



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES Dr. ALFREDO
NICOLÁS USUBILLAGA DEL HIERRO.



**TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS
EXTRACTOS DE *Lantana trifolia* (VERBENACEAE) EN CEPAS
BACTERIANAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS.**

Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al Título de
Licenciado en Bioanálisis.

www.bdigital.ula.ve

Autora(s):

Torrealba Tua Josemar Beatriz
C.I. V-25.940.938

Sanabria Ramirez Brenda Katherin
C.I. V-26.287.552

Tutora:

Prof: Johanna C. Hernández M.

Mérida, Julio de 2024.

DEDICATORIA

A Dios, por ser nuestro guía en todo el proceso para la realización de tan importante proyecto, por brindarnos la sabiduría necesaria para esclarecer cada duda y el entendimiento para reconocer que no somos dueños de la verdad absoluta y que nuestros semejantes nos pueden brindar una mano amiga cuando no encontrábamos respuestas a ciertas interrogantes, por darnos fe y compromiso cualidades importantes para culminar exitosamente este proceso.

A nuestros padres Marly Tua, José Torrealba, Blanca Ramírez y Ender Sanabria sin ellos nada de esto fuera sido posible ya que son el pilar fundamental que nos mantuvo siempre erguidas para lograr cada meta necesaria que nos permitió llegar hasta aquí, valoramos enormemente ese esfuerzo que han hecho por nosotras, son la luz que guió cada paso del proceso.

A Josely y Junior Torrealba, por estar siempre presentes y darnos ánimos, fortaleza y hacerme sentir segura para continuar.

A todos aquellos que nos apoyaron y aportaron un grano de arena para lograr nuestro objetivo, encontrarlos en el camino rumbo a la realización de este proyecto fue esa chispa de energía y alegría que nos dio fuerzas.

Este triunfo está dedicado a todos y cada uno de ustedes, que hicieron este camino más sencillo, hermoso y llevadero. LOS AMAMOS.

Josemar Beatriz Torrealba Tua

Brenda Katherin Sanabria Ramirez

AGRADECIMIENTOS

En el presente trabajo investigativo queremos agradecer primeramente a Dios, por ser nuestra roca eterna, que nos otorgó sabiduría, inteligencia, entendimiento, templanza y confianza. Por guiarnos a lo largo de nuestra existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad, encontrando refugio en su infinito amor.

A nuestros amados padres Blanca Ramirez, Ender Sanabria, Marly Tua y José Torrealba quienes a lo largo de sus vidas nos han inculcado que con esfuerzo, trabajo, y amor todo se puede lograr. Cada sacrificio que han hecho, cada día de trabajo duro, cada palabra de aliento y cada decisión que tomaron en nuestros nombres son el fundamento de nuestro éxito. Su dedicación y esfuerzo constante para asegurarnos una excelente educación va más allá de las palabras. Este logro es un testimonio de su inmenso amor, así como también un tributo a la eterna admiración que sentimos por ustedes. Gracias por ser los mejores padres y llenar nuestro mundo de amor y dulzura.

Agradecemos a nuestros docentes, que pese a la vicisitud han compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de nuestra profesión, de manera especial a la tutora de nuestro proyecto de investigación la profesora Johanna Hernández quien nos ha guiado con su paciencia, conocimiento y rectitud en nuestra investigación, de igual manera queremos agradecer al jurado evaluador conformado por las profesoras Alida Pérez e Ysbelia Obregón, así como también a la Profesora Rosa Aparicio e Yndra Cordero quienes con sus correcciones, consejos y ayuda hicieron que la dificultad se convirtiera en aprendizaje. A todos los profesores que a lo largo de la carrera aportaron un granito a nuestro crecimiento tanto intelectual como personal y

por creer en nosotras y otorgar no solo sus conocimientos sino que también su calidad humana.

Agradecimiento especial a nuestro Padrino Eterno el Profesor Dr. Antonio Villavicencio quien en vida, nos ayudó a encontrar en nuestro interior el potencial como estudiantes y humanos que tal vez no sabíamos que era parte de nosotras. De igual manera, al Profesor Luis Rojas que con mucho cariño y compromiso fue el primero en aceptarnos como sus tesis, adquiriendo la responsabilidad de acompañarnos a lo largo de esta hermosa travesía. Ambos estarán por siempre en el pensamiento de cada una de nosotras.

A nuestros compañeros, que ahora somos parte de la Promoción XVIII de Bioanálisis ULA, por demostrarnos que pese a cualquier dificultad en la unión esta la fuerza; sabemos que caminando solo se llega rápido, caminado acompañado se llegara más lejos.

Por último, pero no menos importante a nuestra casa de estudio la ilustre Universidad de Los Andes, en especial a la Facultad de farmacia y Bioanalisis por brindarnos sus instalaciones y permitirnos ser parte de una de las instituciones más esplendidas de nuestro país, gracias por formarnos con excelencia, nos llevaremos siempre los valores de compromiso, responsabilidad, respeto y muchos otros, gracias por darnos más que solo formación académica, aquí obtuvimos grandes lecciones de humanidad, compasión y amor, principios valiosos que nos acompañaron día a día y nos guiaron hasta la meta.

Brenda Katherin Sanabria Ramirez

Josemar Beatriz Torrealba Tua

| ÍNDICE DE CONTENIDO | Pág. |
|--|------|
| VEREDICTO..... | II |
| DEDICATORIA..... | III |
| AGRADECIMIENTOS..... | IV |
| ÍNDICE DE CONTENIDO..... | VI |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | VIII |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | IX |
| RESUMEN..... | X |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| CAPITULO I: EL PROBLEMA..... | 4 |
| Planteamiento del Problema..... | 4 |
| Justificación e Importancia de la Investigación..... | 6 |
| Objetivos de la Investigación..... | 8 |
| Objetivo General..... | 8 |
| Objetivos Específicos..... | 8 |
| Alcances y Limitaciones de la Investigación..... | 9 |
| Alcances de la Investigación..... | 9 |
| Limitaciones de la Investigación..... | 9 |
| CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO..... | 10 |
| Trabajos Previos..... | 10 |
| Antecedentes Históricos..... | 15 |
| Bases Teóricas..... | 17 |
| Productos Naturales..... | 17 |
| Familia Verbenaceae..... | 24 |
| Género <i>Lantana</i> | 26 |
| <i>Lantana trifolia</i> | 26 |
| Extractos Vegetales..... | 29 |
| Métodos de Obtención..... | 29 |

| ÍNDICE DE CONTENIDO (CONTINUACIÓN) | Pág. |
|--|-------------|
| Tamizaje Fitoquímico..... | 31 |
| Generalidades de las Bacterias..... | 34 |
| Microorganismos Patógenos..... | 39 |
| Actividad Antibacteriana..... | 40 |
| Antibióticos..... | 42 |
| Operacionalización de Términos..... | 46 |
| Operacionalización de las Variables..... | 48 |
| Hipótesis..... | 51 |
| CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO..... | 52 |
| Tipo de Investigación..... | 52 |
| Diseño de Investigación..... | 52 |
| Población y Muestra..... | 53 |
| Unidad de investigación..... | 53 |
| Selección del tamaño de la muestra..... | 53 |
| Sistema de variables..... | 54 |
| Instrumento de recolección de datos..... | 54 |
| Procedimiento de la investigación..... | 55 |
| Diseño de análisis..... | 63 |
| CAPITULO IV: Resultados y discusiones..... | 64 |
| Resultados..... | 64 |
| Discusiones..... | 75 |
| CAPITULO V: Conclusiones y Recomendaciones..... | 79 |
| Conclusiones..... | 79 |
| Recomendaciones..... | 80 |
| Referencias Bibliohemerográficas..... | 81 |

| | ÍNDICE DE FIGURAS | Pág. |
|------------------|--|------|
| Figura 1 | Estructuras químicas de los distintos Metabolitos Secundarios..... | 18 |
| Figura 2 | Elementos básicos del metabolismo primario relacionados con el metabolismo secundario..... | 19 |
| Figura 3 | Similitud entre las estructuras químicas del metabolismo primario y secundario..... | 20 |
| Figura 4 | Estructuras químicas de los distintos metabolitos secundarios de <i>Lantana trifolia</i> | 28 |
| Figura 5 | Compuestos químicos en aceites esenciales de <i>Lantana trifolia</i> | 28 |
| Figura 6 | Extractor Soxhlet..... | 30 |
| Figura 7 | Reflujo en caliente..... | 31 |
| Figura 8 | Clasificación de los antibióticos..... | 45 |
| Figura 9 | Obtención de los extractos de la especie vegetal | 56 |
| Figura 10 | Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de tallos y hojas de <i>Lantana trifolia</i> | 73 |

| ÍNDICE DE TABLAS | | Pág. |
|------------------|---|------|
| Tabla 1 | Descripción taxonómica de la familia Verbenaceae..... | 25 |
| Tabla 2 | Cuadro de Operacionalización de las Variables Dependientes..... | 49 |
| Tabla 3 | Cuadro de Operacionalización de las Variables Independientes..... | 50 |
| Tabla 4 | Cepas de Referencia Internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC)..... | 60 |
| Tabla 5 | Peso de la planta, extractos, y porcentaje de rendimiento..... | 64 |
| Tabla 6 | Reporte de resultados del ensayo fitoquímico de los extractos de tallos y hojas de <i>Lantana trifolia</i> | 65 |
| Tabla 7 | Reporte ilustrado de los resultados positivos del ensayo fitoquímico de los extractos de tallos y hojas de <i>Lantana trifolia</i> | 67 |
| Tabla 8 | Resultados obtenidos en la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de tallos y hojas de <i>Lantana trifolia</i> | 71 |



**TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS
EXTRACTOS DE *Lantana trifolia* (VERBENACEAE) EN CEPAS BACTERIANAS
GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS**

Autora(s):

Josemar Beatriz Torrealba Tua.

C.I: V-25.940.938

Brenda Katherin Sanabria Ramírez

C.I: V-26.287.552

Tutor: Prof. Johanna C. Hernández M.

RESUMEN

Lantana trifolia es un arbusto pequeño perteneciente a la familia Verbenaceae, que crece en las regiones tropicales y subtropicales. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antibacteriana y ensayo fitoquímico de los extractos obtenidos en tallos y hojas de *Lantana trifolia* en cepas de referencia internacional. Los extractos fueron obtenidos mediante la técnica en refugio, empleando como solventes etanol y metanol, a los cuales se les realizó el análisis fitoquímico preliminar cualitativo, mediante tamizaje fitoquímico identificando metabolitos secundarios como: esteroles y triterpenos, fenoles, flavonoides y glicósidos. Posteriormente, se determinó la actividad antibacteriana frente a cepas de referencia internacional, a través del método de difusión en agar con disco (Kirby-Bauer). El extracto etanólico de tallos y hojas mostró zonas de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* 8 mm; *Enterococcus faecalis* 7 mm; *Pseudomonas aeruginosa* 8 mm; y *Klebsiella pneumoniae* 7 mm; *Pseudomonas aeruginosa* 7 mm; *Escherichia coli* 7 mm respectivamente, mientras que el extracto metanólico de tallos y hojas a *Enterococcus faecalis* 8 mm; *Klebsiella pneumoniae* 7 mm; *Pseudomonas aeruginosa* 7 mm; y *Enterococcus faecalis* 8 mm; *Klebsiella pneumoniae* 7 mm respectivamente

Palabras claves: *Lantana trifolia*, extractos, actividad antibacteriana, método de Kirby Bauer.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son muy usadas en diferentes culturas del mundo, en poblaciones sudamericanas son utilizadas por sus propiedades medicinales, ya que esto ha contribuido al bienestar y mejora del estado fisiopatológico de las personas, sin embargo, es muy importante conocer con exactitud las plantas a utilizar para evitar efectos indeseables (Musinya, 2022). El uso terapéutico de plantas medicinales como alternativa para el combate de enfermedades infecciosas se aplica desde la antigüedad y actualmente existe gran interés por la medicina tradicional y, dentro de esta, la medicina herbaria, que ha generado numerosos estudios, divulgados en prestigiosas publicaciones que comprueban que los compuestos activos contenidos en un material vegetal pueden tener un uso medicinal (Gallegos y Zurita, 2016).

Entre la inmensa diversidad de géneros y especies de plantas que poseen uso medicinal se encuentra la *Lantana trifolia*, un arbusto perenne con tres hojas en cada nudo; las hojas lanceoladas, con glándulas anaranjadas en la cara inferior, con espigas densa y cilíndrica, con las brácteas inferiores largamente puntiagudas; frutos maduros jugosos y de color lila o púrpura perteneciente a la familia Verbenaceae, es muy común en América Central, América del Sur, el Caribe, Hawái, aunque se puede encontrar en África y en Madagascar. Es muy usada en regiones con dificultad de acceso a medicinas para tratar afecciones que incluyen el tratamiento del asma, resfriado común, malaria, epilepsia, cataratas, conjuntivitis, entre otras enfermedades, afecciones que son tratadas con dicha planta gracias a la presencia de ciertos metabolitos secundarios en la misma (Musinya y cols., 2021). Actualmente algunos metabolitos secundarios se usan en la fabricación de medicamentos, ya que poseen diversas actividades biológicas, en dicho sentido la naturaleza y los productos de ella han sido y continúan

siendo un aliado para el hombre en la prevención, mejora y contribución para la salud pública, ya que no solo se utilizan como punto de partida para la obtención de medicamentos industriales si no que mantienen plena vigencia para el tratamiento de numerosas dolencias y patologías (Musinya y cols., 2021).

En dicho aspecto la *Lantana trifolia* es un arbusto que posee metabolitos secundarios que pueden ser de ayuda para tratar enfermedades respiratorias, infecciones bacterianas, enfermedades reumatóides de etiología inflamatoria, e inclusive quizás contribuya con el sistema inmunológico. Sus propiedades antibacterianas estimulan al ser humano al estudio de las plantas con el fin de descubrir nuevas sustancias que contribuyan a la salud y al tratamiento de ciertas patologías (Musinya y cols., 2021).

www.bdigital.ula.ve

Este trabajo está estructurado siguiendo las normas APA, a través de cinco capítulos, el Capítulo I esta titulado como El Problema, subtitulado, Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II esta titulado como, Marco Teórico y subtitulado por, los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las Variables e Hipótesis. Así mismo, el Capítulo III esta titulado como Marco Metodológico y subtitulado, Tipo de Investigación, Diseño de Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Instrumento de Recolección de Datos, Procedimiento de la Investigación y Diseño de Análisis. El Capítulo IV esta titulado como Resultados y Discusiones, y el Capítulo V está titulado y representado por, Conclusiones Recomendaciones y Referencias Biblioheremográficas.

Finalmente, esta investigación tiene como Objetivo General: Evaluar la actividad antibacteriana y tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos en tallos y hojas de *Lantana trifolia* frente a cepas de referencia internacional mediante el método de Kirby Bauer con el fin de generar datos empíricos suficientes que validen las aplicaciones etnofarmacológicas de *Lantana trifolia* y verificar la seguridad de su uso en el organismo, proporcionando así el fin de cualquier investigación un aporte científico, para el uso de la especie en la prevención y tratamiento de enfermedades, para el avance en el campo de salud.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

La multiresistencia a los antibióticos es un problema que va en aumento en el mundo, llegando a afectar, no solamente a los sistemas de salud de todos los países, sino también, repercutiendo en los diferentes sectores. La amenaza que el mundo sufre, especialmente en los países en vías de desarrollo es llegar nuevamente a la era pre-antibiótico donde el uso de estos medicamentos no sean efectivos para el tratamiento de infecciones. La resistencia antimicrobiana en la región de América ha ido en aumento en los últimos años y Venezuela no se escapa de dicha realidad, esto se ve reflejado en datos proporcionados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) que muestran que Venezuela entre los años 2016 a 2018 arrojó resultados en donde diferentes bacterias presentaron resistencia por encima de 20% a ciertos antibióticos (Mogollón, 2022).

La resistencia de las bacterias es el principal obstáculo para la eficacia terapéutica de los antibióticos, pues no sólo puede anular la acción curativa si se manifiesta en el curso del tratamiento, sino que tiene a la larga consecuencias todavía más graves para el conjunto de la población, ya que provoca la desaparición de las cepas susceptibles y la propagación de las resistentes. Ese es el motivo por el cual la determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos haya adquirido tanta importancia y sea indispensable para hacer de los antibióticos un uso racional y para preservar la eficacia de este grupo tan valioso de agentes terapéuticos (Pedrique, 2022). La amenaza constante a la salud proporcionada por la resistencia

bacteriana, ha implicado como resultado la necesidad de conseguir alternativas que permitan controlar infecciones bacterianas sin perjudicar al ser humano (Sepúlveda y cols., 2003).

Así mismo, dentro de las alternativas para corregir la resistencia bacteriana se encuentra el uso de productos naturales, los cuales se han vuelto cada vez más populares porque son fácilmente accesibles, de bajo costo y se reducen los efectos secundarios (Musinya, 2022).

Una vez descrita la situación actual del problema; los autores de la investigación formularon el siguiente enunciado holopráxico: ¿Cuál es la relación causa-efecto que existe entre la actividad antibacteriana y el tamizaje fitoquímico, en extractos de *Lantana trifolia* en cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas?

Justificación e Importancia de la Investigación

En nuestro planeta los medicamentos son esenciales para la existencia de la vida ya que nos ayudan a combatir enfermedades producidas por diferentes organismos que habitan conjuntamente con los seres humanos, dentro de la amplia clasificación de medicinas existentes se encuentran los antibióticos, estos han sido usados desde el siglo XX siendo muy útiles para combatir grandes infecciones, sin embargo, gracias a su eficacia estos se usan descontroladamente generando un problema de salud pública, ya que se ha aumentado su resistencia haciendo más difícil el tratamiento y prevención de muchas enfermedades infecciosas. A ello se añade la lentitud con la que se está elaborando medicamentos alternos para reemplazar a los que han perdido su eficacia (Acuña, 2003).

Por consiguiente, debido a la necesidad de conseguir alternativas que permitan controlar infecciones bacterianas se ha recurrido a la fitoquímica para demostrar la importancia que las plantas ejercen como valiosa fuentes de sustancias activas con propiedades antibacterianas (Cruz, Rodríguez y Rodríguez, 2010).

Por otra parte, la potencialidad de la investigación se inclina al interés, en que las hojas y tallos de la planta *Lantana trifolia* contienen terpenoides, flavonoides, saponinas y alcaloides, lo cual pudiera estar relacionado con las propiedades medicinales que se le atribuyen a la planta, así mismo se pudo corroborar que varios componentes fitoquímicos presentes en los extractos de la especie estudiada presentaban actividad antibacteriana (Musinya, 2022).

La razón de esta investigación radica que en Venezuela como en la mayoría de países de Latinoamérica, las infecciones provocadas por microorganismos tales como bacterias y hongos, presentan un problema para la salud de la población (Mogollón, 2022). Aunque el empleo de los fármacos sintéticos constituye uno de los avances de la medicina moderna y son ampliamente utilizados para el control de hongos y bacterias estos pueden ocasionar una serie de dificultades, como el abuso de estos ocasiona resistencia por parte de los microorganismos (Martínez, 2016).

Ante esta situación nace la necesidad de plantear una alternativa prometedora, como es el uso de productos naturales derivados de plantas, ya que permite encontrar compuestos bioactivos y una de las ventajas de obtener este tipo de sustancias es que se reducen los efectos secundarios (Torres, León y Tomas, 2017). Durante años se ha demostrado que los metabolitos secundarios de la planta *Lantana trifolia* tienen un gran potencial asociado a la actividad antibacteriana, antiinflamatoria y citotóxica (Agwu, 2019).

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana y tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos en tallos y hojas de *Lantana trifolia* en cepas de referencia internacional.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos (etanol y metanol) de los tallos y hojas de la especie *Lantana trifolia*, mediante el método de reflujo.
- Determinar la composición química de los extractos previamente obtenidos mediante el tamizaje fitoquímico.
- Comprobar la actividad antibacteriana de los extractos de tallos y hojas de la especie *Lantana trifolia* mediante el método de difusión en agar con discos (Kirby-Bauer) en cepas de referencia internacional.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

El alcance de una investigación está representado por la amplitud y profundidad del conocimiento que se quiere aprender (Hurtado, 2000). Por tal motivo, el verbo del objetivo general es la cúspide del conocimiento que se va a adquirir durante la realización de la investigación, ya que el mismo se refiere a la profundidad del estudio a realizar. En este sentido, la investigación tiene como alcance evaluar la acción antibacteriana de los diferentes extractos obtenidos de tallos y hojas de la especie *Lantana trifolia* frente a cepas de referencia internacional Gram positivas y Gram negativas para promover estrategias terapéuticas de origen vegetal como alternativa al creciente problema de resistencia bacteriana.

Limitaciones de la Investigación

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación se presentaron limitaciones relacionadas con los aspectos teóricos, recolección, técnicos y recursos económicos (Hernández, Fernández y Batista, 2010). Las limitaciones existentes en este proyecto vienen dadas por la disponibilidad de trabajos previos, pues se han encontrado pocos artículos actualizados, así mismo, en la recolección de la planta debido a que la especie en estudio es la menos común en el estado Mérida, otra limitación es de tipo técnica, ya que los instrumentos utilizados en ocasiones han presentado fallas. También limitaciones de presupuesto, suscitadas por la crisis económica que presenta el país.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Musinya (2022), en su trabajo de investigación: Actividad antimicrobiana, toxicidad y análisis fitoquímico de extractos de hojas de *Lantana trifolia*, tuvo como objetivo principal: investigar la composición fitoquímica, la actividad antimicrobiana, la toxicidad aguda y subaguda de extractos de hojas de *Lantana trifolia* para validar su uso etnomedicinal. Los métodos utilizados fueron: el análisis fitoquímico cualitativo de extractos acuosos y orgánicos (metanol) para identificar compuestos de valor farmacológico, utilizando la maceración; y método de difusión en agar con discos (Kirby-Bauer) para el estudio antimicrobiano. Obtuvo como resultados en el análisis fitoquímico cualitativo de ambos extractos la presencia de taninos, saponinas, compuestos fenólicos, terpenoides, flavonoides y alcaloides, en cuanto al estudio de la actividad antimicrobiana entre los microorganismos utilizados *Staphylococcus aureus* (Gram positivo), *Bacillus cereus* (Gram positivo), *Escherichia coli* (Gram negativo) y *Candida albicans* (levadura), el microorganismo más susceptible fue *Candida albicans*. Los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de los extractos acuosos y metanólicos de hojas de *Lantana trifolia* para *S. aureus* fueron 200 mg/mL y 400 mg/mL; 3,12 mg/mL y 6,25 mg/mL respectivamente. La concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima fungica (CMF) para *Candida albicans* fueron 100 mg/mL y 3,125 mg/mL para extractos acuosos y metanólicos. Así mismo, en el estudio de toxicidad oral aguda, el extracto acuoso de hojas de *Lantana trifolia* demostró una dosis letal media (LD₅₀) de >2000 mg/Kg, lo que demuestra su

seguridad, por lo tanto el extracto acuoso de hojas de *Lantana trifolia* puede ser relativamente no tóxico cuando se administra por vía oral durante un período corto. Concluyó que es necesario controlar los parámetros hepáticos, renales, hematológicos y bioquímicos, especialmente cuando se administran dosis más altas durante un período prolongado, ya que pueden producirse efectos nocivos dependientes de la dosis. De igual manera, pudo corroborar que varios componentes fitoquímicos presentes en los extractos de hojas de *Lantana trifolia*, presentaban actividad antimicrobiana, por lo que esto podría constituir la base para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Teniendo en cuenta los componentes de los extractos se plantea el uso etnomedicinal de la planta *Lantana trifolia*, razón por la cual se incluye este trabajo como antecedente de la presente investigación.

Madivoli y Ondoo (2020), publicaron un trabajo en la revista de plantas medicinales para el desarrollo económico, titulado: *Lantana trifolia*: composición fitoquímica y elemental, contenido proximal y perfil de cromatografía de gases-espectrometría de masas. El objetivo general fue: analizar la composición proximal, la composición elemental, el contenido fenólico total y el perfil de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) de *Lantana trifolia*. El método utilizado para las composiciones proximales y elementales de las muestras de hojas, tallos y raíces se evaluaron mediante procedimientos estándar, mientras que los contenidos fenólicos y flavonoides fueron evaluados por el método Folin-Ciocalteu y cloruro de aluminio. Los metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de toda la planta se determinaron mediante CG-EM. Los resultados fueron: Los análisis proximales y elementales de la planta revelaron que *Lantana trifolia* puede ser una buena fuente de elementos esenciales, proteínas, fibra cruda y carbohidratos en las raíces. Las concentraciones de calcio, hierro, magnesio y zinc en las hojas resultaron ser

de $8860,755 \pm 66,27$, $11003,1014 \pm 3,24$, $1520,252 \pm 6,85$ y $39,6615 \pm 6,68$ mg/Kg respectivamente, en comparación con las raíces y tallos que fueron menores. En conclusión la concentración de compuestos fenólicos totales y flavonoides totales y el perfil CG-EM de los extractos metanólicos revelaron que *Lantana trifolia* pueden ser una buena fuente de metabolitos secundarios, algunos de los cuales han sido reportados como eliminadores de radicales libres. Por lo tanto, *Lantana trifolia* no solo se puede usar para obtener gran variedad de metabolitos secundarios, sino que su contenido nutricional sugiere que la planta se puede usar para combatir la deficiencia de nutrientes entre muchas comunidades que carecen de los recursos adecuados, porque prospera en la naturaleza. Relacionándose así con nuestra investigación, ya que en ambas se estudia la composición química de la especie.

Madivoli, Gachoki y Gachanja (2020), publicaron un trabajo original en la Revista de materiales y polímeros inorgánicos y organometálicos, titulado: Síntesis fácil de nanopartículas de plata utilizando extractos acuosos de *Lantana trifolia* y su actividad antimicrobiana. El objetivo general fue: analizar los extractos acuosos de *Lantana trifolia* para sintetizar nanopartículas de plata y determinar su actividad antibacteriana y antifúngica. La muestra estuvo representada por los metabolitos secundarios, las nanopartículas y la actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de *Lantana trifolia*. En cuanto a la investigación fitoquímica se realizó mediante maceración , la morfología, el tamaño y los grupos funcionales presentes en las nanopartículas de plata se evaluaron mediante microscopía electrónica y espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FT-IR), el papel de la temperatura, el tiempo de reacción y la concentración del ion precursor se evaluaron mediante la resonancia del plasmón superficial de nanopartículas de plata mediante espectroscopía UV-Visible y la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar con discos de Kirby-Bauer. Los datos

obtenidos en este estudio revelaron que el aumento en el tiempo de reacción condujo a un aumento en la resonancia del plasmón superficial de las nanopartículas de plata, mientras que el aumento de la temperatura de 20 a 35 °C aumentó la tasa de síntesis de nanopartículas de plata. Los diámetros de las nanoparticulas estaban entre 35 y 70 nm y tenían actividad antimicrobiana moderada contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *S. aureus* y *B. subtilis*. En conclusión, al aumentar la temperatura de la reacción, se obtuvo un aumento en la síntesis de nanopartículas a partir de metabolitos secundarios de *Lantana trifolia*, de igual manera se logró evidenciar que las nanopartículas de plata poseen actividad antimicrobiana frente a diversos microorganismos. Guardando estrecha relación con nuestra investigación, ya que las cepas estudiadas mostraron un comportamiento similar.

Agwu (2019), publicó un trabajo original en la Revista de Ciencias Aplicadas y Gestión Ambiental, titulado: Actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de flores de *Lantana trifolia* en aislamientos bacterianos de heridas. El objetivo general fue: analizar la actividad antibacteriana en los extractos de *Lantana trifolia* en aislamiento bacteriano de heridas. La muestra fue representada por los componentes fitoquímicos y la actividad antibacteriana en los extractos de flores de *Lantana trifolia* contra bacterias aisladas de heridas quirúrgicas y diabéticas de pacientes. En cuanto a la investigación fitoquímica se realizó mediante maceración, la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar con discos Kirby Bauer. La preparación de concentración del extracto de la planta se realizó con 750 mg de etanol, y se agregaron extractos acuosos de hojas de *Lantana trifolia* a pequeños mL de etanol y agua destilada respectivamente para dar una concentración de 300 mg/mL, así mismo, se prepararon otras concentraciones de 150, 75, 37,5 y 18,75 mg/mL mediante un método de dilución. En los resultados obtenidos se evidenció que los fitoquímicos

presentes en las flores de *Lantana trifolia* incluyen flavonoides, taninos, glucósidos feniletanoides, azúcares reductores, terpenoides, saponinas, alcaloides, antraquinonas y esteroles. El rango de diámetro de inhibición fue significativamente ($P<0,05$) menor en el extracto acuoso ($15,2\pm1,5$ a $35,5\pm0,9$ mm) que en el etanólico ($28,3\pm3,4$ a $49,18\pm1,9$ mm). La actividad antibacteriana se produjo a concentraciones bajas (18,75 mg/mL) solo para el extracto etanólico. El aislamiento bacteriano más sensible al extracto de *L. trifolia* fue *Staphylococcus aureus* ($35,5\pm0,9$ mm y $49,1\pm8,9$ mm para los extractos acuoso y etanólico respectivamente a (300mg/mL), mientras que los menos sensible fue *Corynebacterium* sp. ($15,2\pm1,5$ mm) y *Mycobacterium* sp. ($28,3\pm3,4$ mm) a 300 mg/mL para extractos acuosos y etanólicos respectivamente. La concentración inhibitoria mínima fue menor para el extracto etanólico, 18,75 mg/mL a 37,5 mg/mL que el extracto acuoso (37,5 a 150 mg/mL). La concentración bacteriana mínima vario de 37,5 mg/mL y 150 mg/mL para extracto etanólico y de 70 y 300 mg/mL para extracto acuoso. En conclusión, *S. aureus* fue la cepa más resistente a los antibióticos (72%), mientras que *Corynebacterium* sp. y *Mycobacterium* sp. fueron las cepas menos resistentes (9,1%). *Lantana trifolia* fue más bacteriostática que los antibióticos más efectivos, Ciprofloxacina, Rocephin, Nitrofurantoina, y merece una mayor investigación. Este estudio se relaciona con nuestra investigación, en la similitud de los compuestos aislados de la planta, así como también en el microorganismo *S. aureus* que presentó sensibilidad ante los extractos etanólicos.

Antecedentes Históricos

Las infecciones ocasionadas por microorganismos han motivado el interés del ser humano desde la antigüedad, destacando inicialmente la infección de heridas en piel producto de guerras o cacerías, sobre las cuales se intentó amplias acciones terapéuticas. En Egipto 2500 años a.C, se empleaba la mirra para el tratamiento de las heridas y con el pasar del tiempo fueron descubriendose diversas opciones terapéuticas. Un hecho realmente importante surgió en 1928, en el que Alexander Fleming, descubrió la penicilina; basado en el fenómeno de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, en una placa contaminada por *Penicillium notatum* (Acuña, 2003).

Sin embargo, actualmente se calcula que la mayoría de los pacientes hospitalizados reciben tratamiento antimicrobiano, por lo que en las últimas décadas se han obtenido numerosos compuestos de esta índole. Por esta razón, su amplio uso fomenta el aumento de la resistencia de las bacterias, lo que crea una gran necesidad para la elaboración de nuevos tratamientos (Sande, 1982).

La búsqueda de sustancias con actividad antibacteriana en fuentes no tradicionales como las plantas, ha sido importante porque existe la posibilidad de encontrar metabolitos secundarios con buena actividad frente a bacterias resistentes a antibióticos. Por tal motivo, las investigaciones de sustancias de plantas con actividad antibacteriana comenzaron hace muchos años, ya en 1949 se conocían algunas; posteriormente se publicaron informes sobre ensayos preliminares de un número grande de especies (Mantilla y Sanabria, 1985).

Hoy en día, existe una gran cantidad de géneros pertenecientes a la familia Verbenaceae, la cual posee diversas propiedades farmacológicas, entre dicha familia resalta el género *Lantana* que ha sido ampliamente estudiado en todos sus aspectos. *Lantana trifolia* se denomina comúnmente como “cariaquito morado”, es un arbusto pequeño o hierba, erecto, sin espinas con un tamaño de hasta 2 m de alto, varios estudios han confirmado que en sus hojas contienen flavonoides con actividad antimicrobiana, así como también, es ampliamente utilizada por sus propiedades antiinflamatorias en muchos países de Latinoamérica resaltando entre ellos Venezuela (Uzcategui y Ávila, 2004).

www.bdigital.ula.ve

Bases Teóricas

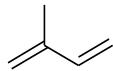
Productos Naturales

A toda la diversidad de compuestos que el hombre extrae de un vegetal y aprovecha o intenta darle alguna utilización los denominamos productos naturales vegetales (Ringuelet y Viña, 2013). A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios (también denominados productos secundarios, productos naturales) (Avalos y Pérez, 2009).

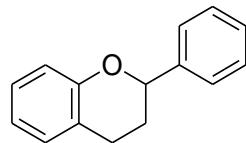
Clasificación de los Productos Naturales:

El mundo vegetal es quizás, el que muestra un abanico de moléculas más diverso y del cual el hombre ha hecho y hace una provechosa utilización. La maquinaria química de un vegetal es tan ingeniosa que asombra al estudiar en su profundidad la estructura, función, metabolismo y regulación de cada molécula identificada y de los innumerables procesos en que participan a nivel celular. Por otra parte, al no contar con el mecanismo de evasión y encontrarse ancladas al suelo o algún otro sustrato, las variadas especies vegetales han necesitado desarrollar mecanismos químicos de defensa que posibilitan su supervivencia frente al ataque de parásitos y herbívoros (Ringuelet y Viña, 2013). Estos mecanismos han derivado en la formación de diferentes productos naturales agrupados principalmente en cuatro clases (Figura 1):

- **Terpenos.** Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales e isopropeno (1).
- **Compuestos fenólicos.** Cumáreas, fenoles, flavonoides (2), lignina y taninos.
- **Glicósidos.** Saponinas (3), glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos
- **Alcaloides.** Cafeína (4), morfina y cocaína (Avalos y Pérez, 2009).

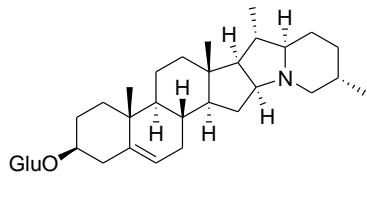


Isopropeno (1)

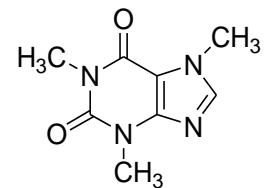


Flavonoides (2)

www.bdigital.ula.ve



Saponina (3)



Cafeína (4)

Figura 1: Estructuras químicas de los distintos metabolitos secundarios.

Tomado y modificado de Avalos y Pérez, 2009.

Rutas Biosintéticas:

Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono (Figura 2).

La estructura química entre unos y otros a veces es muy parecida. Es el caso de la prolina (metabolito primario) y el ácido pipecólico (metabolito secundario), compuestos muy relacionados estructuralmente entre sí (Figura 3) (Ávalos y Pérez, 2009).

Existen tres intermedios químicos principales como son el acetil-CoA, el ácido shikímico y el ácido mevalónico, a partir de estas tres rutas se biosintetizan los principales grupos de productos naturales como son los ácidos grasos, antraquinonas, terpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas, lignanos, entre otros (Ávalos y Pérez, 2009).

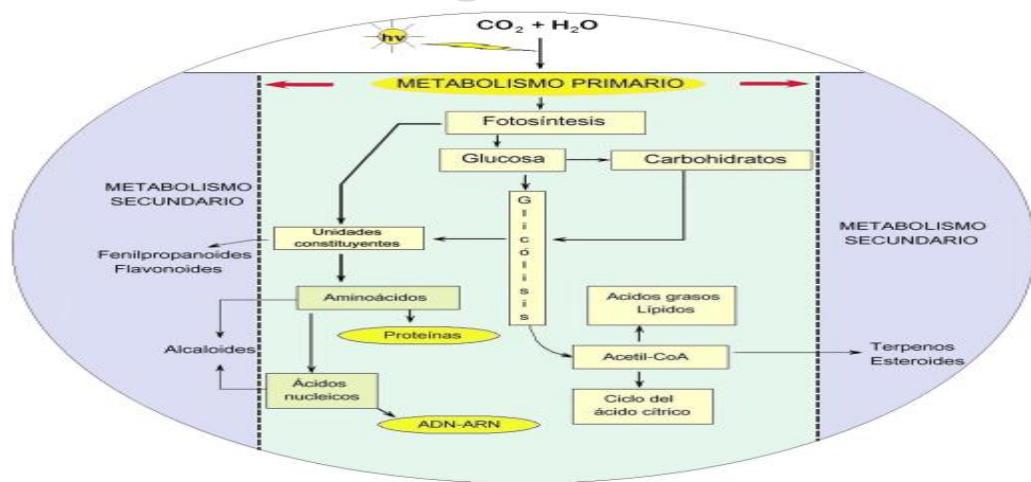


Figura 2. Elementos básicos del metabolismo primario relacionados con el metabolismo secundario.

Tomado y modificado de Avalos y Pérez, 2009.

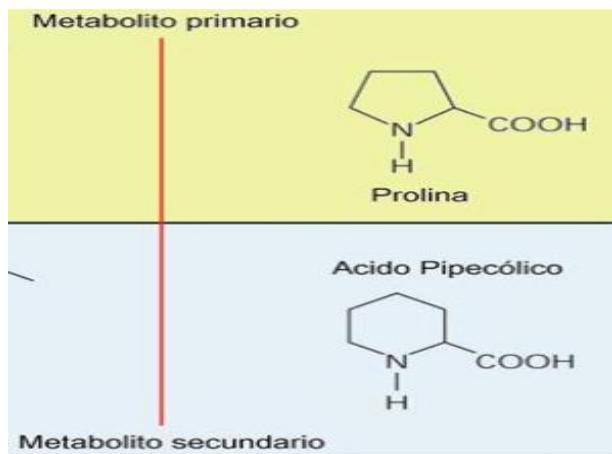


Figura 3. Similitud entre las estructuras químicas del metabolismo primario y secundario.

Tomado y modificado de Avalos y Pérez, 2009.

La síntesis de los productos naturales comienza con la fotosíntesis que tiene lugar en plantas superiores, algas y algunas bacterias. Es un proceso endotérmico que requiere de la luz solar. Aquellos organismos incapaces de absorber la luz obtienen su energía de la degradación de carbohidratos (Gutiérrez y Estévez, 2009).

Alcaloides:

Debido a que muchos alcaloides tienen fórmulas químicas complejas y múltiples carbonos asimétricos, tanto la elucidación de sus estructuras químicas como el estudio de sus vías de biosíntesis han sido relativamente recientes y difíciles de resolver, y en algunos casos permanecen aún incompletas. Casi todas las enzimas involucradas en la biosíntesis de la nicotina y la morfina han sido identificadas, pero luego de alrededor de 190 años después del aislamiento de esta última. Las rutas biosintéticas son diversas y los precursores que utilizan las plantas son los aminoácidos: L-

ornitina, L-arginina, L-lisina, histidina, L-fenilalanina, L-triptófano o L-tirosina; y en menor proporción otros compuestos que pueden intervenir como la L-prolina, el ácido antranílico, el ácido nicotínico, y otros. El heterociclo requiere de procesos inter o intramoleculares, pudiendo participar una única molécula de aminoácido (como en el caso de la higrina, de la peletearina), dos moléculas del mismo aminoácido (para la formación de los alcaloides quinolizidínicos y bencilisoquinoleínas), dos aminoácidos diferentes (para el caso de la tubulosina), o varias moléculas del mismo aminoácido como en el caso de la esparteína (Ringuelet y Viña, 2013).

En general la estructura carbonada del aminoácido es mantenida intacta en la estructura del alcaloide, mientras que el carbono del ácido carboxílico sufre descarboxilación. En algunos casos la molécula requiere carbonos suplementarios, y éstos pueden ser proporcionados por grupos acetatos (en el caso de los tropanos), dimetilalilpirofosfatos (en las ergolinas y furoquinoleínas), o por el secologanósido en el caso específico de los alcaloides indolmonoterpénicos; es decir que, el resto de la molécula deriva de otras vías (la vía del acetato, la vía del ácido shikímico o la vía del ácido mevalónico). Las variaciones estructurales encontradas en los diferentes alcaloides, que se han ido sumando al screening o mapa alcaloídico, surgen de reacciones de oxidación, esterificación, acoplamientos, etc (Ringuelet y Viña, 2013).

Glicósidos Cianógenos:

Sus precursores biosintéticos son algunos aminoácidos que sintetizan a los diferentes glicósidos cianógenos (GC) por la vía de aldoximas y nitrilos. Para su mejor estudio se los suele clasificar a los GC en derivados de la valina, leucina e isoleucina: para la síntesis de linamarina, cardiospermina,

proacacipetalina, y lotaustralina; los derivados de la fenilalanina, para generar prunasina, amigdalina, lucumina y vicianina; y los que derivan de la tirosina: taxifilina, durrina, trigloquinina, entre otros (Ringuelet y Viña, 2013).

Glicósidos cardiacos o cardenólidos

Son semejantes a las saponinas esteroideas, tienen también propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Se encuentran de forma natural en forma de glicósidos o de agliconas. Quizá el más conocido sea la digitoxina o su análogo digoxina, aislada de *Digitalis purpurea* y utilizada como medicamento en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva (Ávalos y Pérez, 2009).

Saponinas

Se encuentran como glicósidos esteroideos, glicósidos esteroideos alcaloides o bien glicósidos triterpenos. Son por tanto triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. Se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar (el terpeno sin el azúcar, por ejemplo), en cuyo caso se denominan sapogeninas. La adición de un grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas (Ávalos y Pérez, 2009).

Compuestos Fenólicos

Cumarinas

Este grupo de compuestos fenólicos simples también presentan el esqueleto básico fenilpropanoide, pero difieren de los fenilpropanoides simples en que la cadena lateral forma una estructura cíclica, un anillo. Corresponden a lactonas fenilpropanoides. Algunos ejemplos que pueden mencionarse incluyen a la cumarina, la umbeliferona (7-hidroxicumarina), la

esculetina (6,7-dihidroxicumarina) y la escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicumarina). Se ha mencionado que los dos últimos compuestos se originarían por adición de sustituyentes oxigenados al anillo aromático de la umbeliferona (Ringuelet y Viña, 2013).

Flavonoides

El esqueleto común de todos los integrantes del grupo consta de dos anillos de seis átomos de carbono (designados con las letras A y B) unidos mediante un puente de tres átomos de carbono que por lo común forma un tercer ciclo (anillo C) (Ringuelet y Viña, 2013).

Dependiendo del grado de oxidación del anillo central, se obtienen las diferentes estructuras de cada compuesto flavonoide en particular. Dentro de las principales clases de flavonoides están comprendidos: chalconas, flavanonas, flavonas, flavonoles, isoflavonas, flavan-3-oles y antocianidinas. Así mismo, los compuestos flavonoides incluyen a las unidades monoméricas de los denominados taninos condensados, las proantocianidinaso proantocianidoles (Ringuelet y Viña, 2013).

Taninos

Como el resto de los compuestos fenólicos, los taninos son químicamente reactivos, capaces de formar puentes de hidrógeno intra e intermoleculares. Se trata de sustancias fácilmente oxidables, ya sea por acción de enzimas vegetales específicas o por efecto de metales (por ejemplo el ión férrico, bajo la forma de FeCl_3), que produce el oscurecimiento de sus soluciones (Ringuelet y Viña, 2013).

Terpenos

Un gran número de sustancias vegetales están incluidas en este grupo de metabolitos secundarios o productos naturales denominados terpenoides.

Quizás es el grupo más numeroso, con varios miles de estructuras descriptas. Todas tienen el mismo precursor biosintético (isopentenil-PP) y tienen como unidad estructural básica a la molécula de isopreno, de cadena abierta, ramificada e insaturada:

Sus esqueletos carbonados se forman por la unión de dos o más de estas unidades de 5 carbonos, de ahí que también se los denomina isoprenoides. Son liposolubles, o sea solubles en solventes orgánicos, aunque algunos se encuentran solubles en el contenido celular por estar formando parte de glicósidos o poseer alguna transformación estructural (Ringuelet y Viña, 2013).

Familia Verbenaceae

La familia Verbenaceae (Tabla 1) es cosmopolita, se encuentra distribuida principalmente en las regiones tropicales atempladas del hemisferio sur, comprende alrededor de 100 géneros y unas 2000 especies. En Venezuela se han reportado 17 especies, dentro de las más destacadas se encuentran *L. caracasana* Turcz, *L. canescens* Kunth y *L. camara* L. dichas especies se encuentran distribuidas entre 0-2550 msnm, ocupando muchos ambientes con diferentes regímenes de precipitación, algunos de ellos semi-xerofíticos, que se caracterizan por una baja disponibilidad hídrica (González y cols., 2009).

Las especies de esta familia se caracterizan por ser plantas herbáceas anuales o perennes, arbustos y con menos frecuencia árboles, con los tallos a menudo tetrágonos, a veces espinosos y generalmente con indumento de pelos simples o complejos. Hojas opuestas o verticiladas, simples, trifoliadas o palmaticompuestas, con el margen entero, dentado, lobulado o hendido;

estípulas ausentes. En esta familia abundan las plantas con propiedades medicinales (Sánchez, 2018). En estudios realizados a los aceites esenciales obtenidos de plantas de la familia Verbenaceae se han encontrado gran variedad de componentes entre los que resaltan: monoterpenos y sesquiterpenos, tales como timol, β -cariofileno, citral, 1,8-cineol, carvona y limoneno. La presencia de estos compuestos, que aumentan o alteran la permeabilidad de membranas bacterianas, podrían explicar su acción antimicrobiana y su efecto sinérgico con antibióticos (Pérez, Torres y Núñez, 2018).

Tabla 1. Descripción taxonómica de la familia Verbenaceae

| Taxonomía | |
|-----------|---------------|
| Reino: | Plantae |
| División: | Magnoliophyta |
| Clase: | Magnoliopsida |
| Orden: | Lamiales |
| Familia : | Verbenaceae |

Tomado y modificado de Sánchez, 2018.

Género *Lantana*

El género *Lantana*, comprende arbustos o plantas herbáceas, erectas semitrepadoras, con los tallos a veces espinosos, hirsutos, escábridos o tomentosos. Hojas opuestas o ternadas, simples, con el margen dentado, generalmente rugosas al tacto y con un olor característico. Inflorescencia en espigas cilíndricas densas, a veces comprimidas formando capítulos subglobosos y densos, con brácteas. Flores sésiles, amarillas, rojas, moradas, blancas o rosadas, naciendo en la axila de una bractéola. El nombre de *Lantana* fue puesto por Linneo a este género en razón al parecido de sus inflorescencias con las del viburno (*Viburnum Lantana*). Dentro de las especies más destacadas del género *Lantana* se encuentran presentes: *Lantana cámara*, *Lantana montevidensis*, *Lantana trifolia*, *Lantana involucrata* (Sánchez, 2018).

Las especies del género *Lantana* han sido ampliamente utilizadas por sus propiedades etnomedicinales farmacéuticas y como plantas ornamentales (García, 1992). En el mismo orden de ideas, en el estudio de las diversas especies (*Lantana camara* L., *Lantana hispida* HBK y *Lantana trifolia* L) se les realizó el tamizaje fitoquímico obteniendo siete metabolitos principales, tales como: antraquinonas, flavonoides, cumarinas, principios amargos, alcaloides, taninos y saponinas (Lara, 2009).

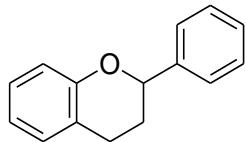
Lantana trifolia

Lantana trifolia, también conocida por sus nombres en inglés *Threeleaf shrubverbena*, *lavender popcorn*, es un arbusto con tres hojas en cada nudo; las hojas lanceoladas, con glándulas anaranjadas en la cara inferior, con espigas densas y cilíndricas, con las brácteas inferiores largamente

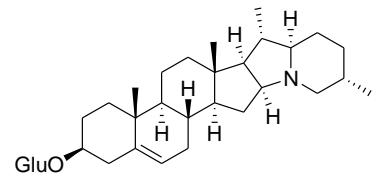
puntiagudas; frutos maduros jugosos y de color lilas o púrpuras. Las plantas del género *Lantana* se encuentran ampliamente distribuidas en todo el planeta, en cuanto a la especie *Lantana trifolia* es importante resaltar que, es una planta en la cual están presentes diversos metabolitos secundarios con diferentes actividades biológicas (Vibrans, 2009).

En tal sentido, el estudio realizado por Madivoli y Ondoo, logró evidenciar que la composición química presente en las diferentes partes de la especie *Lantana trifolia* poseen un alto contenido fenólico total, en el cual las hojas registraron el mayor contenido de flavonoides en comparación con los tallos que tenían menor cantidad del metabolito mencionado. En el mismo orden de ideas, los fenoles como flavonoides ejercen su actividad antioxidante absorbiendo radicales libres y especies receptivas de oxígeno, por lo que juega un papel importante en la eliminación de radicales libres oxidativos. Cabe resaltar, que en la especie estudiada estaban presentes los terpenos que constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios, así mismo, tienen gran importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antibacterianas, antimicrobianas, entre otras (Madivoli y Ondoo, 2020).

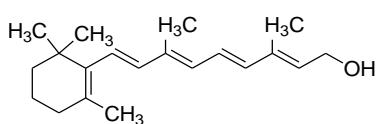
Por otra parte, en el estudio de la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de flores de *Lantana trifolia* en aislamientos bacterianos de heridas, se logró evidenciar que en su composición química estaban presentes (Figura 4) flavonoides (2), saponinas (3), taninos, azúcares reductores, terpenos (5), alcaloides, antraquinonas (6) y esteroles Agwu (2009), mientras que en los aceites esenciales de dicha familia se encontró (Figura 5) β -cariofileno (7), germancreno (8) y metileuginol (9), lo cual sugiere una mayor factibilidad de aplicación económica (Pérez, 2011).



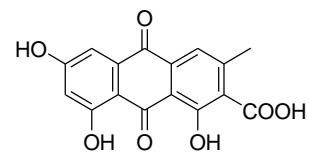
Flavonoides (2)



Saponina (3)

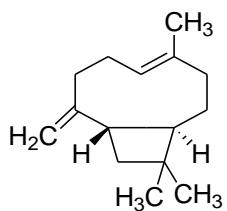


Terpenos (5)

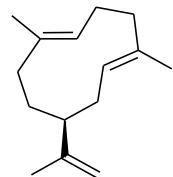


Antraquinonas (6)

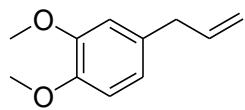
Figura 4. Estructuras químicas de los distintos metabolitos secundarios de *Lantana trifolia*
Tomado y modificado de Agwu, 2019.



β - cariofileno (7)



Germacreno D (8)



Metileugenol (9)

Figura 5. Compuestos químicos en aceites esenciales de *Lantana trifolia*.
Tomado y modificado de Pérez, 2011

Extractos Vegetales

La extracción es el proceso de separación de uno o más componentes de una mezcla compleja, su objetivo principal es obtener un componente específico para agregar valor al producto. El proceso de separación puede ser clasificado de acuerdo a la naturaleza del material extraído o clasificado por el tipo de fases en contacto, como sólido-líquido, líquido-líquido, entre otros (Viganó y Martínez, 2015).

Métodos de obtención:

La separación de sustancias a partir de matrices vegetales se clasifica como extracción sólido-líquido y puede llevarse a cabo a través de métodos convencionales o no convencionales (Viganó y Martínez, 2015).

En cuanto a la extracción convencional, este tipo de extracción incluye técnicas clásicas basadas en la capacidad de extracción de diferentes disolventes y/o aplicación de calor y agitación. Las técnicas clásicas para la extracción de compuestos a partir de vegetales son Soxhlet y maceración. Estos métodos de extracción tienen como ventaja el bajo costo del montaje de la unidad extractora y como desventajas, los altos tiempos de extracción, el uso de grandes cantidades de disolventes, su baja selectividad (Viganó y Martínez, 2015).

Extracción con Soxhlet: es una extracción semicontinua con un disolvente orgánico. En este procedimiento la muestra sólida finamente pulverizada se coloca en un cartucho de material poroso que se sitúa en la cámara del extractor soxhlet (Figura 6). Se calienta el disolvente extractante, situado en el matraz, se condensan sus vapores que caen,gota a gota, sobre el cartucho que contiene la muestra, extrayendo los analitos solubles.

Cuando el nivel del disolvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón lateral, el disolvente, con los analitos disueltos, asciende por el sifón y retorna al matraz de ebullición (Cela, Lorenzo y Casais, 2003).



Figura 6. Extractor Soxhlet

Tomado y modificado de Cela, Lorenzo y Casais, 2003.

Maceración: el proceso de maceración consiste en la separación de los componentes líquidos de un compuesto sólido. Esto se logra en su mayoría con el uso de agua como disolvente natural, aunque existen varios tipos de componentes actos para la solubilidad, como aceites, o alcohol.

Características de la Maceración:

- En el proceso de maceración se extraen todos los principios activos (Materia prima) de las plantas y frutos.
- El efecto que produce el líquido soluto, es potenciar la concentración y extracción de la materia prima.
- Generalmente se debe reposar por unos días el compuesto sólido en el soluto, que puede ser agua para que comience la extracción de sus líquidos.
- La extracción de líquidos en plantas, se utiliza para la medicina tradicional (Cela, Lorenzo y Casais, 2003).

Reflujo en caliente: el modo más común de llevar a cabo reacciones orgánicas a temperaturas elevadas consiste en utilizar un disolvente a ebullición en un montaje en el que el vapor del disolvente condense en un refrigerante colocado sobre el matraz de reacción, de manera que vuelva a la mezcla de reacción. Este procedimiento recibe el nombre de técnica de reflujo (Figura 7). La temperatura de reacción es muy próxima al punto de ebullición del disolvente escogido, por lo que se mantiene razonablemente constante durante todo el transcurso de la reacción mientras tenga lugar la ebullición. En los montajes en que se utiliza la técnica de reflujo, la fuente de calor para el matraz de reacción es habitualmente una manta calefactora (Aguado, 2012).

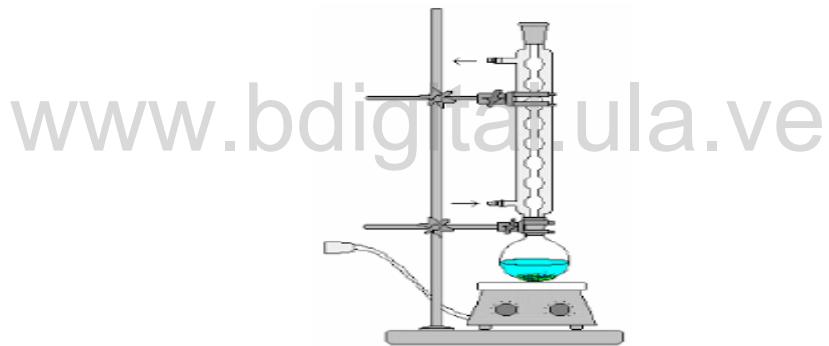


Figura 7. Reflujo en caliente

Tomado y modificado de Aguado, 2012.

Tamizaje Fitoquímico

Se refiere al estudio cualitativo de todos los metabolitos de un organismo, por ejemplo, una planta o un ser vivo. También refiere al estudio y relación entre dos seres vivos, por ejemplo, humanos y vegetales, en el caso de la planta se pueden realizar estudios para obtener conocimientos sobre ella y sus utilidades en la cultura popular tradicional. Así mismo, otorga

información detallada sobre un gran número de compuestos que se encuentran en las plantas en un momento dado al nivel de los compuestos primarios y secundarios. Lo más relevante es que permite realizar un análisis completo de un organismo vegetal (Castillo y cols., 2017).

La fitoquímica comprende el estudio de metabolitos secundarios presentes en especies vegetales, los cuales pueden ser fenoles y polifenoles, quinonas, flavonas y flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides y aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos, glucósidos y saponinas, así como esteroides y xantona (Castillo y cols., 2017).

El tamizaje fitoquímico consiste en la obtención de extractos de plantas con solventes apropiados, tales como agua, acetona, alcohol, cloroformo y éter. Otro solvente, el diclorometano, se usa específicamente para la extracción de terpenoides. Posterior a la extracción, se llevan a cabo reacciones de coloración, las cuales son reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Algunas de las reacciones evalúan grupos de sustancias y otros la presencia de otros compuestos como ácidos grasos, azúcares reductores, polisacáridos y mucílagos (Castillo y cols., 2017). A continuación se mencionan los fundamentos de las distintas pruebas químicas de identificación:

- **Determinación de Alcaloides:** las pruebas de Wagner; Mayer y Dragendorff; se basan en la formación de precipitados de color, por lo general naranja cobrizo o azul cuando los alcaloides en forma de sal reaccionan con la solución de yodo o metales pesados (Domínguez, 1979).

- **Determinacion de Flavonoides:** mediante la prueba de Shinoda y NaOH al 10 %; se forman de un complejo rojo por la reducción del ion flavillo por el hidrogeno generados al reaccionar el extracto con los componentes de la prueba (etanol, ácido clorhídrico concentrado, cinta de magnesio, alcohol amílico) cuando existe la presencia de flavonoides (Domínguez, 1979).
- **Determinación de Triterpenos:** prueba de Lieberman Burchard; se basa en una reacción colorimétrica. Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, ya que ambos tipos de productos poseen un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6 , (Bermejo y cols., 2014)
- **Determinación de Fenoles:** prueba de Tricloruro Férrico; se basa en la sustitución del hidrogeno del grupo hidroxilo por un ion cloruro provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro, formando un grupo fenóxido mas hierro generándose un cambio de color (Domínguez, 1979).
- **Determinación de Saponinas:** prueba de Altura de la Espuma; Al agitar una solución acuosa de una muestra que contiene saponinas se forma una espuma estable debido a que las saponinas tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial ya que estas están constituidas por grandes moléculas orgánicas, como esteroides o triterpenos, unidas a uno o varios azúcares, por lo que contienen una parte lipofílica, que es el esteroide o triterpeno y una parte hidrofílica que es el azúcar (Mena, 2015).
- **Determinación de Cumarinas:** mediante la prueba de NH₄OH (Hidróxido de amonio concentrado); al añadir NH₄OH concentrado se rompen los enlaces de las cumarinas y las hace soluble en medio alcalino, lo que aumenta su absorción en luz UV. Se

observa un cambio de color o fluorescencia bajo luz UV (Domínguez, 1979).

- **Determinación de Quinonas:** mediante la prueba de H_2SO_4 ; las quinonas son dicetonas insaturadas, que por reducción se convierten en polifenoles los que fácilmente las regenera por oxidación. Esta reacción da como resultado una coloración de amarilla a roja (Domínguez, 1979).
- **Determinación de Lactonas:** prueba de Baljet, permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas, aunque otros compuestos láctonicos pueden dar también positivo este ensayo (Domínguez, 1979).

www.bdigital.ula.ve

Generalidades de las bacterias

Las bacterias son microorganismos procariotas unicelulares que presentan un tamaño de algunos micrómetros de largo (entre 0,5 y 5 μm , y diversas formas incluyendo esferas, bastones y espirales. Ellas son los organismos más abundantes del planeta. Son ubicuas, encontrándose en todo hábitat de la tierra, creciendo en el suelo, en manantiales calientes y ácidos, en desechos radioactivos, en las profundidades del mar y de la corteza terrestre. Algunas bacterias pueden incluso sobrevivir en las condiciones extremas del espacio exterior. Se estima que hay en torno a 40 millones de células bacterianas en un gramo de tierra y un millón de células bacterianas en un mililitro de agua dulce. En total, se calcula que hay aproximadamente 5×10^{30} bacterias en el mundo (Marcano, 2008).

Para crecer las bacterias necesitan un mínimo de nutrientes: agua, una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno y algunas sales minerales, es por

ello que las mismas toman del medio las sustancias que necesitan para su desarrollo (nutrientes) que requieren para su catabolismo (mantenimiento) y su anabolismo (crecimiento). De igual forma, las bacterias también realizan biosíntesis de nuevos compuestos celulares, que demandan energía procedente del medio ambiente (Marcano, 2008).

Como característica principal, las procariotas no poseen compartimientos intracelulares delimitados por membranas, por lo que carecen de membrana nuclear. Además, es importante destacar que su ADN es circular y cerrado, posee una pared celular compuesta por peptidoglucano, así como, la presencia de fimbrias; logrando tener flagelos para impulsar la célula bacteriana. Por esta razón, la clasificación más sencilla de las bacterias se deben a las características de su pared celular, sus propiedades genotípicas y fenotípicas (Marcano, 2008).

Una etapa importante y básica en el estudio de las características de una bacteria es la observación directa de su morfología macroscópica y microscópica (Murray, 2018).

En microbiología, debido a que las bacterias no se pueden ver a simple vista, no se pueden estudiar de forma individual, por lo que se trabaja con poblaciones bacterianas. Estas poblaciones se obtienen después de cultivar la bacteria de interés en un medio que le proporcione todos los nutrientes que requiere: materia orgánica, iones inorgánicos, factores de crecimiento y agua. Además, se debe cuidar que la temperatura a la cual se va a cultivar sea la adecuada (Murray, 2018).

En medios sólidos las bacterias crecen formando agregados que se pueden observar macroscópicamente sobre la superficie y que reciben el nombre de colonias. Se asume que cada colonia procede de una sola bacteria que se ha multiplicado y desarrollado en un medio de cultivo sólido

hasta formar una colonia visible. Por lo tanto, una colonia está formada por millones de bacterias. La bacteria original desde la cual desciende la colonia se conoce como unidad formadora de colonia (UFC) (Murray, 2018).

Este concepto nos ayuda a estimar el número de bacterias presentes en una muestra de interés. Para esto, se cultiva en un medio sólido una fracción conocida de la muestra. Posteriormente, se cuentan las colonias que se desarrollaron. El resultado del recuento bacteriano se expresa como el número de unidades formadoras de colonia en relación al volumen (mL) o a la masa (g) de la muestra cultivada. En teoría, equivale al número de bacterias originalmente presentes en la muestra, al momento de realizar la siembra (Murray, 2018).

Las bacterias que crecen en medios líquidos tienen gran libertad de movimiento, y como carecen de una superficie sólida, no dan origen a colonias. El desarrollo de una población bacteriana se evidencia mediante la turbidez del caldo o la sedimentación del cultivo (Murray, 2018).

Observación Macroscópica: el análisis macroscópico se refiere a la observación detallada de la morfología de las colonias, en la cual se puede identificar características como forma, elevación, margen, superficie, brillo, color, hemólisis (en agar sangre). Estos atributos son propios del grupo bacteriano y son estables a través de las generaciones, por lo que este análisis permite un acercamiento a la identificación de los géneros bacterianos (Murray, 2018).

La observación macroscópica de bacterias es un examen visual de las colonias, en el cual se puede distinguir características tales como:

- Tamaño aproximado de la colonia (muy pequeña, puntiformes, pequeñas, medianas, grandes)

- Color de las colonias (blancas, amarillas, grises, doradas u otro)
- Superficie de las colonias (húmeda, seca, viscosa u otra) invasividad de las colonias sobre la placa (velo fino de desarrollo microbiano en la superficie del agar)

Otras características, como por ejemplo, presencia de hemolisina (la hemólisis se observa mirando el medio de cultivo a contraluz, sólo en medios que contienen sangre) (Murray, 2018).

Observación Microscópica: la observación microscópica de bacterias consiste en examinar a las bacterias como células independientes, con ayuda del microscopio y de tinciones que revelan determinadas características, como forma, agrupación, presencia o ausencia de cápsula, esporas, flagelos, movilidad, entre otras (Murray, 2018).

La técnica de la tinción Gram: es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología que permite diferenciar rápida y fácilmente las bacterias según sus características morfológicas. El principio del método se basa en la tinción de todas las bacterias mediante cristal violeta o violeta de genciana y posteriormente decolorar los microorganismos con alcohol-acetona, lo que sucede con las Gram negativas, mientras que las Gram positivas siguen manteniendo la coloración. Posteriormente, se utiliza un colorante de contraste para visualizar los microorganismos Gram negativas como la fucsina o safranina. De este modo podemos visualizar las bacterias Gram positivas de color azul-violáceo mientras que las Gram negativas se visualizan de color rojo o rosa. Esta técnica de tinción es casi exclusiva de las bacterias y los hongos, siendo estos irregulares en la tinción, mientras que en vegetales y animales no permanece la tinción (Mora, 2012).

Los fundamentos de la diferenciación entre ambos grupos se basan exclusivamente en las características de las paredes celulares entre ambos

grupos de bacterias. La clave es el peptidoglucano más conocido como mureina , uno de los principales constituyentes de la pared celular, formando una gruesa capa en las Gram positivas, mientras que tienen una delgada capa en las Gram negativas (Mora, 2012), así pues se puede definir a cada grupo según su tinción de la siguiente manera:

Cepas Gram positivas, o bacterias grampositivas: aquellas bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. Esta característica química está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Son uno de los principales grupos de bacterias, y cuando se tratan como taxón se utiliza también el nombre de *Posibacteria*. Estas bacterias por lo general presentan un rango de diámetro de inhibición menor en extractos acuosos que en etanol y entre ellas encontramos *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* entre otras (Mora, 2012 y Agwu, 2019).

Cepas Gram negativas o bacterias gramnegativas: son aquellas bacterias que no se tiñen de azul oscuro o violeta mediante la tinción de Gram. Cabe destacar, que dichas bacterias presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglucano; al ser la pared fina, no retienen el colorante durante la tinción de Gram. Por otra parte. Es indispensable señalar que muchas especies de bacterias Gram negativas causan enfermedades. Los cocos gramnegativos causan la gonorrea (*Neisseria gonorrhoeae*), meningitis (*Neisseria meningitidis*), entre otros, mientras que los bacilos gramnegativos causan enfermedades respiratorias (*Hemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*; entre otras) (Murray, 2018).

Microorganismos Patógenos

- **Bacterias Gram positivas:**

Staphylococcus aureus: es considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano y en los animales; es considerada la más virulenta, responsable de un amplio espectro de enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves que amenazan con la vida. El impacto de las cepas de *S. aureus* sobre la salud es la resistencia que puede presentar a múltiples antibióticos, sobre todo a la meticilina (Cervantes, García y Salazar, 2014).

Enterococcus faecalis: son microorganismos anaerobios facultativos Gram positivos, causan diversas infecciones entre ellas, endocarditis, infecciones urinarias e intraabdominales, prostatitis, celulitis e infecciones de las heridas, así como bacteriemias recurrentes (Bush y Vázquez, 2023).

- **Bacterias Gram negativas**

Klebsiella pneumoniae: es un bacilo Gram negativo de la familia Enterobacteriaceae, es la especie con mayor relevancia clínica dentro del género *Klebsiella*, desempeñando un importante papel como causa de enfermedad y/o infección oportunista. Habita el intestino del hombre como parte de la microbiota normal, pudiendo también colonizar la nasofaringe, es una bacteria Gram negativa, encapsulada, no móvil, fermenta la lactosa, anaerobio facultativo. Es encontrada en la flora normal de la boca, la piel y los intestinos (Costa, 2016).

Escherichia coli: es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, género *Escherichia*, Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser

patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez, 2002).

Pseudomonas aeruginosa: es un patógeno ubicuo, oportunista y bastante persistente en el medio ambiente. Esta bacteria tiene forma de bastón aproximadamente de 0,5-1 μm de diámetro y de 1,5-5 μm de largo. Cuentan con un flagelo polar que le confiere la motilidad necesaria. Se considera a esta especie como bacteria aerobia facultativa debido a la capacidad que tiene para crecer en medios anaerobios tomando el nitrógeno o arginina como terminal de aceptación de protones. Este patógeno ubicuo en el medio ambiente puede llegar a persistir de manera eficaz en el agua y en el suelo viviendo con un requerimiento nutricional mínimo y tolerando diversos medios físicos. Puede crecer entre 20- 43 °C, y al crecer en altas temperaturas se diferencia del resto de las otras especies de *Pseudomonas*. Se caracteriza por ser parte del grupo de no fermentadores que tienen en común la incapacidad de fermentar lactosa, con la capacidad de utilizar fuentes de carbono y nitrógeno como acetato y amoniaco, obteniendo energía de la oxidación de azúcares (Zarza y cols., 2019).

Actividad Antibacteriana

Se define como la capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de una población bacteriana, en menor o mayor grado o para eliminar dicha población de bacterias, siendo algunos aislados bacterianos más sensibles a un compuesto que otros. El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a agentes antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios. Se desarrolla mediante las pruebas de susceptibilidad a los antibióticos, cuyo objetivo es evaluar en el laboratorio el comportamiento de un microorganismo ante uno o varios antimicrobianos.

Los resultados obtenidos de estos ensayos proporcionan una valiosa información acerca de la posibilidad de tratar con éxito mediante un agente antimicrobiano específico a un paciente infectado con el microorganismo aislado (Araque, 2008).

Como no se puede predecir la susceptibilidad de las bacterias a los antimicrobianos, en la actualidad se dispone de varios métodos para determinar el patrón de susceptibilidad de una bacteria a los antibióticos (Araque, 2008). Entre los métodos más utilizados podemos mencionar:

- **Método de difusión del disco en agar (Kirby-Bauer):** método utilizado con mayor frecuencia para evaluar la sensibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos, es la denominada prueba de difusión del disco. Es un método sencillo y fácil de realizar en los laboratorios de rutina que sólo brinda información cualitativa o semicuantitativa sobre la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico determinado. Sin embargo, los resultados obtenidos son de gran valor clínico para iniciar, mantener o modificar una antibioticoterapia. Esta técnica fue estandarizada por Kirby-Bauer. Este método consiste en depositar en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto como el disco impregnado con antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde el agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurrido el tiempo 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Araque, 2008).

- **Método de dilución en caldo o en agar:** se basa en la presencia o ausencia de crecimiento de un microorganismo en un caldo frente a una concentración de antimicrobiano. Para ello se comprueba visualmente si los tubos o pocillos presentan turbidez. Este método se divide en macrodilución (si se usan tubos de ensayo) o microdilución (si se usan placas multipocillo). Se recomienda para la mayoría de los microorganismos utilizar caldo Mueller-Hinton, al que se añadirán los suplementos necesarios. El medio debe tener un pH de 7.2 a 7.4 y estar ajustado con Ca^{2+} (20-25 mg/L) y Mg^{2+} (10-12.5 mg/L) (Pérez y Rivas, 2020).
- **Método de la cinta o Epsilómetro Etestr (AB BioDISK):** es una técnica cuantitativa para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de antibióticos y antifúngicos mediante un gradiente de concentración del antimicrobiano sobre una tira. Es una alternativa sencilla y rápida a las determinaciones convencionales de CIM (Araque, 2008).

Antibióticos

La definición de antibiótico refiere a una sustancia química producida por diversas especies de microorganismos que, en pequeñas concentraciones, es capaz de inhibir el desarrollo de otros microorganismos. No obstante, el advenimiento de los métodos sintéticos ha introducido una modificación en esta definición. Hoy, el antibiótico se define como una sustancia de origen natural o sintético que es capaz de inhibir o matar a microorganismos (Pérez y Rivas, 2020).

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una

acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo. El objetivo de la antibioticoterapia es controlar y disminuir el número de microorganismos viables, de modo que el sistema inmunológico sea capaz de eliminar la totalidad de los mismos. De acuerdo a la interacción germen-antibiótico, estos fármacos pueden dividirse en: a) bactericidas: su acción es letal, llevando a la lisis bacteriana; b) bacteriostáticos: a las concentraciones que alcanzan en el suero o tejidos impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana pero sin llegar a destruir las células. De hecho, cuando se retira el antibiótico, el microorganismo se puede multiplicar de nuevo (Seija y Vignoli, 2019), los antibióticos se pueden clasificar de la siguiente manera (Figura 8).

- **Clasificación según el espectro de acción:**
 1. **Amplio:** aquellos antibióticos que son activos sobre un amplio número de especies y géneros diferentes.
 2. **Reducido:** antibióticos solo activos sobre un grupo reducido de especies (Seija y Vignoli, 2019).
- **Clasificación según el mecanismo de acción:** es el mecanismo por el cual un antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento o destruir una célula bacteriana (Figura 8) (Seija y Vignoli, 2019). Se dividen en:
 1. **Inhibidores de la formación de la pared bacteriana:** a nivel de la síntesis del peptidoglicano actúan las proteínas fijadoras de penicilinas uniendo una cadena de peptidoglicanos con otra para formar la pared rígida. Algunos antibióticos se unen a las proteínas fijadoras de peptidoglicanos impidiendo que esta realice su trabajo por lo que la pared se debilita y se destruye (Longa y cols., 2008).

2. **Inhibidores de la síntesis proteica:** los antibióticos actúan directamente a nivel de las dos subunidades de los ribosomas, en la subunidad 30 los aminoglucósidos, tetraciclinas y glicinas impiden que en ARNt forme complejos de iniciación. En la subunidad 50 los fenicos bloquean la formación de enlaces peptídicos del péptido saliente, originando proteínas anómalas, mientras que macrólidos, lincosaminas y estreptograminas bloquean el ARNt, y las oxazolidonas interfieren en la formación del complejo de inicio de traducción (Longa y cols., 2008).
3. **Inhibidores de la duplicación del ADN:** actúan bloqueando la transcripción del ARN o bloqueando la replicación de ADN (Longa y cols., 2008).
4. **Inhibidores de la membrana citoplasmática:** solo se da en bacterias Gram negativas por poseer membrana externa. El antibiótico altera su permeabilidad lo cual produce perdida de componentes esenciales (Longa y cols., 2008).
5. **Inhibidores de vías metabólicas:** Actúan a nivel de ciertas enzimas indispensables para la síntesis de cofactores y para el metabolismo (Longa y cols., 2008).

- **Clasificación según farmacocinética y farmacodinamia:**

Por muchos años la susceptibilidad bacteriana se ha medido a través de pruebas, como la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM). Este número luego era comparado con las concentraciones séricas o plasmáticas del antibiótico, alcanzadas con las dosis habituales del mismo. Esto no tiene en cuenta la farmacocinética o la farmacodinamia de cada antibiótico en particular. Cada clase de antibiótico es metabolizada en forma diferente por nuestro organismo. No es lo mismo un betalactámico, con

escasa penetración celular, que un macrólido que se concentra a nivel intracelular. Esto es lo que llamamos farmacocinética: absorción, distribución, eliminación. Por otro lado, está la farmacodinamia que intenta comprender las relaciones entre las drogas y sus efectos, tanto deseables como indeseables. Los antibióticos pueden clasificarse de acuerdo a la forma en que producen la muerte o inhibición bacteriana en antibióticos tiempo-dependientes y concentraciones dependientes. En el caso de los tiempo dependientes (betalactámicos y macrólidos) el éxito de la terapéutica viene dado por mantener concentraciones por encima de la CIM por el mayor tiempo posible interdosis (T por encima de CIM). En el caso de los concentración dependientes el éxito terapéutico viene dado por lograr un buen pico sérico de concentración (Pico/CIM) o un buen área bajo la curva (AUC/CIM), dependiendo de cada droga (Seija y Vignoli, 2019).

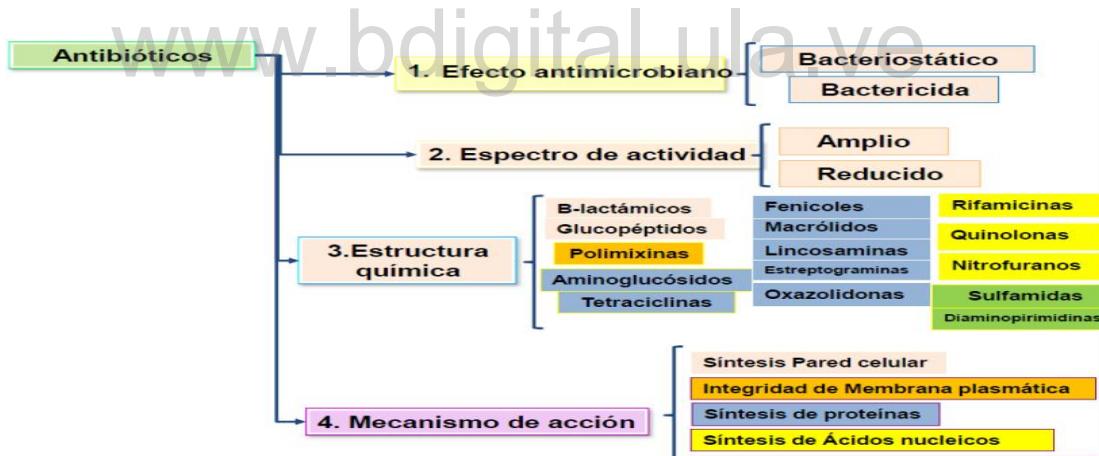


Figura 8. Clasificación de los antibióticos. Manual Práctico de Bacteriología Clínica.

Tomado y modificado de Longa y cols., 2008.

Definición Operacional de Términos

Solvente

Un disolvente o solvente es una sustancia química que disuelve al soluto, resultando en una disolución; normalmente el solvente es el componente de una disolución presente en mayor cantidad (Ruiz, 2020).

Metabolismo Primario

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. La mayor parte del carbono, del nitrógeno y de la energía termina en moléculas comunes en todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones, este conjunto de compuestos constituyen así el metabolismo primario (Avalos y Pérez, 2009).

Plantas Medicinales

Son plantas medicinales todas aquellas que contienen en alguno de sus órganos, principios activos, los cuales administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades de los hombres y de los animales en general. El 10 % de las plantas que se conocen actualmente se pueden considerar medicinales, es decir, se encuentran recogidas dentro de los tratados médicos de fitoterapia (Pérez, 2010).

Microorganismos

Son organismos que por su pequeño tamaño son imperceptibles a la vista, colonizan todo ambiente desde el suelo, el agua y aire, participan de forma vital en todos los ecosistemas. Se agrupan en dos categorías: procariotas y eucariotas. En la primera se encuentran las archaeas y las bacterias, mientras que en la segunda se encuentran los hongos, las algas y los protozoos. Cabe mencionar que, los microorganismos son claves para el funcionamiento de los sistemas biológicos y el mantenimiento de la vida sobre el planeta, ya que participan en procesos metabólicos, ecológico y biotecnológicos (Montaño y cols., 2010).

Antimicrobianos

www.bdigital.ula.ve

Los antimicrobianos son agentes o sustancias de cualquier procedencia (microorganismos, plantas, sintéticos o semisintéticos), que actúan contra el crecimiento y actividad de cualquier microorganismo, tales como bacteria, micobacterias, hongos, parásitos y virus (Organización Mundial de la Salud, 2018).

Cepas

Son un grupo de microorganismos que pertenecen a la misma especie y comparten las mismas características. Suelen identificarse por letras, números o nombres que siguen al epitelio específico. Las cepas con diferentes antígenos se denominan serotipos, serovariedades, o biovariedades (Tortora y cols, 2007).

Definición Operacional de las Variables

Espinoza y Eudaldo (2019), explican que, la operacionalización de las variables comprende la desintegración de los elementos que conforman la estructura de la hipótesis y de manera especial a las variables y precisa que la operacionalización se logra cuando se descomponen las variables en dimensiones y estas a su vez son traducidas en indicadores que permitan la observación directa y la medición. Afirma que la operacionalización de las variables es fundamental porque a través de ellas se precisan los aspectos y elementos que se quieren cuantificar, conocer y registrar con el fin de llegar a conclusiones (Tabla 2-3).

Así tenemos que la Operacionalización en la siguiente Investigación se plantea de la siguiente manera:

Tabla 2. Cuadro de Operacionalización de las Variables Dependientes:
Actividad antimicrobiana de los extractos de *Lantana trifolia*.

| 1. Variable | 2. Tipo de variable | 3. Definición Conceptual ¿Qué es? |
|--|---|--|
| Actividad Antibacteriana de los extractos de <i>Lantana trifolia</i> . | Dependiente | Capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de una población bacteriana (en menor o mayor grado), o para eliminarla, y que se puede expresar cualitativa o cuantitativamente (Araque, 2008). |
| 4. Definición operacional ¿Cómo se mide? | 5. Dimensiones | 6. Indicador |
| Método de Kirby-Bauer. | Resistencia de Cepas bacterianas. Bacterias Gram positivas: ° <i>Staphylococcus aureus</i> ° <i>Enterococcus faecalis</i> . Bacterias Gram negativas: ° <i>Klebsiella pneumoniae</i> . ° <i>Escherichia coli</i> ° <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Sensibilidad de las Cepas Bacterianas. (Presencia o Ausencia de halos de inhibición (en mm) frente a cepas Gram positivas y Gram negativas) |

Elaborado por: Hernández, Sanabria y Torrealba, 2024

Tabla 3. Cuadro de Operacionalización de las Variables Independientes: Composición química de los extractos de *Lantana trifolia*.

| 1. Variable | 2. Tipo de variable | 3. Definición Conceptual ¿Qué es? |
|---|--|--|
| Composición química de los extractos de <i>Lantana trifolia</i> . | Independiente | Compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones de adaptación al ambiente y protección frente a patógenos y depredadores (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2003). |
| 4. Definición operacional ¿Cómo se mide? | 5. Dimensiones | 6. Indicador |
| Tamizaje Fitoquímico | Para las pruebas químicas cualitativas puede haber presencia y ausencia de: - Alcaloides. - Esteroles y/o triterpenos. - Saponinas. - Compuestos fenólicos - Taninos. - Flavonoides. - Quinonas y Antraquinonas. - Glicósidos - Cumarinas. - Lactonas. | Alcaloides: la aparición de turbidez o precipitados. Esteroles y/o triterpenos: coloración azul o verde para esteroides; coloración es rosa, rojo, magenta o violeta para triterpenos. Saponinas: formación de abundante espuma. Compuestos fenólicos: coloración de azul a negro. Taninos: un precipitado blanco indica presencia Flavonoides: coloración naranja a rojo, para flavonas; si es rojo flavonoles y magenta flavononas. Quinonas y Antraquinonas: una coloración roja. Glicósidos: coloración púrpura o violácea. Cumarinas: la presencia de fluorescencia azul-violeta. Lactonas: coloraciones roja, violeta o rosa. |

Elaborado por: Hernández, Sanabria y Torrealba, 2024.

Hipótesis

El género *Lantana* posee diversas propiedades medicinales y estudios anteriores han reportado la presencia de compuestos químicos biológicamente activos en diferentes especies de este género; por lo cual es de esperar que los metabolitos secundarios encontrados en los tallos y hojas de la especie *Lantana trifolia*, presenten actividad antibacteriana frente a las diferentes cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Según Hernández y cols; 2010 refirieron que el conocimiento generado por un proceso investigativo define el alcance y el tipo de investigación. Adicionalmente, Hurtado (2000), refirió que existen diferentes tipos de investigación: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. Específicamente, la investigación confirmatoria tiene como fin explicar la relación entre las variables y lograr plantear hipótesis con sentido lógico. Al respecto, esta investigación fue de tipo confirmatoria, ya que confirmó la relación entre la actividad antibacteriana y los compuestos fitoquímicos de los extractos obtenidos de tallos y hojas de *Lantana trifolia*, sobre cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas de referencia internacional.

Diseño de Investigación

Para la recolección de los datos se necesitó un diseño de investigación representado por las estrategias pertinentes. Al respecto, se refirió que tales estrategias están representadas por el dónde, cuándo y la amplitud de la información que se quiere recolectar. En tal sentido, el diseño de esta investigación fue experimental, de campo y de laboratorio; ya que las muestras se recolectaron en un ambiente natural. Respecto al tiempo de recolección de los datos, este estudio fue contemporáneo ya que, la recolección sucedió durante el desarrollo de la investigación y transversal; porque la muestra se tomó en un solo momento (Hurtado, 2000).

Población y Muestra

Unidad de Investigación

La unidad de estudio se refiere al contexto, al ser o entidad poseedores de las características, evento, calidad o variable, que desea estudiar, una unidad de estudio puede ser una persona, un objeto, un grupo, una extensión geográfica, una institución, entre otras (Hurtado, 2000). La unidad de estudio de esta investigación está representada por la especie *Lantana trifolia*, situada en el sector Los Rosales, calle la Rosa, Ejido Estado Mérida. La muestra de colección Voucher S.B N° 01 fue identificada por el “Dr. Pablo Meléndez” en el herbario MERF “Dr. Luis Ruíz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

www.bdigital.ula.ve ***Selección del Tamaño de la Muestra***

La muestra es un subconjunto o parte del universo o población en que se llevó a cabo la investigación. Hay procedimientos para obtener la cantidad de los componentes de la muestra como fórmulas, lógica y otros. La muestra es una parte representativa de la población (López, 2004). Por esta razón, y en este orden de ideas; la investigación se fundamentó en el estudio de los tallos y hojas de la especie *Lantana trifolia*.

Sistema de Variables

La variable es una característica, calidad o propiedad observada que puede adquirir diferentes valores y es susceptible de ser cuantificada o medida en una investigación, la misma se clasifica en variable dependiente e independiente; siendo la variable dependiente el posible efecto o el resultado de la presencia o manifestación de la variable independiente. Es el centro de máxima atención del estudio. Y la variable independiente es causa de la presencia o manifestación de la variable dependiente (Oyola, 2021). De tal manera, las variables que correspondieron con el objeto de investigación son las siguientes: Variable dependiente: Actividad antibacteriana de los extractos de la especie *Lantana trifolia*. Variable independiente: Composición química de los extractos de *Lantana trifolia*.

www.bdigital.ula.ve
Instrumento de Recolección de Datos

Los instrumentos de recolección de datos, son aquellos medios que se utilizan para recopilar la información que proviene de la aplicación de una técnica determinada con el propósito de registrar las relaciones sociales y describir la realidad como lo experimentan sus correspondientes protagonistas (Sánchez y cols., 2021). En tal sentido, la intención de este proyecto de investigación fue confirmar, observar y describir la presencia o ausencia de los metabolitos presentes en los extracto de la planta *Lantana trifolia* a través de reacciones químicas cualitativas, en esa misma línea confirmar la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de tallos y hojas de *Lantana trifolia* en cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas de referencia internacional.

Procedimiento de la Investigación

1. Recolección del material vegetal: se recolectaron 340,89 gramos entre tallos (214,41g) y hojas (126,49 g) de la planta *Lantana trifolia* en el sector Los Rosales, calle la Rosa, Ejido Estado Mérida, los cuales se colocaron en la estufa a 40°C hasta completar sequedad (8 días). La especie fue identificada por el Prof. Pablo Meléndez y el ejemplar comprobante fue depositado en el Herbario de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

2. Obtención de los extractos de la especie vegetal: la obtención de los extractos y posteriormente el desarrollo del tamizaje fitoquímico fue realizado en el instituto de investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usúbillaga del Hierro” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la asesoría de la Profesora Johanna Hernández y la Prof. Ysbelia Obregón. Los tallos y hojas seleccionados fueron sometidos a un proceso de molienda por separado, las hojas fueron molidas utilizando un mortero obteniendo 80,09 g (Figura 9), para los tallos se utilizó un molino con el tamizador -2 mm obteniendo 117,0 g de tallos (Figura 9); para la elaboración del extracto etanólico se colocó 80,09 g de hojas secas con 500 mL de etanol, en cuanto al material vegetal de los tallos se colocaron 117,0 g de dichos tallos con 700 mL de etanol, para la obtención del extracto metanólico, luego de realizar el extracto etanólico en el mismo recipiente que contenía el material vegetal se agregó 400 mL de metanol para las hojas y para los tallos 600 mL. La técnica seleccionada fue reflujo en caliente (Figura 9) la cual implica la condensación de vapores y la vuelta de este condensado al sistema que los originó, a medida que se procede a la calefacción del matraz, la temperatura aumenta evaporando parte del disolvente, los vapores del mismo ascienden por el cuello del envase hasta el refrigerante, donde se condensa volviendo de nuevo al sistema. Después se procede a filtrar con

papel filtro cada uno de los extractos, para luego llevar a cabo la concentración en el rotavapor a presión reducida y temperatura controlada no mayor a 45 °C (Figura 9). Finalmente, los extractos se colocaran en frascos color ámbar y se llevaron a secar en la estufa a 40°C.

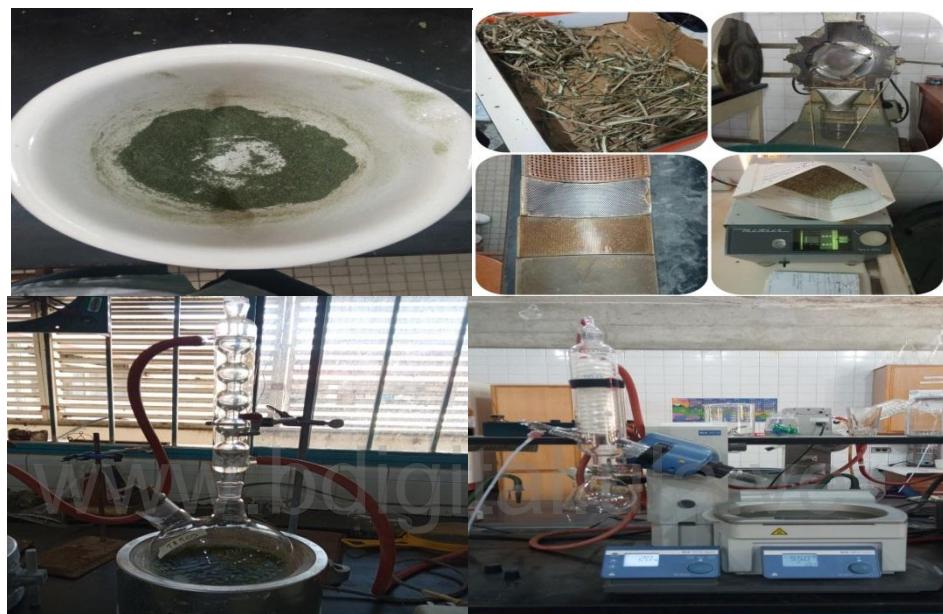


Figura 9: Obtención de los extractos de la especie vegetal.
Elaborado por Hernández, Sanabria y Torrealba, 2024.

3. Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Lantana trifolia*:

Una vez obtenidos los extractos de *Lantana trifolia* se realizó el respectivo ensayo fitoquímico cualitativo para determinar los metabolitos secundarios presentes en la planta; en el cual utilizamos diferentes pruebas, tales como:

- **Alcaloides:**

Wagner, Mayer y Dragendorff: Los extractos se disolvieron individualmente en ácido clorhídrico (10 %) diluido (HCl), se calentaron en baño de maría, y se filtraron. Luego se trataron de la siguiente

manera: cada filtrado se dividió en tres tubos de ensayo al primer tubo se le adicionó de cinco a diez gotas del reactivo de Wagner, al segundo tubo de cinco a diez gotas del reactivo de Mayer y al último tubo de cinco a diez gotas del reactivo de Dragendorff. La formación de precipitado color crema en Wagner y un precipitado anaranjado y café rojizo en la prueba de Dragendorff y Mayer, respectivamente, indican la presencia de alcaloides en el extracto vegetal (Domínguez, 1979).

- **Saponinas:**

Prueba de la altura de la espuma: una porción del extracto se agregó 4 tubos de ensayo y se disolvió agregando 2 mL de agua caliente, se dejó reposar durante 1 minuto y se agitó fuertemente de 2-5 minutos continuos. La formación de espuma con apariencia de panal de abejas que perdura en el tiempo se considera positivo (Domínguez, 1979).

- **Flavonoides:**

Prueba de Shinoda: en 4 tubos de ensayo se agregaron 1 g de cada extracto respectivamente que fue disuelto con metanol, estos se mezclaron con trozos de cinta de magnesio, de 3 a 5 gotas de HCl concentrado, el cual fue vertido por las paredes del tubo. La formación de una coloración amarilla, naranja, rojo, pardo indica positividad en todos los casos (Domínguez, 1979).

NaOH al 10 %: se adicionó una pequeña parte del extracto en 4 tubos diferentes, luego se agregó 0,5 ml de hidróxido de sodio, si se forma una coloración de amarillo, café, rojo o naranja indica la presencia de flavonoides. (Domínguez, 1979).

- **Lactonas:**

Ensayo de Baljet: se diluyeron 5 g de los extractos en agua destilada y se le adicionó de 3 o 4 gotas del reactivo de Balje, un cambio de coloración de naranja a rojo demuestra la presencia de lactonas sesquiterpénicas (Gallegos y cols., 2019).

- **Fenoles:**

Prueba de tricloruro férrico: A los 4 extractos se le adicionaron 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 10% en solución salina fisiológica, el desarrollo de una coloración verde o negra indica la presencia de compuestos fenólicos en general (Bermejo y cols., 2014).

- **Esteroles y Triterpenos**

Prueba de Lieberman-Burchard: en tubos de ensayo se disolvió los extractos de la planta con 2 mL de cloroformo, se agregaron 2 mL de anhídrido acético. La mezcla se dejó enfriar y se le añadió H_2SO_4 concentrado por las paredes del tubo sin agitar. El color verde o azul indica la presencia de esteroles. Color rosa o morado indica la presencia de triterpenos (Domínguez, 1979).

- **Quinonas y antraquinonas:**

Prueba de Ácido Sulfúrico: Se disolvieron 500 mg de cada uno de los extractos en agua destilada y metanol y se le adicionó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. La formación de color rojo indica la presencia de quinonas (Domínguez, 1979).

Prueba de Hidróxido de Amonio: En un tubo de ensayo se colocaron pequeñas porciones de los extractos con 10 gotas del hidróxido de amonio (NH_4OH). La presencia de un color rojo es indicativa de antraquinonas (Domínguez, 1979).

- **Glicósidos:**

Glicósidos: Se disolvieron 200 mg de los extractos en 1 mL de agua destilada, se agregaron 2 mL de ácido acético glacial y posteriormente se adicionaron algunas gotas de cloruro férrico al 5%. Las soluciones se vertieron en tubos de ensayo con 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. La formación de un anillo marrón en la interfaz indica la presencia de glucósidos cardiotónicos (Domínguez, 1979).

- **Cumarinas:**

Prueba de Fluorescencia (NH_4OH concentrado): Se colocaron alrededor de 1 g de cada extracto en un tubo de ensayo y se diluyó con metanol, para agregarle 10 gotas de hidróxido de amonio (NH_4OH) concentrado. La fluorescencia azul-violeta intensa bajo la luz ultravioleta indica la presencia de cumarinas (Domínguez, 1979).

- **Taninos:**

Prueba de Gelatina: Se añadieron a los extractos una solución de gelatina al 1 % que contiene cloruro de sodio (NaCl), solo a los tubos que den positivo para compuestos fenólicos. La presencia de taninos se confirma por la formación de un precipitado blanco o la ruptura de la gelatina (Bermejo y cols., 2014).

4. Determinación de la Actividad Antibacteriana de los extractos en tallos y hojas de *Lantana trifolia* por el Método de Difusión en Disco

La determinación de la actividad antibacteriana, se realizó por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), originalmente descrito por Bauer y cols., (1966), bajo la asesoría de las Profesoras Yndra Cordero e Ysbelia Obregón, y el auxiliar de Laboratorio TSU. José Emilio Salazar, en el Laboratorio de Actinomicetos, adscrito al IIFFB.

Bacterias Estudiadas: para este estudio se seleccionaron cinco especies de bacterias: dos especies Gram positivas y tres Gram negativas, de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC por sus siglas en inglés), las cuales fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes (ULA), a cargo de la Licenciada Yacneli Infante (Tabla 4).

Tabla 4. Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).

| Bacterias Gram positivas (ATCC) | |
|--|------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ATCC 25923 |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | ATCC 29212 |
| Bacterias Gram negativas (ATCC) | |
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC 25922 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | ATCC 23357 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC 27853 |

Elaborado por Cordero y Obregón, 2024.

Preparación de las muestras: se pesó 10 mg del extracto y se disolvió en 1 mL de dimetilsulfoxido (DMSO) para obtener una solución de una concentración de 10000 ppm (10 mg/mL).

Preparación de los discos: se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro, los cuales se esterilizaron bajo luz ultravioleta (LUV), por 24 horas. Posteriormente se impregnaron con 10 µL de la muestra en estudio (extracto), DMSO (como control negativo) y se utilizaron discos de antibióticos comerciales como control positivo con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar. En este caso se utilizó Ampicilina® 10 µg, Eritromicina® 15 µg y Piperacilina® 100 µg.

Preparación de los Inóculos Bacterianos: el inóculo bacteriano se preparó con la ayuda de un asa estéril, tomándose de esta manera, una pequeña cantidad de colonias, a partir de un cultivo fresco y purificado de cada cepa bacteriana repicada en agar Müller-Hinton, para luego ser suspendidas en tubos, previamente estériles, que contienen 5 mL de una solución salina fisiológica estéril de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0,85 %, hasta que alcance una turbidez equivalente al patrón de Mac Farlán N° 0,5 (10^{6-8} UFC/mL).

Inoculación de las Placas y Determinación de la Actividad Antibacteriana: se realizó la inoculación de las placas de agar Müller-Hinton, tomando un inóculo de cada bacteria con un hisopo estéril impregnado por la placa, rotando la misma sin dejar ningún espacio libre, hasta lograr una siembra uniforme, se dejó secar. Posteriormente se colocaron en forma equidistante los discos de papel, los cuales fueron impregnados con 10 µL de la solución en estudio, adicionalmente se colocaron los discos de los respectivos controles tanto positivo (Ampicilina®, Eritromicina® y Piperacilina®) como negativo (dimetilsulfóxido). Estas se dejaron en la nevera a 4 °C aproximadamente durante 30 minutos (pre-

incubación), con la finalidad de que los discos impregnados con las diferentes muestras difundan a través del agar, para luego llevarlas a la estufa durante 24 horas a 37 °C en posición invertida, en atmósfera aeróbica.

Lectura de las Placas: luego de ser incubadas cada una de las placas, por un lapso de tiempo de 24 horas, se realizó la lectura de las mismas con una regla milimétrica. Donde se consideró un resultado positivo o sensible (presencia de actividad antibacteriana) cuando se observó un halo de inhibición alrededor del disco, y se tomó como resultado negativo o resistente (sin actividad antibacteriana) la ausencia de dicho halo. El diámetro de la zona de inhibición producto de la actividad antibacteriana de las muestras en estudio se expresó en milímetros (mm) (Bauer, 1966).

www.bdigital.ula.ve

Diseño de Análisis.

Los enfoques que se utilizaron para el análisis de los datos son cuantitativos y cualitativos. El enfoque cuantitativo parte de datos evidenciables. Hernández, Fernández y Baptista, (2010) la definen expresando: “usa la recolección de datos para probar hipótesis con base a medición numérica y el análisis estadístico, para establecer patrones de comportamiento y probar teorías, debe tener una concepción lineal, que implica claridad entre los elementos que conforman el problema, que deben ser limitados y saber con exactitud donde inician, también se debe reconocer qué tipo de incidencia existe entre sus elementos”. En nuestro trabajo de investigación este tipo de datos estuvo dado por la actividad antibacteriana, en cuanto, a la medición, y a la ausencia y presencia de los halos de inhibición. Sin embargo, en el análisis de los datos de la investigación no se utilizaron métodos estadísticos, estos datos obtenidos en las pruebas preliminares fueron recopilados de manera cualitativa. Por otro lado, el enfoque cualitativo utiliza recolección de datos sin medición numérica para descubrir o afirmar preguntas de investigación y puede o no probar hipótesis en su proceso de interpretación; este enfoque estuvo dado por el ensayo fitoquímico y sus diferentes pruebas.

CAPITULO IV

Resultados y Discusiones

Resultados

Los tallos y hojas de *Lantana trifolia* fueron sometidos a un proceso de extracción en reflujo utilizando dos tipos de solventes orgánicos: etanol y metanol, obteniéndose cuatro extractos (Tabla 5). Los extractos de los tallos presentaron un color verde claro, olor característico; mientras que los extractos de las hojas presentaron un color verde oscuro.

Tabla 5. Peso de la planta, extractos, y porcentaje de rendimiento

| Partes de la planta | Peso g | Peso de extracto g | Rendimiento de los Extractos (%) |
|---------------------|--------|---|----------------------------------|
| Tallos molidos | 117,0 | Extracto Etanol: 1,6 Extracto Metanol: 1,8 | 1,37 1,54 |
| Hojas molidas | 80,09 | Extracto Etanol: 1,5 Extracto Metanol: 1,6 | 1,87 1,99 |

Elaborado por: Hernández, Sanabria y Torrealba, 2024.

Ensayo fitoquímico preliminar

Los extractos de tallos y hojas de *Lantana trifolia* fueron sometidos a pruebas químicas preestablecidas para revelar el grupo de metabolitos secundarios presentes en las muestras; la revelación de cada componente fue de forma cualitativa mediante fenómenos químicos de reacción como: viraje de color, precipitados, turbidez del medio, formación de anillo, producción de espuma, y fluorescencia por exposición a la luz ultravioleta (UV). Dichos fenómenos fueron primordiales para revelar la presencia de los metabolitos presentes en la especie estudiada (Tabla 6,7).

Tabla 6. Reporte de resultados del ensayo fitoquímico de los extractos de tallos y hojas de *Lantana trifolia*.

| Pruebas químicas | EET | EMT | EEH | EMH |
|-----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| Alcaloides | | | | |
| Wagner | - | - | - | - |
| Mayer | - | - | - | - |
| Dragendorff | - | - | - | - |
| Antraquinonas | | | | |
| NH ₄ OH _[+] | - | - | - | - |
| Cumarinas | | | | |
| NH ₄ OH _[+] | - | - | - | - |
| Glicósidos | - | + | + | + |

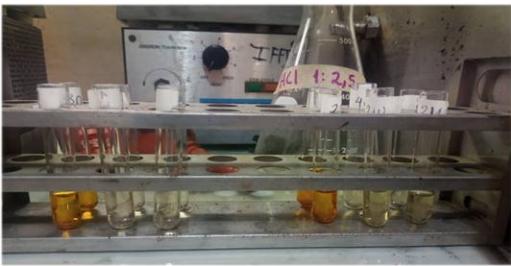
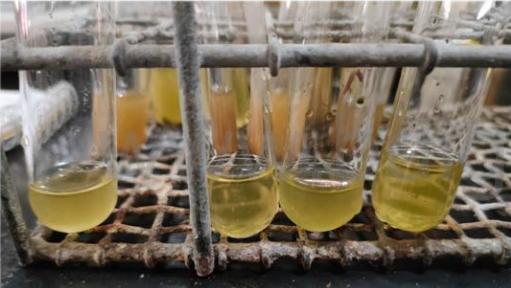
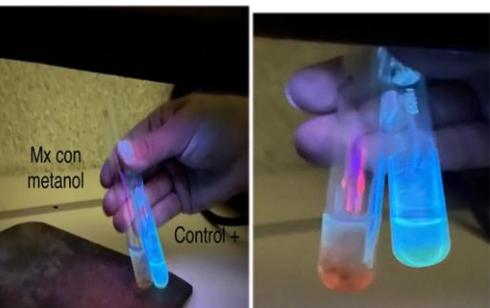
Leyenda: (+): Positivo, (-): Ausente. EET: Extracto Etanol Tallos, EEH: Extracto Etanol Hojas, EMT: Extracto Metanol Tallo, EMH: Extracto Metanol Hojas. Elaborado por Hernández, Sanabria y Torrealba, 2024.

Tabla 6. Reporte de resultados del ensayo fitoquímico de los extractos de tallos y hojas de *Lantana trifolia* (continuación).

| Pruebas químicas | EET | EMT | EEH | EMH |
|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Flavonoides | | | | |
| Shinoda | - | - | - | - |
| NaOH al 10% | - | - | + | + |
| Lactonas | | | | |
| Baljet | - | - | - | - |
| Quinonas | | | | |
| NH ₄ OH [] cápsula | - | - | - | - |
| Taninos | | | | |
| Gelatina | - | - | - | - |
| Esteroles y triterpenos | + | + | + | + |
| Liberman-Buchard | (azul) | (azul) | (azul) | (azul) |
| Fenoles | | | | |
| FeCl ₃ | - | - | + | + |
| Saponinas | | | | |
| Prueba de la Altura | - | - | - | - |

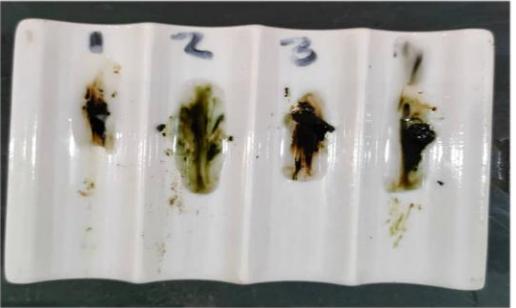
Leyenda: (+): Positivo, (-): Ausente. EET: Extracto Etanol Tallos, EEH: Extracto Etanol Hojas, EMT: Extracto Metanol Tallo, EMH: Extracto Metanol Hojas. Elaborado por Hernández, Sanabria y Torrealba, 2024.

Tabla 7. Reporte ilustrado de los resultados positivos del ensayo fitoquímico de los extractos de tallos y hojas de *Lantana trifolia*.

| Prueba | Reporte |
|--|---|
| Wagner,Mayer y Dragendorff  | Metabolito: Alcaloides Reporte: Negativo Tubo 1 y 2: Tallos y Hojas con Etanol Tubo 3 y 4: Tallos y Hojas con Metanol |
| NH₄OH concentrado  | Metabolito: Antraquinonas. Reporte: Negativo. Tubo 1 y 2: Tallos y Hojas con Etanol Tubo 3 y 4: Tallos y Hojas con Metanol |
| NH₄OH concentrado  | Metabolito: Cumarinas. Reporte: Negativo |

Elaborado por: Hernández, Sanabria y Torrealba, 2024.

Tabla 7. Reporte ilustrado de los resultados positivos del ensayo fitoquímico de los extractos de tallos y hojas de *Lantana trifolia* (continuación).

| Prueba | Reporte |
|---|---|
| H₂SO₄ [] cápsula  | Metabolito: Quinonas Reporte: Negativo 1 y 2: Tallos y Hojas con Etanol 3 y 4: Tallos y Hojas con Metanol |
| Prueba de la Gelatina  | Metabolito: Taninos. Reporte: Negativo. |
| Altura de la Espuma  | Metabolito: Saponinas. Reporte: Negativo. Tubo 1 y 2: Tallos y Hojas con Etanol Tubo 3 y 4: Tallos y Hojas con Metanol |

Elaborado por: Hernández, Sanabria y Torrealba, 2024.

Tabla 7. Reporte ilustrado de los resultados positivos del ensayo fitoquímico de los extractos de tallos y hojas de *Lantana trifolia* (continuación).

| Prueba | Reporte |
|---|--|
| Glicosidos  | Metabolito determinado: Glicósidos Reporte: Positivo, formación de un anillo marrón. Tubo 2: Hojas con Etanol Tubo 3 y 4: Tallos y Hojas con Metanol. |
| NaOH al 10 %  | Metabolito determinado: Flavonoides Reporte: Positivo, formación de coloración de café a naranja. Tubo 1: Hojas con Etanol Tubo 3: Hojas con Metanol |
| Baljet  | Metabolito: Lactonas sesquiterpénicas Reporte: negativo. Tubo 1 y 2: Tallos y Hojas con Etanol Tubo 3 y 4: Tallos y Hojas con Metanol |

Elaborado por: Hernández, Sanabria y Torrealba, 2024.

Tabla 7. Reporte ilustrado de los resultados positivos del ensayo fitoquímico de los extractos de tallos y hojas de *Lantana trifolia* (continuación).

| Prueba | Reporte |
|---|---|
| <p>Lieberman Burchard.</p>  | <p>Metabolito determinado: Esteroles.</p> <p>Reporte: Positivo, formación de interface azul.</p> <p>Tubo 1 y 2: Tallos y Hojas con Etanol</p> <p>Tubo 3 y 4: Tallos y Hojas con Metanol</p> |
| <p>Tricloruro Férrico (FeCl₃)</p>  | <p>Metabolito determinado: Fenoles</p> <p>Reporte: Positivo, formación de coloraciones verdes.</p> <p>Tubo 2: Hojas con Etanol</p> <p>Tubo 4: Hojas con Metanol</p> |

Elaborado por: Hernández, Sanabria y Torrealba, 2024.

Evaluación de la Actividad Antibacteriana

La actividad antibacteriana de *Lantana trifolia* se determinó mediante el método de difusión en disco en agar (Kirby-Bauer), en cuatro extractos de tallos y hojas obtenidos con etanol y metanol, frente a cepas bacterianas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), y tres especies Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Los resultados se muestran en la (Tabla 8) (Figura 10).

Tabla 8. Resultados obtenidos en la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de tallos y hojas de *Lantana trifolia*

| Muestras ensayadas [] | Halos de Inhibición en milímetros (mm) | | | | | |
|------------------------------|--|---|---|---|---------------------------------|--|
| | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 | <i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | |
| EET | 8 | 7 | - | 8 | - | |
| EMT | - | 8 | 7 | 7 | - | |
| EEH | - | - | 7 | 7 | 7 mm | |
| EMH | - | 8 | 7 | - | - | |
| Controles | | | | | | |
| Eritromicina (E) | 32 mm | - | - | - | - | |

Leyenda: EET: Extracto Etanol Tallos, EEH: Extracto Etanol Hojas, EMT: Extracto Metanol Tallo, EMH: Extracto Metanol Hojas.

Elaborado por: Hernández, Sanabria y Torrealba, 2024.

Tabla 8. Resultados obtenidos en la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de tallos y hojas de *Lantana trifolia* (continuación).

| Muestras ensayadas [] | Halos de Inhibición en milímetros (mm) | | | | | <i>E. coli</i> ATCC 25922 |
|---------------------------|--|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|----|---------------------------------|
| | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 | <i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 | | |
| | | | | | | |
| Ampicilina (AMP) | - | 32 | - | - | - | - |
| Piperacilina (PIP) | - | - | 27 | 27 | 27 | |
| Dimetilsulfóxido | - | - | - | - | - | |

Elaborado por: Hernández, Sanabria y Torrealba, 2024.

Figura 10: Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de tallos y hojas de *Lantana trifolia*.

| Prueba | Reporte |
|--------|--|
| | <p>Método de Difusión en agar con disco</p> <p>Especie en estudio: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.</p> <p>Reporte:</p> <ul style="list-style-type: none"> (16)EET: positivo (17)EMT: negativo (18)EEH: negativo (19)EMH: negativo |
| | <p>Método de Difusión en agar con disco</p> <p>Especie en estudio: <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.</p> <p>Reporte:</p> <ul style="list-style-type: none"> (16)EET: positivo (17)EMT: positivo (18)EEH: negativo (19)EMH: positivo |

Leyenda: EET: Extracto Etanol Tallos, EEH: Extracto Etanol Hojas, EMT: Extracto Metanol Tallo, EMH: Extracto Metanol Hojas.

Elaborado por: Hernández, Sanabria y Torrealba, 2024.

Figura 10: Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de tallos y hojas de *Lantana trifolia* (continuación).

| Prueba | Reporte |
|--------|---|
| | Método de Difusión en agar con disco Especie en estudio: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357. Reporte (16)EET: negativo (17)EMT: positivo (18)EEH: positivo (19)EMH: positivo |
| | Método de Difusión en agar con disco Especie en estudio: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 Reporte: (16)EET: positivo (17)EMT: positivo (18)EEH: positivo (19)EMH: negativo |
| | Método de Difusión en agar con disco Especie en estudio: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. Reporte: (16)EET: negativo (17)EMT: negativo (18)EEH: positivo (19)EMH: negativo |

Leyenda: EET: Extracto Etanol Tallos, EEH: Extracto Etanol Hojas, EMT: Extracto Metanol Tallo, EMH: Extracto Metanol Hojas.

Elaborado por: Hernández, Sanabria y Torrealba, 2024.

Discusiones

El género *Lantana* es conocido por sus usos medicinales. *Lantana trifolia* es una planta usada para el tratamiento de diferentes enfermedades como asma, resfriado común, epilepsias y amigdalitis (Musinya, 2022). El estudio de dicha especie ha permito conocer que dentro de su composición se encuentran presentes alcaloides, taninos, saponinas, flavonoides, compuestos fenólicos, esteroles y triterpenos (Madivoli y Ondoo, 2020).

Mediante las pruebas químicas cualitativas que permitieron llevar a cabo el tamizaje fitoquímico en esta investigación, se confirmó la presencia de glicósidos, flavonoides, fenoles y esteroles. Luego de llevar a cabo una detallada revisión de la literatura relacionada con la caracterización fitoquímica de los extractos de *Lantana trifolia* en diferentes países, se observó una estrecha relación con la composición fitoquímica de la especie analizada. Según Musinya, 2022 el cual estudio la composición fitoquímica de la especie *Lantana trifolia* mediante el análisis fitoquímico cualitativo de extractos acuosos y etanólicos, identificó la presencia de taninos, saponinas, compuestos fenólicos, terpenoides, flavonoides y alcaloides, los resultados de este proyecto investigativo presenta similitud en cuanto a la presencia de flavonoides y fenoles, sin embargo, compuestos como alcaloides, saponinas y taninos difieren, la ausencia de estos puede deberse a las condiciones climáticas en las que fueron recolectadas, ya que en épocas de lluvia los compuestos hidrosolubles se pierden debido al estrés de la planta, impidiendo así expresar su máximo potencial de rendimiento, las situaciones de estrés pueden deberse a factores abióticos o bióticos, los factores abióticos pueden ser cambio de climas, manejo de cultivos o asociado a fenología (Silva y cols., 2005). De manera similar, (Madivoli y Ondoo, 2020), en el estudio de la composición fitoquímica de los extractos metanólicos de

Lantana trifolia, confirmaron la presencia de fenoles y flavonoides en tallos, hojas y raíces de la planta, lo cual guarda estrecha relación con esta investigación, ya que se logró identificar dichos metabolitos en los extractos etanólicos y metanólicos de tallos y hojas. Además, estos autores afirmaron que la presencia de fenoles, flavonoides y terpenos (los cuales se evidenciaron en la presente investigación) ejercen su actividad en la eliminación de radicales libres oxidativos, así como también los terpenos tienen gran importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, entre otras.

En el año 2005, Silva y cols., obtuvieron por maceración extractos de las hojas de la especie *Lantana trifolia*, usando como solventes etanol y agua evaluando la actividad antiinflamatoria y antinociceptiva, en cuanto a la composición química, los compuestos obtenidos con ambos solventes variaron, mientras que en el extracto acuoso se observaron saponinas y alcaloides en el extracto etanólico no estuvieron presentes, sin embargo, en nuestro trabajo de investigación tanto en los extractos etanólicos como metanólicos no hubo variación, es decir se encontraron exactamente los mismos metabolitos secundarios, por lo que no es recomendable realizar extractos con ambos solventes en esta especie, puesto que presentan una misma conducta a pesar de que el metanol es más polar que el etanol, en cuanto al rendimiento el extracto metanólico tuvo un mayor porcentaje de rendimiento que el etanólico.

En esa misma línea, tanto los extractos etanólicos y metanólicos de tallos y hojas de *Lantana trifolia* exhibieron diversos grados de actividad antibacteriana contra los microorganismos seleccionados. Sin embargo, según (Agwu, 2019), es importante tener en cuenta el tipo de disolvente utilizado durante la extracción, conocer que los extractos de plantas son

generalmente más activos contra bacterias Gram positivas que bacterias Gram negativas lo cual podría deberse a la diferencia de pared celular que poseen (Briers y Lavigne, 2015); así como también tener presente el método utilizado para evaluar la actividad antibacteriana. En este estudio, los extractos disponen de una concentración de 10.000 ppm, encontrándose que tanto los extractos etanólicos como metanólicos presentaron una composición fitoquímica idéntica, con variación solo en la parte de la planta utilizada, a pesar de que el extracto metanólico es más polar que el extracto etanólico y por ende extrae mayor cantidad de compuestos polares (los cuales son aquellos que poseen mayor actividad biológica) no fue quien tuvo mayor actividad antibacteriana, sino que fue el extracto etanólico quien la obtuvo, esto se debe al método usado para evaluar dicha actividad, ya que el método de difusión en agar con discos (Kirby-Bauer) presenta una desventaja, representada por el uso de discos de papel filtro, el papel retiene los compuestos polares como el metanol, este compuesto es muy polar por lo tanto, el disco no permite que los metabolitos presentes en dicho extracto difundan en el agar, disminuyendo su actividad, quedando en evidencia al observarse que el extracto etanólico presentó moderada actividad frente a cepas bacterianas Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, y frente a microorganismos Gram negativos *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, mientras que el extracto metanólico no presentó actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ni *Escherichia coli*.

En el mismo orden de ideas, (Agwu, 2019), evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos acuoso y etanólico en flores de *Lantana trifolia* en aislamientos bacterianos de heridas; utilizando solventes como metanol y agua para obtener los extractos, como resultado se evidenció que el aislamiento bacteriano más sensible al extracto de *Lantana trifolia* fue

Staphylococcus aureus ($35,50\pm0,9$ mm y $49,18\pm1,9$ mm para los extractos acuoso y etanólico respectivamente a 300 mg/mL) mientras que el menos sensible fue *Corynebacterium* sp. ($15,2\pm1,5$ mm) y *Mycobacterium* sp. ($28,3\pm3,4$) a 300 mg/mL para extractos acuosos y etanólicos respectivamente. Sin embargo, la actividad antibacteriana evaluada en esta investigación no arrojó halos de inhibición representativos debido a la baja concentración del extracto. No obstante, los microorganismo que presentaron mayor resistencia a los extractos etanólicos de tallos y hojas fueron *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Los resultados acerca de la composición química de los extractos en tallos y hojas de *Lantana trifolia*, confirmaron que contiene metabolitos que le confiere propiedades antibacterianas, estos compuestos bioactivos de origen vegetal podrían constituir la base para el desarrollo de nuevos fármacos, tal como refiere Musinya, 2022.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Los extractos obtenidos de las hojas y tallos de *Lantana trifolia* mediante el método de extracción con reflujo mostraron un rendimiento de 1,37 %, 1,87 %, 1.54 % y 1,99% para etanol y metanol (tallos y hojas) respectivamente.
- Se obtuvieron los diferentes extractos de tallos y hojas de la especie *Lantana trifolia*, utilizando como disolventes metanol y etanol a través de la técnica de reflujo
- La composición química preliminar de los extractos metanólico y etanólico fue analizada cualitativamente mediante el tamizaje o ensayo fitoquímico logrando la identificación de esteroles, glicósidos, flavonoides y fenoles en los tallos y hoja de la especie tanto en los extractos etanólicos como metanólicos.
- Los extractos etanólico y metanólico de los tallos y hojas de *Lantana trifolia* a una concentración de 10.000 ppm presentaron actividad antibacteriana frente a las diferentes cepas bacterianas estudiadas, siendo *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, las bacterias que presentaron menor sensibilidad frente a los extractos.

Recomendaciones

- Realizar el estudio de la actividad antibacteriana en otras cepas patógenas.
- Aislar y separar los metabolitos presentes en dichos extractos y ensayar nuevamente la actividad antibacteriana.
- Utilizar otros métodos para determinar la susceptibilidad de bacterias, tales como métodos de dilución o método de la cinta, ya que no todos son igualmente sensibles por lo que los resultados pueden verse influenciados.
- Analizar si los extractos de los tallos y hojas de *Lantana trifolia* presentan otro tipo de actividad biológica como antifúngica, antioxidante o fotoprotectora.

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Acuña, L. (2003) Evolución de la terapia con agentes antimicrobianos: qué fue, qué es y será. *Revista chilena de infectología*, 20(1), 7-10.
- Aguado B. (2012). Técnicas de reflujo. *Operaciones básicas de laboratorio*. 1-4.
- Agwu, E. (2019). Actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de flores de *Lantana trifolia* en aislamientos bacterianos de heridas. *Revista de Ciencias Aplicadas y Gestión Ambiental*, 23(8), 1549-1555.
- Araque, M. (2008). Prueba de susceptibilidad antimicrobiana. En Longa A, Sánchez K, Velazco J, Araujo E, Nicves B, Ramírez A, Velazco E. *Manual Práctico de Bacteriología Clínica*. (pp. 25-30) Venezuela: Editorial Venezolana C.A.
- Avalos, A., y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. *Departamento de Biología Vegetal*. Facultad de Biología. (Trabajo de investigación). Universidad Complutense de Madrid. España. Zanin.
- Bauer, A., Kirby W., Sherris J., y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45, 493-496.
- Bermejo Z, Pereira S, Cintro J, Morales G. (2014). Determinación de parámetros químicos- físicos de las tinturas al 20 % obtenida de hojas, tallos y frutos de *Melia azedarach*. *Revista Haban ciencia med*; 13(5) 670-680.
- Briers Y, Lavigne R. (2015). Rompiendo barreras: expansión del uso de endolisin as como nuevos antibacterianos Gram negativos. *Microbiología del futuro*, 10 (3), 377-390.
- Bush, L., y Vásquez, M. (2023). Infecciones por neumococos. Manual MSD. Versión para profesionales, 1, 2-14.

- Castillo, G., Zavala, D., y Carrillo, M. (2017). Análisis fitoquímico: una herramienta para develar el potencial biológico y farmacológico de las plantas. *Revista Académica de Investigación*, 1, 871-86.
- Cela, R., Lorenzo, R., y Casais, M. (2003). Técnicas de separación en química analítica. Editorial Síntesis. Madrid.
- Cervantes, E., García, R., y Salazar, P. (2014). Características generales de *Staplylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología clínica. Medica de Laboratorio*, 1(2), 28-40.
- Costa, R. (2016). *Klebsiella pneumoniae*. *Hospital Evita Pueblo De Berazategui. Prov. de Buenos Aires*, 1(11), 19-21.
- Cruz, A., Rodríguez, N., y Rodríguez, C. (2010). Evaluacion *in vitro* del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana cámara*, *Schinus molle* y *Silyum marianum*. *Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica*, 13 (2), 117-124.
- Domínguez, X. (1979). Métodos de Investigación Fitoquímica. México: Editorial Limusa.
- Espinoza, F., y Eudaldo, E. (2019). Las variables y su Operacionalización en la investigación educativa. Segunda parte. *Conrado*, 15(69), 171-180.
- Gallegos M, Nietos A, Alarcon F, Cruz F, Garcia R. (2019). Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos de *Thalassia testudinum* Banks ex König et Sims de la localidad de Champotón, Campeche, México, durante el ciclo anual 2016-2017. *Revista Polobotanica*. 48: 151-168.
- Gallegos, L., y Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Analés de la Facultad de Medicina*. 77(4): 327-332.
- García, H. (1992). Flora medicinal de Colombia: botánica médica. Tercer Mundo Editores, Bogotá, Colombia.

- González A, Villalobos V, Pereyra G, Rengifo E, Marín O, y Tezara W. (2009). Comparación ecofisiológica de tres especies del género *Lantana L.* (Verbenaceae), 32(2), 417-432.
- Gutiérrez, A., y Estévez, A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el siglo XXI. Madrid: *Real Academia de Ciencias Exactas, Fisicas y Naturales*. 103(2): 409-419.
- Hernández, R., Fernández, C., y Batista, L. (2010) *Metodología de la Investigación*. 5ta ed. México: Mc Graw Hill
- Hurtado, J. (2000). Holopraxis de la Investigación en: *Metodología de la Investigación Holística*. Tercera Edición. Caracas, Venezuela: Fundación Sypal, 63-84.
- Lara, O., (2009). Estudio sobre los aceites esenciales y metabolitos secundarios en las especies *Lantana camara L.*, *Lantana hispida HBK* y *Lantana trifolia L.*, de la Familia Verbenaceae. Guatemala. [Tesis para optar el título de químico farmacéutico].
- Longa, A., Sánchez, K., Araque, M., Velazco, J., Araujo, E., Nieves, B., Ramírez, A., y Velasco, E. (2008). *Manual Práctica de bacteriología Clínica*. Editorial Venezolana C.A.
- López, P. (2004). Población muestra y muestreo. *Punto Cero*, 09(08), 69-74.
- Madivoli, E., Gachoki K., y Gachanja, A. (2020). Facile synthesis of silver nanoparticles using *Lantana trifolia* aqueous extracts and their antibacterial activity. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 30 (8), 2842-2850.
- Madivoli, E., y Ondoo, R. (2020). *Lantana trifolia*: phytochemical and elemental composition, proximate contents and gas chromatography-mass spectrometry profile. *The Journal of Phytopharmacology*, 4(1), 1-8.

- Mantilla, J., y Sanabria, A. (1985). Actividad antibacteriana de plantas superiores colombianas. *Revista Colombiana Ciencias Químicas Farmaceutica*. 4(2), 25-33.
- Marcano, D. (2008). El lado positivo de las bacterias. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 39(2), 63-65.
- Martínez J. (2016). Evaluación de dos métodos para la obtención de extractos con actividad antioxidante a partir de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) con aplicación en productos mínimamente procesados. Colombia. [Tesis para obtener el título de Ingeniero en Alimentos].
- Martínez, L. (2016). *Mecanismos de resistencia a los antimicrobianos*. Revista Médica Valdecilla, (1), 7-16.
- Mena, V., y Tamargo, B. (2015). Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos. *Revista Cubana de plantas medicinales*. 20, (1), 106-116.
- Mogollon P. (2022). Resistencia bacteriana en infecciones nosocomiales en adultos en Latinoamérica. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*. Universidad de San Carlos –Guatemala. 1-88.
- Montaño, N., Sandoval, A. Camargo, S. y Sánchez, J. (2010). Los microorganismos; pequeños gigantes. Elementos: Ciencia y Cultura, 17 (23), 15-23.
- Mora, X. (2012). Diferenciando Bacterias grampositivas y gramnegativas. *Revista Selecciones Avícolas*, 1 (5), 25-27.
- Murray, P. (2018). *Microbiología médica básica*. Editorial Elsevier; 1er edición.
- Musinya, I. (2022). Antimicrobial Activity, Toxicity and Phytochemical Screening of *Lantana trifolia* Leaf Extracts. *University of Nairobi. The Journal of Phytopharmacology* 1: 15-89.
- Musinya, R., Mbaria, J., y Ole-Mapenay, I. (2021). Acute and Sub-acute toxicity of the aqueous leaf extract of *Lantana trifolia* (Verbenaceae) in

- experimental rodents. *The Journal of Phytopharmacology*, 10(5), 350-356.
- OMS (1979) The selection of essential drugs. WHO Technical Report Series 641: 1-44
- Oyola, A. (2021). La variable. *Revista del Cuerpo Médico Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo*, 14(1), 90-93.
- Pedrique M. (2022). Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (antibiograma). *Revista de Microbiología. Antibiogramas*. 30-39.
- Pérez, C; Torres, C; y Núñez, M. (2018). Actividad antimicrobiana y composición química de aceites esenciales en Verbenaceae, especies que crecen es Suramérica. *Moléculas*, 23 (3).
- Pérez, E., y Rivas, A. (2020). Determinación de la sensibilidad de los microorganismos frente a antimicrobianos de origen natural y la concentración mínima inhibitoria (CMI) por métodos fenotípicos. *Revista de la Universidad Politécnica de Valencia*. (1):1-10.
- Pérez I. (2010). El uso de las plantas medicinales. *Revista Ecuatoriana de Plantas*. 1: 23-26.
- Pérez, J. (2011). Estudio químico de los aceites esenciales y metabolitos secundarios de tres plantas del género *Lantana* (Verbenaceae). *Ciencias básicas*, 15-20.
- Ringuelet, J., y Viña, S. (2013). Productos naturales vegetales. Buenos Aires-Argentina. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata (EDULP).
- Rodríguez, G. (2002).Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud publica México*, 44, 644-675.
- Ruiz, M. (2020). Métodos físicos de separación obtención de extractos en hidrodestilación, 1-6

- Sánchez, M., Fernández, M., y Díaz, J. (2021). Técnicas e instrumentos de recolección de información: análisis y procesamiento realizado por el investigador cualitativo. *Revista Científica*, 8(1), 107-121.
- Sánchez, J. (2018). Familia Verbenacea. *Árboles y arbustos ornamentales de las Islas Canarias*, 7 (1), 1-10
- Sande, M. (1982). Quimioterapia de la Enfermedad. *Agentes Antimicrobianos. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. La Habana Cuba. Editorial Científica.
- Seija, V., y Vignoli, R. (2019) Principales grupos de antibióticos en *Bacteriología y Virología Médica*, 1 (1), 631-647.
- Sepúlveda, G., Porta, H., y Rocha, M. (2003). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fisiopatología*, 35(1).
- Silva G, Martin F, Matheus M, Leitao S, Fernandes P. (2005). Investigacion de las actividades antiinflamatoria y antinociceptivas de *Lantana trifolia*. *Revista de Etnofarmacología*, ELSEVIER.100 (3): 254-259.
- Torres, J., León, J., y Tomas, G. (2017). Actividad antibacteriana y antifungica de extractos de *Luma chequen* (molina). A Gray arrayan frente a patógenos de origen clínico. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*. 37 (1): 10-16.
- Tortora, G., Carroll, Funke, B. y Case, C. (2007). Introducción a la microbiología (9^a Ed). Buenos Aires- Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Uzcátegui, B., y Ávila, D. (2004). Efecto antiinflamatorio, antinociceptivo y antipirético de *Lantana trifolia* Linnaeus en animales de experimentación, 45(4), 317-322.
- Vibrans, H. (2009). Verbenaceae *Lantana trifolia* L. *Malezas de México*.

Vigano, J., Brumera, I., Bragab, P., Da Silvac, K., Marostica, M., Reyes, F., y Martínez, J. (2015). Extracción de líquidos a presión como proceso alternativo para la obtención sencilla de Bioactivos compuestos de cáscaras de maracuyá. Chile. [Tesis para optar el título de químico farmacéutico].

Zarza P, Mordani S, Maldonado A, Hernández D, Solano S, Vázquez R. (2019). *Pseudomonas aeurginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*. 36 (2):180-189.

www.bdigital.ula.ve