

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE LAS
AMÉRICAS

VICERRECTORIA ACADÉMICA

CARRERA DE LICENCIATURA EN FARMACIA

“ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD
MICROBIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS Y
METANÓLICOS DE *LIPPIA ALBA* Y SU EVALUACIÓN
INICIAL IN VITRO FRENTE A CEPAS DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS”

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

ALEJANDRA PEÑA TORRES

TUTOR: LIC. JAVIER RODRIGO ALPÍZAR CORDERO

SAN JOSÉ, COSTA RICA, AGOSTO 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradecer primeramente a Dios, por el don de la vida, por ser la luz que guio mi sendero y me dio las fuerzas necesarias para caminarlo hasta el día de hoy bajo su protección.

A cada uno de los profesores que encontré en la carrera, especialmente al Lic. Javier Rodrigo Alpízar Cordero, por su consejo valioso, su guía, su tiempo y porque a pesar de los obstáculos sacamos la investigación adelante.

Al Dr. Esteban Mena Jara por su apoyo, conocimiento, tiempo y consejos para la realización del presente trabajo.

A mis jefes Ing. Alejandro Villani, Ing. Mauricio Villani, Dra. Catalina Vargas y Dra. Xinia Bonilla, por darme la oportunidad no solo de desarrollarme como persona y como profesional en un ambiente laboral de mucho crecimiento, si no de concluir con los estudios de una carrera que tanto amo.

A mi mejor amigo y compañero de vida, Doni, por ser un gran apoyo en este camino. Gracias por siempre estar dispuesto a ayudar y darme tranquilidad con tu palabra.

DEDICATORIA

Este trabajo final de graduación es dedicado a esas personas incondicionales que estuvieron a mi lado en este largo proceso:

A mi abuelita Ida, que esperó con mucho cariño verme realizada como profesional, me dio tanto amor y sé que desde el cielo siempre me va a acompañar y se sentirá orgullosa de este logro.

A la mujer más valiente que conozco, mi madrecita Álix que sin ella nada de esto sería posible, ella siempre colocó su mano en mi espalda y me acompañó en el camino dándome fuerzas y ánimo para no rendirme. La mejor del mundo, ejemplo de vida, mi mamá.

A mi hijo precioso, Alejandro, que ha sido mi principal motivación para salir adelante, el amor de mi vida, por todas esas noches que no me acosté a su lado pero, que con mucha madurez, paciencia y anhelo ha podido entender.

A mi tía Zoila, mi segunda mamá, mi otro pilar, por toda la ayuda que me ha brindado, porque a pesar de las dificultades siempre ha estado presente.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	15
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	16
Planteamiento del problema	16
Hipótesis.....	18
Objetivo General	18
Objetivos específicos	18
Justificación.....	19
Antecedentes.....	22
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	27
Generalidades de la piel.....	27
Anatomía	27
Funciones de la piel.....	28
Lesiones en la piel	30
Microbiota bacteriana de la piel.....	31
Generalidades de las bacterias	34
Cocos.....	34
Estafilococos.....	37
Características bioquímicas y fisiológicas	38
<i>Staphylococcus aureus</i>	38
Principales factores de virulencia.....	40
Infecciones producidas por <i>S. aureus</i>	40
Diagnóstico para infecciones por <i>S.aureus</i>	43
Antibióticos	44
Modos de acción de los antimicrobianos	44
Resistencia bacteriana a antibióticos.....	44
Mecanismos de resistencia bacteriana	45
Resistencia bacteriana de <i>S.aureus</i> a los antibióticos	45
Pruebas de sensibilidad a los antibióticos (PSA) y Concentración mínima inhibitoria (CMI)	46
Medicina natural	48
Plantas para uso medicinal	49
Fitofármacos.....	49
Metabolismo	50
Metabolitos primarios y secundarios de las plantas	50

Quimiotaxonomía.....	51
<i>Lippia alba</i> o Juanilama	54
Generalidades.....	55
Clasificación taxonómica.....	55
Nombres comunes.....	56
Descripción botánica y partes de la planta.....	56
Farmacología de la planta	56
Fitoquímica de la planta.....	57
Extractos.....	58
Métodos de extracción	58
Maceración.....	58
Destilación.....	59
Técnicas de identificación y cuantificación de fitoquímicos	61
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	63
Enfoque.....	63
Método de la investigación	64
Variables.....	64
Instrumentos y técnicas	66
Procesos de recolección de <i>Lippia alba</i>	66
Extracciones de las hojas de <i>Lippia alba</i>	67
Materiales y equipo para la obtención de los extractos metanólicos y acuosos de <i>Lippia alba</i>	67
Reactivos.....	68
Extracciones metanólicas por técnica de maceración de las hojas de <i>Lippia alba</i>	70
Destilación del extracto metanólico.....	71
Extracciones acuosas por técnica de infusión de las hojas de <i>Lippia alba</i>	72
Sólidos disueltos	74
Pruebas de caracterización Fitoquímica	76
Extracción etanólica por técnica de maceración de las hojas de <i>Lippia alba</i>	76
Destilación del extracto etanólico	76
Caracterización fitoquímica del extracto etanólico de <i>L.alba</i>	77
Reactivos	79
Extracción	80
Extracto etéreo	81
Extracto acuoso (AQ1).....	85
Extracto acuoso AQ2	86

Pruebas microbiológicas para la evaluación de la capacidad antibacteriana de los extractos metanólicos y acuosos de <i>Lippia alba</i> (Juanilama).....	90
Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos acuoso y metanólico frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	90
Equipos y materiales para las pruebas microbiológicas.....	92
Reactivos a utilizar.....	92
Ensayo microbiológico 1 realizado al extracto metanólico de las hojas de <i>Lippia alba</i>	93
Ensayo microbiológico 2 realizado al extracto acuoso de las hojas de <i>Lippia alba</i> ...	97
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS	98
Extracciones acuosas y metanólicas de las hojas secas de <i>Lippia alba</i>	98
Resultados de prueba de sólidos disueltos	101
Caracterización fitoquímica de las hojas secas de <i>Lippia alba</i> por medio de la identificación de metabolitos activos a través de métodos químicos y químico-instrumental	102
Métodos Químicos	103
Método químico instrumental	110
Evaluación de la posible actividad antibacteriana del extracto acuoso y metanólico de <i>Lippia alba</i> (Juanilama) en el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Staphylococcus aureus</i> , mediante la medición de halos de inhibición.....	113
Ensayo 1	113
Ensayo 2	117
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES	121
RECOMENDACIONES	122
REFERENCIAS	123
ANEXOS.....	131

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Partes de las diferentes capas de la piel.	28
Figura 2. Microbiota normal del cuerpo humano.	33
Figura 3. Cocos dispuestos en pares.	34
Figura 4. Cocos dispuestos en forma de cadena.	35
Figura 5. Cocos dispuestos en grupos de cuatro.	36
Figura 6. Cocos dispuestos en grupos de configuración cúbica.	36
Figura 7. Cocos dispuestos en grupos de racimos de uva.	37
Figura 8. Estructura de la pared celular en bacterias Gram-positivas.	39
Figura 9. Infección cutánea celulitis causada por <i>S.aureus</i>	41
Figura 10. Infección cutánea piel escaldada.	4; Error! Marcador no definido.
Figura 11. Infección cutánea impétigo.	43
Figura 12. Fotografía de la planta <i>Lippia alba</i>	54
Figura 13. Partes que integran un equipo de destilación simple.	60
Figura 14. Equipo de destilación por rotavapor.	61
Figura 15. Planta seca para la realización del extracto.	67
Figura 16. Material seco de hojas de <i>Lippia alba</i> para la extracción con metanol.	69
Figura 17. Material seco de hojas de <i>Lippia alba</i> para la extracción con agua.	70
Figura 18. Proceso de maceración y posterior filtración al vacío en desarrollo del extracto metanólico de <i>L.alba</i>	71
Figura 19. Método de destilación del extracto metanólico acoplado al rotavapor.	72
Figura 20. Extracto acuoso de las hojas de <i>Lippia alba</i> durante el proceso de filtración.	7; Error! Marcador no definido.
Figura 21. Prueba de sólidos disueltos para los extractos acuosos y metanólicos concentrados de las hojas de <i>Lippia alba</i>	75
Figura 22. Algunos reactivos utilizados durante la caracterización fitoquímica del extracto metanólico de <i>L.alba</i> dentro de la cámara de gases y suministrados por el Laboratorio de Química, Universidad Internacional de las Américas (UIA).	77
Figura 23. Dimensiones de la placa y sistema cromatográfico para identificación de terpenos en cromatografía de capa fina.	85

Figura 24. Metodología empleada en la caracterización de los metabolitos en los extractos E, AQ1, AQ2E y AQ2A de las hojas secas de <i>Lippia alba</i>	89
Figura 25. Vista frontal y posterior de cepa de <i>S.aureus</i> , ATCC 25923, proporcionada por el Laboratorio de Microbiología de la UCR, para la evaluación <i>in vitro</i> de los extractos acuosos y metanólicos de <i>Lippia alba</i>	95
Figura 26. Placa de Petri rotulada, con hoyos, sin inóculos dentro de Cámara de Flujo Laminar.	96
Figura 27. Preparación de las diluciones de los extractos sometidos al ensayo microbiológico. ..	96
Figura 28. Coloración inicial de los extractos previo a las pruebas de caracterización fitoquímica.	10;Error! Marcador no definido.
Figura 29. Aplicación de pruebas de alcaloides con reactivo de Dragendorff a extractos: E, AQ1 y AQ2E.	104
Figura 30. Aplicación de pruebas de flavonoides con extracto E y AQ2E.	105
Figura 31. Aplicación de prueba de KOH para la identificación de las cumarinas en los extractos E y AQ2E.	106
Figura 32. Aplicación del reactivo de Liberman para la identificación de triterpenos en los extractos E y AQ2E.	107
Figura 33. Desarrollo de la prueba de taninos para la identificación en los extractos E y AQ1. ..	108
Figura 34. Aplicación del reactivo Lugol para la identificación de almidón en el extracto AQ1.	109
Figura 35. Identificación de azúcares reductores en el extracto AQ1 para comprobar la presencia de azúcares reductores.	110
Figura 36. Identificación de Terpenos en el extracto etéreo por medio de cromatografía de capa fina y reveladas con UV, Vainillina y Yodo metálico respectivamente.	111
Figura 37. Prueba de identificación Peroxidasa a la cepa de <i>S.aureus</i> suministrada por el Laboratorio de Bacteriología de la UCR.	113
Figura 38. Prueba de sensibilidad Microbiana de <i>S.aureus</i> frente a extracciones Metanólicas de <i>L.alba</i>	115
Figura 39. Prueba de sensibilidad Microbiana de <i>S.aureus</i> frente a extracciones acuosas de <i>L.alba</i>	118

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Funciones de la piel, partes dónde se realiza y enfermedades asociadas.....	30
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>Lippia alba</i>	55
Tabla 3. Variables de la investigación.	65
Tabla 4. Concentraciones y volúmenes de los extractos metanólicos y acuosos que se emplearon en la evaluación de la actividad antibacteriana sobre una cepa de <i>S. aureus</i> y los volúmenes de disolvente utilizado.	9;Error! Marcador no definido.
Tabla 5. Cantidad de los extractos metanólicos y acuosos a diferentes concentraciones que se emplearon en la evaluación de la actividad antibacteriana sobre una cepa de <i>S. aureus</i>	91
Tabla 6. Cantidad de material botánico utilizado en el extracto acuoso y metanólico y su correspondiente volumen de disolvente para una relación 1:2 soluto-disolvente.	99
Tabla 7. Características de los extractos acuosos y metanólicos después de proceso de maceración.	100
Tabla 8. Cantidades finales obtenidas después de los procesos de maceración del extracto acuoso y maceración-destilación del extracto metanólico.	101
Tabla 9. Pesos de las variables consideradas para la obtención de la masa de los sólidos disueltos en un mililitro del extracto.	10;Error! Marcador no definido.
Tabla 10. Resultados obtenidos durante la caracterización o tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de <i>Lippia alba</i>	11;Error! Marcador no definido.
Tabla 11. Resultados de la prueba de sensibilidad microbiana de <i>S.aureus</i> con las extracciones Acuosas de <i>Lippia Alba</i>	114
Tabla 12. Concentraciones de extracto metanólico y cantidad presente en cada pozo con relación a los porcentajes del extracto utilizados durante el ensayo microbiológico.	117
Tabla 13. Resultados de la prueba de sensibilidad microbiana de <i>S.aureus</i> con las extracciones Acuosas de <i>Lippia alba</i>	118

RESUMEN

El desarrollo del presente trabajo tiene como objetivo evaluar la actividad *in vitro* de los extractos acuosos y metanólicos de *Lippia alba* (Juanilama) frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* y de esta forma establecer una alternativa natural para el tratamiento de padecimientos dermatológicos derivados por alteraciones de dicho patógeno en las personas.

Para llevar a cabo ésta investigación, se requirió el uso de los Laboratorios de Química de la Universidad Internacional de las Américas en la obtención de extractos acuosos y metanólicos y el tamizaje fitoquímico. En cuanto a los procedimientos microbiológicos, éstos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología Analítica ubicado en Desamparados.

En la obtención del extracto metanólico, las hojas de la planta se dejaron reposar durante ocho días en una mezcla de metanol y agua y posteriormente se procedió a la evaporación del metanol, utilizando el rota vapor. El extracto acuoso se obtuvo mediante una infusión en agua caliente y se dejó reposar durante una hora.

En cuanto a la caracterización fitoquímica de las hojas de *Lippia alba*, se observó la presencia de Taninos, Flavonoides, Cumarinas, Triterpenos y esteroides, Terpenos y azúcares reductores.

Se comprobó que el extracto que muestra actividad antibacteriana es el metanólico, con un halo de inhibición de 11mm para la concentración de 100%, 8mm para la concentración de 80% y 6 mm para la concentración de 60%. Por el contrario, el extracto acuoso no muestra actividad.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

Planteamiento del problema

Dentro de los patógenos más importantes en el ser humano se encuentra el coco Gram-positivo *Staphylococcus aureus*. Cerca de un 20% de la población es portadora permanente de dicho patógeno en las fosas nasales y un 30% lo es de manera intermitente. Puede además colonizar otras partes del cuerpo como la piel y el tracto gastrointestinal e incluso, con el rompimiento de las barreras de protección mecánicas, podría alcanzar tejidos más profundos. (Pahissa, 2009).

Desde 1880 Alexander Ogston, un médico cirujano escocés, demostró que algunos cocos eran responsables de la producción de abscesos piógenos. Describe entonces al *Staphylococcus aureus* como la especie más virulenta, y con los años ha mantenido una importante morbimortalidad a pesar de la gran cantidad de antibióticos supuestamente activos frente a dicho microorganismo. (Pahissa, 2009)

La acción de los agentes antimicrobianos según Pierre y Ryser, (2006), depende del tipo de microorganismo afectado y se relaciona principalmente con la estructura de la pared celular y el arreglo de la membrana externa. Las bacterias Gram-negativas poseen una resistencia intrínseca a una amplia variedad de antimicrobianos, la cual crea una barrera contra agentes tóxicos y de esta forma, ciertos constituyentes de esos antimicrobianos son incapaces de penetrar al microorganismo.

En ese mismo sentido, Medina (2000) describe:

La resistencia bacteriana a los antibióticos es una respuesta predecible y quizás inevitable del uso de antimicrobianos. La velocidad con la que surge y se extiende en poblaciones microbianas está con frecuencia determinada por la cantidad de antibióticos concretos usados en un ambiente dado. Existe por ello la posibilidad de retrasar su aparición y limitar su extensión con un juicioso uso de los antibióticos, tanto en

humanos como en animales, o incluso, buscando métodos alternativos o naturales. (p.59)

Las plantas fueron los primeros medicamentos que se utilizaron; la Universidad Tecnológica de Pereira [UTP], (2009) señala que “desde tiempos prehistóricos el hombre ha utilizado plantas con fines medicinales (curativos y preventivos), alimenticios y cosméticos. Actualmente, especies de plantas promisorias de uso etnofarmacológico, son fuentes de información para el descubrimiento de posibles sustancias con importante actividad biológica” (p.263).

Además del valor tradicional y terapéutico de las plantas, algunos autores han reconocido el gran potencial antimicrobiano de las especies, demostrando su eficacia en la inhibición del crecimiento de una gran variedad de organismos, como: bacterias, hongos, virus, protozoarios e insectos (Yuste y Fung, 2004).

En Costa Rica, por tener una biodiversidad tan amplia el uso de plantas naturales para tratar enfermedades es muy común. Según la Organización Mundial de la Salud [OMS], (2004) “la atención primaria de salud de hasta un 80% de la población de los países en desarrollo, se basa en la medicina tradicional, por tradición cultural o porque no existen otras opciones” (parr.2); de esta forma se cuenta con un conocimiento fundamentado pero predominantemente empírico.

Dentro del conocimiento fundamentado, Rodríguez (2007) menciona a *Lippia alba* (Juanilama) y explica que se trata de una planta nativa de América (se encuentra desde México hasta Argentina y en el Caribe), se puede cultivar en los jardines aunque también crece en las riberas de los ríos, en terrenos agrícolas y cerca de algunas carreteras. En Costa Rica el uso más común es en fricciones para dolores de reumatismo y en resfríos. En Guatemala la decocción de hojas y flores sirve contra afecciones de la piel.

Diversos artículos científicos demuestran la capacidad terapéutica de las plantas y en este caso, específicamente su poder contra las bacterias. Dado lo anterior se plantea

esta investigación, para comprobar las propiedades antibacterianas “*in vitro*” de los extractos acuosos y metanólicos de *Lippia alba* (Juanilama), frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* y contestar la pregunta de investigación, a saber:

¿Poseen los extractos acuosos y metanólicos de las hojas de *Lippia alba*, acción antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*?

Hipótesis

Los extractos acuosos y metanólicos de las hojas de Lippia alba poseen acción antimicrobiana in vitro frente a cepas de Staphylococcus aureus.

Objetivo General

Evaluar la capacidad antibacteriana *in vitro* de los extractos acuosos y metanólicos de las hojas de *Lippia alba* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

Objetivos específicos

Obtener los extractos acuosos y metanólicos de las hojas de la planta *Lippia alba*.

Caracterizar los principales componentes del extracto de las hojas secas de *Lippia alba* mediante métodos químicos y químico- instrumentales.

Comparar la actividad antibacteriana de los extractos frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, por medio de la medición de halos de inhibición.

Justificación

La investigación pretende brindar una posible alternativa natural para contrarrestar el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus*; dicha alternativa sería una respuesta natural ante la creciente resistencia que ha venido presentado diversos microorganismos patógenos y que normalmente, se intenta contrarrestarlos con medicamentos convencionales como los antibióticos.

Se vuelven necesarios otros métodos para combatir las enfermedades provocadas por los organismos patológicos. Se estima que gran parte de la población de los países en vías de desarrollo se basa en la medicina tradicional, sin embargo, a su vez, se vuelve necesaria una regulación para su uso y comprobación de beneficios (OMS, 2004).

Reyes y Renderos, (2002) destacan que los investigadores siempre están en constante estudio de nuevas drogas vegetales y en años recientes, con el estímulo por nuevos conocimientos botánicos y químicos han vuelto a interesarse en forma creciente en la investigación de drogas vegetales que no han tenido desarrollo en su uso, por lo que la tecnología moderna y los avances, se han encaminado a la extracción de sustancias de origen vegetal para utilizarlas posteriormente como materias prima.

Una vez obtenidas dichas materias primas, se debe evaluar si éstas son aptas. La Universidad Tecnológica de Pereira (UTP) (2009), menciona que “diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes anti microbianos, pero estos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios” (p.263). Lo anterior permite que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado.

El tratamiento de diferentes patologías utilizando plantas naturales es bastante común; Cañigueral y Vanaclocha (2006) plantean: “La Fitoterapia o terapéutica con plantas”, se define como la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen

vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico” (p.15).

En el marco de las consideraciones anteriores, se conoce que la base de los medicamentos fitoterapéuticos son las drogas vegetales y los diversos tipos de productos que podrían obtenerse de éstas. Se evidencia entonces la necesidad de marcar una diferenciación entre droga vegetal y planta medicinal.

La organización Mundial de la Salud (OMS) definió la planta medicinal en 1978 como cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica.

Por lo que se refiere al término droga vegetal, la OMS lo definió de forma escueta como la parte de la planta medicinal utilizada en terapéutica. La Real Farmacopea Española (RAE, 2002), por su parte, da una definición más precisa, se consideran drogas vegetales: las plantas, partes de plantas, algas, hongos o líquenes, enteros, fragmentados o cortados, sin procesar, generalmente desecados (Vanaclocha y Cañigüeral, 2006, pp.15-16).

La planta *Lippia alba* (Juanilama) del reino Verbenaceae posee muchas propiedades curativas, Cáceres (1996) lo señala de la siguiente manera: “Es una planta nativa cultivada en jardines de toda Centroamérica. El material usado medicinalmente se obtiene por recolección en los campos de crecimiento silvestre o por alguna siembra doméstica en huertos familiares” (pp.337-338).

Ciccio y Ocampo, (2006) declaran que en general el uso tradicional de la planta es principalmente como infusión de las hojas o las flores, se utiliza principalmente en trastornos de tipo digestivo, pero que además posee actividades antisépticas, antibacterianas, astringentes y emenagogas.

Tomando en cuenta que la planta es de fácil acceso, ya que se puede encontrar hasta en los jardines de las casas y además, conociendo las múltiples propiedades descritas, se decide comprobar la actividad antibacteriana de la planta *Lippia alba*. Se decidió emplear un método de análisis microbiológico de fácil aplicación y a la vez confiable por lo que se utilizó la Técnica por difusión en pozo y la medición de halos de inhibición que es de uso común en este tipo de análisis.

A su vez, durante la búsqueda de información no se encontró evidencia en Costa Rica del análisis microbiológico del *S.aureus* frente extractos crudos utilizando como solvente agua y metanol. La técnica de obtención de los extractos de maceración por infusión es muy utilizada en los hogares y se quiso comprobar si ésta técnica en realidad es apta para realizar este tipo de extractos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2018), plantea que los niveles de resistencia a los antibióticos son elevados, tanto en países con ingresos altos, así como los de ingresos bajos; la situación es catalogada como un problema grave a nivel mundial, ya que los patógenos no respetan fronteras nacionales. Posicionan además al *Staphylococcus aureus* como una de las bacterias que a menudo presentan resistencia.

Por las razones mencionadas, nace la inquietud de proponer y estudiar alternativas naturales para combatir infecciones bacterianas, debido a que se tiene menos respuesta terapéutica de los antibióticos existentes. Así lo pone en evidencia la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2017) cuando da a conocer una lista de bacterias resistentes. Dentro de la lista mencionan el *Staphylococcus aureus*, organismo que será objeto de estudio en la presente investigación y que dicho sea de paso, es reconocido por su alta patogenicidad y marcada resistencia frente antibióticos que van desde la Penicilina hasta las Fluoroquinolonas y Vancomicina

Antecedentes

Lee y Devore (1968) citados por Ocampo (1994) plantean: “El ser humano ha estado sobre la tierra aproximadamente dos millones de años. Durante 99% de este lapso ha vivido como recolector-cazador, hace diez mil años comenzó a domesticar plantas y animales y lleva algo menos de doscientos años en una sociedad industrial” (p.6).

La recolección y selección de materiales botánicos que se emplean para usos medicinales, se iniciaron con la aparición de la agricultura; en los pueblos indígenas, ésta actividad se mantiene a través del tiempo y aún se desarrolla de manera importante (Ocampo, 1994).

Lezaeta (1997) menciona que “la medicina natural nació con el hombre y que fue practicada por los sacerdotes egipcios y caldeos” (p.18). Gracias a este conocimiento transmitido de generación en generación, se ha logrado recopilar y documentar gran cantidad de información, que con el paso del tiempo y el desarrollo de tecnologías se ha podido ir verificando.

Pochettino y Lema, (2008) describen el conocimiento botánico tradicional (CBT) como un “cuerpo acumulativo de conocimientos, prácticas y creencias acerca de las relaciones entre los seres humanos y los componentes vegetales de su entorno. Este cuerpo de conocimientos se modifica a partir de procesos de selección y es transmitido culturalmente de generación en generación”. (parr.1)

Para el desarrollo y fundamentación del siguiente apartado, se procedió a realizar búsquedas en las diferentes bases de datos que estaban a disposición, dentro de las cuales podemos mencionar: EBSCO, GOOGLESCHOLAR, MEDLINE, OPAC, PUBCHEM, PUBMED, SCIELO. Algunos de los principales hallazgos realizados, son los artículos que mencionamos a continuación:

En Brasil, Sena et al. (2006), realizaron un estudio para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos acuosos, metanólicos y de etil acetato de las raíces de

L.alba, a través de ensayos de difusión por pozos y el perfil fitoquímico. Los extractos se probaron sobre siete microorganismos en total, dentro de los cuales estaban: *E.coli*, *K. pneumonia*, *E.faecalis*, *Salmonella sp.*, *P.aeruginosa* y 2 cepas de *S.aureus*. Se utilizaron las raíces secas para preparar los extractos y luego se evaporaron los solventes a 50°C. En cuanto a los ensayos microbiológicos, las cepas fueron inoculadas en Müller-Hinton (MH) a una concentración de 0.5 McFarland e incubadas a 37°C durante 24 h. Los resultados obtenidos muestran que los extractos de etil acetato y metanol presentan actividad antibacteriana contra *S.aureus*.

Vera, Pastrana, Fernández y Viña (2007), evaluaron en Colombia, la actividad antimicrobiana *in vitro* de volátiles y no volátiles de *Lippia alba* y extractos orgánicos y acuoso de *Justicia pectoralis* cultivadas en diferentes pisos térmicos del departamento de Tolima. El hidrodestilado y extracto metanólico sin hidrodestilar de interés para la investigación es el de *L.alba*; el material vegetal se utilizó seco y se obtuvieron dos macerados metanólicos: uno a partir del material vegetal seco y otro a partir del residuo del hidrodestilado. Los aceites esenciales fueron obtenidos por hidrodestilación durante dos horas. En cuanto a la actividad antimicrobiana se emplearon *S. aureus*, *E. coli* y *C.albicans*. Se utilizó el método de difusión en agar sobre Müller-Hinton, colocando controles positivos y negativos. Las placas fueron incubadas a 37 °C por 24h y luego se midieron los halos de inhibición en cm. En este caso, los autores exponen que además del aceite esencial, los extractos metanólicos, muestran actividad inhibitoria.

En Argentina, Nuñez et al. (2012), realizaron un estudio de Polifenoles y la actividad antimicrobiana en los extractos de *Lippia alba*; las hojas y las flores fueron recolectadas durante el verano, fueron lavadas y secadas durante cinco a siete días y procesadas para un tamaño de partícula menor a 350µm. Las muestras fueron extraídas con agua caliente (infusión), con agua hirviendo (decocción) y con etanol de 70° para una relación planta solvente 1:1. La actividad antimicrobiana fue probada contra *S.aureus*, *E.faecalis*, *E.coli*, y *P.aeruginosa*, mediante el método de difusión de disco. La suspensión de 1.5×10^8 UFC/mL fue estandarizada ajustándola a la densidad óptica de 0.08-0.1 a 625nm.

Las placas Petri se llenaron con agar Müller-Hinton y se prepararon discos de 6mm de diámetro con 30µg/mL de compuestos fenólicos con los extractos crudos. Ampicilina 10µg y Gentamicina 120µg, se utilizaron como controles positivos. Como controles negativos se utilizaron discos con 20µl de etanol a 70° o agua estéril destilada. Dentro de los resultados se logra observar que en términos del contenido de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante, el extracto etanólico es superior al acuoso. Los extractos acuosos obtenidos por infusión presentan menor contenido de fenoles, alto contenido de flavonoides y mejor actividad de radicales libres en comparación con los extractos obtenidos por decocción. En este caso, únicamente el extracto etanólico presenta actividad antimicrobiana, la cual es mayor frente a bacterias Gram- positivas.

Sette et al. (2014), en Brazil, estudiaron la actividad antibacterial y realizaron el tamizaje fitoquímico de extractos de *Lippia alba* (Mill); los microorganismos utilizados fueron: *S. mutans*, *S. mitis*, *S.aureus* y *Lactobacillus casei*: lo anterior como una alternativa natural para el tratamiento y prevención de enfermedades. En cuanto a la preparación de los extractos utilizaron como solvente el agua, realizando una decocción e infusión de la planta. En la realización de la decocción utilizaron hojas secas que fueron mezcladas con agua y hervidos durante cinco minutos. Para la infusión, se hirvió el agua y luego se colocó encima de las hojas secas pulverizadas, después de la mezcla se dejó en reposo durante cinco minutos.

Siguiendo la descripción anterior, la evaluación antimicrobiana se llevó a cabo simulando el ambiente bucal. El medio de cultivo utilizado fue el agar Brain, Hearth Infussion (BHI), enriquecido con sacarosa al 5%. La actividad antimicrobiana se midió en 10µL de cultivo + 90 µL del extracto+ 900 µL de BHI. Para el control positivo se utilizó Clorhexidina y las muestras fueron incubadas durante 20h a 37°C. Con el tamizaje fitoquímico, se lograron observar compuestos fenólicos incluidos flavonoides y taninos. Concluyen que el extracto acuoso por infusión es mejor que el obtenido por decocción ya que la infusión presentó un efecto inhibitorio mayor; los autores explican que la presencia del ácido elágico en la infusión podría justificar este comportamiento y que además no estaba presente en la decocción, por lo que la temperatura es un factor a

considerar. Ambos extractos presentaron una mayor actividad antimicrobiana que la Clorhexidina.

Para el desarrollo de esta sección, se realizó una búsqueda de evidencia, cuyos alcances se lograron gracias a la revisión en las bases de datos de las siguientes universidades estatales y privadas: Universidad de Costa Rica (SIBDI), Universidad de Iberoamérica UNIBE y en la Universidad Internacional de las Américas UIA.

Costa Rica es un país pequeño en territorio; sin embargo, al ser una región puente, se da el tránsito de gran cantidad de enfermedades, algunas tienen una mayor prevalencia e incidencia que otras. Gran parte de las enfermedades tienen origen infeccioso, lo que preocupa a las autoridades ya que algunos microorganismos patológicos presentan una creciente resistencia. Esta resistencia ha despertado el interés en el costarricense y a continuación se detallarán algunas investigaciones que hacen alusión a este tema.

Ciccio y Ocampo (2006), realizaron un estudio acerca de la variación anual de la composición química del aceite esencial de las hojas de *Lippia alba* que crece en la región tropical húmeda de Costa Rica, utilizando cromatografía de gases capilar y espectroscopia de masas. Se utilizó material proveniente de cinco cosechas efectuadas en el transcurso de un año, a partir de una plantación en la zona atlántica de Costa Rica. Los aceites esenciales fueron extraídos de las hojas secas por medio de hidrodestilación, durante tres horas, con un equipo Clevenger modificado. Se obtuvo como resultado que los dos componentes mayoritarios del aceite son carvona y limoneno. Además, se evidencia que la composición química de la planta en la zona Atlántica de Costa Rica es estable durante el año, es decir, que su cosecha se podría efectuar en distintos meses sin que haya variación en la composición del aceite.

Medina, Araya, Tamayo y Romero (2011), investigaron metodologías de extracción para limoneno y carvona en *Lippia alba* usando cromatografía de gases. Para la identificación de compuestos, se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas; mientras que en el análisis cuantitativo, se usó un

cromatógrafo de gases con un detector de ionización de llama. Las hojas de *Lippia alba* se recolectaron durante un año en Peñas Blancas; los componentes para su identificación se extrajeron por hidrodestilación a partir de hojas secas con agua, a una temperatura de 85-90°C, durante 4h y la muestra fue leída en el cromatógrafo. Los compuestos mayoritariamente observados en el aceite esencial fueron: carvona y limoneno de acuerdo con la cuantificación, el limoneno no se encuentra en los meses de octubre, diciembre y febrero; las concentraciones de carvona más altas se obtuvieron en abril y julio, las más bajas en febrero y octubre. Dada las consideraciones anteriores, se puede evidenciar que la composición de metabolitos en la planta *Lippia alba*, no es constante durante todo el año, presentándose o no ciertos componentes, en dependencia de las condiciones ambientales.

Un hecho de relevancia histórica acerca de las plantas medicinales en Costa Rica, es que la Universidad de Costa Rica mediante su Vicerrectoría de Investigación, crea el Centro de Investigación en Productos Naturales (CIPRONA) en el año 1979; dicho centro investigativo e interdisciplinario trabaja en colaboración con otros centros de investigación e Instituciones Públicas, para la creación de información científica sobre las plantas con usos medicinales, sus metabolitos y otros. (Hernández, 2018).

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

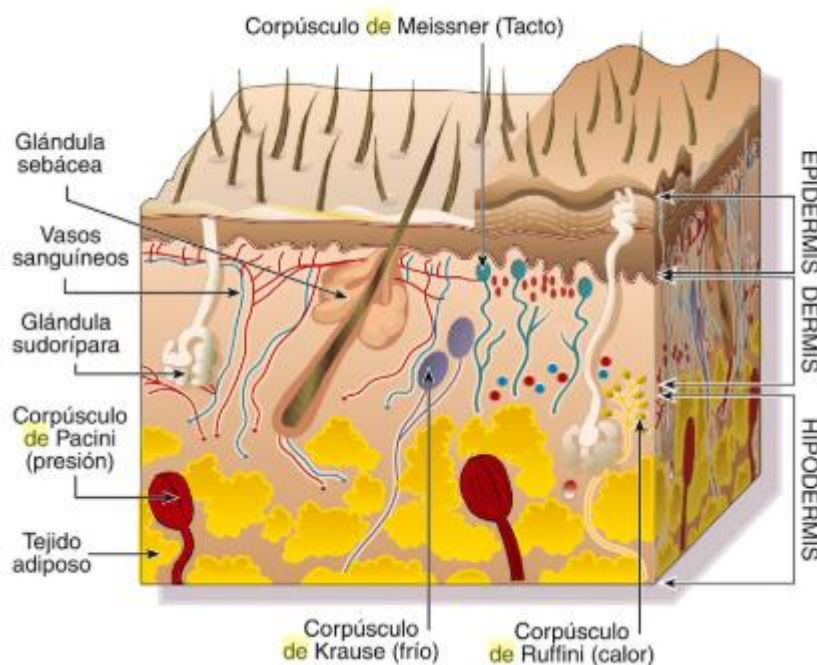
A continuación, se desarrollan teóricamente los conceptos que permiten fundamentar las variables de esta investigación, así como analizar posteriormente los resultados obtenidos.

Generalidades de la piel

Anatomía

Según Hammer y McPhee, (2014) la piel es el órgano más extenso que tenemos y también el más accesible. Brinda una función básica y simple de protección; como una barrera, la piel frena la desecación y las enfermedades, manteniendo la humedad y los patógenos fuera. Sin embargo, subestimarla y verla como una simple envoltura plástica es un error para ésta vital estructura. Además, tiene la peculiaridad de que todas las enfermedades que la atacan pueden ser observadas a simple vista. El sistema integumentario (piel) consiste en una capa de tejido, de 1 a 4 mm de espesor, esta capa cubre todas las partes del cuerpo que están expuestas. La piel es distinta de las mucosas y contiene estructuras que exudan el sudor (unidades ecrinas) y estructuras que producen pelos y aceites (unidades folículo sebáceas). Estas características hacen que la piel presente variaciones en el grosor, por ejemplo, la piel más delgada es la que cubre los párpados y la más gruesa se encuentra en el tronco. La piel está formada por capas: la epidermis, que es un epitelio escamoso estratificado; y una capa de tejido conectivo, la dermis. Ésta posee gran cantidad de vasos sanguíneos que brindan células de protección contra microorganismos. La tercera capa la conformaría un tejido adiposo que se conoce como subcutis o hipodermis.

Figura 1. Partes de las diferentes capas de la piel



Nota: Tomado de Gutiérrez, Guillamas, Hernando, Méndez, Sánchez y Tordesillas, 2017, (p.26).

Funciones de la piel

Fitzpatrick, (2008) explica que la piel es un órgano extenso y de suma importancia, protege al huésped de su ambiente y, al mismo tiempo, permite la interacción del organismo con el ambiente circundante; realiza diversas funciones en el organismo, dentro de las cuales están:

- **Barrera física de permeabilidad:** Al estar frente a un gran número de estímulos ambientales, deseables o no, permite el paso selectivo de las sustancias que entren en contacto. Por ejemplo permite la salida de grasa, la cual previene resequedad de la piel.

- **Protección:** Evita que microorganismos patógenos, invadan tejidos más profundos, protección contra la luz UV, cambios bruscos de la temperatura, lesiones químicas y humedad ambiental externa.
- **Sensaciones:** La piel tiene receptores sensitivos repartidos en toda su superficie que le permiten reconocer el medio ambiente y la defensa ante peligros. Los estímulos adecuados provocan sensaciones de tacto, presión, temperatura y dolor y reconoce la intensidad y procedencia del estímulo.
- **Función metabólica o de reserva:** Puede servir como reserva de agua o de grasa y en la parte metabólica es responsable del 90% de la producción de vitamina D gracias al esteroide 7-dihidrocolesterol, que absorbe radiaciones solares y se convierte en provitamina D. (pp. 57-72).

Tabla 1. Funciones de la piel, partes dónde se realiza y enfermedades asociadas

Función	Capa de tejido	Algunas enfermedades asociadas
Barrera de permeabilidad	Epidermis	Dermatitis atópica Displasias ectodérmicas Ictiosis Queratodermias Dermatitis exfoliativa Enfermedades ampollares
Protección contra patógenos	Epidermis Dermis	Verruga vulgar Ectima Celulitis Leishmaniasis Virus de la inmunodeficiencia humana Tiña del pie o del cuerpo
Termorregulación	Epidermis Dermis Hipodermis	Displasias ectodérmicas Raynaud Hipertermia
Sensación	Epidermis Dermis Hipodermis	Neuropatía diabética Lepra Prurito Neuralgia posherpética
Protección contra radiación ultravioleta	Epidermis	Xerodermia pigmentosa Albinismo oculocutáneo
Reparación/regeneración de las heridas	Epidermis Dermis	Queloides Úlcera venosa por estasis Piodermia gangrenosa
Aspecto físico	Epidermis Dermis Hipodermis	Melasma Vitiligo Esclerodermia Lipodistrofia

Nota: Tomado de Fitzpatrick, 2008 (p.58).

Lesiones en la piel

Siemens (1891-1969), citado por Fitzpatrick, (2008) “Quien estudia las enfermedades de la piel y no estudie primero la lesión nunca aprenderá dermatología”. Dicha afirmación defiende la idea de que la lesión primaria de la piel, o su evolución es el elemento esencial en el que se basa un buen diagnóstico de la enfermedad cutánea. (p.25).

Hammer y McPhee, (2014) describen que existen dos tipos de enfermedades de la piel: crecimientos y erupciones.

- **Crecimientos:** Puede ser un quiste, una malformación o una neoplasia benigna o maligna, algo que se puede observar como un bulto en la piel.
- **Erupciones:** Son enfermedades cutáneas no neoplásicas, más específicamente, una afección inflamatoria de la piel (dermatitis).

Las lesiones inflamatorias de la piel se han denominado lesiones primarias, dentro de las cuales, las más importantes son máculas y parches, pápulas y placas, vesículas y ampollas, pústulas y nódulos.

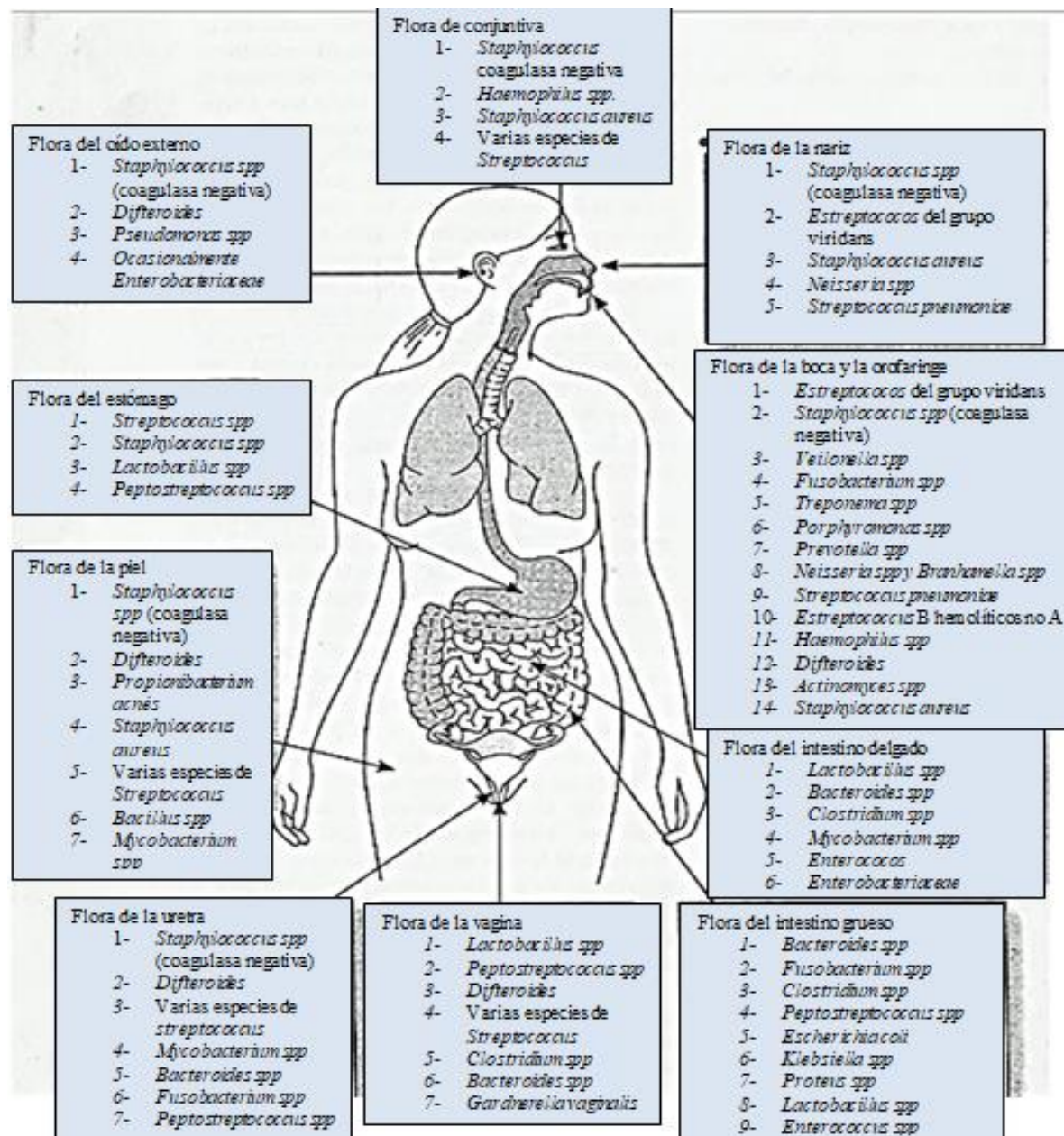
- **Máculas y parches:** Áreas de decoloración sin ningún cambio perceptible en la textura. Las máculas tienen un diámetro de 1cm o menos, mientras que los parches superan el tamaño de 1 cm.
- **Pápulas y placas:** Lesiones cutáneas palpables elevadas en las que la amplitud de la lesión excede su espesor. Una pápula es pequeña de 1cm o menos de diámetro, mientras que una placa excede 1cm de tamaño.
- **Vesículas y ampollas:** Espacios llenos de fluido dentro de la piel. La vesícula mide menos de 1cm; las ampollas exceden ese tamaño.
- **Pústula:** Es una vesícula que tiene en su interior líquido con pus.
- **Nódulo:** Lesión sólida, de bordes redondeados, donde el grosor y el diámetro son similares.

Microbiota bacteriana de la piel

García, Fernández y Paredes, (1997) menciona que la relación que tiene el hombre con los microorganismos genera interacciones que pueden resultar beneficiosas o nocivas. “Según la naturaleza de esta interacción, los microorganismos se clasifican en: comensales, cuando colonizan las superficies corporales sin causar daño y patógenos, cuando dañan al huésped por invasión directa y lesión o por la producción de sustancias tóxicas” (p.9). Desde que el neonato pasa a través del canal uterino, la colonización microbiana comienza, pues en este punto se expone a la flora vaginal de madre. Luego del nacimiento, el bebé entra en contacto con los microorganismos del

ambiente y de otros individuos, hasta que, muy rápidamente va desarrollando su propia flora microbiana, conocida como, flora normal o comensal. Es evidente entonces que una multiplicidad de microorganismos habita en la piel de las personas, “la flora predominante incluye *Staphylococcus epidermidis*, especies de *Micrococcus* y difteroides. Otras bacterias como *Staphylococcus aureus*, estreptococos alfa y gamma hemolíticos y levaduras, colonizan transitoriamente la piel” (p.9).

Figura 2: Microbiota normal del cuerpo humano



Nota: Tomado de Mata, 2013, p.42.

Generalidades de las bacterias

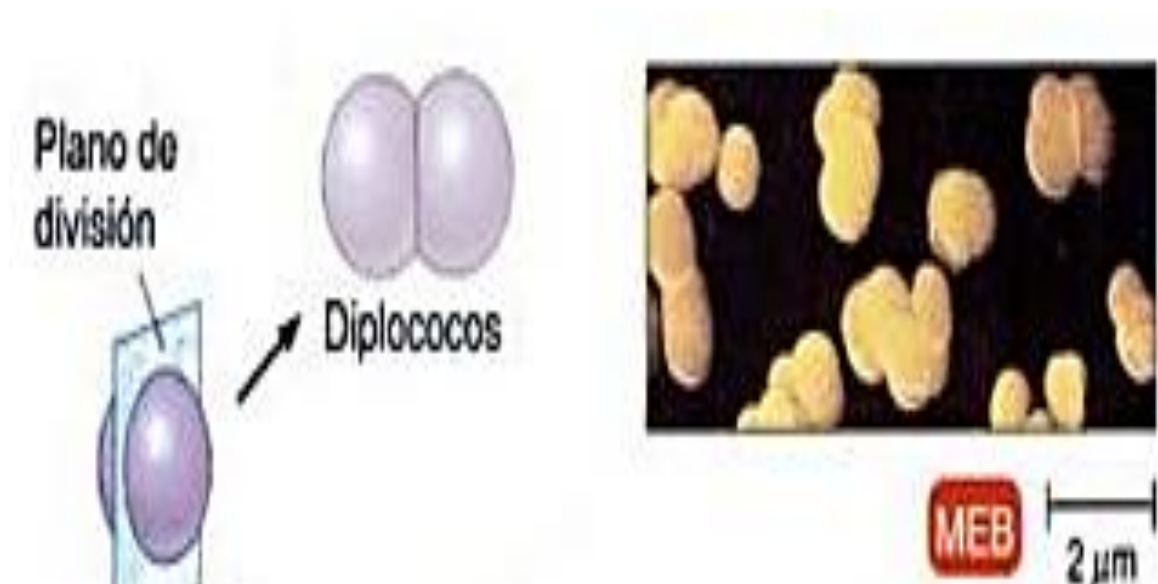
Tortora, Funke y Case, (2007), explican ampliamente, que las bacterias poseen diferentes tamaños y formas. La mayoría miden entre 0.2 y 2 μm de diámetro y entre 2 y 8 μm de largo. Se clasifican en: cocos esféricos, bacilos bastoniformes, y bacterias espirales. A continuación se explica cada grupo.

Cocos

Su nombre hace referencia a las bayas, en general, son redondos, pero pueden ser ovalados, elongados o con uno de sus lados aplanado. Cuando se dividen para reproducirse, las células permanecen unidas entre sí y dependiendo de su distribución después de dividirse éstos reciben diferentes nombres:

Diplococos: Después de la división los cocos permanecen unidos en pares.

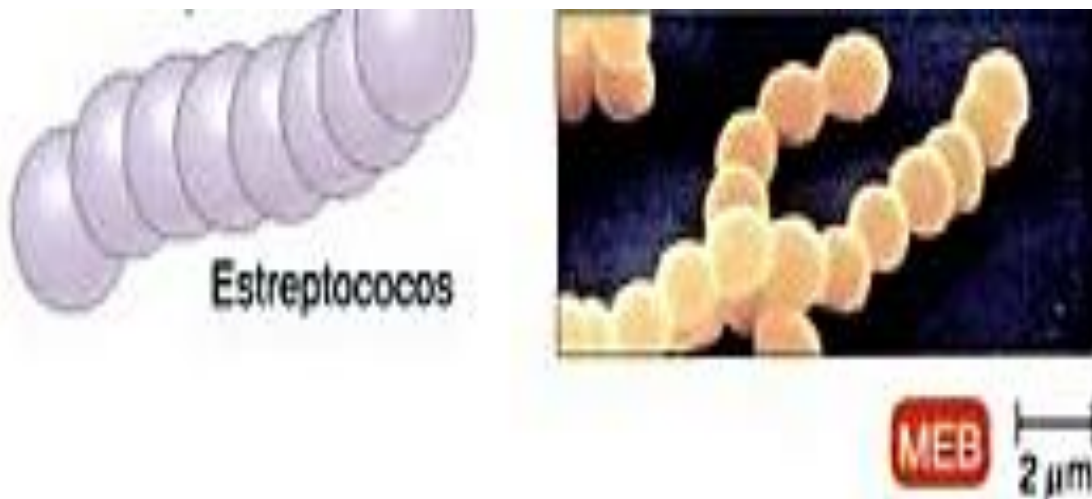
Figura 3: Cocos dispuestos en pares



Nota: Tomado de Tortora, Funke y Case, 2007, p. 79.

Estreptococos: Son los cocos que después de la división permanecen unidos en forma de cadena.

Figura 4. Cocos dispuestos en forma de cadena



Nota: Tomado de Tortora, Funke y Case, 2007, p. 79.

Tétradas: Son cocos que se dividen en 2 planos y permanecen unidos en grupos de cuatro.

Figura 5. Cocos dispuestos en grupos de cuatro



Nota: Tomado de Tortora, Funke y Case, 2007, p. 79.

Sarcinas: Este tipo de cocos, se dividen en tres planos y permanecen unidos en grupos de configuración cúbica.

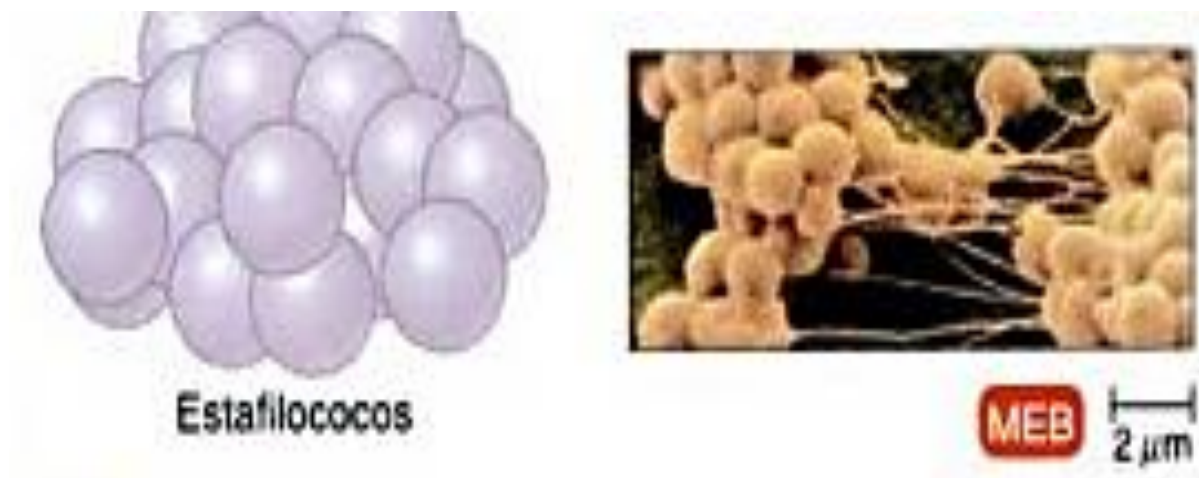
Figura 6. Cocos dispuestos en grupos de configuración cúbica



Nota: Tomado de Tortora, Funke y Case, 2007, p. 79.

Estafilococos: Se dividen en múltiples planos y forman grupo similares a racimos de uvas.

Figura 7. Cocos dispuestos en grupos de racimos de uva



Nota: Tomado de Tortora, Funke y Case, 2007, p. 79.

Estafilococos

Pahissa (2009) menciona que el género *Staphylococcus* tradicionalmente se ha incluido en la familia *Microcaceae*, sin embargo, estudios recientes han demostrado que los *Staphylococcus* y *Micrococcus* están muy poco relacionados por lo que tentativamente lo ubicaron dentro de la familia *Staphylococceae* y el orden *Bacillales* con los que comparte una mayor similitud.

El género *Staphylococcus* incluye cuarenta y dos especies diferentes. Algunas de ellas son parte de la flora microbiana normal de piel y mucosas en humanos y otras se encuentran solo en mamíferos y aves. “Las especies que tienen mayor importancia clínica en el hombre son: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Staphylococcus aureus*”. (p.15).

Características bioquímicas y fisiológicas

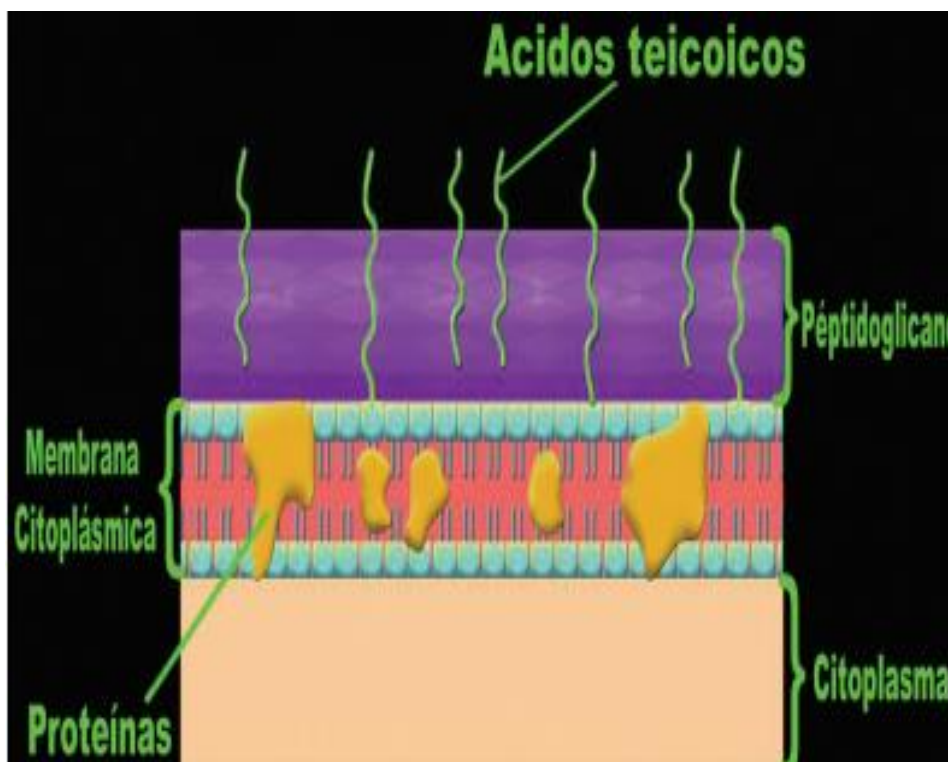
En efecto, Pahissa (2009) describe a los estafilococos como “bacterias inmóviles que no forman esporas, generalmente no poseen cápsula y en raras excepciones son anaerobias facultativas” (p.16). Por lo general no requieren medios enriquecidos para crecer, donde pueden desarrollarse después de 18-24 horas de incubación formando colonias de 1 a 3 mm de diámetro.

Casi todas las especies producen catalasa “una enzima que permite desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre. Esta característica se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* (catalasa positivo) de los género *Streptococcus* y *Enterococcus*, los cuales son catalasa negativos” (p.17). Sin embargo, la principal característica que la diferencia de los otros tipos de *Staphylococcus* es ser coagulasa positivos. La misma le permite coagular el plasma. (Pahissa, 2009).

Staphylococcus aureus

Pahissa 2009 la define como una bacteria muy resistente al calor y a la desecación que puede crecer en medios con elevada salinidad. Como la mayoría de las bacterias Gram-positivas, los componentes fundamentales de la pared celular son el peptidoglicano, que tiene carácter de endotoxina por lo que participa en la patogenia de la infección y los ácidos teicoicos, que median la unión de la bacteria a las mucosas.

Figura 8. Estructura de la pared celular en bacterias Gram-positivas



Nota: Tomado de Cavalieri, 2005, p.4.

S.aureus puede ser una bacteria tanto comensal como extremadamente patógena, en los seres humanos causa básicamente tres síndromes:

- Lesiones superficiales como abscesos en la piel y heridas infectadas.
- Invasiones profundas e infecciones sistémicas como osteomielitis, endocarditis, neumonía, bacteremias.
- Síndrome tóxico tales como el síndrome de shock tóxico (TSS), por sus siglas en inglés, fiebre estafilocócica escarlata, síndrome de la piel escaldada e intoxicación alimentaria por estafilococos (Jarraud et al. 2005).

Principales factores de virulencia

El *S. aureus* produce una gran variedad de proteínas que le brindan capacidad para colonizar y provocar enfermedades en el ser humano, casi todas las cepas, producen enzimas tipo nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasas y colagenasas, y además hemolisinas tipo alfa, beta, gamma y delta. La función principal de estas enzimas y hemolisinas es degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para las bacterias (Jawetz, Melnick y Adelberg, 2011).

Infecciones producidas por *S. aureus*

La evolución normal de las infecciones por *S. aureus* se produce en neonatos, la mayoría de los niños y los adultos a través de la colonización en forma intermitente. Posteriormente albergan el microorganismo en forma preferente en la nasofaringe, ocasionalmente en la piel y rara vez en la vagina. Se contamina cualquier sitio de la piel, mucosas o incluso se puede contagiar a otras personas, a través de aerosoles o por contacto directo (Cervantes, García y Salazar, 2014).

La liberación de toxinas en la piel y otros órganos puede causar diversos tipos de exantemas cutáneos y síntomas generales como lo es la enfermedad diarreica aguda. Las bacterias pueden sobrepasar los mecanismos fagocíticos locales y acceder a los canales linfáticos y al torrente sanguíneo, dando origen a una bacteriemia estafilocócica, ésta es una complicación grave que puede conducir a una infección metastásica la cual conlleva a un pronóstico no muy alentador para el paciente (Cervantes et al. 2014).

Desde cualquier punto, los microorganismos pueden diseminarse a través de los linfáticos y la circulación sanguínea a otras partes del organismo. La supuración dentro de las venas, asociada a la trombosis, es una característica frecuente de tal diseminación. En la osteomielitis, el centro primario del crecimiento de *S. aureus* suele ser un vaso sanguíneo terminal de la metafisis de un hueso largo, lo que desencadena necrosis del hueso y supuración crónica. *S. aureus* puede ser causa de neumonía,

meningitis, empiema, endocarditis o septicemia con formación de pus en cualquier órgano (p.30).

Los estafilococos que poseen baja capacidad para invadir, intervienen en muchas infecciones cutáneas por ejemplo las descritas por Ramos (2012):

- **Celulitis:** Infección de la dermis profunda y el tejido celular subcutáneo originada en especial por *S. aureus* y *S. pyogenes* y, con menor frecuencia, *H. influenzae*. La enfermedad puede vincularse con otros padecimientos, entre ellos úlceras crónicas, úlceras por insuficiencia venosa, desnutrición y alcoholismo.

Figura 9. Infección cutánea celulitis causada por *S.aureus*.



Nota: Tomado de <http://informacionfiabledesalud.com/?p=3516>.

- **Síndrome de la piel escaldada:** Enfermedad por toxinas epidermolíticas de ciertas cepas, que produce ampollas como si la piel estuviera

escaldada; pueden aparecer ampollas en zonas lejanas al sitio inicial. El cuadro aparece fundamentalmente en niños por debajo de los cinco años.

Figura 10. Infección cutánea piel escaldada



Nota: Tomado de Guerra, 2008, p.51.

- **Impétigo:** Enfermedad bacteriana contagiosa, lesiona las capas superficiales de la piel; predomina en niños menores de cinco años y se presenta de modo principal en la cara y los miembros superiores. Puede adoptar las formas seca y bullosa. El seco es la forma más frecuente, inicia con una mácula eritematosa y escamosa que se extiende con rapidez y puede causar pústulas cubiertas de costras amarillentas.

Figura 11. Infección cutánea impétigo



Nota: Tomado de <http://guiasdemedicina2015.blogspot.com/2015/06/impetigo.html>.

Diagnóstico para infecciones por *S.aureus*

Pahissa, (2009), señala que los datos clínicos y epidemiológicos son fundamentales para orientar el diagnóstico microbiológico. En cuanto al diagnóstico etiológico de la infección, se requiere la identificación de la bacteria a partir de muestras clínicas. Una vez obtenida la muestra, siguiendo los principios generales de obtención, transporte y conservación, se identifica mediante:

- **Examen directo:** Mediante una tinción de Gram, se pueden observar cocos grampositivos agrupados en parejas, tétradas o racimos. La muestra puede ser tomada de la sangre, tejidos, líquidos estériles, aspirados de los abscesos y otras colecciones purulentas. El resultado será de infección estafilocócica pues las características microscópicas no facilitan la distinción entre las especies de estafilococos.
- **Cultivo y aislamiento:** *S.aureus*, puede crecer en cultivos como agar sangre, agar chocolate o agar infusión cerebro-corazón; los cuales no son selectivos. El medio selectivo más empelado es el agar manitol sal, ya que, por su alto contenido de sal, impide el crecimiento de la mayoría de

bacterias gramnegativas. La bacteria produce ácido que fermenta el manitol y la coloración cambia de un rosado pálido a un amarillo.

- **Prueba de catalasa:** Se coloca una gota de una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en un portaobjetos y se le aplica una muestra de la colonia de las bacterias, se empiezan a formar pequeñas burbujas en la muestra observada indicando de esta manera que el resultado es positivo.

Antibióticos

Cruz, (2001) define a los antibióticos como compuestos químicos que son utilizados para eliminar o inhibir el crecimiento antimicrobiano tanto en seres humanos como en animales. Un antibiótico puede ser derivado de otros organismos vivos, generalmente microorganismos, modificaciones químicas de estos, o también sintéticos o semisintéticos. El efecto que causa sería una inhibición de la reproducción del microorganismo, o su crecimiento o destrucción de microorganismos de los mismos.

Modos de acción de los antimicrobianos

“Los agentes antimicrobianos se clasifican de acuerdo a sus modos específicos de acción contra las células bacterianas. Estos agentes pueden interferir con la síntesis de la pared celular, inhibir la síntesis de proteínas, interferir con la síntesis de ácido nucleico, o inhibir una ruta metabólica” (Cavalieri et al. 2005, p.6).

Resistencia bacteriana a antibióticos

Como se mencionó, la resistencia a los antibióticos es un problema alarmante, e inevitable. La razón principal radica en la mala utilización que se les da, pues se abusa de forma indiscriminada de los recursos disponibles. Surgen de esta forma, patógenos multiresistentes que inhabilitarán la acción de antibióticos más tóxicos.

Mecanismos de resistencia bacteriana

Existen una serie de formas en que los microorganismos son resistentes a los agentes antimicrobianos y Cavalieri et al. (2005) las describe de la siguiente manera:

- **Producción de enzimas:** La bacteria produce enzimas que destruyen el agente antimicrobiano antes que éste alcance su blanco o modifica el agente antimicrobiano de tal forma que ya no puede ser reconocido por su blanco. Por ejemplo: las beta-lactamasas.
- **Impermeabilidad de la membrana bacteriana externa:** El agente antimicrobiano no puede penetrar la membrana bacteriana.
- **Alteración de los blancos:** El sitio de ataque es alterado genéticamente, de tal manera que ya no permite la unión del agente antimicrobiano
- **Bombas de eflujo:** La bacteria posee una bomba que expelle al agente antimicrobiano de la célula antes que este alcance su blanco. Es mediado por proteínas trans-membrana.
- **Alteración de rutas metabólicas:** Dentro de las bacterias, las rutas metabólicas son alteradas genéticamente para que el agente antimicrobiano no pueda provocar un efecto.

Resistencia bacteriana de *S.aureus* a los antibióticos

Es conocido que gran cantidad de microorganismos han generado con el tiempo, un alto grado de resistencia a los antimicrobianos. La evolución de la sensibilidad a los antibióticos en el *S.aureus*, es un proceso complejo y dinámico; Pahissa, (2009), describe el proceso de la siguiente forma:

A principios de la década de los cuarenta, la mayoría de los aislados de la bacteria eran sensibles a la penicilina G. Sin embargo, este microorganismo rápidamente desarrollo la capacidad de producir

penicilinas, una enzima que inactiva las penicilinas naturales y las aminopenicilinas, y cuya codificación plasmídica favoreció su diseminación.

Esta resistencia fue inicialmente esporádica y observada en el medio hospitalario, pero en dos décadas, más de 75% de los aislados eran resistentes y se habían diseminado a la comunidad. Poco después, y tras la introducción de nuevos antimicrobianos como la Estreptomicina, la Tetraciclina, el Cloranfenicol y la Eritromicina, *S.aureus* desarrolló resistencia a los mismos junto con la producción de la Penicilinas. (p.34)

Pahissa (2009), aclara que frente al desarrollo de resistencia, surgieron las penicilinas semisintéticas, alrededor del año 1961 y, en ese mismo año se reportaron los primeros casos de *S.aureus* con resistencia a la meticilina (SARM). Poco tiempo después los retos terapéuticos se extendieron por todo el mundo y alcanzó a antibióticos como la Gentamicina y aminoglucósidos, Cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, lincosamidas, fluoroquinolonas y hasta Vancomicina.

Pruebas de sensibilidad a los antibióticos (PSA) y Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Los antibiogramas según Negroni, (2009), son estudios donde se mide el grado de resistencia o el grado de sensibilidad de los microorganismos *in vitro*. Estos estudios tratan de simular las condiciones en las que se encuentra el agente infeccioso dentro de los tejidos o los líquidos orgánicos. La finalidad de las pruebas es poder implementar tratamiento con antimicrobianos en las personas, respaldado por un diagnóstico clínico y estudios bacteriológicos.

Según Clinical Laboratory Standars Institute (CLSI), la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se describe como la concentración mínima de sustancia bactericida que puede causar efecto inhibitorio. Dicha concentración puede ser determinada mediante técnicas que Cavalieri et al. (2005), describe a continuación:

Prueba de difusión en agar por disco: Esta prueba se ha utilizado por más de 70 años. Primeramente, se seleccionan las colonias (3-5 colonias) para preparar una suspensión del inóculo en solución salina o caldo de Mueller-Hinton o soya tripticasa, dicha suspensión debe estar estandarizada en la escala de 0.5 McFarland, una vez la placa esté inoculada con la bacteria, se distribuyen los discos y se procede con la incubación de la placa. Tras este proceso, los halos de inhibición estarán listos para ser leídos e interpretar los resultados.

Prueba de difusión en agar por pozo: Se aplica la misma técnica descrita anteriormente, la variable radica en que la sustancia con posible efecto antibiótico es colocada directamente en la placa. Para esto es necesario hacer pozos del mismo tamaño en el agar y saber la cantidad exacta de microlitros que se van a colar en cada pozo.

Técnica de dilución en caldo o agar: En un tubo de ensayo que contiene medio de cultivo, se pone a crecer la bacteria. De manera ascendente se agregan diferentes concentraciones de la sustancia con posible actividad antibacteriana, la concentración a la cual no se genere crecimiento bacteriano es la concentración mínima inhibitoria (CMI). La concentración mínima bactericida (CMB), también es posible obtenerla y sería equivalente a la concentración mínima en la cual se tendrá muerte de las bacterias en estudio.

De acuerdo con el Clinical Laboratory Standards Institute CLSI (2017), el halo de inhibición se clasifica en tres niveles: sensible (S), intermedio (I) y resistente (R), de esta forma una bacteria sensible a la sustancia produce un halo entre 30 mm y 35 mm; el intermedio sería entre 15mm y 30 mm y es considerado resistente cuando los halos son menores a 15 mm. Dadas las consideraciones anteriores de esta forma es posible establecer la concentración mínima que logra inhibir el crecimiento de la bacteria.

Dadas las consideraciones que anteceden, Sáenz (1999) explica que la inhibición no sólo dependerá de la sensibilidad bacteriana o de la cantidad de sustancia con posible actividad antibacteriana, sino también, cambios de pH, profundidad del agar, la cual debe ser exactamente de 4 mm. Un agar delgado, permite una mejor difusión de los

antibióticos produciendo una falsa sensibilidad, pero también un agar con más de 4 mm de profundidad puede producir una disminución en la migración (difusión) del antibiótico con la consiguiente falsa resistencia. La inhibición también dependerá de los medios de cultivos, éstos deben ser lo más frescos posibles, con no más de 7 días de preparados.

Medicina natural

Según Quesada (2008), las plantas se conocen desde tiempos ancestrales como remedios y curaciones para diferentes males, no se puede cuestionar su importancia en el desarrollo de la medicina y la farmacología moderna. Existe una gran variedad de plantas medicinales que varían según las diferentes regiones y ecosistemas de las zonas en que se encuentran. (p.1).

La humanidad, siempre ha sufrido de enfermedades centrandose parte de sus esfuerzos en tratar de combatirlos, por lo que el empleo de las plantas medicinales ha sido vista como una forma de afrontar enfermedades dentro de las poblaciones, de esta manera, el uso de plantas medicinales constituye una de las formas más complejas y hondamente enraizadas en la conducta humana.

Entralgo (2004) menciona que el hombre primitivo, desde su origen, utilizaba para sus curaciones plantas silvestres hasta la actualidad, donde logra incorporar este acervo a su cultura. Esta práctica traspasó todas las barreras y obstáculos durante el proceso de evolución y llegó hasta el presente, donde ha sido ampliamente utilizada por gran parte de la población mundial como fuente eficaz de recursos terapéuticos. En el marco de las consideraciones anteriores, el autor enfatiza que durante los últimos años, el interés del público en las terapias naturales ha aumentado y su uso está en expansión. La multiplicidad de los productos medicinales tradicionales, han evolucionado frente a entornos ampliamente diferentes en lo cultural, climático y geográfico. Significa entonces, el surgimiento de importantes desafíos y la necesidad de evaluar estos productos, asegurando su inocuidad y eficacia mediante el registro y la reglamentación. Los medicamentos naturales que formaron la base de la atención de salud en todo el

mundo desde los primeros días de la humanidad siguen utilizándose ampliamente y tienen una considerable importancia en el comercio internacional

Plantas para uso medicinal

La medicina tradicional, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), (2002), se define como aquella que hace uso de "diversas prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias que incorporan medicinas procedentes de plantas, animales y/o fuentes minerales, terapias espirituales, técnicas manuales y ejercicios, aplicados en singular o en combinación para mantener el bienestar, además de tratar, diagnosticar y prevenir las enfermedades". (p.2).

Brutti (2004), mencionado por Madaleno (2007), define la planta medicinal como un organismo vegetal que posee componentes con actividad farmacológica y que tienen la capacidad de ejercerla sobre los seres vivos. Dicha actividad puede ser positiva o no, lo que indica que contienen principios activos responsables de esas acciones.

Cabe agregar que, con el estudio de las características anteriormente mencionadas, surge la fitoterapia que es "la ciencia que estudia el uso de plantas medicinales y las incorpora en formas farmacéuticas (fitofármacos), cuya calidad, seguridad y eficacia están garantizadas, teniendo en cuenta las características de las drogas vegetales y extractos" (Cea de Amaya, 2013, parr. 4).

Fitofármacos

El uso de plantas medicinales se extiende más allá de su uso popular y forma parte de la base sobre la cual se han desarrollado muchos medicamentos de la medicina alopática. Se estima que alrededor del 25% de las medicinas modernas son derivadas directa o indirectamente de las plantas. Por esta razón, con el resurgir de la medicina tradicional, las compañías farmacéuticas enfocan su atención en la investigación y desarrollo de los productos basados en plantas con eficacia, seguridad y calidad (Calixto, 2000).

Los fitofármacos se definen como: “productos obtenidos por procesos tecnológicamente adecuados, empleando exclusivamente materias primas vegetales, con la finalidad profiláctica curativa, paliativa o para fines de diagnóstico. Se caracteriza por el conocimiento de su eficacia y de los riesgos de su uso, así como para la reproducibilidad y la constancia de su calidad (OMS, citado por Cea, 2013, parr.5).

Ramos et al. (2011) mencionan que el tema de calidad en el desarrollo de estos fármacos, debe seguir una serie de pasos en investigación y desarrollo que garanticen la eficacia y seguridad de producto final. Para ello se parte del enfoque etnobotánico con la identificación de la planta y los requerimientos necesarios para su siembra. Luego se procede con la obtención y estandarización del extracto para ser sometido a estudios preclínicos, clínicos y toxicológicos que respalden la formulación y comercialización del fitofármaco.

Metabolismo

El metabolismo como lo explica Roach, (2010) “es un conjunto integrado de reacciones químicas que tienen lugar en el organismo, lo capacitan para extraer energía del medio y así poder utilizarla para sintetizar los bloques de construcción que se emplean para fabricar proteínas, carbohidratos y las grasas esenciales” (p.3).

Con relación a la afirmación anterior, “toda sustancia que se produzca durante el metabolismo se le llamará metabolitos y son el resultado de la degradación a nivel intracelular de las moléculas. Las enzimas reconocen los metabolitos y actúan sobre ellos para participar de reacciones posteriores, de esta forma no se acumulan dentro de las células” (p.8).

Metabolitos primarios y secundarios de las plantas.

Dewick, (2002), Maplestone, Stone y William, (1992) citados por Rivas, Orandy y Verde (2016), explican que en un principio, la estructura química, molécula precursora u orígenes biosintéticos de los metabolitos primarios y secundarios no se pueden

diferenciar. La diferencia se hace visible en su función, de modo que se dice que son metabolitos primarios aquellos que participan en la nutrición y procesos metabólicos esenciales para la planta, mientras que los secundarios permiten interacciones de la planta con el entorno.

Los metabolitos primarios presentes en los vegetales son: carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, ácidos nucleicos, aminas, clorofilas e intermediarios metabólicos de las vías anabólicas y catabólicas, que a su vez se transformarán en metabolitos secundarios que no son vitales para la planta pero, que le da a ésta, ventajas para responder a estímulos del entorno, para almacenamiento o como defensa contra predadores (Rivas, Orandy y Verde, 2016).

Quimiotaxonomía

De la misma forma Rivas, Orandy y Verde (2016) llaman así a “la relación que guarda una planta, en cuanto a su clasificación taxonómica y los metabolitos secundarios que contiene” (p.4). Algunos son: terpenoides, esteroides, compuestos fenólicos-flavonoides, cumarinas, quinonas, lignanos, glicósidos cianogénicos, glicósidos cardiotónicos, iridoides, alcaloides, saponinas y sesquiterpenos. A continuación, se describirán los metabolitos de interés para el tamizaje fitoquímico.

Alcaloides.

Se definen como un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas nitrogenadas, son producidos y almacenados por cualquier parte de la planta. Poseen una estructura compleja y marcada acción farmacológica, pueden encontrarse como bases libres o formando sales. Las sales son en general solubles en agua, en tanto que las bases libres lo son en solventes orgánicos (Rivas, Orandy y Verde, 2016).

Flavonoides.

Martínez, Gonzáles, Culebras y Tuñón, (2002) describen a los flavonoides como pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño

producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, tiene además propiedades farmacológicas como actividad protectora hepática, antiinflamatoria, antialérgica, antibacteriana, antifúngica, antioxidante, cicatrizante, y hasta reducción de hiperpigmentación. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Están formados por un anillo de benceno (anillo A), una cadena lactónica, ya sea abierta o cerrada y otro anillo de benceno (anillo B), los dos anillos pueden tener uno o varios grupos o sustituyentes, como grupos hidroxilos, metoxilos o cadenas alifáticas. Se dividen en subgrupos como flavonas, flavonoles, flavanonas, chalconas e isoflavonoides.

Cumarinas.

Son productos naturales que pertenecen al grupo de compuestos conocidos como benzopironas, consistentes en un anillo bencénico unido a una pirona. Se caracteriza por tener una estructura cristalina e incolora. En las plantas se encuentran en tegumentos de las semillas, frutos, flores, raíces, hojas y tallos, aunque la mayor concentración se halla en general en frutos y flores; posee además propiedades antimicrobianas (Rejia, 2007).

Terpenos.

Taiz y Zeiger, (2006), enfatizan que el mayor grupo de productos secundarios son los terpenos; estos son generalmente insolubles en agua y sintetizados a partir de acetil CoA o de intermediarios glicolíticos. Se forman por la unión de elementos de cinco carbonos que tienen el esqueleto carbonado ramificado del isopentano (unidades de isopreno). De esta forma los monoterpenos contienen dos unidades C₅, sesquiterpenos tienen tres unidades C₅, los diterpenos tienen cuatro unidades C₅, los triterpenos tienen 30 carbonos. Los terpenos le brindan protección a la planta ya que funciona como una sustancia tóxica. (p. 536).

Taninos.

Isaza, (2007), los describe como: “Compuestos fenólicos solubles en agua, con pesos moleculares entre 500 y 3000, que además de dar las reacciones fenólicas usuales, tienen propiedades especiales tales como la habilidad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas” (p.13).

Son polímeros de polifenoles con 1 a 2% de hidróxidos fenólicos libres. El término tanino fue usado por primera vez para describir aquellos compuestos que podían convertir la piel animal en cuero. Estos compuestos interaccionan con las proteínas formando puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo fenólicos de los taninos y los sitios electronegativos de la proteína. Los taninos vegetales también sirven como defensas contra microorganismos (Taiz y Zeiger, 2006).

Antraquinonas.

De estructura quinónica. “Son un derivado antracénico de los acetatos y sikimatos, y que tienen propiedades laxantes, en grandes dosis puede funcionar como purgante” (Vanaclocha y Cañigual, 2003, p.33).

Almidón.

Mérida (s.f.) menciona que el almidón es la principal reserva de energía y de carbono de las plantas. Suministrando la energía y los esqueletos carbonados necesarios para el metabolismo de la planta durante los periodos de oscuridad, cuando la fotosíntesis está inactiva. La síntesis de almidón es un proceso coordinado que implica la intervención de diferentes actividades enzimáticas.

Saponinas.

Son esteroides glicósidos o derivados de triterpenoides, llamados así por sus propiedades semejantes a las del jabón. Cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el

azúcar), y forman una espuma cuando se las agita en agua. Las saponinas son tóxicas, y se cree que su toxicidad proviene de su habilidad para formar complejos con esteroides (Taiz y Zeiger, 2006).

Azúcares reductores.

Los azúcares reductores son aquellos azúcares que poseen su grupo carbonilo (grupo funcional) intacto, y que a través del mismo pueden reaccionar como reductores con otras moléculas que actuarán como oxidantes (Berg, Stryer y Tymoczko, 2007).

***Lippia alba* o Juanilama**

Figura 12. Fotografía de la planta *Lippia alba*



Nota: Elaboración propia.

La Juanilama o *Lippia alba* (Mill.) es una planta medicinal muy utilizada en Centro y Sur América por sus propiedades medicinales. “Se ha utilizado en el territorio nacional para el tratamiento de afecciones gastrointestinales, expectorante, febrífugo, astringente, antiséptico, antiinflamatorio, antibacteriano y emenagogo” (Ciccío y Ocampo, 2006. pp.149-154).

Generalidades

L.alba pertenece a la familia Verbenaceae; se le conoce popularmente como Juanilama, planta que se identifica por presentar diferencias en sus quimiotipos y fenotipos, así como una composición química diferente en dependencia de la ubicación geográfica, las características fisicoquímicas del suelo y el clima. (Ocampo, 1985)

En Costa Rica, según Ciccío y Ocampo, (2006), “hay dos variedades: una con un olor fragante (forma dulce) y otra con un olor sumamente fuerte y poco agradable (forma fuerte); cada una con condiciones climáticas diferenciadas, predominando la forma fuerte en el trópico seco y la forma dulce en el trópico húmedo” (pp. 149-154) .Las dos formas se diferencian además en el quimiotipo de sus aceites esenciales, predominando para la forma dulce el tipo carvona-limoneno.

Clasificación taxonómica

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Lippia alba*

Nombre Científico	<i>Lippia alba</i>
Nombre Común	Juanilama
Reino	Plantae
Familia	Verbenacea
División	Magnoliophyta

Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Género	<i>Lippia</i>
Especie	<i>alba</i>

Nota: Tomado de Cicció y Ocampo, 2006 (p.112).

Nombres comunes

Dentro de la denominación común que se le da a esta planta en distintos lugares tenemos: “juanilama, mirto, orozul, prontoalivio, quitadolor, hierba Louisa, anís de España, cidreira, guanislama, hierba maestra, hierba buena de castilla, hierva del negro, juanislama, mastranto, menta americana, orégano, pampa orégano, poleo silvestre, salva vida, salvia sija, salvia trepadora, salvia, sweet margon, toronjil, valeriana y white lippia” (Restrepo, Romeo y Fraume, 2005, p.202).

Descripción botánica y partes de la planta

Rodríguez (2007) describe la planta como:

Arbusto de 1 a 2 m de altura, muy puberulento, muy ramificado, ramas delgadas, largas y caídas, fuerte olor a limón; hojas opuestas, aovadas u oblongas, agudas, obtusas, rugosas en la parte superior; flores tubulares, brácteas puberulentas, ovadas, acumuladas, las inferiores son mucronadas, cabeza floral redondeada u oblonga, en pares, en pequeños tallitos en las hojas axilares corola color lila. (p. 109).

Farmacología de la planta

Como lo establece Hennebelle, Sahpaz, Henry, Bailleul, (2008), “las hojas de la planta presentan actividad como antiespasmódico, sedante, febrífugo, antiinflamatorio, analgésico, antidiarreico, antimicrobiano, anticonvulsivante y ansiolítico” (p.211). A su

vez reporta que el extracto alcohólico de las hojas presenta actividad antibiótica contra varias bacterias dentro de las cuales se encuentra *Staphylococcus aureus*.

Sena, Melo, Saraiva, Goncalves, Caetano, y Haroudo, (2006), mencionan que la decocción y la infusión de las hojas de *L. alba* se utilizan actualmente en la medicina popular para combatir diversas enfermedades. Los extractos se utilizan en el tratamiento de enfermedades gástricas, diarrea, fiebre, tos, asma y como fármaco calmante, además, muchos autores han confirmado la actividad antibacteriana de *L. alba* contra diversas bacterias.

Fitoquímica de la planta

García, Díaz, Oyola, Brango Castaño y Maldonado, (2014), realizaron un estudio fitoquímico, en donde reportan la presencia de: Flavonoides, Cumarinas, Taninos y Triterpenos. Mencionan citando a Medina et al. (2011), que la presencia de saponinas y alcaloides son metabolitos circunstanciales que dependen de muchos factores, por ejemplo, las condiciones medio ambientales de la planta.

Chies, Branco, Scola, Agostini, Gower y Salvador, (2013) informaron que la planta tiene un contenido fenólico importante y actividad antioxidante, además que los principales flavonoides presentes en la planta *L. alba* son: epigenina, luteolina, naringina y rutina.

López, Stashenko y Fuentes, (2011) explican que la planta presenta alto contenido de terpenoides dentro de los cuales se tienen: carvona, geraniol, limoneno, citral y alcohol perílico y que bajo las condiciones de su estudio éstos componentes le proporcionan características genotóxicas a la planta.

Martínez, Soto, Almeida, Hermosilla y Martínez, (2012), determinan que las cumarinas y azúcares reductores, están directamente relacionados con las propiedades antibacterianas y en específico, con las propiedades antiestafilocócicas, que pueden mostrar las plantas que posean este tipo de metabolitos.

Extractos

Martínez (2016) los define como formas farmacéuticas líquidas constituidas por los principios activos solubles contenidos en una porción medicinal de tejidos vegetales o animales y separados del residuo de la extracción.

Métodos de extracción

El proceso mediante el cual se le da tratamiento a una planta con un disolvente adecuado se denomina extracción. Popularmente los principios activos de la raíz, hojas, flores, tallos, son extraídos de manera sencilla por medio de una infusión o decocción. En cambio, para analizar propiedades medicinales de una droga vegetal se necesitarán técnicas un poco más complejas, que me permitan tener métodos reproducibles con cuantificación de principios activos. Por ejemplo: Maceración, Lixiviación, Soxhlet y Destilación por rotavapor. Se describirán a continuación algunas de ellas.

Maceración

Bonatti (1991) explica que este es un “método de extracción sólido-líquido donde el material vegetal que se pretende extraer contiene compuestos solubles en el líquido de extracción” (p. 106). El material vegetal fresco o seco, es molido o se corta en trozos pequeños y se coloca en recipientes adecuados con el solvente seleccionado por polaridad. Dentro de los disolventes se tiene: hexano, cloroformo, metanol y etanol.

Los solventes se podrán colocar en reposo o con agitación continua, a temperatura ambiente durante 5 días cada extracción. Otra forma de obtenerlo es colocando una mezcla de solventes: metanol: cloroformo: hexano en la proporción 7:2:1, obteniendo un extracto en forma directa.

Destilación

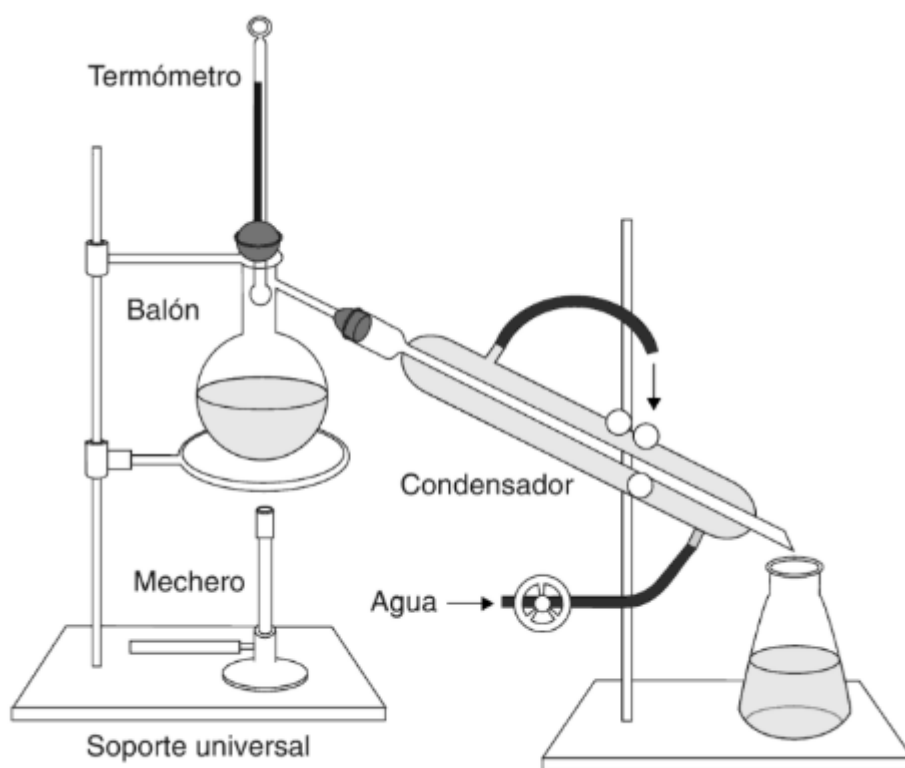
Según la Real Academia Española RAE, la destilación se define como la técnica para separar por medio del calor, en alambiques u otros vasos, una sustancia volátil de otras más fijas, enfriando luego su vapor para reducirla nuevamente a líquido y recolectarla.

Por su parte Doria, Ibáñez y Mainero, (2009), la describen como un método para separar un componente volátil de una mezcla de otros componentes, volátiles o no. Consiste en calentar un líquido hasta su punto de ebullición, condensar el vapor por enfriamiento y recibir el líquido condensado en otro recipiente. Hay cuatro técnicas básicas de destilación: simple, fraccionada, por arrastre de vapor y a presión reducida. Se describirán a continuación dos de las técnicas de relevancia en la investigación.

Destilación simple.

Este tipo de destilación se utiliza para separar un componente líquido de otros no volátiles, o para separar componentes que tienen diferencias en el punto de ebullición de 30-40 ° C. La sustancia se coloca en un balón de destilación y se le aplica calor, la sustancia con el punto de ebullición menor se evapora primero, el vapor va hacia el condensador donde se enfría y se separa (Doria, Ibáñez y Mainero, 2009).

Figura 13. Partes que integran un equipo de destilación simple



Nota: Tomado de Osorio, 2009, p.79

Destilación a presión reducida (Rotavapor)

Según Casado, Durán, Miró y Paredes, (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” (p.186).

En este tipo de destilación se utiliza el rotavapor como equipo para generar el vapor y lograr la destilación; sin embargo, para conseguir la ebullición además del aporte de calor, se utiliza una bomba de vacío que reduce la presión en el interior del matraz de destilación. Combinando los parámetros de presión y temperatura, es posible

destilar sustancias con el paso del estado líquido al gaseoso y utilizando una temperatura menor de la que sería necesaria bajo condiciones de presión atmosférica.

Figura 14. Equipo de destilación por rotavapor



Nota: Tomado de <https://www.southernlabware.com/yamato-re301-aw-rotary-evaporator-bm-500-water-bath-4l-glassware-a-115v-12a.html>

Técnicas de identificación y cuantificación de fitoquímicos

García, Gavilanes, Martínez, Montero, Oñaderra y Vivanco (1999) explican que una técnica de análisis es un proceso científico que ha demostrado utilidad para conseguir datos o información acerca de la composición de las sustancias; entre ellas tenemos la espectrometría de infrarrojo, la espectrometría de masas y la cromatografía de gases.

Existen diferentes métodos cualitativos y cuantitativos para la detección de metabolitos provenientes de plantas. Para el desarrollo del siguiente trabajo se describirán los siguientes métodos:

Métodos químicos.

Tamizaje fitoquímico.

Aunque en la actualidad existen técnicas avanzadas para determinar la naturaleza química de los metabolitos de las plantas, los ensayos fitoquímicos tradicionales aún constituyen una forma confiable de realizar un análisis cualitativo de los extractos, ya que arrojan información preliminar acerca de su composición. Cuando se investigan muchos extractos de plantas, esto constituye una ventaja ya que permite descartar todas aquellas especies que no tienen potencial para ser utilizadas para algún beneficio farmacológico, quedando solamente las que sí lo tienen.

Según Prashant et al. (2011) plantean que el tamiz fitoquímico consiste en la obtención de extractos de plantas con solventes apropiados, tales como agua, acetona, alcoholes, cloroformo y éter. Otro solvente, el diclorometano, se usa específicamente para la extracción de terpenoides. Posterior a la extracción, se llevan a cabo reacciones de coloración, las cuales son reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Algunas de las reacciones evalúan grupos de sustancias y otros la presencia de otros compuestos como ácidos grasos, azúcares reductores, polisacáridos y mucílagos (Sharapin, 2000).

Métodos instrumentales.

Cromatografía de capa fina (CCF).

Según Beyer y Walter (1987) la cromatografía es un proceso de separación fiable de trabajo en el laboratorio, se emplea con una placa cromatográfica o como lo describen los autores: “una lámina metálica, que se cubre con la película de unos 250 μm de espesor de un adsorbente (gel de sílice y óxido de aluminio, entre otros)” (p.9).

Describen que se sitúa en el extremo inferior de la disolución de las sustancias que se van a separar. La separación se lleva a cabo en un sistema cromatográfico que contendrá: eluyente hasta una altura de 0.5 cm.

La mejor ventaja de éste método, radica en la gran capacidad de separación, ya que permite la separación de vitaminas, terpenos, esteroides y pigmentos y la rapidez del proceso. Solamente requiere de 10 a 30 minutos. Es importante mencionar que esta técnica puede considerarse Químico-instrumental, pues hace uso de compuestos químicos y también de instrumentos reveladores como la lámpara de UV y el calentador.

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

En el siguiente capítulo se presenta la metodología realizada para elaborar la investigación y la recolección de los datos. Se analizará el método que conlleva, el tipo de investigación, las fuentes de información utilizadas, las categorías de análisis, variables para la obtención de los extractos así como la validez del trabajo.

Enfoque

La presente investigación tendrá un enfoque cuantitativo, el cual, Hernández, Fernández y Baptista (2014) lo describen de la siguiente manera: “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” (p.4).

Bajo este enfoque se realizará un experimento en el laboratorio, donde se pretende demostrar la hipótesis establecida por medio de la medición numérica y el análisis. De esta forma, se evaluará la capacidad antibacteriana *in vitro* de los extractos acuosos y metanólicos de las hojas de *Lippia alba* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

Método de la investigación

Según Hernández, Fernández y Baptista (2014) “el término experimento tiene al menos dos acepciones, una general y otra particular” (p.129). Se refiere a elegir o realizar una acción y después, observar las consecuencias. La esencia de esta concepción de experimento es que requiere la manipulación intencional de una acción para analizar sus posibles resultados.

Debido a lo anterior se puede fundamentar que la presente investigación sigue un método experimental; del cual, la parte de extracción y del tamizaje fitoquímico, se llevará a cabo en los laboratorios de Química de la Universidad Internacional de las Américas (UIA) y la evaluación microbiológica *in vitro* de los extractos, se llevarán a cabo en el Laboratorio de Microbiología Analítica.

Variables

Según Hernández et al. (2014):

Una variable es una propiedad que puede fluctuar y cuya variación es susceptible de medirse y observarse. Ejemplos de variables son el género, la presión arterial, el atractivo físico, el aprendizaje de conceptos, la religión, la resistencia de un material, la masa, la personalidad autoritaria, la cultura fiscal y la exposición a una campaña de propaganda política. El concepto de variable se aplica a personas y otros seres vivos, objetos, hechos y fenómenos, los cuales adquieren diversos valores respecto de la variable referida. Por ejemplo, la inteligencia, ya que es posible clasificar a las personas de acuerdo con su inteligencia; no todas las personas la poseen en el mismo nivel, es decir, varían en inteligencia.

Las variables adquieren valor para la investigación científica cuando llegan a relacionarse con otras variables, es decir, si forman parte de una hipótesis o una teoría. En este caso, se les suele denominar constructos o construcciones hipotéticas (p.105).

Tabla 3. Variables de la investigación

Objetivo	Variable o Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Instrumentalización
Obtener los extractos acuosos y metanólicos de la planta <i>Lippia alba</i> .	Extractos	Resultado de separar una mezcla de sustancias, por disolución de cada componente. Se pone en contacto directo el material orgánico con una fase líquida, de uno o varios disolventes. (Martínez,2016,p.8)	Extracción acuosa y extracción metanólica mediante maceración.	Maceración por infusión acuosa y Maceración +destilación en rotavapor para extracto Metanólico.
Caracterizar los principales componentes del extracto de <i>Lippia alba</i> mediante métodos químicos y químico-instrumentales.	Metabolitos activos	Productos de reacciones catalizadas por enzimas que ocurren dentro de las células para la obtención de energía, reproducción y reparación. (Harris, E. s.f.)	Cromatografía de capa fina y Pruebas cualitativas de identificación de grupos funcionales.	Cromatografía de capa fina Lámpara de UV-VIS Reactivos y tubos de ensayo para llevar a cabo las pruebas de grupos funcionales.
Evaluar y comparar la actividad antibacteriana del extracto frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , por medio de la medición de halos de inhibición.	Actividad antibacteriana	Alteraciones en la estructura o funcionamiento de una bacteria, consecuencia del uso de agentes químicos externos los cuales alteran el crecimiento.	Medir los halos de inhibición del extracto en el medio de cultivo Müller-Hinton, así como también un control positivo de Mupiral y negativo con los disolventes.	Placas petri, medios de cultivo preparados, incubadora, cristalería, regla de medición, cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> .

Nota: Elaboración propia.

Instrumentos y técnicas

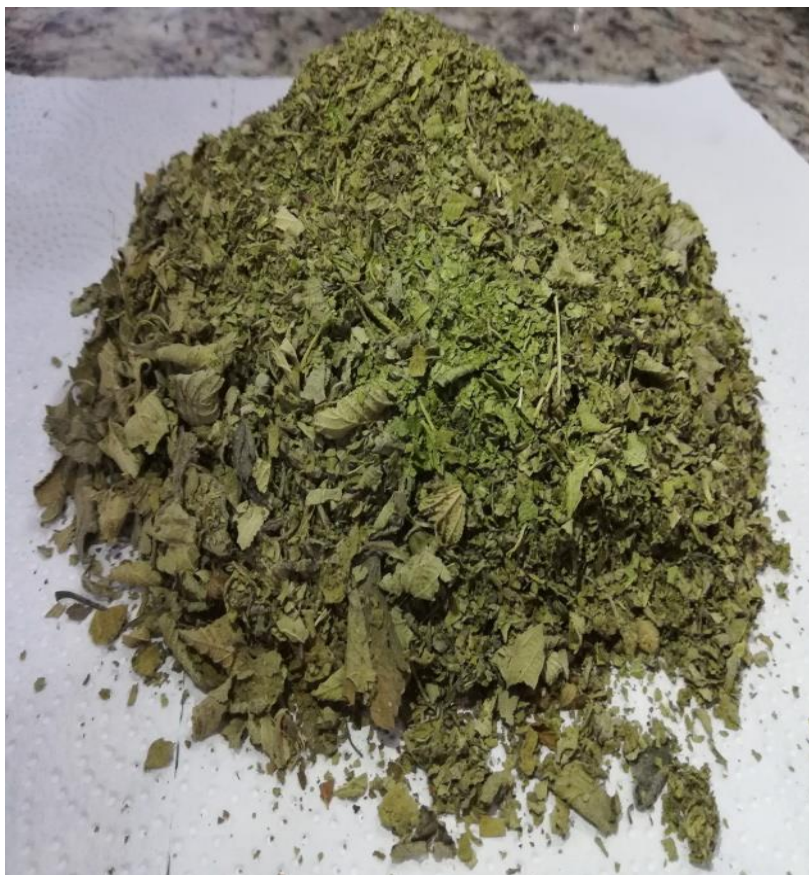
En la elaboración del siguiente apartado, se describen métodos, técnicas e instrumentos por utilizar en la realización de esta investigación, de esta forma se explicará el “cómo” del estudio. Los métodos se desarrollaron en las instalaciones de la Universidad Internacional de las Américas y en el Laboratorio de Microbiología Analítica ubicado en Desamparados, bajo la supervisión del Dr. Esteban Mena Jara.

Procesos de recolección de *Lippia alba*

Previamente a la recolección de las hojas de *Lippia alba*, una rama del material natural fue llevada a la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica para una primera identificación de la planta. El botánico Mario Blanco comprobó la identidad y dio una breve descripción de la misma. Recomendó que la recolección se hiciera en la mañana, antes del periodo comprendido entre 11:00 y 2:00 pm, ya que durante estas horas el sol emite radiación intensa; al aumentar el calor y la luz, la planta utiliza los nutrientes generados para el dinamismo fotosintético. De recolectarse durante este periodo, se corre el riesgo de que los componentes requeridos para el estudio no estén presentes, lo que produciría variaciones en los análisis microbiológicos.

Sobre la base de las consideraciones anteriores se obtuvo el material vegetal recolectado de un terreno ubicado en El Carmen, Nicoya, Guanacaste durante el mes de Mayo del 2019. Las hojas frescas fueron sometidas a un proceso de secado al aire libre bajo el sol, durante cuatro días; una vez seco, se guardó en papel toalla y bolsas herméticas, hasta el momento de la extracción. En la figura 15 se observan las muestras de material por tratar.

Figura 15. Hojas secas de la planta *Lippia alba* para la realización del extracto



Nota: Elaboración propia.

Extracciones de las hojas de *Lippia alba*

Materiales y equipo para la obtención de los extractos metanólicos y acuosos de *Lippia alba*

Balanza granataria marca Bayar, modelo WTB2000, capacidad 2000 ± 0.01 g

Calentador agitador marca Corning, modelo PC-420D

Sistema de filtración de bomba de vacío Zeny, modelo FHI200(X)

Colador

Büchner

Kitasato

Papel filtro marca Fisher, cualitativo P4

Frascos ámbar con cierre hermético

Probetas

Beaker

Agitador de vidrio

Espátulas acanaladas grandes

Reactivos

Metanol al 99%

Agua destilada

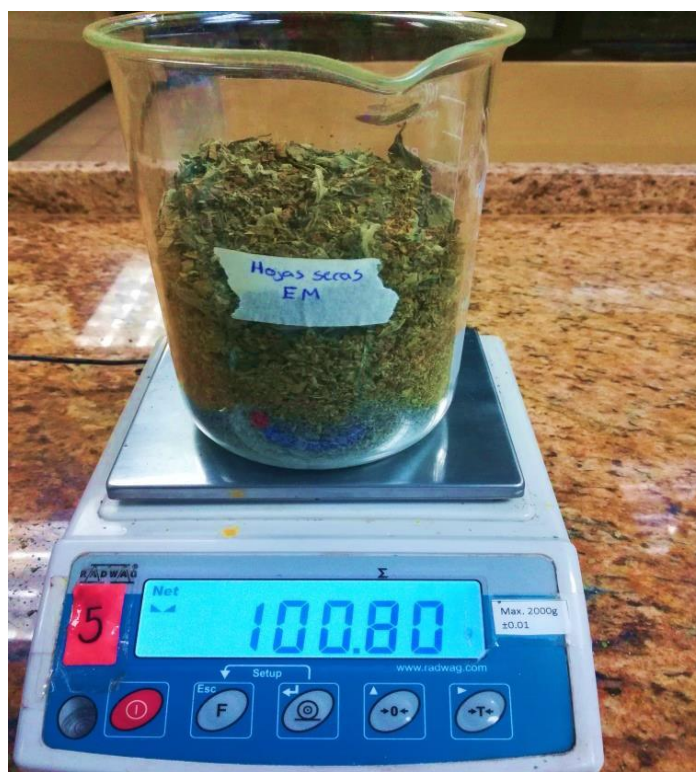
Hojas secas de *Lippia alba* finamente trituradas: 100g para cada extracto

Se tomaron las hojas verdes y frescas de *Lippia alba* y se limpiaron con papel toalla húmeda, se sacaron al aire libre para someterlas a un proceso de secado durante cuatro días. Cuando las hojas estuvieron secas, se empacaron debidamente para ser trasladadas a los Laboratorios de Química de la Universidad Internacional de las Américas.

Una vez en el laboratorio, se procedió a pesar la totalidad de la muestra recolectada en una balanza marca Bayar de 2000.00 \pm 0.01g y se obtuvo un total de 209.58 g que se dividieron en 2 partes. De esta forma 100 g de la muestra se utilizaron

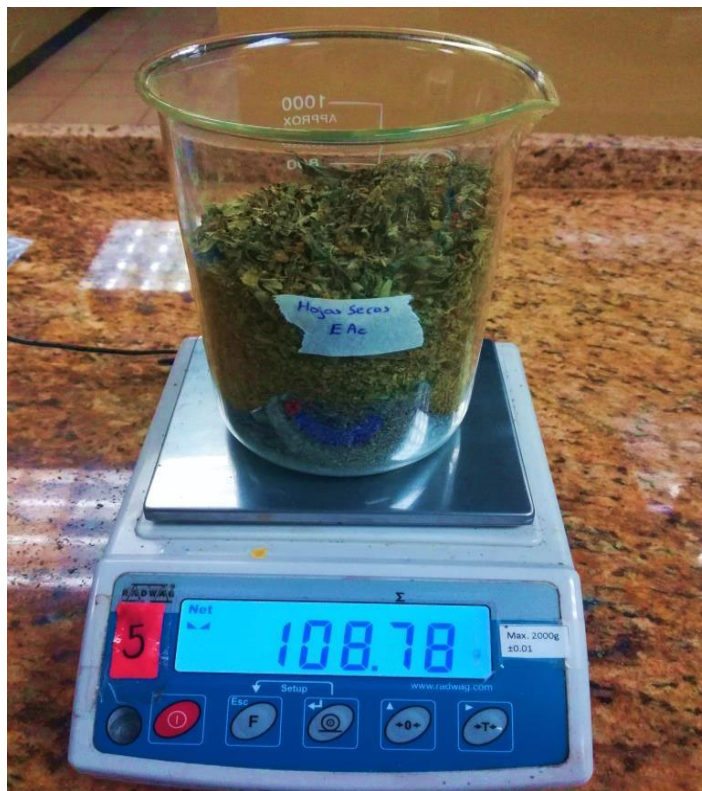
en la extracción metanólica y otros 100g en la extracción acuosa. El material sobrante se almacenó en papel toalla dentro de una bolsa con cierre hermético.

Figura 16. Material seco de hojas de *Lippia alba* para la extracción con metanol



Nota: Elaboración propia.

Figura 17. Material seco de hojas de *Lippia alba* para la extracción con agua



Nota: Elaboración propia.

Extracciones metanólicas por técnica de maceración de las hojas de *Lippia alba*

En un frasco grande color ámbar con cierre hermético, se colocó 100g de hojas de *Lippia alba* finamente trituradas y se le agregó 200 mL de una dilución de metanol-agua 70:30, con el propósito de mantener una proporción de una parte de soluto por dos partes de disolvente. Para la preparación de la dilución Metanol-agua 70:30, se mezclaron 140 mL de metanol y 60 mL de agua.

El frasco se cerró adecuadamente y a pesar de ser un envase ámbar, se decidió cubrir el frasco con papel aluminio. Se dejó macerar la muestra en un lugar seco, oscuro y a temperatura ambiente durante ocho días. Concluido el proceso de maceración, con un colador se procedió a colar la muestra y de esta manera separar el extracto de las

hojas. El extracto se filtró con un sistema de filtración integrado por: Büchner, kitasato, papel filtro marca Fisher, cualitativo P4 y una bomba de vacío marca Zeny.

Figura 18. Proceso de maceración y posterior filtración al vacío en desarrollo del extracto metanólico de *L.alba*



Nota: Elaboración propia.

Destilación del extracto metanólico

Se recolectaron cerca de 195 mL de extracto metanólico filtrado al vacío, a los cuales se les realizó el proceso de destilación por rotavapor. Se colocó en un sistema de rota vapor, para lograr la eliminación del metanol. Durante 2h y 30min la temperatura se mantuvo en 64°C hasta observar que el condensador ya no destilaba más metanol.

Figura 19. Método de destilación del extracto metanólico acoplado al rotavapor



Nota: Elaboración propia.

Del balón se recogieron cerca de 56mL de un líquido oscuro que se colocó en un envase ámbar, de los cuales, 3mL fueron utilizados para la prueba de sólidos disueltos y los restantes 53mL se almacenaron para posteriormente ser sometidos a pruebas microbiológicas. Se cubrió el envase con papel aluminio y se mantuvo en refrigeración (4 °C) hasta el momento de ser utilizado, el líquido tenía un aspecto entre verde musgo y café oscuro.

Extracciones acuosas por técnica de infusión de las hojas de *Lippia alba*

En un beaker, se colocó 100g de hojas de *Lippia alba* finamente trituradas y se le adicionó 200mL de agua destilada recién hervida a 100°C durante 5 minutos. La cantidad de disolvente procuró mantener la relación de 1:2 g/mL soluto-disolvente. Cabe destacar que el extracto acuoso se obtuvo a partir de una infusión del material botánico y

no durante un proceso de decocción. Además, al tratarse de agua, la infusión no se realizó al mismo tiempo que la maceración; la infusión se realizó cercana al análisis microbiológico de los extractos para así evitar la posible contaminación de la muestra.

La infusión se dejó reposar durante una hora y se tapó el beaker con un vidrio reloj, el extracto color verde oscuro, fue separado de las hojas utilizando un colador y posteriormente se filtró al vacío con ayuda de una bomba marca Zeny, Büchner, kitasato y papel filtro marca Fisher, cualitativo P4. De los 196 mL recolectados aproximadamente, 3 mL fueron utilizados para la prueba de sólidos disueltos y los restantes 193 mL se trasladaron a un frasco color ámbar con cierre hermético. Se cubrió el frasco con papel aluminio y se mantuvo en refrigeración a 4°C para posteriormente ser utilizado en las pruebas microbiológicas.

Figura 20. Extracto acuoso de las hojas de *Lippia alba* durante el proceso de filtración



Nota: Elaboración propia.

Sólidos disueltos

Esta prueba fue realizada por triplicado tanto a los extractos acuosos como a los metanólicos dispuestos para la misma.

Materiales y métodos.

Pipeta de 1mL

Viales con tapa

Beaker de 50mL

Vidrio reloj

Estufa DIGISYSTEM, modelo DN-500

Balanza analítica ADAM Nimbus, modelo NBL-254e, capacidad 250g \pm 0.0001g

Reactivos.

Extracto acuoso de las hojas de *L.alba*

Extracto metanólico concentrado de las hojas de *L.alba*

Procedimiento.

- 1- Se encendió la estufa a 105°C para que al momento en que se realizó la prueba ya se encontraba en la temperatura necesaria.
- 2- Se rotularon 3 viales para el extracto acuoso como A1, A2 y A3.
- 3- De la misma forma se rotularon 3 viales para el extracto metanólico como M1, M2 y M3.
- 4- Cada uno de los viales se pesaron vacíos y con tapa en la balanza analítica. Se registró el dato.

- 5- Se tomó con pipeta 1mL de cada extracto y se colocaron en los viales correspondientes.
- 6- Se tomaron las masas de cada vial + extracto y se anotaron los resultados.
- 7- Los viales se colocaron sin tapa en dos beaker para ser introducidos en la estufa a 105°C durante tres horas.
- 8- Se dejaron secar las muestras.
- 9- Una vez secas, se dejaron enfriar a temperatura ambiente tapando ambos beaker con el vidrio reloj.
- 10- Ya a temperatura ambiente, se les colocaron las tapas a cada vial y se procedió a pesarlos en la balanza analítica. Se registró el dato.
- 11- Con las masas obtenidas anteriormente, se procedió a realizar los cálculos para obtener la masa de sólidos disueltos en cada extracto.

Figura 21. Viales para la determinación de sólidos disueltos de los extractos acuosos y metanólicos concentrados de las hojas de *Lippia alba*



Nota: Elaboración propia.

Pruebas de caracterización Fitoquímica

En la caracterización cualitativa de los principales componentes fitoquímicos de las hojas de *Lippia alba*; se decidió realizar un tamizaje completo a partir de un extracto etanólico al 70% que fue tratado para la eliminación completa del etanol, posterior a la extracción.

Extracción etanólica por técnica de maceración de las hojas de *Lippia alba*

En un frasco grande color ámbar con cierre hermético, se colocó 100g de hojas de *Lippia alba* finamente trituradas y se le agregó 200 mL de una dilución de etanol-Agua 70:30, con el propósito de mantener la proporción de una parte de soluto por dos partes de disolvente. Para la preparación de la dilución etanol- agua 70:30, se mezcló 140 mL de etanol y 60 mL de agua.

El frasco se cerró adecuadamente y se cubrió con papel aluminio. Se dejó macerar la muestra en un lugar seco, oscuro y a temperatura ambiente durante ocho días. Concluido el proceso de maceración se procedió a colar la muestra con un colador y de esta manera separar el extracto de las hojas. El extracto se filtró con un sistema de filtración con bomba de vacío descrito anteriormente.

Destilación del extracto etanólico

Se recolectó aproximadamente 190mL del filtrado, a los cuales se les realizó el proceso de destilación por rotavapor. Se colocó en un sistema de rotavapor, para lograr la eliminación del etanol. Durante 2h y 30min la temperatura se mantuvo en 64°C y al cabo de este periodo se logró observar que el condensador ya no destilaba más etanol.

Del balón se recogió cerca de 51mL de un líquido oscuro que se colocó en un envase ámbar, para posteriormente ser sometido a tamizaje fitoquímico. Se cubrió el envase con papel aluminio y se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta el momento de ser utilizado, el líquido tenía un aspecto entre verde musgo y café oscuro.

Las pruebas de identificación se realizaron en el Laboratorio de Química de la Universidad Internacional de las Américas. Varias de éstas requerían el uso de reactivos químicos, solventes y preparados de alta toxicidad, los mismos fueron manipulados dentro de la cámara de gases Biobase, modelo FHI 200 (X).

Figura 22. Algunos reactivos utilizados durante la caracterización fitoquímica del extracto metanólico de *L.alba* dentro de la cámara de gases y suministrados por el Laboratorio de Química, Universidad Internacional de las Américas (UIA)



Nota: Elaboración propia.

Caracterización fitoquímica del extracto etanólico de *L.alba*

En la realización del tamizaje fitoquímico, es importante mencionar que se siguió el procedimiento descrito en el Manual de Laboratorio de Farmacognosia de la Universidad Internacional de las Américas, elaborado por el Licenciado Javier Rodrigo Alpízar Cordero, quien toma como referencia a Domínguez (1973).

Materiales y equipo.

Embudo separador

Aro metálico

Goteros

Capilares

Vidrio reloj

Espátulas

Pizeta

Soporte Universal

Erlenmeyer de 250 mL

Calentador-agitador Corning, modelo PC-420D

Beaker 500 mL, 250 mL, 100 mL y 50mL

Tubos de ensayo

Papel filtro

Lámpara UV-Vis Cole-Parmer, longitud de onda 254 nm y 365 nm

Cromatoplasmas TLC Sílica Gel 60 F₂₅₄

Capilla extractora Biobase, modelo FHI 200 (X)

Reactivos

Éter etílico

HCl 2%

Reactivo Dragendorff

Metanol

Virutas de Magnesio

HCl concentrado

KOH 0.5 mol/L

Cloroformo

Anhídrido Acético

Ácido Sulfúrico concentrado

Hidróxido de Amonio 25%

FeCl₃ 1%

Hexano

Acetato de Etilo

Reactivo de Vainillina 1%

Yodo metálico

Etanol

Reactivo de Lugol

Reactivo de Benedict

NaOH 10%

Extracto etanólico concentrado de las hojas secas

Extracción

- 1- Se tomó 50mL del extracto etanólico concentrado dispuesto para el análisis y se colocó en un embudo separador, se agregó 25mL de éter etílico, agitando levemente y liberando el gas de forma constante mediante la llave del embudo. Se logró observar que una vez equilibradas las presiones ya no salió más gas.
- 2- Se agitó vigorosamente, asegurándose una buena mezcla entre la fase etérea y la fase acuosa.
- 3- Se colocó el embudo de separación en el soporte y se retiró la tapa del embudo.
- 4- Se dejó reposar el sistema hasta que se observó una división clara de dos fases. La fase más densa, en este caso el agua, se observó en el fondo del embudo y la fase menos densa en la superficie, en este caso el éter etílico.
- 5- Se recolectó las dos fases en recipientes diferentes, la fase más densa se retiró primero por abajo, posteriormente se retiró por la boca superior del embudo el extracto etéreo.
- 6- Se rotuló ambos recipientes, uno como extracto etéreo y otro como extracto acuoso.
- 7- Se colocó nuevamente el extracto acuoso en el embudo separador y se agregó 25mL de éter etílico, se repitió el procedimiento descrito anteriormente. El proceso de adición de 25mL de éter se realizó 4 veces más hasta que se observó ausencia de color en el extracto etéreo.

- 8- El extracto acuoso se guardó en un frasco ámbar y en el refrigerador, ya que es propenso al crecimiento de microorganismos; de igual forma el extracto etéreo se almacenó en un frasco ámbar pero a temperatura ambiente.

Extracto etéreo

Una vez que se requirió el uso del extracto etéreo, fue sometido a los siguientes puntos:

- 1- Se concentró el extracto hasta un volumen no mayor de 30mL.
- 2- Para esto se colocó el extracto en baño maría en la capilla y se cuidó que la temperatura no sobrepasara los 36.4°C.
- 3- El extracto se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se le realizaron las diferentes pruebas de identificación de metabolitos secundarios.

Métodos Químicos utilizados en la caracterización de componentes.

Prueba de identificación de alcaloides (Dragendorff).

- 1- Se tomó 4mL del extracto etéreo y se colocó en un tubo de ensayo.
- 2- Se evaporó completamente en un baño maría. Se debe tener cuidado con la temperatura del baño para que el extracto no suba por el tubo de ensayo y así no tener pérdida del metabolito.
- 3- Se disolvió el residuo en 3mL de HCl al 2%.
- 4- Se agregó, deslizado a las paredes del tubo de ensayo, 3 gotas del reactivo de Dragendorff.
- 5- Se observó si hubo cambio de coloración, formación de precipitado, turbidez... etc.

Prueba de identificación de flavonoides (Shinoda).

- 1- Se tomó 4mL del extracto etéreo y se colocó en un tubo de ensayo.
- 2- La muestra se evaporó por completo en baño maría.
- 3- Se agregó 2mL de metanol para disolver el residuo.
- 4- En baño maría se calentó la muestra y se agregó una pequeña punta de espátula de limaduras de Magnesio.
- 5- Una vez en la capilla de extracción se le agregó 1mL de HCl concentrado y se observó un burbujeo violento.
- 6- La muestra se observó para determinar si hubo cambio de coloración, formación de precipitado, turbidez.

Prueba de identificación de cumarinas (KOH).

- 1- Se tomó 4mL del extracto etéreo y se colocó en un tubo de ensayo.
- 2- Se evaporó completamente en baño María.
- 3- Se disolvió el residuo en 1mL de agua hirviendo.
- 4- Con un capilar se aplicó dos gotas en un papel de filtro (las gotas deben estar bastante separadas).
- 5- Se utilizó lámpara UV a una longitud de onda de 366 nm.
- 6- Se colocó el papel de filtro debajo de la lámpara apuntando a una de las muestras anteriormente aplicadas.
- 7- Sobre la muestra se aplicó una gota de KOH 0,5 mol/L.
- 8- Se observó para determinar si hubo cambio de coloración.

Prueba de identificación de triterpenos (Lieberman Buchard).

- 1- Se colocó 4mL del extracto etéreo en un tubo de ensayo.
- 2- Se evaporó completamente en baño María.
- 3- Se trasladó el tubo a la capilla de extracción y se disolvió el residuo en 1mL de CHCl₃ (cloroformo).
- 4- Se adicionó al tubo de ensayo 1mL de anhídrido acético y se agitó bien

- 5- Posteriormente se inclinó el tubo y se agregó lentamente 3 gotas de H_2SO_4 concentrado por las paredes del tubo para no agitar la muestra.
- 6- La muestra se observó para determinar si hubo cambio de coloración, formación de precipitado o turbidez.

Prueba de identificación de antraquinonas (Bornträger-Kraus).

- 1- Se tomó 4mL del extracto etéreo y se colocó en un tubo de ensayo.
- 2- Se evaporó completamente la solución en un baño María y se observó un residuo.
- 3- Se disolvió el residuo en 1mL de NH_4OH al 25%.
- 4- La muestra se observó para determinar si hubo cambio de coloración.

Prueba de identificación de taninos.

- 1- Se tomó 4mL del extracto etéreo y se colocó en un tubo de ensayo.
- 2- Se evaporó completamente el disolvente en un baño María y se observó un residuo.
- 3- Se disolvió el residuo en agua caliente y se adicionó cinco gotas de $FeCl_3$ al 1%.
- 4- La muestra se observó para determinar si hubo cambio de coloración.

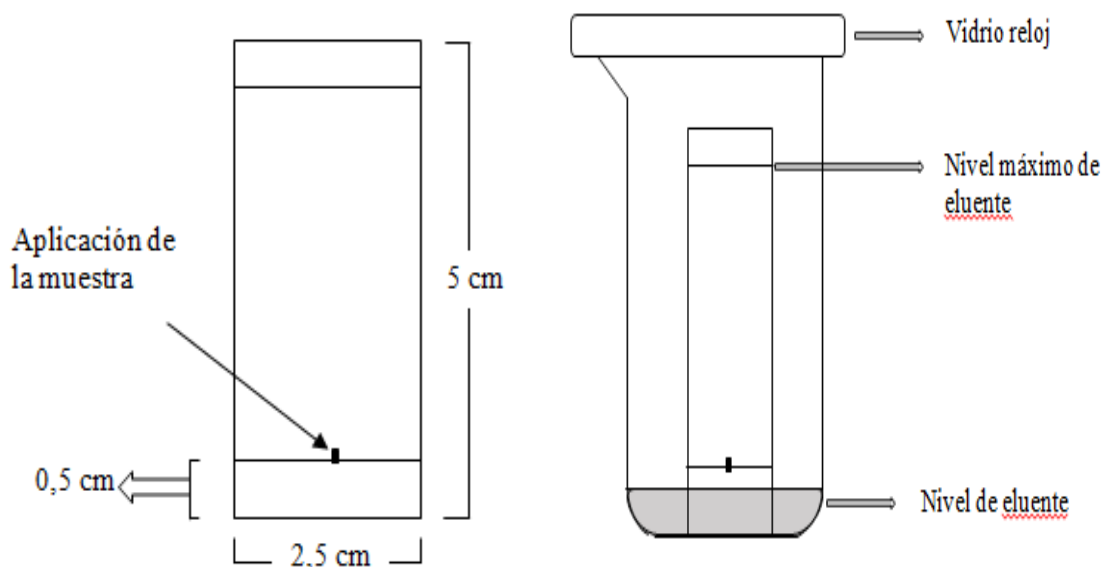
Método Químico-Instrumental utilizado en la caracterización de componentes.

Cromatografía de capa fina TLC para identificación de terpenos.

- 1- Para la realización de esta prueba se tomaron 4 placas cromatográficas cuya fase estacionara debe ser silica gel con fluorescencia a 254nm (TLC silica gel F₂₅₄). Se ajustó a la medida 5 x 2,5 cm. Se trazó una línea en la parte superior e inferior desde los bordes a 0.5 cm y se colocó un punto en la parte central e inferior donde se realizó la aplicación de la muestra. (Ver figura 23).

- 2- Se tomó con un capilar la muestra del extracto etéreo y se aplicó una pequeña cantidad en tres de las placas cromatográficas de capa fina, luego se dejó evaporar el disolvente.
- 3- Se procedió a la elaboración del eluyente o la fase móvil en la cual se colocó 27mL de Hexano y 3mL de acetato de etilo para su uso por triplicado.
- 4- Se armó el sistema cromatográfico, tal y como se muestra en la figura 23. Se tuvo el cuidado de que la cantidad de eluyente que se agregó en el sistema no estuviera por encima del punto de aplicación de la muestra. Para el ajuste, se utilizó la placa cromatográfica extra, elaborada con anterioridad, la cual no contenía muestra.
- 5- Una vez ajustados los tres sistemas se colocaron las placas y se observó el avance de la fase móvil.
- 6- Se retiró la placa cuando el eluyente llegó a la marca de 0.5 cm de la parte superior.
- 7- Se dejó secar bien todas las placas y una se observó con la luz UV a 254 y 365nm.
- 8- La segunda placa se reveló con el reactivo vainillina- ácido sulfúrico en etanol, se agitó bien y con un gotero se colocó varias gotas del reactivo hasta que la placa quedó bien impregnada. Se realizó desde la parte superior de la placa y se dejó correr en línea recta. Se dejó secar.
- 9- Esta placa se quemó en el calentador-agitador con la parte metálica en contacto con el calentador y se retiró cuando la coloración se observó intensa.
- 10- La tercer placa se reveló utilizando Yodo metálico, se observó el resultado y se tomó nota.

Figura 23. Dimensiones de la placa y sistema cromatográfico para identificación de terpenos en cromatografía de capa fina



Nota: Elaboración propia.

Extracto acuoso (AQ1)

Del refrigerador se sacó la muestra acuosa y se separó en dos recipientes pequeños color ámbar, en volúmenes iguales rotulados como AQ₁ y AQ₂ en el refrigerador.

Métodos Químicos utilizados en la caracterización de componentes.

Prueba para determinación de almidón (Lugol).

- 1- Se tomó 2mL de AQ₁ y se colocó en un tubo de ensayo.
- 2- Se agregó gota a gota el Lugol esperando que la muestra se mostrara azul, si no hay cambio de color se añade más hasta un máximo de 2mL del reactivo.
- 3- Se observó el cambio o la usencia de cambio en la coloración.

Prueba para determinación de saponinas (Espuma).

- 1- Se agregó 3mL de AQ₁ a un tubo de ensayo, se tapó el tubo de ensayo con papel parafina, se agitó por un minuto y se dejó reposar en la gradilla por 20 min.
- 2- Se observó si hubo presencia de espuma en la muestra.

Prueba para determinación de azúcares reductores (Benedict).

- 1- Se tomó 3mL de la muestra y se colocó en un tubo de ensayo.
- 2- Se agregó 10 gotas del reactivo rotulado como Benedict.
- 3- En baño María, se agitó, se calentó la muestra y se esperó de 5 a 10 min.
- 4- Se observó si hubo presencia de un precipitado.

Prueba de taninos y Prueba de Dragendorff.

Para estas pruebas se siguió el procedimiento que fue descrito anteriormente pero utilizando como muestra el extracto AQ₁.

Extracto acuoso AQ₂

- 1- Se sacó del refrigerador la muestra rotulada como AQ₂.
- 2- Se agregó 10mL de HCl 3M, se agitó bien y se calentó por 20 min.
- 3- Se dejó enfriar a temperatura ambiente.
- 4- La muestra se colocó fría en un embudo separador y procedió a realizar de 3 a 5 extracciones con éter etílico de igual manera como se realizó al extracto original. Para esto se siguió el mismo procedimiento denominado Extracción.
- 5- Se separó el extracto etéreo como AQ₂E y el acuoso como AQ₂A. La muestra AQ₂A no se refrigeró pues tenía mucha presencia de ácido que no permite el crecimiento de microorganismos.

Muestra AQ2E.

Se concentró la muestra a un volumen aproximado de 30 mL y se realizó las pruebas que se indican a continuación, siguiendo los procedimientos descritos anteriormente:

Métodos Químicos utilizados en la caracterización de componentes.

Prueba de Dragendorff

Prueba de Shinoda

Prueba de KOH

Prueba Liberman Buchard

Prueba de Bornträger-Kraus

Muestra AQ2A.

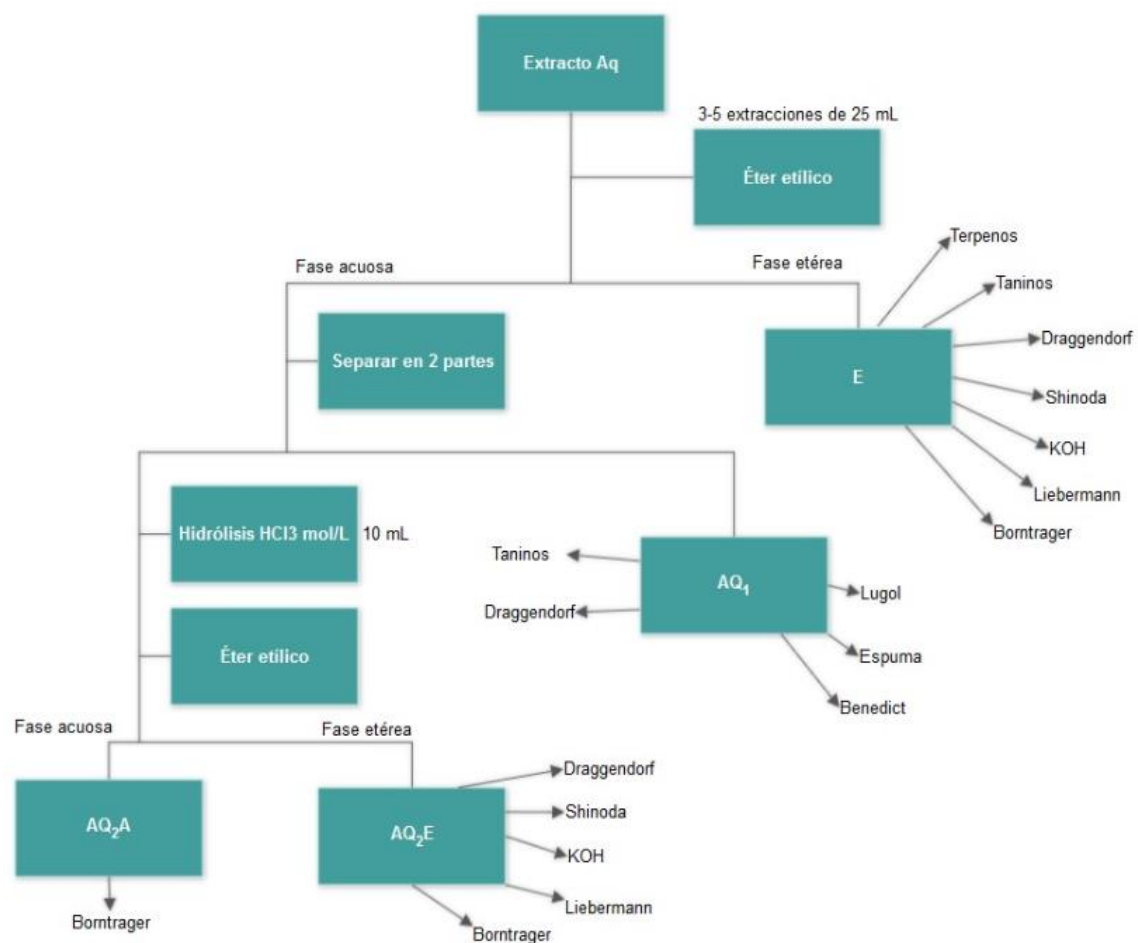
La muestra se tomó directamente y se le realizó la prueba de Bornträger-Kraus, el cual es un método químico utilizado en la caracterización de antraquinonas.

Prueba de Bornträger-Kraus.

- 1- 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 al 10%. El pH se verificó con tiras reactivas. Si no se tornó azul la disolución la prueba se cataloga como negativa.
- 2- Se desechó el resto de la muestra AQ₂A.

En la figura 24 se observa un resumen de la metodología empleada en la caracterización de los metabolitos de los extractos E, AQ1, AQ2E y AQ2A basado en el Manual de Laboratorio de Farmacognosia de la Universidad Internacional de las Américas, elaborado por el Licenciado Javier Rodrigo Alpizar Cordero.

Figura 24. Metodología empleada en la caracterización de los metabolitos en los extractos E, AQ1, AQ2E y AQ2A de las hojas secas de *Lippia alba*



Nota: Alpízar, J. (2019).

Pruebas microbiológicas para la evaluación de la capacidad antibacteriana de los extractos metanólicos y acuosos de *Lippia alba* (Juanilama)

Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos acuoso y metanólico frente a cepas de *Staphylococcus aureus*

En esta etapa, se evaluó la posibilidad de que distintas diluciones de los extractos metanólicos y acuosos de las hojas secas de Juanilama tuvieran actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. Las cepas fueron facilitadas por el Laboratorio de Bacteriología Médica de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica, brindadas por el Dr. Carlos Chacón Díaz.

Los análisis microbiológicos se desarrollaron en los Laboratorios de Microbiología Analítica, bajo la supervisión y guía del Dr. Esteban Mena Jara (microbiólogo), estando presente durante todo el proceso. Todos los materiales, insumos y equipo fueron suministrados por el laboratorio microbiológico. La actividad fue evaluada a dos extractos: Primero se utilizó el extracto metanólico y en segundo lugar, el extracto acuoso.

En la tabla 4, se muestran las concentraciones y diluciones aplicadas durante la evaluación de ambos extractos, utilizando como disolvente agua estéril. El volumen de disolvente utilizado se agregó en procura de lograr concentraciones de los extractos al 100%, 80%, 60% y 40%.

Como control positivo para las muestras se utilizó: Mupirocina al 2% ungüento (Mupiral ®), este es un antibiótico tópico de amplio espectro, se utiliza en infecciones primarias y secundarias de la piel. Se aplicó como blanco los solventes utilizados para las extracciones con el objetivo de comprobar si pudieron intervenir o no en el ensayo. La identificación cualitativa del *S. aureus* se realizó con Agua Oxigenada al 3%.

Tabla 4. Concentraciones y volúmenes de los extractos metanólicos y acuosos que se emplearon en la evaluación de la actividad antibacteriana sobre una cepa de *S. aureus* y los volúmenes de disolvente utilizado

Concentración del extracto acuoso o metanólico %	Volumen de extracto utilizado (mL)	Volumen de solvente utilizado (mL)
100%	10	0
80%	8	2
60%	6	4
40%	4	6

Nota: Elaboración propia.

Tabla 5. Cantidad de los extractos metanólicos y acuosos a diferentes concentraciones que se emplearon en la evaluación de la actividad antibacteriana sobre una cepa de *S. aureus*

Concentración del extracto acuoso o metanólico %	Volumen de extracto utilizado (µL)
100%	40
80%	40
60%	40
40%	40

Nota: Elaboración propia.

Equipos y materiales para las pruebas microbiológicas

2 Micropipetas Graduadas: Una de 10-100 μL marca Huawei y otra marca Shcheer de 1 a 5mL.

Puntas estériles de micropipetas

Lámpara de alcohol para esterilización

Torunda estéril

Goteros

Placas de Petri con agar Müller-Hinton estándar

Portaobjetos

Regla con escala métrica

Cámara de flujo laminar horizontal tipo 1, marca High Ten, modelo 3HT-24

Incubadora Thermo Scientific, modelo Hera Therm

Reactivos a utilizar

Cepa fresca de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Caldo tripticasa de soya

Mupiral ®

Alcohol etílico al 90%

Extractos metanólicos de *Lippia alba*

Extractos acuosos de *Lippia alba*

Metanol (tomado del laboratorio de Universidad Internacional de las Américas)

Agua estéril (proporcionada por el Laboratorio de Microbiología analítica)

Ensayo microbiológico 1 realizado al extracto metanólico de las hojas de *Lippia alba*

Cultivo de cepas Bacterianas.

Una vez que las cepas bacterianas de *S.aureus* ATCC 25923 fueron recibidas de parte de la Universidad de Costa Rica UCR, se realizó una prueba de identificación llamada Peroxidasa, colocando una pequeña cantidad de la bacteria en un vidrio y se agregaron entre dos y tres gotas de Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) al 3%, luego se preparó un cultivo de éstas, para ello en una cámara de flujo laminar:

- 1- Se tomó una colonia aislada de la cepa con una torunda estéril.
- 2- Se inoculó en 5mL de caldo de tripticasa de soya.
- 3- Se incubó durante 24 horas a 37 °C.
- 4- Se estandarizó la concentración de bacterias, para ello se introdujo una torunda estéril en el caldo de cultivo joven para la luego sumergirla en un tubo con 5mL de solución salina al 0.85%, se comparó su turbidez contra la de un estándar de 0.5 en la escala de McFarland correspondiente a una concentración bacteriana de 1.5×10^8 UFC/mL.
- 5- Se prepararon los medios de cultivos para el ensayo y se dejaron solidificar durante 20 minutos.
- 6- Se rotularon y midieron las placas para que fuera más fácil la incorporación de los extractos en el agar.
- 7- Se le realizó a cuatro placas, cuatro agujeros con las bases estériles de micropipetas y con ayuda de un aza de micología también estéril, se tomó como guía las marcas azules previamente realizadas. Tenían un espacio aproximado de un centímetro y medio desde el borde de la placa. La

profundidad de cada pozo se hizo del grosor del agar, cada uno con un diámetro de 0.5 cm y recogía una cantidad de líquido máxima de 40 μ L.

- 8- Se procedió a realizar tres rayados de la cepa estandarizada de *S.aureus* con torundas estériles en cuatro placas de Petri con agar estándar, tomando el caldo preparado del tubo de ensayo con la punta de la torunda. Con un movimiento en zigzag se hicieron estrías al agar de lado a lado logrando así cubrir toda la placa.

Inoculación por triplicado del extracto metanólico a diferentes concentraciones, controles positivos y blanco.

Una vez estuvieron listas las placas, se procedió a la colocación de los extractos, para ello:

- 1- Se realizaron las diluciones de los extractos con agua autoclavada a 121 °C durante 20 minutos y 15 libras de presión (estéril). Las cantidades de extracto y disolvente utilizado se especificó en tabla 4.
- 2- De cada una de las diluciones del extracto especificados en la tabla 5 se colocaron 40 μ L en 3 de los pozos de las placas.
- 3- A las placas con concentración de 100% y 60% se les colocó en el cuarto pozo 40 μ L del control positivo Mupiral ®.
- 4- A las placas con concentración de 80% y 40% se les colocó en el cuarto pozo 40 μ L del blanco (metanol), considerando que aunque se quiso realizar la evaporación completa, la misma podría contener trazas del solvente.

Incubación de las placas con extractos metanólicos a diferentes concentraciones, positivos y blanco.

Cuando las muestras estuvieron montadas:

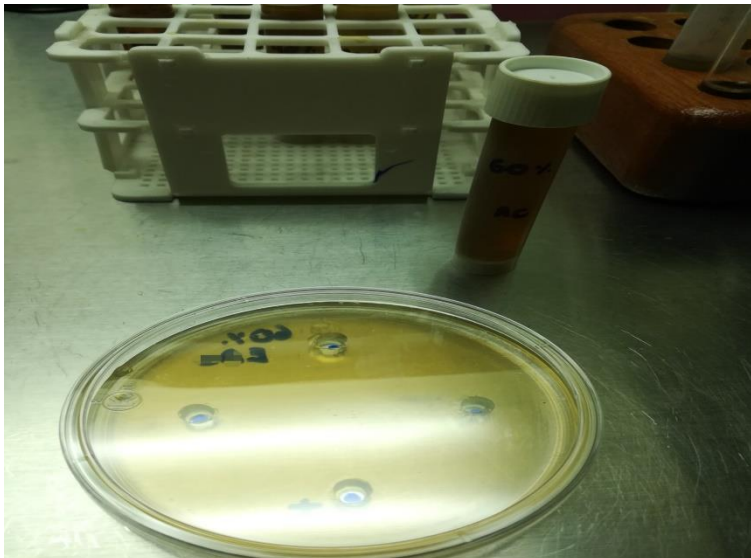
- 1- Se taparon las cepas y se guardaron en una incubadora a 37 °C, durante 24 horas
- 2- Después del tiempo de incubación, se observó el crecimiento de las bacterias en las placas y se evaluó si los extractos tuvieron o no efecto antimicrobiano.

Figura 25. Vista frontal y posterior de cepa de S.aureus, ATCC 25923, proporcionada por el Laboratorio de Microbiología de la UCR, para la evaluación *in vitro* de los extractos acuosos y metanólicos de *Lippia alba*



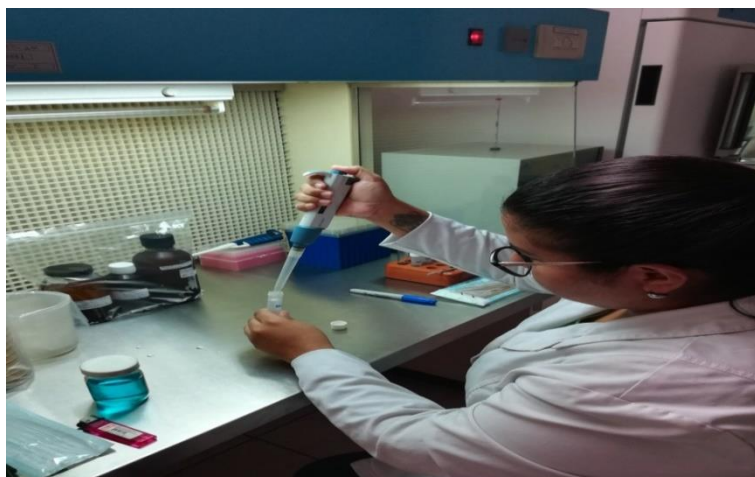
Nota: Elaboración propia.

Figura 26. Placa de Petri rotulada, con pozos, sin inóculos dentro de Cámara de Flujo Laminar



Nota: Elaboración propia.

Figura 27. Preparación de las diluciones de los extractos sometidos al ensayo microbiológico



Nota: Mena, E. (2019).

Ensayo microbiológico 2 realizado al extracto acuoso de las hojas de *Lippia alba*

Cultivo de cepas Bacterianas.

Cuando se dio inicio a esta segunda parte del ensayo, ya se contaba con la solución estandarizada de bacterias y los medios de cultivo en agar Müller-Hinton, los cuales se habían preparado anteriormente en el ensayo microbiológico 1, por lo que se continuó el procedimiento con el rotulado de las placas, elaboración de pozos e inoculación del *S.aureus* (puntos 6, 7 y 8 del cultivo bacteriológico en el ensayo microbiológico 1).

Inoculación por triplicado del extracto acuoso a diferentes concentraciones y controles positivos y blanco.

El procedimiento de inoculación se realizó de la misma forma que con el extracto metanólico, solamente que en lugar del extracto metanólico, se utilizó el extracto acuoso (puntos del uno al cuatro de la inoculación bacteriana en el ensayo microbiológico 1).

Incubación de las placas con extractos acuosos a diferentes concentraciones, positivos y blancos.

Una vez que las muestras estuvieron montadas, se incubaron a 37 °C, durante 24 horas como se explicó anteriormente, luego se analizó si los extractos tuvieron o no efecto antimicrobiano mediante la medición de halos de inhibición.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS DE RESULTADOS

En este capítulo los resultados e información que se proporcionan son los obtenidos durante el desarrollo de la investigación que se basó en cada variable planteada dentro de los objetivos específicos. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

Extracciones acuosas y metanólicas de las hojas secas de *Lippia alba*

Cuando se realizó la recolección del material botánico, previo a su utilización, se sometió a un proceso de selección de las partes de interés, por lo que se eliminó material extraño, por ejemplo raíces. Se procedió a realizar una limpieza utilizando papel toalla húmedo, para posteriormente separar el material de interés (hojas) del resto de planta.

Las hojas fueron sometidas a un proceso de secado al aire libre bajo el sol, durante cuatro días, revolviendo para tratar de que las hojas recibieran el calor uniformemente. Posteriormente se envolvió el material con hojas de papel toalla y se colocaron en una bolsa con cierre hermético hasta el momento de su uso. Cabe mencionar que las hojas se sometieron al proceso de secado pues estudios previos recomendaban el uso de las hojas secas como es el caso de Sette et al. (2014) y Nuñez et al. (2012).

Con el objetivo de determinar cuál de los dos disolventes tenía mejor capacidad de extracción, se utilizó para el extracto acuoso (agua), una técnica de maceración por infusión, sencilla de “hogar” y para el otro extracto, una maceración en frío con disolvente orgánico metanólico al 70:30 con agua. Diferentes estudios reportan la presencia de flavonoides en la planta, lo que le confiere, en parte, un carácter fenólico cuya solubilidad habilita el uso de dichos disolventes. (Pascual, Slowing, Carretero, Sánchez, Villar, 2000, pp.201-2014).

Para cada uno de los métodos se utilizó la misma cantidad inicial de material botánico (100g) y se procuró mantener una relación 1:2 g/mL de soluto-disolvente tal y como se observa en la tabla 6.

Tabla 6. Cantidad de material botánico utilizado en el extracto acuoso y metanólico y su correspondiente volumen de disolvente para una relación 1:2 g/mL soluto-disolvente

Cantidad de hojas secas para ambos extractos (g)	Volúmenes de disolvente para ambos extractos (mL)
100	200

Nota: Elaboración propia.

Para la obtención de ambos extractos se utilizó la Técnica de Maceración, pues es una forma sencilla de extraer, del material vegetal, los componentes solubles en el líquido disolvente. (Bonatti, 1991, p. 106).

Después de aplicar las técnicas de extracción, se obtuvieron líquidos con escasa viscosidad. El extracto metanólico presentó características organolépticas como: coloración verde oscuro, olor intenso, penetrante y característico de hojas verdes trituradas, no homogéneo incluso después de la filtración al vacío. El extracto acuoso, mostró características como: coloración verde oscura un poco más clara y cristalina que el anterior, olor característico de hojas trituradas y verdes, no homogéneo en las mismas condiciones. En la tabla 7, se resumen los resultados.

Tabla 7. Características de los extractos acuosos y metanólicos después de proceso de maceración

Características organolépticas				
Disolvente del extracto	Aroma	Apariencia	Color	Consistencia
Agua (H₂O)	Olor a hojas trituradas	Translúcido con partículas visibles	Verde oscuro	Líquida
metanol (CH₃OH)	Olor a hojas trituradas, penetrante	Translúcido con partículas visibles	Verde muy oscuro	Líquida

Nota: Elaboración propia.

Aunque se mantuvo la proporción soluto disolvente 1:2 g/mL, la cantidad final recolectada no fue la misma para ambos extractos.

Debido a las consideraciones anteriores resulta oportuno indicar que el volumen de extracto acuoso recolectado al final de la maceración fue casi igual al volumen inicial agregado de agua. El volumen final del extracto metanólico recolectado fue menor al volumen de disolvente agregado; esto se debió a que el disolvente utilizado era una mezcla de metanol-agua al 70:30 y el extracto fue sometido a un proceso de destilación para eliminar el metanol de la muestra, eliminando de esta forma gran parte del volumen recolectado. En la tabla 8 se compilan los resultados mencionados.

Tabla 8. Cantidades finales obtenidas después de los procesos de maceración del extracto acuoso y maceración-destilación del extracto metanólico

Método de extracción	Total de extracciones	Cantidad final del extracto obtenida (mL)	Tiempo de extracción en horas
Maceración por infusión Extracto Acuoso	1	196	1
Maceración en frío Extracto metanólico	1	56	192

Nota: Elaboración propia.

Resultados de prueba de sólidos disueltos

En esta prueba se siguió la metodología mencionada anteriormente para la determinación de sólidos disueltos en 1mL de extracto. El primer paso consistió en registrar las masas de los viales vacíos con tapa y además las masas de los viales después del proceso de secado. Una vez recopilados estos datos, por diferencia se obtuvo la masa de sólidos disueltos, los cuales, mediante una sencilla conversión de unidades de gramos a miligramos y un cálculo del promedio de esos miligramos, se convierten en los mg de sólidos disueltos en 1mL de extracto. En la tabla 9 se describen los resultados obtenidos. Es importante mencionar que este resultado, será utilizado posteriormente para determinar la concentración de extracto presente en las diluciones preparadas durante el ensayo microbiológico. La realización del análisis posterior a la prueba de sólidos disueltos, está condicionada a la formación de halos de inhibición dentro de las placas.

Tabla 9. Masas de las variables consideradas para la obtención de la masa de los sólidos disueltos en un mililitro del extracto

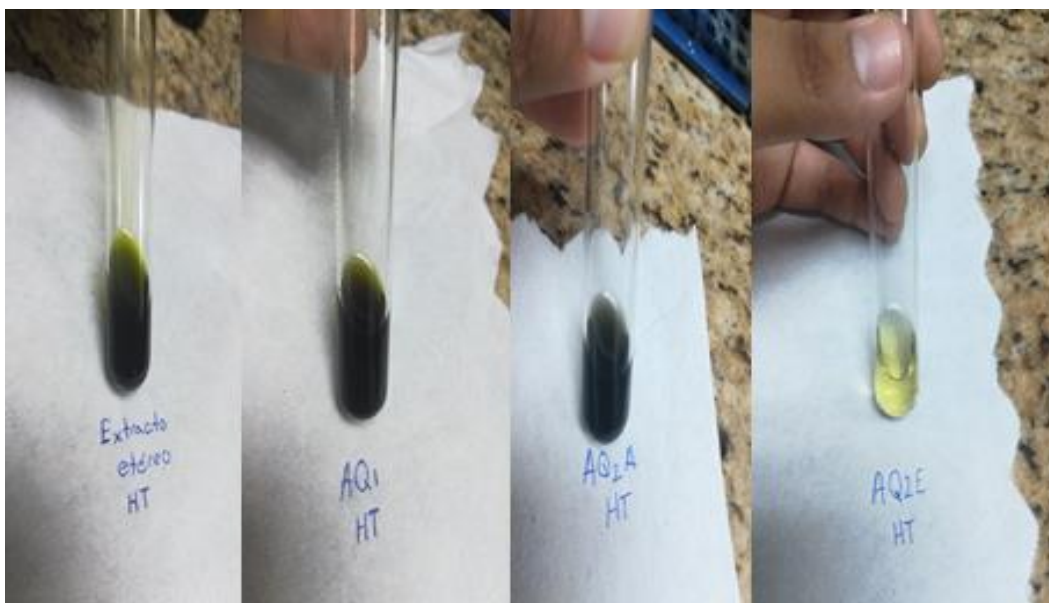
Extracto	Número de vial	Masa de los viales vacíos con tapa (mg)	Masa de los viales +sólidos disueltos con tapa (mg)	Masa de sólidos disueltos (mg)	Promedio de masa de sólidos disueltos (mg)
Acuoso	1	2824,6	2855,9	31,3	30
	2	2824,7	2854,0	29,3	
	3	2814,2	2843,6	29,4	
Metanólico	1	2817,4	2825,7	8,30	8,7
	2	2831,6	2840,5	8,90	
	3	2818,6	2827,7	9,10	

Nota: Elaboración propia.

Caracterización fitoquímica de las hojas secas de *Lippia alba* por medio de la identificación de metabolitos activos a través de métodos químicos y químico-instrumental

En la caracterización de los componentes activos de las hojas secas de *Lippia alba*, se procedió a realizar un tamizaje fitoquímico más completo del extracto etanólico, para esto se analizó la presencia de: alcaloides, flavonoides, cumarinas, triterpenos, antraquinonas, taninos, terpenos, almidón, saponinas y azúcares reductores. Se siguió el procedimiento descrito en la metodología para obtener los extractos: etéreos, acuosos (AQ1 y AQ2) y a partir de AQ2 (AQ2E y AQ2A). En la figura 28 se observa el color de cada extracto previo a la realización de las pruebas; de izquierda a derecha se ubican: Extracto etéreo (E), AQ1, AQ2A y AQ2E.

Figura 28. Coloración inicial de los extractos, previo a las pruebas de caracterización fitoquímica



Nota: Elaboración propia.

Métodos Químicos

Identificación de alcaloides.

Esta prueba se le realizó a los extractos rotulados como: etéreo (E), AQ1 y AQ2E. Es importante mencionar que la prueba sería considerada como positiva si se formaba un precipitado anaranjado en el momento en que la gota del reactivo de Dragendorff entra en contacto con la solución.

En el tubo de ensayo E, la prueba resultó negativa. En el AQ1, se observó un cambio en la coloración de verde oscuro a café probablemente por el color del reactivo, pero no se observa precipitación naranja y por último en el AQ2E, se observa una coloración rojiza que no corresponde con la prueba.

Si bien en algunos estudios mencionan la presencia de alcaloides en la planta (Medina-López et al. 2011), en otros estudios no reportan presencia de alcaloides y

atribuyen éste fenómeno a las diferentes condiciones medio ambientales en las que crece la planta (Ming 1992, Ricciardi 2000; Blanco y Agudelo 2007). Se sabe que la composición y contenido de metabolitos presentes puede variar de acuerdo a condiciones de tipo geográfico, clima, suelo y estado de la planta al momento de la recolección. En la figura 29 se observa de izquierda a derecha la prueba a E, AQ1 y AQ2E.

Figura 29. Aplicación de pruebas de alcaloides con reactivo de Dragendorff a extractos: E, AQ1 y AQ2E



Nota: Elaboración propia.

Identificación de flavonoides.

La prueba de Shinoda, se le realizó a los extractos rotulados con: E y AQ2E. La prueba sería considerada como positiva si se da coloración del rojo al magenta que puede variar hacia el rosado claro, si la presencia de flavonoides no es tan alta. Para Carvajal, Hata, Sierra y Rueda (2009), la prueba de flavonoides da positiva cuando aparecen coloraciones rojizas, violetas o naranjas.

El extracto E dio positivo, aunque la muestra inicial era verde oscura se logró observar con la prueba una coloración vino muy oscura, al mover el tubo de ensayo se logró ver algunos pequeños precipitados rojos. En esta prueba se genera hidrógeno debido a la reacción entre el ácido clorhídrico y el magnesio, este gas produce la reducción del ion flavilo responsable de los cambios de color. Todos los flavonoides, excepto chalconas, auronas e isoflavonas, provocan una reacción positiva al realizar esta prueba (Marcano y Hasegawa, 2002, p. 58). En el caso del extracto AQ2E dio positivo pues la coloración observada fue naranja. En la figura 30 se pueden observar los resultados del extracto E y AQ2E de izquierda a derecha, lo que confirma lo descrito la mayoría de la literatura consultada, acerca de que es uno de los principales componentes de la planta.

Figura 30. Aplicación de pruebas de flavonoides con extracto E y AQ2E



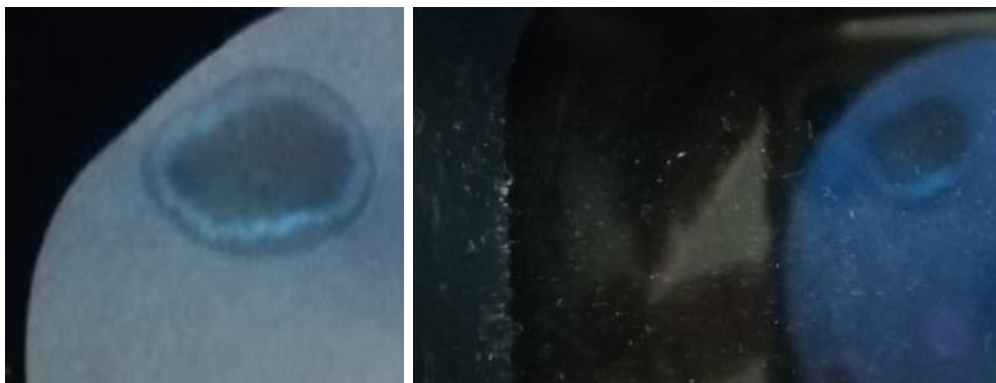
Nota: Elaboración propia. Peña, A. (2019).

Identificación de cumarinas.

Esta prueba fue realizada a los extractos E y AQ2E, según Orantes (2008), las cumarinas se caracterizan por su intensa absorción en la región ultravioleta del espectro, las cuales al ser examinadas a la luz ultravioleta presentan coloración exaltada en

presencia de un medio básico. El resultado positivo se vería como una coloración verde alrededor de la muestra. En este caso ambos extractos resultaron positivos. En la figura 31 se puede observar la coloración verde de E y AQ2E de izquierda a derecha.

Figura 31. Aplicación de prueba de KOH para la identificación de las cumarinas en los extractos E y AQ2E



Nota: Elaboración propia.

Identificación de triterpenos y esteroides con reactivo de Liberman Buchard.

Esta prueba se realizó a los extractos E y AQ2E con el objetivo de identificar triterpenos y esteroides. Se empleó una mezcla ácida compuesta de ácido acético, ácido sulfúrico y anhídrido acético. El color se debe a que el grupo hidroxilo (-OH) del esteroide reacciona con los reactivos y existe un aumento en la conjugación de la saturación del anillo fusionado lo que dio un color de verde claro a verde esmeralda. (Chávez, Hernández, León, 2012).

Cuando se realizó el ensayo dentro de la capilla se pudo observar una coloración verde esmeralda en el extracto E y un verde más claro en el AQ2E. En la figura 32 se observa la coloración de las muestras.

Figura 32. Aplicación del reactivo de Liberman para la identificación de triterpenos en los extractos E y AQ2E



Nota: Elaboración propia.

Identificación de antraquinonas.

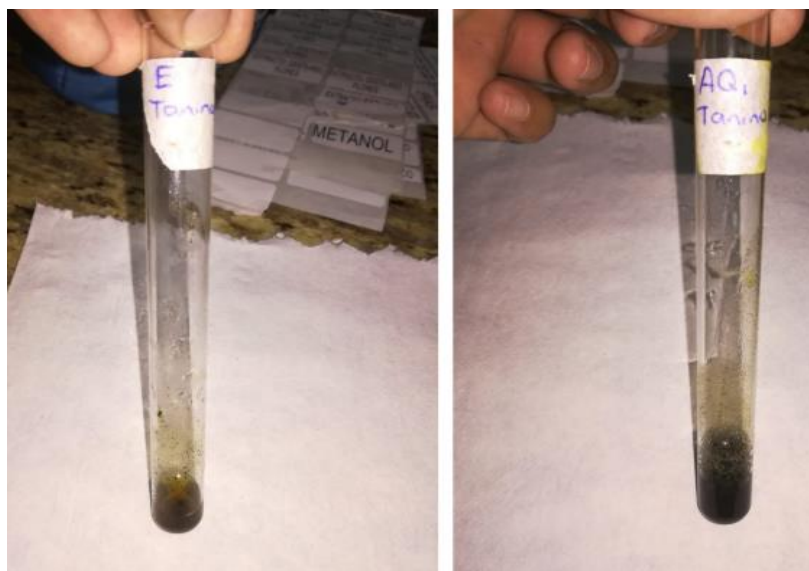
Después de someter el ensayo al extracto E, AQ2E y AQ2A, el color que indica la presencia del metabolito es el rojo oscuro y entre más claro sea, menos presencia del metabolito. Para ambos extractos la prueba fue negativa.

Identificación de taninos.

Se sometieron a esta prueba los extractos E y AQ1. Para Coy, Parra y Cuca, (2014), químicamente los taninos son polímeros de polifenoles con 1 a 2 % de hidróxidos fenólicos libres, estos compuestos al igual que los compuestos fenólicos precipitan en presencia de cloruro férrico. Esta respuesta se debe al ataque producido por el Ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (formación de complejo).

Una coloración azul indicaría la presencia de taninos gálicos y verde para catéquicos (Sharapin, 2000). Bajo las anteriores afirmaciones el extracto E cambió la coloración de verde oscuro a verde un poco más claro y AQ1 pasó de verde oscuro a negro. Para AQ1, si se considera la presencia de taninos gálicos éste tipo de coloración sería válida ya que el FeCl_3 utilizado es de color café rojizo y ante la presencia de este tipo de taninos (coloración azul), el color esperado es negro. En la figura 33 se observan los cambios mencionados.

Figura 33. Desarrollo de la prueba de taninos para la identificación en los extractos E y AQ1

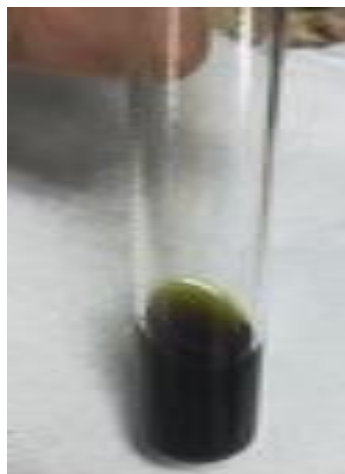


Nota: Elaboración propia.

Identificación de almidón.

En este caso se utilizó el extracto AQ1 y no se observó cambio de color hacia el azul, por lo tanto el resultado es negativo como se puede observar en la figura 34.

Figura 34. Aplicación del reactivo Lugol para la identificación de almidón en el extracto AQ1



Nota: Elaboración propia.

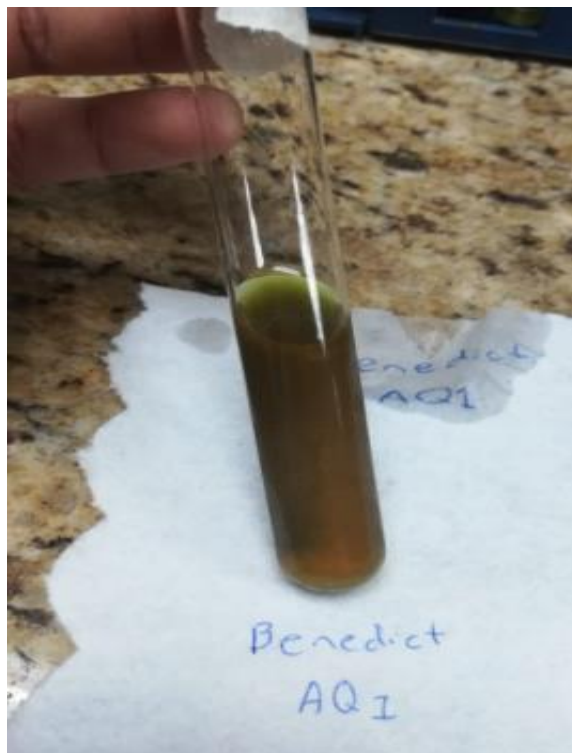
Identificación de saponinas.

De la misma forma que la prueba anterior el extracto utilizado fue AQ1 con resultados negativo sin la formación de espuma.

Identificación de azúcares reductores con reactivo de Benedict.

El extracto AQ1 se sometió a la prueba de azúcares reductores con resultado positivo. Según Berg, Stryer, y Tymoczko, (2007), si se da la formación de un precipitado naranja, se cuenta con azúcares reductores. El reactivo de Benedict está formado por: Sulfato cúprico, Citrato de sodio y Carbonato anhidro de sodio. En un medio alcalino, el ion cúprico (otorgado por el sulfato cúprico) es capaz de reducirse por efecto del grupo aldehído del azúcar (-CHO) a su forma de Cu^+ . Este nuevo ion forma un complejo llamado óxido cuproso (Cu_2O) que se observa como un precipitado rojo ladrillo que se puede observar en la figura 35.

Figura 35. Identificación de azúcares reductores en el extracto AQ1 para comprobar la presencia de azúcares reductores



Nota: Elaboración propia.

Método químico instrumental

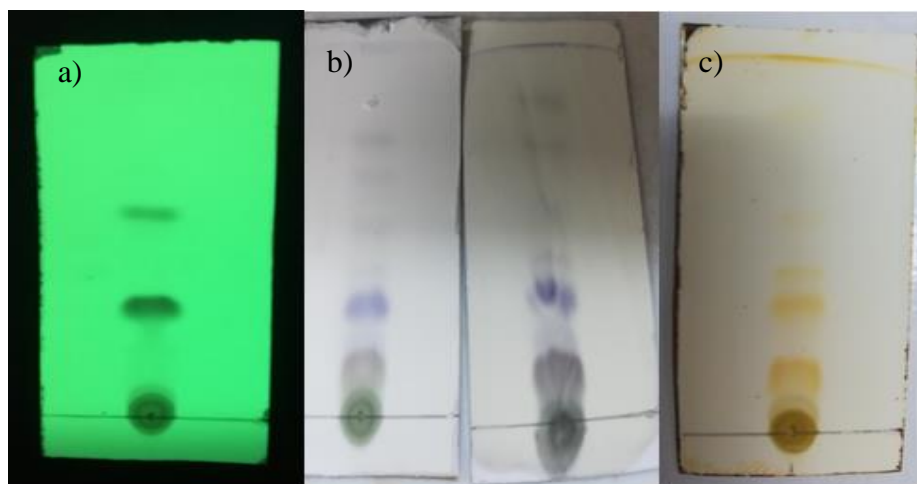
Identificación de Terpenos mediante Cromatografía de capa fina.

Para este ensayo se utilizó el extracto E. Para Carvajal, Hata, Sierra y Rueda (2009), se considera resultado positivo si aparecen manchas en cualquier tonalidad del rojo, azul, morado o verde. Como se puede observar en la figura 36, se revelaron las placas inmersas en el sistema cromatográfico, de izquierda a derecha las placas fueron reveladas de la siguiente forma:

- Inicialmente en el Ultravioleta UV a 254 nm, aquí se observaron manchas bien marcadas.

- Luego con el reactivo Vainillina y quemadas en el calentador, donde se ven distintas manchas de colores moradas, verdes y azules.
- Por último, se reveló una placa con Yodo metálico en donde se observan manchas amarillentas.

Figura 36. Identificación de Terpenos en el extracto etéreo por medio de cromatografía de capa fina y reveladas con UV (a), Vainillina (b) y Yodo metálico (c) respectivamente



Nota: Elaboración propia.

En la tabla 10 se puede observar un resumen de resultados obtenidos en las pruebas de caracterización de componentes en los extractos de las hojas de *Lippia alba*. Es importante mencionar que el resultado se dará en términos de una presencia fuerte (+ + +), presencia moderada (+ +) y presencia débil o trazas (+) o de lo contrario, ausencia del metabolito (-).

Tabla 10. Resultados obtenidos durante la caracterización o tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Lippia alba*

Tipo de prueba	Componente a identificar	Lectura de positivo	Extracto	Observaciones	Resultado
Dragendorff	Alcaloides	Precipitado naranja	E	De verde oscuro a claro	-
			AQ1	De verde oscuro a café	-
			AQ2E	De verde muy claro a rojo	-
Shinoda	Flavonoides	Coloración de rojo a magenta	E	De verde oscuro a rojo oscuro	+++
			AQ2E	De verde muy claro a naranja	+++
KOH	Cumarinas	Coloración verde alrededor	E	Coloración verde tenue	+
			AQ2E	Coloración verde tenue	+
Lieberman Burchard	Triterpenos	Verde claro a esmeralda	E	De verde oscuro a esmeralda	++
			AQ2E	De verde muy claro a verde	++
Bornträger-Kraus	Antraquinonas	Rojo oscuro	E	Sin cambio	-
			AQ2E	De verde muy claro a verde	-
			AQ2A	De verde muy oscuro a verde oscuro	-
FeCl ₃	Taninos	Azul o verde	E	De verde oscuro a negro	+++
			AQ1	De verde oscuro a verde	+
Cromatografía (TLC)	Terpenos	Manchas verdes, azules y moradas	E	Manchas de varios colores	+++
Lugol	Almidón	Azul	AQ1	De verde oscuro a muy oscuro	-
Espuma	Saponinas	Espuma	AQ1	Sin cambio	-
Benedict	Azúcares reductores	Precipitado naranja	AQ1	Formación de precipitado	+++

Nota: Elaboración propia.

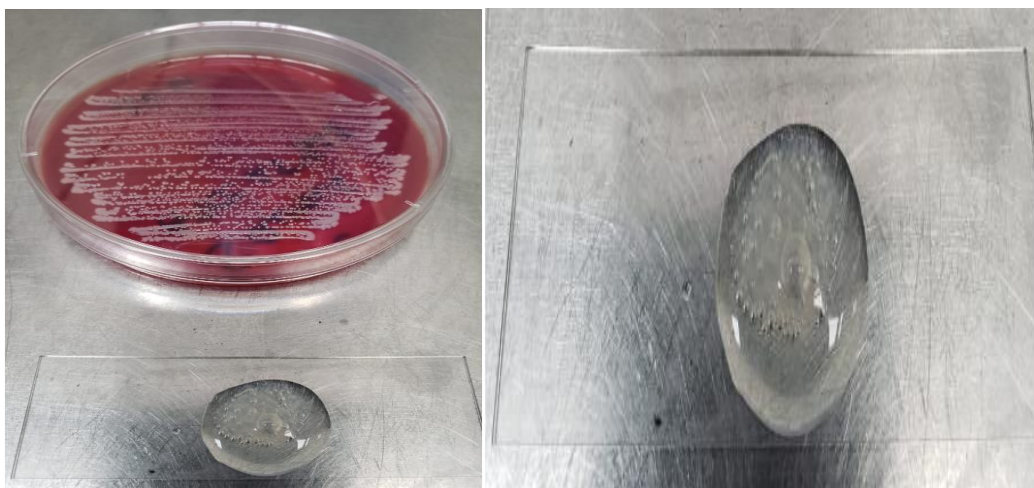
Evaluación de la posible actividad antibacteriana del extracto acuoso y metanólico de *Lippia alba* (Juanilama) en el crecimiento *in vitro* de *Staphylococcus aureus*, mediante la medición de halos de inhibición

En esta etapa de la investigación se realizaron dos ensayos microbiológicos. A continuación se exponen los resultados obtenidos en cada uno:

Ensayo 1

Como primer paso se procedió a la identificación del *S.aureus*, para esto se realizó la prueba de la Peroxidasa pues según McFaddin, (2003), ésta bacteria posee una enzima llamada Peroxidasa que degrada el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en oxígeno y agua, una vez que entra en contacto con éste y de esta forma se protege pues el H_2O_2 tiene propiedades oxidativas y la acumulación del mismo resultaría tóxica para la bacteria. Se logra observar en la figura 37 el burbujeo producido por *S.aureus* al degradar el peróxido de hidrógeno.

Figura 37. Prueba de identificación Peroxidasa a la cepa de *S.aureus* suministrada por el Laboratorio de Bacteriología de la UCR



Nota: Elaboración propia.

El primer ensayo consistió en tomar muestras a diferentes concentraciones del extracto metanólico y colocarlas en cuatro placas de Petri con sus respectivos blancos y controles negativos, las placas estaban rayadas con una concentración estándar de bacterias de *S.aureus*. A cada placa le fue asignada una concentración diferente, se les hizo cuatro agujeros para así realizar las mediciones por triplicado y en el cuarto agujero se le colocó ya fuera el blanco o el control positivo.

Los resultados de éste proceso se muestran a continuación.

Tabla 11. Resultados de la prueba de sensibilidad microbiana de *S.aureus* con las extracciones Metanólicas de *Lippia alba*

Diluciones de extracto de metanol (CH ₃ OH) %	Actividad	Halo de inhibición (mm)
100	Positiva	11
80	Positiva	8
60	Positiva	6
40	Negativa	0

Nota: Elaboración propia.

Al concluir la incubación de las muestras, se pudo observar que el extracto metanólico presenta efecto antimicrobiano frente a *S.aureus*. Teniendo un mayor efecto el extracto concentrado al 100%. Conforme se fue diluyendo el extracto, el mismo iba disminuyendo el efecto, hasta llegar a la concentración de 40% donde no hubo formación de halo de inhibición. En las concentraciones de 100% y 60% se colocó un control positivo de Mupirocina que obtuvo halos de inhibición de 40mm., mientras que en las placas con 80% y 40% se colocó un blanco de metanol previendo trazas del solvente en el extracto. No obtuvo halos.

En la figura 38 se puede observar la distribución de los halos de inhibición de las concentraciones de extracto metanólico al 100, 80, 60, 40% de izquierda a derecha.

Figura 38. Prueba de sensibilidad Microbiana de *S.aureus* frente a extracciones Metanólicas de *L.alba*



Nota: Elaboración propia.

Tomando en cuenta lo descrito en la tabla 10, el extracto metanólico al 100% presentó halos de inhibición con un diámetro de 11 mm que, según los estándares del Clinical Laboratory Standards Institute CLSI, corresponde a un halo resistente, por lo tanto, el extracto metanólico evaluado, considerando los estándares, posee acción baja.

Con respecto a la concentración del extracto metanólico al 80%, éste presentó halos de inhibición con un diámetro de 8 mm, que clasificaría el halo como resistente. De la misma forma el extracto etanólico al 80% posee acción baja.

El halo de inhibición para la concentración al 60% de extracto metanólico, se considera un halo resistente, es mucho más pequeño ya que tiene un diámetro de 6 mm. Así mismo que con los extractos anteriores, éste extracto se considera de acción baja.

Finalmente con la concentración del extracto metanólico al 40%, no se obtuvo formación de halo de inhibición, por lo que se consideró que el extracto a esta

concentración no presentó ninguna actividad antibacteriana frente al microorganismo. Lo anterior, permite consolidar el concepto de Concentración Mínima Inhibitoria CMI, pues al no presentar halos de inhibición, la CMI sería la concentración de extracto etanólico al 60%.

El control positivo, se clasificaría como sensible pues obtuvo un diámetro de inhibición de 40mm. Este medicamento se escogió pues es un antibiótico de amplio espectro que cubre acción tanto para bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. (Quesada 2017)

Relación con la prueba de sólidos disueltos.

Como se comprobó con anterioridad, la cantidad de sólidos disueltos por mililitro de extracto metanólico equivale a 8.7mg y teniendo en cuenta que la cantidad inoculada del extracto en el ensayo microbiológico fue de 40 μ L, se procedió a calcular las concentraciones de extracto en cada una de las diluciones testadas microbiológicamente.

El extracto aplicado al 100% contiene una concentración de 8.7 μ g/ μ L, el extracto al 80% contiene una concentración de 6.96 μ g/ μ L, el de 60% contiene 5.22 μ g/ μ L y el de 40% fue de 3.48 μ g/ μ L. Dados los planteamientos anteriores y tomando en cuenta que el extracto metanólico utilizado al 60% era la CMI, se deduce que la cantidad mínima de extracto que produce inhibición es 208.8 μ g por pozo, en la tabla 12 a continuación se agrupan los resultados.

Tabla 12. Concentraciones de extracto metanólico y cantidad presente en cada pozo con relación a los porcentajes del extracto utilizados durante el ensayo microbiológico.

Diluciones de extracto de Metanol (CH₃OH) %	Concentración del extracto (µg/µL)	Cantidad del extracto por pozo (µg)
100	8,7	348,0
80	6,9	278,4
60	5,2	208,8
40	3,5	139,2

Nota: Elaboración propia.

Ensayo 2

Durante el segundo ensayo se tomó muestras a diferentes concentraciones del extracto acuoso y se colocaron sobre placas Petri previamente inoculadas con una solución estándar *S.aureus*. Las placas contaban con cuatro pozos para realizar por triplicado el ensayo, más la colocación de un blanco o control positivo según fuera el caso. Los resultados de éste proceso se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Resultados de la prueba de sensibilidad microbiana de *S.aureus* con las extracciones Acuosas de *Lippia alba*

Diluciones de extracto de Agua (H ₂ O) %	Actividad	Halo de inhibición (mm)
100	Negativa	0
80	Negativa	0
60	Negativa	0
40	Negativa	0

Nota: Elaboración propia.

Al finalizar la incubación de las muestras, y teniendo en cuenta lo estipulado por el Clinical Laboratory Standars Institute (CLSI) (2017), se pudo observar que en todas las concentraciones del extracto acuoso, no hubo formación de halos de inhibición por lo que se considera que el extracto acuoso no posee actividad antibacteriana frente al microorganismo probado, quizás por la capacidad de extracción del solvente utilizado. De acuerdo con la prueba de sólidos disueltos, se decidió no realizar el análisis pues el extracto no mostró halos de inhibición en ninguna de las concentraciones.

Figura 39. Prueba de sensibilidad Microbiana de *S.aureus* frente a extracciones acuosas de *L.alba*



Nota: Elaboración propia.

A pesar de que hay estudios que evidencian la actividad antibacteriana de los extractos acuosos obtenidos por técnica de maceración de las hojas secas de *L.alba* frente a *Staphylococcus aureus*, como es el caso de Sette et al. (2014), hay otros estudios que reportan que el extracto acuoso no posee efecto inhibitorio, por ejemplo el estudio de Sena et al. (2006) donde explican que las diferencias pueden estar sujetas a una cantidad considerable de variables, pero la más importante es la naturaleza de planta. Así lo demostró Ciccío y Ocampo, (2006), donde mencionan que las muestras de material botánico obtenidas de la planta *L.alba* presentan variaciones en sus Metabolitos activos si se recogen en diferentes épocas del año. Las diferencias no se limitan a la época del año, sino que incluyen factores como estado del suelo, procesos de recolección, tratamiento de la muestra, entre otros.

No se debe perder de vista que el extracto metanólico de las hojas secas de *Lippia alba*, posee actividad antibacteriana, lo que está sustentado en estudios consultados durante la investigación. Se puede relacionar entonces los resultados con la presencia de metabolitos activos identificados en la planta a partir del extracto etanólico.

La actividad antibacteriana del extracto podría estar dada por la presencia de compuestos fenólicos como flavonoides, cumarinas y taninos pues según Carrada y Castellón (2018) estos “inhiben de manera dosis dependiente la actividad hemolítica y disminuye la secreción de alfa toxina en sobrenadantes de cultivos de *S.aureus*”. (p.131). De la misma forma Melo et al. (2015) reportan que los terpenos son sustancias tóxicas moduladoras de la actividad microbiana. (p.98). Por otro lado los azúcares reductores presentan propiedades antiestafilocócicas que describen Martínez, Soto, Almeida, Hermosilla y Martínez, (2012).

Si se toma en cuenta que el halo de inhibición se clasifica en tres niveles: sensible (S), intermedio (I) y resistente (R), de esta forma una bacteria sensible a la sustancia produce un halo de 30 mm y 35mm; el intermedio sería entre 15mm y 30 mm y es considerado resistente cuando los halos son menores a 15 mm; se deduce que el mejor disolvente utilizado para las extracciones es el metanol.

Así mismo no se puede obviar que la acción antibacteriana de los extractos puede variar por muchas razones y no sólo por el disolvente utilizado. También se debe tomar en cuenta la diferencia en el tiempo durante los procesos de maceración, el tratamiento que se le da a las muestras, el correcto almacenamiento de los extractos, una concentración adecuada de las bacterias para el ensayo, las variaciones en la concentración de metabolitos debidas a las condiciones ambientales y geográficas en que creció la planta e incluso, el proceso de recolección de las mismas que pueden producir alteraciones durante los ensayos microbiológicos.

La formación de halos resistentes en la evaluación microbiológica también puede deberse a que los extractos no fueron sometidos a procesos de semipurificación o purificación, donde se puede potenciar el efecto antimicrobiano de los metabolitos secundarios. Resultaría conveniente entonces llevar a cabo dichos procesos para observar el comportamiento de los extractos en estas nuevas condiciones.

Para el método de extracción acuoso se seleccionó una técnica sencilla que es muy usada en los hogares y así poder determinar si esa forma era viable o no. Dado los resultados obtenidos, la técnica de maceración por infusión no es una buena técnica para la extracción de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

Una vez finalizado el presente trabajo de investigación, se concluye lo siguiente:

- La utilización del material botánico de forma seca proporciona una fácil preservación, manipulación y transporte del mismo.
- La coloración verde oscura y el olor penetrante son mucho más intensos en el extracto metanólico que en el extracto acuoso.
- Las hojas secas de *Lippia alba* presentan metabolitos como flavonoides, taninos, terpenos, azúcares reductores, cumarinas y triterpenos identificados en el tamizaje fitoquímico.
- El burbujeo producido en la prueba de Peroxidasa realizada al *Staphylococcus aureus*, confirma la identidad del mismo.
- Se observa actividad antibacteriana en las concentraciones 100%, 80% y 60% del extracto metanólico.
- La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se dio en el extracto etanólico al 60% que corresponde a una cantidad de 208,8µg por pozo.
- El extracto acuoso no presentó actividad inhibitoria bacteriana.
- La técnica de maceración por infusión no es un buen método para la extracción de metabolitos secundarios con capacidad antibacteriana.
- El mejor disolvente para realizar las extracciones fue el metanol.
- El extracto metanólico de las hojas secas de *Lippia alba*, es una alternativa natural para el tratamiento de infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*.

RECOMENDACIONES

- Realizar una investigación en donde se evalúe a la planta en diferentes épocas del año, para así comprobar si las variaciones encontradas son significativas (debido a las diferencias encontradas de un estudio a otro entre los metabolitos reportados en las hojas de *Lippia alba*).
- Realizar estudios microbiológicos del extracto *Lippia alba*, contra otros microorganismos patógenos frente a los cuales, según la literatura, presenta efecto antimicrobiano.
- Estudiar otras propiedades reportadas en *Lippia alba*, por ejemplo las antifúngicas y las antiinflamatorias.
- Contar en la Universidad con los equipos necesarios para poder realizar destilaciones más eficientes, por ejemplo un rotavapor con mayor rendimiento. De la misma manera, sería provechoso contar con un laboratorio microbiológico que esté bien equipado, por ejemplo que cuente con cámara de flujo laminar, incubadora y autoclave.

REFERENCIAS

Artículos de revistas científicas

- 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.
- Carvajal, L.; Hata, Y.; Sierra, N. y Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá. *Revista Colombiana Forestal*. Volumen 13. pp.164-167.
- Cea de Amaya, R. (2013). Célula Inventa Química y Farmacia. Recuperado de: <http://www.dbbe.fcen.uba.ar/contenido/objetos/Cea2013.pdf>
- Cervantes, E; García, R; Salazar, P. (2014). Características generales de los *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*. México. 61 (1). pp 28-40.
- Chies, C; Branco, C; Scola, G; Agostini, F; Gower, A y Salvador, M. (2013). Antioxidant effect of *Lippia alba* (Miller) N. E. Brown. *Antioxidants*, v.2. (pp. 194–205).
- Ciccio, J. y Ocampo, R. (2006). Variación anual de la composición química del aceite esencial de *Lippia alba* (Verbenaceae) cultivada en Costa Rica. 6 (3): 149-154.
- Isaza, J. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica*. 33:13-18. DOI:10.22517/23447214.5817.
- Jarraud, S; Mougel, C; Thioulouse, J; Gerard, L; Meugnier, H. y Forey, F. (2002). Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, Groups (Alleles), and Human Disease. *American Society for Microbiology*. 70:631-641.

- López, M; Stashenko, E y Fuentes, J. (2011). Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. *Genetics and Molecular Biology*, v.34(3). (pp. 479–488).
- Madaleno, I. (2007). Etno-farmacología en Iberoamérica, una alternativa a la globalización de las prácticas de cura. En *Revista Cuadernos Geográficos de la Universidad de Granada*, vol. 41. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/>
- Martínez, S; Gonzáles, J; Culebras, J y Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 6: 271-278.
- Medina, L; Araya, J; Tamayo, G y Romero, R. (2011). Comparacion de metodologías de extracción para limoneno y carvona en *Lippia alba* usando cromatografía de gases. *Ciencia y Tecnología*, 27 (1y2), (pp.1-13).
- Nuñez, M; Torres, C; Aguado, M; Bela, A; Dudik, H y Bregni, C. (2012). Polyphenols and antimicrobial activity in extracts of *Lippia alba* (Mill.). *Int.J.Med.Arom.Plants*. N°3, (pp.361-368).
- Pascual, M; Slowing, K; Carretero, E; Sánchez, D y Villar, A. (2000). *Lippia*: Traditional uses, chemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. (pp. 201-2014).
- Pierre, P. y Ryser, E (2006). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* DT 104, and *Listeria monocytogenes* on inoculated alfalfa seeds with a fatty acid-based sanitizer. *Journal of Food Protection*. 69(3):582-589.
- Pochettino, M.L. (2008). La variable tiempo en la caracterización del conocimiento botánico tradicional. *Darwiniana*, 46(2), parr.1.
- 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).
- Sáenz, C. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana Metodología de laboratorio. Revista médica del Hospital Nacional de Niños. Costa Rica. Vol.34. (parr. 15, 19-22).
- Sena, J.; Melo, J.; Saraiva, A.; Goncalves, A.; Caetano, M. y Haroudo, X. (2006). Antimicrobial activity and phytochemical profile form the roots of *Lippia alba* (Mill) N.E.Brown. Revista Brasileira de Farmacognosia, 16(4), (pp.506-509).
- Sette, P; Rego, S; Macedo, M; Batista, S; Rocha, A; Oliveira, T; Amaro, L; Correia, H y Costa, K. (2014). Antibacterial activity and phytochemical screening of extracts of *Lippia alba* (Mill). African Journal of Microbiology Research, Vol. 8(29), (pp.2783-2787).
- Universidad Tecnológica de Pereira. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia et Technica, 15(42), (pp. 239-268).
- Vera, J; Pastrana, P; Fernández, K y Viña, A. (2007). Actividad antimicrobiana *in vitro* de volátiles y no volátiles de *Lippia alba* y extractos orgánicos y acuoso de justicia pectoralis cultivadas en diferentes pisos térmicos del departamento del Tolima. Scientia et Technica, N°33 (pp.345-348).
- Yuste, J. y Fung, C. (2004) Inactivation of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in apple juice by a combination of nisin and cinnamon Journal and Food Protection. (67.2), (pp. 371-377).

Fuentes consultadas en línea

Hernández, A. (16/02/2018). Centro de investigación en productos naturales (CIPRONA). Universidad de Costa Rica. Recuperado de: <http://ciprona.ucr.ac.cr/historia/>

Harris, E. (s.f.). Biochemical Facts behind the Definition and Properties of Metabolites. Facultad de Nutrición. California, Florida: Texas A&M University. Recuperado de: <https://pdfs.semanticscholar.org/22c7/77dca442d4166a6454032418a81ec4cd2572.pdf>

Mérida, A. (s.f.). Mecanismos de adaptación de las plantas a estreses abióticos. España: Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis. Recuperado de: <https://www.ibvf.us-csic.es/en/node/82>

Ocampo, R. (1994). Domesticación de plantas medicinales en Centroamérica. (Informe N°245). Costa Rica: CATIE. (pp.6-7). Recuperado de: <https://books.google.co.cr>

Organización Mundial de la salud (OMS). (2002). Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. Ginebra. Recuperado de: <https://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js4930s/>

Organización Mundial de la salud (OMS). (2004). Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Recuperado de: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). Definición fitofármacos. Octubre 2017. Recuperado de: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s18840es/s18840es.pdf>

Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). Datos recientes revelan altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo. (Enero 2018). Recuperado de:

<https://www.who.int/es/news-room/detail/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>

Restrepo, M; Romeo, P y Fraume, N. (2005). El milagro de las plantas. Recopilado de: https://books.google.co.cr/books?id=ss3tcgKqh_UC&pg=PT203&dq=nombre+com%C3%BAAn+de+lippia+alba&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwis75f5y7jjAhVRw1kKHbU9Ag4Q6AEILTAB#v=onepage&q=nombre%20com%C3%BAAn%20de%20lippia%20alba&f=false

Ramos, W; Soares, M; do Nascimento, L; do Nascimento P; Costa, F; Ataíde, A; Carréra, J; Melo, M y Ribeiro, D. (2012). Selecting Medicinal Plants for Development of Phytomedicine and Use in Primary Health Care, Bioactive Compounds in Phytomedicine, InTech, Available. Recopilado de: <http://www.intechopen.com/books/bioactive-compounds-in-phytomedicine/selectingmedicinal-plants-for-development-of-phytomedicine-and-use-in-primary-health-care>

Libros

Alpízar, J. (2018). *Manual de Laboratorio de Farmacognosia*.

Berg, J; Stryer, L y Tymoczko, J. (2007). *Bioquímica*. 6ª Edición. España: Reverte.

Beyer, H. y Walter, W. (1987). 19ª Edición. *Manual de Química Orgánica*. España: Editorial Reverte.

Bonati, A. (1991). *Formulation of plant extracts into dosage forms. London: The medicinal plant industry*.

Cáceres, A. (1996). *Plantas de uso medicinal en Guatemala*. Guatemala: Editorial Universitaria.

Casado, E; Durán, P; Miró, T y Paredes, A. (2012). *Operaciones básicas de Laboratorio*. España: Paraninfo.

- Cavaliere, S; Harbeck, R; McCarter, Y; Ortez, J; Rankin, I; Sautter, R; Sharp, S. y Spiegel, C. (2005). *Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*. 1ª Edición. Estado Unidos.
- Cruz, A. (2001). *Antibióticos Naturales*, México.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). (2017) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Clinical Laboratory Standards Institute. 27th Ed.
- Entralgo, P. (2004). *Historia de la medicina*. España: Salvat S.A.
- Fitzpatrick, T. (2008). *Dermatología en Medicina General*. 7ª Edición, España: Editorial Panamericana.
- García, M., Gavilanes, J., Martínez, A., Montero, F., Oñaderra, M. y Vivanco, F. (1999). *Técnicas Instrumentales de Análisis en Bioquímica*. España: Síntesis.
- García, P; Fernández, M. y Paredes, F. (1997). *Microbiología Clínica Aplicada*. 3ª Edición, España: Editorial Díaz de Santos.
- Hammer, G. y Mcphee, S. (2014). *Fisiopatología de la enfermedad*. 7ª Edición, Editorial McGraw-Hill, México.
- Hernández, R; Fernández, C y Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación*. México: McGraw-Hill.
- Jawetz, Melnick y Adelberg. (2011). *Microbiología Médica. China*, 25ª Edición, McGraw Hill.
- Lezaeta, M. (1997). *Medicina natural al alcance de todos*. (Digitalizado en 2006). Recuperado de: <https://www.casadellibro.com/libro-medicina-natural-al-alcance-de-todos-2aa-ed/9789688602256/228988>

- McFaddin, J. (2003). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. 3ª Edición. Estados Unidos: Ed. Médica Panamericana. (pp. 74-76).
- Medina, A. (2000). *Guía de antimicrobianos y tratamiento de las infecciones*. España: Díaz de Santos.
- Negrón, M. (2009). *Microbiología estomatológica*. 2ª Edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Pahissa, A. (2009). *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. España: Marge Medica Books.
- Rivas, C; Orandy, M. y Verde, M. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. México: OmniaScience.
- Roach, L. (2010). *Lo esencial en Metabolismo y nutrición*. 3ª edición. España: Elsevier. (pp. 3, 8).
- Rodríguez, H. (2007). *La utilidad de las plantas naturales en Costa Rica*. Heredia, Costa Rica: EUNA. (p.109). Recuperado de: https://books.google.co.cr/books?id=j_J4hXSzgeEC&pg=PA109&q=juanilama+plantas+medicinales&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwi8yKiwYzjAhVhvlkKHb6WAwMQ6AEIJzAA#v=onepage&q=juanilama%20plantas%20medicinales&f=false
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de la tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: Roberto pinzón.
- Taiz, L y Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. 3ª Edición. Universitat Jaume I.
- Tortora, G; Funke, B. y Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología*. 9ª Edición. Argentina: Editorial Panamericana.
- Vanaclocha, B. y Cañigual, S. (2006). *Fitoterapia*. España: Elsevier. Recuperado de: <https://books.google.co.cr>

Tesis y trabajos de graduación

- Cambronero, M. y Cordero, C. Determinación de la actividad antiinflamatoria tópica del aceite esencial, del extracto etanólico y del extracto etéreo de *Lippia alba* (*Verbenaceae*), empleando un modelo animal. UCR. Costa Rica.
- Colina, A.C. (2016). Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de “*Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst” de la zona de Yucay (Cusco). Tesis para optar por el título de licenciada en Química en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
- Orantes, E. (2008). “Tamizaje fitoquímico de la especie vegetal guatemalteca *Quararibea yunckeri* Standley Subsp. *izabalensis* W.S. Alverson ex Véliz (*Bombacaceae*)”. (Licenciatura en Química y Farmacia). Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Ramírez, N. (2013). Obtención del látex del targuá (*Croton Draco*) y análisis *in vitro* de su efecto antibacteriano contra la cepa *Staphylococcus aureus* causante del impétigo, durante el periodo de enero a abril, 2013. (Grado de Doctor en Farmacia). Universidad Internacional de las Américas. Costa Rica.
- Reyes, N. y Renderos, A. (2002). Elaboración de una loción capilar a base de extractos naturales de ajo y romero (Licenciado en Química y Farmacia). Universidad del Salvador.
- Reja, B. (2007). Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes. (Doctorado en Química Física). Universidad de Santiago de Compostela.

ANEXOS

Anexo 1. Carta de solicitud de cepa de S.aureus para el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.



Telfax: 2219-8816 / Apartado 285-2400 Desamparados, San José

e-mail: mianalitica@gmail.com / Web: mianalitica.com

San José, 21 de junio del 2019

MICROBIOLOGIA ANALITICA

Dr. Carlos Chacón Díaz
Sección de Bacteriología
Facultad de Microbiología
Universidad de Costa Rica
Pto.

Estimado Dr. Díaz:

Por medio de la presente yo, Esteban Mena Jara, código del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica 1470, por medio de mi laboratorio Microbiología Analítica le estaré ayudando a la señorita Alejandra Peña Torres, estudiante de la Universidad Internacional de las Américas con las pruebas microbiológicas necesarias para su tesis de grado en Farmacia, en la misma se probará la capacidad antimicrobiana de extractos de juanilama (*Lippia alba*) sobre *Staphylococcus aureus*.

La copa de *Staphylococcus aureus* que le proporcionen garantizo que será utilizada correctamente, pues las pruebas las realizará la estudiante bajo mi supervisión.

Sin más por el momento, me despido cordialmente,

Dr. Esteban Mena Jara, M.Q.C.
Código CMQCCR 1470
Gerente Técnico
Microbiología Analítica S.A.

Firmado digitalmente por: JOSE
ESTEBAN MENA JARA (FIRMA)
Fecha y hora: 21.06.2019 10:12:22