



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
LIC. EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIATURA EN
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

“Identificación fitoquímica y evaluación in vitro del extracto de *Baccharis salicifolia* sobre bacterias de importancia clínica”

Presenta

pQ.F.B. Eduardo Javier Escalante Hernández

Director

D. C. Sandra Luz Cabrera Hilerio

Asesor

D. C. Rocío Aguilar Sánchez

NOVIEMBRE, 2022



BUAP

OFICIO C.Q./CT 002P/2020

EDUARDO JAVIER ESCALANTE HERNÁNDEZ
Presente

Toda vez que se cuenta con la aprobación del Coordinador del Área de Bioquímica-Alimentos, le comunico que su anteproyecto de Tesis denominado:

"Identificación fitoquímica y evaluación in vitro del extracto de Baccharis solifolia sobre bacterias de importancia clínica"

ha sido autorizado, siendo:

D.C. SANDRA LUZ CABRERA HILERIO, Director de Tesis
D.C. ROCÍO AGUILAR SÁNCHEZ, Asesor de Tesis

Y con esta fecha se registra en los archivos de la Dirección de esta Facultad, para los fines legales que tenga lugar.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a 22 de enero de 2020

Dr. Jorge R. Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas



c.c.p. Archivo

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390



“HUP, 50 años de enseñanza y salud”

OFICIO C.Q./CT 037A/2022

Dr. Jorge R. Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis del alumno de la Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Eduardo Javier Escalante Hernández

realizada en el área de Química Analítica, comunican a Usted la autorización para la publicación del Trabajo de tesis bajo la dirección de la D.C. Sandra Luz Cabrera Hilerio y de la D.C. Rocío Aguilar Sánchez, con el siguiente título:

“Identificación fitoquímica y evaluación in vitro del extracto de Baccharis Salicifolia sobre bacterias de importancia clínica”

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan el día 11 de octubre de 2022.

Atentamente
“Pensar bien, para vivir mejor”
H. Puebla de Z., a 12 de octubre de 2022

Dra. Laura Morales Lara, PRESIDENTE

M.C. Laura Martínez Pérez, SECRETARIO

D.C. José Luis Gárate Morales, VOCAL
c.c.p. Archivo

Cadena digital: 2Na,Jc%Rz*Tb(Tk/Hv!Mx*Cm(Zi,Cf.Bj+Va%Ji-
Ex!Ah,We.Vl!Oh%Lm)ZfWj,Hp&Oi\$Qm)Kf!Qb,Oh,Tv\$Tr/Kt!Vx/Dj*Jg^Vx-Ux(Yk#Sg\$Ac-Iv+Zn*Yx!Rb-
Zq&Yy&Gc%Go(Hb\$Hj&Cw\$Qj(Nf#Id'Oz+Ct!Mx!Mv'Xx)Dw(Fs-Yf!Cg\$Cc"IF-Bk-
Za.Oh&Bv&Ig'Zo\$Wy"t'Rs#Ti.Mu*Xn.Vn#Ft,Rq"Uu\$Ar\$Hp'Kv"Zm/Wl!Qm!Aj"Zk*Cy+Pg,Mv!Kl-Va+

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 55 00 Ext. 7390



“HUP, 50 años de enseñanza y salud”

OFICIO C.Q./CT 034J/2022

Mtro. Ricardo Valderrama Valdez
Director de Administración Escolar
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

En relación al oficio de fecha 24 de octubre de 2022, firmado por la Coordinadora de la Licenciatura en QFB de la Facultad de Ciencias Químicas, me permito comunicar a Usted el nombre de los catedráticos que integran el Jurado de Examen Profesional de la **Licenciatura en Químico Farmacobiólogo**, quien con número de matrícula **201324761**, en la Modalidad de Titulación por Tesis sustentará:

ESCALANTE HERNANDEZ EDUARDO JAVIER

JURADO

D.C. Laura Morales Lara, Presidente
M.C. Laura Martínez Pérez, Secretario
D.C. José Luis Gárate Morales, Vocal

Examen que se realizará el día **4 de noviembre de 2022**, a las 15:00 horas en el Salón de Usos Múltiples (SUM) de la Facultad de Ciencias Químicas. Esperando una respuesta favorable al presente, le reitero mi atenta y distinguida consideración.

Atentamente
“Pensar bien, para vivir mejor”
H. Puebla de Z., 25 de octubre de 2022


Dr. Jorge Raúl Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas



c.c.p. Archivo
Cadena digital: 5Pc)Kb'Xc)Is)On-
Ga#Jd/Rv.Wf''Kj#Jw)Mt)He,Sr,Bi\$Fn\$Kb'Sj(WH#Fk.Nn+Wq.Xc\$Ht!Os''Bo(Kn'Zm+Fh#Gp&Fz/Ym+Su#Sl*Mq!Kf\$Rz%Gm)Du\$En
+Hv''Jh&Qv&Ot*Qb(Uw%Mn%Rt.Qa\$Es'Kk-
Ze'Ly.Cx(Ng.No#Mr'Xg!Fn(Ai'Sk'Wg(la+Gw*Hg''Mf,Pc/Vc&Sh)Me&Tj&Xg.Cq*Dd)Rh!Xh+Xk\$Vu!Yx/Bn.Am!Mg!Tf(Nj%Jt-
Zj/Po.Di-Lv!Kr%Aa*Mz)

Facultad
de Ciencias
Químicas

San Claudio No. 1, Edificio FCQ-9
Ciudad Universitaria, Col. San Manuel
Puebla, Pue. C.P. 72540
01 (222) 229 5500 Ext. 7390

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi directora de tesis la D. C. Sandra Luz Cabrera Hilerio por brindarme la oportunidad de trabajar con ella y su equipo de trabajo, por la confianza, por el tiempo, su paciencia y su gran actitud que tanto la caracteriza de entre tantos docentes, gracias por el apoyo y por siempre darme la seguridad para poder realizar las presentaciones de los diferentes congresos a los que pude asistir, porque es una profesional en todos los aspectos y porque me da una gran felicidad que existan docentes como ella, la cual siempre enseña de la mejor manera y con todas la ganas,

gracias por todas las veces que nunca nos dejó, por todos los convivios y gracias por siempre ayudarme y ayudarnos ya que sé que no soy el único, infinitas gracias Dra. por ser una gran profesional.

A mi asesor de tesis la D. C. Rocío Aguilar Sánchez por el apoyo brindado, por explicar las técnicas utilizadas con detalle y por ser una docente que ayuda siempre a los alumnos.

Al D. C. José Luis Garate Morales, por su apoyo para las técnicas de FT-IR así como por explicar con gran detalle cada paso de la técnica y su paciencia, un docente que siempre se caracteriza por su apoyo a los alumnos y ser una persona muy amable, Gracias!

A la M. C. María Azucena Pérez Fernández por su colaboración y donación del material biológico utilizado.

Al D. C. Mariana Miranda Arambula por su colaboración, así como por la ayuda en la recolección del material vegetal y su apoyo en este proyecto.

A mis sinodales D. C. Lura Morales Lara, M. C. Laura Martínez Pérez y el D. C. José Luis Garate Morales quienes tomaron de su tiempo para el estudio de este proyecto, así como su aportación de puntos importantes.

Gracias por su apoyo, así como su tiempo brindado en este proyecto.

Dedicatorias

Dedico este proyecto a las personas que son importantes en mi vida, ya que sin ellas sé que esto no habría sucedido.

A mis Padres quienes sé que han hecho el esfuerzo más grande de sus vidas para poder brindarme siempre lo mejor, gracias a ellos, hoy estoy aquí, gracias por siempre demostrarme que todo se puede, gracias por confiar en mí y gracias por siempre estar a mi lado, gracias porque sé que a lo largo de este camino me han entendido en muchas cosas y sé que les costó, sin embargo, lo entendieron y sé que me aman con todo su ser. Infinitas gracias a mis seres más queridos en el universo.

A mi hermana, mi gran confidente, gracias por apoyarme y siempre escucharme, por estar cuando lo necesito y ser la pequeña que siempre voy a admirar.

A mi Mejor amiga Jennifer quien me brindo su gran amistad, gracias por el enorme apoyo que siempre me brindo a lo largo de este camino llamado universidad, gracias por enseñarme y tenerme siempre la paciencia, gracias por abrirme las puertas de tu casa y por darme la confianza de convivir con tú hermosa familia que al igual que tú siempre me daban los ánimos para seguir, gracias porque contigo hoy puedo decir que la amistad existe y es algo muy valioso. Gracias por siempre estar y por todo tu apoyo, sin duda alguna tú amistad es el recuerdo más bello de la universidad.

A mis también mejores amigos Alex y Karla, quienes junto con Jenny pasamos la universidad siempre juntos aprendiendo, divirtiéndonos y siempre apoyándonos, gracias por esos momentos que marcaron mi vida.

A Absalon quien sin duda alguna siempre me apoya y es una persona a quien quiero demasiado y admiro mucho, quien me ayudo siempre y me animo para poder realizar este trabajo, gracias por siempre estar conmigo.

A mis amigos que conocí en el laboratorio y en mi trabajo, gracias por el apoyo que me brindaron, gracias por insistirme para poder terminar mi proyecto, infinitas gracias a Majó y Chio por esos viajes para la recolección de muestras y los diferentes congresos a los que asistimos, a mis amigos del trabajo por su

apoyo para poder terminar en especial a Jazmin, Belen, Miriam, Daya y Valeria porque su apoyo fue de gran ayuda para hoy poder concluir este proyecto.
¡Infinitas gracias!

ÍNDICE

| | |
|---|-----|
| ÍNDICE DE TABLAS | I |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | II |
| ABREVIATURAS | III |
| 1. RESUMEN..... | 1 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| 3. ANTECEDENTES | 4 |
| 3.1 La botánica y su importancia en la actualidad | 4 |
| 3.2 La aleopatía en las plantas | 5 |
| 3.3 <i>Baccharis salicifolia</i> | 6 |
| 3.4 Resistencia bacteriana a los antibióticos | 9 |
| 3.5 Agentes infecciosos de importancia intrahospitalaria | 10 |
| 3.5.1 <i>Staphylococcus aureus</i> | 10 |
| 3.5.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 10 |
| 3.5.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 11 |
| 3.5.4 <i>Staphylococcus saprophyticus</i> | 11 |
| 3.5.5 <i>Escherichia coli</i> | 11 |
| 3.6 La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB). ... | 12 |
| 4. JUSTIFICACIÓN | 13 |
| 5. OBJETIVOS | 14 |
| 5.1 Objetivo general..... | 14 |
| 5.2 Objetivos particulares..... | 14 |
| 6. DIAGRAMA DE TRABAJO..... | 15 |
| 7. MATERIALES Y METODOS | 16 |
| 7.1 Materiales | 16 |
| 7.2 Métodos..... | 16 |
| 8. METODOLOGÍA | 17 |
| 8.1 Obtención del material vegetal..... | 17 |
| 8.2 Secado y molienda..... | 17 |
| 8.3 Obtención de los extractos vegetales..... | 17 |
| 8.4 Preparación de medios de cultivos y resiembra de las cepas. | 17 |

| | | |
|-------|--|----|
| 8.5 | Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de <i>B. salicifolia</i> mediante el método de difusión en agar con pozos. | 18 |
| 8.5.1 | Obtención de la suspensión bacteriana | 18 |
| 8.5.2 | Bioensayo de la actividad antibacteriana de los extractos de <i>B. salicifolia</i> | 18 |
| 8.6 | Fraccionamiento fitoquímico del extracto con mayor actividad antibacteriana de <i>B. salicifolia</i> | 18 |
| 8.6.1 | Cromatografía en capa fina (CCF) del extracto con mayor actividad antibacteriana de <i>B. salicifolia</i> | 18 |
| 8.6.2 | Bioautografía en cromatografía de contacto | 19 |
| 8.6.3 | Cromatografía en columna (CC) del extracto con mayor actividad antibacteriana de <i>B. salicifolia</i> | 19 |
| 8.7 | Evaluación de la actividad antibacteriana de las fracciones mediante el método de difusión en pozo. | 19 |
| 8.8 | Obtención de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) y la Concentración mínima bactericida (CMB) | 20 |
| 8.9 | Espectroscopía de FT-IR: Determinación de los grupos funcionales. | 20 |
| 9. | RESULTADOS Y DISCUSIONES | 21 |
| 9.1 | Evaluación antibacteriana de los extractos. | 21 |
| 9.2 | Separación por cromatografía de capa fina. | 26 |
| 9.3 | Bioautografía en cromatografía de contacto. | 27 |
| 9.4 | Cromatografía de columna del extracto con mayor actividad antibacteriana de <i>B. salicifolia</i> . 28 | |
| 9.5 | Evaluación de la actividad antibacteriana de las fracciones mediante el método de difusión en pozo. | 28 |
| 9.6 | Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida. | 29 |
| 9.7 | Espectroscopía de FT-IR: Determinación estructural de la fracción 29 de <i>B. salicifolia</i> | 33 |
| 10. | CONCLUSIÓN. | 35 |
| 11. | RECOMENDACIONES | 36 |
| 12. | BIBLIOGRAFÍA. | 37 |
| 13. | ANEXOS. | 42 |

ÍNDICE DE TABLAS

| # | Título | Página |
|----------|---|--------|
| Tabla 1. | Comparación fitoquímica de los extractos hidroalcohólicos de <i>B. glutinosa</i> , <i>B. salicifolia</i> , <i>B. genistelloides</i> . | 10 |
| Tabla 2. | Métodos utilizados en la investigación. | 16 |
| Tabla 3. | Efectos de inhibición antibacteriana de los diversos extractos de <i>B. salicifolia</i> . | 22 |
| Tabla 4. | Inhibición del crecimiento bacteriano del extracto de <i>B. salicifolia</i> a diferentes tiempos de EAU sobre bacterias Gram positivas. | 24 |
| Tabla 5. | Actividad antibacteriana (%) del extracto crudo a 60 minutos de EAU de <i>Baccharis salicifolia</i> con mayor inhibición | 24 |
| Tabla 6. | Fracciones orgánicas obtenidas en la CCF del extracto de acetona de <i>B. salicifolia</i> . | 26 |
| Tabla 7. | Actividad antibacteriana de las fracciones acetónicas frente <i>S. aureus</i> ATCC 29213. | 28 |
| Tabla 8. | Concentraciones utilizadas para obtener la CMI y CMB de la fracción número 29 del extracto de <i>B. salicifolia</i> . | 29 |
| Tabla 9. | Resultados de la CMI. | 30 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| # | Título | Página |
|-----------|--|--------|
| Figura 1. | Estructuras de fitoalexinas aisladas de chícharo y frijol. | 7 |
| Figura 2. | Flores de <i>B. salicifolia</i> . | 8 |
| Figura 3. | Planta de <i>Baccharis salicifolia</i> (hojas y flores) | 9 |
| Figura 4. | Actividad antibacteriana del extracto de <i>B. salicifolia</i> a partir de acetona a diferentes tiempos de EAU | 23 |
| Figura 5. | CCF del extracto crudo | 26 |
| Figura 6. | Bioautografía realizada a <i>S. aureus</i> (ATCC 29213) | 27 |
| Figura 7. | Halos de inhibición de la fracción número 29 frente <i>S. aureus</i> ATCC 29213. | 29 |
| Figura 8. | Revelado de la CMI de la fracción #29 del extracto de <i>B. salicifolia</i> | 31 |
| Figura 9. | Espectro FT-IR de la fracción 29 de <i>B. salicifolia</i> . | 33 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------|---|
| ATCC | American Type Culture Collection |
| CMI | Concentración Mínima Inhibitoria |
| CMB | Concentración Mínima Bactericida |
| FT-IR | Espectroscopía Infrarroja por Transformación de Fourier |
| CCF | Cromatografía de Capa Fina |
| UV | Ultravioleta |
| MTT | (3- (4,5-dimeltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) |
| RF | Factor de retención |
| EAU | Extracción Asistida Por Ultrasonido |
| CC | Cromatografía en columna |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| Hz | Hertzios |

1. RESUMEN

Las enfermedades infectocontagiosas son causa importante de la morbilidad y mortalidad en el mundo originadas por la emergencia de microorganismos resistentes a antibióticos. Los agentes implicados en la prevalencia de estas enfermedades se encuentran *S. aureus*, el cual posee características tales como su rápida respuesta adaptativa frente a cambios del medio y la resistencia a ciertos antibióticos. Una alternativa eficaz para su control son los compuestos naturales o alelopáticos, por ejemplo, los metabolitos secundarios obtenidos de plantas. *Baccharis salicifolia* es una especie que posee bioactividades significativas que se aprovechan en la medicina popular utilizándola como planta diurética, digestiva y antifúngica; sin embargo, existen pocos estudios sobre la composición y compuestos activos de *Baccharis*. En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos obtenidos a partir de *B. salicifolia*, sobre bacterias de importancia clínica como *S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. saprophyticus* salvaje, *S. aureus* salvaje. Los extractos fueron obtenidos mediante EAU a diferentes tiempos y con diferentes disolventes. La evaluación antibacteriana se realizó por el método de difusión en agar con pozos. El extracto con mayor actividad antibacteriana fue separado mediante CCF y CC y para la determinación de la CMI se utilizó micro dilución en agar en microplaca. Los grupos funcionales se determinaron a partir de FT-IR. El resultado de la actividad antibacteriana evaluado a las 24 h demostró que el extracto crudo a base de acetona presentó inhibición frente a bacterias del género *Staphylococcus* obteniendo un 85.25% sobre *S. aureus* ATCC 29213 con respecto a la vancomicina. La fracción 29 purificada tuvo mayor actividad antibacteriana con respecto al extracto crudo, siendo un 210.5% más efectiva en comparación con la vancomicina 30 µg. La CMI para *S. aureus* ATCC 29213 es de 0.312 mg/mL, *S. epidermidis* ATCC 12228 es de 0.625 mg/mL, *S. saprophyticus* (silvestre) es de 1.25 mg/mL y *S. aureus* (silvestre) es de 0.156 mg/mL. A partir de la espectroscopía de FT-IR las bandas correspondientes mostraron una gran cantidad de grupos OH unidos a enlaces C-H como los que se han reportado estar presentes en los flavonoides. Con este estudio se demuestra que el uso de extractos de *B. salicifolia* puede ser una alternativa para el control y la eliminación de patógenos de importancia clínica.

2. INTRODUCCIÓN

El incremento de morbilidad y mortalidad en el mundo es un riesgo que se complica a causa de infecciones contraídas durante la asistencia médica. En México, se calcula que 450.000 casos de infección relacionada con el ámbito intrahospitalario causan 32 muertes por cada 100.000 habitantes por año (OMS, 2014). En la actualidad la demanda del uso inadecuado de los antibióticos ha ocasionado que las bacterias causantes de enfermedades nosocomiales se vuelvan resistentes a los mecanismos de acción de los fármacos haciendo más complicado el control de éstas.

Por otro lado, México es conocido como un país megadiverso, ya que presenta al menos el 10% de la diversidad terrestre del planeta (Mittermeier, *et al.*, 1992), Además, ocupa el segundo lugar a nivel mundial con 4500 plantas medicinales documentadas. Nuestros antepasados utilizaban las plantas como remedios medicinales para aliviar los síntomas de la población. Así mismo las plantas poseen actividad alelopática, es decir; la influencia directa de un compuesto químico liberado por una planta sobre el desarrollo y crecimiento de otra planta. Los compuestos alelopáticos pueden ser liberados de las plantas al ambiente por medio de la exudación de las raíces, lixiviación, volatilización y descomposición de los residuos de las plantas en el suelo (Ebana *et al.*, 2001).

El uso de plantas es una alternativa en el control de enfermedades infectocontagiosas ya que poseen metabolitos secundarios que presentan actividad biológica contra diversos microorganismos como las bacterias.

Una de estas plantas es Stevia que, además de ser un edulcorante natural y 400 veces más dulce que el azúcar común posee diversas propiedades como antiinflamatorio, antitumoral, antidiurético y antimicrobiano.

Existen algunos trabajos reportados de *Stevia rebaudiana* y su actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* causante de la caries (Guevara, 2017). Además, extractos de *Stevia* ha mostrado actividad antibacteriana frente a bacterias Gram negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. typhi*) (Federico *et al.*, 2017)., Así como se demostró la actividad antibacteriana de Stevia frente a *S. aureus* y *E. coli* (Morales,

2017)., Así mismo, extractos de *Stevia rebaudiana* demostraron actividad antibacteriana frente a bacterias ambientales *S. aureus*, *S. epidermidis* y *P. aeruginosa* (Miranda *et al.*, 2017).

Este trabajo se realizó con el fin de evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Stevia rebaudiana* frente a bacterias de importancia clínica, así como la determinación de la CMI y la determinación de grupos funcionales obtenidos del extracto por espectroscopía FT-IR y UV-vis.

3. ANTECEDENTES

3.1 La botánica y su importancia en la actualidad

La botánica es una ciencia con gran tradición en México que se remonta a la época prehispánica, Tan es así, que la botánica indígena ha sido considerada precursora de la botánica moderna y de la botánica actual de nuestro país, desde donde los indígenas de diversos territorios han aportado valiosos conocimientos sobre las plantas (Barba *et al.*, 2015). Tomando como referencia la gran biodiversidad que hay en México, se proponen nuevas alternativas para el control de enfermedades infectocontagiosas, como lo es, la utilización de metabolitos secundarios producidos por algunas plantas.

Las plantas son productoras de un gran número de metabólicos de importancia comercial, usados en las industrias farmacéutica, alimenticia, de cosméticos, además son fuentes de numerosas sustancias de interés agroquímico (Karuppusamy, 2009). Las plantas son organismos autótrofos que, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa, denominados metabolitos secundarios (Avalos *et al.*, 2009); una de sus principales características es su actividad biológica, la cual se puede utilizar con diferente finalidad, ya sea como medicamento, insecticida, herbicida, perfume o colorante, estos son también llamados productos naturales.

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que tiene un organismo, que se encarga de obtener energía y todas las moléculas necesarias para dar sustentabilidad, en este caso, a la planta, como lo son: aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos estos son denominados como metabolitos primarios, mientras que los metabolitos secundarios de las plantas son aquellos compuestos químicos que cumplen con funciones no esenciales en ella, ya que no intervienen en el metabolismo primario, pero les confieren claras ventajas selectivas, sino en las interacciones de ésta con su medio ambiente (Badajos, 2011). Estos también pueden ser definidos como principios activos, los cuales son responsables de una acción y un efecto, que puede ser, terapéutico o medicinal. Los principios activos en las plantas son, en general, los metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios no tienen una función específica en la planta ya que estos son diferentes en cada especie, el ser humano ha utilizado estos metabolitos como venenos, somníferos, perfumes, alucinógenos, analgésicos, y antimicrobianos. Los metabolitos más comunes en las plantas son terpenos, saponinas, alcaloides, fenoles, taninos, entre otros (Avalos y Pérez, 2009). Se estima que más de 100 000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas (Bhalla *et al.*, 2005). Aproximadamente 1 600 estructuras químicas nuevas obtenidas a partir de plantas superiores se describen cada año, de las cuales un gran número tiene actividad biológica (Sajc *et al.*, 2000). Este hecho hace que el estudio de metabolitos presentes en gran parte de las plantas sea un reto, generando la necesidad de utilizar tecnologías diversas para su producción, caracterización e identificación.

3.2 La alelopatía en las plantas

Como se sabe, la botánica es la ciencia encargada del estudio de las plantas, la cual aprovecha y usa las propiedades químicas que las plantas poseen para poder atraer, proteger, estimular, evitar o inhibir a los depredadores o agentes patógenos que sean una amenaza para la planta.

La palabra alelopatía tiene su origen del latín *Alelo* = unos a otros y *phatia* = recíproco, lo que quiere decir: *Ser recíproco para unos o para otros*.

La alelopatía se encarga de estudiar a los metabolitos secundarios, los cuales son estimulados a través del antagonismo externo, es decir, cuando la planta se ve amenazada, ya sea por un daño estructural o algún cambio ambiental. Estos metabolitos secundarios son utilizados como herramientas para su propio beneficio, ya sea para defenderse o para poder ser polinizada por insectos o aves pequeñas. Estos metabolitos secundarios también son llamados aleloquímicos o fitoalexinas.

Las fitoalexinas son de naturaleza química diversa, principalmente son flavonoides de bajo peso molecular que se sintetizan en las plantas después de una agresión o infección.

Los primeros reportes sobre la presencia de estos metabolitos fueron descritos por Muller y Borger (Kuc, 1995), cuyos estudios demostraron la resistencia de las plantas

a enfermedades; en el caso de la planta de la papa frente al hongo *Phytophthora infestans*, esta resistencia fue causada por la liberación de compuestos fungitóxicos por la planta infectada. De estas investigaciones surgió la teoría de las fitoalexinas. Por su parte, las investigaciones de Cruickshank y Perrin (Kuc, 1995) fueron de suma importancia para poder establecer a nivel molecular el concepto de fitoalexinas, estos investigadores caracterizaron diferentes estructuras en algunas especies vegetales, con lo cual pudieron construir un punto de inicio para el estudio de su biosíntesis, degradación e importancia en la resistencia a enfermedades.

Algunos investigadores sugieren que las fitoalexinas (figura 1) son metabolitos productos del estrés, inducidos por altos niveles de radiación ultravioleta, heridas, descenso de temperatura y por la aplicación de algunos fungicidas (Mateos *et al.*, 2003).

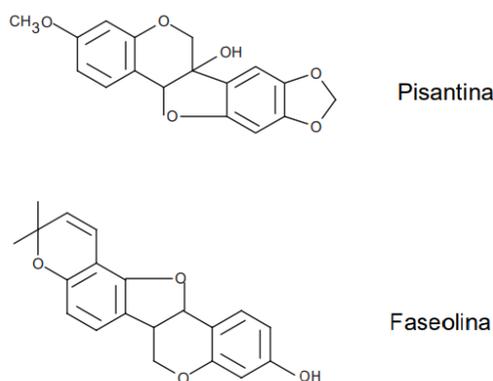


Figura 1. Estructuras de fitoalexinas aisladas de chícharo y frijol.

3.3 *Baccharis salicifolia*

La familia *Asteracea* es uno de los grupos sistémicos más numerosos dentro de las Angiospermas, que comprende 1000 géneros y cerca de 25000 especies (De la Cruz y Romero, 1997) (De la Cruz y Romero, 1999).

El género *Baccharis* (familia *Asteraceae*) está representado por más de 500 especies, distribuidas principalmente en Brasil, Argentina, Colombia, Chile, México, ocupando las regiones más elevadas. En Brasil están descritas aproximadamente 120 especies, 100 especies en Argentina, 28 especies en México y cerca de 40 especies en Colombia. Existe un interés muy grande por estudiar a este género por su amplio uso

en la medicina tradicional, debido a su contenido fitoquímico de flavonoides, diterpenos y triterpenos (Gonzaga *et al.*, 2005).

Dentro de este género destaca *B. salicifolia* (figura 2), el cual es un arbusto de 1-2 m de altura, ramoso desde la base, glutinoso, provisto de raíces gemíferas, hojas lanceoladas, agudas en el ápice, atenuadas en la base con pecíolos cortos, aserradas en la mitad superior del margen o enteras, tri nervadas de 40-90 mm de longitud por 4-15 mm, con capullos muy numerosos pedunculados, agrupados en cimas corimbiformes no hojadas (Ruiz *et al.*, 2012.)



Figura 2. Flores de *Baccharis salicifolia*.

La especie *B. salicifolia* es conocida como chilca, chilca blanca, ckechua chilca, chilco, yana chilca, chilca negra y es utilizada como antiinflamatorio, analgésico y antiespasmódico, en forma de infusión; también como cicatrizante, vulnerario y contra las fracturas, en forma de emplastos.

Diversos estudios han demostrado que *B. salicifolia* (figura 3) presenta actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas, esto a partir de extractos a base de etanol, no obstante, se ha identificado la fracción 10 del extracto etanólico como la fracción con mayor inhibición contra *Staphylococcus aureus* (Escalante *et al.*, 2017).



Figura 3. Planta de *Baccharis salicifolia* (hojas y flores)

Así mismo, en otros estudios se demostró la actividad antihelmíntica de los extractos de *B. salicifolia* (Salazar *et al.*, 2007).

En la tabla 1 se muestran los diversos compuestos químicos que han sido encontrados y analizados en algunas especies del género *Baccharis*, tales como, *B. glutinosa*, *B. salicifolia* y *B. genistelloides*, destacando la presencia de flavonoides, terpenos y esteroides, sustancias reductoras, lactonas y cumarinas. Los principales metabolitos presentes en el género *Baccharis* son los flavonoides de tipo flavanona y flavona, así como los diterpenos de núcleo kaurano, cleorodanos y labdano; atribuyendo las diversas actividades y propiedades biológicas de estas especies principalmente a compuestos como los flavonoides y diterpenos (Gonzaga *et al.*, 2005).

Cabe mencionar que las especies del género *Baccharis* han sido utilizadas por siglos para curar dolencias comunes, sus aplicaciones en medicina herbaria han sido registradas en varios países de América en donde se encuentra distribuido este género (Rangel *et al.*, 2001).

Tabla 1. Comparación fitoquímica de los extractos hidroalcohólicos de *B. glutinosa*, *B. salicifolia*, *B. genistelloides*.

| Metabolitos secundarios | Especies | | |
|--------------------------|---------------------|-----------------------|--------------------------|
| | <i>B. glutinosa</i> | <i>B. salicifolia</i> | <i>B. genistelloides</i> |
| Flavonoides | ++ | ++ | +++ |
| Taninos y/o compuestos | +++ | +++ | +++ |
| Fenólicos | | | |
| Triterpenos y Esteroides | +++ | ++ | +++ |
| Catequinas | +++ | +++ | ++ |
| Sustancias reductoras | +++ | ++ | +++ |
| Lactonas y Cumarinas | +++ | +++ | ++ |
| Quinonas | -- | -- | + |
| Azucares reductores | ++ | ++ | +++ |
| Alcaloides | -- | -- | -- |

(+++) Abundante, (++) Bastante, (+) Poco, (--) Ausencia

Tomado de: Aguilar *et al.*, 2014.

3.4 Resistencia bacteriana a los antibióticos

La resistencia a los fármacos antibacterianos tiene particular importancia clínica dado la capacidad de las bacterias de eludir las acciones antibacterianas, al igual que las posibilidades de que surjan mutaciones o nuevos mecanismos de transferencia de resistencia. La industria farmacéutica ha visto casi agotada su capacidad de introducir nuevos fármacos antibacterianos por los altos costos de investigación y la escasa recuperación de la inversión (Casellas, J. M. 2011).

Las bacterias que en su mayoría producen infecciones humanas frecuentes son las pertenecientes a las Gram positivas, En los Estados Unidos de América, el proyecto de vigilancia de agentes patógenos de importancia epidemiológica (SCOPE, por su sigla en inglés) indica que 60% de las bacteriemias nosocomiales son causadas por cocos grampositivos aerobios o facultativos.

3.5 Agentes infecciosos de importancia intrahospitalaria

En la actualidad las enfermedades infecciosas son una de las causas más importantes de muerte en el hombre. Dentro de las infecciones de gran importancia están las asociadas a la atención de la salud (IAAS) las cuales se adquieren en el hospital u otro servicio de salud, es decir, que no estaba presente, ni en período de incubación, cuando el paciente ingresó a dicho centro (M. Macedo, J. Blanco, 2010). Estas infecciones se presentan después de las primeras 48-72 horas de hospitalización y suceden en todo el mundo, principalmente en países en desarrollo. Los pacientes, familiares y personal del hospital se encuentran en riesgo de adquirir IAAS lo que contribuye a incrementar el gasto y la mortalidad hospitalaria (Salazar, 2012).

Investigaciones realizadas en el 2007 revelaron que en la Unidad de Neonatología del Hospital del Niño “Dr. Ovidio Aliaga Uría” (Bolivia) fue la septicemia la forma más frecuente de presentación, los microorganismos aislados fueron *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae* (Salazar, 2012). Dentro de estas bacterias identificadas se hacen resaltar dos de ellas, *S. epidermidis* y *E. faecalis* que, junto con *S. aureus*, entran en un grupo importante las bacterias Gram positivas.

3.5.1 *Staphylococcus aureus*

Es una bacteria considerada como oportunista, debido a que ocasiona enfermedades en el humano, principalmente cuando éste atraviesa lapsos de vulnerabilidad asociados a circunstancias anómalas que disminuyen la competencia de su sistema inmunológico. Bajo tales condiciones, el microorganismo es capaz de provocar afecciones en casi cualquier región anatómica, lo cual refleja su amplio bagaje en cuanto a genes de virulencia que lo habilitan para establecerse, reproducirse, sobrevivir y diseminarse en diversas clases de tejidos (Massey *et al.*, 2006).

3.5.2 *Staphylococcus epidermidis*

Es la especie más prevalente de los estafilococos coagulasa negativos (ECN), supone más del 65% de todos los estafilococos aislados en las muestras de pacientes portador de prótesis de rodilla. En los últimos años, el protagonismo de estas bacterias como

patógenos es manifiesto, fundamentalmente causando bacteriemia e infección de material protético. Es por ella que se considera que la mayoría de las infecciones causadas por *S. epidermidis* son de origen nosocomial (Pérez *et al.*, 2010).

3.5.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Es un bacilo Gram negativo, no fermentador, que se comporta básicamente como un patógeno nosocomial oportunista. Sus mínimos requerimientos nutricionales, su tolerancia a una amplia variedad de condiciones físicas y su resistencia intrínseca a un gran número de antibióticos, explican su papel ecológico como un importante y eficaz patógeno intrahospitalario (Pollack, 2002). Se presenta en pacientes con inmunosupresión, con quemaduras severas, enfermedades pulmonares o neutropenia por causa de quimioterapia que por ello están propensos a desarrollar infecciones por esta bacteria.

3.5.4 *Staphylococcus saprophyticus*

Es un coco Gram positivo, coagulasa negativa, anaerobio facultativo, no formador de cápsula, ni de esporas e inmóvil. Es catalasa positiva y oxidasa negativa. Posee la enzima ureasa y es capaz de adherirse a las células epiteliales del tracto urogenital, causante de frecuentes infecciones del tracto urinario en mujeres, así como uretritis en varones (Fariña *et al* 2005).

3.5.5 *Escherichia coli*

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*, coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se considera parte de su microbiota habitual, pero hay descritos seis patotipos de *E. coli* productores de diarrea: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC).

3.6 La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C (Horna, et al., 2005)

La Concentración Mínima Bactericida (CMB), se define como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99,9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas) (Horna, et al., 2005)

4. JUSTIFICACIÓN

Los antibióticos son de suma importancia para la humanidad, ya que han sido de gran ayuda para controlar diversas infecciones, salvando a millones de vidas a lo largo de la historia, estos son fármacos definidos como sustancias que pueden ser producidos por microorganismos como bacterias y hongos los cuales inhiben el crecimiento de algunos microorganismos que posteriormente pueden llegar a destruir.

En la actualidad la resistencia bacteriana, definida como la capacidad de un microorganismo de resistir los efectos de un antimicrobiano, es un problema de salud pública, esto debido en parte al uso indiscriminado de los antibióticos.

Por ello la resistencia bacteriana a los antibacterianos ha llevado al uso de extractos vegetales como una alternativa dada su alta eficacia, así como también supone un bajo costo en la producción y un bajo o nulo impacto ambiental.

Se proponen nuevas alternativas como la alelopatía, consistente en la utilización de metabolitos secundarios que pueden influir estimulando o inhibiendo diferentes procesos biológicos de otros organismos. El uso de estos metabolitos no solo debe centrarse a su utilidad en el ámbito clínico sino también para el desarrollo de nuevas propuestas como pueden ser pesticidas compatibles con el medio ambiente.

5. OBJETIVOS

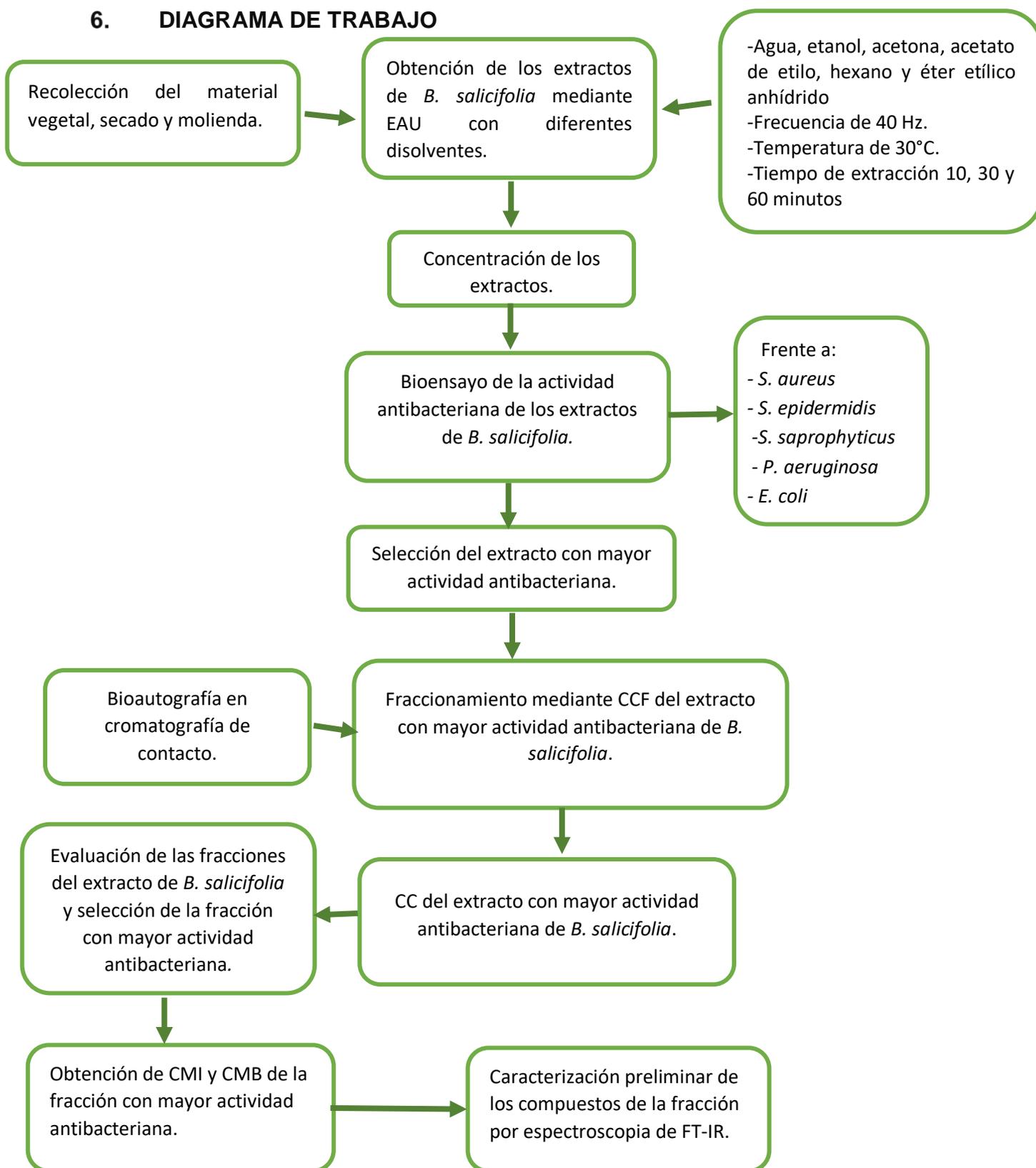
5.1 Objetivo general

Identificación fitoquímica y evaluación *in vitro* del extracto de *B. salicifolia* sobre bacterias de importancia clínica.

5.2 Objetivos particulares

- Obtener los extractos de *B. salicifolia* mediante la extracción asistida por ultrasonido (EAU) con diferentes disolventes (agua, etanol, acetona, acetato de etilo, cloroformo y éter de petróleo)
- Evaluar los extractos obtenidos frente a las bacterias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *P. aeruginosa* y *E. coli* mediante el método de difusión en agar por pozo.
- Realizar un ensayo biodirigido del extracto con mayor actividad antibacteriana por el método de bioautografía.
- Fraccionamiento mediante el método de capa fina y cromatografía en columna del extracto.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de la fracción del extracto mediante el método de microdilución en pozos.
- Caracterizar preliminarmente los compuestos de la fracción por espectroscopia de FT-IR.

6. DIAGRAMA DE TRABAJO



7. MATERIALES Y METODOS

7.1 Materiales

- Material de vidrio y reactivos de grado analítico esencial para cada determinación.
- Cepas bacterianas: *S. epidermidis*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario de Puebla BUAP.
- Material vegetal: *B. salicifolia* colectada en el Municipio de Tepetitla de Lardizábal Tlaxcala, CIBA- IPN.

7.2 Métodos

En la tabla 2 se muestran los métodos empleados y las determinaciones que se emplearon en esta investigación.

Tabla 2. Métodos utilizados en la investigación

| Determinación | Método | Referencia |
|---|--|---|
| Extracción | Extracción asistida por ultrasonido modificado | Auzola y Aguliar 2007 |
| Evaluación de la actividad antibacteriana | Difusión de agar en pozos | Rojas et al., 2005 |
| Separación del extracto mediante cromatografía | CCF Y CC | Pereira et al., 2013 Barrera y Bautista.2008 |
| Determinar y caracterizar los compuestos de la fracción | Espectroscopia FT-IR | Saavedra et al., 2010 |

8. METODOLOGÍA

8.1 Obtención del material vegetal

Se colectaron las partes aéreas (tallo, hoja y flor) de plantas de *B. salicifolia* del municipio de Tepetitla de Lardizábal Tlaxcala.

8.2 Secado y molienda

Se dejó secar el material vegetal en el sol durante cinco días, posteriormente se realizó un tratamiento de deshidratación para retirar el resto de la humedad con la ayuda de una estufa de secado a una temperatura de 40°C durante 4 h, una vez deshidratada se redujo el tamaño de partícula en un mortero de porcelana para tener una mejor superficie de contacto y llevarla al proceso de extracción.

8.3 Obtención de los extractos vegetales

La extracción asistida por ultrasonido se realizó con un equipo Branson 5510 con una frecuencia de 40 Hz, las extracciones fueron obtenidas con diferentes disolventes de distintas polaridades los cuales fueron agua, etanol, acetona, acetato de etilo, hexano y éter etílico anhídrido. Las muestras de material vegetal fueron colocadas con sus respectivos disolventes en una relación 1:10 en un matraz de 100 ml y se procedió a colocarlos en el equipo Branson, se realizaron 3 tiempos de extracción 10, 30 y 60 min a una temperatura de 30°C. Los extractos se filtraron y se concentraron en un rotavapor. Se almacenaron a 4°C en frascos ámbar.

8.4 Preparación de medios de cultivos y resiembra de las cepas.

Se utilizó agar Mueller-Hinton para el método de difusión en agar con pozos modificado. Se emplearon puntas cortadas para la generación de pozos en las placas de agar. Una vez gelificadas las placas se pusieron a prueba esterilidad incubándolas a 37°C por 18-24 h. Se preparó solución salina isotónica al 0.9% en tubos de 5 mL con tapón de rosca, los cuales se esterilizaron y posteriormente se utilizaron para la obtención de la suspensión bacteriana de cada una de las cepas. Las resiembras bacterianas se realizaron en agar TSA. Para los bioensayos se necesitaron resiembras de 24 h.

8.5 Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de *B. salicifolia* mediante el método de difusión en agar con pozos.

8.5.1 Obtención de la suspensión bacteriana

Se utilizaron resiembras de 24 h de cada una de las bacterias antes mencionadas en el punto 7.1 y se prepararon suspensiones a una densidad celular equivalente al tubo 0.5 del estándar de McFarland (1.5×10^8 células/mL).

8.5.2 Bioensayo de la actividad antibacteriana de los extractos de *B. salicifolia*.

La actividad antibacteriana se determinó utilizando el método de difusión en pozo. Para lo cual se preparó un inóculo de cada cepa a una concentración de 1.5×10^8 células/mL correspondiente al tubo 0.5 del estándar de McFarland. Se sembró masivamente en la placa de agar Mueller-Hinton y posteriormente se colocaron 20 µl de cada extracto a evaluar y un control negativo de inhibición (disolventes), como control positivo se utilizaron sensidiscos de vancomicina 30 µg para *S. aureus* y sensidiscos de imipenem® 10 µg para el resto de las bacterias a evaluar. Las placas fueron incubadas a 37°C de 18 a 24 h, los bioensayos se realizaron por triplicado, pasadas las 24 h se observaron y midieron los halos de inhibición con ayuda de un vernier, se tomó en cuenta el tamaño de halo de inhibición (en cm) de los antibióticos en comparación al halo (en cm) de los extractos de *B. salicifolia*.

8.6 Fraccionamiento fitoquímico del extracto con mayor actividad antibacteriana de *B. salicifolia*.

8.6.1 Cromatografía en capa fina (CCF) del extracto con mayor actividad antibacteriana de *B. salicifolia*.

Se realizó la separación por CCF al extracto con mayor inhibición. Se utilizaron cromatofolios CCF y una mezcla de disolventes (hexano, acetato de etilo, éter etílico anhidro y etanol) en una relación 2:1:1:2 respectivamente. Una vez realizada y que el frente de migración alcanzó el extremo superior de la placa se retiró y se procedió a revelar con luz UV y posteriormente con una solución de H₂SO₄ al 20%, con aplicación posterior de calor (Pereira, 2013) y se observó el número de fracciones que contiene.

Por último, se calculó el valor de R_f, que es el cociente entre la distancia recorrida por el compuesto y la distancia recorrida por el eluyente (Diaz, 2006).

8.6.2 Bioautografía en cromatografía de contacto

Se utilizaron cromatofolios de CCF previamente corridos con la muestra del extracto eluidos y sin restos de disolventes, los cuales se colocaron sobre una caja Petri y fue vertido medio de cultivo Mueller Hinton sobre el cromatofolio, una vez gelificado el medio, se colocó a prueba de esterilidad por 24 h. Posteriormente se inocularon las placas a una concentración de 0.5 del estándar de Mc Farland con las cepas bacterianas con crecimiento de 24 h. Pasadas las 24 h a 37°C de incubación se evaluaron por medio de la observación de la presencia (+) o ausencia (-) de halos de inhibición sobre los cromatofolios (Rivas-Morales et al., 2016). El ensayo se realizó por triplicado.

8.6.3 Cromatografía en columna (CC) del extracto con mayor actividad antibacteriana de *B. salicifolia*.

Se utilizó una columna de cromatografía con sílica gel en polvo (fase estacionaria), la cual fue acondicionada con el extracto a fraccionar y se realizó la elución mediante el empleo de una mezcla de disolventes seleccionados para el corrimiento del extracto (fase móvil) determinados de acuerdo con los resultados de la CCF antes mencionados en el punto 8.6, esto con la finalidad de arrastrar la mayor cantidad de metabolitos secundarios en el extracto (Barrera & Bautista, 2008). Las fracciones obtenidas fueron recolectadas de forma individual y guardadas en viales ámbar a 4°C.

8.7 Evaluación de la actividad antibacteriana de las fracciones mediante el método de difusión en pozo.

Las fracciones obtenidas fueron concentradas en rotavapor, una vez concentradas fueron evaluadas mediante el método de difusión en pozos antes mencionado en el punto 8.5, una vez evaluadas fueron descartadas las fracciones que no presentaron actividad antibacteriana y con la finalidad de obtener un porcentaje de inhibición del extracto crudo con mayor inhibición se recurrió a la fórmula empleada por Martínez en 1996, ecuación 1. Esto en la fracción con mayor inhibición.

$$\% \text{ efecto inhibitorio} = \frac{\text{media diámetro halo de inhibición}}{\text{media diámetro halo de inhibición control positivo}} \times 100$$

Ecuación 1. Porcentaje del efecto inhibitorio

8.8 Obtención de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) y la Concentración mínima bactericida (CMB)

Para esta determinación de la CMI y CMB se utilizaron 4 cepas (*S. aureus* ATCC 29213, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. saprophyticus* salvaje clínico y *S. aureus* salvaje clínico, se utilizó una microplaca con 96 pozos donde fueron manejadas 10 concentraciones diferentes de la fracción con mayor actividad antimicrobiana (10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156, 0.078, 0.039, 0.019 mg/mL), en cada pozo se colocaron 20 µL de la fracción, posteriormente se le añadieron 180 µL de agar Mueller-Hinton se mezcló y por último se le añadieron 2 µL de suspensión bacteriana a partir de un tubo al 0.5 del estándar de Mc Farland. Se colocó como control negativo de inhibición 20 µL (disolventes que se utilizaron en la CC) y como control positivo se colocaron 20 µL de una suspensión de antibiótico comercial (Vancomicina 30 µg). Se incubó por 20 h y en las primeras 20 h se sacó para leer la turbidez que presentó en la superficie del pozo, se observó un botón opaco. Posteriormente se les añadió a todos los pozos 20 µL de revelador MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) y se colocó nuevamente en la estufa por 10-15 min. Después de ese tiempo se observó un cambio de coloración de amarillo a violeta en la superficie de los pozos que presentaron crecimiento.

8.9 Espectroscopía de FT-IR: Determinación de los grupos funcionales.

La fracción que mostró la mayor inhibición del crecimiento bacteriano se llevó a la caracterización por FT-IR en un equipo Digilab de Agilent Technologies, modelo Scimitar, se utilizó una muestra sólida y seca de la fracción 29 de *B. salicifolia*. Se tomó una muestra y se colocó en el mortero con KBr, y se trituro hasta obtener una muestra homogénea, posteriormente se formó una pastilla y se colocó dentro del infrarrojo para su lectura,

Una vez obtenido el espectro se hizo la interpretación de mismo (Saavedra et al., 2010).

9. RESULTADOS Y DISCUSIONES

9.1 Evaluación antibacteriana de los extractos.

Los resultados de la evaluación antibacteriana de los extractos (con agua, etanol, acetona, acetato de etilo, hexano y éter etílico anhidrido), se observa en la tabla 3.

Los extractos acuosos no presentaron inhibición antibacteriana en ninguna cepa evaluada tanto Gram positiva como Gram negativa, con ello se demuestra que metabolitos de carácter polar son incapaces de inhibir el crecimiento bacteriano. Sin embargo, los extractos obtenidos con los disolventes etanol, acetona, acetato de etilo hexano y éter etílico anhidrido presentaron actividad antibacteriana solo en las bacterias Gram positivas, esto puede estar relacionado a que dichas bacterias poseen una capa externa de peptidoglicano y su pared celular. Mientras que los microorganismos Gram negativos poseen una delgada capa de peptidoglicano más una membrana externa de lipopolisacáridos. Esto determina que ambos microorganismos respondan en forma diferente a la presencia de moléculas como los antibióticos (Strohl et al., 2001). Así como también se ha demostrado que algunos flavonoides son capaces de tener un efecto antibacteriano donde demuestran que flavonoides tiene un efecto sobre bacterias Grampositivas (Tereschuk et al., 2007).

En los resultados con respecto al efecto del tiempo de extracción con EAU mostrados en la tabla 3, se puede observar que a mayor tiempo de EAU el efecto antibacteriano es mayor, esto se debe a que las ondas de ultrasonido causan la ruptura mecánica de la pared celular liberando los componentes bioactivos y a su vez el calentamiento local del solvente aumenta la difusión del extracto, mejorando así la transferencia de masa a través de la interfase sólido-liquido. Los efectos mecánicos de la sonicación inducen a una mayor disolución del solvente en las paredes y membranas celulares, facilitando la liberación del contenido de las células y mejorando la transferencia de masa (Medina et al., 2017).

Tabla 3. Efectos de inhibición antibacteriana de los diversos extractos de *B. Salicifolia*.

| Extractos <i>B. salicifolia</i> / Bacterias | <i>E. coli</i> | <i>P. Aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. saprophyticus</i> |
|--|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Extracto con agua (10 min) | - | - | - | - | - |
| Extracto con agua (30 min) | - | - | - | - | - |
| Extracto con agua (60 min) | - | - | - | - | - |
| Extracto con etanol (10 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con etanol (30 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con etanol (60 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con acetona (10 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con acetona (30 min) | - | - | ++ | + | + |
| Extracto con acetona (60 min) | - | - | +++ | ++ | ++ |
| Extracto con acetato de etilo (10 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con acetato de etilo (30 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con acetato de etilo (60 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con hexano de etilo (10 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con hexano (30 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con hexano (60 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con éter etílico anhídrido (10 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con éter etílico anhídrido (30 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con éter etílico anhídrido (60 min) | - | - | + | + | + |
| Control negativo | - | - | - | - | - |
| Control positivo | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |

Donde (-): Nula inhibición, (+): Poca inhibición, (++) : mediana inhibición, (+++): máxima inhibición, esto a partir del halo de inhibición que presento cada extracto.

Diversos autores han reportado que extractos obtenidos de las plantas del género *Baccharis* presentan actividad contra diversas bacterias Rodríguez *et al.*, 2016, demostró la actividad antibacteriana de los extractos de *B. revoluta* contra bacterias Gram positivas como *S. aureus* ATCC 25923, y Gram negativas como *E. coli* ATCC 13706 y *K. pneumoniae* ATCC 70063, demostrando que el género *Baccharis* tiene potencial antibacteriano con extractos obtenidos a partir de diclorometano, metanol y acetona, frente a *S. aureus* con una actividad antibacteriana relativa (ABR) con respecto a la rifaximina.

Estos resultados se correlacionan con los obtenidos en este trabajo y demostrados en la tabla 3 donde se muestra la actividad antibacteriana en el extracto obtenido con acetona. Otros estudios como los de Rangel *et al.*, 2001 demuestran que *B. nítida* tiene una actividad antibacteriana en extractos crudos a partir de etanol y acetona frente a cepas de *S. aureus*. Diversos estudios del género *Baccharis* han demostrado las distintas actividades biológicas que este género presenta tanto actividades antifúngicas como lo menciona Martínez *et al.*, 2010 donde demostró la actividad antifúngica de *B. latifolia* sobre fitopatógenos a partir de extractos polares, así como también García *et al.*, 2005, demostraron la capacidad toxica y repelente del aceite esencial de *B. salicifolia* sobre *Tribolium castaneum*.

Todos estos estudios han demostrado las diversas actividades biológicas que posee el género *Baccharis* los cuales se correlacionan con la actividad antimicrobiana demostrada en los extractos crudos obtenidos a partir de disolventes orgánicos y descritos en la tabla 3, siendo evidente la gran cantidad de metabolitos secundarios obtenidos a partir de los extractos.

El extracto con mayor actividad antibacteriana fue el obtenido a partir de acetona con 60 min de EAU, como se muestra en la figura 4 y tabla 4.

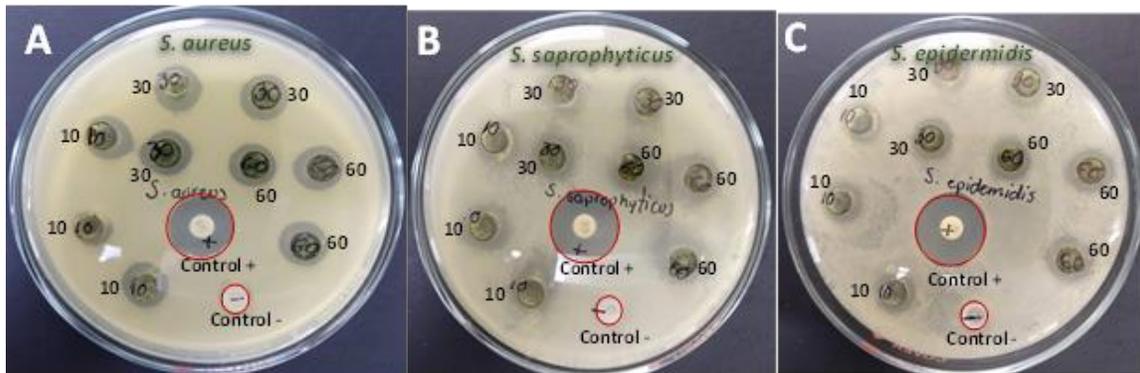


Figura 4. Actividad antibacteriana del extracto de *B. salicifolia* a partir de acetona a diferentes tiempos de EAU 10 min 30 min y 60 min, control (+) Vancomicina 30 µg y control (-) acetona. A) *S. aureus*, B) *S. epidermidis* C) *S. saprophyticus*.

En los bioensayos realizados para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos fueron implementados como controles negativos los disolventes utilizados para la extracción, esto con la finalidad de descartar falsos positivos de inhibición. De acuerdo con los resultados obtenidos se demuestra que los disolventes no interfieren en el crecimiento y desarrollo bacteriano.

Tabla 4. Inhibición del crecimiento bacteriano del extracto de *B. salicifolia* a diferentes tiempos de EAU sobre bacterias Gram positivas.

| Tiempo de extracción /Bacteria. | <i>S. aureus</i> (mm) | <i>S. epidermidis.</i> (mm) | <i>S. saprophyticus.</i> (mm) |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 10 min. | 11 | 10 | 12 |
| 30 min. | 12 | 11 | 12 |
| 60 min. | 13 | 12 | 13 |
| Control (-) | 0 | 0 | 0 |
| Control (+) | 16 | 20 | 20 |

Donde los valores en la tabla son los promedios de las mediciones de los halos de inhibición.

Control (+): Vancomicina 30 µg, Control (-): Acetona.

La tabla 4 evidencia el grado de inhibición obtenido con el extracto de acetona donde a mayor tiempo 60 min de EAU fue el que resultó con halos de inhibición mayor a los otros dos tiempos (10 min y 30 min) comparados. Esto se debe al tiempo de extracción donde la muestra vegetal está en contacto con el disolvente durante más tiempo, así como la cavitación provocada por el ultrasonido tiene un mayor número de repeticiones como se menciona en el punto 9.1

Tabla 5. Actividad antibacteriana (%) del extracto crudo a 60 minutos de EAU de *B. salicifolia* con mayor inhibición

| Cepa | Inhibición (%) |
|-------------------------|----------------|
| <i>S. aureus</i> | 81.25 |
| <i>S. epidermidis</i> | 60 |
| <i>S. saprophyticus</i> | 65 |

De acuerdo con estos resultados, se puede deducir que los metabolitos obtenidos de *B. salicifolia* con mayor actividad antibacteriana son de naturaleza polar, dentro de los cuales se han aislado del género *Baccharis* diferentes grupos de metabolitos secundarios como son flavonoides, terpenoides, diterpenos y cumarinas, así como también aceites esenciales como los son limoneno, δ -cadineno, mirceno, α -tujeno, α - y β -pineno, α -felandreno, limoneno, β -ocimeno, terpinen-4-ol (Prada, 2015).

Diversos autores han identificado una gran cantidad de metabolitos en *B. salicifolia*, algunos de ellos identificados son, flavanonas (apigenina, quercetina, sakuranetina) (Zdero *et al.*, 1986, del Corral *et al.*, 2012), diterpenos, incluidos 17 labdanos (Jakupovic *et al.*, 1990, del Corral *et al.*, 2012), clerodanos algunos de ellos con β -xilopiranosido y β -fucopiranosido (Zdero *et al.*, 1986, Jakupovic *et al.*, 1990, Loayza *et al.*, 1995), 15 flavonas (Domínguez *et al.*, 1986), algunos derivados de cadineno (cadinoles) (Zdero *et al.*, 1986, Jakupovic *et al.*, 1990, Loayza *et al.*, 1995), compuestos como (óxido de *baccharis*, benzofuranos, cumarinas) (Dominguez *et al.* 1986, Zdero *et al.*, 1986). y triterpenos (del Corral *et al.*, 2012), fitoesteroles (Domínguez *et al.*, 1986), monoterpenos (α -felandreno, α -terpineol, α -tujeno, canfeno) (Loayza *et al.*, 1995, García *et al.*, 2005, Carrizo Flores *et al.*, 2009, Sosa *et al.*, 2012),

(*cis- α -copaen-8-ol*, *biciclogermacreno*, *germacreno-D*) (Loayza et al., 1995, García et al., 2005, Carrizo Flores et al., 2009, Sosa et al. 2012), así como también varios flavonoides de *B. salicifolia*, como la quercetina, apigenina, naringenina (Céspedes et al., 2006). Además, de esta especie se han aislado los diterpenoides, los ácidos 5-hidroxi-6-hidro-salicifólico y salicifólico, junto con la sakuranetina, la apigenina y la escopoletina (del Corral et al., 2012).

9.2 Separación por cromatografía de capa fina.

Se eligió el extracto con mayor actividad antibacteriana, en este caso el extracto a base de acetona, al cual se le realizaron una serie de cromatografías en capa fina utilizando diferentes mezclas de disolventes, esto con la finalidad de obtener una mezcla ideal para poder separar los compuestos del extracto.

El revelado de la CCF por luz UV y con H₂S₄O al 20%, mostró que la cromatografía obtenida con la mezcla de disolventes (Acetato de etilo: Eter etílico anhidrido: Hexanos en relación 1:1:2) tuvo una mejor separación de los compuestos (figura 5). En las cuales se observan 11 fracciones con los R_f indicados en tabla 6.

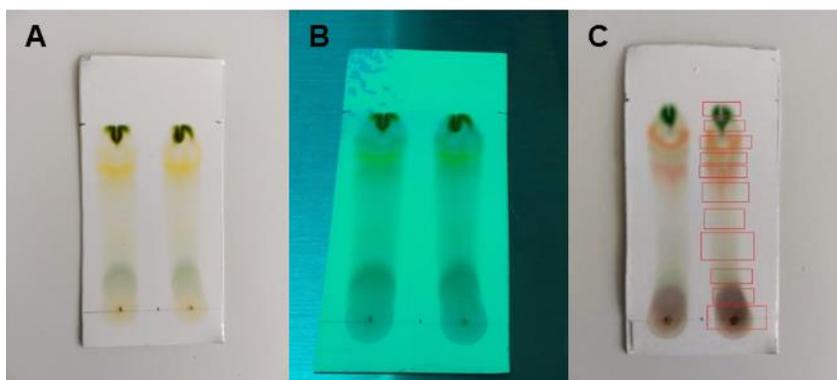


Figura 5. Cromatografía de capa fina del extracto crudo. A) cromatografía eluida, B) Cromatografía revelada mediante UV y C) Cromatografía revelada con ácido sulfúrico al 20% donde se pueden observar las 11 fracciones del extracto crudo.

Tabla 6. Fracciones orgánicas obtenidas en la CCF del extracto de acetona de *B. salicifolia*.

| Fracción | Rf |
|-----------------|-------------|
| 1 | 0.03 |
| 2 | 0.09 |
| 3 | 0.18 |
| 4 | 0.33 |
| 5 | 0.45 |
| 6 | 0.57 |
| 7 | 0.66 |
| 8 | 0.72 |
| 9 | 0.81 |
| 10 | 0.87 |
| 11 | 0.96 |

9.3 Bioautografía en cromatografía de contacto.

De acuerdo con Betina (1973) citada por Padrón-Márquez (2010), la bioautografía es el método más importante de detección para compuestos nuevos o no identificados; esta se basa en los efectos biológicos de las sustancias bajo estudio. La bioautografía típica está basada en la técnica de difusión en agar donde el compuesto antibacterial o antifúngico es transferido de la capa cromatográfica a una de agar inoculado. Las zonas de inhibición pueden ser visualizadas en la superficie de agar después del periodo de incubación, estas corresponden a la o las fracciones en las placas cromatográficas que dan la actividad antimicrobiana (Dewanjee, et al., 2015).

Se realizó la bioautografía en cromatografía de contacto del extracto crudo de *B. salicifolia* contra una cepa de *S. aureus* ATCC 29213 y se procedió a la evaluación antibacteriana obteniendo como resultado que las fracciones menos polares son las responsables de la actividad antibacteriana (figura 6).

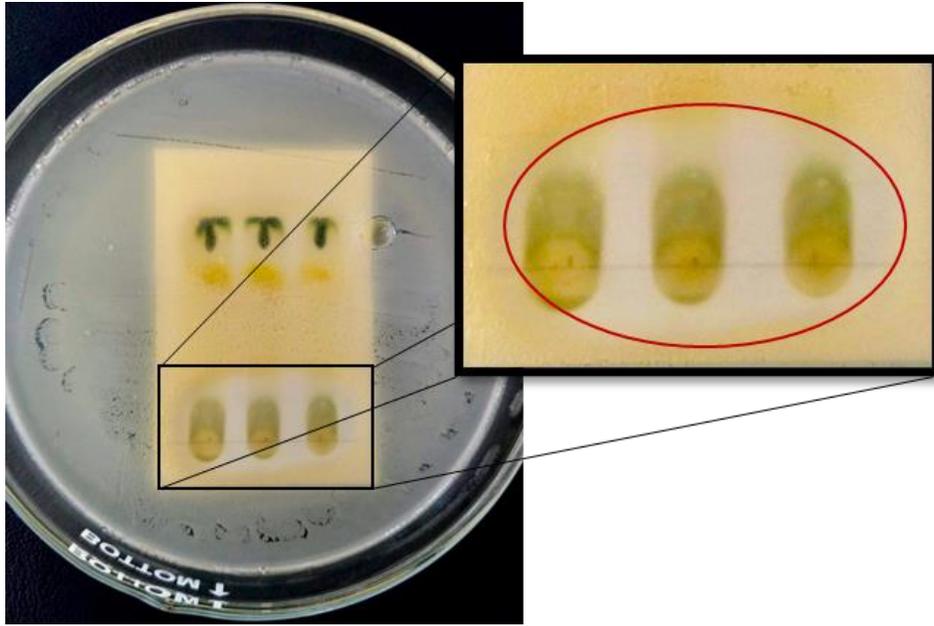


Figura 6. Bioautografía realizada a *S. aureus* (ATCC 29213)

9.4 Cromatografía de columna del extracto con mayor actividad antibacteriana de *B. salicifolia*.

Se obtuvieron 36 fracciones las cuales fueron recolectadas en tubos de ensaye de 10 mL, posteriormente fueron concentrados mediante un rotavapor y almacenados en frascos ámbar y en refrigeración a 4°C.

9.5 Evaluación de la actividad antibacteriana de las fracciones mediante el método de difusión en pozo.

Las 36 fracciones fueron evaluadas obteniendo como resultado que las fracciones de la 25 a la 30 obtuvieron los halos de inhibición de mayor tamaño contra *S. aureus* ATCC 29213, como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7. Actividad antibacteriana de las fracciones acetónicas frente *S. aureus* ATCC 29213.

| No. De fracción. | <i>Inhibición del crecimiento (mm)</i> |
|------------------|--|
| 25 | 28 |
| 26 | 33.3 |
| 27 | 27.6 |
| 28 | 28 |
| 29 | 40 |
| 30 | 29 |
| Control (+) | 19 |
| Control (-) | 0 |

Como observamos en la tabla 5, la fracción con mayor inhibición fue la número 29 con un promedio de un halo de inhibición de 40 mm que en comparación con el halo de inhibición del control positivo corresponde a un 210.5% de inhibición. (Tomando como referencia que el control positivo es el 100% de inhibición) (figura 7).



Figura 7. Efecto antibacterial de la fracción 29 frente *S. aureus* ATCC 29213 a las 24 h

9.6 Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida.

La concentración de la fracción # número 29 se obtuvo mediante la diferencia de pesos donde fue colocado un mililitro de la fracción en un papel aluminio y fue deshidratado

hasta eliminar el disolvente, obteniendo un resultado de 307.75 mg/mL. Posteriormente se prepararon diferentes diluciones con las siguientes concentraciones como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Concentraciones utilizadas para obtener la CMI y CMB de la fracción número 29 del extracto de *B. salicifolia*.

| Dilución | Concentración mg/mL |
|-----------------|--------------------------------|
| 1 | 10 |
| 2 | 5 |
| 3 | 2.5 |
| 4 | 1.25 |
| 5 | 0.625 |
| 6 | 0.312 |
| 7 | 0.156 |
| 8 | 0.078 |
| 9 | 0.039 |
| 10 | 0.019 |

La tabla 9 muestra los resultados obtenidos de la CMI, donde se encontró que para *S. aureus* ATCC 29213 la CMI es de 0.312 mg/mL, para *S. epidermidis* ATCC 12228 de 0.625 mg/mL, para *S. saprophyticus* (silvestre) de 1.25 mg/mL y para *S. aureus* (silvestre) de 0.156 mg/mL. Diversos estudios han demostrado que el género *Baccharis* posee una gran variedad de metabolitos con actividad biológica, tal como Navarro *et al.*, 2019, demostraron que *B. latifolia* presenta una CMI de 62.5 µg/mL contra *S. aureus* ATCC 25923 y *S. epidermidis* ATCC 12228 esto en el extracto hidroalcohólico de *B. latifolia*.

Tabla 9. Resultados de la concentración mínima inhibitoria, donde (+) significa inhibición del crecimiento bacteriano y (-) crecimiento bacteriano.

| Dilución | Concentración mg/mL | <i>S. aureus</i> ATCC 29223 | <i>S. epidermidis</i> ATCC 12228 | <i>S. saprophyticus</i> (silvestre) | <i>S. aureus</i> (silvestre) |
|----------|------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--|---------------------------------|
| 1 | 10 | + | + | + | + |
| 2 | 5 | + | + | + | + |
| 3 | 2.5 | + | + | + | + |
| 4 | 1.25 | + | + | + | + |
| 5 | 0.625 | + | + | - | + |
| 6 | 0.312 | + | - | - | + |
| 7 | 0.156 | - | - | - | + |
| 8 | 0.078 | - | - | - | - |
| 9 | 0.039 | - | - | - | - |
| 10 | 0.019 | - | - | - | - |
| | Control (+) | + | + | + | + |
| | Control (-) | - | - | - | - |

Donde (+) significa inhibición del crecimiento bacteriano y (-) crecimiento bacteriano.

En la figura 8 se puede observar el vire del MTT. El MTT originalmente es un reactivo de color amarillo, este al reaccionar con la viabilidad de la célula bacteriana se reduce produciendo una coloración violeta, indicando el crecimiento bacteriano. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de cristal reducido (formazán) (Garfias *et al.*, 2000).

La CMI demuestra la capacidad del antimicrobiano para inhibir el crecimiento de las bacterias a diferencia de la CMB que nos demuestra la capacidad mínima del antimicrobiano capaz de matar un 99.9 % de la población bacteriana inicial, en este caso las CMI y CMB fueron las mismas concentraciones.

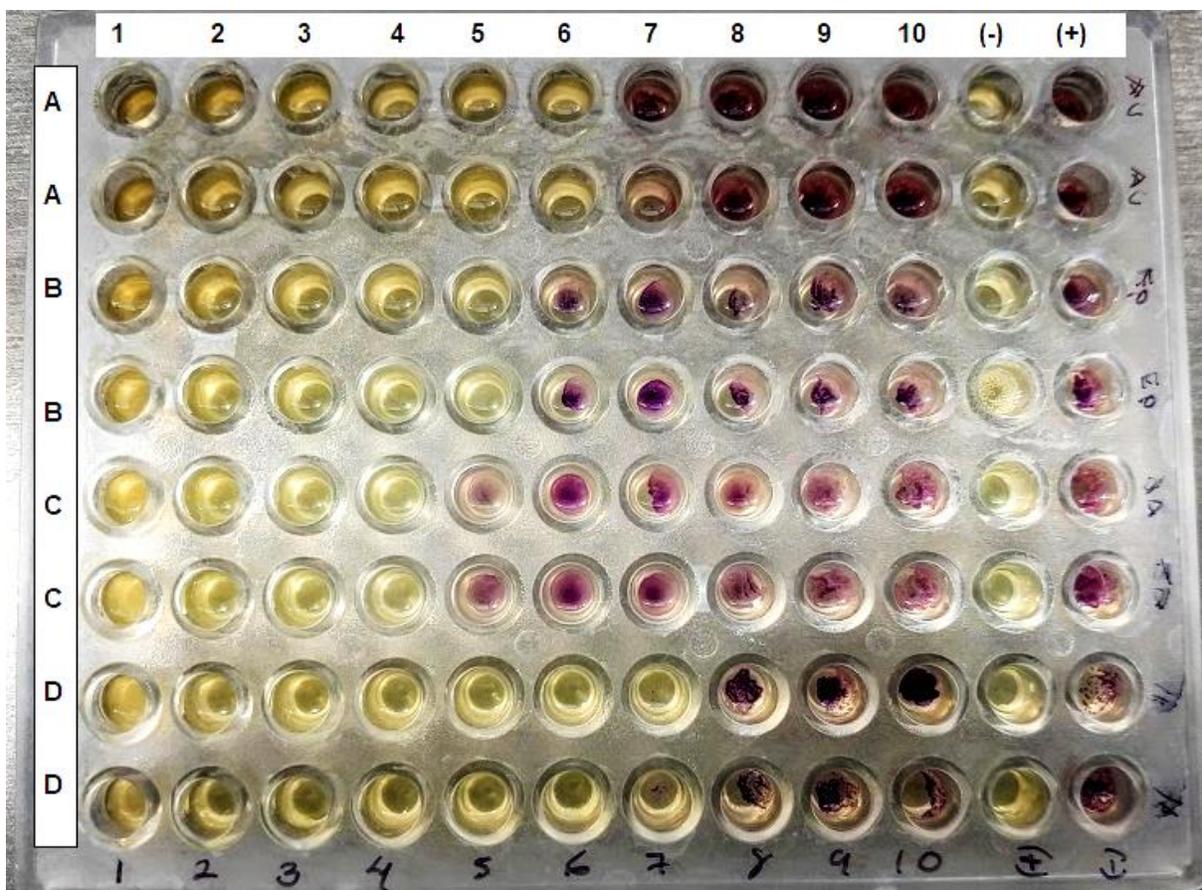


Figura 8. Revelado de la concentración mínima inhibitoria de la fracción #29 del extracto de *B. salicifolia*, donde las diluciones están numeradas del 1 al 10 y as bacterias corresponden; A) *S. aureus* ATCC 29223, B) *S. epidermidis* ATCC 12228, C) *S. saprophyticus* (silvestre) y D) *S. aureus* (silvestre).

Como se puede observar en los resultados obtenidos, la fracción # número 29 de *B. salicifolia* demuestra la presencia de metabolitos secundarios con actividad biológica sobre bacterias del género *Staphylococcus*, diversos estudios han demostrado que el género *Baccharis* contiene un gran número de metabolitos secundarios con diferentes actividades biológicas como la capacidad antibacteriana, antifúngica y repelente, como lo reporta Ferronato *et al.*, 2007 donde demuestran que aceites esenciales de *B. uncinella* y *B. dracunculifolia* poseen actividad antibacteriana contra cepas de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Martínez *et al.*, 2011; demostraron el efecto antifúngico de extractos de *B. latifolia* sobre *Candida albicans*. Por otro lado, García *et al.*, 2005, demostraron la capacidad toxica y repelente del aceite esencial de *B. salicifolia* sobre

Tribolium castaneum. Dichos efectos son propiciados por los metabolitos secundarios, dentro de los cuales podemos encontrar antioxidantes con actividad antibacteriana como lo son algunos flavonoides (Zampini *et al.*, 2007).

Otros estudios han revelado que el extracto de propóleo son ricos en flavonas como lo es la apigenina, tiene una acción antibacteriana sobre *Streptococcus mutans* (Eguizábal *et al.*, 2013), por otra parte, estudios han demostrado que la quercetina tiene una actividad antibacteriana sobre *S. aureus* con una CMI de 256 µg/mL (Storani *et al.*, 2019), por mencionar también que los extractos de *Eugenia churutensis* tienen actividad antibacteriana sobre *Enterococcus faecalis* y *S. aureus*, demostrando que dicho extracto es mayormente rico en cadinol (Sornoza *et al.*, 2018), dichos estudios se pueden correlacionar con los diferentes compuestos que han sido aislados de *B. salicifolia* así como la actividad antibacteriana que este trabajo demostró.

9.7 Espectroscopía de FT-IR: Determinación estructural de la fracción 29 de *B. salicifolia*.

Los flavonoides junto con los diterpenos son los compuestos que más frecuentemente se encuentran presentes en el género *Baccharis*. En el presente trabajo en una primera etapa de la caracterización de la fracción 29 el extracto de acetona obtenidos a partir de la planta *B. Salicifolia*, se empleó espectroscopia infrarroja que nos muestra la información de los diferentes grupos funcionales presentes. La figura 9 muestra el espectro FT-IR de la fracción 29-2 en donde se observa una gran banda de estiramiento de los grupos OH de alcoholes en $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$ que, acoplada a la banda de estiramiento de los grupos C-H en aproximadamente 2900 cm^{-1} , confirma la presencia de una gran cantidad de grupos OH unidos a enlaces C-H como los que se han reportado estar presentes en los flavonoides. Además, se espera que esta banda sea ancha cuando existen interacciones intermoleculares de enlace de hidrógeno, lo cual es de esperarse en estructuras químicas del tipo flavonoide. En aproximadamente 1640 cm^{-1} se observa una banda que puede asociarse a la vibración de estiramiento de los enlaces C=C con hibridación sp^2 de los anillos aromáticos. En la región entre

~980 y 1400 cm^{-1} se encuentran las frecuencias de balanceo de los enlaces C-H con hibridación sp^3 , probablemente superponiéndose a las frecuencias derivadas de los enlaces C-H con hibridación sp^2 .

Las bandas observadas en aproximadamente 1050 cm^{-1} y 1080 pueden asociarse a la vibración de estiramiento C-O (oxígeno de un alcohol primario) y a un éter alifático cíclico respectivamente.

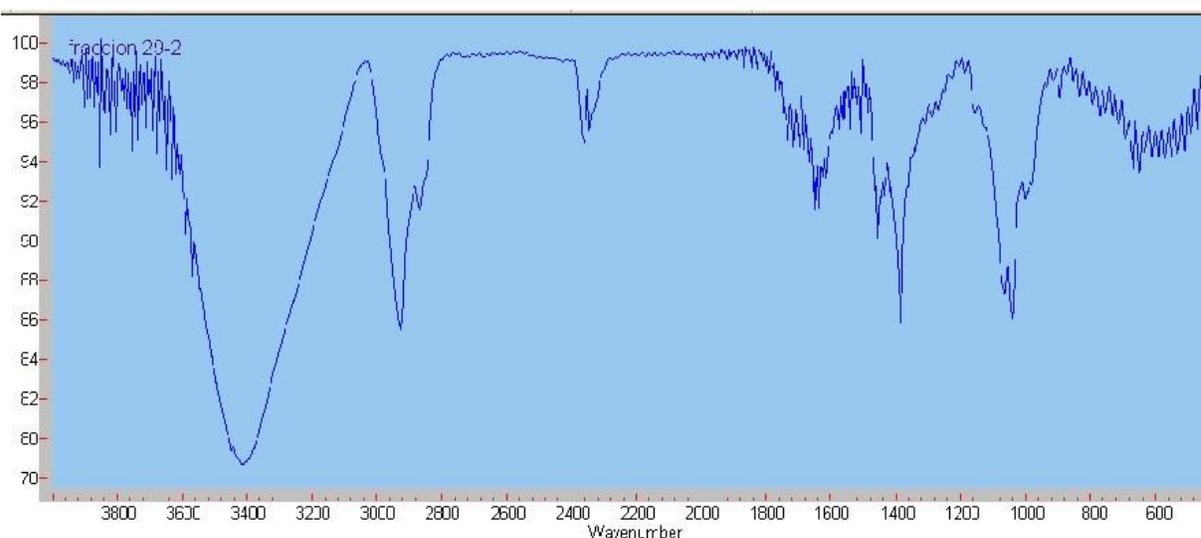


Figura 9. Espectro FT-IR de la fracción 29-2 de *B. salicifolia*.

Estudios como los de Retnasamy *et al.*, 2016 muestran que el 3410.24 cm^{-1} indicado para grupos (-OH) correspondientes a fenoles, los cuales se correlacionan con los resultados obtenidos en el gráfico del FT-IR correspondiente a la fracción 29.

10. CONCLUSIÓN

- Los extractos obtenidos a partir de etanol, acetona, acetato de etilo y éter etílico anhidrido presentaron actividad antibacteriana contra el género *Staphylococcus* con lo que se demuestra que *B. salicifolia* es una fuente abundante de metabolitos de carácter poco polares, medianamente polares y no polares.
- Los metabolitos con mayor actividad antibacteriana son de carácter no polar, esto se revelo con ayuda de la cromatografía de capa fina donde la actividad antibacteriana se encuentra en la parte inferior de la placa de cromatografía.
- La fracción 29 del extracto de acetona fue la que presento mayor actividad con un 210.5% más eficaz en comparación con el antibiótico vancomicina.
- Se demostró que la CMI para *S. aureus* ATCC 29213 la CMI es de 0.312 mg/mL, *S. epidermidis* ATCC 12228 la CMI es de 0.625 mg/mL, *S. saprophyticus* (silvestre) la CMI es de 1.25 mg/mL y *S. aureus* (silvestre) la CMI es de 0.156 mg/mL.
- La determinación de los grupos funcionales de la fracción 29 de *B. salicifolia* por FT-IR mostro que contiene grupos O-H que podrían ser característicos de los flavonoides.

11. RECOMENDACIONES

- Realizar purificación de la fracción 29.
- Realizar cromatografía de gases para su caracterización.
- Caracterizar los metabolitos secundarios encargados de la actividad antibacteriana.
- Evaluar la actividad antibacteriana de el o los metabolitos identificados.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Ávalos, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal, 2(3), 119-145
- Azuola, R., & Vargas-Aguilar, P. (2007). Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Revista Tecnología en marcha*, 20(4).
- Badajoz, E. (2011). Variación Del Metabolismo Secundario En Plantas Debida Al Genotipo Y Al Ambiente.
- Barba, B., Gonzalez. M. (2015) ¿Qué sabemos de los beneficios de las plantas mexicanas?
- Benito Navarro, A., & De la Cruz Tito, F. (2019). Actividad antioxidante y antimicrobiana in vitro de los extractos de *Schkuhria pinnata* y *Baccharis latifolia*.
- Bhalla, R., Narasimhan, K., & Swarup, S. (2005). Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. *Plant cell reports*, 24(10), 562-571.
- Blanco, Y. (2006). La utilización de la alelopatía y sus efectos en diferentes cultivos agrícolas. *Cultivos tropicales*, 27(3), 5-16.
- Cabrera, Cristina Eugenia, Rommel Fabián Gómez, and Andrés Edmundo Zúñiga. "La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación." *Colombia médica* 38.2 (2007).
- Cárdenas Tello, C. (2014). Plantas alelopáticas.
- Casellas, J. M. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 30(6), 519-528.
- Del Corral, S., Cuffini, S. L., Cardoso, S. G., Bortoluzzid, A. J., & Palacios, S. M. (2012). Phytotoxic halimanes isolated from *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pad.) Pers. *Phytochem Lett* 5: 280–283.

- Dominguez, X. A., El Dahmi, S., & Rombold, C. (1986). Hydroxyacetophenone derivatives from *Baccharis glutinosa*. *Journal of Natural Products*, 49(1), 143-144.
- Eguizábal, M., & Moromi Nakata, H. (2013). Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*.
- Escobar Falconí, V. E. (2015). Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata por espectroscopia de infrarrojos (FT-IR), UV-Vis, absorción atómica de llama (FAAS) y microscopía de barrido electrónico (SEM) (Bachelor's thesis, PUCE).
- Fariña, N., Sanabria, R., Figueredo, L., Ramos, L., & Samudio, M. (2005). *Staphylococcus saprophyticus* como patógeno urinario. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 3(1).
- Ferronato, R., Marchesan, E. D., Pezenti, E., Bednarski, F., & Onofre, S. B. (2007). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC e *Baccharis uncinella* DC (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17, 224-230.
- García Mateos, R., & Pérez Leal, R. (2003). Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 9(1).
- García, M., Donadel, O. J., Ardanaz, C. E., Tonn, C. E., & Sosa, M. E. (2005). Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 61(6), 612-618.
- García, M., Donadel, O. J., Ardanaz, C. E., Tonn, C. E., & Sosa, M. E. (2005). Toxic and repellent effects of *Baccharis salicifolia* essential oil on *Tribolium castaneum*. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 61(6), 612-618.
- Horna Quintana, Gertrudis, Silva Díaz, María, Vicente Taboada, William, & Tamariz Ortiz, Jesús. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto

Nacional de Enfermedades Neoplásicas. Revista Médica Herediana, 16(1), 39-45. Recuperado en 26 de marzo de 2022, de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2005000100007&lng=es&tlng=es.

Jacoby, G. A., & Archer, G. L. (1991). New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *New England Journal of Medicine*, 324(9), 601-612.

Jakupovic, J., Schuster, A., Ganzer, U., Bohlmann, F., & Boldt, P. E. (1990). Sesqui- and diterpenes from *Baccharis* species. *Phytochemistry*, 29(7), 2217-2222.

Juan-Ignacio Alós, Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global.

Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1222-1239.

Loayza, I., Salatino, E. W., Teixeira, G., & Negri, J. (1995). The *Baccharis* genus. *Phytochemistry*, 38, 381-386.

Martínez, E. M. G., Segovia, I. F., & López, A. F. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Martínez, S., Terrazas, E., Alvarez, T., Mamani, O., Vila, J., & Mollinedo, P. (2010). Actividad antifúngica in vitro de extractos polares de plantas del género *Baccharis* sobre fitopatógenos. *Revista Boliviana de Química*, 27(1), 13-18.

Martínez¹, S., Mollinedo¹, P., Almanza, G., & Terrazas, E. (2011). Estudio in vitro de la actividad antifúngica de extractos vegetales del género *Baccharis* sobre *Candida albicans*. *Revista Boliviana de Química*, 28(1), 35-40.

Medina-Torres, N., Ayora-Talavera, T., Espinosa-Andrews, H., Sánchez-Contreras, A., & Pacheco, N. (2017). Ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from vegetable sources. *Agronomy*, 7(3), 47.

Miranda Cabrera, C. M. (2022). Determinación de la actividad Antioxidante y Composición Química de *Baccharis Latifolia* (Chilca) Planta Ancestral de Pantaño-Ecuador (Master's thesis).

- Miranda-Arámula, M., Reyes-Chilpa, R., & Anaya L, A. L. (2021). Phytotoxic activity of aqueous extracts of ruderal plants and its potential application to tomato crop. *Botanical Sciences*, 99(3), 487-498.
- Naivy. A., Jimenz. E. (2011) Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro.
- Núñez. E. (2007). Extracciones con equipo soxhlet.
- Olaechea, P. M., Insausti, J., Blanco, A., & Luque, P. (2010). Epidemiología e impacto de las infecciones nosocomiales. *Medicina intensiva*, 34(4), 256-267.
- Prada Muñoz, J. K. (2015) Análisis metabolómico de la especie *Baccharis latifolia* (Asteraceae) en la sabana de Bogotá.
- Rangel, D., Garcia, I., Velasco, J., Buitrago, D., & Velazco, E. (2001). Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nitida* (Ruiz et Pavon) Pers. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 42(2), 43-46.
- Rodríguez, Ó. E., Roa, V. P., & Palacios, É. A. (2016). Actividad antibacteriana y antioxidante de *Baccharis revoluta* Kunth. *Nova*, 14(25), 57-65.
- Sajc, L., Grubisic, D., & Vunjak-Novakovic, G. (2000). Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal*, 4(2), 89-99.
- Salazar Cuba, Viviana. (2012). Infecciones intrahospitalarias. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 51(3), 187-190. Recuperado en 27 de abril de 2022, de http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-06752012000300006&lng=es&tlng=es.
- Salazar, W., Cárdenas, J., Núñez, M., Fernández, I., Villegas, L., Pacheco, L., & Untiveros, G. (2007). Estudio fitoquímico y de la actividad antihelmíntica de los extractos de *Euphorbia huanchahana* y *Baccharis salicifolia*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73(3), 150-157.
- Sornoza Cabrera, G. M., & Morales Pérez, Y. J. (2018). Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Eugenia churutensis*

- X. cornejo (Bachelor's thesis, Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Químicas).
- Storani, G., Diaz David, D. C., Fernández, H. R., & Picco, E. J. (2019). Evaluación de la actividad antibacteriana de quercetina frente a cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas a partir de casos de mastitis bovina.
- Strohl, W. A., Rouse, H., & Fisher, B. D. (2001). Lippincott's illustrated Reviews. Microbiology. p22-23, 26-27.
- Tereschuk, M. L., Quarenghi, M. V., González, M., & Baigorí, M. D. (2007). Actividad antimicrobiana de flavonoides aislados de *Tagetes del Noa*. Boletín latinoamericano y del caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 6(6), 364-366.
- Verdi, L. G., Brighente, I. M. C., & Pizzolatti, M. G. (2005). Género *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, económicos e biológicos. Química Nova, 28(1), 85-94.
- Vivot, E. P., Sánchez, C., Cacik, F., & Sequin, C. (2012). Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). Ciencia, docencia y tecnología, (45), 131-146.
- Volfredo, J., & Camacho, A. (2010). Los antimicrobianos en la práctica médica. Medicina Intensiva, 272.
- Zampini, I. C., Vera, N. R., Bardón, A. D. V., & Isla, M. I. (2007). Flavonoides bioactivos (antioxidantes y antimicrobianos) aislados de *Baccharis incarum*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 6(5), 292.
- Zdero, C., Bohlmann, F., King, R. M., & Robinson, H. (1986). Diterpene glycosides and other constituents from Argentinian *Baccharis species*. Phytochemistry, 25(12), 2841-2855.

13. ANEXOS

Tabla 3. Efectos de inhibición antibacteriana de los diversos extractos de *B. salicifolia*

| Extractos <i>B. salicifolia</i> / Bacterias | <i>E. coli</i> | <i>Ps. aeruginosa</i> | <i>S. aureus</i> | <i>S. epidermidis</i> | <i>S. saprophyticus</i> |
|--|----------------|-----------------------|------------------|-----------------------|-------------------------|
| Extracto con agua (10 min) | - | - | - | - | - |
| Extracto con agua (30 min) | - | - | - | - | - |
| Extracto con agua (60 min) | - | - | - | - | - |
| Extracto con etanol (10 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con etanol (30 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con etanol (60 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con acetona (10 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con acetona (30 min) | - | - | ++ | + | + |
| Extracto con acetona (60 min) | - | - | +++ | ++ | ++ |
| Extracto con acetato de etilo (10 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con acetato de etilo (30 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con acetato de etilo (60 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con hexano de etilo (10 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con hexano (30 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con hexano (60 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con éter etílico anhídrido (10 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con éter etílico anhídrido (30 min) | - | - | + | + | + |
| Extracto con éter etílico anhídrido (60 min) | - | - | + | + | + |
| Control negativo | - | - | - | - | - |
| Control positivo | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |

Donde (-): Nula inhibición, (+): Poca inhibición, (++) : mediana inhibición, (+++) : máxima inhibición

