



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
“Dr. ALFREDO NICOLAS USUBILLAGA DEL  
HIERRO”**



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE LA ESPECIE *Vitis vinifera* L., FRENTE A CEPAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS**

Trabajo de Grado presentado para optar por el título de Licenciada en  
Bioanálisis

**Autora:**

**Gavi R. Giraldo M.**

**C.I. V- 23. 583.492**

**Tutora:**

**Prof. Diolimar Buitrago**

**Mérida, junio de 2023**

## DEDICATORIA

A Dios y la Virgen, por permitirme estar en este mundo y tenerme con vida y salud para salir adelante y ayudarme en todo momento.

A mis padres, por darme la vida en especial a mi Madre por su apoyo y amor incondicional, por enseñarme que pese a cualquier circunstancia todo en vida se puede alcanzar, este logro es tuyo mamita linda. Te amo.

A mis abuelos, por estar siempre presente de forma incondicional en cada paso que doy para alcanzar mis sueños y metas, este logro es también de ustedes mi abuela mamá y abuelo papá (desde el cielo). Los amo

A mis hermanas, por su apoyo incondicional y ejemplo de lucha, entrega y dedicación para cumplir cada meta establecida en la vida. Las amo.

A mi madrina, por su apoyo incondicional en este largo camino a cumplir mi sueño y por estar siempre presente como una madre en todo momento. Te amo.

A mi esposo y padre de mi hija, por estar siempre a mi lado apoyándome y ayudándome de manera incondicional a salir adelante en todo momento. Este logro también es tuyo. Te amo.

A mi hija, por llegar a mi vida y enseñarme el amor más puro e incondicional que puede existir en la vida y darme las fuerzas para seguir adelante sin importar los obstáculos que se puedan presentar en cada paso que doy hacia mis sueños. Te amo.

A mis tíos, primos, sobrinos, cuñados, suegros y amigos, de cada uno he tomado una enseñanza.

A mis amigas (kathe, Live's, Tere, Loris, Annelsy) y compañeros de clases, sin ustedes este largo pero hermoso camino no hubiese sido igual.

A mi Tere, sin ti no lo hubiese podido lograr.

A todos los profesores, por su dedicación y apoyo incondicional pese a cualquier circunstancia a lo largo de esta hermosa carrera.

A mi tutora y jurados por guiarme en este trabajo.

*Gavi Giraldo*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios y la Virgen, por darme vida, salud entendimiento, sabiduría y fuerzas en cada paso que doy y en especial para cumplir uno de mis más grandes y anhelados sueños.

A toda mi familia, amigos y los que formaron parte de este camino, por apoyarme siempre y enseñarme que sí se pueden alcanzar las metas establecidas en la vida.

A la ilustre Universidad de los Andes, por abrirme sus puertas y permitirme convertirme en una profesional.

A la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, mi segundo hogar y a todos lo que ahí hacen vida, cada uno aportando su granito de arena para formarnos como profesionales.

A todos los profesores, por impartir sus conocimientos y guiar de manera incondicional, apoyando y ayudando a todos los estudiantes con ganas de superación profesional y personal.

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y a todos los que hacen vida ahí, por apoyarme, guiarme y ayudarme a realizar mi Tesis.

A mi Tutora, Prof. Diolimar Buitrago, por aceptar guiarme en la realización de mi Tesis y dar un paso más para graduarme como Licenciada en Bioanálisis, así como también a las jurados Prof. Yndra Cordero y Prof. Alida Pérez.

A mis amigas y compañeros de clases, por todo el apoyo y todas las experiencias vividas en cada materia de la hermosa carrera de Bioanálisis.

A mi Tere, por siempre estar dispuesta ayudarme sin esperar nada a cambio.

A todas y cada una de las personas que me apoyaron de una manera u otra a cumplir mi sueño y meta de ser Licenciada en Bioanálisis.

A todos infinitas **GRACIAS** desde lo más profundo de mi corazón.

*Gavi Giraldo*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
VEREDICTO.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS .....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>CAPÍTULO I: EL PROBLEMA.....</b>	<b>3</b>
Planteamiento del Problema.....	3
Justificación de la investigación.....	5
Objetivos de la investigación.....	7
Objetivo general.....	7
Objetivos específicos.....	7
Alcances y limitaciones de la investigación.....	7
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>9</b>
Trabajos Previos.....	9
Antecedentes Históricos.....	11
Bases teóricas.....	12
Familia Vitaceae.....	12
<i>Descripción botánica de la familia Vitaceae.....</i>	<i>12</i>
<i>Composición química de la familia Vitaceae.....</i>	<i>13</i>
<i>Actividad biológica de la familia Vitaceae.....</i>	<i>14</i>
Género <i>Vitis</i> .....	14
<i>Descripción botánica del género Vitis.....</i>	<i>14</i>

<i>Composición química del género Vitis</i> .....	15
Especie <i>Vitis vinifera</i> L. ....	16
<i>Descripción botánica de la especie Vitis vinifera</i> L.....	16
<i>Distribución geográfica de la especie Vitis vinifera</i> L.....	17
<i>Composición química de la especie Vitis vinifera</i> L.....	18
<i>Usos etnobotánicos de la especie Vitis vinifera</i> L.....	23
<i>Actividad biológica de la especie Vitis vinifera</i> L.....	24
Extractos vegetales.....	24
Métodos de obtención de los extractos vegetales.....	25
Productos naturales.....	26
Tamizaje fitoquímico.....	29
<i>Prueba para determinar alcaloides</i> .....	29
<i>Prueba para determinar triterpenos/esteroles</i> .....	30
<i>Prueba para determinar compuestos fenólicos</i> .....	30
<i>Prueba para determinar saponinas</i> .....	30
<i>Prueba para determinar taninos</i> .....	30
<i>Prueba para determinar flavonoides</i> .....	31
<i>Prueba para determinar cumarinas</i> .....	31
<i>Prueba para determinar antraquinonas</i> .....	31
<i>Prueba para determinar quinonas</i> .....	32
<i>Prueba para determinar lactonas sesquiterpenos</i> .....	32
Bacterias.....	32
<i>Características generales de la bacterias</i> .....	32
Clasificación de las bacterias.....	33
<i>Bacterias Gram positivas</i> .....	33
<i>Bacterias Gram negativas</i> .....	35
Resistencia bacteriana.....	37
Métodos para determinar la actividad antibacteriana.....	38
<b>Definición operacional de términos</b> .....	40

<b>Operacionalización de las variables</b> .....	41
<b>Hipótesis</b> .....	44
<b>CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO</b> .....	45
<b>Tipo de Investigación</b> .....	45
<b>Diseño de la Investigación</b> .....	45
<b>Población y Muestra</b> .....	46
Unidad de la Investigación.....	46
Selección del Tamaño Muestral.....	46
<b>Sistema de Variables</b> .....	46
<b>Procedimiento de la Investigación</b> .....	47
Recolección de la muestra.....	47
Obtención de los extractos.....	47
Tamizaje fitoquímico de la especie <i>Vitis vinifera</i> L.....	49
Evaluación de la actividad antibacteriana por el método de difusión... del disco en agar (Kirby Bauer).....	51
<b>Diseño de Análisis</b> .....	54
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	55
<b>Resultados</b> .....	55
<b>Discusiones</b> .....	67
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	73
<b>Conclusiones</b> .....	73
<b>Recomendaciones</b> .....	74
<b>BIBLIOHEMEROGRAFÍA</b> .....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pág.
1.	Estructura química del Resveratrol aislado de la familia..... Vitaceae.....	13
2.	Especie <i>Vitis vinifera</i> L.....	16
3.	Estructura química del Resveratrol, Acido Gálico, Acido..... Caféico y Rutina, aisladas de la especie <i>Vitis vinifera</i> L.....	19
4.	Estructura química de los polifenoles aislados de la especie.. <i>Vitis vinifera</i> L.....	20
5.	Estructura química de proantocianidinas polifenólicas..... aisladas de la especie <i>Vitis vinifera</i> L.....	21
6.	Pared celular de las bacterias Gram positivas.....	34
7.	Pared celular de las bacterias Gram negativas.....	36
8.	Determinación de alcaloides en el extracto metanólico de..... hojas y semillas de <i>V. vinifera</i> L.....	58
9.	Determinación de triterpenos/esteroles en el extracto..... metanólico de hojas y semillas de <i>V. vinifera</i> L.....	58
10.	Determinación de compuestos fenólicos en el extracto..... metanólico de hojas y semillas de <i>V. vinifera</i> L.....	59
11.	Determinación de saponinas en el extracto metanólico de..... hojas y semillas de <i>V. vinifera</i> L.....	59
12.	Determinación de taninos en el extracto metanólico de hojas y semillas de <i>V. vinifera</i> L.....	60
13.	Determinación de flavonoides (reacción de Shinoda) en el.... extracto metanólico de hojas y semillas de <i>V. vinifera</i> L.....	60
14.	Determinación de flavonoides (prueba con NaOH al 10%) en el extracto metanólico de hojas y semillas de <i>V. vinifera</i> L.....	61

15.	Determinación de cumarinas en el extracto metanólico de.... hojas y semillas de <i>V. vinifera</i> L.....	61
16.	Determinación de antraquinonas en el extracto metanólico... de hojas y semillas de <i>V. vinifera</i> L.....	62
17.	Determinación de quinonas en el extracto metanólico de..... hojas y semillas de <i>V. vinifera</i> L.....	62
18.	Determinación de lactonas sesquiterpenos en el extracto..... metanólico de hojas y semillas de <i>V. vinifera</i> L.....	63
19.	Extracto metanólico de hojas (37) y semillas (38) ensayado... en <i>S. aureus</i> .....	65
20.	Extracto metanólico de hojas (37) y semillas (38) ensayado... en <i>E. faecalis</i> .....	65
21.	Extracto metanólico de hojas (37) y semillas (38) ensayado... en <i>P. aeruginosa</i> .....	66
22.	Extracto metanólico de hojas (37) y semillas (38) ensayado... en <i>K. pneumoniae</i> .....	66
23.	Extracto metanólico de hojas (37) y semillas (38) ensayado... en <i>E. coli</i> .....	67

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág.
1.	Taxonomía de la especie <i>Vitis vinifera</i> L.....	17
2.	Operacionalización de la variable dependiente.....	42
3.	Operacionalización de la variable independiente.....	43
4.	Procedimiento para el tamizaje fitoquímico de la especie <i>Vitis vinifera</i> L.....	49
5.	Microorganismos y controles positivos.....	54
6.	Determinación del % de rendimiento del extracto metanólico.. de las hojas y semillas de la especie <i>Vitis vinifera</i> L.....	55
7.	Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto metanólico... de las hojas y semillas de la especie <i>Vitis vinifera</i> L.....	57
8.	Resultados de la actividad antibacteriana del extracto..... metanólico de las hojas y semillas de la especie <i>Vitis vinifera</i> L.	64

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema N°		Pág.
1.	Procedimiento para la obtención de los extractos de la... especie <i>Vitis vinifera</i> L.....	48
2.	Ensayo de la actividad antibacteriana por el método de... difusión del disco en agar (Kirby Bauer).....	53

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES

“Dr. ALFREDO NICOLAS USUBILLAGA DEL HIERRO”  
LINEA DE INVESTIGACIÓN: PRODUCTOS NATURALES



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE LA ESPECIE *Vitis vinifera* L., FRENTE A CEPAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS**  
Trabajo de Grado II

**Autora:**

Gavi Giraldo

C.I. V- 23.583.492

**Tutora:**

Prof. Diolimar Buitrago

**RESUMEN**

El objetivo de la investigación fue determinar la actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas y Gram negativas y la composición química del extracto metanólico de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L. Se obtuvieron por maceración los extractos con el disolvente orgánico metanol. Posterior a ello, su composición química fue analizada cualitativamente mediante el tamizaje fitoquímico, lográndose la identificación de compuestos como alcaloides, esteroides, compuestos fenólicos y taninos en el extracto metanólico de hojas; así como también, presencia de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y lactonas sesquiterpénicas en el extracto metanólico de semillas. En cuanto a la actividad antibacteriana, se cuantificó la sensibilidad a través de la técnica difusión del disco en agar (Kirby-Bauer) a la concentración de 10.000 ppm (10 mg/mL), con la medición de los halos de inhibición, obteniéndose como resultado que el extracto de las hojas mostró actividad frente a *S. aureus* (7 mm), *P. aeruginosa* (7 mm), *K. pneumoniae* (7 mm) y *E. coli* (8 mm); mientras que, el extracto de las semillas mostró actividad sobre *S. aureus* (7 mm) *P. aeruginosa* (7 mm), *K. pneumoniae* (8 mm) y *E. coli* (7 mm).

**Palabras clave:** *Vitis vinifera* L., actividad antibacteriana, extractos, tamizaje fitoquímico.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente, la resistencia bacteriana se encuentra en aumento y representa serios retos para el tratamiento de infecciones tanto adquiridas en la comunidad como en los hospitales, así como un reto terapéutico que deja pocas posibilidades para el tratamiento de estas infecciones. La resistencia a los antimicrobianos supone una amenaza a la esencia misma de la medicina moderna y a la sostenibilidad de una respuesta de salud pública mundial eficaz ante la amenaza persistente de las enfermedades infecciosas. Los antimicrobianos eficaces son imprescindibles para las medidas preventivas y curativas, para proteger a los pacientes frente a enfermedades potencialmente mortales. Cuando los microbios se vuelven resistentes a los medicamentos, se reducen las opciones para tratar las enfermedades que provocan (Tafur, Torres y Villegas, 2008; Organización Mundial de la Salud, 2016).

Por tanto, se requiere del desarrollo de nuevas opciones de tratamiento para enfermedades que afectan la salud; los extractos de plantas o bien sus compuestos puros ofrecen una alternativa potencial para el desarrollo de nuevos tratamientos antimicrobianos que puedan ser utilizadas para el control de microorganismos patógenos, debido a la presencia de metabolitos o compuestos que inhiben el crecimiento o provocan la muerte de estos (Lavor, Matías, Alves, Santos, Figueredo, Lima y Coutinho, 2014; Upadhyay, Karumathil, Upadhyaya, Bhattaram y Venkitanarayanan, 2016). Entre estas plantas, se encuentra la especie *Vitis vinifera* L. (uva). La uva y sus derivados vínicos se consideran alimentos funcionales debido a que son ricos en compuestos fenólicos, en especial flavonoides, con propiedades antioxidantes. Tienen propiedades farmacológicas y bioquímicas, incluyendo

propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antiaterogénicas, antimicrobianas y antioxidantes (Jianmei y Mohamed, 2012).

La importancia de ésta investigación radica, en que en la actualidad se ha observado una importante resistencia a los antibióticos por parte de una gran cantidad de microorganismos, es por ello que se estudió el extracto de *Vitis vinifera* L., para encontrar una alternativa a esta resistencia bacteriana.

El objetivo de esta investigación fue, determinar la actividad antibacteriana y la composición química del extracto de la especie *Vitis vinifera* L., frente a cepas Gram positivas y Gram negativas

Éste proyecto de investigación fue compilado de la siguiente manera: El Capítulo I, denominado El Problema, está formado por los siguientes subtítulos: Planteamiento del Problema, Justificación de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones del proyecto a llevar a cabo. El Capítulo II, llamado Marco Teórico, donde se describen los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición de Términos, Operacionalización de las Variables e Hipótesis. El Capítulo III, titulado Marco Metodológico, consta de los siguientes subtítulos: Tipo de Investigación, Diseño de Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Procedimientos de la Investigación y Diseño de Análisis. El Capítulo IV, titulado Resultados y Discusiones. El Capítulo V, titulado Conclusiones y Recomendaciones.

## **CAPÍTULO I**

### **EL PROBLEMA**

#### **Planteamiento del Problema**

La llamada "Edad de Oro" de los antibióticos comienza en 1941 con la producción de la penicilina a gran escala, lo que revolucionó para siempre el campo de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, Alexander Fleming, desde que recibió el Premio Nobel de Medicina en el año 1945, advirtió sobre el fenómeno de la resistencia cuando expresó "Llegará un momento en que la penicilina podrá ser comprada por cualquiera en los negocios. Existe el peligro de que un hombre ignorante pueda fácilmente aplicarse una dosis insuficiente de antibiótico y, al exponer a los microbios a una cantidad no letal del medicamento, los haga resistentes" (Ventola, 2015).

Lamentablemente, el ser humano no concientizó esta alerta y muy pronto aparecieron los primeros aislamientos resistentes como parte de la evolución natural de las bacterias en su adaptación al medio ambiente. Este fenómeno se aceleró con el tiempo, por el uso inadecuado de antibióticos en diferentes ecosistemas, favorecido por la falta de normas y fiscalización del uso de estos; así como, tratamientos deficientes, ventas sin receta médica o a través de internet, comercialización de antimicrobianos falsificados o de mala calidad y la falta de control de residuos de antimicrobianos en plantas de producción (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2016).

En los años 60, la aparición del *Staphylococcus aureus* meticilina (oxacilina) resistente y *Pseudomonas* resistentes a gentamicina confirman la gravedad de la resistencia antimicrobiana. Este fenómeno se fue haciendo más dramático con el incremento de la resistencia a la ampicilina en los 70; la aparición de *Enterococcus* resistente a la vancomicina en los 90 y la extensión de la resistencia a diferentes familias de antimicrobianos acorde con su velocidad de uso y cuantía en la práctica médica la que ya involucra, incluso, a antibióticos de última generación (Errecalde, 2004; Fan, Li, Wang, He, Feble y Schwarz, 2016).

Desafortunadamente, la evolución en la producción de antimicrobianos se ha acompañado de un incremento marcado de la resistencia de bacterias, hongos, parásitos, incluso virus, a diferentes familias de estos. Por tal razón, la OMS ha designado la resistencia antimicrobiana (RAM) como una de los tres problemas más importantes que enfrenta la salud humana en este siglo al constituir una de las mayores amenazas para la salud mundial (Infectious Diseases Society of America IDSA, 2011).

Por tal motivo, actualmente se están buscando alternativas naturales para combatir la resistencia de las bacterias, específicamente se están realizando estudios con extractos de plantas para conocer el efecto que estos producen sobre los microorganismos. Los extractos vegetales son compuestos producidos de la obtención de sustancias biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, por el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado. De una misma planta, dependiendo de la parte de ella utilizada, del solvente y de la técnica de extracción, podremos obtener una diferente gama de sustancias (Santamaría, Martín y Astorga, 2015). Dichos extractos contienen componentes los cuales son llamados metabolitos secundarios, responsables del olor, del sabor y del color de la planta. Presentan propiedades biológicas,

muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, entre otros. Reciben también la denominación de productos naturales (Castillo y Martínez, 2007; Pérez y Ávalos, 2009).

Una vez descrita la situación actual del problema de investigación, las autoras formulan el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál será la actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas y Gram negativas y la composición química del extracto de la especie *Vitis vinifera* L?

### **Justificación e importancia de la Investigación**

La resistencia antimicrobiana tiene un impacto mundial desde que los microorganismos y genes resistentes no respetan fronteras geográficas o ecológicas. La diseminación ocurre a través de alimentos, agua, animales y/o personas por los viajes y comercio internacional con un alto volumen de tráfico aéreo. Además, por la trasmisión de genes de resistencia interespecies y la pobre higiene y saneamiento en comunidades y los hospitales. Un ejemplo de ello lo constituye la diseminación rápida mundial del clon ST258 de *K. pneumoniae* carbapenemasa KPC detectado, inicialmente, en Estados Unidos en 1996; el clon ST131 de *Escherichia coli* relacionado con resistencia a cefalosporinas y fluoroquinolonas y el clon USA 300 de *S. aureus* meticilina (oxacilina) resistente (Tzouveleki, Markogiannakis, Psichogiou, Tassios y Daikos, 2012; Peirano, Bradford, Kazmierczak, Badal, Hackel y Hoban, 2014; OMS, 2016; McClure y Zhang, 2017). Es evidente que la resistencia antimicrobiana, ha puesto en riesgo los logros de la medicina moderna, entre las infecciones más temibles en la

actualidad son las producidas por bacilos Gram negativos multirresistentes, para las cuales no quedan casi o ninguna opción de tratamiento. El desarrollo de antibióticos contra estas bacterias es particularmente difícil debido a la baja permeabilidad de la pared celular de estas, la variedad de bombas de eflujo (que activan el transporte de antibióticos fuera de la célula) y una serie de enzimas capaces de inactivar a todos los  $\beta$ -lactámicos (Marston, Dixon, Knisely, Palmore y Fauci, 2016).

Es necesario comenzar a adoptar medidas y acciones dirigidas a combatir el fenómeno de la resistencia bacteriana, basándonos primariamente en la promoción de estilos de vida saludables, y en la aplicación de métodos naturales o tradicionales de curación, los cuales, lejos de provocar efectos indeseables y resistencia bacteriana, inhiben el crecimiento de gérmenes patógenos, aumentan las defensas inmunológicas y favorecen el buen funcionamiento de nuestro organismo (Cabrera, Fradagas y Guerrero, 2005).

En vista de lo anteriormente expuesto, en la actualidad se están haciendo estudios sobre la actividad antibacteriana presente en las plantas como alternativa natural de fácil acceso para el tratamiento de las enfermedades infecciosas, producidas por bacterias. Las plantas medicinales a través de la historia se han utilizado de forma empírica para el alivio y la cura de síntomas y enfermedades (García, Morón y Larrea, 2010). Se han realizado muchas investigaciones, que han demostrado el poder antimicrobiano de los extractos de plantas, entre ellas la especie *Vitis vinifera* L., en Leal, Santos, Pinto, Queiroz, Rodríguez, Saavedra, y Gouvinhas, (2020); Radulescu, Buruleanu, Nicolescu, Olteanu, Bumbac, Holban y Simal (2020); Villanueva, (2020); Ali, Afrasiab y Anwar, (2019) y Rodríguez, (2019).

## **Objetivos de la investigación**

### **Objetivo general**

Determinar la actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas y Gram negativas y la composición química del extracto de la especie *Vitis vinifera* L.

### **Objetivos específicos**

- Obtener los extractos metanólicos de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L., mediante el método de maceración.
- Identificar los compuestos químicos provenientes de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L., mediante tamizaje fitoquímico.
- Comprobar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L., por medio de la técnica de difusión del disco en agar (Kirby-Bauer).

## **Alcances y Limitaciones de la Investigación**

### **Alcances**

Los alcances de una investigación se refieren a la amplitud de lo que se quiere saber, es decir, el conocimiento a adquirir durante el proceso de indagación (Hernández, Fernández y Batista, 2010). En tal sentido, el

alcance de esta investigación fue adquirir información sobre la actividad antibacteriana y la composición química del extracto de la especie *Vitis vinifera* L.

### **Limitaciones**

Durante el desarrollo de este trabajo se presentaron limitaciones relacionadas con los aspectos teóricos, técnicos y recursos económicos (Hernández, Fernández y Batista, 2010). En tal sentido, las limitaciones estuvieron relacionadas con los aspectos técnicos, tales como: cortes de electricidad, transporte público, internet, mantenimiento de equipo de computación (laptop), fallas en servicio de gas para la realización de la actividad antibacteriana y problemas presentados en la infraestructura del Instituto de Investigaciones para llevar a cabo el tamizaje fitoquímico.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPÍTULO II

### MARCO TEORICO

#### Trabajos previos

Villanueva, (2020). Realizó un trabajo de investigación titulado: Sinergia bactericida del extracto etanólico de *Vitis vinifera* con oxacilina sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *in vitro*. El objetivo de la investigación fue evaluar la sinergia bactericida del extracto etanólico concentrado de la semilla de *Vitis vinifera* (EEVV) con oxacilina (OXA) a 1 µg sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; considerándose 4 grupos: G1: extracto etanólico, G2: oxacilina, G3: combinación del extracto etanólico y OXA G4: grupo de control, con 10 repeticiones de cada grupo; obteniéndose los siguientes resultados: los halos de inhibición del EEVV, mostraron una media de inhibición de 34,60 mm siendo mayor que lo considerado por el CLSI (>13 mm), pero no supera a la OXA (43,60 mm). La combinación de EEVV más OXA no evidenció tener efecto sinérgico (43,10 mm). La prueba post ANOVA de Tukey, determinó que no existe diferencia entre OXA sola y la combinación con EEVV. La autora concluyó que, el extracto etanólico de *Vitis vinifera* al 100 % combinado con oxacilina, no evidencia halos de inhibición mayores a los obtenidos con OXA, sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Esta investigación tiene relación con el trabajo en estudio, ya que en ambas investigaciones se estudió la actividad antibacteriana de la semilla de *Vitis vinifera*.

Ali, Afrasiab, y Anwar (2019). Realizaron un trabajo de investigación titulado: Actividad antibacteriana de extractos de hojas de siete cultivares de uva contra seis cepas bacterianas. El objetivo de la investigación fue evaluar las propiedades antibacterianas del extracto metanólico de hojas de diferentes cultivares de uva frente a seis cepas bacterianas. En el estudio se determinó la actividad antibacteriana de diferentes concentraciones (25, 50 y 100 mg/mL) de extractos metanólicos de hojas de siete cultivares de uva (Red Globe, Autumn Royal, Crimson, Thompson, Sundarkhani, Perlette y King's Ruby) probado contra seis cepas de bacterias (*Proteus sp.*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium septicum*) utilizando el método de difusión en pozo de agar. Los resultados mostraron que, el extracto metanólico de las hojas de todos los cultivares tienen actividad antibacteriana significativa, inhibiendo el crecimiento de las seis cepas bacterianas probadas. Los halos de inhibición frente a las diferentes bacterias oscilaron entre 12,6 mm y 29,6 mm. Las zonas de inhibición más altas fueron producidas por *Proteus sp.* (29,6 mm), *Pseudomonas sp.* (27,0 mm), *Staphylococcus aureus* (27,0 mm), *E. coli* (26,0 mm), *Streptococcus viridans* (23,3 mm) y *Clostridium septicum* (21,0 mm) a concentraciones de 100 mg/mL de los diferentes cultivares. Los autores concluyeron que, los extractos metanólicos de hojas de *Vitis vinifera* L., tienen actividad inhibitoria contra todas las bacterias probadas y merecen una mayor investigación. Este estudio se relaciona con esta investigación porque en ambos se estudió la actividad antibacteriana frente a bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus*

Rodríguez, (2019). Realizó un trabajo de investigación titulado: Efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de las semillas de *Vitis vinifera* (uva) y *Vaccinium corymbosum* (arándano) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Trujillo-2019. El objetivo de la investigación fue determinar el efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de las semillas de *Vitis*

*vinifera* (Uva) y *Vaccinium corymbosum* (arándano) frente a cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, Trujillo-2019. El estudio se llevó a cabo en una muestra de 15 placas con cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, la bacteria fue expuesta a extractos hidroetanólicos de las semillas de uva y semillas de arándano al 15 y al 30 %, además se evaluó el extracto hidroetanólico mixto de las semillas de uva más arándano al 15 y 30 % y se comparó con los controles positivo (clorhexidina al 0,12 %) y negativo (SSF). El efecto antibacteriano se midió por medio de los halos de inhibición, con un vernier. Los resultados indicaron que, el promedio de los halos de inhibición para el extracto de las semillas de uva fue de 10,07 mm (15 %) y 12,11 mm (30 %); del extracto de las semillas de arándano fue 9,35 mm (15 %) y 13,41 mm (30 %); del extracto hidroetanólico mixto de las semillas de uva más arándano fue de 11,29 mm (15 %) y de 13,32 mm (30 %). Se concluyó que, el extracto hidroetanólico de las semillas de arándano al 30 % obtuvo mayor efecto antibacteriano en comparación de las demás concentraciones. Esta investigación se relaciona con el presente estudio en la determinación de la actividad antibacteriana

### **Antecedentes Históricos o Epistemológicos de la Especie *Vitis vinifera* L.**

La vid (*Vitis vinifera* L.) es una especie originaria de Europa y los restos arqueológicos más antiguos correspondientes a semillas datan de 6.000 años a. C. al sureste de Georgia. Fue introducida en América durante la colonización española y su cultivo fue difundido en gran medida por los frailes para la producción de vino, necesario para celebrar la misa. En América, las primeras vides se plantaron en la actual República Dominicana y de allí fueron llevadas a México y Perú, pasando desde este último país a Chile en el año 1548 aproximadamente (Poblete, Vargas, Lanino y Zúñiga,

2017). El cultivo de la vid (*Vitis vinifera* L.) es uno de los cultivos más antiguos y de mayor importancia económica. En el 2014 se cultivaron más de 7.5 millones de hectáreas de vid en el mundo, obteniendo más de 271 millones de hectolitros para la producción de vinos (Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2014; Borja, García, Reyes y Arellano, 2016).

## **Bases teóricas**

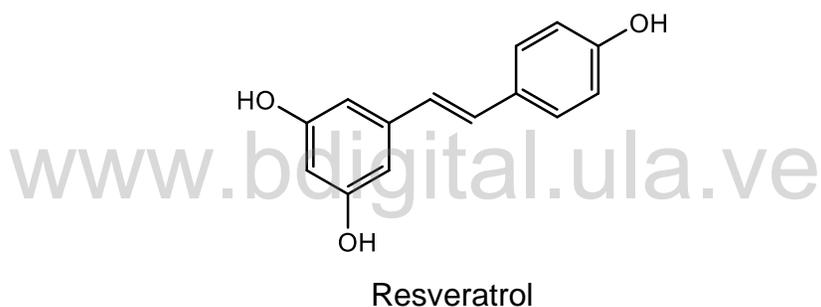
### **Familia Vitaceae**

#### ***Descripción botánica de la familia Vitaceae***

Familia de arbustos trepadores mediante zarcillos, a veces arbustos erectos y árboles. Los zarcillos pueden ser brotes o inflorescencias modificadas. Poseen hojas esparcidas, compuestas o simples, pero profundamente lobuladas, con estípulas, y abundantes zarcillos derivados de modificaciones en las inflorescencias. Se distribuyen por las regiones templado-cálidas. Las flores, muy pequeñas, son actinomorfas, unisexuales o hermafroditas, muestran una estructura pentámera (raramente tetrámera), y están provistas de un disco en el ápice del pedúnculo. El perianto es precozmente caduco y está formado por 5 sépalos verduzcos muy reducidos, 5 pétalos libres en la base y soldados en el extremo formando una especie de capucha que cae por el alargamiento de los estambres (*Vitis vinifera*). Estos últimos están en número de 5, mientras el gineceo, formado por 2 carpelos, cada uno con 2 óvulos, es súpero y bilocular. El fruto es una baya carnosa y contiene de 2 a 4 semillas oleaginosas (Sozzi, 2008).

### **Composición química de la familia Vitaceae**

*Vitis vinifera* es una planta que pertenece al orden Vitales y su familia es Vitaceae. Los frutos de la vid y los productos derivados de los mismos constituyen la principal fuente de estilbenos disponibles en la naturaleza. Los estilbenos sintetizados en plantas de la familia Vitaceae se denominan viniferinas. La estructura química de las viniferinas se basa en el esqueleto de un hidroxiestilbeno, concretamente el 3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno (resveratrol) (Figura 1) (Almagro, 2011).



**Figura 1. Estructura química del Resveratrol aislado de la familia Vitaceae. Tomado y modificado de Almagro, 2011.**

Analizando la familia Vitaceae teniendo en cuenta la gran variedad de subespecies de uvas, los compuestos activos pueden variar sobretodo en la fórmula cuantitativa que en la cualitativa. Entre los componentes principales destacan los taninos que son los responsables de darle el color característico. Los diferentes componentes de esta familia los podemos clasificar de la siguiente manera: Flavonoides, especialmente en frutos y hojas, taninos condensados (procianidina, antocianidinas), abundan en las semillas y hollejos especialmente, aunque se pueden encontrar en las hojas

y raíces, ácidos orgánicos, vitaminas, compuestos nitrogenados, en los frutos, ácidos volátiles, ceras, lípidos, etc (Espinoza y Espinoza, 2004).

### ***Actividad biológica de la familia Vitaceae***

El resveratrol aislado de la familia Vitaceae tiene efectos beneficiosos para las plantas ya que presenta actividad antifúngica y antimicrobiana, además tiene numerosas propiedades saludables para el ser humano entre las que destaca su actividad anti-hiperoxidativa (anti-envejecimiento), actividad quimio-preventiva contra el cáncer, actividad vasodilatadora y anti-agregación plaquetaria, actividad anti-hepatotóxica y actividad reguladora de triacilglicéridos (Almagro, 2011).

### **Género *Vitis***

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

La uva o grano de uva es el nombre que recibe el fruto que crece formando racimos de la vid común o vid europea. Corresponde al género *Vitis* perteneciente a familia de las Vitaceae, que incluye cerca de 600 especies de arbustos, por lo general trepadoras, que producen frutos en baya, propios de países cálidos y tropicales. Dentro de este género se incluyen 20 especies cultivadas por sus frutos, y algunas especies se cultivan para el consumo de sus hojas como cualquier vegetal (Hidalgo, Gómez, Rojas, Soliz, Soliz, Rubí y Dayra, 2016).

### ***Descripción botánica del género Vitis***

El género *Vitis* está formado por trepadoras leñosas, en general poligamodioicas. Corteza sin lenticelas que se desprende en tiras, zarcillos en general ramificados sin discos adhesivos. Hojas alternas, opuestas a los

zarcillos, de enteras a palmatisectas irregularmente dentadas, caducas; estípulas caducas. Inflorescencias en panícula opuestas a las hojas. Flores unisexuales en la subespecie silvestre o hermafroditas en la mayoría de las variedades de cultivo. Receptáculo floral con disco nectarífero intraestaminal formado por cinco lóbulos. Sépalos soldados. Pétalos soldados en el ápice formando un capuchón caedizo en la antesis. Estambres en general 5. Carpelos 2, con 2 primordios seminales por lóculo; estigma generalmente bilobado. Fruto en baya, con 1-4 semillas, ausentes en variedades apirenas. Semillas elípticas o piriformes, con un pico prominente en las variedades de cultivo, de color marrón (Wan, Schwaninger, Baldo, Labate, Zhong y Simón, 2013).

### ***Composición química del género Vitis***

Los antocianos o antocianinas representan una parte importante tanto cuantitativa como cualitativamente de los flavonoides de las bayas de las uvas. Entre las antocianidinas del género *Vitis* se encuentran la cianidina, la peonidina, la petunidina, la delfinidina y la malvidina. Los flavanoles están presentes en la uva en estado de monómeros y en formas más o menos polimerizadas que constituyen los taninos catéquicos. Los principales flavanoles monoméricos de la uva son la catequina y su isómero, la epicatequina. Este último se puede encontrar en forma de éster gálico. Sus formas oligoméricas y poliméricas, que pueden comprender un número muy elevado de unidades, se designan por el término “taninos” o “proantocianidinas”, a causa de su propiedad de liberar antocianidinas en medio ácido por ruptura de las uniones intermonoméricas. Hay 2 grupos mayoritarios de taninos en la uva: las procianidinas, derivadas de catequina y epicatequina; y los prodelfinidoles, derivados de galocatequina y epigalocatequina (Valls, Lampreave, Nadal y Arola, 2000).

## Especie *Vitis vinifera* L.

### **Descripción botánica de la especie *Vitis vinifera* L.**

La especie *Vitis vinifera* L. (Figura 2), es una planta trepadora que se propaga por estacas. El tronco es retorcido y áspero, del que parten ramas jóvenes muy flexibles, denominadas sarmientos. Las hojas se disponen sobre estas ramas en forma alterna, son grandes (14 por 12 cm), acorazonadas en la base, palmeadas, lobadas, dentadas, con nervadura reticular, palmatinervada, con peciolo largo. Opuestos a cada hoja, se presentan zarcillos arrollados que al enroscarse en algún soporte permite a las ramas trepar sobre éste. Las flores son perfumadas, en racimos, hermafroditas o unisexuales, se componen de un cáliz verde, ensanchado a manera de platillo, incospicuos, con 5 sépalos, gamosépalo, la corola presenta 5 pétalos blancos o verdes, gamopétala, los cuales caen al abrirse la flor (caducos) dejando 5 estambres al descubierto, gineceo unicarpelar con un solo estigma. El fruto es una baya redonda o elipsoidal, con el epicarpio de color verde, rosado o violáceo tan oscuro que parece negro, presenta 1 a 4 semillas piriformes u ovoides con dos cotiledones (Hidalgo y cols, 2016)



**Figura 2. Especie *Vitis vinifera* L.  
Tomado y modificado de Hidalgo y cols, 2016.**

Hidalgo y cols (2016), describieron la taxonomía de *Vitis vinifera* L. (Tabla 1).

**Tabla 1. Taxonomía de la especie *Vitis vinifera* Linneo 1753.**

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Phylum</b>	Fanerógama
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase</b>	Rosidae
<b>Orden</b>	Vitales
<b>Familia</b>	Vitaceae
<b>Género</b>	<i>Vitis</i>
<b>Especie</b>	<i>Vitis vinifera</i> L.

**Tomado y modificado de Hidalgo y cols, 2016.**

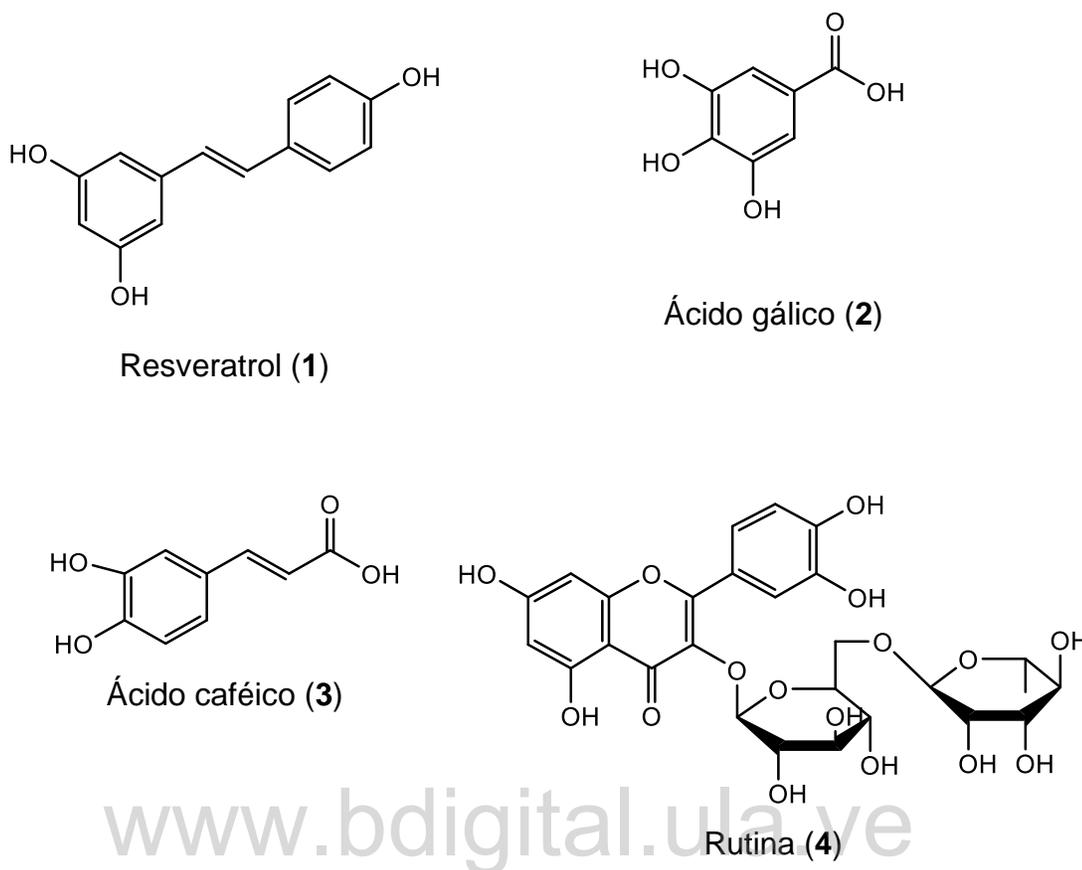
#### ***Distribución geográfica de la especie Vitis vinifera L.***

Habitano principalmente en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, en menor número se hallan en regiones templadas. La vid se cultiva ahora en las regiones cálidas de todo el mundo, en especial en Europa Occidental, los Balcanes, California, Australia, Suráfrica, Chile y Argentina, zonas templadas comprendidas entre los 20 °C y 50 °C al Norte Sur del Ecuador, donde están bien definidas las cuatro estaciones del año. Se introdujo en la costa oriental de América del Norte en la época colonial, pero el intento fracasó a consecuencia de los ataques de los parásitos y las enfermedades. Más tarde se obtuvieron variedades resistentes como Concord y Delaware, fruto de la hibridación de la vid europea con especies norteamericanas (Sozzi, 2008).

### **Composición química de la especie *Vitis vinifera* L.**

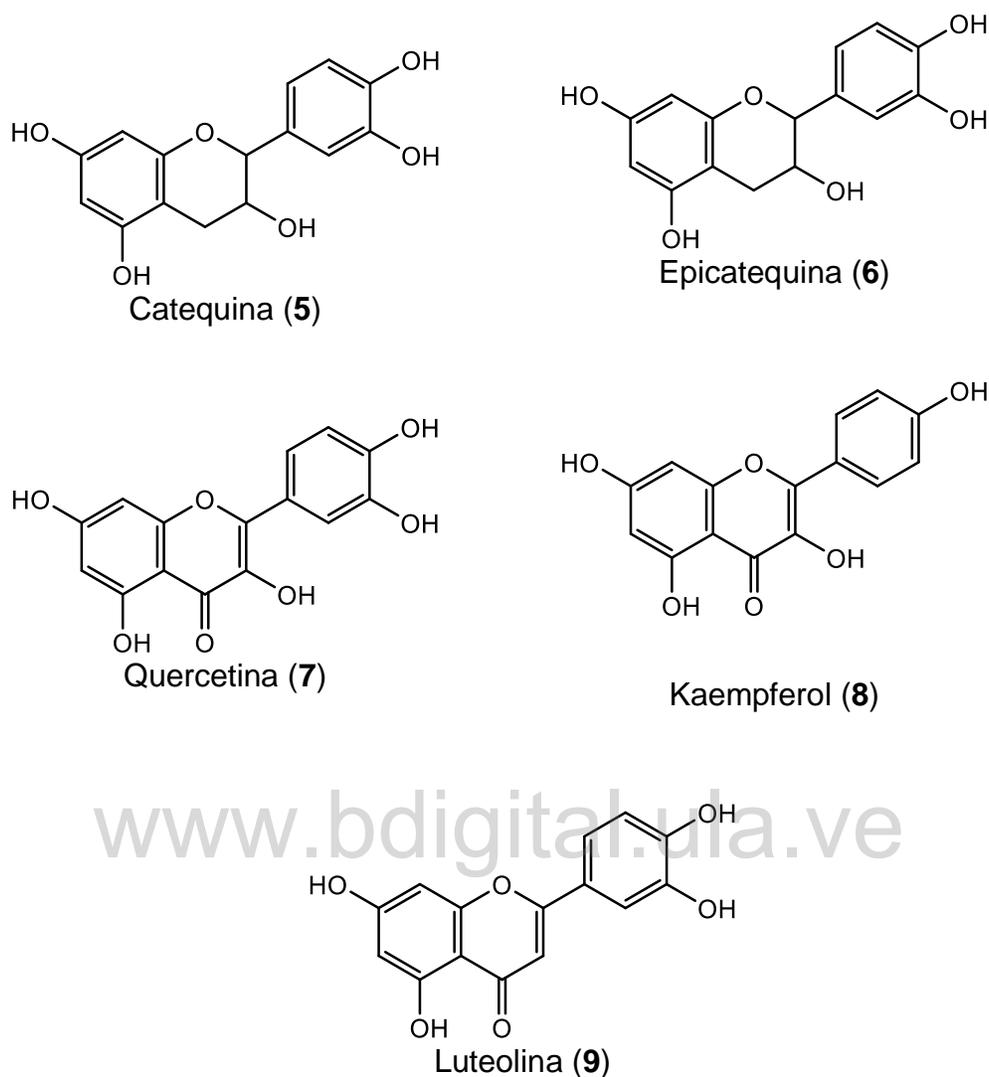
Podemos diferenciar tres tipos de tejido en la uva: la piel, la pulpa y la semilla. La piel y la semilla contienen moléculas polifenólicas mientras que la pulpa es rica en azúcares. La piel de la uva contiene entre 50-100 microgramos de resveratrol por gramo. El resveratrol **(1)** (Figura 3) es un polifenol que pertenece a la familia de los estilbenos y que posee propiedades antioxidantes, antitrombogénicas, neuro y cardioprotectoras y antiinflamatorias (Ozaki, Uchida, Furukawa, Akashi, Niwa, Nona y Nishioka, 1990; Kato, Tonhi y Clemente, 2012). Las hojas de *Vitis vinifera*, presentan resveratrol el cual se puede encontrar de 0,04 a 39,5  $\mu\text{g/g}$  de peso fresco; además de ácido gálico **(2)**, ácido caféico **(3)** y rutina **(4)** (Figura 3) (Tobar, Franco, Morales y Cruz, 2009).

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



**Figura 3. Estructura química del Resveratrol, Acido Gálico, Acido Caféico y Rutina aisladas de la especie *Vitis vinifera* L. Tomado y modificado de Ozaki y cols, 1990.**

Las semillas de uva son ricas en polifenoles con propiedades antioxidantes como las catequinas (5), epicatequina (6), quercetina (7), kaempferol (8) y luteolina (9) (Figura 4) (Ozaki y cols, 1990; Kato y cols, 2012).

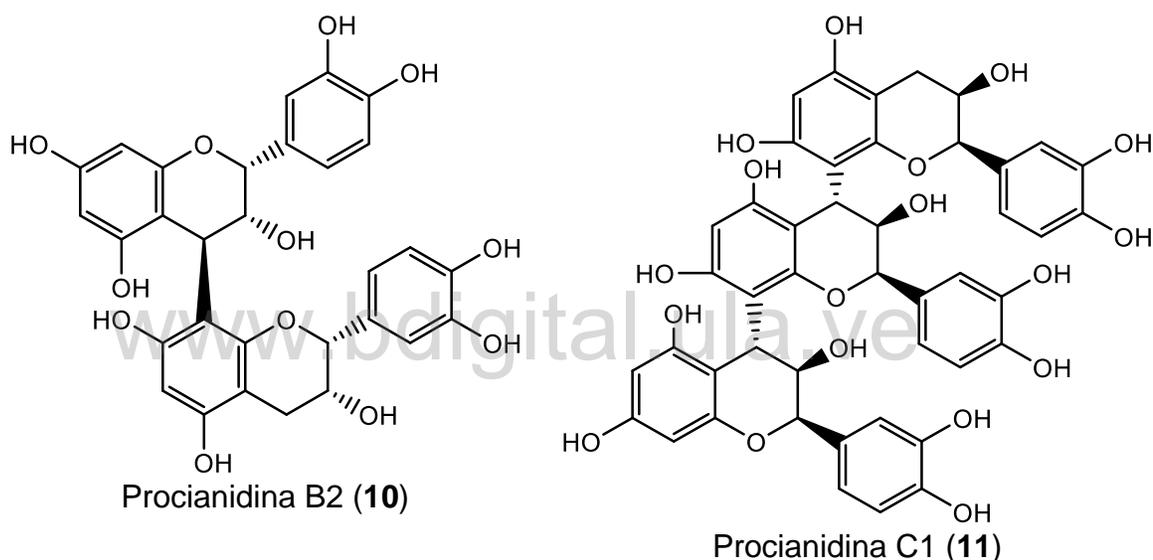


**Figura 4. Estructura química de los polifenoles aislados de la especie *Vitis vinifera* L.**

**Tomado y modificado de Ozaki y cols, 1990.**

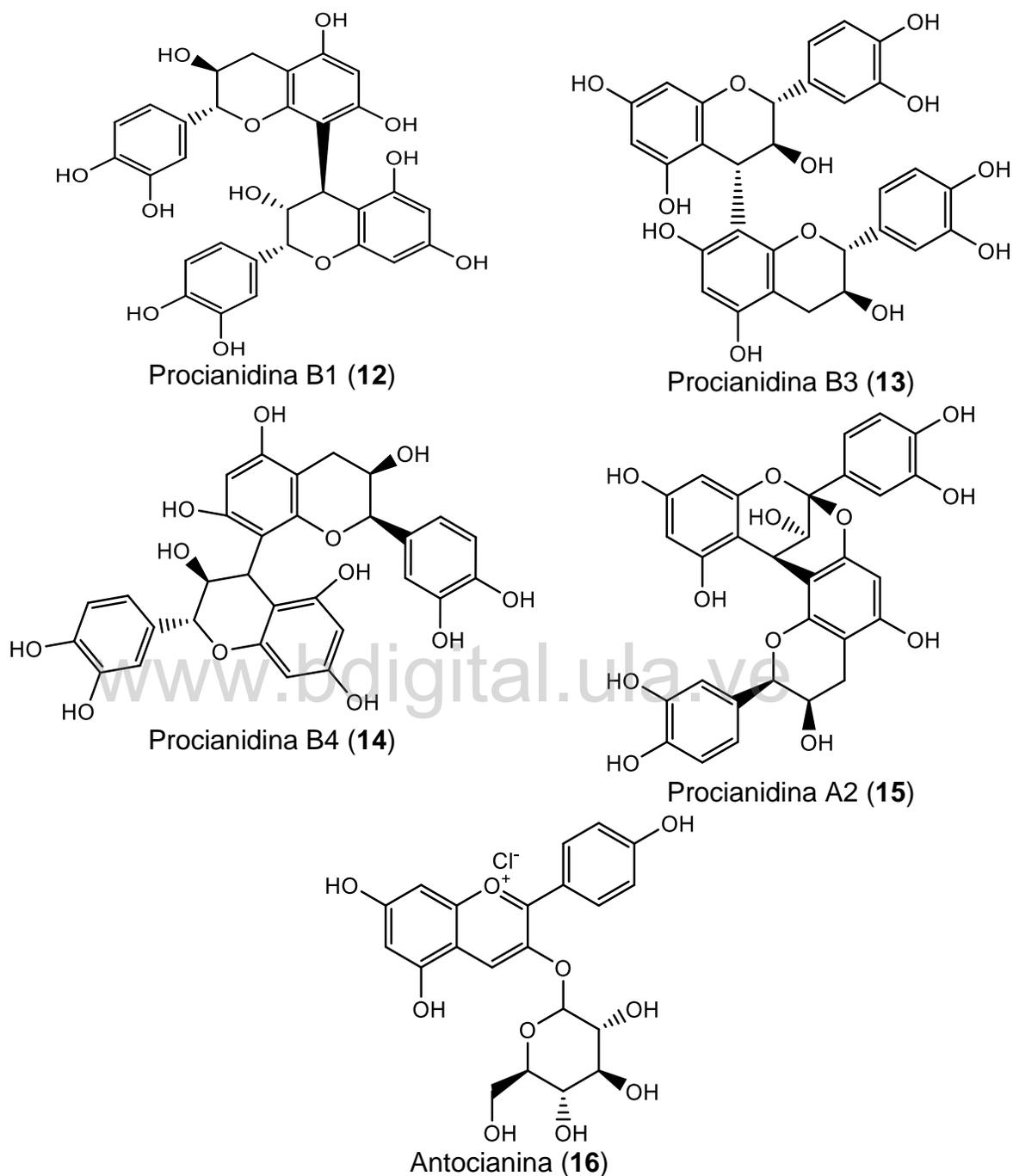
Además, estos compuestos forman dímeros, trímeros y tetrámeros (proantocianidinas polifenólicas), que también se encuentran en diferentes partes de la planta. Entre las numerosas proantocianidinas identificadas en la semilla, destacan, por su abundancia el dímero procianidina B2 (**10**) y el trímero procianidina C1 (**11**). Otras procianidinas presentes en la semilla de

uva son los dímeros procianidina B1 (**12**), procianidina B3 (**13**), procianidina B4 (**14**) y procianidina A2 (**15**), así como leucoantocianidinas (oligómeros y polímeros) y antocianinas (**16**) (Figura 5) que se encuentran principalmente en frutos flores y hojas. Los niveles de antocianinas en las uvas están asociados no solo con la porción de la fruta analizada, sino que también pueden verse influenciados por factores como el método de cultivo, los aspectos climáticos y los factores fisicoquímicos como el pH y la temperatura (Ozaki y cols, 1990; Kato y cols, 2012; Leguizamón, González y Báez, 2005).



**Figura 5. Estructura química de proantocianidinas polifenólicas aisladas de la especie *Vitis vinifera* L.**

Tomado y modificado de Ozaki y cols, 1990.



**Continuación Figura 5. Estructura química de proantocianidinas polifenólicas aisladas de la especie *Vitis vinifera* L.**

**Tomado y modificado de Ozaki y cols, 1990).**

Los compuestos fenólicos, son una combinación de proantocianidinas, los cuales dan la pigmentación de la uva. Entre ellos se hallan taninos, flavonoides, antocianos y ácidos fenólicos. Estos compuestos polifenólicos en *V. vinifera* han evidenciado ser responsables de las funciones antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes y antitumorales. Las proantocianidinas de *V. vinifera* tienen un papel como metabolitos de defensa contra herbívoros y patógenos (Calapai, Bonina, Bonina, Rizza, Mannucci, Arcoraci y cols, 2017).

Las semillas contienen taninos y ácidos fenólicos; la pulpa contiene ácidos fenólicos, algunos taninos, excepcionalmente antocianos y los hollejos contienen taninos, antocianos, ácidos fenólicos y flavonoides (Reynier, 2012).

La baya contiene metabolitos secundarios bioactivos, especialmente los polifenoles como las catequinas, ácidos fenólicos y antocianinas (Riedel Akumo, Min, Smetanska y Neubauer, 2022).

### ***Usos etnobotánicos de la especie Vitis vinifera L.***

Las uvas constituyen uno de los frutos más apreciados, nutritivos y ricos en vitamina C conocidos. Las uvas secas llamadas pasas son también nutritivas y de buen sabor. Pero la mayor importancia sin dudas de *Vitis vinifera* L., reside en su utilización para la elaboración de vinos, alcoholes y vinagres, a partir de la fermentación del jugo de sus frutos. El cultivo de la vid y la fabricación del vino son tan antiguos que es imposible precisar con exactitud el origen, cronología y lugar. Actualmente su elaboración es tan importante que constituye una verdadera disciplina científica conocida como "Enología" (Sozzi, 2008).

### ***Actividad biológica de la especie Vitis vinifera L.***

La uva y sus derivados vínicos se consideran alimentos funcionales debido a que son ricos en compuestos fenólicos, en especial flavonoides, con propiedades antioxidantes. Tienen propiedades farmacológicas y bioquímicas, incluyendo propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antiaterogénicas (anti-formador de ateromas), antimicrobianas y antioxidantes. La capacidad anticancerígena de los compuestos fenólicos se ha relacionado con los cánceres de colon, esófago, pulmón, hígado, mama y piel (Jianmei y Mohamed, 2012).

Por la facilidad que ofrece la uva para ser consumida, los beneficios que brinda a la salud y el dulzor que proporcionan sus granos, hacen de ella un alimento ideal para las personas de todas las edades. Aunado a lo anterior, la uva es una fruta rica en potasio, magnesio, calcio, ácido ascórbico, fitoquímicos, fibra dietética, y ácidos grasos insaturados. A la uva se le atribuyen propiedades laxantes, depurativas, diuréticas y antitumorales, por lo tanto, cumple con las características para ser considerado como alimento funcional (Aviña, Carranza, Vásquez y Carranza, 2016).

### **Extractos vegetales**

Son compuestos producidos de la obtención de sustancias biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, por el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado. De una misma planta, dependiendo de la parte de ella utilizada, del solvente y de la técnica de extracción, podremos obtener una diferente gama de sustancias (Santamaría, Martín y Astorga, 2015).

## **Métodos de obtención de los extractos vegetales**

### ***Maceración***

Es un procedimiento en el que se coloca el material vegetal, desecado en un recipiente adecuado con tapa. Se agrega suficiente cantidad de disolvente o mezcla de disolventes, hasta tapar totalmente el material vegetal. Se deja en reposo a temperatura ambiente o en un sitio tibio durante el tiempo indicado (3 a 7 días), hasta que el material soluble se disuelva. Se agita con frecuencia durante el tiempo de maceración. Luego se filtra y estruja el marco para retirar el disolvente. Para completar a volumen se hace pasar disolvente hasta alcanzar el volumen deseado. La operación se puede repetir con igual o diferente disolvente (Nadinic, Bandoni, Martino y Ferraro, 2016).

### ***Percolación***

Se humedece 1 Kg del material vegetal con una cantidad adecuada del disolvente prescrito para humectarla y embeberla bien. Se deja en maceración en un recipiente por un tiempo determinado. Luego se empaca un percolador de tamaño adecuado con el material vegetal. Se agrega suficiente disolvente hasta obtener una columna en el percolador. Se tapa el orificio inferior, se cubre el percolador y se lo deja macera durante 48 horas. Pasado este tiempo se abre la canilla inferior y se comienza a colectar el percolado, reservando las primeras fracciones. Se continúa la percolación agregando más cantidad de disolvente hasta el agotamiento del material vegetal (Nadinic y cols, 2016).

### ***Decocción***

Se obtiene por calentamiento a ebullición del material vegetal con el disolvente o con agua. Generalmente se emplea para materiales vegetales cuyas partes usadas sean duras como cortezas, tallos, raíces, y que contengan principios solubles en el disolvente y que sean termoestables (Nadinic y cols, 2016).

### ***Infusión***

Este proceso se utiliza para materiales vegetales con principios solubles en agua. Son extemporáneas, fácilmente atacables por hongos y bacterias, al igual que la decocción. Se prepara en una proporción de 50 g de material vegetal por litro de agua. Primero se embebe el material vegetal con agua caliente y se lo deja en reposo por 15 minutos, luego se agrega el resto de agua hirviendo y se deja reposar por 30 minutos. Se filtra y se exprime bien el marco. Se hace pasar agua hirviendo por el marco hasta completar los 1.000 mL. Esta preparación al igual que la decocción debe ser refrigerada (en cuyo caso se conserva solo por unos días), salvo que se congele o se agregue algún conservante (Nadinic y cols, 2016).

## **Productos Naturales**

Los productos naturales son compuestos sintetizados por los organismos vivos, que participan en los mecanismos de defensa y supervivencia por lo que son considerados como metabolitos secundarios; es importante conocer que no tienen utilidad aparente para el ser que lo sintetiza a diferencia de los metabolitos primarios que presentan una utilidad definida (Marcano y Hasegawa, 2002).

El reconocimiento de metabolitos secundarios se realiza por medio de pruebas fitoquímicas preliminares, las cuales son una prueba química de caracterización consistente en una reacción química que produce alteración rápida en la estructura molecular de un compuesto, por ejemplo, la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular, o la formación de un complejo, lo cual da por resultado una manifestación sensible como el cambio de un color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas, dándonos indicios de la presencia o ausencia de un metabolito secundario en particular (Martínez, Valencia y Jiménez, 2008). A continuación, se describen algunos productos naturales o metabolitos secundarios.

### ***Alcaloides***

Los alcaloides son sustancias básicas que contienen nitrógeno en un anillo heterocíclico, son derivados de aminoácidos, presentan distribución taxonómica limitada y se encuentran en plantas superiores como sales de un ácido orgánico. Atendiendo a su solubilidad, propiedad empleada para extraerlos y purificarlos, la base del alcaloide es soluble en solventes orgánicos y pueden formar sales solubles en solventes polares cuando se encuentra en ácidos minerales diluidos (Martínez y cols, 2008).

### ***Flavonoides***

Los flavonoides son compuestos polifenólicos con quince átomos de carbono, cuya estructura consta de 2 anillos de benceno unidos por una cadena lineal de tres carbonos. El esqueleto de los flavonoides se representa por el sistema C6–C3–C6 (Martínez y cols, 2008).

### ***Saponinas***

Las saponinas son un grupo de glicósidos solubles en agua, que tienen la propiedad de hemolizar la sangre y disminuir la tensión superficial del agua, formando espuma abundante. Las saponinas por hidrólisis se desdoblan en carbohidratos y una aglicona llamada sapogenina (Martínez y cols, 2008).

### ***Cumarinas***

Las cumarinas son un grupo muy amplio de principios activos fenólicos y tienen en común la estructura química de 1-benzopirán-2-ona. Se caracterizan porque presentan fluorescencia bajo la luz ultravioleta a 365 nm (Martínez y cols, 2008).

### ***Quinonas***

Las quinonas son dicetonas cíclicas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles, siendo reversible esta reacción. Las quinonas derivan su nombre del miembro más simple de la serie p-benzoquinona obtenida en 1838 por Woskresensky, como producto de oxidación del ácido quínico (Martínez y cols, 2008).

### ***Taninos***

Los taninos son productos de excreción de muchas plantas, involucrados en mecanismos de defensa de las mismas, contra organismos parásitos. Se encuentran más comúnmente en hojas, ramas y debajo de la corteza. Químicamente los taninos son polímeros de polifenoles, sustancias con alto peso molecular (comprendido entre 500 a 3000), se clasifican en: Taninos Hidrosolubles o Pirogálicos: Son ésteres fácilmente hidrolizables formados

por una molécula de azúcar (en general glucosa) unida a un número variable de moléculas de ácidos fenólicos (ácido gálico o su dímero, el ácido elágico) (Martínez y cols, 2008).

### **Tamizaje Fitoquímico**

El tamizaje fitoquímico o "screening" fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y, a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo (Sharapin, 2000).

A continuación, se presentan los fundamentos de cada una de las pruebas que se llevaron a cabo en este estudio:

#### ***Pruebas para determinar alcaloides***

Ensayo de Wagner, Mayer y Dragendorff: La extracción de alcaloides se basa en que habitualmente se encuentran en estado de sales, en su basicidad y en disolventes orgánicos; puede llevarse a cabo con un disolvente (diclorometano, cloroformo, benceno o dióxido de etilo) en medio alcalino o en medio ácido con una disolución alcohólica o hidroalcohólica acidificada (Bruneton, 2001).

### ***Prueba para determinar triterpenos/esteroles***

Ensayo de Lieberman-Bouchard: está compuesto por una mezcla de ácido sulfúrico y anhídrido acético que producen sustancias cromóforas con el ciclopentano perhidrofenantreno. La positividad de la prueba se observa por la aparición de un color rojo, verde o azul (Domínguez, 1979).

### ***Prueba para determinar compuestos fenólicos***

Ensayo de tricloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ): Las sustancias precipitan en presencia de cloruro férrico. Esta respuesta se debe al efecto producido por el ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo, provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (Domínguez, 1979).

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

### ***Prueba para determinar saponinas***

Ensayo de la espuma: el ensayo de espuma permite reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroidal como triterpénicas. La característica estructural de estos compuestos le confiere un carácter anfótero que les permite actuar como tenso activos y formar espuma que es estable por lo menos 30 segundos (Payo, Oquendo y Oviedo, 1996; Carvajal, Uribe, Sierra y Rueda, 2009).

### ***Prueba para determinar taninos***

Ensayo de la gelatina: Esta prueba permite reconocer los compuestos químicos llamados taninos, estos son polímeros polifenólicos que

tienen la propiedad de desnaturalizar las proteínas de la solución de gelatina produciendo un precipitado (González, 2011).

### ***Pruebas para determinar flavonoides***

Ensayo de Shinoda: permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal. El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos (Payo y cols, 1996).

Prueba de NaOH al 10%: la aparición de amarillo a rojo (xantonas y/o flavonas), café a púrpura rojizo (chalconas) y azul (antocianinas) (Domínguez, 1979).

### ***Prueba para determinar cumarinas***

Prueba de Hidróxido de Amonio concentrado ( $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado): 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 amoniaco (fluorescencia azul-violeta) (Bruneton, 2001).

### ***Prueba para determinar antraquinonas***

Ensayo de Borntrager: Para la identificación de antraquinonas se emplea el ensayo de Borntrager. Si la fase acuosa alcalina se colorea de rosado a rojo, el ensayo se considera positivo (Payo y cols, 1996).

### ***Prueba para determinar quinonas***

Prueba de Ácido Sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$  concentrado): una pequeña cantidad de muestra se disuelve en  $H_2SO_4$  [ ]. La prueba es positiva al aparecer una coloración roja-púrpura (Bucay, 2009).

### ***Prueba para determinar lactonas sesquiterpenos***

Ensayo de Baljet: permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico. En estas condiciones se considera la presencia de esta familia de compuestos por la aparición de una coloración o un precipitado rojo (Payo y cols, 1996).

## **Bacterias**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

En la naturaleza existen 2 clases de células, las procariontas y las eucariotas; las primeras son evolutivamente más antiguas, solo se hallan como seres unicelulares y constituyen las bacterias. El resto de los organismos vivos unicelulares y pluricelulares está formado por células eucariotas (Guillem, 2006).

### ***Características generales de las bacterias***

Las bacterias poseen un tamaño medio que oscila entre 2 y 10  $\mu m$ . Su citoplasma está repleto de ribosomas; el material genético, constituido por ácido desoxirribonucleico (ADN), forma un conglomerado compacto (nucleoide) carente de membrana nuclear. La membrana citoplasmática está rodeada externamente por una pared dura y elástica, de peptidoglicano (glicopéptido, mureina), que confiere la forma a la célula. Algunas bacterias

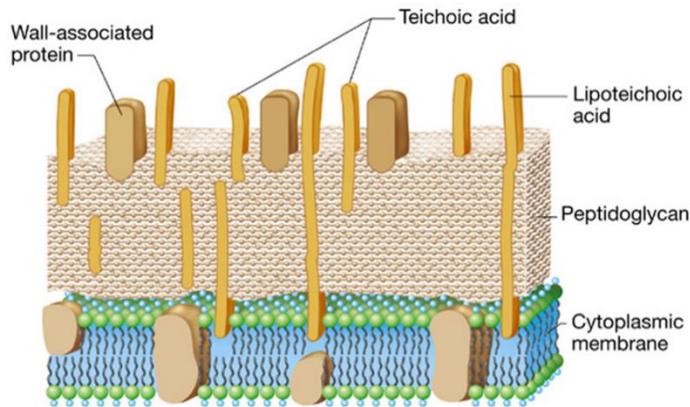
tienen una capsula rodeando la pared; también pueden poseer flagelos, que facilitan su movilidad, y fimbrias (pili), que desarrollan varias funciones, fundamentalmente de adherencia. En las bacterias, además del ADN cromosómico (nucleoide) puede existir ADN extracromosómico formando plásmidos. Algunas estructuras bacterianas, como el lipopolisacárido de la pared, el polisacárido capsular y las proteínas de los flagelos, son antigénicas, por lo que inducen la producción de anticuerpos cuando infectan al hombre. Los diferentes grupos bacterianos poseen diversas capacidades metabólicas (litoautótrofas, fotoautótrofas, organoheterótrofas, etc.), el grupo que tiene interés en medicina es el que posee un metabolismo heterótrofo; es decir, requiere sustratos orgánicos como fuente de energía y de carbono. Para el desarrollo de su metabolismo algunas bacterias necesitan oxígeno (bacterias aerobias); para otras el oxígeno resulta letal (bacterias anaerobias) y algunas pueden multiplicarse tanto en presencia como en ausencia de oxígeno (bacterias facultativas) (Guillem, 2006).

www.bdigital.ula.ve

### **Clasificación de las bacterias**

#### ***Bacterias Gram positivas***

Las bacterias Gram positivas poseen una pared que está constituida por varias capas peptidoglicano que conforma una estructura rígida y gruesa. Además, contiene ácidos teicoicos, que están compuestos principalmente por un alcohol y fosfato. Existen dos clases de ácidos teicoicos: el ácido lipoteicoico que abarca toda la capa del peptidoglicano y está unida a la membrana plasmática, y el ácido teicoico mural, que está unido a la capa de peptidoglicano (Figura 6). Estos ácidos son responsables de una gran parte de la especificidad antigénica de la pared celular y en consecuencia permiten la identificación de las bacterias mediante ciertas pruebas de laboratorio (Tortora, Funke y Case, 2007).



**Figura 6. Pared celular de las bacterias Gram positivas.**

**Tomado y modificado de Tortora, Funke y Case, 2007.**

Dentro de las bacterias Gram positivas se encuentran una gran variedad de géneros y especies, para fines del estudio; solo se describirán las siguientes especies:

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

*Staphylococcus aureus*

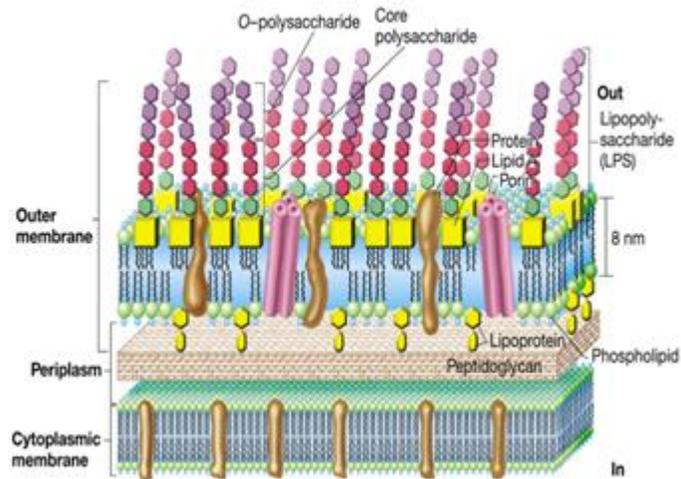
Son cocos Gram positivos en racimos irregulares, inmóviles no formadores de esporas, sin cápsula, catalasa y coagulasa positiva y aerobios facultativos, poseen alta tolerancia a la sal, fermentan el manitol, las colonias son redondas, lisas, elevadas y resplandecientes de color amarillo dorado intenso. Crecen bien en condiciones de presión osmótica elevada y humedad reducida, lo cual explica en parte que pueden desarrollarse y sobrevivir en las secreciones nasales y en la piel. Causan infecciones piógenas en lactantes y niños, en la piel, celulitis, furúnculos e infecciones post-operatorios (Tortora, Funke y Case, 2007).

### *Enterococcus faecalis*

Son cocos Gram positivos que se encuentran formando parte de la microbiota de la cavidad oral y del tracto gastrointestinal, anaerobio facultativo, catalasa negativa, inmóvil y no esporulado que se dispone en pares o cadenas. Son microbios relativamente resistentes, persisten como contaminantes en el ámbito hospitalario, en las manos, en la ropa de cama, incluso como aerosol fecal. En el ámbito médico, con frecuencia invaden el torrente sanguíneo a través de elementos invasivos como los catéteres permanentes (Tortora, Funke y Case, 2007).

### ***Bacterias Gram negativas***

Las bacterias Gram negativas poseen una pared celular compuesta por pocas capas de peptidoglicano y una membrana externa, compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos. Su intensa carga negativa dificulta considerablemente la fagocitosis y la actividad del complemento dos complementos de defensa del huésped. La membrana externa también constituye una barrera que impide el paso de ciertos antibióticos, de enzimas digestivas, de detergente de metales pesados, de sales biliares y de ciertos colorantes. Sin embargo, la membrana no impide el paso de todas las sustancias presentes en el medio, puesto que las células necesitan nutrientes para sustentar el metabolismo. La permeabilidad de la membrana se debe en parte a la presencia de proteínas llamadas porinas, las cuales forman canales de membrana (Figura 7) (Tortora, Funke y Case, 2007).



**Figura 7. Pared celular de las bacterias Gram negativas.**  
**Tomado y modificado de Tortora, Funke y Case, 2007.**

Dentro de las bacterias Gram negativas se encuentran diversos géneros y especies, en este estudio solo serán descritas las especies mencionadas a continuación:

### *Pseudomonas aeruginosa*

Es un bacilo Gram negativo, móvil, aerobio, no forma esporas, fermenta la glucosa, es negativo al indol y generalmente no tiene cápsula. En un medio de agar sangre, las colonias son grandes, irregulares con pigmento verde. Tienen proteasas que pueden ser responsables de las lesiones cutáneas hemorrágicas observadas en algunas infecciones. Además, produce una enterotoxina responsable de la diarrea asociada con infecciones intestinales, también da lugar a infecciones del tracto urinario, infecciones de quemaduras y heridas, meningitis, bronconeumonía y endocarditis bacteriana (Tortora, Funke y Case, 2007).

### *Klebsiella pneumoniae*

Es un bacilo no flagelado, por lo tanto, inmóvil, anaerobio facultativo. Se encuentra frecuentemente en el suelo o el agua. Esta especie puede producir una forma grave de neumonía en los seres humanos (Tortora, Funke y Case, 2007).

### *Escherichia coli*

Es un bacilo Gram negativo, aerobio o anaerobio, fermenta la lactosa y la glucosa, sin cápsula y móviles. Las cepas lisas forman colonias incoloras, convexas y brillantes. Se encuentra en el intestino grueso, es responsable de cuadros febriles y diarreicos, puede desplazarse del conducto intestinal al tracto urinario y a los riñones por vía hematológica, causando con mayor frecuencia procesos patológicos en el tracto urinario (Tortora, Funke y Case, 2007).

## **Resistencia bacteriana**

Las bacterias pueden presentar resistencia a los antibióticos como resultado de mutaciones cromosomales e intercambio de material genético de otras bacterias o fagos (virus que utilizan bacterias para su desarrollo y reproducción) (Tenover, 2006).

La resistencia bacteriana puede ser:

### ➤ **Natural**

La resistencia natural o intrínseca es una propiedad específica de las bacterias, su aparición es anterior al uso de los antibióticos y tiene la característica de ser inherente a una especie en particular (Tenover, 2006).

### ➤ **Adquirida**

La resistencia adquirida es un verdadero cambio en la composición genética de la bacteria y constituye un verdadero problema en la clínica. Existe un fenómeno conocido como tolerancia, considerado como un tipo de resistencia adquirida, aun cuando el microorganismo siga siendo sensible al medicamento (Tenover, 2006).

## **Métodos para determinar la actividad antibacteriana**

### ***Método de difusión en agar***

Este método de difusión en disco o en pozo, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles. También llamado método de Kirby-Bauer, fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos. El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo una cantidad conocida de la sustancia. Los medios de cultivo más utilizados son el agar Müeller-Hinton y agar tripticosa soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras. Algunos investigadores utilizan el agar nutritivo (Barry, Amsterdam, Coyle, Gerlach y Thornsberry,

1979; Hacek, Dressel y Peterson, 1999; European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing EUCAST, 2000).

En el caso de evaluar varias sustancias los discos de papel filtro o los pozos deben ponerse en forma equidistante. A continuación, se procede a su incubación a la temperatura adecuada por 24 horas luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos de las distintas sustancias sobre el microorganismo estudiado, con el antibiótico control. La lectura de los resultados representa la actividad *in vitro* de la sustancia. Algunos autores refrigeran las placas a 4°C para permitir la predifusión de los extractos antes de la incubación (Tepe, Daferera, Sökmen y Polissiou, 2004; Mbata, Debiao y Saikia, 2006).

### **Métodos de dilución**

El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima inhibitoria (CMI) la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas, y la CBM como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado, estas variables son una herramienta para investigar nuevos antimicrobianos (Andrews, 2001; McDermott, Bodeis, Fritsche, Jones y Walker, 2005).

En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la CMI es determinada después de la incubación. En el método de dilución en agar, las cajas se siembran por profundidad con

una determinada concentración de extracto vegetal, luego se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas, después de ésta, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas, la principal desventaja de este método es la cantidad necesaria de muestra a evaluar. Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar CMI, en un gran número de muestras. La ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales, además permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático (Langfield, Scarano, Heitzman, Kondo, Hammond y Neto, 2004).

### **Definición operacional de términos**

#### ***Bactericidas***

Son sustancias que provocan la destrucción y muerte del germen por lo que su acción sobre el mismo es irreversible (Domínguez, Galiana y Pérez, 2002).

#### ***Bacteriostáticos***

Son antisépticos que consiguen frenar el crecimiento de los microorganismos. Este procedimiento es reversible por lo que cuando deja de estar presente la sustancia bacteriostática, los gérmenes pueden volver a reproducirse (Domínguez y cols, 2002).

### ***Medios de cultivo***

Es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes, que proveen condiciones bioquímicas y biofísicas apropiadas para el aislamiento, desarrollo y mantenimiento de los microorganismos (Domínguez y cols, 2002).

### ***Antibiograma***

Es el procedimiento que se utiliza en el laboratorio para la determinación de la sensibilidad de un microorganismo ante diferentes antibióticos. Es la principal ayuda que ofrece el laboratorio clínico para la elección de un tratamiento apropiado (Domínguez y cols, 2002).

### **Operacionalización de las variables**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

La operacionalización de las variables se emplea en la investigación científica para designar al proceso mediante el cual se transforma la variable de conceptos abstractos a términos concretos, observables y medibles (Ver tabla 2-3), es decir, dimensiones e indicadores; por lo general se representa en un cuadro (Hurtado, 2010).

**Tabla 2. Operacionalización de la variable dependiente**

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana del extracto de las hojas y semillas de la especie <i>Vitis vinifera</i> L.	Dependiente Cualitativa Discreta	Es la capacidad que tienen algunas sustancias de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias o su eliminación sin dañar el organismo infectado (Martínez, De Ferrer, Ojeda, Ferrer y Nava, 2003).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
Métodos de difusión en agar (Kirby-Bauer)	Sensible Resistente	Presencia de halos de inhibición definidos: positivo Ausencia de halos de inhibición definidos: negativo

Fuente: Giraldo y Buitrago, 2023.

**Tabla 3. Operacionalización de la variable independiente**

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química del extracto de las hojas y semillas de la especie <i>Vitis vinifera</i> L.	Independiente Cualitativa Discreta	Los metabolitos secundarios son los responsables del olor, del sabor y del color de la planta. Presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, entre otros. Reciben también la denominación de productos naturales (Castillo y Martínez, 2007; Pérez y Ávalos, 2009)
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
Tamizaje fitoquímico	Pruebas químicas cualitativas:	
	- Alcaloides Ensayo de Dragendorff, Wagner, Mayer	Aparición de turbidez o precipitado
	- Esteroles y/o	Coloración azul o verde
	Triterpenos Ensayo de Lieberman-Bouchard	Coloración violeta
	- Saponinas Altura de la espuma	Formación de abundante espuma
	- Taninos Ensayo de la gelatina	Precipitado blanco
	- Flavonoides Ensayo de Shinoda	Coloración naranja a rojo para flavonas
	Prueba de NaOH 10 %	Coloración rojo para flavonoles Coloración magenta para flavononas
- Quinonas y Antraquinonas Prueba de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc. Ensayo de Bontrager	Coloración roja	

Fuente: Giraldo y Buitrago, 2023.

## Hipótesis

Estudios realizados a la especie *Vitis vinifera* L., han reportado la presencia de compuestos fenólicos posiblemente responsables de las diferentes actividades biológicas, en tal sentido se presume que el extracto metanólico de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L., recolectada en los Andes venezolanos presente compuestos similares con actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas y Gram negativas.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## **CAPÍTULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **Tipo de Investigación**

El tipo de investigación tiene relación con la interrogante de estudio en la cual se resalta lo que se quiere saber, esto marca el logro general que se desea conseguir durante el proceso de la investigación. En consecuencia, el verbo a utilizar en el objetivo tiene que implicar un logro (Hurtado, 2010). En tal sentido, esta investigación es confirmatoria ya que, se encarga de establecer relaciones de causa y efecto.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

#### **Diseño de Investigación**

El diseño de investigación se debe determinar a través de las estrategias que se implementan para recolectar la información en una fuente determinada, en un tiempo específico y en una cantidad o amplitud asociada a lo que se quiere saber (Hurtado, 2010). Por tal motivo, dicha investigación tuvo un diseño experimental, ya que los extractos obtenidos de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L., se sometieron a ciertas pruebas para determinar su composición química y actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas y Gram negativas.

## **Población y Muestra**

### **Unidad de Investigación**

La población, o en términos más precisos población objetivo, es un conjunto finito o infinito de elementos con características comunes para los cuales serán extensivas las conclusiones de la investigación. Ésta queda delimitada por el problema y por los objetivos de estudio (Arias, 2006). En tal sentido, la unidad de investigación fue la especie *Vitis vinifera* L.

### **Selección del tamaño muestral**

La “n” muestral estuvo representada por las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L.

## **Sistema de variables**

Las variables relacionadas con el objetivo de esta investigación son las siguientes: Variable dependiente (VD): actividad antibacteriana del extracto de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L., variable independiente (VI): composición química del extracto de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L. Estas variables corresponden a los núcleos semánticos del problema de investigación, a la vez, permitirán la verificación del evento de estudio en la unidad de investigación.

## Procedimientos de la Investigación

### Recolección de la muestra

La muestra, fue recolectada en el sector José Adelmo Gutiérrez de la Parroquia Matriz del Municipio Campo Elías del Estado Mérida, y fue transportada al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes.

### Obtención de los extractos

**Secado de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L.:** el material vegetal fue secado al aire libre protegido de la luz solar.

**Molienda del material vegetal seco** (hojas y semillas): se procedió a la molienda en un mortero de porcelana (semillas) y en una licuadora (hojas) hasta obtener un polvo fino.

**Extracción de las hojas y semillas:** la muestra fue sometida a extracción por maceración en frío, utilizando como solvente metanol, durante un periodo de 10 días. Pasado ese tiempo se calentó y filtró cada extracto para luego ser concentrados.

**Concentración de los extractos en un rotavapor:** los extractos (hojas y semillas) fueron concentrados utilizando un rotavapor a la temperatura de 40 °C. Posterior a ello, el producto seco se pesó y colocó en un envase de color ámbar.

**Refrigeración de los extractos:** finalmente, se llevaron a refrigeración (4 °C)

En el Esquema 1 se presenta el procedimiento para la obtención de la composición química del extracto de la especie *Vitis vinifera* L.

**Esquema 1. Procedimiento para la obtención del extracto de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L.**



Fuente: Giraldo y Buitrago, 2023

### Tamizaje fitoquímico de la especie *Vitis vinifera* L.

En la Tabla 4, se presenta el procedimiento del tamizaje fitoquímico que se llevó a cabo para determinar mediante pruebas cualitativas los metabolitos secundarios presentes en el extracto de metanol de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L.

**Tabla 4. Procedimiento para el tamizaje fitoquímico de la especie *Vitis vinifera* L.**

Metabolito secundario	Pruebas	Procedimiento	Reacción positiva
Alcaloides	Wagner	Se disolvió una porción del extracto de en 2 mL de HCl al 5%, luego se agitó, filtró y se tomó una alícuota a la que se le añadieron gotas de los diferentes reactivos (Wagner, Mayer y Dragendorff).	Precipitado rojo pardo
	Mayer		Precipitado blanco o amarillento
	Dragendorff		Precipitado rojo- anaranjado
Esteroles	Lieberman-Bouchard	A una pequeña porción del extracto concentrado se le añadió 1 mL de ácido acético anhidro y luego se estratificó con 2-3 gotas de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado	Observación de una coloración azul o verde
Triterpenos			Observación de una coloración violeta
Compuestos fenólicos	Reacción con FeCl <sub>3</sub> 10 %	Al extracto disuelto en agua se le añadió unas gotas de cloruro férrico al 10 %	Aparición de un color verde, azul o negro
Saponinas	Altura de la espuma	Se colocó en un tubo de ensayo 1 mL del extracto y se agitó vigorosamente durante 1 minuto	Formación de espuma estable por 30 minutos

Fuente: Domínguez, 1979; Orantes, 2008; Tambe, Pedhekar y Harshali, 2021.

**Continuación Tabla 4. Procedimiento para el tamizaje fitoquímico de la especie *Vitis vinifera* L.**

Metabolito secundario	Prueba	Procedimiento	Reacción positiva
Taninos	Gelatina 1 %	Se disolvieron 10 mg del extracto en 10 mL de una solución de gelatina (1%)	Formación de un precipitado blanco
Flavonoides	Shinoda	A 1 mL de extracto diluido, se le adicionó una pequeña cantidad de magnesio metálico y 3 gotas de HCl concentrado.	Coloración naranja a rojo para flavonas y xantonas
			Coloración rojo para flavonoles
			Coloración magenta para flavononas
	NaOH 10 %	A 1 mL de extracto diluido, se le agregaron 3 gotas de hidróxido de sodio al 10 %.	Coloración de amarillo a rojo para flavonas y xantonas
			Coloración café a naranja para flavonoles
			Coloración purpura a rojiza para chalconas
Cumarinas	Prueba de Hidróxido de Amonio (NH <sub>4</sub> OH)	Al extracto se le añadió 0,5 mL de etanol y 2gotas de hidróxido de amonio concentrado, luego se examinó bajo la luz ultravioleta.	fluorescencia azul-violeta

Fuente: Orantes, 2008; Domínguez, 1979.

**Continuación Tabla 4. Procedimiento para el tamizaje fitoquímico de la especie *Vitis vinifera* L.**

Metabolito secundario	Prueba	Procedimiento	Reacción positiva
Quinonas y Antraquinonas	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc.	A 10 mg del extracto, se le adicionó 1 gota de ácido sulfúrico concentrado.	Coloración roja-púrpura
	Bontrager	A 10 mg del extracto, se le agregó 1 gota de hidróxido de amonio concentrado (NH <sub>4</sub> OH).	Coloración rojo-cereza
Lactonas sesquiterpenos	Baljet	Se disolvieron 10 mg del extracto y se le adicionó de 3 a 4 gotas del reactivo de Baljet.	coloración de naranja a rojo

Fuente: Domínguez, 1979; Rajesh, Latha, Selvamani y Rajesh, 2010; Tambe, Pedhekar y Harshali, 2021.

**Evaluación de la actividad antibacteriana por el método de difusión del disco en agar (Kirby-Bauer)**

La evaluación de la actividad antibacteriana, se realizó en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, mediante el método de difusión del disco en agar. En el ensayo, se utilizaron bacterias de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC) y sus respectivos controles positivos (Tabla 5).

A continuación, se menciona el procedimiento que se llevó a cabo (Rotman, Ahumada, Demo, Oliva, Turina, López, y Zygadlo, 2003); CLSI, 2020).

**Preparación del inóculo bacteriano:** los inóculos se prepararon en solución salina estéril (0,85 % p/v NaCl), a partir de un cultivo fresco de cada cepa bacteriana repicada en caldo Müller-Hinton, hasta lograr una turbidez similar al patrón de McFarland N° 0,5 ( $1,6 \times 10^8$  UFC/mL).

**Preparación de las placas de Petri con agar Müller-Hinton:** se colocaron aproximadamente 20 mL de agar Müller-Hinton en placas de Petri.

**Siembra:** los inóculos de cada microorganismo, se sembraron en la superficie del agar con un hisopo estéril.

**Colocación de los discos:** seguidamente, se colocaron en la superficie del agar inoculado, los discos de papel de filtro, con el extracto a una concentración de 10.000 ppm (10 mg/mL), los controles positivos y el control negativo.

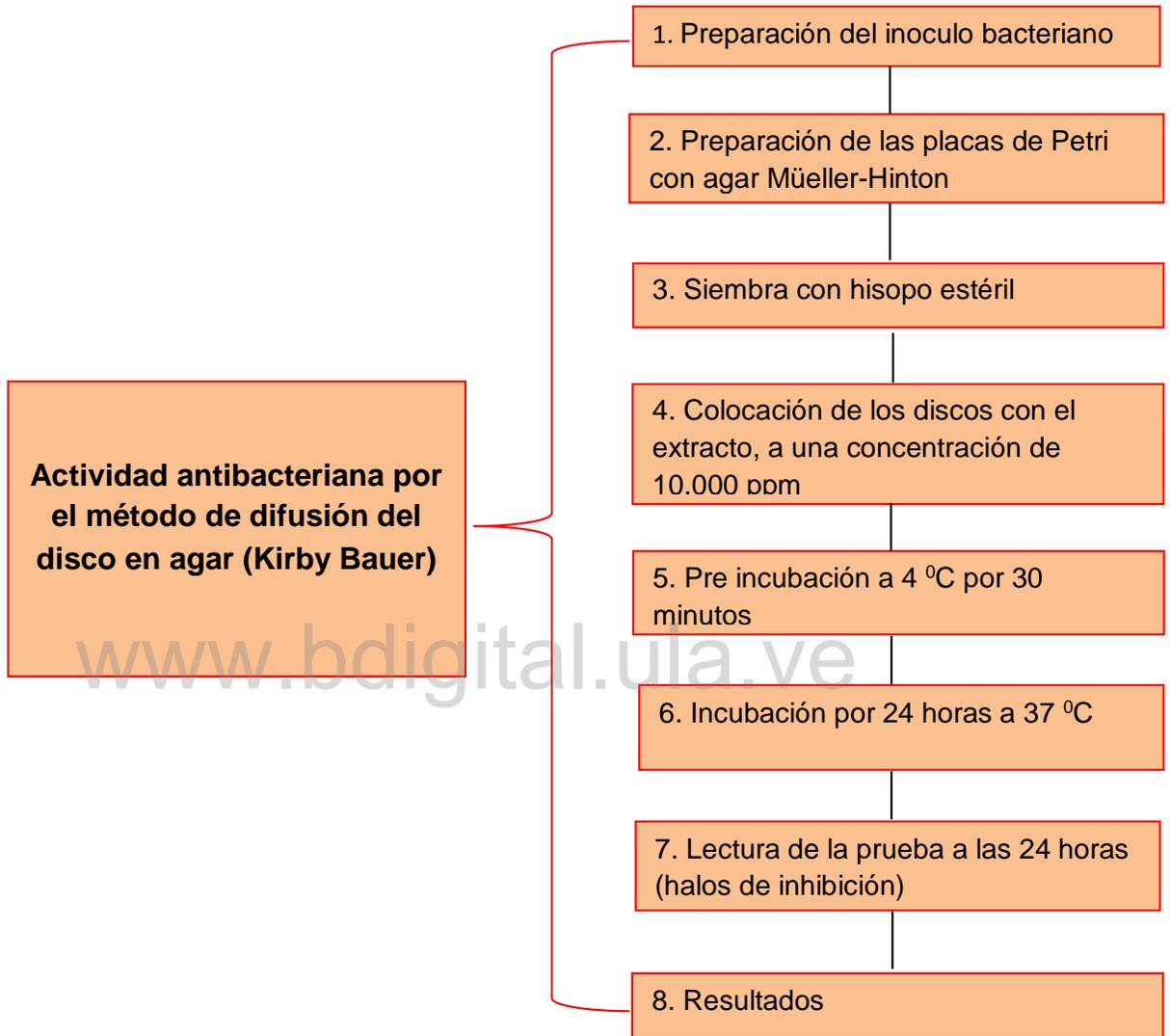
**Pre-incubación:** se pre-incubó durante 30 minutos a la temperatura de 4 °C, con la finalidad de permitir que los compuestos presentes en el extracto difundan sobre el agar.

**Incubación:** luego se incubó a una temperatura de 37 °C, durante 24 horas.

**Lectura de la prueba:** se realizó la lectura de los halos de inhibición a las 24 horas, la zona de inhibición fue expresada en milímetros (mm).

En el Esquema 2 se presenta el ensayo de la actividad antibacteriana por el método de difusión del disco en agar (Kirby Bauer).

**Esquema 2. Ensayo de la actividad antibacteriana por el método de difusión del disco en agar (Kirby Bauer)**



Fuente: Giraldo y Buitrago, 2023

**Tabla 5. Microorganismos y controles positivos**

	MICROORGANISMOS	ANTIBACTERIANO (CONTROLES POSITIVOS)
<b>GRAM POSITIVOS</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Eritromicina (15 µg)
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29912	Ampicilina (10 µg)
<b>GRAM NEGATIVOS</b>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Piperacilina (100 µg)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	Piperacilina (100 µg)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Piperacilina (100 µg)

(CLSI, 2020).

### Diseño de análisis

Los resultados de la investigación fueron analizados a través de un enfoque cuantitativo. Se tomaron los datos relacionados con el problema de investigación: relación entre la actividad antibacteriana y la composición química del extracto de la especie *Vitis vinifera* L., los cuales fueron medidos numéricamente y expresados en tablas (Palella y Martins, 2010).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### RESULTADOS

##### Determinación del % de rendimiento del extracto metanólico de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L.

En la tabla 6 se presentan los porcentajes de rendimiento del extracto metanólico obtenido de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L.

Tabla 6. Determinación del % de rendimiento

Material vegetal	Peso inicial material vegetal (gramos)	Peso final del extracto metanólico (gramos)	% de rendimiento
Hojas	85	25,621	30,142
Semillas	7	1,236	17,657

Fuente: Giraldo y Buitrago, 2023.

En la determinación del % de rendimiento se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{\text{Peso final del extracto obtenido}}{\text{Peso inicial de la muestra}} * 100$$

### **Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L.**

El tamizaje fitoquímico se llevó a cabo mediante pruebas químicas realizadas al extracto metanólico obtenido de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L., con el fin de determinar la presencia de metabolitos secundarios utilizando diferentes reactivos químicos. Posterior a ello se observaron las diferentes reacciones de coloración y precipitación, donde se obtuvieron los siguientes resultados: presencia de alcaloides, esteroides, compuestos fenólicos y taninos en el extracto metanólico de hojas; así como también, presencia de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y lactonas sesquiterpenos en el extracto metanólico de semillas (Tabla 7, Figuras 8-18).

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Tabla 7.** Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L.

Metabolito secundario	Ensayo	Extracto Metanólico Hojas	Extracto Metanólico Semillas
<b>Alcaloides</b>	Reactivo Dragendorff	+	-
	Reactivo Mayer	-	-
	Reactivo Wagner	-	-
<b>Triterpenos/Esteroles</b>	Reacción de Liebermann-Burchard	+ Verde	-
<b>Compuestos Fenólicos</b>	Reacción con al FeCl <sub>3</sub> 10 %	+ + Azul-Negro	+ Azul-Negro
<b>Saponinas</b>	Reacción de espuma	-	-
<b>Taninos</b>	Gelatina	+	+
<b>Flavonoides</b>	Reacción de Shinoda	-	-
	Reacción con NaOH al 10 %	-	+ + Naranja
<b>Cumarinas</b>	Prueba con NH <sub>4</sub> OH concentrado	-	-
<b>Antraquinonas</b>	Prueba con FeCl <sub>3</sub>	-	-
<b>Quinonas</b>	Prueba con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado.	-	-
<b>Lactonas Sesquiterpenos</b>	Ensayo de Baljet	-	+

Fuente: Giraldo y Buitrago, 2023.

### Pruebas químicas realizadas

- **Alcaloides:** prueba realizada con reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner

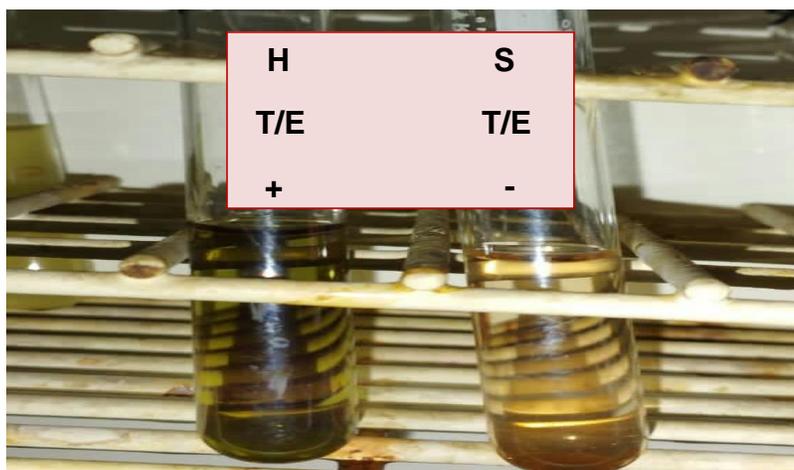


Leyenda: H hojas, S semillas, D Dragendorff, M Mayer, W Wagner, + positivo, - negativo.

**Figura 8.** Determinación de alcaloides en el extracto metanólico de hojas y semillas de *V. vinifera* L.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

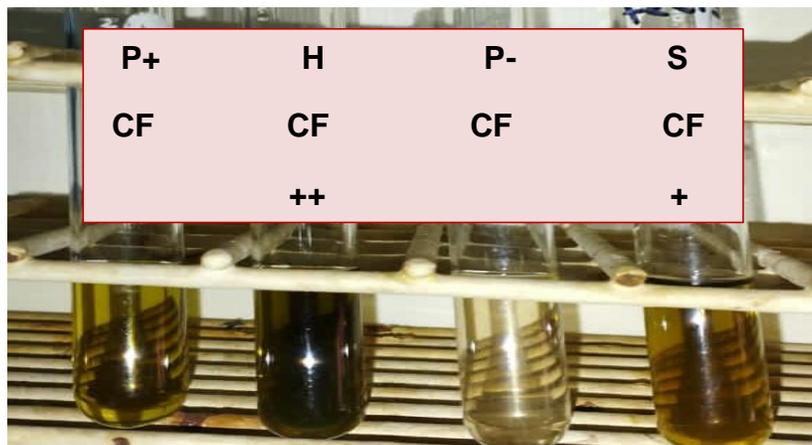
- **Triterpenos/esteroles:** prueba realizada con reacción de Liebermann-Burchard



Leyenda: H hojas, S semillas, T/E triterpenos/esteroles, + positivo, - negativo.

**Figura 9.** Determinación de triterpenos/esteroles en el extracto metanólico de hojas y semillas de *V. vinifera* L.

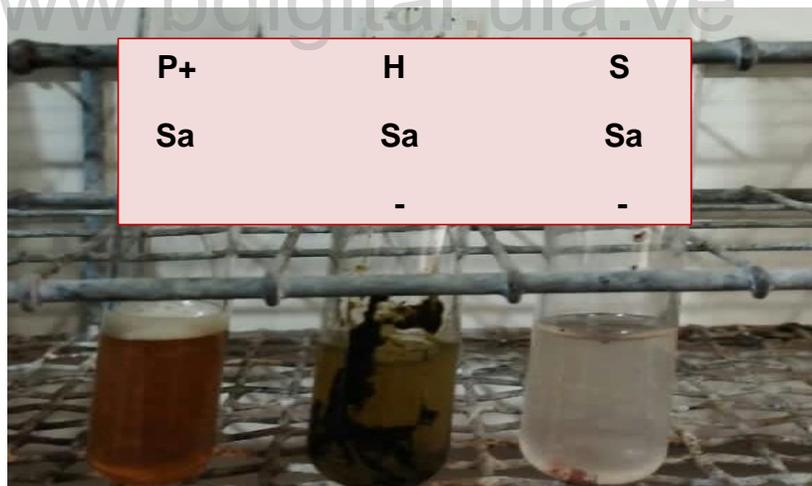
- **Compuestos fenólicos:** prueba realiza con FeCl<sub>3</sub> al 10%



Leyenda: P+ patrón positivo, H hojas, S semillas, P- patrón negativo, CF compuestos fenólicos, + positivo.

**Figura 10.** Determinación de compuestos fenólicos en el extracto metanólico de hojas y semillas de *V. vinifera* L.

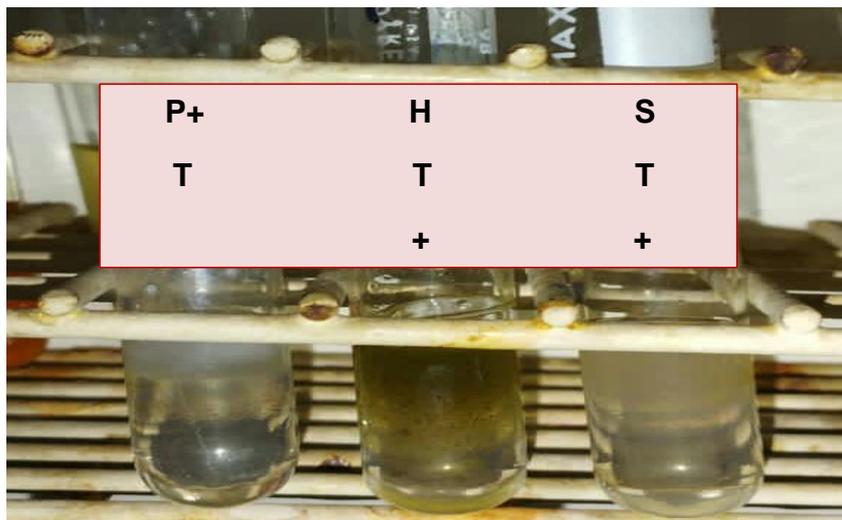
- **Saponinas:** prueba realizada con reacción de espuma



Leyenda: P+ patrón positivo, H hojas, S semillas, Sa saponinas, - negativo.

**Figura 11.** Determinación de saponinas en el extracto metanólico de hojas y semillas de *V. vinifera* L.

➤ **Taninos:** prueba realizada con el ensayo de la gelatina



Leyenda: P+ patrón positivo, H hojas, S semillas, T taninos, + positivo.

**Figura 12.** Determinación de taninos en el extracto metanólico de hojas y semillas de *V. vinifera* L.

➤ **Flavonoides:** prueba realizada con reacción de Shinoda



Leyenda: P+ patrón positivo, H hojas, S semillas, F flavonoides, - negativo.

**Figura 13.** Determinación de flavonoides (reacción de Shinoda) en el extracto metanólico de hojas y semillas de *V. vinifera* L.

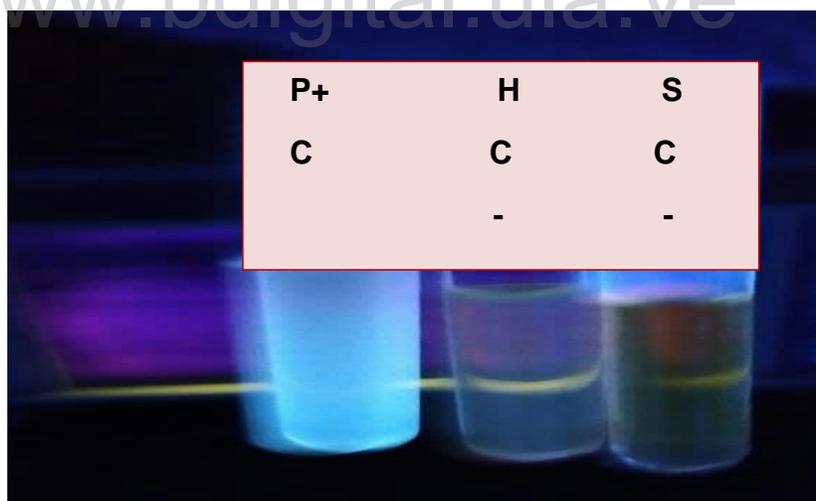
- **Flavonoides:** prueba realizada con reacción de NaOH al 10%



Leyenda: P+ patrón positivo, H hojas, S semillas, F flavonoides, - negativo.

**Figura 14.** Determinación de flavonoides (reacción de NaOH al 10%) en el extracto metanólico de hojas y semillas de *V. vinifera* L.

- **Cumarinas:** prueba realizada con NH<sub>4</sub>OH concentrado



Leyenda: P+ patrón positivo, H hojas, S semillas, C cumarinas, - negativo.

**Figura 15.** Determinación de cumarinas en el extracto metanólico de hojas y semillas de *V. vinifera* L.

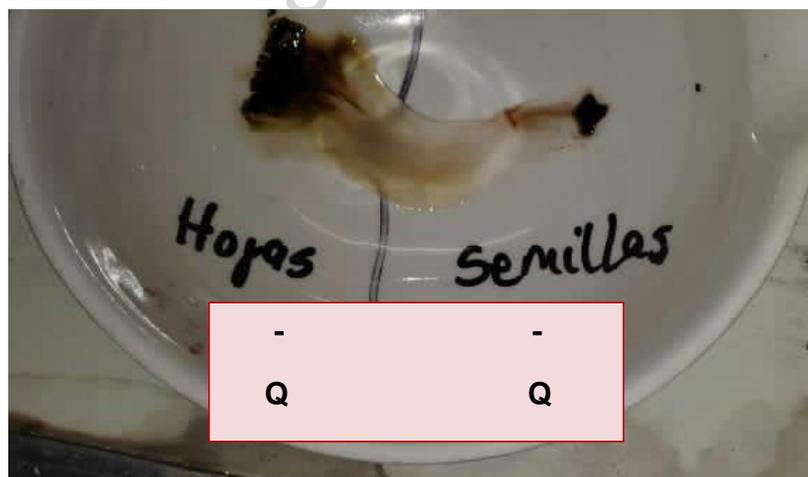
- **Antraquinonas:** prueba realizada con  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado



Leyenda: H hojas, S semillas, A antraquinonas, - negativo.

**Figura 16.** Determinación de antraquinonas en el extracto metanólico de hojas y semillas de *V. vinifera* L.

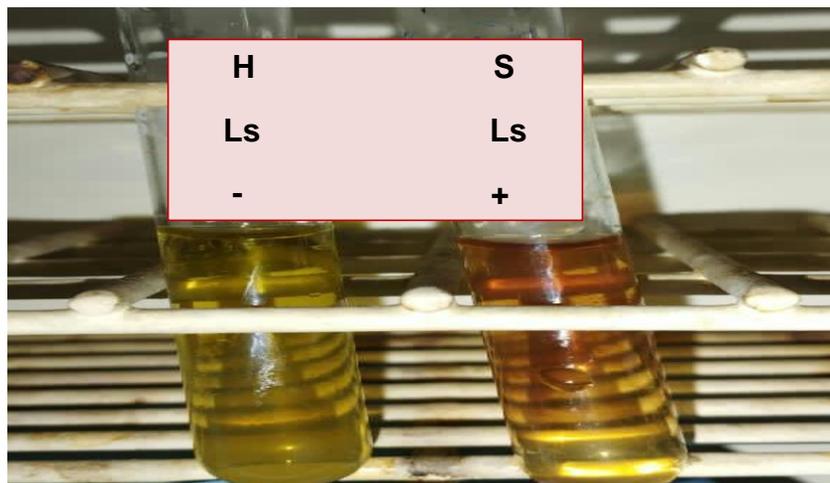
- **Quinonas:** prueba realizada con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado



Leyenda: Q quinonas, - negativo.

**Figura 17.** Determinación de quinonas en el extracto metanólico de hojas y semillas de *V. vinifera* L.

- **Lactonas sesquiterpénicas:** prueba realizada con ensayo de Baljet



Leyenda: H hojas, S semillas, Ls lactonas sesquiterpénicas, + positivo, - negativo.

**Figura 18.** Determinación de lactonas sesquiterpenos en el extracto metanólico de hojas y semillas de *V. vinifera* L.

### **Actividad antibacteriana del extracto de metanol obtenido de las hojas y semillas de la Especie *Vitis vinifera* L.**

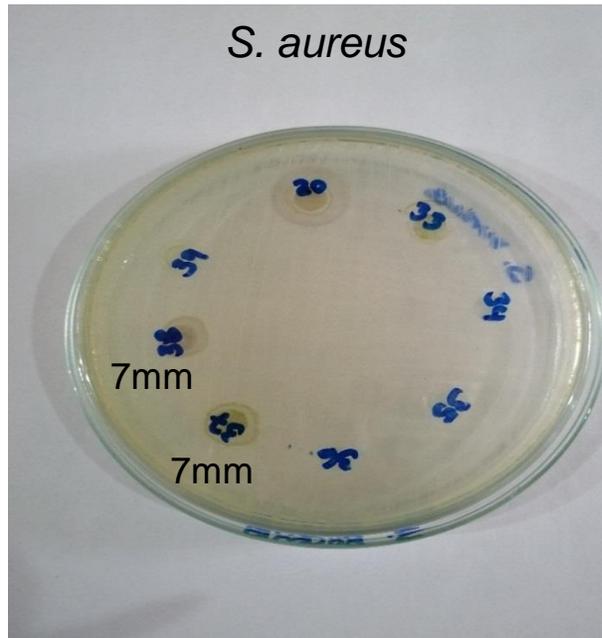
Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L., evaluados mediante la técnica de difusión de disco en agar (Kirby-Bauer) a la concentración de 10.000 ppm, fueron los siguientes: el extracto metanólico de las hojas, mostró actividad frente a la cepa bacteriana Gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) con un halo de inhibición de 7 mm (Figura 19); además de cepas bacterianas Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) con un halo de inhibición de 7 mm (Figura 21), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) con un halo de inhibición de 7 mm (Figura 22), y *Escherichia coli* (ATCC 25922) con un halo de inhibición de 8 mm (Figura 23).

Así mismo, el extracto metanólico de las semillas mostró actividad sobre la cepa bacteriana Gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) con un halo de inhibición de 7 mm (Figura 19); además de cepas bacterianas Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) con un halo de inhibición de 7 mm (Figura 21), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) con un halo de inhibición de 8 mm (Figura 22), y *Escherichia coli* (ATCC 25922) con un halo de inhibición de 7 mm (Figura 23). (Tabla 8)

**Tabla 8.** Resultados de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L.

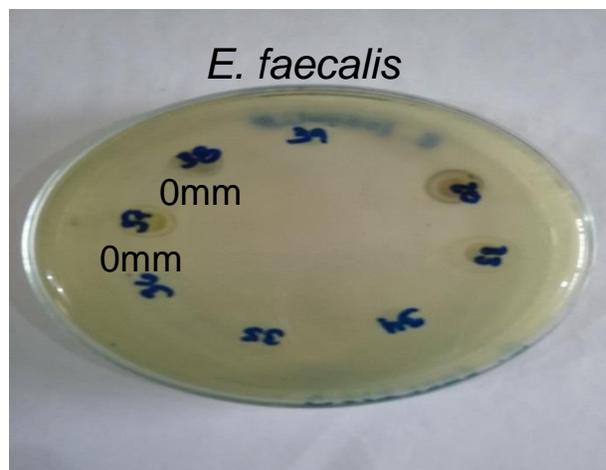
Cepas Bacterianas	Extracto de Metanol de Hojas	Extracto de Metanol de Semillas
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	7 mm	7 mm
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	7 mm	7 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	7 mm	8 mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	8 mm	7 mm

Fuente: Giraldo y Buitrago, 2023.

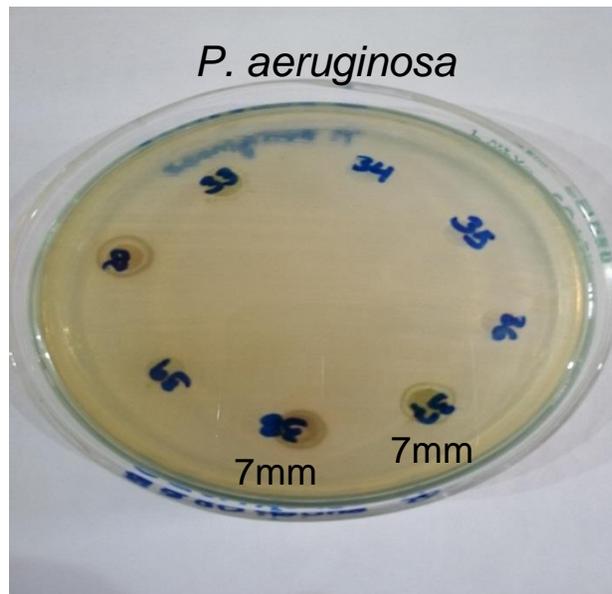


**Figura 19.** Extracto metanólico de hojas (37) y semillas (38) ensayado en *S. aureus*

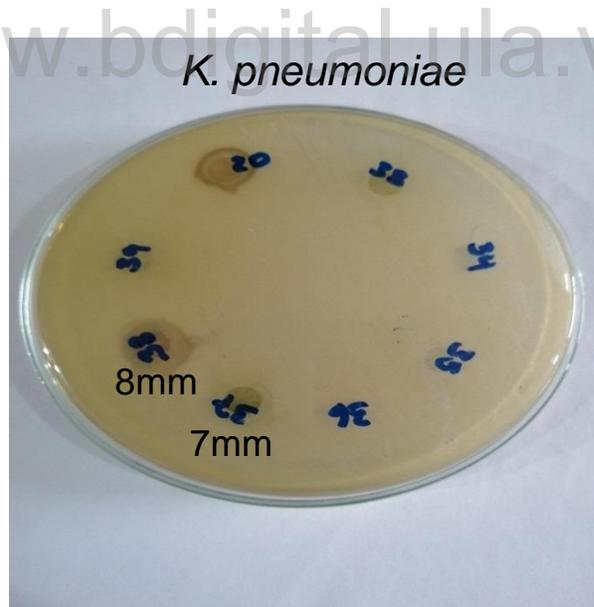
[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



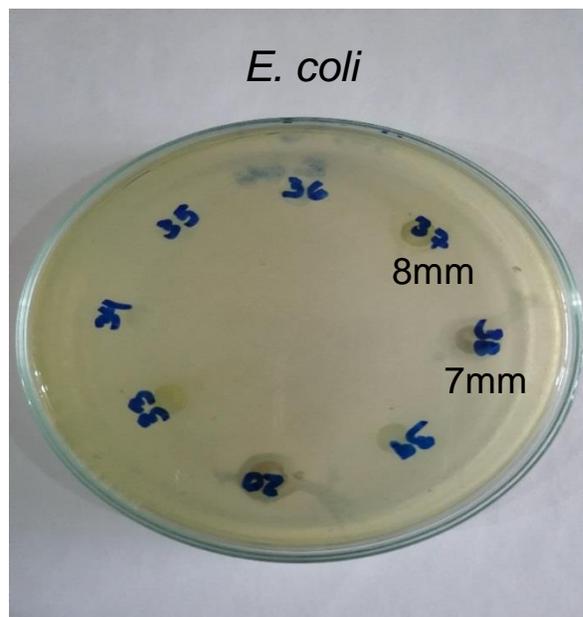
**Figura 20.** Extracto metanólico de hojas (37) y semillas (38) ensayado en *E. faecalis*



**Figura 21.** Extracto metanólico de hojas (37) y semillas (38) ensayado en *P. aeruginosa*



**Figura 22.** Extracto metanólico de hojas (37) y semillas (38) ensayado en *K. pneumoniae*



**Figura 23.** Extracto metanólico de hojas (37) y semillas (38) ensayado en *E. coli*

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)  
**DISCUSIONES**

En la presente investigación se obtuvieron por maceración los extractos metanólicos de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L., dichos extractos evidenciaron mediante el tamizaje fitoquímico la presencia de metabolitos secundarios en las hojas, tales como: alcaloides, esteroides, compuestos fenólicos y taninos; mientras que, en las semillas se evidenció la presencia de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y lactonas sesquiterpénicas.

Al comparar los resultados obtenidos con estudios anteriores en cuanto al tamizaje fitoquímico de extractos metanólicos de *Vitis vinifera* L., de otros países, esta investigación mostro tener composición química similar.

Rani y Vijayanchali (2021). Estudiaron el extracto de semillas de la especie *Vitis vinifera* L., en diferentes solventes como agua, éter, acetona, cloroformo, etanol y metanol encontrando compuestos químicos tales como: alcaloides, flavonoides, fenoles, saponinas, taninos, terpenoides, quinonas y esteroides, demostrando así relación con los compuestos fenólicos, taninos y flavonoides hallados en el extracto metanólico de las semillas de esta investigación.

Según, Leal y cols (2020), en su investigación reportaron la presencia de compuestos fenólicos (ácido gálico) y flavonoides (catequina) en los extractos hidrometanólicos de tallo de uva, guardando similitud con los compuestos fenólicos y flavonoides encontrados en el extracto metanólico de las semillas en este estudio.

En la investigación de Radulescu y cols (2020), utilizando extractos hidroalcohólicos de semillas de *Vitis vinifera* L., obtenidos mediante maceración clásica y extracción asistida por ultrasonido, reportaron compuestos químicos como flavonoides y compuestos fenólicos, mostrando similitud con el trabajo en estudio en cuanto a los compuestos químicos evidenciados en el extracto metanólico de semillas de *Vitis vinifera* L., y en cuanto al método de maceración.

Asimismo, usando extractos metanólicos y acuosos de hojas de *Vitis vinifera*, obtenidos con extracción continua, Devi y Singh (2017), evidenciaron compuestos fenólicos (ácido gálico), flavonoides (rutina), taninos (rutina), alcaloides (atropina), saponinas (diosgenina), esteroides (cicloartenol) y terpenoides, en su trabajo de investigación, lo cual concuerda con los compuestos bioactivos como alcaloides, esteroides, compuestos fenólicos y taninos reportados en el extracto metanólico de las hojas de *Vitis vinifera* L., en esta investigación, empleando un método de extracción diferente.

Mientras que, Nirmala y Narendhirakanan (2011), en el tamizaje fitoquímico realizado a los extractos etanólicos de las semillas de *Vitis vinifera* L., obtenidos mediante extracción continua, reportaron la presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, triterpenos y esteroides, por tanto, los metabolitos hallados en esta investigación guardan relación con los descritos en dicha literatura, pero difieren en alcaloides, saponinas triterpenos y esteroides ya que, no hubo reporte de dichos metabolitos en los extractos de semillas de este estudio, empleando método de extracción diferente.

En base a los trabajos anteriores, los compuestos químicos hallados en los extractos metanólicos de las hojas de esta investigación son similares químicamente en relación a los alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos reportados por Devi y Singh (2017), en los extractos metanólicos de hojas de *Vitis vinifera*. Así mismo, los extractos metanólicos de las semillas de esta investigación son similares químicamente en relación a los flavonoides y taninos reportados por Rani y Vijayanchali (2021), en extractos metanólicos de semillas de *Vitis vinifera*.

Por otra parte, los extractos metanólicos de las hojas reportaron alcaloides y esteroides, mientras que, los extractos metanólicos de las semillas reportaron flavonoides y lactonas sesquiterpénicas diferenciándose así químicamente.

En cuanto a la actividad antibacteriana, los extractos metanólicos de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L., en ésta investigación evaluados por medio del método de difusión del disco en agar (Kirby-Bauer) a la concentración de 10 mg/mL, evidenciaron tener actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, sin embargo *Enterococcus faecalis* mostró resistencia.

En este orden de ideas, Ali y cols (2019), evaluaron extractos metanólicos de hojas de uva utilizando el método de difusión en pozo de agar a diferentes concentraciones (25, 50 y 100 mg/mL), obteniendo como resultado actividad frente a *Proteus* sp. (29,6 mm), *Pseudomonas* sp. (27,0 mm), *Staphylococcus aureus* (27,0 mm), *E. coli* (26,0 mm), *Streptococcus viridans* (23,3 mm) y *Clostridium septicum* (21,0 mm) a la concentración de 100 mg/mL. Cabe mencionar que, a pesar de usar otro método y diferente concentración, ésta investigación se relaciona ya que, hubo actividad de los extractos metanólicos de las hojas de *Vitis vinifera* L., sobre *Staphylococcus aureus* (7 mm) y *Escherichia coli* (8 mm).

Por otra parte, se han realizado investigaciones con extractos etanólicos para determinar la actividad antibacteriana de *Vitis vinifera* L., en tal sentido, Villanueva (2020), en su trabajo de investigación usó el extracto etanólico de las semillas de *Vitis vinifera* sobre *Staphylococcus aureus* por el método de difusión del disco en agar, evidenciando como resultado actividad frente a la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* (34,60 mm). Comparando éste estudio con esta investigación, a pesar de usar solvente diferente, el extracto metanólico de las semillas de *Vitis vinifera* L., evaluado mediante el método de difusión del disco en agar, presentó actividad sobre *Staphylococcus aureus* (7 mm) de manera similar.

En cuanto a la investigación propuesta por Ahmad, Khan, Waqar, Khan, Khan, Ramazan y cols (2014), evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos acuosos de hojas de uva a la concentración de 3 mg/0,1 mL, utilizando el método de prueba de difusión de disco, en bacterias patógenas, reportando actividad contra *S. aureus* (30 mm), *E. faecalis* (28,9 mm), *E. coli* (28 mm) y *P. aeruginosa* (23,7 mm). Cabe destacar que dicha investigación tiene relación con el trabajo en estudio en cuanto al método usado y la actividad de los extractos metanólicos de las hojas de *Vitis vinifera* L.,

reportada frente a *S. aureus* (7 mm), *E. coli* (8 mm) y *P. aeruginosa* (7 mm), en donde se observaron halos de inhibición menores debido a la diferente concentración utilizada, pero difiere con la actividad reportada frente a *E. faecalis* donde no hubo reporte de sensibilidad.

Así mismo, Nirmala y Narendhirakanan (2011), determinaron la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en pozos de agar y dilución en caldo, de extractos etanólicos de semillas de *Vitis vinifera*, a concentraciones de 50, 100, 150, 200 mg/mL, evidenciando actividad sobre *E. coli* ( $15 \pm 0,1$  mm), *K. pneumoniae* ( $16 \pm 0,1$  mm) *E. faecalis* ( $16,2 \pm 0,1$  mm) *S. aureus* ( $16,2 \pm 0,05$  mm) y *P. aeruginosa* ( $14,2 \pm 0,2$ ) mm a la concentración de 200 mg/mL. Lo cual concuerda con esta investigación ya que, se reportó actividad frente a *E. coli* (7 mm), *K. pneumoniae* (8 mm) *S. aureus* (7 mm) y *P. aeruginosa* (7 mm), en los extractos metanólicos de las semillas de *Vitis vinifera* L. a la concentración de 10 mg/mL, observándose halos de menor tamaño posiblemente debido a las diferentes concentraciones usadas, diferente solvente y diferente método empleado.

Cabe destacar que, los extractos metanólicos de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L., analizados en esta investigación, fueron activos debido a la presencia de compuestos fenólicos en ambos extractos; atribuyéndoles así, la similitud de los resultados reportados en cuanto a la actividad antibacteriana.

En otro orden de ideas, la concentración de los extractos metanólicos de las hojas y semillas de *Vitis vinifera* L., 10 mg/mL y los halos de inhibición evidenciados en la actividad antibacteriana de esta investigación, comparados con las diferentes concentraciones y diferentes halos de inhibición reportados por Ali y cols (2019); Ahmad, Khan, Waqar, Khan, Khan, Ramazan y cols (2014) y Nirmala y Narendhirakanan (2011), mostraron actividad antibacteriana significativa, tomando en cuenta que el

método de difusión del disco en agar tiene como desventaja que los metabolitos secundarios polares se quedan retenidos en el papel de filtro y no difunden completamente en el agar.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

- El tamizaje fitoquímico realizado mediante pruebas químicas del extracto metanólico de las hojas de la especie *Vitis vinifera* L., demostró la presencia de alcaloides, esteroides, compuestos fenólicos y taninos.
- Así mismo, el extracto metanólico de las semillas de la especie *Vitis vinifera* L., demostró la presencia de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides y lactonas sesquiterpénicas.
- En cuanto a la actividad antibacteriana, el extracto metanólico de las hojas de la especie *Vitis vinifera* L., mediante el método de difusión del disco en agar (Kirby-Bauer) a la concentración de 10.000 ppm (10 mg/mL), presentó actividad frente a la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (7 mm); además de cepas bacterianas Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (7 mm), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) (7 mm) y *Escherichia coli* (ATCC 25922) (8 mm).

- Por otra parte, la actividad antibacteriana del extracto metanólico de las semillas de la especie *Vitis vinifera* L., mediante el método de difusión del disco en agar (Kirby-Bauer) a la concentración de 10.000 ppm (10 mg/mL), presentó actividad sobre la cepa bacteriana Gram positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (7 mm); además de cepas bacterianas Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (7 mm), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) (8 mm), y *Escherichia coli* (ATCC 25922) (7 mm). Se puede concluir que, a pesar de usar baja concentración de extractos metanólicos tanto de hojas como de semillas, hubo actividad antibacteriana significativa reportada en ambos extractos.

### Recomendaciones

- Realizar análisis de tamizaje fitoquímico a los extractos de otras partes de la especie *Vitis vinifera* L., como tallo, raspón, hollejo y pulpa.
- Determinar la actividad antimicótica presente en los extractos de las hojas y semillas de la especie *Vitis vinifera* L.
- Utilizar el método de difusión en pozo de agar para determinar actividad antibacteriana.

## BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Ahmad, W., Khan, M., Waqar, M., Khan, M., Khan, A., Ramazan, R., Wali, S., Ahmad, F., Khan, N., Yousaf, S., Zeb, M., Khan, A., Rahman, M., y Faisal, S. (2014). *In vitro* antibacterial activity of *Vitis vinifera* leaf extracts against some pathogenic bacterial strains. ***Advances in Biological Research***, 8 (2), 62-67. Doi: 10.5829/idosi.abr.2014.8.2.82348
- Ali, N., Afrasiab, H., y Anwar, S. (2019). Antibacterial activity of leaf extracts of seven grape cultivars against six strains of bacteria. ***Advancements in Life Sciences***, 6 (4), 159-164.
- Almagro, L. (2011). *Análisis funcional de la producción de compuestos con actividad antitumoral a partir de cultivos y celulares sometidos a licitación* (Tesis Doctoral). Universidad de Murcia, España.
- Andrews, J. (2001). Determination of Minimum Inhibitory Concentration. ***Journal of Antimicrobial Chemotherapy***, 48 (1), 5-16. Doi: 10.1093/jac/48.suppl\_1.5
- Arias, F. (2006). ***El Proyecto de Investigación, introducción a la metodología científica***. Venezuela: Episteme.
- Aviña, D., Carranza, J., Vásquez, B., y Carranza, J. (2016). Capacidad antioxidante y contenido fenólico de uva blanca (*Vitis vinifera* L.) sin semilla. ***Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos***, 1 (1), 801-805.
- Barry, D., Amsterdam, M., Coyle, E., Gerlach, C., y Thornsberry, H. (1979). Simple inoculum standardizing system for antimicrobial disk susceptibility test. ***Journal of Clinical Microbiology***, 10 (6), 910-918. Doi: 10.1128/jcm.10.6.910-918.1979.

- Borja, M., García, J., Reyes, L., y Arellano, S. (2016). Rentabilidad de los sistemas de producción de uva (*Vitis vinifera*) para mesa e industria en Aguascalientes, México. ***Agricultura, Sociedad y Desarrollo***, 13 (1), 151-168.
- Bruneton, J. 2001. ***Farmacognosia, Fitoterapia y Plantas Medicinales***. España: Acribia.
- Bucay, L. (2009). *Estudio farmacognóstico y actividad antimicrobiana de la Violetilla (Hynbanthus parviflorus)* (Trabajo de investigación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- Cabrera, Y., Fradagas, A., y Guerrero, L. (2005). Antibióticos naturales. Mito o realidad. ***Revista Cubana de Medicina General Integral***, 21 (3-4).
- Calapai, G., Bonina, F., Bonina, A., Rizza, L., Mannucci, C., Arcoraci, V., Laganà, G., Alibrandi, A., Pollicino, C., Inferrera, S., y Alecci, U. (2017). A randomized, double-blinded, clinical trial on effects of a *Vitis vinifera* extract on cognitive function in healthy older adults. ***Frontiers in Pharmacology***, 8, 776. Doi: 10.3389/fphar.2017.00776.
- Carvajal, L., Uribe, Y., Sierra, N., y Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). ***Colombia Forestal***, 12, 161-170.
- Castillo, E., y Martínez, I. (2007). ***Manual de fitoterapia***. España: MASSON.
- Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI (Estados Unidos). (2020). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 30 the Edition: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Devi, S., y Singh, R. (2017). Evaluación del potencial antioxidante y antihipercolesterolémico de las hojas de *Vitis vinifera*. ***Ciencia de los***

**Alimentos y Bienestar Humano**, 6 (3), 131-136. Doi: 10.1016/j.fshw.2017.07.002

Domínguez, X. (1979). **Métodos de investigación fitoquímica**. México: Limusa.

Domínguez, M., Galiana, J., y Pérez, F. (2002). **Manual de cirugía menor**. Madrid: Arán Ediciones.

Espinoza, J., y Espinoza, A. (2004). *Determinar los constituyentes químicos en la hoja de la Cissus verticillata L. por medio de un screening fitoquímico* (Tesis Doctoral). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Nicaragua.

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). (2000). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution. **Clinical Microbiology and Infection**, 6 (9), 509- 515. Doi: 10.1046/j.1469-0691.2000.00142.x.

Errecalde, J. (2004). *Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*.

Fan, R., Li, D., Wang, Y., He, T., Feble, A., y Schwarz, S. (2016). Presence of the *optrA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of porcine origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 60 (12), 7200-7205. Doi: 10.1128/AAC.01591-16.

García, I., Morón, F., y Larrea, C. (2010). Plantas medicinales en revistas científicas de Cuba colonial y neocolonial. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, 15 (4), 182-191.

- González, Y. (2011). Taninos de diferentes especies vegetales en la prevención del fotoenvejecimiento. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, 20 (1), 16-20.
- Guillem, Prats. (2006). **Microbiología clínica**. Madrid. Editorial Médica Panamericana.
- Hacek, D., Dressel, D., y Peterson, L. (1999). Highly reproducible bactericidal activity test results by using a modified national committee for clinical laboratory standards broth macrodilution technique. **Journal of Clinical Microbiology**, 37 (6), 1881-1884. Doi: 10.1128/JCM.37.6.1881-1884.1999.
- Hernández, Fernández, C., y Batista, L. (2010). **Metodología de la Investigación**. México: Mc Graw Hill.
- Hidalgo, R., Gómez, M., Rojas, P., Soliz, M., Soliz, R., Rubí, Á., y Dayra. (2016). Propiedades medicinales de la semilla de uva. **Revista de Investigación e Información en Salud**, 11 (26), 53-57.
- Hurtado, J. (2010). **El proyecto de la investigación**. Caracas: FEDUPEL.
- Infectious Diseases Society of America (IDSA). (2011). Combating Antimicrobial Resistance: Policy Recommendations to Save Lives. **Clinical Infectious Diseases**, 52 (5), 397-428. Doi: 10.1093/cid/cir153
- Jianmei, Y., y Mohamed A. (2012). Functional components of grape pomace: their composition, biological properties. **International Journal of Food Science and Technology**, 48 (2), 221-237. Doi: 10.1111/j.1365-2621.2012.03197.x.
- Kato, C., Tonhi, C., y Clemente, E. (2012). Antocianinas de uvas (*Vitis vinifera* L.) producidas en sistema convencional. **Revista Brasileira de**

**Tecnología Agroindustrial**, 6 (2), 809-821. Doi: 10.3895/S1981-36862012000200007

- Langfield, R., Scarano, F., Heitzman, M., Kondo, M., Hammond, G., y Neto, C. (2004). Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galiodes*. **Journal of Ethnopharmacology**, 94 (2-3), 279-281. Doi: 10.1016/j.jep.2004.06.013.
- Lavor, A., Matías, E., Alves, E., Santos, B., Figueredo, F., Lima, L., y Coutinho, H. (2014). Association between drugs and herbal products: *In vitro* enhancement of the antibiotic activity by fractions from leaves of *Croton campestris* A. (Euphorbiaceae). **European Journal of Integrative Medicine**, 6 (3), 301-306. Doi: 10.1016/j.eujim.2014.03.002.
- Leal, C., Santos, R., Pinto, R., Queiroz, M., Rodríguez, M., Saavedra, M., y Gouvinhas, I. (2020). Recovery of bioactive compounds from white grape (*Vitis vinifera* L.) stems as potential antimicrobial agents for human health. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 27 (4), 1009-1015. Doi: 10.1016/j.sjbs.2020.02.013.
- Leguizamón, G., González, A., Báez, R. (2005). Antocianinas en uva (*Vitis vinifera* L.) y su relación con el color. **Revista Fitotecnia Mexicana**, 28 (4), 359-368.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). **Fitoquímica orgánica**. Venezuela.
- Martínez, A., Valencia, G., y Jiménez, U. (2008). **Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica**. Colombia.
- Martínez, J., De Ferrer, B., Ojeda, Ferrer, A., y Nava, R. (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. **Revista de la**

**Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia**, 20 (4), 502-512.

Mbata, T., Debiao, L., y Saikia, A. (2006). Antibacterial activity of the crude extract of Chinese Green Tea. ***African Journal of Biotechnology***, 7 (19), 1571.

McDermott, P., Bodeis, S., Fritsche, T., Jones, R., y Walker, R. (2005). Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents. ***Journal of Clinical Microbiology***, 43 (12), 6136-6138. Doi: 10.1128/JCM.43.12.6136-6138.2005.

Marston, H., Dixon, D., Knisely, M., Palmore, T., y Fauci, A. (2016). Resistencia Antimicrobiana. ***JAMA***, 316 (11), 1193-1204.

McClure, J., y Zhang, K. (2017). Complete genome sequence of a community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* hypervirulent strain, USA300-C2406, isolated from a patient with a lethal case of necrotizing pneumonia. ***Genome Announcements***, 5 (22), 461-517. Doi: 10.1128/genomeA.00461-17.

Nadinic, J., Bandoni, A., Martino, V., y Ferraro, G. (2016). ***Fitocosmética: Fitoingredientes y otros productos naturales***. Argentina: EUDEBA.

Nirmala, J., y Narendhirakanan, R. (2011). *In vitro* antioxidant and antimicrobial activities of grape seed and skin extracts (*Vitis vinifera* L) – Muscat variety. ***International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences***, 3 (4), 242-249.

OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino). (2014). *Organización Internacional de la Viña y el Vino*.

- Orantes, E. (2008). *Tamizaje fitoquímico de la especie vegetal guatemalteca Quararibeayunkerii Standley Subsp. Izabalensis W.S. Alverson ex Veliz (Bombacaceae)* (Informe de tesis). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Organización Mundial de la Salud. (2016). *Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos*.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2016). *El Plan de acción de la FAO sobre la resistencia a los antimicrobianos 2016-2020*.
- Ozaki, M., Uchida, S., Furukawa, K., Akashi, T., Niwa, M., Nona, G., y Nishioka, Y. (1990). Flavonoids in biology and medicine, III: Current issues in flavonoids research. **Singapore**, 259-265.
- Parella, S., y Martins, F. (2010). **Metodología de la Investigación Cuantitativa**. Caracas: FEDUPEL.
- Payo, A., Oquendo, M., y Oviedo, R. (1996). Tamizaje fitoquímico preliminar de plantas que crecen en Holguín. **Revista Cubana de Farmacia**, 30 (2).
- Peirano, G., Bradford, P., Kazmierczak, K., Badal, R., Hackel, M., y Hoban, D. (2014). Global Incidence of carbapenemase Producing *Escherichia coli* ST131. **Emerging Infectious Diseases**, 20 (11), 1928–1931. Doi: 10.3201/eid2011.141388
- Pérez, E., y Ávalos, A. (2009). Metabolismo secundario de plantas. **Reduca**, 2 (3), 119-145.
- Poblete, I., Vargas, D., Lanino, M., y Zúñiga, A. (2017). Caracterización ampelográfica de la cepa Tamarugal (*Vitis vinifera* L.), originaria de la

región de Tarapacá, desierto de Atacama. ***Idesia (Arica)***, 35 (4), 47-54.  
Doi: 10.4067/S0718-34292017000400047

Radulescu, C., Buruleanu, L., Nicolescu, C., Olteanu, R., Bumbac, M., Holban, G., y Simal, J. (2020). Phytochemical profiles, antioxidant and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) Seeds and skin from organic and conventional vineyards. ***Plants (Basel)***, 9 (11), 1470. Doi: 10.3390/plants9111470.

Rajesh, P., Latha, S., Selvamani, P., y Rajesh, V. (2010). Phytochemical screening and toxicity studies on the leaves of *Capparis sepiaria* Linn (Capparidaceae). ***Journal of Basic and Clinical Pharmacy***, 01 (01), 41-46.

Rani, D., y Vijayanchali, S. (2021). Phytochemical composition and antioxidant activity of fresh and dried grape (*Vitis vinifera*) fruit proportions. ***International Journal of Innovative Science and Research Technology***, 6, 734-739.

Reynier, A. (2012). ***Manual de viticultura***. Madrid: Mundi-Prensa.

Riedel, H., Akumo, D., Min, N., Smetanska, I., y Neubauer, F. (2022). Investigation of phenolic acids in suspension cultures of *Vitis vinifera* stimulated with indanoyl-isoleucine, N-Linolenoyl-L-Glutamine, malonyl coenzyme A and insect saliva. ***Journal Metabolites***, 2 (1), 165-177. 10.3390/metabo2010165

Rodríguez, D. (2019). *Efecto antibacteriano del extracto hidroetanólico de las semillas de Vitis vinifera (uva) y Vaccinium corymbosum (arándano) frente a Streptococcus mutans ATCC 25175, Trujillo-2019* (Trabajo de grado). Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Perú.

- Rotman, A., Ahumada, O., Demo, M., Oliva, M., Turina, A., López, M., y Zygadlo, J. (2003). Aromatic plants from Yungas. Part III. Composition and antimicrobial activity of *Myrrhimum atropurpureum* Schott var. *octandrum* Bentham essential oil. ***Flavour and Fragrance Journal***, 18 (3), 211-214. Doi: <https://doi.org/10.1002/ffj.1189>.
- Santamaría, C., Martín, A., y Astorga, F. (2015). *Extractos vegetales, aplicación para la reducción del estrés*.
- Sharapin, N. (2000). ***Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos***. Colombia: CAB.
- Sozzi, G. (2008). ***Árboles frutales. Ecofisiología, cultivo y aprovechamiento***. Buenos Aires:
- Tafur, J., Torres, J., y Villegas, M. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. ***Infection***, 12 (3), 227-232.
- Tambe, B., Pedhekar, P., y Harshali, P. (2021). Phytochemical screening and antibacterial activity of *Syzygium cumini* (L.) (Myrtaceae) leaves extracts. ***Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development***, 9 (5), 50-54. Doi: 10.22270/ajprd.v9i5.1023.
- Tenover, F. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacterium. ***The American Journal of Medicine***, 119 (6), 3-10. Doi: 10.1016/j.amjmed.2006.03.011.
- Tepe, B., Daferera, D., Sökmen, M., y Polissiou, M. (2004). *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigi*. M. Zohary et P.H. Davis. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 52 (5), 1132-1137. Doi: 10.1021/jf035094I

- Tobar, J., Franco, O., Morales, E., y Cruz, J. (2009). Contenido de resveratrol en hojas de vides silvestres (*Vitis* spp.) mexicanas. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias**, 41, 127-137.
- Tortora, G., Funke, B., y Case, C. (2007). **Introducción a la microbiología**. Argentina: Editorial medica panamericana.
- Tzouvelekis, L., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P., Daikos, G. (2012). Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: and evolving crisis of mundial dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, 25 (4), 682-707. Doi: 10.1128/CMR.05035-11
- Upadhyay, A., Karumathil, D., Upadhyaya, I., Bhattaram, V., y Venkitanarayanan, K. (2016). Controlling bacterial antibiotic resistance using plant-derived antimicrobials. **Antibiotic Resistance**, 205-226.
- Valls, J., Lampreave, M., Nadal, M., y Arola, L. (2000). Importancia de los compuestos fenólicos en la calidad de los vinos tintos de crianza. **Alimentación Equipos y Tecnología**, 19 (2), 119-124.
- Ventola, C. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and Therapeutics**. 40 (4), 277-283.
- Villanueva, J. (2020). *Sinergia bactericida del extracto etanólico de Vitis vinifera con oxacilina sobre Staphylococcus aureus ATCC 25923 in vitro* (Tesis para obtener el título profesional de: Médico Cirujano). Universidad César Vallejo, Perú.
- Wan, Y., Schwaninger, H., Baldo, A., Labate, J., Zhong, G., Simón, Ch. (2013). Phylogenetic analysis of the grape genus (*Vitis* L.). Reveals broad reticulation and concurrent diversification during neogene and quaternary climate change. **BMC Evolutionary Biology**, 13, 141.