Gonzáles en el 2014, gracias al bacteriólogo danés Hans Christian Joachim Gramen 1844, que desarrolló la técnica de coloración denominada Tinción de Gram durante sus años de aportes científicos. Se decreta que una cualidad de las bacterias gram negativas, es que estas poseen una pared celular delgada, además de que están unidas por lipoproteínas a otra membrana plasmática externa, la cual es soluble en solventes orgánicos y la capa de peptidoglucano es muy delgada y no retiene el complejo de cristal violeta, y por lo tanto no es posible su tinción azul violácea.

Figura 6. Estructura de la Pared Celular en Bacterias Gram-negativas



Fuente: Núñez, 2016

Estas bacterias gram negativas se pueden clasificar según sea su necesidad de oxígeno para mantenerse con vida, por consiguiente se puede mencionar la siguiente clasificación de las mismas: bacterias aerobias estrictas, en las cuales se cuentan con bacilos y cocos aerobios como el género *Campylobacter* y las pseudomonas, bacterias anaerobias estrictas que presenta *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella* y *Porphyromonas*, por último se tienen las bacterias anaerobias facultativas las que pertenecen a esta división son las bacterias de la familia de *Enterobacteriaceae*, entre las cuales tenemos la *Escherichia coli*, *Salmonellas*, *Serratia*, *Shigellas* y la *Klebsiella*. (Mollinedo y Gonzáles, 2014)

Klebsiella pneumoniae

Chaves (2013), establece que esta bacteria:

Son bacilos rectos, de 0,3-1,0 μm de diámetro y 0,6-6,0 μm de longitud. Las células se disponen individualmente, en parejas o en cadenas cortas. Son inmóviles, gram negativas y la mayor parte capsuladas. En los cultivos en medios sólidos, las cepas que producen cápsula permiten observar colonias mucosas de una consistencia viscosa. Estructuralmente al ser gramnegativas, presentan el citoplasma envuelto por una membrana citoplasmática o interna, el peptidoglicano, el espacio periplásmico, y una membrana externa. Adicionalmente, algunas cepas poseen fimbrias (pilis).

A esta bacteria se le considera un patógeno oportunista, ya que infecta a pacientes inmunosuprimidos, además, de recién nacidos hospitalizados en unidades neonatales. Sus afecciones más comunes son las que se producen en el torrente sanguíneo, neumonía, infección urinaria, heridas quirúrgicas y de tejidos blandos, enterocolitis, meningitis, conjuntivitis, absceso renal, endocarditis y bacteriemia. (Alfaro *et al*, 2007)

Como se mencionó, la *Klebsiella pneumoniae*, se encuentra mayoritariamente en hospitales, por esto se aísla regularmente en unidades de cuidado intensivos como enfermedades nosocomiales, así, también es muy común en áreas de pediatría. Por esta razón se ha observado que, en las cepas encontradas recientemente en estas zonas, presentan cepas resistentes a las cefalosporinas de tercera generación, con demostración de resistencia a otros antibióticos. (Alpuche *et al*, 2004)

Por el aumento de esta resistencia que se ha observado en las áreas de los hospitales, a esta bacteria se le ha asociado con que puede incrementar tanto la morbilidad y la mortalidad de los pacientes, principalmente los encontrados en cuidados intensivos y servicios quirúrgicos, su patogenicidad puede complicar otras enfermedades con las que cuenta el paciente internado o inmunosupresor, aumenta su letalidad. (Cruz *et al*, 2013)

Se considera que la resistencia con la que cuenta la *Klebsiella pneumoniae* se debe a la producción de β -lactamasas de espectro extendido (β LEE), estas enzimas tienen el poder

de hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro. Esta aparición se considera como la principal causa de resistencia de este microorganismo, lo anterior porque complica el tratamiento de estas infecciones, por su resistencia a los β -lactámicos, así como a los antimicrobianos de distintas familias. (Cruz *et al*, 2013)

Figura 7. Microorganismo *Klebsiella pneumoniae*



Fuente: Aguilar, 2018

Clasificación Taxonómica

Tabla 2. Clasificación Taxonómica de *Klebsiella pneumoniae*

Clasificación Taxonómica	Clasificación científica
Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Klebsiella</i>
Especie	<i>Pneumoniae</i>

Fuente: Cubero, 2015

Escherichia coli

El pediatra alemán Escherich, en 1885 descubrió y aisló la *Escherichia coli*, la cual se encuentra habitualmente en el intestino. En un inicio esta bacteria era conocida como *Bacterium coli commune*. Pero en el año 1919, los investigadores Castellani y Chalmers, le cambiaron esa denominación por *Escherichia*, para honrar a su descubridor Escherich. La especie más común es la conocida como *Escherichia coli*. (Canet, 2016)

Rodríguez en el 2002, menciona que esta bacteria es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae. Se considera que la *Escherichia coli* forma parte de la flora intestinal normal de los humanos, esto porque prácticamente desde su nacimiento se ha descubierto que coloniza el intestino de los niños. Sin embargo, se conocen cepas que pueden llegar a ser patógenas y causan enfermedades, como lo es la diarrea.

De acuerdo a investigaciones anteriores esta bacteria cuenta con seis patotipos, estos se pueden asociar a los cuadros diarreicos que provoca la *E.coli*, por medio de los factores de virulencia y mecanismos de patogenicidad. Específicamente estos patotipos serían: *E. coli* enteropatógeno (ECEP), *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* entero invasora (ECEI), *E. coli* shigatoxigénica (ECST), *E. coli* enteroagregativa (ECEA), *E. coli* adherente difusa (ECAD) y *E. coli* adherente invasiva (ECAI). De los anteriores la *E. coli* enteropatógeno es la que se ha asociado principalmente al vómito y fiebre de los lactantes. (Ariza, Farfán y Vargas, 2016)

La *Escherichia coli*, es una bacteria que se encuentra presente en una mayor concentración en la microflora intestinal normal del ser humano. Sin embargo, es posible que la *E. coli* en otras partes del cuerpo puede causar patologías graves, como afecciones de las vías urinarias, bacteriemia y meningitis (Oderiz, Leotta y Galli).

La exploración de la enterobacteria *Escherichia coli* es posible llevarla a cabo mediante un determinado análisis de ADN, el cual es capaz de permitir amplificar genes de virulencia específicos para cada uno de los tipos de *E. coli* diarreogénicos. (Estrada, López, Saucedo, Thompson, López, y Rosado, 2009)

La resistencia bacteriana de la gram negativa *Escherichia coli* a respectivos antibióticos está relacionada con el consumo de estos, debido a que la presión selectiva que ejercen, favorece la adaptación, creación y diseminación de mecanismos de resistencia a los antimicrobianos. La preponderancia aumentada de las resistencias hace indispensable orientar racionalmente el tratamiento empírico de la infección urinaria en el medio extrahospitalario, lo que constituye una práctica habitual y recomendada, que los laboratorios de microbiología informen periódicamente a los clínicos de los patrones que se presenten de sensibilidad de las bacterias potencialmente causantes de infección en cada área geográfica. (Fuster et al, 2003)

Razón a la resistencia bacteriana a nivel mundial, Mosquito, et al. (2011) analizaron la importancia e interés de revisar y analizar los mecanismos moleculares más generales o universales de resistencia presentes en la *E. coli*, con la finalidad de proporcionar a las personas del área biomédica, información actualizada, veraz y resumida sobre estos mecanismos, para poder así conocer e interpretar mejor este problema en la literatura médica. El aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos ha complicado la visión terapéutica de los pacientes infectados, por lo que ha llegado a ser un problema a nivel mundial presente en múltiples bacterias, en especial en la *Escherichia coli*, que tiene valores altos de resistencia a los antibióticos conocidos, lo que se convierte en un torpecimiento en el momento determinado para el tratamiento antibiótico requerido.

La *Escherichia coli* tiene como característica que presenta en el laboratorio clínico una forma de cultivo propicio, pero la identificación de los diferentes genotipos patógenos requiere de métodos de detección de genes de virulencia. Pasado el tiempo del descubrimiento de esta bacteria se decidió que, este microorganismo habita en el agua y en el suelo, como resultado de una contaminación fecal. Tradicionalmente, su treinta y tres detecciones se ha usado como un indicador de agua no potable y, además, de mala calidad de los alimentos. (Salas, 2014)

Figura 8. Microorganismo *Escherichia coli*



Fuente: McCullough, 2019

Clasificación taxonómica

Tabla 3. Clasificación Taxonómica de *Escherichia coli*

Clasificación Taxonómica	Clasificación científica
Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>Coli</i>

Fuente: Janon, 2016

Salmonella typhi

Esta bacteria fue descubierta por Theobald Smith en el año de 1855. Esta aparición se dio primeramente en los intestinos de los cerdos que estaban infectados por la peste porcina clásica. Su nombre deriva del Dr. Daniel Elmer Salmon, quien fue compañero de investigación de Smith, el cual fue un patólogo estadounidense. Se conoce que la nomenclatura de esta bacteria es controvertida y sigue evolucionando. (Ab *et al*, 2015)

Figura 9. Microorganismo *Salmonella typhi*



Fuente: Krieger, 2018

Clasificación Taxonómica**Tabla 4. Clasificación Taxonómica de *Salmonella typhi***

Clasificación Taxonómica	Clasificación científica
Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Salmonella</i>
Especie	<i>Typhi</i>

La *Salmonella typhi* es un microorganismo categorizado en bacilo gram negativo, el cual presenta características específicas para su morfología. Es decir, son bacterias que pueden medir de 0,7-1,5 μm por 2-5 μm , poseer movilidad y no esporulencia. Entonces, por lo general no son capaces de producir gases, pero sí SH_2 . De igual manera, en su estructura está presente una colección de antígenos como, por ejemplo: el antígeno H, el antígeno K, el antígeno O y el principal antígeno característico de la especie typhi que es el Vi. (Basualdo, Coto & Torres, 2006)

El serotipo de la bacteria *S. typhi* se califica por la sobrevivencia que presentan los macrófagos a nivel intracelular, esto se da porque el bacilo tiene la capacidad de inhibir la detonación catabólica de la oxidación y genera que se siga multiplicando. De acuerdo a esto, es transportado por medio de la circulación linfática a los ganglios linfáticos, bazo, hígado y médula ósea. La *Salmonella typhi* reacciona generando una contestación mononuclear y una irritación, la cual no tiene la capacidad de desencadenar una diarrea. (Ray y Ryan, 2011).

La vía por donde es posible contagiarse del microorganismo es mediante de la ingestión del mismo, comenzando a recorrer el estómago, viajando hacia los intestinos, específicamente el intestino delgado, lugar donde se reconoce que este bacilo posee una adherencia a la mucosa y

que de allí le permite desarrollarse hacia lo que son los micropliegues de las células M, que están localizados en los enterocitos. Existe, además, otra vía común por donde también es conocida la ruta de transporte de la *S. typhi*, es el medio del citoplasma. (Murray, Pfaller & Rosenthal, 2014)

Es importante mencionar y destacar que hay un único y específico hospedero para la *Salmonella typhi*: el ser humano. Se caracteriza que este microorganismo puede introducirse al ser humano, albergando el área de la vesícula biliar y luego de eso estableciéndose en estado de portador crónico. Se habla que la gran cantidad de estas afecciones son por medio del consumo de alimentos en estado contaminado y en niños que tienden a realizar contagios de manera fecal-oral. (Murray, Pfaller & Rosenthal, 2014)

La *S. typhi* causa lo que es un tipo de enfermedad febril denominada fiebre tifoidea, que posee peculiaridades como: un periodo de incubación de aproximado de 7-14 días, con síntomas relacionados o anexos a esta enfermedad que son: constipación, decaimiento y fiebre. Asimismo, durante el período de días ya anteriormente mencionado, el bacilo actúa penetrando en el intestino delgado y posteriormente, se dirige a ganglios linfáticos afectándolos. (Basualdo, Coto & Torres, 2006).

Se acentúa que uno de los principales antibióticos con gran utilidad a lo largo de los años para combatir la enfermedad producida por la *Salmonella typhi* Fiebre tifoidea fue el Cloranfenicol. Sin embargo, al darse un gran uso de este antibiótico se provocó una alta resistencia ante este fármaco. Es por esto, que se ha ido incursionando el uso de otras terapias antibióticas que permitan combatir esa resistencia, como lo son: Ampicilina, Trimetoprim sulfametoxazol (TMP/SMX), Amoxicilina, Ácido nalidíxico, Ciprofloxacina, Ofloxacino y Ceftriaxona. (Lopes, Mota, Ramos, Santos & Souza, 2010)

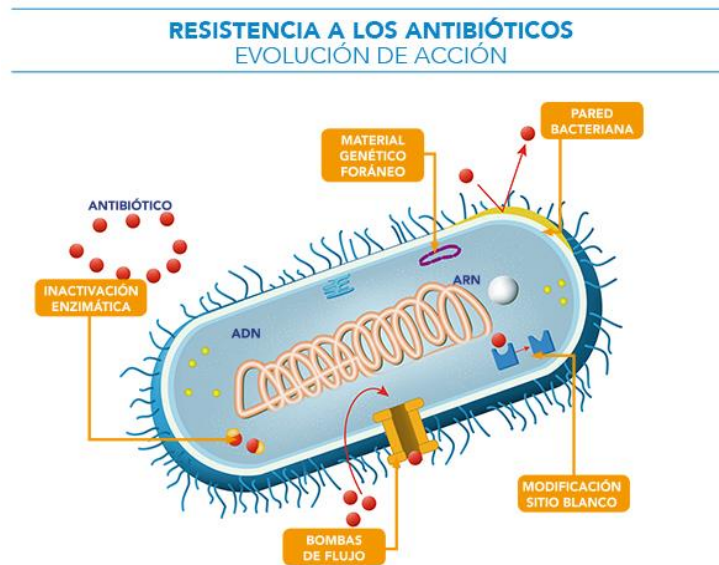
Resistencia Bacteriana

Características

Este tipo de resistencia también conocida como farmacorresistencia, se produce cuando las bacterias, virus, hongos o parásitos se vuelven inmunes a los medicamentos que se utilizan para tratarlas y que anteriormente eran eficaces contra ellas. Existen bacterias que son resistentes a más de un fármaco, a estas se les conoce como ultrarresistentes. El término resistencia a los antimicrobianos, engloba a diferentes tipos de microorganismos y de

medicamentos como lo son antibacterianos, antivirales, antiparasitarios y anti fungicidas. (Serra, 2017)

Figura 10. Resistencia Bacteriana



Fuente: Murillo, 2020

Esta inmunidad se debe a la capacidad que desarrollan los microorganismos de poder protegerse de los antimicrobianos y el efecto que estos tienen contra ellas. Un aspecto relevante es que la resistencia que manifiestan se puede deber a varias razones, como lo es una selección natural ocurriendo esta al azar o por una aplicación de presión selectiva en una población específica. (Aguilar y Calderón, 2016)

Específicamente, la resistencia natural, es aquella capacidad que tienen las cepas de una especie específica de bacterias además de un mecanismo permanente, y que se conoce de manera certera que no cuenta con ningún tipo de relación con algún medicamento, sino se considera que se da de una manera genética. Como ejemplo de lo anterior, se cuenta con la *Klebsiella pneumoniae* por su fabricación de betalactamasas que son resistentes a la penicilina. (Pérez y Robles, 2013)

Caso contrario, la resistencia adquirida, se considera que es específica de cada bacteria, ya que son naturalmente sensibles a un antimicrobiano, sin embargo, esto puede llegar a cambiar por alguna variación o producción de genes de resistencia, en consecuencia, ocasiona que esta característica de sensibilidad se pierda y se vuelvan resistentes. Los fármacos más

afectados son los beta-lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicol y sulfamida. (Pérez y Robles, 2013)

Sin importar el tipo de resistencia, ambas ocasionan lo mismo, provocan que la bacteria no tenga sensibilidad frente al antimicrobiano que se utiliza para tratarla, por lo que su efecto al contrarrestar la infección se ve incapaz de realizarla y por lo tanto esta se puede complicar y resultar ser inclusive mortal para el paciente que la padece. (León y Vázquez, 2013)

Un aspecto que se considera que ha favorecido el incremento de la resistencia bacteriana de los fármacos es el uso indiscriminado de los mismos en los hospitales, ya que se sopesa que tiene relación esto porque las cepas cambian sus mecanismos y provoca que se pierda la sensibilidad y aumenta la resistencia, esto deja en muchas ocasiones que las terapias que se conocen para tratarlos sean ineficaces, en la actualidad se conoce que un gran número de bacterias presentan multirresistencia. (Serra, 2017)

Por el incremento de la multirresistencia que se ha observado en los últimos años, ha llegado a afectar la elaboración de nuevos fármacos ya que se da la aparición de bacterias, hongos y virus que desde su origen los mecanismos que presentan, tienen características defensivas que promueven la destrucción de los antimicrobianos (Fernández, 2003). Lo anterior provoca que su efecto disminuya de forma drástica, prolongue el tratamiento y el tiempo de enfermedad, así como también aumenta el riesgo de mortalidad. (Serra, 2017)

Según Gutiérrez, Muñoz y Sánchez (2012), las bacterias pueden desarrollar mecanismos que les ayudan para trasladar de un microorganismo a otro, genes que provocan la resistencia, se debe considerar que esta característica se da sin importar si son de la misma o distinta especie. Se cree que esta particularidad es la causante del crecimiento acelerado de resistencia a los antibióticos. Es conocido que esta transferencia se da por diferentes métodos, como lo son los plásmidos, las secuencias de inserción (IS), los integrones, los transposones (Tn) y los bacteriófagos.

Se puede conocer el porqué es posible para las bacterias transferir su capacidad de resistencia a los fármacos, gracias a las bases genéticas de las mismas. Hans Winkler descubrió que toda célula cuenta con ADN, y para denominarlo propuso el término de genoma, esto en 1920. De igual manera, se demuestra que la gran mayoría del cromosoma bacteriano está contenido en el nucleóide, donde el ADN no cuenta con ninguna membrana que lo confine. (Gutiérrez, Muñoz y Sánchez, 2012)

Los plásmidos pueden generar traslado de genes de una bacteria a otra, propiamente dicho, estas moléculas son extra cromosomales, son de pequeño tamaño generalmente no mayor de un 20% del tamaño de un cromosoma, también se les conoce como replicones, esto porque tienen la capacidad de replicarse fácilmente, además se debe tomar en cuenta que no tienen relación con la replicación del cromosoma bacteriano. Sin embargo, contienen información genética importante, ya que favorece a la transmisión de los genes de resistencia de los microorganismos, esto porque contiene genes como los que codifican las proteínas, estas son las que ocasionan la resistencia a los fármacos, se debe considerar que un plásmido puede provocar multiresistencia a los medicamentos. (Gutiérrez, Muñoz y Sánchez, 2012)

Estas moléculas son las responsables de una gran cantidad de resistencia, como es el caso de la producción de betalactamasa de la *Klebsiella*, el *Staphylococcus* y su resistencia a la meticilina, e inclusive se le asocia con la multiresistencia que en los últimos tiempos se le ha observado a la *Escherichia coli* y también a la *Klebsiella pneumoniae*. (Gutiérrez, Muñoz y Sánchez, 2012)

Igualmente, los transposones y las secuencias de inserción, fueron descubiertas por Barbara McClintock en 1947, ya que evidenció la presencia de elementos móviles en el ADN, por esto se les considera genes que ayudan a la movilidad dentro del genoma. De manera específica los transposones tienen la característica de desplazarse de forma autónoma a otras partes del genoma de una célula, lo que facilita las mutaciones del ADN. Se cuentan con transposones sencillos o compuestos, donde la característica de resistencia a los medicamentos se debe a que los transposones compuestos portan genes que lo favorecen. esta resistencia. (Gutiérrez, Muñoz y Sánchez, 2012)

Mecanismo de Acción

Según Echeverría en 1998, establecen que el mecanismo de acción de la resistencia bacteriana:

Para trabajar, un antibiótico requiere ingresar a la bacteria, mantenerse intacto hasta llegar a su lugar de acción y luego unirse al punto donde va a ejercer su función en la bacteria. Uno de los mecanismos más usados por la bacteria es disminuir o evitar la presencia del antibiótico en su interior modificando su permeabilidad, alterando su mecanismo de transporte activo en la membrana celular o generando mecanismos de eliminación activa del antibiótico.

Si un fármaco logra sobrepasar lo anterior, se encontrará con enzimas que son liberadas por los microorganismos que son las causantes de provocar la inactivación y destrucción del fármaco. Para demostrar lo dicho, se cuenta con las betalactamasas que son las que destruyen el anillo betalactámico que están presentes en las penicilinas y cefalosporinas o las fosforilasas y acetilasas que inactivan a los aminoglucósidos. (Echevarría, 1998)

Otro método, es el cambio de puntos de unión para los fármacos, esto favorece la inactivación de la acción antimicrobiana del mismo, como se observa en el estafilococo meticilino resistente, el neumococo penicilina resistente y el enterococo multirresistente. Al modificar la información genética, se logra desarrollar mecanismos que protegen a la bacteria de los antibióticos, sin importar si es una variación pequeña o cambios en grandes segmentos de su código genético (transposomas). Es importante recalcar que esta información se puede guardar y liberar cuando sea necesario, así también transmitirla en la misma o distinta especie por medio de plásmidos o bacteriófagos. (Echevarría, 1998)

Alternativas Terapéuticas

En la antigüedad se utilizaban distintas sustancias para tratar patologías, como era el uso de sustancias de origen animal, vegetal o mineral, ya que al utilizarlas se les atribuía propiedades curativas. Sin embargo, el primer fármaco sintético se descubrió hasta el año de 1885, el cual fue acetofenidina lo cual lo comercializaron con el nombre de Phenacetin, el cual cuenta con características analgésicas y en 1889 se produjo el ácido acetilsalicílico que fue el segundo de importancia. (Lifshit, 2011)

Mancebo, Regalado y Sánchez en el 2012, establecen que como se conoce el hombre a descubierto por la necesidad la función terapéutica que tienen las plantas para con la salud, y en el tratamiento de las enfermedades. De igual manera mencionan que la Organización Mundial de la Salud (OMS), establece que en promedio un 80% de la población utiliza las plantas para contrarrestar los problemas de salud que los aquejan y en muchas ocasiones lo hacen de forma frecuente. Cabe destacar que lo que se utilizan son los extractos o principios activos que ellas producen.

Debido al aumento en la resistencia que se ha venido observando en los últimos tiempos, se ha visto incrementado los estudios con respecto a descubrir alternativas que sean utilizadas para tratar patologías relacionadas con bacterias, hongos o parásitos, y encontrar una posible cura que sustituya la terapia actual. Esta problemática afecta a toda la población a nivel

mundial, teniendo grandes riesgos en la salud de las personas además de aumentar el costo del tratamiento al que son sometidas para tratar sus enfermedades. La OMS realizó estudios donde demostró que, al utilizar y aprovechar los recursos naturales en este campo, se pueden elaborar alternativas al tratamiento vigente. (Rodríguez, Sánchez y Zárate, 2017)

Como se mencionó los aceites esenciales obtenidos de las plantas, los cuales contienen metabolitos secundarios que son a los que se le atribuye su posible efecto terapéutico, son los más utilizados para tratar de crear alternativas de tratamiento. Entre los cuales tenemos flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, glicósidos, entre otros. (Arroyo, Barreda, Bonilla, Huamán y Ráez, 2010)

Gutiérrez y Peña (2017), mencionan que la combinación de estas sustancias tienen un efecto en una célula en específico, tanto en las bacterias gram positivas así como gram negativas esto generalmente en las que muestran sensibilidad, uno de los mecanismos es que al utilizar estos aceites esenciales, se introducen a través de los lípidos en la membrana celular del microorganismo y lo que ocasiona es que transforma la estructura y la vuelve más permeable, esto provoca que se dé un intercambio de iones con otros elementos, y de forma concurrente puede ocasionar la muerte celular.

Medicamentos a Bases de Extractos Naturales

Desde tiempos pasados los recursos naturales especialmente las plantas se les conocen que poseen propiedades para curar distintas enfermedades, y es bien sabido que gracias a estas cualidades participaron en el desarrollo y creación de la medicina que actualmente conocemos. Por la diferencia de ecosistemas con la que cuenta el planeta, existe una variedad importante de plantas medicinales. (Quesada, 2008)

Esto gracias a las propiedades que se les conocen a las plantas, hoy en día todavía son de uso principal para la creación y elaboración de nuevos tratamientos para modernizar la terapia actual. Gracias a la actualización de los procesos en los laboratorios farmacéuticos, se ha facilitado la extracción, purificación y verificación de la sustancia obtenida, así como la comprobación del posible efecto de la misma. Posterior a esta comparación se preparan las distintas formas farmacéuticas cumpliendo las especificaciones y controles de calidad establecidos. (Sáenz, 2004)

Actualmente se estima que cerca de un 25% del total de las medicinas que son producidas en los últimos años, son derivadas en forma parcial o total de los extractos que son obtenidos de las plantas. Por lo anterior, las empresas farmacéuticas orientan su investigación y desarrollo en la medicina tradicional basada en plantas naturales con propiedades farmacológicas. (Calixto, 2000)

Microbiología

Generalidades

La Microbiología es la ciencia que se encarga del estudio y análisis de los seres vivos muy pequeños, concretamente de aquellos cuyo tamaño se encuentra por debajo del poder resolutivo del ojo humano. Esto define que el objeto de esta disciplina sea determinado por la metodología apropiada para poner en evidencia y poder estudiar a los microorganismos. Indispensablemente, el origen tardío de la Microbiología con respecto a la relación a otras ciencias biológicas y el reconocimiento de las múltiples actividades desplegadas por los microorganismos, hay que atribuirle a la carencia, durante mucho tiempo, de los instrumentos y técnicas pertinentes. (Arana, Fernández, González y Sosa, 2014)

Figura 11. Microbiología.



Fuente: Valdés, 2020.

El asentamiento de la Microbiología como ciencia está estrechamente ligado a una serie de controversias seculares (con sus numerosas filtraciones de la filosofía e incluso de la religión de la época), que se prolongaron hasta finales del siglo XIX. La resolución de estas polémicas depende del desarrollo de una serie de estrategias experimentales fiables (esterilización, cultivos puros, perfeccionamiento de las técnicas microscópicas, etc.), que a su vez dieron nacimiento a un cuerpo coherente de conocimientos que constituye el núcleo aglutinador de la ciencia microbiológica. (Arana, Fernández, González y Sosa, 2014)

Tras la edad de oro de la bacteriología, inaugurada por las grandes figuras de Pasteur y Koch, la Microbiología quedó durante cierto tiempo como una disciplina descriptiva y aplicada, estrechamente imbricada con la Medicina, y con un desarrollo paralelo al de la Química, que le aportaría varios avances metodológicos fundamentales. Sin embargo, una corriente, en principio minoritaria, dedicada a los estudios básicos centrados con ciertas bacterias del suelo poseedoras de capacidades metabólicas especiales, incluyendo el descubrimiento de las que afectan a la nutrición de las plantas, logró hacer ver la ubicuidad ecológica y la extrema diversidad fisiológica de los microorganismos. (Arana, Fernández, González y Sosa, 2014)

Por último, la vertiente aplicada que estuvo en la base de la creación de la Microbiología, mantuvo su vigencia, enriquecida por continuos aportes de la investigación básica, y hoy muestra una impresionante “hoja de servicios” y una no menos prometedora perspectiva de expansión a múltiples campos de la actividad humana, desde el control de enfermedades infecciosas (higiene, vacunación, quimioterapia, antibioterapia) hasta el aprovechamiento económico racional de los múltiples procesos en los que se hallan implicados los microorganismos. (Arana, Fernández, González y Sosa, 2014)

La Microbiología, considerada como una ciencia especializada, no aparece hasta finales del siglo XIX, debido a la confluencia de una serie de procesos metodológicos que se habían empezado a incubar de manera lentamente en los siglos anteriores y que obligaron a una revisión de conceptos y prejuicios seculares sobre la dinámica del mundo vivo. Persiguiendo el clásico esquema de Collard (1976), podemos diferenciar cuatro etapas o periodos en el desarrollo de la Microbiología:

- Primera etapa, eminentemente especulativa, que se extiende desde la antigüedad hasta llegar a los primeros microscopistas. (Arana, Fernández, González y Sosa, 2014)

- Segunda etapa, de lenta acumulación de observaciones (desde 1675 aproximadamente hasta la mitad del siglo XIX), que arranca con el descubrimiento de los microorganismos por Leeuwenhoek (1675). (Arana, Fernández, González y Sosa, 2014)
- Tercera etapa, de cultivo de microorganismos, que llega hasta finales del siglo XIX, donde las figuras de Pasteur y Koch encabezan el logro de cristalizar a la Microbiología como ciencia experimental bien asentada. (Arana, Fernández, González y Sosa, 2014)
- Cuarta etapa (desde principios del siglo XX hasta nuestros días), en el que los microorganismos se estudian en toda su complejidad fisiológica, bioquímica, genética, ecológica, etc., y que supone un extraordinario crecimiento de la Microbiología, el surgimiento de disciplinas microbiológicas especializadas (Virología, Inmunología, etc), y la estrecha imbricación de las ciencias microbiológicas en el marco general de las Ciencias Biológicas. A continuación, se realiza un breve recorrido histórico de la disciplina microbiológica, desglosando los períodos 3° y 4° en varios apartados temáticos. (Arana, Fernández, González y Sosa, 2014)

Cultivo Microbiano

El cultivo microbiano está basado en el conocimiento de sus necesidades nutritivas y físicas. Este tipo de procedimiento se realiza en un laboratorio donde se cuentan con características y medios adecuados para la proliferación de estas bacterias. Existen distintos medios para este crecimiento entre estos tenemos los de consistencia líquida, denominado caldo o sólido este último si se le adiciona agar al caldo. El agar es un polisacárido, extraído de algas, que funciona como sustancia solidificante e inerte, ya que no actúa como elemento nutritivo frente a la gran mayoría de las bacterias. (Lopardo, 2016)

Figura 12. Cultivo Microbiano



Fuente: García, 2014

Otros puntos para tener en cuenta al momento de realizar este tipo de preparaciones son: la consistencia, el pH, el color, la transparencia (ausencia de precipitados, homogeneidad), temperatura adecuada en la disolución, esterilización y agregado de componentes como sangre, vitaminas o antibióticos. (Lopardo, 2016)

Agar

El agar es un polisacárido que se saca de algas de la clase Rhodophyceae, mejor conocidas como algas rojas. A pesar de que la purificación del agar fue hallada en el siglo XVII, no fue hasta en 1882 que su uso se extendió al campo de la bacteriología, cuando Robert Koch encontró que este producto presentaba ventajas sobre la gelatina al usarse en medios de cultivo. Antes de la Segunda Guerra Mundial, el país de Japón tenía el monopolio de producción de agar, debido a que presentaba abundantes reservas de algas y una industria bien organizada. Con el apareamiento del conflicto bélico, se redujo el suministro de agar a USA, como medida en su contra y surge entonces como solución inmediata, la recuperación del agar de medios de cultivo usados. Se publicaron varios procedimientos con tal propósito. (Acuña, Alvarado, Avendaño, León y Peña, 2016)

Figura 13. Agar



Fuente: Tomado de <https://www.britannica.com/topic/agar-seaweed-product>.

Siguiente a la II Guerra Mundial, se desistieron los intentos de recobrar el agar, debido a que se abocó todo intento a la producción del mismo. Esto justifica el hecho de que no haya bibliografía reciente al respecto. Hoy por hoy el agar-agar ha alcanzado un valor sumamente

elevado en el mercado mundial, lo cual unido a la crisis económica por la que atraviesa nuestro país y todos los países en vías de desarrollo, ha confinado su uso en algunos campos, tales como el alimenticio. (Acuña, Alvarado, Avendaño, León y Peña, 2016)

Tipos de Agar

Agar Técnico

El agar técnico es el agar de menor pureza, y puede ser utilizado para la preparación de medios de cultivo para microorganismos no exigentes y en el que el medio de cultivo no requiere una transparencia total.

Figura 14. Agar-agar



Fuente: Tomado de <https://es.dreamstime.com/foto-de-archivo-colonias-bacterianas-en-la-placa-de-agar-image6515640>

Sinónimos

Agar-Agar

Especificaciones

Fuerza del gel al 1,5% (Método Nikan) debe ser entre 700-1100 g/cm².

pH en gel al 1,5% debe ser entre 6,0-7,5.

Límite Máximo de Impurezas

Pérdida por desechos a 105°C es de un 20 %.

Residuo de calcinación (en SO₄) es de un 5 %.

Agar Bacteriológico Tipo Europeo

El agar bacteriológico tipo europeo es un agar soluble en agua purificada, facilitando soluciones transparentes. Además, es el agar más indicado en la preparación de medios de cultivo en general. También, es el agar más utilizado en Europa para los cultivos bacteriológicos. Está ausente de inhibidores que pueden interferir el crecimiento microbiano y es altamente transparente.

Especificaciones

Intervalo de gelificación al 1,5% debe estar entre 32-39,5°C.

Intervalo de fusión al 1,5% debe estar entre 80-90°C.

Fuerza del gel al 1,5% (Método Nikan) debe ser entre 800-1100 g/cm².

pH en gel al 1,5% debe ser entre 6,0-7,5.

Límite Máximo de Impurezas

Pérdida por desechos a 105°C debe ser del 10 %.

Residuo de calcinación (en SO₄) debe ser del 5 %.

Agar Bacteriológico Tipo Americano

El agar bacteriológico tipo americano es similar al agar bacteriológico tipo europeo, pero con una menor fuerza de gel. A una concentración del 1,5% la fuerza de gel del tipo americano es de 600-850 g/cm², mientras que el tipo europeo es de 800-1100 g/cm². Con este

agar se puede trabajar a mayores concentraciones. Además, es usado en la estructuración de medios de cultivo y otras aplicaciones bacteriológicas. También, está ausente de inhibidores que pueden interferir el crecimiento microbiano y es altamente transparente.

Especificaciones

Intervalo de gelificación al 1,5% debe estar entre 32-38°C.

Intervalo de fusión del gel al 1,5% debe estar entre 80-95°C.

Fuerza del gel al 1,5% (Método Nikan) debe estar entre 600-850 g/cm².

pH en gel al 1,5% debe estar entre 6-7.

Límite Máximo de Impurezas

Pérdida por desechos a 105°C debe ser del 20 %.

Residuo de calcinación (en SO₄) debe ser del 6 %.

Agar Estándar

El agar estándar también llamado agar cuenta estándar, fue creado por Buchbinder, Baris y Goldstein en el año de 1953. Es un medio no selectivo que se inventó para cuantificar la carga microbiana aerobia presentada en los alimentos, lácteos entre otros. Este agar se elaboró para el desarrollo satisfactorio de bacterias aerobias no exigentes, esto gracias a los componentes que contiene que serían levadura, la tripteína y la glucosa que permiten el correcto desarrollo de los microorganismos. (Gil, 2019)

Como peculiaridades físicas este agar posee un color de tono claro, además de un aspecto transparente, lo que facilita la visualización de las colonias que son sembradas en él. Aparte se conoce que este medio no posee inhibidores, esto facilita que las bacterias se puedan desarrollar sin ningún problema a temperaturas entre 25 y 40°C, con una temperatura óptima de crecimiento a 37°C. Las bacterias que se encuentren en este rango son de importancia, porque en su gran mayoría son las que causan enfermedades en los humanos. Por esta y otras razones este medio es recomendado por la American Public Health Association (APHA) para el recuento de mesófilos aerobios. (Gil, 2019)

Pruebas de Sensibilidad

Generalidades

Las pruebas de sensibilidad o antibiogramas permiten determinar la susceptibilidad de un microorganismo en contra de los medicamentos antimicrobianos, a partir de la exposición de una concentración estandarizada del germen a estos fármacos. Las pruebas de sensibilidad pueden desarrollarse para bacterias, hongos y virus. Para diversos microorganismos, los resultados obtenidos con un fármaco permiten predecir los efectos que se obtendrán con remedios similares. Así, no todos los medicamentos posiblemente útiles necesitarán probarse. (Hazen, 2018)

Figura 15. Pruebas de Sensibilidad



Fuente: Ramos, 2020.

Hoy en día generalmente se utiliza en un laboratorio microbiológico avanzado exclusivamente, pruebas de sensibilidad in vitro. En principio, las pruebas in vitro tratan de predecir el efecto de un tratamiento in vivo, pero utilizando sólo dos de los tres elementos en juego: el antibiótico y la bacteria, puestos en un medio que dista mucho de ser el que naturalmente se da en una infección. (Lopardo, 2016)

Las pruebas de sensibilidad se realizan *in vitro*, y no tienen en cuenta numerosos factores que afectan al fármaco *in vivo* (p. ej., la farmacodinámica y la farmacocinética, las concentraciones del medicamento en el sitio de acción, el estado inmunitario del huésped, las defensas específicas de sitio) y que influyen en el éxito de un tratamiento. Por ello, las pruebas de sensibilidad no siempre predicen los resultados de la terapia. (Hazen, 2018)

Las pruebas de sensibilidad pueden ser cualitativas, semicuantitativas o con métodos basados en los ácidos nucleicos. Las pruebas también pueden determinar el efecto de la combinación de distintos antimicrobianos (pruebas de sinergia). (Hazen, 2018)

La prueba de sensibilidad antimicrobiana es una de las tantas armas con las que contamos en el laboratorio para ayudar a los profesionales en medicina controlar los procesos infecciosos que se desarrolla en los pacientes. Pero para poder desarrollar todo el potencial con que se cuenta hay que cumplir con un requisito fundamental: es necesario lograr el aislamiento del agente productor del cuadro clínico mediante los cultivos correspondientes. (Herrera, 2004)

La razón fundamental de una prueba de sensibilidad es la de realizar una predicción a través de una prueba *in vitro*, observar la respuesta del paciente a un determinado antibiótico, la evolución de la infección y detectar una resistencia relevante del organismo que está causando este proceso infeccioso. (Herrera, 2004)

La determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos es una de las tareas del laboratorio de microbiología clínica de mayor impacto en el manejo del paciente. Además, los estudios de sensibilidad son fundamentales para conocer las tendencias de resistencia en los microorganismos de importancia clínica y para definir la política de utilización de antimicrobianos. (Martínez, 2003)

Estos estudios, por otra parte, suponen una de las principales cargas financieras en el laboratorio. Por todo ello, muchos de los cambios ocurridos durante las últimas décadas en la microbiología clínica están relacionados con los estudios *in vitro* de sensibilidad a los antimicrobianos. (Martínez, 2003)

Aunque el método anterior es de importancia para determinar si una sustancia presenta actividad frente a cualquier patógeno, para esto se observan los halos de inhibición que presenta o no cada sustancia analizada, donde se debe medir en milímetros dicha zona para establecer

este valor. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible, intermedia o resistente según cada una de las categorías que les corresponde. (Picazo, 2013)

Concentración Mínima Inhibitoria

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), es aquella concentración mínima de un antimicrobiano (en $\mu\text{g/mL}$), que es capaz de inhibir el desarrollo de un microorganismo al transcurrir un periodo de 24 horas de incubación a 37°C . Existen diversos tipos de pruebas de sensibilidad a los antibióticos. Las principales son por dilución macroscópica en caldo y por dilución en agar, las dos pruebas son para cuantificar la concentración mínima de un antibiótico que inhibe el crecimiento visible in vitro del microbio. (Jima, 2015)

Figura 16. Concentración Mínima Inhibitoria



Fuente: Tomado de https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Seleccion-de-bacterias-resistentes-Un-test-de-concentracion-inhibitoria-minima_fig1_320618038

Estos valores son utilizados para conocer la susceptibilidad que tienen los microorganismos hacia las sustancias que se utilizan para tratarlos. Este método se ha establecido como “Gold Standard” contra otras técnicas que se utilizan para el mismo fin. Este método aparte de identificar cual es la cantidad mínima de que tiene la capacidad para inhibir un microorganismo, también ofrece la oportunidad de determinar la resistencia que pueden experimentar. (Ahón y Rengifo, 2019)

Se debe considerar que no siempre un valor de CMI más bajo manifiesta una mayor actividad antimicrobiana. Esto porque la sensibilidad o la resistencia son distintas para cada bacteria y el antimicrobiano por utilizar. Conocer estos criterios es de suma importancia, esto porque si se considera sensible su evolución es favorable, por el contrario, si es intermedio o resistente esta será desfavorable, esto ayuda a evitar el fracaso en el éxito del tratamiento. (Cercenado y Saavedra, 2013)

Los halos de inhibición presentes en la placa demuestran la diferencia entre los microorganismos o los hongos sensibles de los resistentes, donde se relaciona con la concentración mínima inhibitoria, esto porque si esta zona es pequeña, se correlaciona con altos valores de la CMI lo cual sería resistente, y si por el contrario estos halos son grandes la CMI es baja lo que significa que son sensibles. (Cercenado y Saavedra, 2013)

Método de Macrodilución

Es una técnica en la cual se utiliza una combinación microorganismo/antimicrobiano o sustancia por analizar para cada bacteria en tubos estériles. El primero es el que contiene la concentración más alta de la sustancia por analizar, luego de esto se realiza una dilución a la mitad de la solución madre y así sucesivamente hasta que se obtiene la cantidad deseada de disoluciones. Para cada dilución se debe emplear un instrumento diferente generalmente pipeta. (Picazo, 2013)

Figura 17. Tubos Estériles



Fuente: Tomado de <https://www.fishersci.es/shop/products/nunc-15ml-50ml-conical-sterile-polypropylene-centrifuge-tubes/p-4526024>.

Plantas Medicinales

Generalidades

Los ancestros en la antigüedad utilizaron las plantas como medicina para tratar enfermedades, ya que estos estudiaron y analizaron los conocimientos adquiridos de todas aquellas plantas que observaron que tenían propiedades medicinales, que con el pasar del tiempo permitió que se le atribuyen muchas más especialidades en referencia a las medicinas. (Correa, Abad, Escobar, 2014)

Figura 18. Plantas Medicinales



Fuente: De Bairacli, 2020.

En la antigüedad el uso de las plantas medicinales para tratar patologías se hacía de forma empírica, esto quiere decir que se hacía probando cada una de ellas, y separando las plantas que curan de aquellas que ocasionaron la muerte. En el comienzo se transmitía el conocimiento de forma oral, y posterior de forma escrita. Un aspecto importante es que fue hasta el siglo XIX en el cual se logró hacer los primeros estudios químicos sobre los principios activos que se encontraban en cada planta, esto fue posible gracias a la creación del microscopio y al constante avance de la química. (Batz, Cardona, Castillo, Godoy y Jom, 2014)

Gallegos en el 2016, establece que actualmente existe un tipo de medicina conocida como medicina herbaria, la cual hace referencia al uso terapéutico de las plantas medicinales con el fin de sustituir o combinar con las medicinas farmacéuticas. En la fabricación de este tipo de tratamientos se utiliza generalmente extractos que se obtienen de estas plantas, estos ayudan a crear alternativas para mejorar la vida de los pacientes que lo ameriten. De igual manera, la OMS establece que entran en esta categoría todas las hierbas, material herbario, preparaciones herbarias y productos herbarios acabados, además, de todos los que cuentan con principios activos de algún material vegetal, que tenga un uso conocido y verificado.

Anteriormente se mencionó que se utilizaban los extractos naturales para crear nuevas alternativas terapéuticas para tratar patologías, pero para que esto se dé, es importante contar con materia prima para su industrialización, sin embargo, es importante el uso racional de las plantas, para recolectar material vegetal de calidad y de suficiente calidad, más si las muestras provienen de plantas silvestres. Otro aspecto a destacar es que las plantas se deben cosechar en la época adecuada, así como un tratamiento post-cosecha, principalmente en lo referente a la desecación y almacenamiento, como en el cuidado de las características fármaco botánicas. (Torres, Ortiz y Valdivia, 2012)

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2018, el 80% de la población a nivel mundial, emplea tratamientos tradicionales a base de plantas para tratar sus enfermedades a nivel de atención primaria en salud. Sin embargo, se ha visto una pérdida generalizada del uso tradicional de las plantas medicinales. Además, por la destrucción de las áreas naturales su disposición se ha visto reducida.

En lo concerniente a la investigación sobre el uso de plantas medicinales, se establece que forma parte de la etnobotánica, la cual es definida como el estudio de las interrelaciones entre el ser humano y las plantas. Sin embargo, por ser de características interdisciplinarias contempla muchas áreas: botánica, química, medicina, farmacología, toxicología, nutrición, agronomía, ecología, sociología, historia y arqueología; por lo que tiene un amplio rango de enfoques y aplicaciones. (Bermúdez, Miranda y Velázquez, 2005)

Pérez en el 2008, menciona que el estudio de los principales componentes que se encuentran en las plantas, son los que se encargan de la acción farmacológica que se les atribuyen, principalmente a los conocidos como principios activos. Estos pueden ser desde

sustancias simples como los alcaloides o mezclas complejas, como las resinas, los aceites esenciales o los extractos a partir de las plantas utilizadas.

***Bidens pilosa* (Romerillo o Muriseco)**

Generalidades

En 1753 fue descubierta y nombrada por Carl Linnaeus la planta de *Bidens pilosa*. Taxonómicamente, se asigna al género *Bidens* (Asteraceae). Según estudios este género incluye entre 230 a 240 especies esparcidas en todo el mundo. Entre las variedades tenemos la *B. pilosa* cae radiata, var. Por la evaluación de los rasgos morfológicos, la quimiogoxonía y la caracterización molecular se da la autenticación de la planta de *B. pilosa*. (Bartolome, Villaseñor y Yang, 2013)

Figura 19. *Bidens pilosa*



Fuente: Tomado de

<http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:32564-2>.

Como lo establecen Bartolomé, Villaseñor y Yang en el 2013, la *Bidens pilosa* es:

Una hierba erecta y perenne ampliamente distribuida en las regiones templadas y tropicales. *B. pilosa* es glabra o peluda, con hojas opuestas verdes que son serradas, lobuladas o diseccionadas. Tiene flores blancas o amarillas, y largos aquenios negros acanalados estrechos (semillas). Crece hasta una altura media de 60 cm y un máximo de 150 cm en ambientes favorables. *B. pilosa* prefiere pleno sol y suelo moderadamente seco. Sin embargo, puede crecer en tierras áridas y estériles de elevaciones bajas a altas.

En 1970 la Organización de los Alimentos y la Agricultura provino el cultivo de *B. pilosa* en África, esto gracias a su rápido crecimiento y a la facilidad que se propaga por medio de semillas. Se conoce que una planta puede producir de 3000 a 6000 semillas. Estas semillas germinan en suelo húmedo entre 3 a 4 días. Y tienen una viabilidad de al menos 3 años. Un aspecto a resaltar es que para su cultivo se requiere mínimas técnicas de agricultura. Por todo esto y a que tiende a invadir de manera fácil, en ciertas ocasiones se considera una mala hierba. (Bartolomé, Villaseñor y Yang, 2013)

Aunque esta planta se encuentra por todo el mundo, se ha establecido que se originó en América del Sur. A las distintas especies de *Bidens* se les otorga el nombre de acuerdo a sus características. Como en los casos, de las conocidas por el nombre de las agujas españolas, garrapatas de mendigo, agujas del diablo, clavijas de zapatero, pato de escoba, horquillas y amigos de agricultores, también tiene un nombre chino conocido de esta planta es *xian feng cao* (significa toda hierba abundante) por su fácil crecimiento. (Bartolomé, Villaseñor y Yang, 2013)

Composición Química

Se ha incrementado el uso de esta planta desde su descubrimiento, esto por su utilización en medicamentos alimentos y bebidas. Hasta el momento, se conocen de 201 compuestos de la planta *Bidens pilosa*, de los cuales: 70 alifáticos, 60 flavonoides, 25 terpenoides, 19 fenilpropanoides, 13 aromáticos, 8 porfirinas y 6 de otros compuestos. (Bartolomé, Villaseñor y Yang, 2013)

Esta planta presenta una cantidad importante de fotoquímicos, uno de ellos son los flavonoides y polinomos. En lo referente a los flavonoides se le atribuye actividad contra el

cáncer, antiinflamatorio, antioxidante, y otros bioactivos. A pesar de esto, solo se ha investigado las bioactividades de 7 de los 60 flavonoides que presenta esta planta, a los 53 flavonoides restantes merecen un estudio adecuado para conocer sus propiedades, así como todos los compuestos que contiene la planta *Bidens pilosa*. (Bartolomé, Villaseñor y Yang, 2013)

Propiedades Farmacológicas

La planta de *Bidens pilosa* es ampliamente utilizada para tratar distintos padecimientos, se ha observado que ya sea la planta entera o partes de ella, han tratado o prevenido cerca de 40 categorías de patologías. Se han realizado estudios sobre esta planta, que, aunque no son muy extensos si muestras que los extractos obtenidos de ella, tienen propiedades antitumorales, antiinflamatorio, antidiabético y anti hiperglucémico, antioxidante, inmunomodulador, antipalúdico, antibacteriano, antifúngico, antihipertensivo, vasodilatador, y anti ulcerativo. (Bartolomé, Villaseñor y Yang, 2013)

Las investigaciones realizadas han demostrado que los extractos obtenidos cuentan con una actividad contra el cáncer. Esta propiedad se le atribuye al flavonoide luteolina, así también se logró observar que tiene el poder de prevenir el cáncer de piel. De igual manera, se utiliza contra trastornos inflamatorios y antialérgicos. Otra propiedad importante es lo concerniente a los agentes antidiabéticos que se ha demostrado contiene la planta, y por esto es utilizada como hierba antidiabética en América, África y Asia. Los estudios realizados establecen que es posible que traten tanto la diabetes tipo 1 como el tipo 2, en animales. (Bartolomé, Villaseñor y Yang, 2013)

Con la creciente utilización de fármacos químicos para combatir patógenos se ha visto un aumento importante en la resistencia bacteriana, por esto se buscan alternativas para tratarlas, y de acuerdo a estudios realizados la *Bidens pilosa* cuenta con propiedades antibacterianas que se pueden usar para tratar de contrarrestar esta resistencia, además, se han probado distintas partes de la planta para actividades antifúngicas dando resultados positivos. (Bartolomé, Villaseñor y Yang, 2013)

Toxicología

Existen estudios de la toxicidad de *Bidens pilosa*, pero en animales, aunque no son suficientes. Hasta el momento, solo se han analizado toxicidades agudas y subcrónicas, pero en ratas y ratones, estos estudios establecieron que no muestran toxicidad evidente en ellos, por lo

tanto, se consideran seguro en estos animales. No obstante, no existen estudios toxicológicos completos en los humanos, otro aspecto importante es que se desconoce las posibles interacciones farmacológicas con otros medicamentos. (Bartolomé, Villaseñor y Yang, 2013)

Usos

Esta planta tiene muchos usos, entre ellos se utiliza como hierbas medicinales y como ingrediente en tés. Toda esta planta se utiliza tanto seca como fresca, se emplea en medicamentos populares. Generalmente se consume en forma de polvo seco o tintura si es de forma externa y como polvo, decocción o maceración cuando es de forma interna. (Bartolomé, Villaseñor y Yang, 2013)

Como se mencionó, esta planta ya sea entera o por partes, se ha observado que es útil en el tratamiento de más de 40 trastornos como inflamación, trastornos inmunológicos, trastornos digestivos, enfermedades infecciosas, cánceres, síndrome metabólico, heridas, y muchos otros. Específicamente, la *Bidens pilosa* fresca se utiliza para tratar mordeduras y heridas de serpiente. (Bartolomé, Villaseñor y Yang, 2013)

Método de Extracción

A temperatura ambiente los aceites esenciales son líquidos, ligeros, con densidad por debajo de la del agua, y generalmente son aromáticos. Además, tienen características de que son volátiles y su textura no es grasa. Al ser aceites estos no son solubles en agua, y en ningún disolvente polar, sin embargo, si se pueden solubilizar en alcohol y en disolventes orgánicos. Las plantas usadas para la extracción de estos tipos de aceites son aquellas que contengan un promedio de 0.5-5% en masa de aceite con respecto a la totalidad de la planta. (Casado, 2018)

Figura 20. Aceites Esenciales



Fuente: Domínguez, 2019.

El procedimiento de extracción por lo general comprende de dos pasos, uno que es la extracción como tal, y el otro comprende el proceso de recuperación de disolvente utilizado para realizarla. Se puede separar mezclas de sólidos por medio de un extractor, siempre y cuando uno de los sólidos sea soluble en un disolvente específico y el otro no, para esto puede ser frío, caliente, agitando o triturando la muestra. La separación se da por filtración de la disolución que contiene el producto buscado de la que contiene los desechos. También, se conocen otros métodos como lo son la extracción sólido- líquido continuo y discontinuo, siendo la de discontinuo la más eficiente. (Venegas, 2016)

En la actualidad existen 5 métodos de extracción conocidos, los cuales serían: arrastre por vapor, destilación agua-vapor, hidro destilación, extracción con solventes y extracción por prensado.

Como ejemplo, tenemos la destilación agua-vapor, esta es una técnica muy usada, de muy buen rendimiento y de muy bajo costo, por tal razón es la más utilizada en la extracción de aceites esenciales. Esta destilación se lleva a cabo por medio de vapor húmedo que es el resultado del agua en ebullición, el vapor pasa la materia prima la cual puede ser hojas, flores, tallos y raíces, la misma se encuentra en una malla. En cambio, la hidrodestilación es el método donde la materia prima se sumerge en su totalidad en el agua y en la liberación de vapor se da la destilación. (Venegas, 2016)

Se debe resaltar que, para realizar extracciones con solventes, es necesario que los puntos de ebullición sean bajas, para minimizar la posible destrucción de la muestra utilizada. Para realizar este proceso, se puede utilizar tanto material sólido, líquido o inclusive mezclar ambos, en agitación constante para una mayor eficiencia. Al finalizar el proceso, se debe eliminar el disolvente utilizado durante la operación, para esto se filtra y se evapora por medio de presión reducida los restos de estos disolventes. (Venegas, 2016)

Maceración

Este método hace referencia a una extracción donde los fragmentos del material vegetal a utilizar se sumergen totalmente en el disolvente que se vaya a emplear, este proceso se debe dar el tiempo necesario para que se dé la disolución de los componentes solubles en el medio, esta ronda entre 2 a 14 días. Se debe recordar que este procedimiento se debe llevar a cabo a

temperatura ambiente y el reposo se debe dar en un recipiente con tapa, generalmente de vidrio. Una vez transcurrido este tiempo, se debe filtrar el líquido y separar del material vegetal utilizado, y por medio de un rotavapor se debe extraer propiamente el extracto. Entre los solventes tenemos: hexano, cloroformo, metanol y etanol. (González, 2004)

Un buen método para realizar una extracción de materia prima vegetal, es el procedimiento de maceración, el cual permite la cuantificación de los principios activos presentes en ella. Para la maceración se utiliza tanto materia sólida como líquida, donde la materia vegetal se encuentra en estado sólido y el solvente a emplear en estado líquido. Se debe recordar siempre que en el disolvente deben ser solubles los componentes a extraer de la planta. De igual manera, se pueden utilizar al tiempo dos o más disolventes para realizar este método, tomando en cuenta que entre ellos tienen que ser compatibles, como lo son: Metanol, cloroformo y hexano. (Peña, 2019)

Figura 21. Maceración



Fuente: Tomado de <https://conceptodefinicion.de/maceracion/>.

Destilación a Presión Reducida (Rotavapor)

Como lo mencionan Casado, Durán, Miró y Paredes en el 2012:

“la evaporación es un proceso en el que un líquido es convertido a vapor mediante la variación de las condiciones de temperatura y/o presión; consiguiendo aumentar la concentración de los solutos presentes en el líquido”.

El rotavapor es una técnica muy útil y empleada en lo concerniente a las destilaciones, esto porque se utiliza para generar vapor, esto ocasiona que se separe el disolvente del extracto. Como principio de este equipo es la aplicación de calor hasta llegar a ebullición y además, emplear una bomba de vacío para reducir la presión en el interior del matraz de destilación. Con esto se da la separación de las sustancias buscadas de las que no son necesarias. (Peña, 2019)

También mencionó que este equipo puede lograr la optimización de las destilaciones realizadas. Las temperaturas varían dependiendo del disolvente utilizado, estas pueden bajar o subir al igual que la presión utilizada, esto con el fin de aumentar las concentraciones del extracto. La bomba de vacío se utiliza para mejorar el desempeño de la extracción, al reducir la presión dentro del matraz de destilación, al dar el cambio de líquido a gaseoso. Un aspecto importante es que se conserva las propiedades organolépticas, químicas y bioquímicas del extracto, sin variaciones del producto. (Peña, 2019)

Figura 22. Equipo de Destilación a Presión Reducida Mediante Rotavapor.



Fuente: Tomado de <https://www.buchi.com/appdrive/client/index.html#/>.

Actividad Antimicrobiana

En estudios antimicrobianos realizados a extractos de distintas plantas, se observó que los extractos etanólicos de las hojas secas de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum* mostraron capacidad importante de inhibición contra la bacteria de *Staphylococcus aureus*. Demostrando así, que estas plantas presentan actividad antibacteriana frente a microorganismos. (Cruz et al, 2010)

Según Da Silva et al en el 2014, en un estudio realizado demostraron de forma in vitro que esta planta presenta actividad contra el *S. aureus* resistente a la oxacilina, esto quiere decir que el romerillo es efectivo para este tipo de patógenos que presentan algún grado de resistencia a los medicamentos tradicionales que se usan para tratarlos.

Identificación Físicoquímico

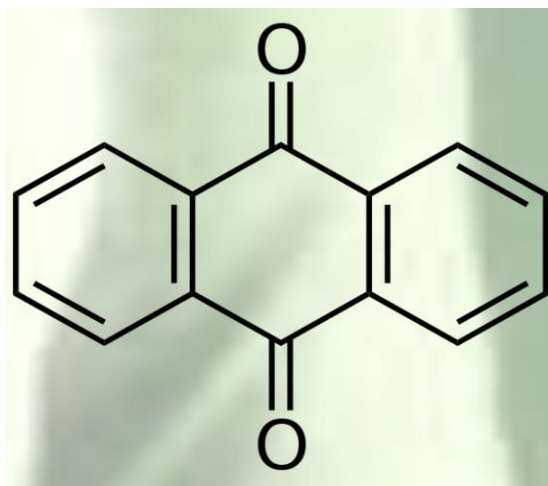
Tamizaje Físicoquímico

En la actualidad se ha observado que existen diversos métodos para realizar la identificación de los compuestos que se extraen de las plantas evaluadas, a pesar de esto, los métodos comunes y tradicionales son los más utilizados, esto porque se consideran que son procedimientos que dan datos veraces, confiables y a bajo costo. Estos procesos son de carácter cualitativo, y lo que se busca con ellos son datos preliminares acerca de su estructura. (Elizondo y Marín, 2020)

Este tipo de tamizaje se realiza posterior a la extracción de la sustancia buscada, consiste en llevar a cabo reacciones con distintos reactivos para determinar la presencia del metabolito analizado. Para determinar si está de forma concreta en una sustancia, se observa el cambio de coloración en el medio para establecer o descartar su presencia. Algunos compuestos analizados son ácidos grasos, azúcares reductores, polisacáridos y mucílagos (Sharapin, 2000).

1. Antraquinonas

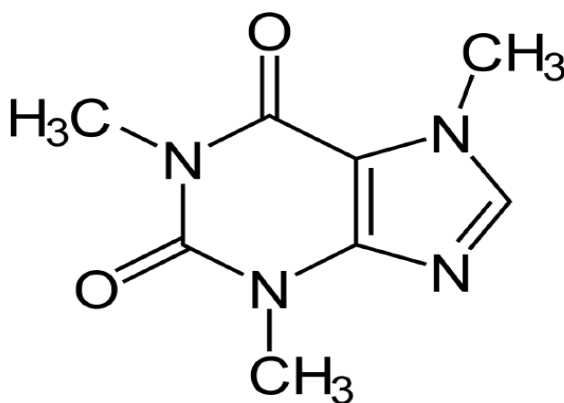
Las antraquinonas son compuestos fenólicos, los cuales se consideran que son el grupo más grande de las quinolonas naturales, además, son la base y fuente que generan la mayor cantidad de colorantes, son solubles en solventes orgánicos. Estas sustancias generan actividades biológicas entre ellas antifúngicas, antimicrobianos, anticancerígenos y antioxidantes. Estas sustancias se encuentran tanto en hojas, tallos, madera y frutos de las plantas. (Vélez y Villa, 2012)

Figura 23. Estructura Molecular de la Antraquinona

Fuente: Sánchez, C., Sánchez, T, y Yua, 2013

2. Alcaloides

Estas sustancias son muy representativas, numerosas y diversas en los componentes de las plantas. Contienen características heterogéneas, con sustancias nitrogenadas, contiene características básicas y con acción fisiológica medicinal. Se utilizan en la medicina como estimulante cardíaco y cerebral, siempre con la precaución que, en incremento de las dosis, la actividad motora disminuye y provoca sueño. (Lima y Morales, 2014)

Figura 24. Estructura Molecular de los Alcaloides.

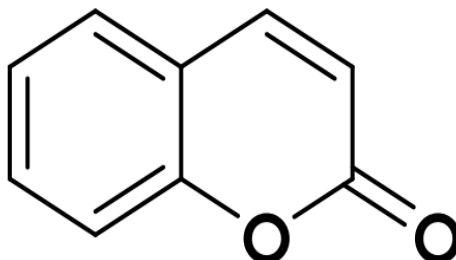
Fuente: Tomado de <https://www.lifeder.com/alcaloides/>

3. Cumarinas

Son un grupo muy amplio de metabolitos secundarios fenólicos, que se encuentran en las plantas. Se conocen más de mil compuestos de cumarinas con distintas actividades

biológicas. Estas sustancias se encuentran en mezclas, en forma libre o como glucósidos, se encuentran en gran variedad de plantas naturales. Presentan propiedades anticoagulantes, antitrombóticas, anticancerígenas y antioxidantes.

Figura 25. Estructura Molecular de las Cumarinas.



Fuente: Vidal, 2012

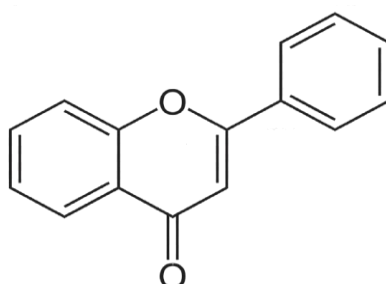
4. Triterpenos

Estos metabólicos secundarios presentan una gran actividad biológica, donde están conformados biosintéticamente por 6 unidades de isopreno, los cuales tienen en común un inicio de escualeno (30). Existe más de un triterpeno por las diferentes formas de cierre del anillo en el intermediario acíclico. Por el reordenamiento producido, las plantas presentan una serie muy amplia de triterpenos. (Almeyda, 2017)

5. Flavonoides

Pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos, siendo uno de los más grandes. Como metabólico son los que se encargan de dar el color amarillo en la planta. Se les atribuyen características farmacológicas como es el caso del fortalecimiento de capilares sanguíneos, cardiotónico, hemostático y antiinflamatorio. (Lima y Morales, 2014, p.17)

Figura 26. Estructura Molecular de los Flavonoides.

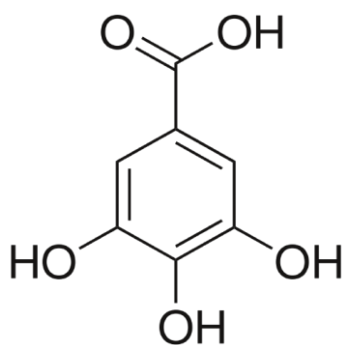


Fuente: <https://www.freepng.es/png-dw7pm0/>.

6. Taninos

Son compuestos fenólicos complejos que se encuentran en muchas variedades de plantas en concentraciones elevadas, con la capacidad de unión con macromoléculas y reaccionar con proteínas solubles de forrajes, dependiendo de la estructura y peso molecular. Son uno de los compuestos más importantes de manera nutricional. Estas moléculas son de alto peso molecular, pueden precipitar distintas sustancias como proteínas, alcaloides, ácidos nucleicos, esteroides, saponinas y carbohidratos. (Márquez y Suárez, 2008)

Figura 27. Estructura Molecular de los Taninos



Fuente: Tomado de <https://www.estudiahosteleria.com/blog/enologia-cocteleria/los-taninos>.

7. Azúcares Reductores

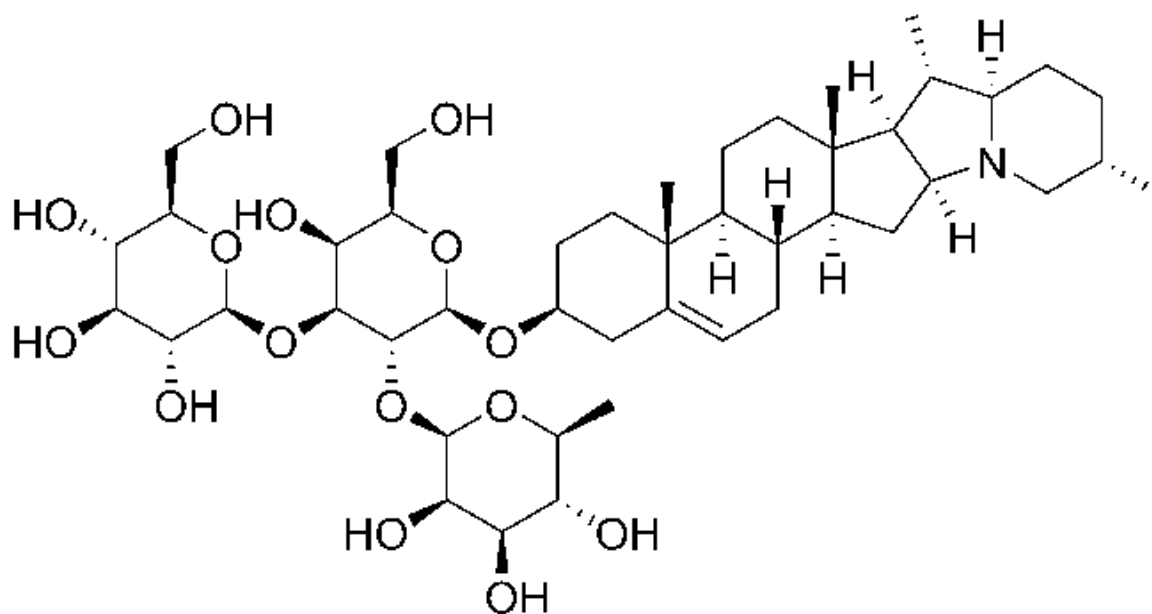
Son aquellos que poseen en su estructura un grupo carbonilo y por él es que son capaces de reaccionar con otras moléculas, esto contienen al menos un OH hemiacetálico libre. Cuentan con un átomo de carbono anomérico libre como en el caso de la glucosa, fructosa, maltosa y galactosa, donde reducen el oxígeno mediante la donación de electrones a otra molécula. (Alexander, Gómez, Jaque, Pazmiño y Pérez, 2017)

8. Saponinas

Pertenecen a los compuestos terpénicos, los cuales contienen azúcar en su estructura al menos una o más moléculas de estas. Este metabolito secundario contiene características similares al jabón. Es muy común su uso como sustancias limpiadoras y como espumantes,

además de ser emulsivos. No se debe administrar en sangre de forma directa por la producción de hemólisis de glóbulos rojos. (Lima y Morales, 2014)

Figura 28. Estructura Molecular de las Saponinas

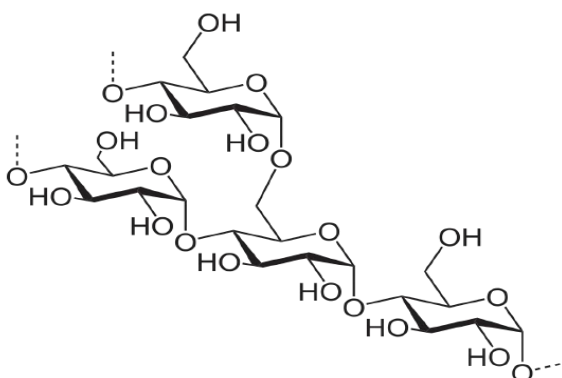


Fuente: <https://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/glucósidos/saponinas/>.

9. Almidón

Es un hidrato de carbono complejo conocido como polisacárido, es digerible, pertenece al grupo de los glucanos. Los almidones cuentan con cadenas de glucosa con estructura lineal llamada amilosa o también en ocasiones es ramificada conocida como amilopectina. Este compuesto es la reserva de energía de los vegetales. Además, tiene la capacidad de atrapar agua o que lo hace ser un hidrocoloide. (Castells, 2009)

Figura 29. Estructura Molecular del Almidón



Fuente: Tomado de <https://www.ecured.cu/Almid%C3%B3n>.

10. Cromatografía de Capa Fina TLC

Es un método muy usado para análisis químicos, ya que es fácil de aplicar y de bajo costo para la identificación de sustancias o componentes que se encuentran mezclados entre ellos. Esta práctica sirve para el análisis cualitativo de la presencia de la sustancia analizada, ya que se evidencia si están en el compuesto o no. (Hernández et al, 2013)

11. Terpenos

Estos compuestos están unidos por un hidrocarburo de 5 átomos de carbono (isopreno), son sustancias aromáticas y volátiles. Los terpenos son los responsables de las propiedades organolépticas de las plantas como el color y sabor, así como la producción de aceite esencial de las mismas. Entre los tipos de terpenos tenemos, los monoterpenos los cuales solo contempla la unión de dos moléculas de isoprenos, y caso contrario, los sesquiterpenos son de mayor tamaño, con la unión de tres moléculas de isoprenos. (García, 2015)

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

En esta sección se describen las técnicas que se emplearán para realizar la recolección de datos, también se define el tipo de investigación que se va a desarrollar, además, de establecer cuál será el enfoque, diseño, variables, instrumentos y los procesos de recopilación de datos que presentará este trabajo.

Enfoque

Baptista, Hernández y Fernández (2014), establecen el enfoque de la investigación como cuantitativo, donde describen:

El enfoque cuantitativo (que representa, como dijimos, un conjunto de procesos) es secuencial y probatorio. Cada etapa precede a la siguiente y no podemos “brincar” o eludir pasos. El orden es riguroso, aunque desde luego, podemos redefinir alguna fase. Parte de una idea que va acotándose y, una vez delimitada, se derivan objetivos y preguntas de investigación, se revisa la literatura y se construye un marco o una perspectiva teórica. De las preguntas

se establecen hipótesis y determinan variables; se traza un plan para probarlas (diseño); se miden las variables en un determinado contexto; se analizan las mediciones obtenidas utilizando métodos estadísticos, y se extrae una serie de conclusiones respecto de la o las hipótesis.

El enfoque de investigación de tipo cuantitativo es una herramienta que permite analizar datos cuantitativos sobre variables y que, además, determina las propiedades y fenómenos cuantitativos mediante diversos análisis dentro de sus técnicas. En este trabajo se realizará la extracción de los metabolitos secundarios de la planta *Bidens pilosa*, con el motivo de analizar y evaluar las extracciones con respecto a su actividad antibacteriana determinada mediante datos numéricos los cuales se conseguirán por medio de pruebas específicas como lo son el tamizaje fitoquímico, fraccionamiento de componentes y pruebas microbianas. Con lo anterior se busca darle respuesta a la hipótesis de la investigación.

Diseño

Según Baptista, Hernández y Fernández (2014), el diseño de la investigación es de tipo experimental, donde definen:

La esencia de esta concepción de experimento es que requiere la manipulación intencional de una acción para analizar sus posibles resultados. Una acepción particular de experimento, más armónica con un sentido científico del término, se refiere a un estudio en el que se manipulan intencionalmente una o más variables independientes (supuestas causas antecedentes), para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre una o más variables dependientes (supuestos efectos consecuentes), dentro de una situación de control para el investigador. Los experimentos manipulan tratamientos, estímulos, influencias o intervenciones (denominadas variables independientes) para observar sus efectos sobre otras variables (las dependientes) en una situación de control.

Según lo anteriormente mencionado por estos autores, podemos determinar que el diseño de la investigación es de tipo experimental, porque es el método adecuado para utilizar y generar pruebas de hipótesis con relación causal. Esto permite que el análisis investigativo se trabaje en condiciones aptas y controladas, buscando describir el modo y el tipo de causa

que produce el acontecimiento determinado. Es decir, en este caso, determinar la capacidad antimicrobiana por parte de los componentes en la planta *Bidens pilosa*.

El alcance de esta investigación es del tipo explicativo, según lo mencionan Baptista, Hernández y Fernández (2014) cuando permiten establecer que:

Los estudios explicativos van más allá de la descripción de conceptos o fenómenos o del establecimiento de relaciones entre conceptos; es decir, están dirigidos a responder por las causas de los eventos y fenómenos físicos o sociales. Como su nombre lo indica, su interés se centra en explicar por qué ocurre un fenómeno y en qué condiciones se manifiesta o por qué se relacionan dos o más variables.

El alcance de investigación de tipo explicativo permite facilitar como una forma de entendimiento del ensayo en estudio. Esto se debe, a que busca entender las causas y solucionar los problemas generales. Además, así como también, arrojar resultados confiables de la interacción con el fenómeno y dar una resolución definitiva al tema de interés central en el que se desarrolla la investigación.

Variables

Objetivo específico	Variable	Definición conceptual	Indicador	Instrumento
Elaborar un fraccionamiento de los componentes presentes en la planta <i>Bidens pilosa</i> , para la comprobación de la existencia de los mismos.	Fraccionamiento de los componentes	Es una operación de unidad utilizada para separar muestras dentro de productos individuales. Implica la separación de componentes por la volatilidad relativa de los componentes presentes. (Hurtado, 2017)	Diferencias de polaridades entre el disolvente y extracto, medidas en g/mL.	Embudo separador mediante extracción líquido-líquido.

<p>Realizar un tamizaje fitoquímico del Muriseco, para la identificación de los metabolitos secundarios presentes en la planta.</p>	<p>Tamizaje fitoquímico</p>	<p>Consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. (Palacios, 2015)</p>	<p>Identificación colorimétrica de la presencia de los metabolitos secundarios en los extractos de la planta <i>Bidens pilosa</i> versus un patrón por medio de un porcentaje cuantitativo.</p>	<p>Observación cualitativa de las pruebas colorimétricas: Shinoda Dragendorff KOH (cumarinas) Lieberman Burchard Börntzger Kraus Benedict Taninos Vainillina Lugol Espuma</p>
---	-----------------------------	---	---	---

<p>Comprobar la actividad antibacterial del extracto de Romerillo contra las bacterias <i>Klebsiella pneumoniae</i>, <i>Salmonella typhi</i>, <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Actividad antibacterial</p>	<p>Es la actividad con la que cuenta una sustancia para inhibir de forma bactericida o bacteriostática el crecimiento de microorganismos, donde sea considerada bactericida debe eliminar la totalidad de las bacterias y bacteriostática inhibir el crecimiento de las mismas. (Elizondo, y Marín, 2020)</p>	<p>Halo inhibición en mm</p>	<p>Difusión de agar</p>
---	--------------------------------	---	------------------------------	-------------------------

Nota: Elaboración propia, 2020

Proceso de Recolección y Análisis

El proceso de recolección de datos e información se caracteriza por utilizar medios científicos que sean a partir de bases de datos confiables, seguras y precisas, como, por ejemplo: EBSCO, Dialnet, Redalyc y Scielo, entre otros sitios web importantes y veraces para la búsqueda de toda la información correspondiente para la planta *Bidens pilosa*. Es necesaria esta localización exhaustiva de características propias del Muriseco, para analizar de una manera más detallada el fraccionamiento químico usado en la obtención de los componentes químicos mediante métodos de extracción basados en diversos disolventes, dentro de los que se puede mencionar: el Acetato de Etilo, Diclorometano y Hexano.

También, durante el proceso de investigación se realizará un tamizaje fitoquímico correspondiente a la planta *Bidens pilosa* con respecto a las cepas de bacterias que anteriormente se mencionaron. Para la obtención de las cepas de microorganismos: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi*, es requerido la identificación de la naturaleza química de los metabolitos secundarios mediante diagnósticos

colorimétricos, como, por ejemplo: prueba de Benedict, prueba de Dragendorff, prueba de Lugol y prueba de vainilla, entre otras. Este análisis fitoquímico se hará en las instalaciones de la Universidad Internacional de las Américas, ubicada en la Sede Central, San José, Costa Rica, bajo la supervisión de experimentados profesionales en esta área.

Por último, se comprobará la actividad y sensibilidad de cada uno de estos microorganismos, por medio de diversos instrumentos, tales como: incubadoras, medios de cultivo y placas Petri. Estas herramientas nos permitirán la determinación cuantitativa de los porcentajes de los halos de inhibición específicos para cada una de nuestras bacterias analizadas, permitiendo que se averigüe si la planta *Bidens pilosa* posee o no una actividad antibacteriana con respecto a la *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*.

Proceso de Recolección de la Planta

La planta de *Bidens pilosa* (Romerillo) se recolectó del área de Puriscal, la materia prima se encontraba en una zona rural, sin presencia de agentes externos (agroquímicos). Se priorizó que las plantas se encontraran físicamente sanas y no se observaron alteraciones en las mismas. Se debe tomar en cuenta que se utilizó para realizar la extracción, toda la planta lo cual sería: tallo, hojas y flores.

Bidens pilosa

En lo concerniente al romerillo, primero se observó que la planta estuviera en buen estado, que el lugar de recolección fuera apropiado y que contará con características propicias para su acopio. Posterior a la selección de plantas se procedió a separar las partes de interés para la investigación de aquellas que no se necesitaran. Cabe señalar que, por ser este tipo de planta, recolectó tanto el tallo, hojas y flores de la misma, dejando de lado la raíz de la planta.

Posterior a esto, se le realizó un lavado con agua a cada planta esto con el fin de eliminar cualquier impureza que pudiese estar presente en ella. Seguidamente al lavado, se procedió a dejar secar el material vegetal a temperatura ambiente por un lapso de 12 horas. Luego, se tomó la materia vegetal y se trituró de forma manual hasta llegar a un tamaño de 4cm, esto con el objetivo de maximizar el rendimiento de extracción por maceración.

Figura 30. Muestra de la Planta de *Bidens pilosa*



Procedimiento y Recursos

Para realizar la extracción de la planta *Bidens pilosa*, necesaria para el fraccionamiento químico se utilizó los instrumentos:

- 1 embudo separador de 250 mL.
- 6 Beaker de 250 mL.
- 2 Beaker de 1000 mL.
- 4 Beaker de 100 mL.

- 1 balanza analítica con capacidad de 250 g marca Adam.
- 1 espátula.
- 1 tabla de picar.
- 1 probeta de 500 mL.
- Algodón.
- Aros metálicos.
- Soportes universales.
- 1 gotero.
- 2 embudos de espiga larga.
- 1 botellas de color ámbar con cierre de 1000 mL.
- Papel filtro.
- 2 agitadores de vidrio.
- 2 calentadores-agitadores marca Corning.
- 4 embudos de espiga larga.
- 1 pizeta con agua destilada.
- Papel toalla.
- Papel parafilm.
- 2 balanzas granatarias con capacidad de 2000 g, marca Ballar RADWAG.
- 1 espátula acanalada.
- 16 viales de 2 mL.
- 1 termómetro.

- 1 embudo Büchner.
- 1 matraz Kitasato.

Equipos utilizados:

- Estufa.
- Rotavapor marca Buchi.
- Mangueras de caucho para conexiones.
- Bomba de inmersión para recirculación de agua por el condensador.
- Autoclave.

Los reactivos necesarios para elaborar la extracción de la planta *Bidens pilosa*, proporcionados por la Universidad Internacional de las Américas, son:

- Acetato de etilo.
- Ácido sulfúrico concentrado.
- Agua destilada.
- Anhídrido acético.
- Cloroformo.
- Diclorometano.
- Etanol 70%.
- Éter etílico.
- FeCl_3 1%.
- Hexano.
- HCl concentrado.

- HCl al 2%.
- Hidróxido de amonio al 25%.
- KOH 0,5 mol/L.
- Limaduras de magnesio.
- Mentol.
- Metanol.
- NaOH al 10%.
- Propilenglicol.
- Reactivo de Benedict.
- Reactivo de Dragendorff.
- Reactivo de Lugol.
- Reactivo de Vainillina al 1%.
- Sacarosa.
- Sulfato de sodio.

Extracción por Maceración de la planta *Bidens pilosa*

- Luego de la recolección de la planta, y que se le realizará un lavado con agua a las mismas, se dejó reposar por 12 horas a temperatura ambiente para minimizar la cantidad de humedad presente en ellas.
- Posterior a esto, se extrajo el tallo, hojas y flores, y se procedió a cortarla en pedazos más pequeños de aproximadamente 2.5 cm mediante forma manual, esto para reducir su tamaño.
- La muestra obtenida se pesó y se obtuvo 358.33g, la cual se incorporó a un recipiente de 1000 mL volumen.

- Seguidamente se adicionó 900 mL de etanol al 70%, esto con el fin de que el líquido cubriera totalmente la materia vegetal.
- Por último, se tapó y se dejó reposar la muestra por un periodo de 7 días a temperatura ambiente (25°C), resguardando la integridad de la muestra de lo que es el contacto de la luz y de agentes externos que pudieran afectar la misma.

Figura 31. Fragmentos de la planta de *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020

Figura 32. Tallo, hojas y flores de la Planta *Bidens pilosa* Macerados



Fuente: Elaboración propia, 2020

Extracción de la *Bidens pilosa*

- Después de 7 días, se procedió a realizar la separación por medio de un embudo Buchner y kitasato en filtración al vacío, el material vegetal del líquido presente. Lo anterior con el fin de eliminar las posibles impurezas en el medio.
- Se obtuvo un volumen de 550 mL.
- Posterior a esto, se procedió a realizar una destilación a presión reducida por medio de un rotavapor. La muestra se colocó en este equipo por un lapso de 6 horas a una temperatura de 60°C.
- Al finalizar la extracción se obtuvo un volumen final de 90 mL, correspondiente al extracto crudo.

Figura 33. Volumen obtenido en el Rotavapor



Fuente: Elaboración propia, 2020

Procedimiento para la Preparación de los Fraccionamientos

A. Elaboración del Extracto Acuoso:

- En un beaker de 600 mL se colocó 50 g de material vegetal, se le adiciona 150 mL de etanol 70% y se calentó a 70°C durante 30 minutos.
- Se filtró el extracto frío en el embudo Büchner y el matraz Kitasato, se llevó al Rotavapor para eliminar el etanol presente y se obtuvo un extracto 100% acuoso. Este extracto se rotuló como extracto acuoso.
- El extracto obtenido se separó en dos partes, una para continuar este procedimiento y el otro para el tamizaje fitoquímico.

- El volumen correspondiente al tamizaje fitoquímico se adiciona a una botella ámbar de 100 mL.

B. Fraccionamiento del Extracto Crudo:

Fracción de Hexano

- Primero, se vertió la disolución del extracto crudo acuoso en el embudo de separación de 250 mL (se usa un embudo para evitar salpicaduras).
- Luego se colocó la fase orgánica dentro del embudo de separación y se inició con 50 mL de hexano para extraer materiales de carácter lipofílico.
- Se agitó bien el embudo de separación, realizando movimientos circulares. Hay que asegurar que el tapón y la llave del embudo se encuentren bien cerrados.
- Es recomendable abrir de vez en cuando la válvula del embudo, de manera que los gases que se puedan formar salgan.
- Posteriormente, se dejó reposar el embudo de separación hasta verificar la división completa de las dos fases, retirando el tapón del embudo separador para que se de esta separación.
- Se procedió a separar las dos fases. Para lo anterior se abrió la llave con cuidado y se depositó en un beaker la fase acuosa, ya que por polaridad es la que se va a encontrar en la parte inferior del embudo de separación. Luego se decanta la fase orgánica en otro beaker la cual corresponde a la fase que contiene el hexano. Y la fase acuosa se volvió a depositar en el embudo de separación para seguir con las extracciones restantes.
- Se repitió este procedimiento hasta asegurar la extracción completa de los componentes, cabe destacar que cada extracción con hexano se depositó en el mismo beaker.
- Al terminar el proceso de separación se obtuvo un volumen final de 400 mL.
- A esta extracción se le denominó y rótulo como fracción de hexano.

- Posteriormente se le añadió 50 gramos de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua presente que se recolectó junto con el extracto.
- Por último, se guardó la fase de hexano en una botella ámbar de 500 mL.

Fracción de Diclorometano

- Después de realizar las extracciones con hexano, se adicionó a la fase acuosa que se mantenía en el embudo separador 50 mL de diclorometano como segundo disolvente de polaridad creciente.
- Se agitó bien el embudo de separación, realizando movimientos circulares. Hay que asegurar que el tapón y la llave del embudo se encuentren bien cerrados.
- Es recomendable abrir de vez en cuando la válvula del embudo, de manera que los gases que se puedan formar salgan.
- Posteriormente se dejó reposar el embudo de separación hasta verificar la división completa de las dos fases, retirando el tapón del embudo separador para se de esta separación.
- Se procedió a separar las dos fases. Para lo anterior se abrió la llave con cuidado y se depositó en un beaker la fase orgánica, la cual corresponde a la fase que contiene el diclorometano. En esta ocasión el diclorometano se encuentra en la parte de abajo del embudo de separación, por su polaridad.
- Se repitió este procedimiento hasta asegurar la extracción completa de los componentes, cabe destacar que cada extracción con diclorometano se depositó en el mismo beaker.
- Al terminar el proceso de separación se obtuvo un volumen final de 400 mL.
- A esta extracción se le denominó y rótulo como fracción de diclorometano.
- Posteriormente se le añadió 50 g de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua presente que se recolectó junto con el extracto.
- Por último, se guardó la fase de diclorometano en una botella ámbar de 500 mL.

Fracción de Acetato de Etilo

- Después de realizar las fracciones con diclorometano, se adiciona a la fase acuosa que se mantenía en el embudo separador 50 mL de acetato de etilo como último disolvente.
- Se agitó bien el embudo de separación, realizando movimientos circulares. Hay que asegurar que el tapón y la llave del embudo se encuentren bien cerrados.
- Es recomendable abrir de vez en cuando la válvula del embudo, de manera que los gases que se puedan formar salgan.
- Posteriormente se dejó reposar el embudo de separación hasta verificar la división completa de las dos fases, retirando el tapón del embudo separador para que se de esta separación.
- Se procedió a separar las dos fases. Para lo anterior se abrió la llave con cuidado y se depositó en un beaker la fase acuosa, ya que por polaridad es la que se va a encontrar en la parte inferior del embudo de separación. Luego se decanta la fase orgánica en otro beaker la cual corresponde a la fase que contiene el acetato de etilo. Y la fase acuosa se volvió a depositar en el embudo de separación para seguir con las extracciones restantes.
- Se repitió este procedimiento hasta asegurar la extracción completa de los componentes, cabe destacar que cada extracción con acetato de etilo se depositó en el mismo beaker.
- Al terminar el proceso de separación se obtuvo un volumen final de 400 mL.
- A esta extracción se le denominó y rótulo como fracción de acetato de etilo.
- Posteriormente se le añadió 50 gramos de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua presente que se recolectó junto con el extracto.
- Por último, se guardó la fase de acetato de etilo en una botella ámbar de 500 mL.

Fracción Acuosa

- La disolución acuosa restante que se encontraba en el embudo de separación, se vertió en una botella ámbar de 500 mL y se rotuló como fracción acuosa.

Preparación del Extracto Etéreo para la Realización del Tamizaje Fitoquímico

- En un embudo separador de 250 mL se colocó 50 mL del extracto crudo de la planta *Bidens pilosa* junto con 25 mL de éter etílico.
- Asegurarse que el tapón y la llave del embudo se encuentren bien cerrados.
- Luego, se agitó lentamente en movimientos circulares el embudo separador conteniendo el extracto crudo.
- Después, se abrió la válvula del embudo para expulsar los gases que se formaron dentro del mismo.
- Posteriormente, se dejó reposar el embudo de separación hasta verificar la división completa de las dos fases, retirando el tapón del embudo separador para que se de esta separación.
- Se procedió a separar las dos fases. Para lo anterior se abrió la llave con cuidado y se depositó en un beaker de 250 mL el extracto crudo, ya que por su densidad es la que se va a encontrar en la parte inferior del embudo de separación.
- Nuevamente, se vertió y depositó el extracto etéreo en otro beaker de 250 mL, debido a que por su densidad es la que se va a encontrar en la parte superior del embudo de separación.
- Se repitió este procedimiento hasta asegurar la extracción completa de los componentes, cabe destacar que se realizó cuatro extracciones de 25 mL con éter etílico y se depositó cada extracto en sus correspondientes beakers anteriormente rotulados.
- A esta extracción se le denominó y rótulo como extracto etéreo.
- Posteriormente se le añadió 50 g de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua presente que se recolectó junto con el extracto.

Preparación del Extracto Acuoso para la Realización del Tamizaje Fitoquímico

- A partir del volumen total del extracto acuoso contenido en un beaker de 500 mL, se traspasó la mitad del extracto acuoso total en un beaker de 250 mL.
- Se rotuló con el nombre de AQ₁ y se guardó en un recipiente color ámbar.
- Luego se trasvasó la otra mitad del extracto acuoso en otro beaker de 500 mL.
- Se realizó una hidrólisis con 15 mL de HCl al 10% concentración.
- Después, se calentó a 200°C durante 20 minutos.
- Se dejó enfriar hasta que alcanzará una temperatura ambiente (25°C).
- Más tarde, se trasvasa el resultante del extracto acuoso junto con el HCl a un embudo separador.
- Se agregó 25 mL de éter etílico al embudo separador.
- Hay que asegurar que el tapón y la llave del embudo se encuentren bien cerrados.
- Luego, se agitó lentamente en movimientos circulares el embudo separador conteniendo el extracto acuoso con sus demás componentes.
- Después, se abrió la válvula del embudo para expulsar los gases que se formaron dentro del mismo.
- Posteriormente, se dejó reposar el embudo de separación hasta verificar la división completa de las dos fases, retirando el tapón del embudo separador para que se de esta separación.
- Se procedió a separar las dos fases. Para lo anterior se abrió la llave con cuidado y se depositó en un beaker de 250 mL el extracto acuoso y se rotuló como AQ₂, ya que por su polaridad es la que se va a encontrar en la parte inferior del embudo de separación.

- Nuevamente, se vertió y depositó el extracto acuoso en otro beaker de 250 mL y se rotuló como AQ₂E, debido a que por su polaridad es la que se va a encontrar en la parte superior del embudo de separación.
- Se repitió este procedimiento hasta asegurar la extracción completa de los componentes, cabe destacar que se realizó cuatro extracciones con éter etílico y se depositó cada extracto en sus correspondientes beakers anteriormente rotulados.
- Posteriormente se le añadió 50 g de sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua presente que se recolectó junto con el extracto.

Preparación del Extracto Etéreo para las Pruebas Fitoquímicas

- Luego de recolectado el extracto etéreo, se procedió a concentrar el extracto etéreo hasta un volumen no mayor de 30 mL.
- Se utilizó un evaporador rotatorio para realizar la concentración cumpliendo con las siguientes características: el baño de agua no debe de sobrepasar los 40°C, debe colocarse suficiente hielo y agua en el sistema de recirculación de agua para el serpentón del condensador.
- Como el punto de ebullición del éter etílico no sobrepasa los 36,4°C, no es necesario poner a funcionar la bomba de vacío.

Pruebas Físicoquímicas de los Extractos Etéreos y Acuosos

1. Prueba Börntrager-Krauss (Identificación de Antraquinonas)

- Se tomó 4 mL del extracto etéreo y se colocó en un tubo de ensayo.
- Se evaporó completamente en un baño María a una temperatura de 200°C.
- Se disolvió el residuo del extracto etéreo en 1 mL de NH₄OH al 25% de concentración.
- Si la planta cuenta con la presencia de este metabolito, la disolución se tornará de un color rojo oscuro. Entre más claro sea el color, menos presencia de metabolito.

2. Prueba de Dragendorff (Identificación de Alcaloides)

- Se tomó 4 mL del extracto etéreo y se colocó en un tubo de ensayo.
- Se evaporó completamente en un baño María a una temperatura de 200°C.
- Luego se disolvió el residuo del extracto etéreo en 3 mL de HCl al 2% de concentración.
- Se agregó tres gotas del reactivo de Dragendorff al tubo de ensayo, recuerde que este reactivo se debe agregar pegado a las paredes del tubo de ensayo.
- Si en la planta hay presencia de alcaloides se formará un precipitado anaranjado el cual se observa en el momento que la gota del reactivo entra en contacto con la disolución.

3. Prueba de KOH (Identificación de Cumarinas)

- Se tomó 4 mL del extracto etéreo y se colocó en un tubo de ensayo.
- Se evaporó completamente en un baño María a una temperatura de 200°C.
- Se disolvió el residuo del extracto etéreo en 1 mL de agua hirviendo.
- Se aplicó con un capilar dos gotas en un papel de filtro (las gotas deben estar bastante separadas).
- Se encendió la lámpara UV a una longitud de onda de 366 nm y se colocó el papel de filtro debajo de la lámpara apuntando a una de las muestras anteriormente aplicadas.
- Sobre la muestra del papel filtro se aplicó una gota de KOH 0,5 mol/L de concentración.
- Si la planta cuenta con la presencia de este metabolito se observará una coloración verde alrededor de la muestra inmediatamente después de aplicado el KOH.
- Es importante no confundir el color verde (positivo) con las tonalidades azuladas o celestes (negativos).

4. Prueba de Liebermann-Burchard (Identificación de Triterpenos)

- Se tomó 4 mL del extracto etéreo y se colocó en un tubo de ensayo.
- Se evaporó completamente en un baño María a una temperatura de 200°C.

- Se disolvió el residuo del extracto etéreo en 1 mL de CHCl_3 (cloroformo, usar en capilla).
- Se adicionó al tubo de ensayo 1 mL de anhídrido acético, se agitó bien el tubo y posteriormente se inclinó el tubo en la capilla.
- Se agregó lentamente 3 gotas de H_2SO_4 concentrado por las paredes del tubo, sin agitar (realizar todo este procedimiento en la capilla).
- Si la planta cuenta con la presencia de estos metabolitos se formará un anillo en medio de las dos fases de color rojo-marrón o verde esmeralda.

5. Prueba de Shinoda (Identificación de Flavonoides)

- Se tomó 4 mL del extracto etéreo y se colocó en un tubo de ensayo.
- Se evaporó completamente en un baño María a una temperatura de 200°C .
- Se disolvió el residuo del extracto etéreo en 2 mL de metanol y se calentó en baño María.
- Se adicionó limaduras de Magnesio (una pequeña punta de espátula), luego se colocó el tubo de ensayo en un beaker y se llevó a la capilla.
- Se agregó 1 mL de HCl concentrado. Se agitó suavemente el tubo de ensayo y se dejó reposar en el beaker (se va a generar un burbujeo violento en el tubo de ensayo, no lo toque).
- Si la planta cuenta con la alta presencia de flavonoides se va a generar una coloración rojo oscuro (si la presencia de este metabolito no es tan alta, la coloración puede variar a rosado claro).

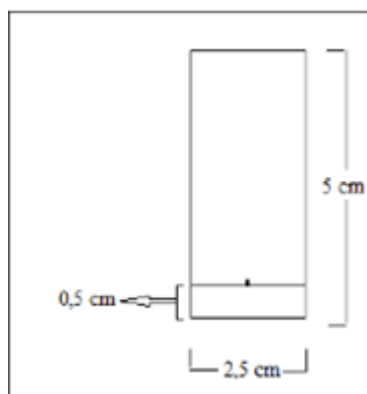
6. Prueba de Taninos (Determinación de Taninos)

- Se tomó 4 mL del extracto etéreo y se colocó en un tubo de ensayo.
- Se evaporó completamente en un baño María a una temperatura de 200°C .
- Se disolvió en agua caliente a 200°C y se adicionó cinco gotas de FeCl_3 al 1% de concentración.

- Si la disolución se torna de un color azul se sugiere la presencia de taninos gálicos. Y si la coloración es verde se sugiere la presencia de taninos catéquicos.

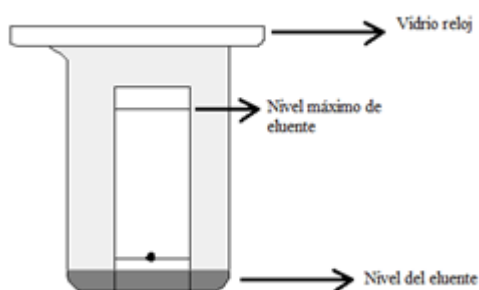
7. Cromatografía de Capa Fina TLC (Determinación de Terpenos)

- Se tomó con un capilar la muestra del extracto etéreo y se aplicó una pequeña cantidad en una placa cromatográfica de capa fina (ver figura 3) de 5 x 2,5 cm, cuya fase estacionaria debe de ser sílica gel con fluorescencia a 254 nm (TLC sílica gel F254).
- Se dejó que se evapore el disolvente.



Fuente: Alpízar, 2018

- Se preparó la fase móvil (eluyente) para correr la placa preparada con anterioridad.
- Se armó el sistema cromatográfico tal y como se muestra en la figura adjunta. Observe que el nivel del eluyente no debe de estar por encima del punto de aplicación de la muestra.



Fuente: Alpízar, 2018

- Usted podrá ver el avance de la corrida, debido a que la placa se va a impregnar (humedecer) con la fase móvil.

- Debe de retirar la placa de la fase móvil 0,5 cm antes de que el eluyente toque la parte superior de la placa.
- Se dejó secar bien la placa (TLC) y se observó con la luz UV a 254 y 365 nm. Posteriormente se reveló la placa con el reactivo de vainillina.
- El reactivo de vainillina debe ser preparado in-situ.
- Se tomó 5 partes de la disolución al 1% de vainillina, se mezcló con 1 parte de H₂SO₄ al 50% en etanol y se agitó bien.
- Luego con un gotero se impregnó toda la placa con el reactivo anteriormente preparado. Se dejó caer unas gotas desde la parte superior de la placa y se dejó correr en línea recta por toda la placa hasta la base (repetir el procedimiento con toda la placa hasta impregnarla totalmente).
- Se dejó que la placa se secase.
- Posteriormente, se quemó la placa de TLC colocándola en un calentador-agitador con la parte metálica en contacto con el calentador, a un nivel de 5 y se retiró cuando la coloración fue intensa.
- Si la planta tiene la presencia de estos metabolitos, la coloración de las manchas serán azules, moradas y/o rojas.

Preparación del Extracto Acuoso para las Pruebas Fitoquímicas

- Se sacó del refrigerador la muestra acuosa y se separó en dos recipientes (viales) en volúmenes iguales rotulados como AQ₁ y AQ₂.
- Se guardó el vial denominado AQ₂ en el refrigerador.

Muestra AQ₁

- Se procedió a realizar las pruebas para la identificación de metabolitos secundarios al vial rotulado como AQ₁.

1. Prueba de Benedict (Determinación de Azúcares Reductores)

- Se agregó 3 mL de muestra a un tubo de ensayo y se añadió 10 gotas del reactivo rotulado como Benedict.
- Se agitó y calentó la muestra en un baño María a una temperatura de 200°C y se esperó de 5 a 10 min para que se enfriara alcanzando temperatura ambiente (25°C).
- Si hay presencia de azúcares reductores en la muestra, se observará la formación de un precipitado rojo ladrillo después del tiempo establecido.

2. Prueba de Dragendorff (Identificación de Alcaloides)

- Se tomó 4 mL del extracto AQ₁ y se colocó en un tubo de ensayo.
- Se evaporó completamente en un baño María a una temperatura de 200°C.
- Luego se disolvió el residuo del extracto etéreo en 3 mL de HCl al 2% de concentración.
- Se agregó tres gotas del reactivo de Dragendorff al tubo de ensayo, recuerde que este reactivo se debe agregar pegado a las paredes del tubo de ensayo.
- Si en la planta hay presencia de alcaloides se formará un precipitado anaranjado el cual se observa en el momento que la gota del reactivo entra en contacto con la disolución.

3. Prueba de Espuma (Determinación de Saponinas)

- Se agregó 3 mL del extracto AQ₁ a un tubo de ensayo, se tapó el tubo de ensayo con papel parafina o plástico.
- Se agitó por un minuto y se dejó reposar en la gradilla por 20 minutos aproximadamente.
- Si hay presencia de este metabolito luego de pasado el tiempo se podrá observar la presencia de espuma en la muestra. A mayor cantidad de espuma mayor concentración de saponinas.

4. Prueba de Lugol (Determinación de Almidón)

- Se tomó 2 mL del extracto AQ₁ y se colocó en un tubo de ensayo.
- Se añadió gota a gota el reactivo hasta que la muestra se torne azul.
- Si no hay cambio de color, añada más Lugol hasta un máximo de 2 mL del reactivo.

5. Prueba de Taninos (Determinación de Taninos)

- Se tomó 4 mL del extracto AQ₁ y se colocó en un tubo de ensayo.
- Se evaporó completamente en un baño María a una temperatura de 200°C.
- Se disolvió en agua caliente a 200°C y se adicionó cinco gotas de FeCl₃ al 1% de concentración.
- Si la disolución se torna de un color azul se sugiere la presencia de taninos gálicos. Y si la coloración es verde se sugiere la presencia de taninos catéquicos.

Muestra AQ₂

- Se sacó del refrigerador la muestra rotulada como AQ₂, se añadió 10 mL de HCl₃ M.
- Se agitó bien y se calentó por 20 min.
- Se dejó enfriar durante unos 10 minutos hasta que alcanzara una temperatura ambiente (25°C).
- Se colocó la muestra fría en un embudo separador y se procedió a realizar de 3 a 5 extracciones con éter etílico (de igual manera como se realizó al extracto original).
- Se separó el extracto etéreo como AQ₂E y el extracto acuoso como AQ₂A.
- La muestra AQ₂A puede no ser refrigerada debido a la alta presencia de ácido que impedirá el crecimiento de microorganismos.

1. Prueba Börntrager-Krauss (Identificación de Antraquinonas)

- Se tomó 4 mL del extracto AQ₂ y se colocó en un tubo de ensayo.
- Se evaporó completamente en un baño María a una temperatura de 200°C.
- Se disolvió el residuo del extracto AQ₂ en 1 mL de NH₄OH al 25% de concentración.
- Si la planta cuenta con la presencia de este metabolito, la disolución se tornará de un color rojo oscuro. Entre más claro sea el color, menos presencia de metabolito.

Muestra AQ₂E

- Se concentró la muestra a un volumen aproximado de 30 mL y se realizó las pruebas que se indican a continuación:

1. Prueba de Börnträger-Krauss (Identificación de Antraquinonas)

- Se tomó 4 mL del extracto AQ₂E y se colocó en un tubo de ensayo.
- Se evaporó completamente en un baño María a una temperatura de 200°C.
- Se disolvió el residuo del extracto AQ₂E en 1 mL de NH₄OH al 25% de concentración.
- Si la planta cuenta con la presencia de este metabolito, la disolución se tornará de un color rojo oscuro. Entre más claro sea el color, menos presencia de metabolito.

2. Prueba de Dragendorff (Identificación de Alcaloides)

- Se tomó 4 mL del extracto AQ₂E y se colocó en un tubo de ensayo.
- Se evaporó completamente en un baño María a una temperatura de 200°C.
- Luego se disolvió el residuo del extracto AQ₂E en 3 mL de HCl al 2% de concentración.
- Se agregó tres gotas del reactivo de Dragendorff al tubo de ensayo, recuerde que este reactivo se debe agregar pegado a las paredes del tubo de ensayo.
- Si en la planta hay presencia de alcaloides se formará un precipitado anaranjado el cual se observa en el momento que la gota del reactivo entra en contacto con la disolución.

3. Prueba de KOH (Identificación de Cumarinas)

- Se tomó 4 mL del extracto AQ₂E y se colocó en un tubo de ensayo.
- Se evaporó completamente en un baño María a una temperatura de 200°C.
- Se disolvió el residuo del extracto AQ₂E en 1 mL de agua hirviendo.
- Se aplicó con un capilar dos gotas en un papel de filtro (las gotas deben estar bastante separadas).
- Se encendió la lámpara UV a una longitud de onda de 366 nm y se colocó el papel de filtro debajo de la lámpara apuntando a una de las muestras anteriormente aplicadas.
- Sobre la muestra del papel filtro se aplicó una gota de KOH 0,5 mol/L de concentración.
- Si la planta cuenta con la presencia de este metabolito se observará una coloración verde alrededor de la muestra inmediatamente después de aplicado el KOH.
- Es importante no confundir el color verde (positivo) con las tonalidades azuladas o celestes (negativos).

4. Prueba de Liebermann-Burchard (Identificación de Triterpenos)

- Se tomó 4 mL del extracto AQ₂E y se colocó en un tubo de ensayo.
- Se evaporó completamente en un baño María a una temperatura de 200°C.
- Se disolvió el residuo del extracto AQ₂E en 1 mL de CHCl₃ (cloroformo, usar en capilla).
- Se adicionó al tubo de ensayo 1 mL de anhídrido acético, se agitó bien el tubo y posteriormente se inclinó el tubo en la capilla.
- Se agregó lentamente 3 gotas de H₂SO₄ concentrado por las paredes del tubo, sin agitar (realizar todo este procedimiento en la capilla).
- Si la planta cuenta con la presencia de estos metabolitos se formará un anillo en medio de las dos fases de color rojo-marrón o verde esmeralda.

5. Prueba de Shinoda (Identificación de Flavonoides)

- Se tomó 4 mL del extracto AQ₂E y se colocó en un tubo de ensayo.
- Se evaporó completamente en un baño María a una temperatura de 200°C.
- Se disolvió el residuo del extracto AQ₂E en 2 mL de metanol y se calentó en baño María.
- Se adicionó limaduras de Magnesio (una pequeña punta de espátula), luego se colocó el tubo de ensayo en un beaker y se llevó a la capilla.
- Se agregó 1 mL de HCl concentrado. Se agitó suavemente el tubo de ensayo y se dejó reposar en el beaker (se va a generar un burbujeo violento en el tubo de ensayo, no lo toque).
- Si la planta cuenta con la alta presencia de flavonoides se va a generar una coloración rojo oscuro (si la presencia de este metabolito no es tan alta, la coloración puede variar a rosado claro).

Muestra AQ₂

1. Prueba de Börntrager (Determinación de Antraquinonas)

- Se tomó 1 mL de muestra y se llevó a un pH de 9 agregando lentamente y con agitación constante gotas de una disolución de NaOH.
- Se verificó el pH con tiras de papel pH.
- Si la disolución se torna azul se sigue con el procedimiento, si no hay coloración azul la prueba se cataloga como negativa.
- Si la disolución es azul agregue lentamente y con agitación constante gotas de una disolución de HCl hasta la formación de una disolución roja.
- Si hay presencia del metabolito la prueba se tornará roja a un pH ácido. Deseche el resto de la muestra rotulada como Muestra AQ₂A.

Preparación para la Concentración de los Extractos

Concentración Extracto Acuoso

- Se tomó un vial con tapa y se pesó el vial vacío con su respectiva tapa.
- Se le adicionó a uno de los viales 1 ml del extracto acuoso y se tapó el vial.
- Se rotuló el vial como extracto acuoso y se pesó el vial con tapa.
- Se determinó la concentración del vial titulado extracto acuoso, a partir de los gramos obtenidos en la balanza y los mL de volumen de extracto agregados al vial.

Concentración Extracto Acetato de Etilo

- Se tomó un vial con tapa y se pesó el vial vacío con su respectiva tapa.
- Se le adicionó a uno de los viales restantes 1 ml del extracto de Acetato de etilo y se tapó el vial.
- Se rotuló el vial como extracto de Acetato de etilo y se pesó el vial con tapa.
- Se determinó la concentración del vial titulado extracto de Acetato de etilo, a partir de los gramos obtenidos en la balanza y los mL de volumen de extracto agregados al vial.

Concentración Extracto Diclorometano

- Se tomó un vial con tapa y se pesó el vial vacío con su respectiva tapa.
- Se le adicionó a uno de los viales restantes 1 ml del extracto de Diclorometano y se tapó el vial.
- Se rotuló el vial como extracto de Diclorometano y se pesó el vial con tapa.
- Se determinó la concentración del vial titulado extracto de Diclorometano, a partir de los gramos obtenidos en la balanza y los mL de volumen de extracto agregados al vial.

Concentración Extracto Hexano

- Se tomó un vial con tapa y se pesó el vial vacío con su respectiva tapa.
- Se le adicionó a uno de los viales restantes 1 ml del extracto de Hexano y se tapó el vial.

- Se rotuló el vial como extracto de Hexano y se pesó el vial con tapa.
- Se determinó la concentración del vial titulado extracto de Hexano, a partir de los gramos obtenidos en la balanza y los mL de volumen de extracto agregados al vial.

Pruebas Antimicrobianas del Extracto Acuoso (Acetato de Etilo, Diclorometano y Hexano) de la planta *Bidens pilosa* Frente a las Bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*

En esta sección se analizó la posible actividad antimicrobiana del extracto acuoso y etanólicos de la planta *Bidens pilosa* contra distintas bacterias como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*. Las cepas de las bacterias fueron facilitadas por el Laboratorio MicroLabs, bajo la supervisión profesional del microbiólogo Dr. Roldan Ajun. De igual manera, los análisis microbianos se llevaron a cabo en este mismo Laboratorio MicroLabs, estando siempre con la vigilancia del microbiólogo Dr. Roldan Ajun. Los materiales imprescindibles para llevar a cabo todas las pruebas fueron facilitados por este laboratorio MicroLabs.

Como control positivo para las cuatro bacterias se utilizó el antibiótico de Levofloxacina. Otro aspecto a sobresalir es que en cada análisis se evaluó también como blanco, los cuatro solventes que se utilizaron para realizar la extracción, en este caso se analizó el extracto acuoso, Acetato de etilo, Diclorometano y Hexano.

Reactivos y Equipo para Realizar las Pruebas Microbiológicas

Equipo

- Placas de Petri con agar estándar
- Papel toalla
- Regla con escala métrica
- Cámara de flujo laminar horizontal marca Clean Bench
- Micropipeta de 10 μ L marca Neogen
- Puntas estériles para micropipeta de 10 μ L

- Hisopos estériles, marca Medline, ref MDS202000
- Incubadora
- Jeringas de plástico desechables de 5 mL
- Filtro para jeringa, 0.22 Micron X 25mm SE-AF2501-22

Reactivos

- Cepa de *Escherichia coli*
- Cepa de *Klebsiella pneumoniae*
- Cepa de *Salmonella typhi*
- Cepa de *Staphylococcus aureus*
- Extracto acuoso de la *Bidens pilosa*
- Extracto de Acetato de Etilo
- Extracto Diclorometano
- Extracto Hexano
- Disolución de Levofloxacina (control positivo de las bacterias) 25mg/ml
- Acetato de etilo (Universidad Internacional de las Américas, Blanco)
- Agua destilada (Universidad Internacional de las Américas, Blanco)
- Diclorometano (Universidad Internacional de las Américas, Blanco)
- Hexano (Universidad Internacional de las Américas, Blanco)

Cultivos de las Distintas Cepas de las Bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*

Las cepas de las cuatro bacterias necesarias para realizar este análisis, fueron incubadas por un periodo de 24 horas para su adecuado y respectivo crecimiento, y así asegurar una

concentración elevada de estas mismas. Este procedimiento está respaldado por el artículo elaborado por Arias *et al* publicado en el 2015 donde mencionan, que este es el tiempo determinado y adecuado para el proceso de incubación y crecimiento de bacterias gram positivas y gram negativas para su correcto uso. Posterior a esto se realizaron los distintos cultivos, tal y como se describe a continuación:

- En una cámara de flujo laminar se procedió a situar el agar estándar en cada uno de los cuatro platos Petri, dejándolos descansar por un periodo de 10 minutos para la solidificación de los mismos.
- Una vez transcurrido este tiempo de los 10 minutos, cada placa se dividió en 9 partes y se rotuló respectivamente, lo más semejantes posibles teniendo la precaución de dejar un espacio de alrededor de un centímetro del extremo de la placa, esto para que la incorporación de los extractos tanto como los medios de control se realizarán de una manera sencilla.
- Posterior, se tomó una punta de microtubo y se realizó nueve agujeros a cada placa, para poder adicionar los tres extractos y el extracto acuoso, el control positivo, así como los cuatro blancos (los tres extractos y el extracto acuoso).
- Luego, se procedió a realizar 4 rayados en forma de zigzag en cada placa con las bacterias. Para este procedimiento, se utilizó un hisopo estéril para cada bacteria. Este hisopo se introdujo en el tubo de ensayo que contenía cada una de las bacterias y se realizó las estrías en el agar con mucho cuidado de no romperlo en el momento de la acción.
- Seguidamente, con ayuda de una micropipeta de 10 μ L, se adicionó cada extracto en el agujero que se había realizado. Se debe recordar que cada vez que se adicione un extracto a la placa se debe cambiar la punta de la micropipeta, para así minimizar el riesgo de una contaminación cruzada. A todas las placas se les adicionó la misma cantidad de los extractos, así como el control positivo correspondiente en cada caso y los blancos correspondientes, todos ellos en la misma posición en la misma placa para facilitar la lectura de cada una respectivamente.

- Por último, se taparon cada una de las placas y se procedió a introducirlas en una incubadora por un lapso de 48 horas. Una vez pasado este tiempo, se observaron y realizaron las lecturas de las placas de las bacterias.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS

Este capítulo reporta los datos obtenidos que dan seguimiento y valor a los objetivos de la presente investigación. La discusión de los resultados pretende dar respuesta al planteamiento del problema expuesto, con la finalidad de evaluar las propiedades antimicrobianas de los extractos de la planta *Bidens pilosa* y comprobar su efecto contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*.

Recolección de la planta *Bidens pilosa*

Se realizó la recolección del material botánico, previo a su utilización se sometió a un proceso de selección de las partes de interés y por lo que se eliminó material extraño, por ejemplo, raíces y partes de la planta muertas. Se procedió a realizar una limpieza utilizando un lavado con agua para eliminar la mayor cantidad de impurezas que se pudieran contener en las partes de la planta seleccionadas, posterior a esto, se removió el exceso de agua con papel toalla y se permitió secar el material botánico mediante una forma extendida a una temperatura ambiente (25°C) para que se eliminará más fácilmente el agua durante 24 horas aproximadamente.

Es importante mencionar que las muestras de las plantas se maceraron a mano, esto con el propósito de prevenir al máximo posible la factible oxidación de los metabolitos que se pudieran encontrar en la planta *Bidens pilosa*, y así, ocasionar un mayor y mejor rendimiento al momento de realizar la extracción. Otro procedimiento que se podría haber ejecutado corresponde a la utilización de herramientas de origen plástico para eludir esta reacción, debido a que las herramientas de metal permiten degradar a una velocidad aumentada las sustancias anteriormente mencionadas.

Extracción de la Planta *Bidens pilosa*

Primero se tomó la planta *Bidens pilosa*, romerillo o comúnmente conocida como muriseco, una vez lavada y seca, se procedió a triturar la planta de una forma manual para evitar la oxidación o destrucción de los metabolitos presentes en la misma. Un aspecto importante a

recordar, es que en esta ocasión al ser una planta categorizada como maleza y por lo tanto poseer un tamaño pequeño, se utilizó para el estudio prácticamente toda la planta (tallo, hojas y flores) y eliminando únicamente la raíz de la misma, debido a que no se consideró en este estudio.

Para realizar la extracción se usó el disolvente etanol al 70%, porque de acuerdo a la literatura de Arroyo *et al* (2010) es un solvente que permite ser factible para el manejo en la planta y que, además, provoca buenos resultados en los análisis y un excelente desempeño en el momento de ejercer la extracción del romerillo. Se realizó una maceración del muriseco en un tamaño homogéneo (2.5cm), debido a la investigación también realizada por Arroyo *et al* (2010) donde se mencionó que permite obtener buenos rendimientos en las extracciones y también, es una forma sencilla y económica para realizarlos.

Extracción Etanólica a partir de la *Bidens pilosa*

Se tomó 358.33 gramos del material vegetal al cual se le incorporó 900 mL de etanol al 70%, este volumen fue necesario y apto para cubrir todo el material vegetal colocado dentro del recipiente ámbar. Posteriormente, se dejó reposar durante 7 días, transcurrido este tiempo se separó el líquido del material vegetal por medio de una filtración al vacío, y el extracto obtenido presentaba una contextura homogénea, con partículas suspendidas en el medio. Se colocó la muestra del extracto obtenido en el rotavapor para eliminar la mayor cantidad de disolvente presente en la muestra. El volumen final obtenido fue de: 90 mL.

Fraccionamiento del Extracto Crudo a partir de la *Bidens pilosa*

Se dividió el volumen total de la extracción de la planta *Bidens pilosa* (90 mL) en dos partes: una parte con un volumen de 50 mL para la continuación de las fracciones de Acetato de Etilo, Diclorometano y Hexano, y la segunda parte con un volumen de 40 mL para la identificación de metabolitos mediante pruebas fitoquímicas.

Fracción de Acetato de Etilo a partir de la *Bidens pilosa*

Después de realizar el fraccionamiento con el acetato de etilo, se observó que el líquido resultante tiene características físicas, tales como: presenta una coloración verdosa, de forma homogénea, sin viscosidad, sin partículas que la conforman. Además, se obtuvo un volumen final de 400 mL. También, es importante comprender la justificación del fraccionamiento de Acetato de Etilo, el cual es separar los diferentes componentes del extracto crudo según la polaridad respectiva, obteniéndose una mayor polaridad del mismo.

Fracción Diclorometano a partir de la *Bidens pilosa*

Una vez realizado el fraccionamiento con diclorometano, el líquido resultante tiene características físicas, tales como: que presenta una coloración amarillenta clara, de igual forma homogénea, sin viscosidad aparente, sin visibles partículas que la conforman. También, se obtuvo un volumen final de 400 mL. Además, es necesario englobar la acreditación del fraccionamiento de Diclorometano, debido a que el motivo es disgregar los diversos elementos que forman parte del extracto crudo según su polaridad, obteniéndose como una polaridad intermedia la del mismo.

Fracción Hexano a partir de la *Bidens pilosa*

Al desarrollar el procedimiento con Hexano, el líquido resultante tiene características físicas, tales como: que presenta una coloración amarillenta-verdosa, con forma homogénea en su visualización, sin viscosidad observada, sin partículas anexas en el contenido. También, se obtuvo un volumen final de 400 mL. Asimismo, es inexcusable mencionar la función del fraccionamiento de Hexano, porque su finalidad es disociar los variados integrantes que conforman el extracto crudo según sea su polaridad, obteniéndose una polaridad disminuida en la fracción.

Fracción Acuosa a partir de la *Bidens pilosa*

Al finalizar los fraccionamientos anteriormente mencionados, se obtiene el fluido que corresponde al extracto acuoso. Este fluido es el final del procedimiento, que posee características, tales como: una tonalidad en su coloración de tipo café, sin contenido de partículas, de una viscosidad baja y una conformación homogénea. De igual manera, se determinó el volumen final del fraccionamiento, el cual fue de 30 mL.

Tabla 5. Resumen de Características de cada Fracción Realizada a la Planta *Bidens pilosa*

Fracción analizada	Volumen (mL) Final	Características del medio
Fracción de acetato de etilo	400	Coloración verdosa, homogénea, sin viscosidad
Fracción de diclorometano	400	Tonalidad amarillenta clara, homogénea, sin viscosidad y sin partículas.

Fracción de Hexano	400	Coloración amarillo-verdosa, homogénea, sin viscosidad y sin partículas
Fracción acuosa	30	Coloración café, sin partículas, viscosidad baja

Tamizaje Fitoquímico para la Identificación de los Metabolitos Secundarios presentes en los Fraccionamientos Acuoso y Etéreos de la *Bidens pilosa*

Tabla 6. Resumen de las Pruebas Fitoquímicas de los Fraccionamientos Etéreos y Acuosos de la Planta *Bidens pilosa*

Prueba Fitoquímica	Fracción etérea	Fracción acuosa uno (AQ ₁)	Fracción acuosa dos (AQ ₂)	Fracción acuosa dos con éter (AQ ₂ E)
Börntrager-Krauss	++		-	+++
Dragendorff	+++	-		-
KOH	+++			++
Liebermann-Burchard	++			++
Shinoda	-			++
Taninos	+++	++		
Cromatografía de capa fina (Terpenos)	++			
Benedict		-		
Saponinas		-		
Lugol		-		
Muy Positivo:+++	Positivo:++	Menos positivo:+	Negativo: -	

Nota: Elaboración propia, 2020

Posteriormente que se obtuvieron los fraccionamientos acuosos y etéreos de la planta *Bidens pilosa*, el siguiente procedimiento a desarrollar correspondió a la caracterización fisicoquímica de las fracciones, con el fin de evidenciar la presencia de metabolitos secundarios

como: alcaloides, flavonoides, cumarinas, triterpenos, antraquinonas, taninos, terpenos, almidón, saponinas y azúcares reductores como componentes de la planta. El método utilizado fue el mismo descrito y respectivo que se describió en la metodología.

Prueba Börntrager-Krauss (Identificación de Antraquinonas) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la *Bidens pilosa*

Para determinar la presencia de antraquinonas en la fracción etérea hidrolizada de la planta, se le realizó la prueba con el reactivo NH_4OH al 25% de concentración, en la cual es considerado un resultado positivo de presencia de antraquinonas, si la disolución se torna de un color rojo oscuro (entre más claro sea el color, menos presencia del metabolito). Esta prueba de Börntrager-Krauss se consideró positiva para la fracción etérea hidrolizada de la planta debido a que se observó un cambio en la coloración: se tornó de un color rojo. Los resultados descritos en este punto se muestran en la figura 34.

Figura 34. Prueba Börntrager-Krauss (Identificación de Antraquinonas) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020.

**Prueba de Dragendorff (Identificación de Alcaloides) para la Fracción Etérea
Hidrolizada de la *Bidens pilosa***

Esta prueba se utiliza para identificar la presencia de alcaloides en la fracción etérea de la planta, se le realizó la prueba con el reactivo Dragendorff, en la cual es considerado un resultado positivo de presencia de alcaloides, si en la disolución se forma un precipitado anaranjado en el momento que la gota del reactivo entra en contacto con la disolución. Esta prueba se consideró positiva como se observa en la figura 35, debido a que se observó un cambio en la disolución: se formó un precipitado anaranjado en el momento que la gota del reactivo entró en contacto con la disolución.

Figura 35. Prueba de Dragendorff (Identificación de Alcaloides) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la *Bidens pilosa*

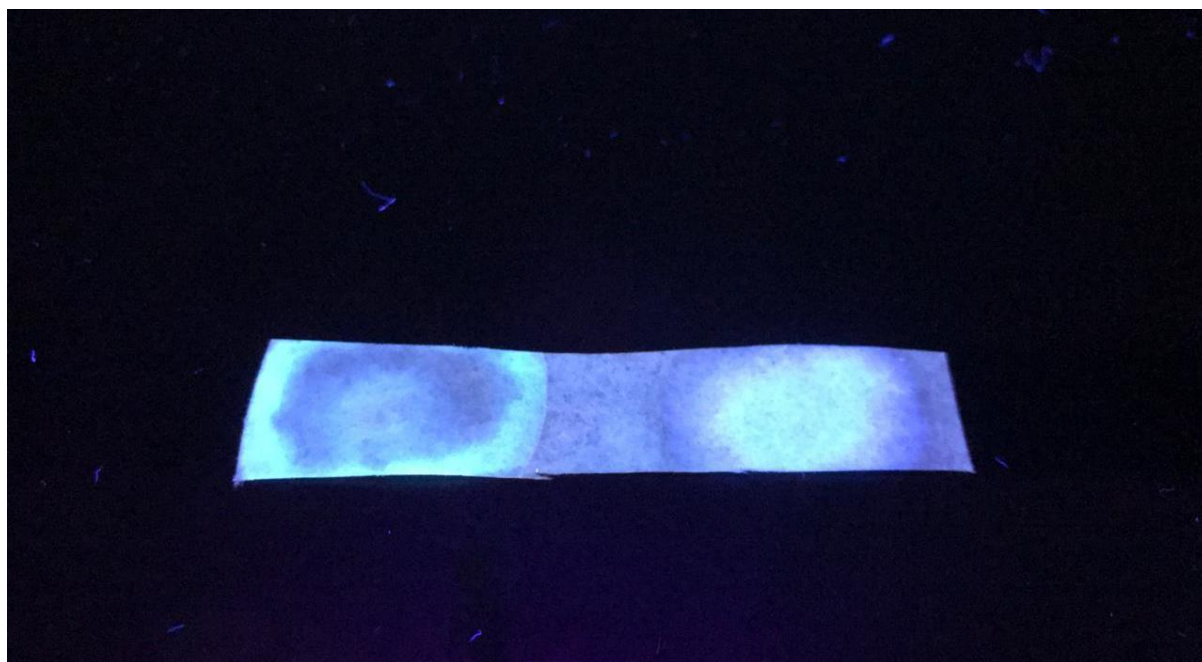


Fuente: Elaboración propia, 2020.

Prueba de KOH (Identificación de Cumarinas) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la *Bidens pilosa*

En la identificación de cumarinas en la fracción etérea hidrolizada de la planta, se le realizó la prueba con el reactivo KOH 0,5 mol/L de concentración, en la cual es considerado un resultado positivo de presencia de cumarinas, si en la disolución se observa una coloración verde alrededor de la muestra, inmediatamente después de aplicado el KOH. En la figura 36 se observó la prueba positiva para la fracción etérea hidrolizada de la planta debido a que se observó una coloración verde alrededor de la muestra, inmediatamente después de aplicado el reactivo KOH.

Figura 36. Prueba de KOH (Identificación de Cumarinas) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020.

Prueba de Liebermann-Burchard (Identificación de Triterpenos) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la *Bidens pilosa*

Para determinar la presencia de triterpenos en la fracción etérea hidrolizada de la planta, se le realizó la prueba con el reactivo Liebermann-Burchard, en la cual es considerado un resultado positivo de presencia de triterpenos, si en la disolución se observa una formación de un anillo en medio de las dos fases, de color rojo-marrón o verde esmeralda. Esta prueba se

consideró positiva para la fracción etérea hidrolizada de la planta debido a que se observó una formación de un anillo en medio de las dos fases, de color rojo-marrón. Los resultados descritos en este punto se muestran en la figura 37.

Figura 37. Prueba de Liebermann-Burchard (Identificación de Triterpenos) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020.

Prueba de Shinoda (Identificación de Flavonoides) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la *Bidens pilosa*

Para determinar la presencia de flavonoides en la fracción etérea hidrolizada de la planta, se le realizó la prueba con el reactivo Shinoda, en la cual es considerado un resultado positivo de presencia de flavonoides, si en la disolución se va a generar una coloración rojo oscuro (si la presencia de este metabolito no es tan alta, la coloración puede variar a rosado claro). Esta prueba de Shinoda se consideró negativa para la fracción etérea hidrolizada, debido a que no se observó una coloración roja oscura en la muestra sino una café clara. Los resultados descritos en este punto se muestran en la figura 38.

Figura 38. Prueba de Shinoda (Identificación de Flavonoides) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la *Bidens pilosa*

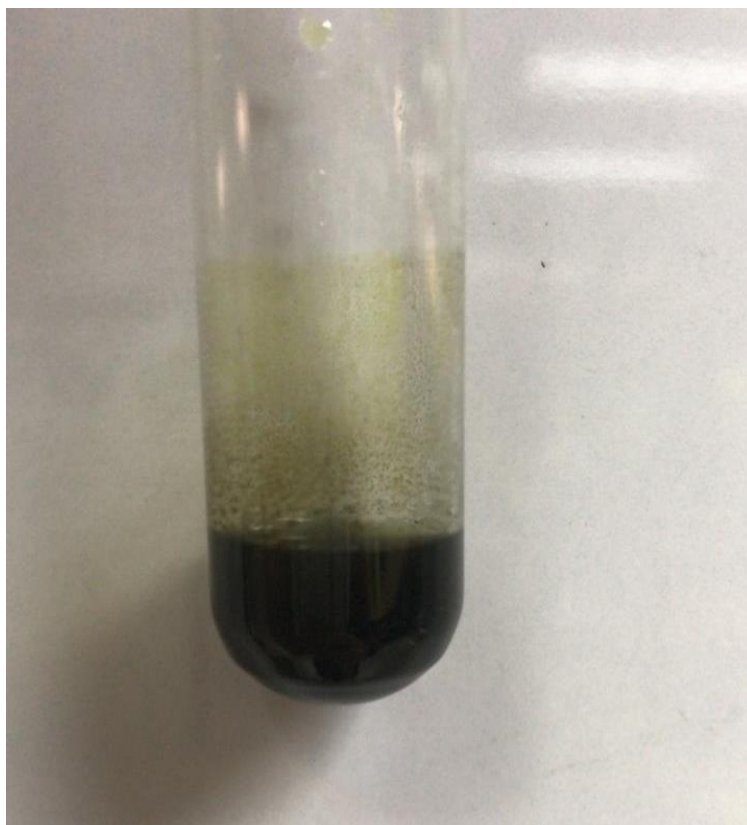


Fuente: Elaboración propia, 2020.

Prueba de Taninos (Determinación de Taninos) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la *Bidens pilosa*

En la determinación de la presencia de taninos en la fracción etérea hidrolizada de la planta, se le realizó la prueba con el reactivo FeCl_3 al 1% de concentración, en la cual es considerado un resultado positivo de presencia de taninos, si en la disolución se torna de un color azul se sugiere la presencia de taninos gálicos. Y si la coloración es verde se sugiere la presencia de taninos catéquicos. Esta prueba de taninos se consideró positiva para la presencia de taninos catéquicos en la fracción etérea debido a que se observó una coloración verde que sugiere presencia de taninos catéquicos. Esto se evidencia en la figura 39.

Figura 39. Prueba de Taninos (Determinación de Taninos) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020.

Cromatografía de Capa Fina TLC (Determinación de Terpenos) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la *Bidens pilosa*

Para determinar la presencia de terpenos mediante la cromatografía de capa fina TLC en la fracción etérea hidrolizada, se le realizó la prueba con la reactiva vainillina, en la cual es considerado un resultado positivo de presencia si en la disolución la coloración de las manchas son azules, moradas y/o rojas de terpenos, si en la disolución la coloración de las manchas son azules, moradas y/o rojas. Esta prueba de cromatografía de capa fina TLC se consideró positiva por la existencia en coloración de manchas en color moradas. Los resultados descritos en este punto se muestran en la figura 40.

Figura 40. Cromatografía de Capa Fina TLC (Determinación de Terpenos) para la Fracción Etérea Hidrolizada de la *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020.

Fraccionamiento del Extracto Acuoso a partir de la *Bidens pilosa*

Para buscar un mejor resultado en las pruebas fitoquímicas, el extracto acuoso se fraccionó y se obtuvieron los siguientes extractos acuosos: extracto acuoso uno (AQ₁); del AQ₁ se obtuvieron el extracto acuoso dos (AQ₂) y el extracto acuoso etéreo (AQ₂E).

Fracción del Extracto Acuoso uno (AQ₁) a partir de la *Bidens pilosa*

Después de realizar el fraccionamiento del extracto acuoso uno (AQ₁) a partir de la *Bidens pilosa*, se procedió a realizar las pruebas para la identificación de metabolitos secundarios al vial rotulado como (AQ₁).

Prueba de Benedict (Determinación de Azúcares Reductores) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la *Bidens pilosa*

Para determinar la presencia de azúcares reductores en la fracción acuosa uno (AQ₁) de la planta, se le realizó la prueba con el reactivo de Benedict, en la cual es considerado un resultado positivo de presencia de azúcares reductores, si en la disolución se da una formación de un precipitado rojo ladrillo, después del tiempo establecido. Esta prueba de Benedict se consideró negativa porque de la imagen se observa una coloración que podría interpretarse como un precipitado rojo ladrillo, después de este lapso de tiempo. Los resultados descritos en este punto se muestran en la figura 41.

Figura 41. Prueba de Benedict (Determinación de Azúcares Reductores) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020.

Prueba de Dragendorff (Identificación de Alcaloides) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la *Bidens pilosa*

En lo concerniente a la prueba para la identificación de alcaloides en la fracción acuosa uno (AQ₁) de la planta, se le realizó la prueba con el reactivo de Dragendorff, en la cual es

considerado un resultado positivo de presencia de alcaloides, si en la disolución se da una formación de un precipitado anaranjado, el cual se observa en el momento que la gota del reactivo entra en contacto con la disolución. Esta prueba de Dragendorff se consideró como negativa la prueba esto porque no se observa la formación de un precipitado anaranjado. Los resultados descritos en este punto se muestran en la figura 42.

Figura 42. Prueba de Dragendorff (Identificación de Alcaloides) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020.

Prueba de Espuma (Determinación de Saponinas) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la *Bidens pilosa*

En la determinar de la presencia de saponinas en la fracción acuosa uno (AQ₁) de la planta, se le realizó la prueba donde se agito la muestra por el tiempo dicho y en donde es considerado un resultado positivo de presencia de saponinas, si en la disolución se da la presencia de espuma en la muestra (a mayor cantidad de espuma mayor concentración de saponinas). Esta prueba de espuma se consideró negativa porque no hubo presencia de espuma en la muestra. Estos resultados se describieron en la figura 43.

Figura 43. Prueba de Espuma (Determinación de Saponinas) para la fracción Acuosa uno (AQ₁) de la *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020.

Prueba de Lugol (Determinación de Almidón) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la *Bidens pilosa*

Para determinar la presencia de almidón en la fracción acuosa uno (AQ₁) de la planta, se le realizó la prueba con el reactivo de Lugol, en la cual es considerado un resultado positivo de presencia de almidón, si la disolución se torna de un color azul. Esta prueba de Lugol se consideró negativa porque no hubo presencia de una coloración azul. Los resultados descritos en este punto se muestran en la figura 44.

Figura 44. Prueba de Lugol (Determinación de Almidón) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la *Bidens pilosa*

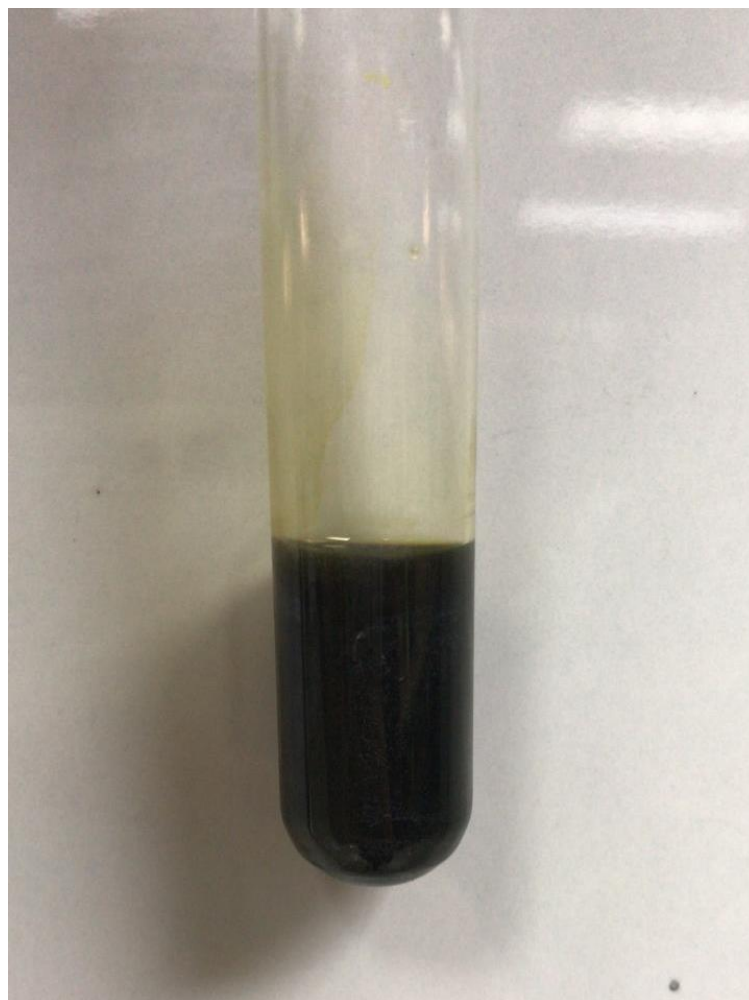


Fuente: Elaboración propia, 2020.

Prueba de Taninos (Determinación de Taninos) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la *Bidens pilosa*

Para determinar la presencia de taninos en la fracción acuosa uno (AQ₁) de la planta, se le realizó la prueba con el reactivo de FeCl₃ al 1% de concentración, en la cual es considerado un resultado positivo de presencia de taninos, si la disolución se torna de un color azul se sugiere la presencia de taninos gálicos. Y si la coloración es verde se sugiere la presencia de taninos catéquicos. Esta prueba de Taninos se consideró positiva porque la disolución se tornó de un color azul, que sugiere la presencia de taninos gálicos. Los resultados descritos en este punto se muestran en la figura 45.

Figura 45. Prueba de Taninos (Determinación de Taninos) para la Fracción Acuosa uno (AQ₁) de la *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020.

Fracción del Extracto Acuoso dos (AQ₂) a partir de la *Bidens pilosa*

Posteriormente de realizar el fraccionamiento del extracto acuoso dos (AQ₂) a partir de la *Bidens pilosa*, se procedió a realizar la prueba para la identificación de metabolitos secundarios al vial rotulado como (AQ₂).

Prueba Börntrager-Krauss (Identificación de Antraquinonas) para la Fracción Acuosa dos (AQ₂) de la *Bidens pilosa*

Para determinar la presencia de antraquinonas en la fracción acuosa dos (AQ₂) de la planta, se le realizó la prueba con el reactivo de Börntrager-Krauss, en la cual es considerado un resultado positivo de presencia de antraquinonas, si la disolución se torna de un color rojo

oscuro. (entre más claro sea el color, menos presencia de metabolito). Esta prueba de Börntrager-Krauss se consideró negativa como se evidencia en la figura 46 porque la disolución no se torna del color deseado.

Figura 46. Prueba Börntrager-Krauss (Identificación de Antraquinonas) para la Fracción Acuosa dos (AQ₂) de la *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020.

Fracción del Extracto Acuoso dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) a partir de la *Bidens pilosa*

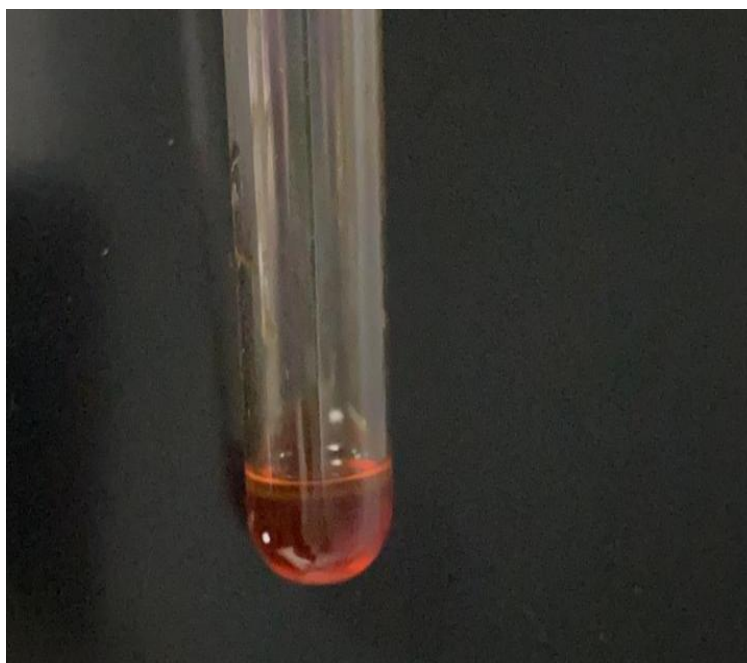
Siguientemente de realizar el fraccionamiento del extracto acuoso dos con éter hidrolizado (AQ₂E) a partir de la *Bidens pilosa*, se concentró la fracción y se procedió a realizar la prueba para la identificación de metabolitos secundarios al vial rotulado como (AQ₂E).

Prueba de Börntráger-Krauss (Identificación de Antraquinonas) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la *Bidens pilosa*

Para determinar la presencia de antraquinonas en la fracción acuosa dos con éter hidrolizado, se le realizó la prueba con el reactivo de Börntrager-Krauss, en la cual es considerado un resultado positivo de presencia de antraquinonas, si la disolución se torna de un

color rojo oscuro. (entre más claro sea el color, menos presencia de metabolito). Esta prueba de Börntrager-Krauss se consideró positiva porque la disolución se tornó de un color rojo, que sugiere la presencia de antraquinonas. Los resultados descritos en este punto se muestran en la figura 47.

Figura 47. Prueba de Börntráger-Krauss (Identificación de Antraquinonas) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020.

Prueba de Dragendorff (Identificación de Alcaloides) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la *Bidens pilosa*

En la identificación de alcaloides en la fracción acuosa dos con éter hidrolizado de la planta, se le realizó la prueba con el reactivo de Dragendorff, en la cual es considerado un resultado positivo en alcaloides, si en la disolución se da una formación de un precipitado anaranjado, el cual se observa en el momento que la gota del reactivo entra en contacto con la disolución. Esta prueba de Dragendorff se consideró negativa ya que no se pudo ver la formación de un precipitado anaranjado, después del tiempo establecido. Los resultados descritos en este punto se muestran en la figura 48.

Figura 48. Prueba de Dragendorff (Identificación de Alcaloides) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la *Bidens pilosa*

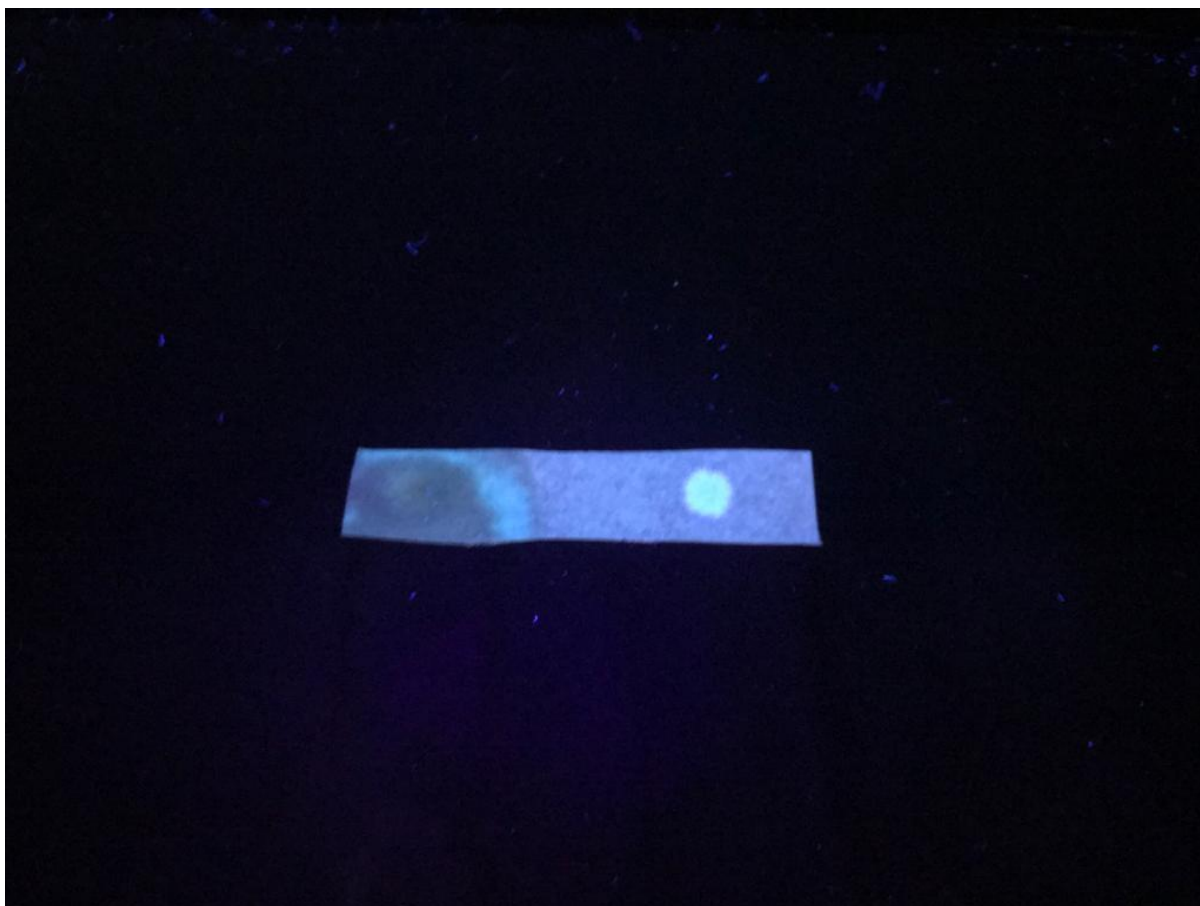


Fuente: Elaboración propia, 2020.

Prueba de KOH (Identificación de Cumarinas) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la *Bidens pilosa*

Para determinar la presencia de cumarinas en la fracción acuosa dos con éter hidrolizado (AQ₂E) de la planta, se le realizó la prueba con el reactivo KOH 0,5 mol/L de concentración, en la cual es considerado un resultado positivo de presencia de cumarinas, si en la disolución se observa una coloración verde alrededor de la muestra, inmediatamente después de aplicado el KOH. Esta prueba de KOH se consideró positiva para la fracción acuosa dos con éter hidrolizado de la planta debido a que se observó una coloración verde alrededor de la muestra, inmediatamente después de aplicado el reactivo KOH. Los resultados se muestran en la figura 49.

Figura 49. Prueba de KOH (Identificación de Cumarinas) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la *Bidens pilosa*

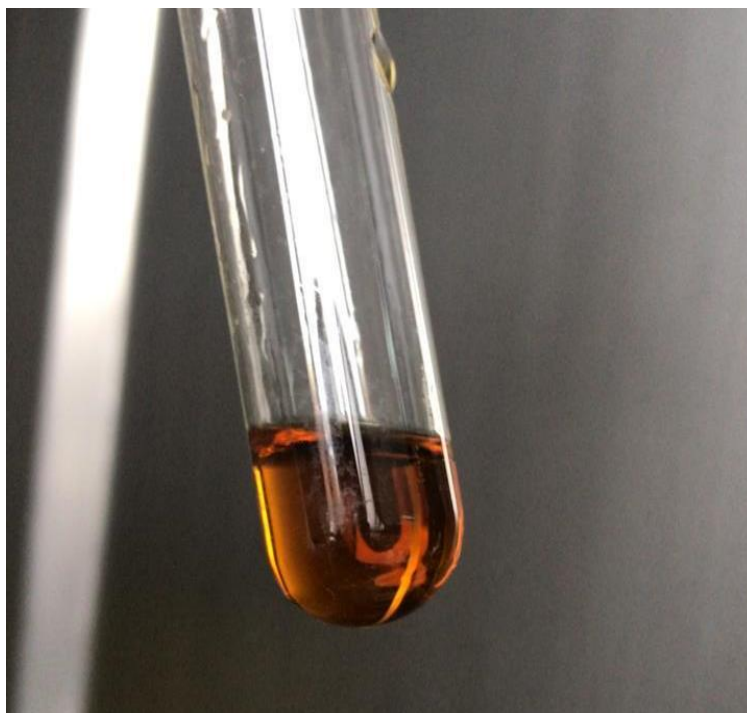


Fuente: Elaboración propia, 2020.

Prueba de Liebermann-Burchard (Identificación de Triterpenos) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la *Bidens pilosa*

Para determinar la presencia de triterpenos en la fracción acuosa dos con éter hidrolizado (AQ₂E) de la planta, se le realizó la prueba con el reactivo Liebermann-Burchard, en la cual es considerado un resultado positivo de presencia de triterpenos, si en la disolución se observa una formación de un anillo en medio de las dos fases, de color rojo-marrón o verde esmeralda. Esta prueba de Liebermann-Burchard se consideró positiva para la fracción acuosa dos con éter hidrolizado de la planta debido a que se observó una formación de un anillo en medio de las dos fases, de color rojo-marrón o verde esmeralda. Los resultados descritos en este punto se muestran en la figura 50.

Figura 50. Prueba de Liebermann-Burchard (Identificación de Triterpenos) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020.

Prueba de Shinoda (Identificación de Flavonoides) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la *Bidens pilosa*

Para determinar la presencia de flavonoides en la fracción acuosa dos con éter hidrolizado (AQ₂E) de la planta, se le realizó la prueba con el reactivo Shinoda, en la cual es considerado un resultado positivo de presencia de flavonoides, si en la disolución se va a generar una coloración rojo oscuro (si la presencia de este metabolito no es tan alta, la coloración puede variar a rosado claro). Esta prueba de Shinoda se consideró positiva para la fracción etérea de la planta debido a que se observó una coloración roja. Lo anterior se evidencia en la figura 51.

Figura 51. Prueba de Shinoda (Identificación de Flavonoides) para la Fracción Acuosa dos con Éter Hidrolizado (AQ₂E) de la *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020.

Concentración de las Fracciones en los Viales

Tabla 7. Determinación de la Concentración de las Fracciones en los Viales

Fracciones	Vial vacío con tapa (g)	Vial + muestra (g)	Cantidad de muestra (g)	Volumen de muestra (mL)	Concentración (mg/mL)
Acuoso	2,8350	3,7871	0,9521	1	952,1
Acetato etilo	2,8550	3,2883	0,4333	1	433,3
Diclorometano	2,3785	4,2704	1,8919	1	1891,9
Hexano	2,8047	3,0532	0,2485	1	248,5

Fuente: Elaboración propia, 2020.

Este procedimiento se realizó con el fin de evidenciar o demostrar la concentración que presenta cada una de las fracciones elaboradas al extracto de la *Bidens pilosa*. Esto con el fin de determinar los mg/mL que presenta el extracto, como se evidencia en la tabla 6, cada una de las fracciones presenta un valor distinto de concentración, donde la fracción elaborada con Diclorometano es la que mayor concentración tuvo en contacto, siguiéndole en valor el acuoso con un resultado de 952.1 mg/mL, siendo estos los que poseen estimaciones más elevadas.

La fracción elaborada con acetato de etilo presenta 433.3 mg/mL, mientras que el hexano de menor concentración posee 248.5 mg/mL. Es decir, que esto se debe a que existe una diferencia de componentes presentes en una fracción con respecto a otra.

Pruebas de Actividad Antibacteriana de las Fracciones de Extracto Acuoso y Extractos Etéreos de la Planta *Bidens pilosa* Mediante Pruebas In Vitro Frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* por Medio de Difusión Agar

Después de realizar las pruebas fitoquímicas a cada uno de los fraccionamientos en hexano, diclorometano, acetato de etilo y acuoso del extracto crudo obtenido de la planta *Bidens pilosa*, se procedió a determinar las actividades antibacterianas que poseen cada una de estas fracciones frente a las bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*. Estos microorganismos fueron adquiridos en el Laboratorio MicroLabs y cultivados para crecer durante 48 horas aproximadamente. Posterior a esto, cada una de las bacterias, se cultivó en el medio conocido como agar estándar en el cual pueden crecer adecuadamente.

Seguidamente, se describió el cultivo de los micrófitos, donde se observó la preparación de la cepa de cada una de las bacterias en el medio agar estándar, donde se evaluó la efectividad de las fracciones acuosas y etéreas. Además de estas fracciones, se utilizó como reactivos acetato de etilo, agua destilada, diclorometano y hexano como blancos, que fueron utilizados para la extracción, con la finalidad de demostrar que la actividad antibacteriana mostrada por los extractos no dependía de estas muestras, sino, de la actividad propia de la planta *Bidens pilosa*. Igualmente, se ejecutó un control positivo (+) para llevar a cabo una comparación constructiva entre la planta utilizada y el antibiótico con efecto conocido, donde se utilizó un fármaco de amplio espectro llamado levofloxacina, para las bacterias gram positivo y gram negativo que fueron analizadas.

Cada fracción de los extractos acuoso y etéreo, se colocó en una posición determinada e identificada para cada uno en la placa, para facilitar la lectura y evitar posibles errores humanos o entrecruzamientos entre los fraccionamientos. Las fracciones que se utilizaron para proceder esta prueba, se recuperaron del extracto madre para determinar el grado de inhibición del mismo contra cada una de las bacterias analizadas.

Tabla 8. Medición Microbiológica de los Halos de Inhibición de las Bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi*

Sustancia empleada	Número de pocillo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhi</i>
Blanco Acetato de etilo	1	-	-	-	-
Fracción de Acetato	2	17mm	15mm	10mm	9mm
Blanco Agua (Acuoso)	3	10mm	8mm	7mm	6mm
Fracción acuosa	4	-	8mm	-	-
Blanco Diclorometano	5	-	-	-	-
Fracción de Diclorometano	6	10mm	10mm	8mm	9mm
Blanco Hexano	7	9mm	6mm	5mm	10mm
Fracción de Hexano	8	-	-	-	-
Levofloxacina	9	23mm	33mm	25mm	29mm

Fuente: Elaboración propia, 2020

Staphylococcus aureus

En la figura 52 que concierne a la placa agar estándar de la bacteria *Staphylococcus aureus*, como se observó en la tabla 8, se evidencia los halos de inhibición que se obtuvieron para esta bacteria, tanto de la actividad de los blancos, así como el fraccionamiento de la planta y el control positivo. Específicamente en la posición #1 y #2 se presentó el fraccionamiento con Acetato de etilo dónde en la posición #1 se encuentra ubicado el blanco y en la #2 el extracto de la *Bidens pilosa* al 100% de concentración. En lo que concierne al blanco, fue destacado que

no presentó actividad, contrario a la muestra la cuál su halo de inhibición fue de 17 mm. Esto evidenció que la actividad se debe a la planta y no al reactivo utilizado para el análisis.

Se determinó que en la numeración #3 y #4 de los pocillos de la placa, arrojaron la actividad ejercida por el agua destilada (#3) correspondiente al blanco, la fracción de la planta (#4). A partir de esto, se analizó que el blanco obtuvo resultado positivo de halo de inhibición, mientras que el fraccionamiento de la *Bidens pilosa* resultó negativo. La medida obtenida del halo de inhibición del blanco fue de 10 mm. Es importante deducir que al ser positivo solo el blanco, se puede concretar que existió algún tipo de alteración en la muestra con la planta y por esta razón la misma dio negativa, mas no así el blanco, el cual mostró una actividad notable.

El resultado del extracto de Diclorometano identificado con el número de pocillo #5, como blanco fue negativo, mientras que la muestra de la planta, determinada con la valoración #6 fue positivo, debido a que existió un halo de inhibición observado en la placa de agar que posee una medida de 10 mm. Es decir, la actividad mostrada por este extracto se debe totalmente a la planta, y se evidenció que no existió ningún grado de alteración por parte del reactivo utilizado para extraerlo. Por lo tanto, esta fracción tiene actividad antibacteriana frente al *Staphylococcus aureus*.

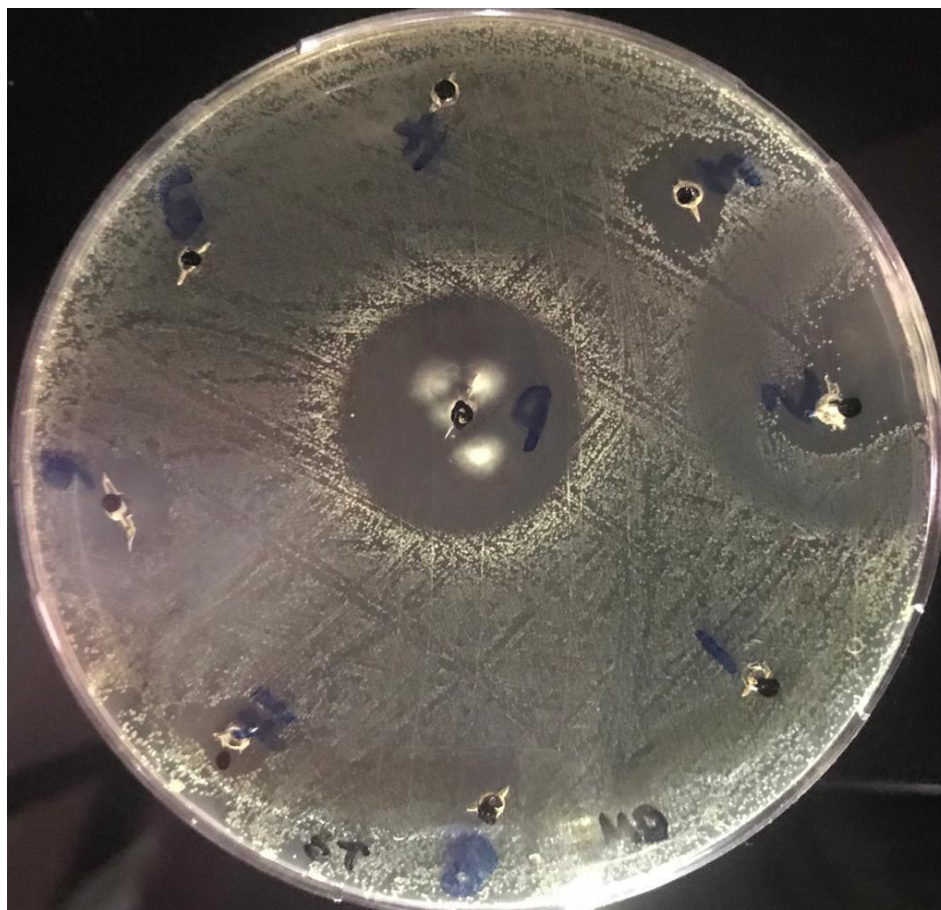
La última pareja de muestras analizadas para la placa de agar estándar de *Staphylococcus aureus*, como lo fueron: el blanco de Hexano colocados en el #7 y el fraccionamiento del romerillo ubicado en el #8, mostraron resultados positivo y negativo, respectivamente para cada uno de ellos. O sea, existió una actividad representada con halo de inhibición para el blanco con una medición de 9 mm y el fraccionamiento fue otorgado como actividad nula por su ausencia de halo de inhibición desarrollado en la placa de agar. El hexano como reactivo, fue el que se le otorga la actividad en esta ocasión.

El control positivo de Levofloxacin utilizado para contrarrestar cada uno de los blancos y cada una de las muestras de fracción de la planta *Bidens pilosa*, probó que presentó acción inhibitoria contra la bacteria *Staphylococcus aureus* siendo su halo de inhibición de 23 mm. Esta inhibición es un valor aceptable con la bacteria, ya que mostró actividad importante.

Según Picazo en el 2013, para que una sustancia sea considerada sensible debe contener un halo de inhibición igual o mayor a 17 mm. Esta premisa lo cumple la fracción de Acetato de Etilo, debido a que muestra una inhibición de 17 mm, por el contrario, la muestra de Diclorometano muestra un halo de inhibición de 10 mm, la cual se considera resistente porque

se encuentra en el rango de igual o menor a 13 mm, según los valores determinados por el mismo autor de manera teórica.

Figura 52. Halos de Inhibición de la Placa Agar Estándar de la Bacteria *Staphylococcus aureus* del Fraccionamiento de la Planta *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020

Escherichia coli

Como se observó en la figura 53 de la placa agar estándar del micrófito *Escherichia coli*, que contiene el blanco, las muestras de la *Bidens pilosa* y el control positivo, hay una evidencia de que hubo acción inhibitoria de parte de los halos de inhibición. Esto se debe a que la posición #2 que corresponde a la muestra de la planta, presentó un valor de 10 mm de medida, mientras que la posición #1 (blanco de acetato de etilo) no desarrolló ningún tipo de inhibición, debido a que no existió evidenciado la formación de un halo identificado para el mismo. En esta fracción de acetato, se le atribuyó que toda la sensibilidad mostrada corresponde al romerillo, esto porque el blanco no mostró actividad alguna que pudiera interferir en los resultados.

Mediante la rotulación #3 y #4 de los pocillos del agar, se permitió deducir que existió actividad registrada en el cultivo de las muestras analizadas. Se generó un halo de inhibición positivo de 7 mm para la ubicación #3 que era del blanco acuoso y un resultado negativo para la rotulación #4 que era la concentración acuosa al 100%, justificado por la ausencia de halos de inhibición en el momento de analizar adecuadamente la placa. Este microorganismo presenta un comportamiento similar al *Staphylococcus aureus*, donde el agua demostró actividad importante, mas no así la muestra como tal. De igual manera se deduce que se puede deber a alguna interacción que ocasiona este reactivo.

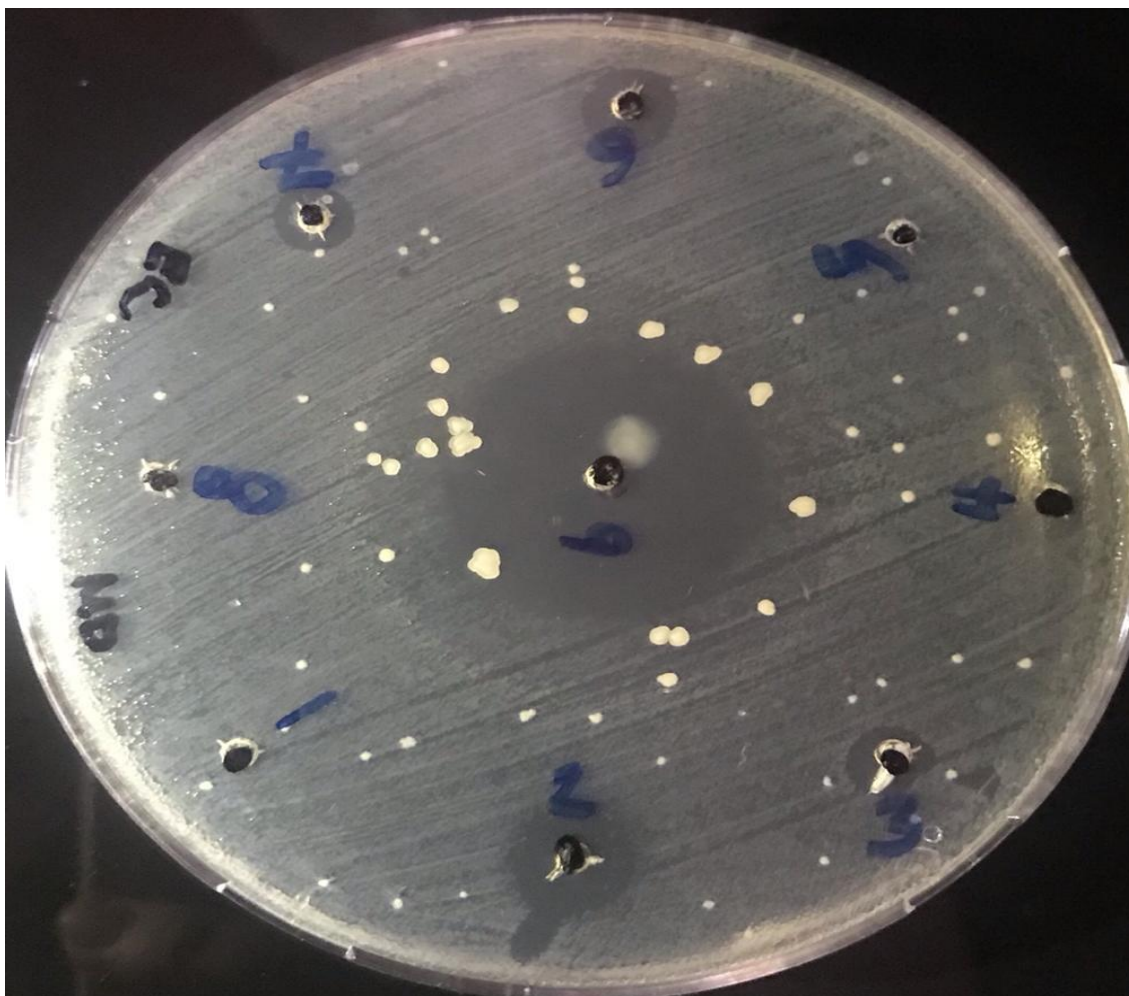
El extracto de Diclorometano identificado con el número de pocillo #5, como blanco fue negativo, mientras que la muestra de la planta, determinada con la valoración #6 fue positivo, debido a que existió un halo de inhibición observado en la placa de agar que posee una medida de 8 mm. Es decir, no existió actividad evidenciada o demostrada para lo que fue el blanco del Diclorometano porque no hubo un halo de inhibición producido y observado, lo anterior demuestra que su actividad (8mm) del muriseco, es totalmente a la capacidad de inhibición de la planta analizada.

Al finalizar, las muestras analizadas para la placa de agar estándar de *Escherichia coli*, como lo fueron: el blanco de Hexano colocados en el #7 y el fraccionamiento del romerillo ubicado en el #8, mostraron resultados positivo y negativo, respectivamente para cada uno de ellos. O sea, existió una actividad representada con halo de inhibición para el blanco con una medición de 5 mm y el fraccionamiento fue otorgado como actividad nula por su ausencia de halo de inhibición desarrollado en la placa de agar.

La Levofloxacin que es el control positivo utilizado para el análisis para comparar cada uno de los blancos y de las muestras de fracción de la planta *Bidens pilosa*, denota que hubo acción inhibitoria hacia la bacteria *Escherichia coli* siendo su halo de inhibición de 25 mm, siendo el mismo de actividad aceptable, según lo mencionado e investigado por Picazo, 2013.

En el caso de esta bacteria, ambas fracciones tanto de Diclorometano como Acetato de Etilo, se consideran resistentes esto porque presenta un halo de inhibición de 8 mm y 10 mm, respectivamente para cada una de ellas, y estos resultados se encuentran por debajo de lo establecido por Picazo en el 2013.

Figura 53. Halos de Inhibición de la Placa Agar Estándar de la Bacteria *Escherichia coli* del Fraccionamiento de la Planta *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020

Klebsiella pneumoniae

El alcance del blanco de Acetato de etilo identificado con el número de pocillo #1, fue negativo, mientras que la muestra de la planta, determinada con la valoración #2 fue positivo, debido a que existió un halo de inhibición observado en la placa de agar que posee una medida de 15 mm. Es decir, no existió actividad evidenciada o demostrada para lo que fue el blanco del Acetato de etilo porque no hubo un halo de inhibición producido, por el contrario, la muestra analizada señala una actividad muy importante que se le atribuye 100% a la capacidad de la planta para inhibir la bacteria.

A continuación, la pareja de muestras analizadas para la placa de agar estándar de *Klebsiella pneumoniae*, como lo fueron: el blanco acuoso (agua) colocados en el #3 y el

fraccionamiento del romerillo ubicado en el #4, mostraron resultados positivos para ambas muestras. O sea, existió una actividad representada con halo de inhibición para el blanco con una medición de 8 mm y 8 mm también para el fraccionamiento del muriseco. Sin embargo, la actividad mostrada por el extracto utilizado, no se le puede achacar a la planta como tal, esto porque su medición es igual a la del blanco, por esto, se deduce que la sensibilidad se debe al reactivo (agua) utilizado para realizar la extracción más no al romerillo. Este extracto se considera como inactivo frente a la *K. pneumoniae*.

Después de titular los números #5 y #6 en los pocillos del agar, que corresponden al blanco del Diclorometano y la fracción de la planta respectivamente, se permitió proceder a contabilizar que existió actividad registrada en el cultivo de las muestras analizadas para la *Klebsiella pneumoniae*. Se generó un halo de inhibición positivo de 10 mm para la ubicación #6 que era del fraccionamiento de la *Bidens pilosa* y un resultado negativo para la rotulación #5 que era la concentración del blanco de Diclorometano, justificado por la ausencia de halos de inhibición en el momento de analizar adecuadamente la placa. Esta fracción se considera que presenta actividad (10 mm) importante con respecto a los parámetros determinados por Picazo, 2013, contra la *K. pneumoniae*, y la misma es completamente del muriseco, sin ninguna evidencia de interacción.

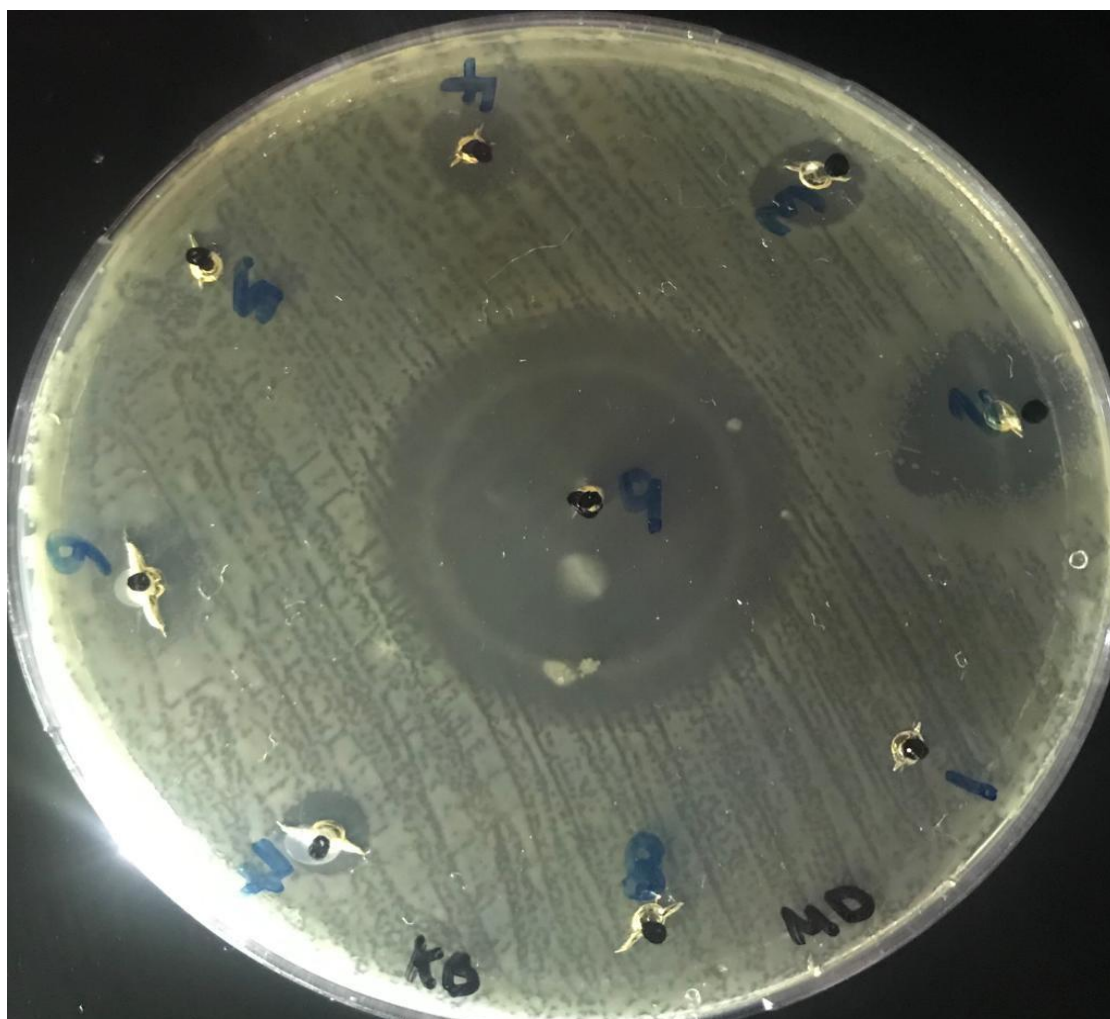
Como se contempló en la figura 54 de la placa agar estándar del micrófito *Klebsiella pneumoniae*, que contiene el blanco, las muestras de la *Bidens pilosa*, hay una evidencia de que hubo acción inhibitoria de parte de los halos de inhibición. Esto se debe a que la posición #7 (blanco) presentó un valor de 6 mm de medida, mientras que la posición #8 que corresponde a la fracción de Hexano no desarrolló ningún tipo de mecanismo de inhibición, debido a que no existió evidenciado la formación de un halo identificado para el mismo. De igual manera, en esta ocasión toda la actividad mostrada corresponde al blanco, y la fracción es totalmente inactiva.

El control positivo (Levofloxacina) que se empleó para la comparación contra cada uno de los blancos y de las muestras de fracción de la planta *Bidens pilosa*, indicó que sí ocurrió actuación en la inhibición desarrollada hacia la bacteria *Klebsiella pneumoniae* siendo su halo de inhibición de 33 mm valor muy aceptable como actividad.

De igual manera se establece la inhibición del Acetato de Etilo de una sensibilidad intermedia, ya que posee un halo de inhibición de 15 mm, caso contrario, la fracción de

Diclorometano se cataloga como resistente, debido a que presenta una actividad de 10 mm, el cual se encuentra por debajo del límite establecido ($= 0 < a 13$ mm).

Figura 54. Halos de Inhibición de la Placa Agar Estándar de la Bacteria *Klebsiella pneumoniae* del Fraccionamiento de la Planta *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020

Salmonella typhi

Como se atisba en la figura 55 que pertenece a la placa agar estándar de la bacteria *Salmonella typhi*, y como se percibe en la tabla 8, se confirma los halos de inhibición que se hallaron para este bacilo, tanto de la actividad del blanco, así como la fracción de la planta. Característicamente en la posición #1 y #2 se mostró el blanco de Acetato de etilo ubicado en la posición #1 y en la #2 el extracto de la *Bidens pilosa* al 100% de concentración. En lo que se refiere al blanco, fue notable que no hubo presencia de actividad, contrario a la muestra dos, la

cual posee un halo de inhibición de 9 mm. Esto evidenció que la actividad se debe a la planta y no al reactivo utilizado para el análisis.

Se resolvió que en la numeración #3 y #4 de los pocillos de la placa, puntualizan la actividad que ejerció el agua destilada correspondiente al blanco, la muestra de la planta. Como base de esto, el blanco obtuvo resultado positivo de halo de inhibición, mientras que el fraccionamiento de la *Bidens pilosa* resultó negativo. La medida que se obtuvo del halo de inhibición del blanco fue de 6 mm. Esto refuerza a los resultados anteriores, donde se observa que, para las demás bacterias, se obtuvo el mismo comportamiento, donde el blanco acuoso presentó actividad, más no el extracto, por lo que puede deberse a alteraciones de la muestra.

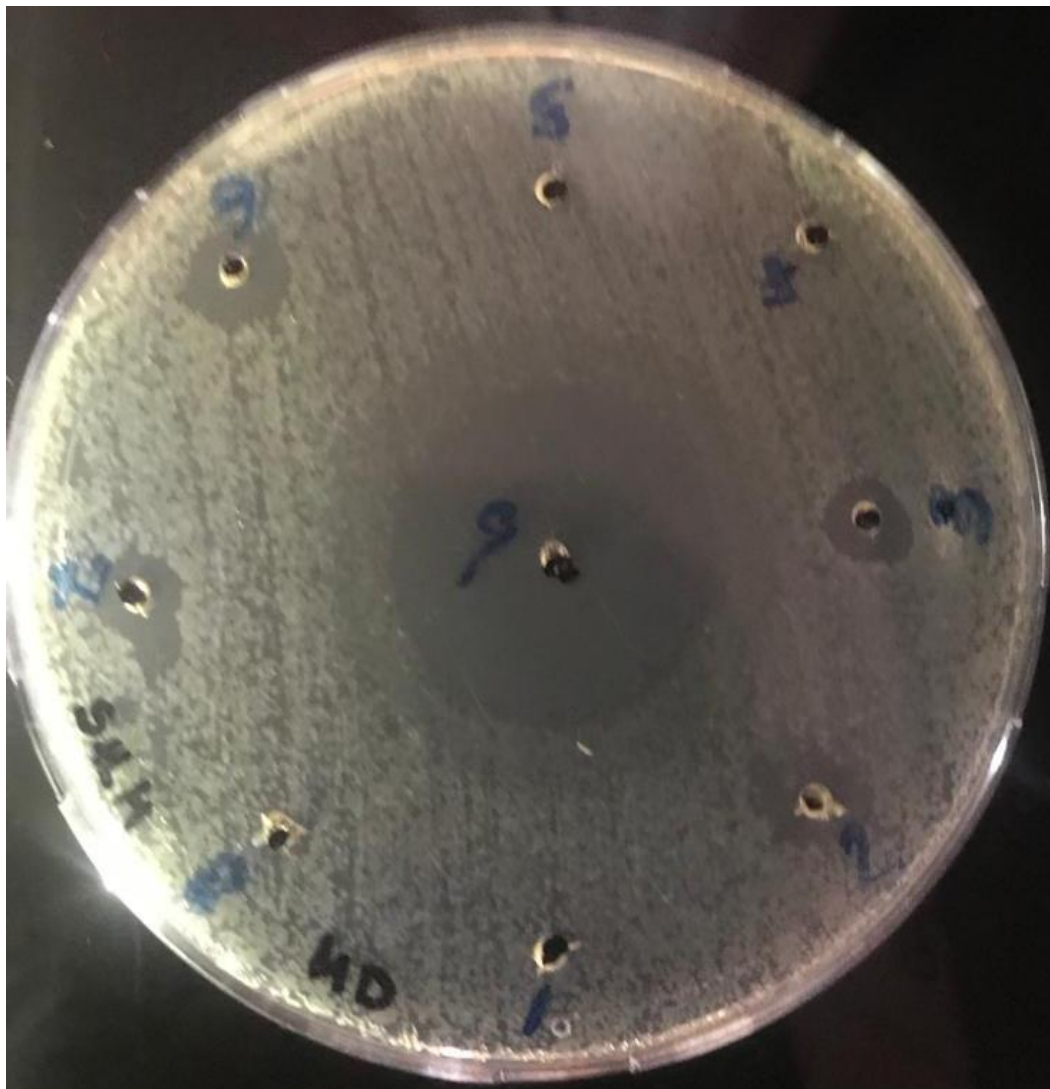
El blanco de Diclorometano localizado con el número de pocillo #5, resultó como negativo, sin embargo, la muestra de la planta, analizada con la valoración #6 fue positiva. En virtud a esto es porque existió un halo de inhibición encontrado en la placa de agar que tiene una medida de 9 mm. Dicho de otro modo, no hubo actividad verificada para lo que fue el blanco del Diclorometano, porque no hubo un halo de inhibición acertado, por lo anterior esta actividad es 100% de la planta, y no del reactivo utilizado para realizar la fracción.

Por último, la pareja de extractos utilizados la placa de agar estándar de *Salmonella typhi*, como lo son: el Hexano (blanco) numerado como el #7 y el fraccionamiento del romerillo enumerado con el #8, argumentaron valores positivos y negativos, respectivamente, propios para cada uno de ellos. A saber, se halló una actividad representada con un halo de inhibición para el blanco (#7) con una medición de 10 mm y la muestra de la planta fue concebida como una actividad nula por su ausencia de halo de inhibición no producido en la placa de agar. La bacteria es sensible al blanco mas no al extracto como tal, por posibles interacciones en la muestra.

El halo de inhibición medido para el control positivo de Levofloxacin fue de 29 mm, antibiótico usado para este análisis, brindando ese resultado positivo representado como halo de inhibición.

La inhibición provocada por las fracciones de Acetato de Etilo y Diclorometano, para este microorganismo, no superaron el límite de sensibilidad de 13 mm, por lo tanto se determinan como bacterias resistentes, ya que sus halos de inhibición fueron de 9 mm en ambos casos.

Figura 55. Halos de Inhibición de la Placa Agar Estándar de la Bacteria *Salmonella typhi* del Fraccionamiento de la Planta *Bidens pilosa*



Fuente: Elaboración propia, 2020

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Se evidenció, que es factible realizar el fraccionamiento a la planta, ya que se observó que el elaborado por acetato de etilo se extraen metabolitos de polaridad elevada, en el caso del diclorometano, los componentes separados son de polaridad intermedia y con el hexano son extraíbles compuestos de baja polaridad.

- En la fracción etérea hidrolizada, se evidenció que presenta una gran cantidad de metabolitos secundarios, como lo demostró la prueba de Börntrager-Krauss, Dragendorff, KOH, Liebermann-Burchard, Taninos y Terpenos. Este último, por medio de la prueba del reactivo de Vainillina aplicada en cromatografía de capa fina.
- El tamizaje fitoquímico de la fracción acuosa, sólo demostró la presencia de Taninos por medio de estas pruebas.
- A la AQ₂, se le realizó la prueba de Börntrager-Krauss, la cual otorgó un resultado negativo. Por ende, a esta fracción no se le conoce posibles compuestos presentes en ella.
- Las pruebas realizadas a la fracción acuosa con éter, permiten probar la presencia de los metabolitos de Börntrager-Krauss, KOH, Liebermann-Burchard y de Shinoda.
- Se observó, que el diclorometano presenta una concentración más elevada de 1891.9 mg/mL, mientras que el hexano es la de menor concentración con un valor de 248.5 mg/mL.
- Para el *Staphylococcus aureus* se evidenció que obtuvo actividad antibacteriana por parte del extracto de Acetato de etilo de la planta con un halo de inhibición de 17 mm y que para lo que fue el blanco no existió acción alguna registrada.
- El blanco acuoso aplicado contra el microorganismo de *Staphylococcus aureus* arrojó un valor de halo de inhibición de 10 mm, determinando que, si existió actividad por parte de este, mientras que para la fracción de la planta no hubo ninguna sensibilidad.
- En el blanco de Diclorometano para el *Staphylococcus aureus* no favoreció la inhibición, porque no se presenciaron halos inhibitorios, sin embargo, en la muestra de la planta, se registró 10 mm de actividad positiva.
- El valor mostrado por parte del blanco de Hexano en inhibición fue de 9 mm para el *Staphylococcus aureus* y se demostró que, para la muestra de la planta, no hubo resultado positivo evidenciado.
- El control positivo usado en el *Staphylococcus aureus*, probó que presentó acción inhibitoria de 23 mm contra la bacteria, siendo este un valor importante de sensibilidad.

- En la *Escherichia coli* hubo evidencia que la muestra de la planta tuvo una medida de inhibición de 10 mm y que para el blanco de Acetato de etilo no se observó ningún grado de actividad.
- Se generó una actividad de 7 mm para el extracto del blanco acuoso en las placas de *Escherichia coli* y un resultado negativo para la concentración acuosa al 100% de la planta.
- El extracto de Diclorometano en la placa de *Escherichia coli*, identificó que la muestra de la planta hizo una actividad antibacteriana de 8 mm versus el resultado negativo observado para el blanco del mismo.
- En la placa de *Escherichia coli* que corresponde a los extractos de Hexano, permitió descubrir que el blanco del mismo fue el caso positivo, debido a que tuvo un halo de 5 mm y el fraccionamiento de la planta fue nulo por la ausencia de un halo de inhibición.
- El control positivo usado en la *Escherichia coli*, probó que presentó acción inhibitoria importante contra la bacteria, la cual fue de 25 mm.
- Para el *Klebsiella pneumoniae* se evidenció que obtuvo actividad antibacteriana por parte del extracto de Acetato de etilo de la planta con un halo de inhibición de 15 mm y que para lo que fue el blanco no existió acción alguna registrada.
- De la *Bidens pilosa* por parte del *Klebsiella pneumoniae* arrojó un valor de halo de inhibición de 8 mm, para cada uno de los extractos: el blanco acuoso y la fracción de la planta. Sin embargo, esta actividad se le atribuye al blanco y no al extracto.
- En el blanco de Diclorometano para la *Klebsiella pneumoniae* no favoreció la inhibición, porque no se presenciaron halos inhibitorios, sin embargo, en la muestra de la planta, se registró 10 mm de actividad positiva.
- El valor cuantitativo que presentó el halo del blanco del Hexano es de 6 mm para la *Klebsiella pneumoniae* y se mostró que, para la parte de la muestra de la planta, no hubo resultado positivo encontrado.
- El control positivo usado en el *Klebsiella pneumoniae*, probó que presentó acción inhibitoria de 33 mm contra la bacteria, siendo el más sensible en este estudio.

- En la *Salmonella typhi* hubo evidencia que la muestra de la planta tuvo una medida de inhibición de 9 mm y que para el blanco de Acetato de etilo no se realizó actividad.
- Se generó una actividad de 6 mm para el extracto del blanco acuoso en las placas de *Salmonella typhi* y un resultado negativo para la concentración acuosa al 100% de la planta.
- El extracto de Diclorometano en la placa de *Salmonella typhi*, identificó que la muestra de la planta hizo una actividad antibacteriana de 9 mm versus el resultado negativo observado para el blanco del mismo.
- En la placa de *Salmonella typhi* que corresponde a los extractos de Hexano, permitió descubrir que el blanco del mismo fue el caso positivo, debido a que tuvo un halo de 10 mm y el fraccionamiento de la planta fue nulo por la ausencia de un halo de inhibición.
- El control positivo usado en la *Salmonella typhi*, probó que presentó acción inhibitoria de 29mm contra la bacteria, la cual se considera importante.
- Se evidenció, que el blanco acuoso (agua destilada) y del hexano, inhibieron todas las bacterias, más no así, las fracciones de los mismos. Esto se puede deber a alteraciones presentes en el blanco correspondiente.
- En lo correspondiente a la fracción de hexano, la misma no inhibe ninguna de las bacterias analizadas, por esto se concluye que esta fracción es totalmente inactiva en este análisis.

Recomendaciones

- A la Universidad Internacional de las Américas, la adquisición de equipos y materiales para la realización de pruebas microbiológicas, con el fin de ayudar en el proceso de análisis sobre los microorganismos investigados y futuros estudios.
- Analizar la planta *Bidens pilosa* contra otras bacterias, esto con el fin de evidenciar si presenta un mayor grado de actividad antimicrobiana con diversos microorganismos.
- Continuar con la tesis utilizando concentraciones mayores de los fraccionamientos, esto con el fin de observar sus valores de inhibición al ir incrementando los mismos.

- Inculcar sobre la importancia que posee la planta *Bidens pilosa*, como un agente que permite combatir en procesos inhibitorios de bacterias, debido a su actividad antibacteriana presente en sus componentes frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi*.
- Realizar investigaciones que puedan elegir y diseñar la forma farmacéutica más apta para combatir procesos bacteriológicos a nivel mundial.
- Incentivar a las personas y profesionales de la salud que la planta *Bidens pilosa* sea un buen colaborador en el tratamiento de patologías relacionadas con bacterias, porque presenta actividad antibacteriana para combatir las mismas.
- Por parte de la carrera de Farmacia, involucrar a los futuros estudiantes a investigar en temas asociados a microorganismos sus proyectos finales de graduación.
- Sugerir sobre la valiosa riqueza de biodiversidad que existe a nivel nacional que puede fomentar a mejores exploraciones en temas de la salud.

BIBLIOGRAFÍA

Ab, N., Chan, K., Eng, S., Lee, L., Pusparajah, P. y Ser, H. (2015). Salmonella: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*. 8 (3)

Acuña, T., Alvarado, J., Avendaño, J., León, D. y Peña, I. (2016). Recuperación de agar-agar a partir de medios de cultivo usados. Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica. p.44

Aguilar, B. (2018). *Klebsiella pneumoniae* and Healthcare Acquired Infections. *Nurses Educational Opportunities*.

Aguilar, L y Calderón, G (2016). Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica* LXXIII 621. p. 758

Ahón, K y Rengifo, F. (2019). Concentración mínima inhibitoria de nanopartículas de óxido de zinc sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644PK/5. Tesis para optar por el grado de Biologo - microbiologo. Universidad Nacional de Trujillo. pp.6-7

Alcántar, G., Almaraz, J., Díaz, P. y Ferrera, R. (2001). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. *Terra Latinoamericana* 19 (4).

Alexander, A., Gómez, A., Jaque, S., Pazmiño, J y Pérez, B., (2017). Azúcares reductores y no reductores. Proyecto de investigación de medicina. Universidad de las Américas.

Alfaro, J., Hoyos, A., Hoyos, C., Mesa, C. y Rivera, O. (2007). Características clínicas, epidemiológicas y de susceptibilidad a los antibióticos en casos de bacteriemia por *Klebsiella pneumoniae* en neonatos. *Rev CES Med* 2007; 21 (2): 31-39

Almeyda, A. (2017). Estudio de la acumulación de ácido betulínico y urechites durante el desarrollo de *Pentalinon andrieuxii* y su relación con la metilación de ADN. Tesis para optar por el grado de maestro en ciencias. Centro de Investigación científica de Yucatán

Alonso, E. (2019). Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto acuoso de hojas de *bidens pilosa* (cadillo) frente a *Staphylococcus aureus*. Tesis para optar el título profesional de químico farmacéutico. Universidad Católica Los Ángeles Chimbote.

Alpuche, C., Espinal, P., Leal, A., Mantilla, J., Saavedra, C., Valenzuela, E. (2004). Epidemiología molecular de infección nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasas de espectro extendido. *Instituto Nacional de Salud*. 24 (3). p.253

Antolínez, D., Bohórquez, J., Corredor, A. y Constanza, L. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. Artículo de revisión *Nova* 13 (23). Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Hernández, N., Pérez, Y., Porro, D., Silva, F. Talavera, I y Vázquez, R. (2013). El procesamiento de imágenes de TLC como una nueva vía para la identificación de sustancias. *Revista Cubana de Química* (3)

Aparicio, G. (2014). Microbiología ambiental: Estructura y morfología bacterianas. SlideShare.

Arana, R., Fernández, C., González, R., Sosa, R. (2014). La Microbiología: historia e inserción en los planes de estudios de la Carrera de Medicina en Cuba. Universidad de Ciencias Médicas de Matanzas. Cuba. 36 (1)

Arenas, R y Rodríguez, P. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica* 16(2)

Ariza, S., Farfán, A., Vargas, F. y Vargas, L. (2016). Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógeno. *Revista Chilena Infectol.* 33 (4)

Arroyo, J., Barreda, A., Bonilla, P., Huamán, O y Ráez, E. (2010). Efecto quimioprotector de *Bidens pilosa* en el cáncer de mama inducido en ratas. *An Fac med.* 71 (3)

Avalos, H., Soto, M. y Zendejas, G. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica.* 25 (3)

Baptista, M. Hernández, R., y Fernández C. (2014). *Metodología de la Investigación.* México: McGraw-Hill

Barrera, M y Méndez, Y. (2016). Fisiopatología de la sepsis por gram positivos. *Revista Cuarzo - Fundación Universitaria Juan N. Corpas.* 22 (1).

Barreto, S. y Estrella, C. (2019). Efecto de una dieta hipocalórica suplementada con extracto de *Bidens pilosa* sobre radicales libres en hígado y cerebro de ratas seniles. Tesis para optar por el Título profesional de Biólogo. Universidad Nacional de Trujillo.

Bartolomé, A., Villaseñor, I., Yang, W. (2013). *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): Botanical Properties, Traditional Uses, Phytochemistry, and Pharmacology. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 13.

Basualdo, J., Coto, C., Torres, R. (2006). *Microbiología Biomédica.* Atlante S.R.L.

Batz, S., Cardona, A., Castillo, V., Godoy, C y Jom, R (2014). Uso tradicional de plantas medicinales y de remedios caseros para tratamiento de infecciones en menores de cinco años. Tesis de la Universidad De San Carlos De Guatemala.

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.

Cabrera, C., Gómez, R. y Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes es una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica* 38 (2).

Cain, M., Jackson, R., Minorsky, P., Reece, J., Urry, L., Wasserman, S. (2011). The first eukaryotes. *Campbell biology*. 10. p.528

Calixto, J. (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research*, 33: 179-189.

Canet, J. (2019). Intoxicación alimentaria por *Staphylococcus aureus*. *Betelgeux Christeys food hygiene*.

Casado, V (2018). Optimización de la extracción de los aceites esenciales por destilación en corriente de vapor. Universidad Politécnica de Madrid.

Castells P. (2009). El almidón. *Revista de Investigación y ciencia* 396

Cataño, J. y Echeverri, L. (2010). *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y resistencia iatreia 23 (3).

Cauna, P y Coronado, G. (2018). Actividad antibacteriana *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de *Plantago major* (llantén) Y *Rumex crispus* (lengua de vaca) sobre cepas atcc de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* – Puno 2017. Tesis para optar por el título de Licenciado en Biología. Universidad Nacional del Altiplano.

Cervantes, E., García, R y Salazar, P, (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab* 61 (1)

Charimba, G., Falowo, A., Hugo, C., Muchenje, V. (2016). *In vitro* antimicrobial activities of *Bidens pilosa* and *Moringa oleifera* leaf extracts and their effects on ground beef quality during cold storage. *CyTA - Journal of Food* 14 (4).

Chaves, J. (No sale fecha). Caracterización molecular del gen de la β -lactamasa *shv-1* en *Klebsiella pneumoniae*. Tesis para optar por el grado de Doctor en Biología. Universidad De Barcelona.

Cordero, A., Umaña, T., Messina, F. y Watson, J. (2007). *Staphylococcus aureus*. Universidad Andres Bello.

Cornejo, A. (2016). Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones de *Bidens pilosa* L. y *Xylosma flexuosum* (H. B. & K.) Hemsl y estudio quimiométrico de la actividad antituberculosa de los perfiles cromatográficos de *Bidens pilosa* L. Tesis para obtener el grado de Maestra en Química Bioorgánica. Universidad Veracruzana.

Correa, L.; Abad, M.; Escobar, V. (2014) Los secretos de las plantas. Tercera edición de Panamericana en Colombia. pp. 9-20-21.

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.

Cruz, A., Rodríguez, C y Rodríguez, N. (2010). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* Y *Silybum marianum*. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 13 (2).

Cruz, J., González, A., Moreno, M., Nieves, B., Puig, J y Solórzano, M. (2013). Caracterización de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productora de betalactamasa de espectro 156 extendido aisladas en dos unidades de cuidados intensivos. Rev Chilena Infectol 30 (4): 374- 380. 374

Cubero, M. (2015). Epidemiología molecular, factores de virulencia y caracterización de los mecanismos de resistencia de *Klebsiella pneumoniae*. Universidad de Barcelona

Damé, L., Hartwig, C., Lambrecht, C., Silveira, H. y Voigt, F. (2011). Comparación de distintas extracciones hidroalcohólicas de plantas con indicativo etnográfico antiséptico/desinfectante. Revista Cubana de Plantas Medicinales 16 (3).

Da Silva, Cerdeira C, Chavasco J, Pugina A, Pacheco C, Natán A, Ishikawa T, Gomes M, Chavasco J. Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de *Bidens pilosa* LINNÉ Y *Annona crassiflora* mart. contra el resistente al oxacilino *staphylococcus aureus* (orsa) del entorno aéreo en la clínica dental [internet]. Rev. Inst. Medicina. Vol.56 N ° .4 São Paulo – Brasil. Julio. 2014. [Citado el 8 de septiembre del 2018]. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652014000400333

De Bairacli, J. (2020). 136 plantas medicinales y sus usos para la salud. Bioguia.

De la Cruz V. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de la bidens pilosa linné sobre Streptococcus mutans ATCC © 25175. [Tesis]. [internet]. Huacho – Perú. 2015. [Citado el 8 de septiembre del 2018]. Disponible en: http://repositorio.uap.edu.pe/bitstream/uap/664/2/de_la_cruz_camara-resumen.pdf

De la Torre, J., Duque, E., Martínez, R., Morales, Y., Muñoz, J., Pérez, R., y Rodríguez, O. Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos. Biotecnología 14 (2).

Domínguez, C. (2019). Aceites esenciales: todo lo que tienes que saber. Enfemenino.

Echeverría, J. (1998). Resistencia bacteriana. Revista Médica Herediana. 9 (2).

Echeverría, J. (2003). Estafilococo Meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. Revista Médica Herediana. 14 (4).

Elizondo, F y Marín, H. (2020). Evaluación de las propiedades antimicrobianas de los extractos de corteza y de las hojas de *Byrsonima crassifolia* (nance) frente a bacterias gram positivo y gram negativo y valoración de su posible actividad antifúngica frente a *Candida albicans*. Tesis para optar por el grado de licenciatura en Farmacia. Universidad Internacional de las Américas. p.75

Espino, M., Leyva, V y Puig, Y. (2011). Resistencia antimicrobiana en Salmonella y E. coli aisladas de alimentos: revisión de la literatura. Panorama Cuba y Salud 6 (1).

Estrada, T., López, C, Saucedo. (falta inicial de nombre), Thompson, M. López, D., J y Rosado, J. (2009). Association of Diarrheagenic Escherichia coli Pathotypes with Infection and Diarrhea among Mexican Children and Association of Atypical Enteropathogenic E. coli with Acute Diarrhea. American Society for Microbiology. 47(1), 93–98. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2620860/>

Fernández, F., López, J., Machado, C. y Ponce, L. (2003). Resistencia bacteriana. Revista cubana Médica Militar. 32 (1).

Ferrer, A., Martínez, J., Nava, R., Ojeda de Rodríguez, G., y Sulbarán de Ferrer, B. (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Revista de la Facultad de Agronomía* 20 (4).

Fuster, C., García, J., Guillán, C., Jiménez, M., Madrid, F., Sánchez, J. (2003). Sensibilidad microbiana de *Escherichia coli* en infecciones urinarias extrahospitalarias. *Actas urológicas españolas*. 27 (10).

Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *An Fac med*. 2016;77(4)

Galiana, A. (2003). Infección por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad. *Archivos de Pediatría del Uruguay* 74 (1).

García, Q. (2014). Condiciones generales para el cultivo de microorganismos. *Microbiología*.

García, I. (2015). Los terpenos. Fundación Canna: Investigación y desarrollo. Recuperado de: <https://www.fundacion-canna.es/los-terpenos>

Gil, M (2019). Agar cuenta estándar: fundamento, preparación y usos. *Biología*. Recuperado de: <https://www.lifedercom/agar-cuenta-estandar/>

González, C y Mollinedo, M (2014). Bacterias Gram negativas. *Revista de Actualización Clínica* (49)

González, E., León, G., Morfín, R., Pérez, H., Petersen, S. y Rodríguez, E. (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica* 34 (1).

Gutiérrez, N., Sánchez, P y Muñoz, R. (2012). Resistencia bacteriana a los antibióticos: mecanismos de transferencia. *Revista Spei Domus* 8 (17). p.33.34

Hazen, K. (2018). Pruebas de sensibilidad o antibiogramas. *Duke university health system*.

Heredia, C., Martín, D., Orozco, M. y Pérez, C. (2019). Actividad antibacteriana de extractos alcohólicos de hojas de *Solanum dolichosepalum* (Bitter). *Informador Técnico* 83 (2)

Herrera, M. (2004). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: Metodología de laboratorio. Revista médica del hospital nacional de niños Dr. Carlos Sáenz Herrera. 34

Hurtado, S. (2017). Fraccionamiento de líquidos del gas natural. Para optar por el título de maestría en Ingeniería del gas y petroquímica Santa Cruz-Bolivia. p.39

Janon, D (2016). Determinación fenotípica de cepas de *Escherichia coli* resistente a betalactámicos, por la técnica de doble disco, en pollos faenados en seis canales industriales de la provincia de Pichincha. Trabajo de Grado presentado para optar el Título de Médico Veterinario y Zootecnista. (p.7)

Jawetz, Melnick y Adelberg. (2011). Microbiología Médica. China, 25ª Edición, Mc Graw Hill.

Jima, L (2015). Concentración mínima inhibitoria de cefotaxima frente a *Escherichia coli* spp. aislada en urocultivos de pacientes que acuden a consulta externa del hospital. Tesis para optar por el título de Licenciada por Laboratorio Clínico. Universidad Nacional de Loja. p. 15-16

Krieger, K. (2018). T Cells That Stay Put Could Be Key to a Better Salmonella Vaccine. University of connecticut.

Kuno, A y Vargas, T. (2014). Morfología bacteriana. Revista de Actualización Clínica, 49(2)

Ledermann, W. (2008). Darwin y las bacterias. Revista Chilena Infectología. 26 (1)

León, P. y Vázquez, G. (2013). Prevalencia de cepas de *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido (blee) en muestras de orina de pacientes ambulatorios de los centros de salud 1, 2 y 3 de la ciudad de cuenca. (Tesis doctoral). Universidad de Cuenca. Ecuador.

Lima, W y Morales, R (2014). Caracterización farmacobotánica de *Byrsonima crassifolia* y *Neurolaena lobata*. Tesis por el título de química biólogas. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Lopardo, H (2016). Introducción a la microbiología clínica. Universidad Nacional de la Plata, pp.33 y 271.

López, M., Mota, C., Ramos, F., Santos, L & Souza, C. (2010). Resistencia antimicrobiana de Salmonella Typhi identificadas en el Estado de Pará, Brasil. Revista Pan-Amazônica de Saúde, (pp.61- 62).

McCullough, M. (2019). E. coli: What you need to know. The Philadelphia Inquirer.

Mamani, L. (2017). Actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos de Senecio spp (Chachacoma) en el crecimiento de Escherichia coli, Klebsiella sp, Staphylococcus aureus y Enterococcus sp. Tesis para optar al título profesional de licenciado en Biología. Universidad Nacional del Altiplano.

Marín, J. y Silva, R. (2007). Evaluación del efecto de una dieta utilizando *Bidens pilosa* y otras materias primas en las etapas de levante y engorde en pollos línea cobb en condiciones experimentales en el municipio de la plata. Tesis para optar por el título de Zootecnista. Universidad Nacional Abierta Y A Distancia UNAD.

Márquez, D. y Suárez, A. (2008). El uso de taninos condensados como alternativa nutricional y sanitaria en rumiantes. Revista de Medicina Veterinaria. 16.

Martínez, L. (2003). El futuro de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos. Enfermedades infecciosas microbiología clínica. 21 (2)

Moncayo, N., Santos, A., Soto, K., Soto, M. (2015). Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus L.* Revista Química Viva. 3.

Mora, D. y Vargas, S. (2018). Evaluación de las propiedades antimicrobianas de los extractos de *Cinnamomun verum* (canela), *Origanum vulgare* (orégano) y *Ocimum basilicum* (albahaca), para su estudio sinérgico y comprobar su efecto en *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. Tesis para optar por el título de Licenciatura en Farmacia. Universidad Internacional de las Américas.

Mora, X. (2012). Diferenciando bacterias gram + y gram -. Revista Real Escuela de Avicultura.

Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, L. y Ochoa, T. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Perú Médica*. Perú.28 (4), 648- 56. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v28n4/a13v28n4.pdf>

Murray, P., Pfaller, M., Rosenthal, K. (2014). *Microbiología Médica* (7ª.ed). Elsevier Saunders.

Murillo, F. (2020). Resistencia bacteriana una crisis actual. *Comunicación médica continua*.

Núñez, E. (2016). Pared celular: Introducción. SlidePlayer

Oderiz, S., Leotta, G. y Galli, L. (2007). Detección y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en niños atendidos en un hospital pediátrico Inter zonal de la ciudad de La Plata. *Revista Argentina de Microbiología*. 247(10). Recuperado de https://ac.elscdn.com/S0325754117301724/1-s2.0-S0325754117301724-main.pdf?_tid=f0b426cd2741-4f67-899f642abed0fa82&acdnat=1536286689_a16d2a093b68baa2dddc95240df3caaf

Organización Mundial de la Salud [OMS] (2018). Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/detail/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>

Palacios, M. (2015). Metabolitos primarios y secundarios. Escuela de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Católica “Los Ángeles de Chimbote”. p.03

Parra, N. (2018). Unidades 9-15 células. SlidePlayer

Patiño, D. (2003). ¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos? *Umbral Científico* (3).

Pérez, H y Robles, A (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD* 4 (3), p. 188-190

Picazo, J (2013). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. *Procedimientos en Microbiología Clínica*.

Prashant, T., Bimlesh, K., Mandeep, K., Gurpreet, K. and Harleen, K. (2011). Phytochemical Screening and Extraction: a Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. (1) 1: 98-106.

Quesada, A. (2008). Las Plantas Medicinales. *Revista Biocenosis*, Vol. 21(1-2)

Ramos, A. (2019). Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de hojas de *Bidens pilosa* (Cadillo) frente a *Staphylococcus aureus*. Tesis para optar el título profesional de químico farmacéutico. Universidad Católica Los Ángeles Chimbote.

Ramos, N. (2020). Prueba de sensibilidad: cuando se utiliza y con cuáles medicamentos. Mejor con salud.

Ray, G & Ryan, K. (2011). Sherris, *Microbiología Médica* (5ª. ed). Mc Graw-Hill.

Reisancho, L. (2019). Influencia del método de extracción del aceite esencial de hojas de amor seco (*Bidens pilosa* L.) en la actividad antimicrobiana. Tesis para optar por el Título de Química Farmacéutica. Universidad Central del Ecuador.

Rodríguez, A. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*. 44 (5)

Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. 3era edición. México. Editorial Médica Panamericana. p.635.

Sáenz, D. (2004). Medicamentos, plantas medicinales y productos naturales. *Farmacoterapia CCSS*. 16 (1-2) p.14

Salas, R. (2014). Elaboración y evaluación del material didáctico variedades enterovirulentas de *Escherichia coli*. (Tesis para la titulación Químico farmacéutico biólogo). Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de estudios superiores Zaragoza. México. Recuperado de https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wpcontent/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_salas_vargas.pdf

Sánchez, C., Sánchez, T., y Yua, M. (2013). Interés de las antraquinonas como laxantes. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla

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.

Solsona, N. (2015). Los instrumentos de vidrio en los tratados de Nicaise Le Fèvre y Marie Meurdrac. Universidad Autónoma de Barcelona, España. Elsevier.

Torres, M, Ortiz, M y Valdivia, R (2012). Propiedades Medicinales y otros usos del Nanche [*Byrsonima crassifolia* (L.): Revista Fuente Nueva Época 11(4), 18-19.

Valdés, R. (2020). Aprender microbiología. Asociación pontesano contra la obesidad.

Valverde, J. (2018). Determinación de la actividad antimicrobiana de la broza del *Coffea arábica* (café) variedad caturra y catuaí mediante la prueba de sensibilidad antimicrobiana in vitro y su aplicación en la industria farmacéutica. Tesis para optar por la Licenciatura en Farmacia. Universidad Internacional de las Américas.

Vélez, M y Villa, N. (2012). Identificación y cuantificación de antraquinonas y cromonas en plantas de Aloe vera cultivadas en municipios de Risaralda por cromatografía líquida de alta eficiencia. Requisito parcial para optar al título de Químico Industrial. Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología Química Industrial Pereira

Venegas, P (2016). Evaluación de las condiciones experimentales para la extracción de aceite esencial de romero para uso como antioxidante en aceites comerciales. Tesis para optar por el grado de licenciatura. Universidad de Costa Rica.

Vidal, J. (2012). Órganos catalizadores bifuncionales basados en líquidos iónicos para la síntesis de heterociclos en reacciones compatibles con la química verde. Trabajo final en master para química sostenible. Universidad Politécnica de Valencia.