



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO  
METANÓLICO DE LOS TALLOS DE VERBENA LITORALIS KUNTH

GUAMAN ORDOÑEZ JUDDY ANABEL  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA  
2019



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL  
EXTRACTO METANÓLICO DE LOS TALLOS DE VERBENA  
LITORALIS KUNTH

GUAMAN ORDOÑEZ JUDDY ANABEL  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA  
2019



# UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TRABAJO TITULACIÓN  
TRABAJO EXPERIMENTAL

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO  
METANÓLICO DE LOS TALLOS DE VERBENA LITORALIS KUNTH

GUAMAN ORDOÑEZ JUDDY ANABEL  
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

SILVERIO CALDERON CARMEN ELIZABETH

MACHALA, 19 DE SEPTIEMBRE DE 2019

MACHALA  
2019

**Nota de aceptación:**

Quienes suscriben, en nuestra condición de evaluadores del trabajo de titulación denominado EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LOS TALLOS DE VERBENA LITORALIS KUNTH, hacemos constar que luego de haber revisado el manuscrito del precitado trabajo, consideramos que reúne las condiciones académicas para continuar con la fase de evaluación correspondiente.



---

SILVERIO CALDERON CARMEN ELIZABETH  
0702531351  
TUTOR - ESPECIALISTA 1



---

ALVARADO CACERES JESSICA VANESSA  
0703240978  
ESPECIALISTA 2



---

GARCÍA GONZÁLEZ CARLOS ALBERTO  
1711388684  
ESPECIALISTA 3

Machala, 19 de septiembre de 2019

# Verbena

---

## INFORME DE ORIGINALIDAD

---

0%

INDICE DE SIMILITUD

0%

FUENTES DE  
INTERNET

0%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL  
ESTUDIANTE

---

## FUENTES PRIMARIAS

---

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

< 20 words

Excluir bibliografía

Apagado

## CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

La que suscribe, GUAMAN ORDOÑEZ JUDDY ANABEL, en calidad de autora del siguiente trabajo escrito titulado EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LOS TALLOS DE VERBENA LITORALIS KUNTH, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.

La autora declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

La autora como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 19 de septiembre de 2019



GUAMAN ORDOÑEZ JUDDY ANABEL  
0750187015

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo está dedicado a Dios por darme fuerza y valentía en cada una de las adversidades que se me han presentado en el transcurso de mi vida estudiantil.

A mis padres quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy una meta más en mi vida.

A mi pequeño hijo Isaías por ser mi motivación más grande para culminar con éxito éste trabajo de titulación.

A mis hermanos Luis, Lucas y Leandro por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso.

A mis abuelitos Luis y Melania quienes con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

*Juddy Guamán O.*

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a mi Tutora Dra. Carmen Silverio, quien me ha brindado su tiempo y dedicación durante el desarrollo de mi tesis, muchas gracias por sus sugerencias.

A el Dr. Segundo García Ledesma, docente encargado del laboratorio de Bromatología, por facilitarme el espacio y material necesario para el desarrollo de la parte experimental.

A la Dra. Mercedes Campo PhD, docente encargada del laboratorio de investigación, por brindarme sus conocimientos en la rama de fitoquímica.

A el Dr. Osmany Cuesta PhD, por guiarme en la parte práctica de Cromatografía en Capa Fina.

A el Laboratorio privado BIOMEDILAB, Dra. Ruth Castillo propietaria del mismo y de manera muy especial al Dr. Lenin Torres, por guiarme en la parte microbiológica y ayudarme en todo lo que necesitaba para el desarrollo y culminación de mi trabajo.

A mi queridos y estimados amigos Karla, Jonathan, Estefanía, Kerly y Mishel quienes estuvieron conmigo siempre en el largo y duro proceso como estudiante.

Andreita Armijos y toda su familia por brindarme su apoyo en este proceso de titulación.



## RESUMEN

*Verbena litoralis kunth* es una planta herbácea perenne, distribuida ampliamente por las regiones de América Latina, Asia y África se usa en la medicina tradicional para el tratamiento de paludismo, fiebre, amigdalitis, infección de vías urinarias, desintoxicar el hígado y riñones, antiparasitario. Los estudios realizados por anteriores autores como Rachel de Lima y Silverio Calderón, destacan los componentes que posee la planta en sus partes aéreas, pero aún no se ha realizado un estudio más a fondo sobre qué metabolitos están presentes en los tallos de *Verbena litoralis kunth*. La Organización Mundial de la Salud expresó que *Staphylococcus aureus* es un microorganismo que actualmente presenta una elevada resistencia bacteriana, esto ha generado que se busquen nuevas alternativas para la creación de nuevos antibióticos, es por ello que la utilización de recursos naturales para investigación científica y con fines medicinales es sumamente importante porque de esa manera estamos aportando información científica y que puede ayudar a generar nuevos productos farmacéuticos. El presente trabajo de investigación tiene como objetivo evaluar la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico del tallo de *Verbena litoralis K*, en el cantón Santa Rosa de la provincia de El Oro. Se recolectaron y se clasificaron los tallos que se encontraban en buenas condiciones y que no presentaban signos de deterioro o contaminación, se lavaron con agua potable y destilada, luego fueron secados al ambiente por 72 horas, y 48 horas más en una estufa a 45°C para evitar que queden restos de humedad, posteriormente se trituraron en un molino artesanal hasta obtener un polvo fino, todo este manejo del material vegetal se realizó mediante las directrices de la OMS, sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección para plantas medicinales. Se realizaron análisis de calidad de humedad, cenizas totales, cenizas solubles e insolubles en ácido clorhídrico y para la obtención del extracto se utilizó 20 g de la droga pulverizada en 100 ml de metanol 99% de pureza mediante el método de maceración y ultrasonido para luego proceder a realizar el tamizaje fitoquímico. El control de calidad físico químico de la droga cruda fue realizado mediante el método gravimétrico y cenizas totales, los resultados se encuentran dentro de los valores establecidos por la farmacopea española 2002, también se identificó las características organolépticas del extracto para verificar que no exista ninguna alteración. El estudio cualitativo para identificar los metabolitos

secundarios presentes en *V. litoralis Kunth* se llevó a cabo mediante tamizaje fitoquímico en el cual se encontraron varios tipos de componentes como fenoles, glucósidos, alcaloides, terpenos, saponinas, flavonoides que también fueron detectados por cromatografía en capa fina utilizando solventes de alta polaridad y reveladores específicos. Se determinó la actividad antibacteriana del extracto metanólico de los tallos de *Verbena litoralis Kunth* mediante el método modificado de pozos en agar utilizando diferentes concentraciones (200 mg/mL, 400 mg/mL, 600 mg/mL, 800 mg/mL) comprobándose la susceptibilidad a *Staphylococcus aureus*. La cantidad mínima inhibitoria de extracto concentrado que nos permitió evidenciar el primer halo de inhibición fue 400mg/mL y 200mg/mL *Staphylococcus aureus* resultó resistente, no presentó halo de inhibición.

**Palabras claves:** *Staphylococcus aureus*, tamizaje fitoquímico, actividad antibacteriana, CCF, *Verbena litoralis Kunth*.

## ABSTRACT

*Verbena litoralis kunth* is a perennial herb plant widely distributed throughout the regions of Latin America, Asia, and Africa, it is used in traditional medicine to treat malaria, fever, tonsillitis, urinary tract infection, antiparasitic, detoxify the liver and kidneys. Authors such as de Lima (2013) and Silverio (2016) have conducted previous studies, including the components that the plant has in its aerial parts. However, no further studies have been conducted on what metabolites are present in the stems of *Verbena litoralis kunth*. The World Health Organization mentions that *Staphylococcus aureus* is a microorganism that currently has a high bacterial resistance which has led to the search for new alternatives for the creation of new antibiotics, that is why the use of natural resources for scientific research and medicinal purposes is very important because of we are providing scientific information which can help generate new pharmaceutical products. This research aims to evaluate the antibacterial activity of secondary metabolites present in the methanolic extract of the stem of *Verbena litoralis K*, in the canton of Santa Rosa of the province of El Oro. The stems that were in good condition and that did not show signs of deterioration or contamination were collected, classified, washed with drinking water and distilled. Then, they were dried in the environment for three days, and for two more days in a 45° stove C to avoid remaining moisture. Subsequently, they were ground in a craft mill until a fine powder was obtained, the management of plant material was carried out with the WHO guidelines on good agricultural and harvesting practices for medicinal plants. Moisture quality analyzes were performed, total ashes, soluble and insoluble ashes in hydrochloric acid and to obtain the extract, 20g of the drug sprayed in 100 ml of 99% pure methanol was used through the method of maceration and ultrasound and then proceed to perform phytochemical screening. The chemical-physical quality control of the crude drug was carried out using the gravimetric method and total ashes. The results obtained are within the values established by the Spanish Pharmacopoeia 2002 and the organoleptic characteristics of the extract were identified to verify that there is no alteration. The qualitative study to identify the secondary metabolites present in *V. litoralis* Kunth was carried out by phytochemical screening in which several types of components such as phenols, glycosides, alkaloids, terpenes, saponins, and

flavonoids were found which were also detected by thin-layer chromatography using high polarity solvents and specific developers. From the methanolic extract of the stems of *Verbena litoralis* Kunth, the antibacterial activity was determined by the modified method of agar wells using different concentrations (200 mg/mL, 400 mg/mL, 600 mg/mL, 800 mg/mL), which confirmed the susceptibility of *Staphylococcus aureus*. The minimum inhibitory amount of concentrated extract of 400 mg/mL allowed us to show the first halo of inhibition and in the concentration of 200 mg/mL *Staphylococcus aureus* was resistant, there was no inhibition halo.

**Keywords:** *Staphylococcus aureus*, phytochemical screening, antibacterial activity, thin layer chromatography, *Verbena litoralis* Kunth.

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>14</b>
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
OBJETIVO GENERAL.	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	17
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>18</b>
<b>VARIABLES</b>	<b>18</b>
Variable independiente	18
Variable dependiente	18
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>18</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	<b>18</b>
1.1 Verbena litoralis Kunth	18
1.1.1. Generalidades.	19
1.1.2. Taxonomía.	19
1.1.3. Descripción botánica.	20
1.1.4. Origen y distribución.	20
1.1.5. Datos ambientales.	20
1.1.6. Usos y propiedades.	20
1.1.7. Composición química.	21
1.2. Fitoquímica	21
1.3. Metabolitos secundarios	22
1.4. Metabolitos secundarios presentes en Verbena litoralis K con acción antibacteriana	22
1.5. Staphylococcus aureus	23
1.5.1. Generalidades.	23
1.5.2. Viabilidad y propagación.	24
1.5.3. Mecanismo de transmisión.	24
1.5.4. Acción patógena de S. aureus.	24
1.5. Análisis microbiológico	24
1.6. Medios de cultivos	24
1.6.1. Medios de cultivo apropiados para el crecimiento de Staphylococcus aureus	24
1.6.1.1. Agar sangre.	25
1.6.1.2. Agar Manitol Salado.	25

1.7. Pruebas bioquímicas	25
1.7.1. Catalasa.	25
1.7.2. Coagulasa..	25
1.8. Resistencia Bacteriana de Staphylococcus aureus	25
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>26</b>
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>26</b>
2.1. Tipo de investigación	26
2.2. Lugar de Investigación.	27
2.3. Descripción del área de estudio.	27
2.4. Características de la zona del lugar de estudio (Zona 7).	27
2.5. Universo y muestra	27
2.6. Materiales	28
2.6.1. Materiales de estudio.	28
2.6.1.1. Observación de campo.	28
2.6.1.2. Registro fotográfico.	28
2.6.1.3. Bibliografía primaria.	28
2.6.2. Materiales de Laboratorio.	28
2.6.2.1 Equipos.	29
2.6.2.2 Materiales de vidrio.	29
2.6.2.3. Sustancias y reactivos.	30
2.6.3. Material Vegetal.	30
2.7. Métodos	30
2.7.1. Método para la obtención de la droga cruda	30
2.7.1.1. Recolección y selección de la materia vegetal.	31
2.7.1.2. Preparación de la muestra.	31
2.7.2. Método para la obtención del extracto	31
2.7.2.1. Maceración	31
2.7.3. Métodos cuantitativos	31
2.7.3.1. Gravimétrico.	31
2.7.4. Métodos Cualitativos.	31
2.7.4.1. Tamizaje fitoquímico.	32
2.7.4.2. Cromatografía en capa delgada.	32
2.7.5. Método Microbiológico	32
2.7.5.1. Aislamiento bacteriano.	32
2.7.5.2. Escala Macfarland.	32
2.7.5.3. Pozos en Agar.	32
2.7.5.4. Contaje bacteriano.	32
2.8. Metodología	32
2.8.1. Recolección y selección de la muestra.	33

2.8.2. Preparación de la muestra.	33
2.8.3. Preparación del extracto seco.	33
2.8.4. Control de Calidad de la Droga	33
2.8.4.1. Ensayos Organolépticos.	33
2.8.4.2. Método gravimétrico.	33
2.8.4.2.1 Determinación del contenido de humedad.	34
2.8.4.2.2 Determinación de cenizas totales.	34
2.8.4.2.3 Determinación de cenizas solubles en agua.	35
2.8.5. Determinación Cualitativa de los metabolitos presentes en <i>Verbena litoralis</i> Kunth	36
2.8.5.1. Ensayos para identificar alcaloides	36
2.8.5.2. Ensayo para identificar Azúcares Reductores.	37
2.8.5.3. Ensayo para identificar Taninos.	37
2.8.5.4. Ensayo para identificar flavonoides.	38
2.8.5.5. Ensayo para identificar saponinas.	38
2.8.6. Cromatografía en Capa delgada.	38
2.9. Evaluación antibacteriana	39
2.9.1. Método modificado de pozos de agar 40:	39
2.10. Análisis estadístico	40
<b>CAPÍTULO III</b>	<b>41</b>
<b>3. RESULTADO Y DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
3.1. Control de la calidad físico química de <i>Verbena litoralis</i> Kunth	41
3.2.2. Cromatografía en Capa Delgada (CCD o TLC)	43
3.2.2.1. Revelado con UV 254 nm-365nm	43
3.2.2.2. Revelador ácido sulfúrico + $\Delta$ +vainillina + $\Delta$	44
3.3. Evaluación de la actividad antibacteriana.	45
1.1.Discusión	47
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>49</b>
<b>4. CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO V</b>	<b>50</b>
<b>5. RECOMENDACIONES</b>	<b>50</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>51</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos	15
Tabla 2. Taxonomía de <i>Verbena litoralis</i> Kunth.	19
Tabla 3. Lista de compuestos presentes en <i>Verbena litoralis</i> Kunth.	21
Tabla 4. Determinantes de patogenicidad y causantes de infecciones.	23
Tabla 5. Análisis de calidad de la droga cruda.	38
Tabla 6. Análisis organolépticos del extracto metanólico de los tallos <i>Verbena litoralis kunth</i> .	39
Tabla 7. Resultados de tamizaje fitoquímico.	39
Tabla 8. Actividad antibacteriana del extracto puro de <i>Verbena litoralis kunth</i> .	42

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Cromatografía en Capa Delgada. Revelado con luz UV 254 nm.	40
Ilustración 2. Cromatografía en capa delgada-Revelador ácido sulfúrico + $\Delta$ .	41
Ilustración 3. Crecimiento de <i>S. aureus</i> en solvente puro A.-Metanol B.	41
Ilustración 4. Halos de inhibición en agar Mueller Hinton por técnica de pozos en agar en diferentes concentraciones 200 mg/mL, 400 mg/mL, 600 mg/mL, 800 mg /mL.	42



## INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana es uno de los problemas que hoy en día afectan a la mayor parte de la población, el uso irracional de antibióticos es la causa principal del desarrollo de cepas resistentes que acarrearán más posibilidades de un tratamiento ineficaz contra las enfermedades, extendiendo el tiempo de sufrimiento de los pacientes incluso se ven obligados a adquirir medicamentos costosos que al no conseguirlos el riesgo de muerte es aún mayor <sup>1</sup>.

Desde siglos pasados las plantas medicinales han sido utilizadas para tratar diversas enfermedades, desde entonces ya se tenía intuición del uso de ciertas plantas y ante qué tipo de enfermedad se las podía administrar.

Existen varios estudios de plantas que poseen propiedades curativas gracias a los metabolitos secundarios y lo que más llama la atención es que muchas de ellas no tienen efecto tóxico. Ante esto, se ha visto la necesidad de investigar nuevos principios activos que al ser utilizados como alternativos evitan el uso indiscriminado de antibióticos.

La rama de la fitoquímica nos permite determinar cualitativamente y cuantitativamente los componentes de las plantas que se deseen estudiar.

La presente investigación consiste en utilizar los recursos naturales de nuestro país como medio fitoterapéutico, la planta que ha sido tomada como objeto de estudio es *Verbena litoralis Kunth*, en la provincia de El Oro, considerando que es una planta silvestre con múltiples propiedades entre ellas analgésica y antioxidantes <sup>2</sup>.

Según estudios de (Silverio, 2016) *Verbena litoralis Kunth*, posee varios metabolitos secundarios que le confieren propiedades bactericidas, tanto en sus hojas, semillas, tallos y raíz. Es por medio de este estudio que se pretende determinar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de los tallos de *Verbena litoralis kunth*, con la finalidad de probar su efecto ante *Staphylococcus aureus*.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según la Organización mundial de la salud (2018), mediante el nuevo sistema de vigilancia de la resistencia a antimicrobianos Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) se emite un informe acerca de las enfermedades producidas por bacterias y que a la vez revela altos niveles de resistencia a los antibióticos que afectan a la población mundial (500.000 personas), con sospecha de infecciones bacterianas en 22 países. El uso inadecuado de antibióticos es la principal causa de producción y proliferación de bacterias resistentes, esta es una situación que pone en peligro la salud de todas las personas <sup>3</sup>.

El desarrollo de resistencia bacteriana por parte de diversos agentes infecciosos provoca día a día una amenaza para la salud pública, entre esas bacterias encontramos a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, seguidas de *Salmonella spp.*, resultando alarmante su rápida propagación a nivel mundial <sup>3</sup>.

Una de las opciones más recomendadas por parte de la organización mundial de la salud es mejorar y favorecer la creación de nuevos principios activos que ayuden al tratamiento de enfermedades que se producen por cepas resistentes.

*S. aureus* forma parte de la flora bacteriana, de la piel y mucosas del ser humano, y actúa como microorganismo patógeno en alimentos y agua <sup>4</sup>. Este microorganismo presenta resistencia a varios antibióticos, entre ellos a la metilina y con sensibilidad intermedia cuando se trata en casos de conjugación o mutación de la bacteria, esto ha provocado con el pasar de los años que *Staphylococcus aureus* ocupe los primeros lugares como agente causal de resistencia, tanto en América como en Europa <sup>5,6</sup>

En el año 2017 la World Health Organization, hace una publicación de una lista de familias de patógenos que han desarrollado resistencia a los antibióticos, y que ahora acechan a la salud humana considerándose como peligrosas:

**Tabla 1. Lista de patógenos prioritarios para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos.**

<b>Prioridad</b>	<b>Microorganismo</b>	<b>Susceptibilidad</b>
<b>Crítica</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Enterobacteriaceae	Resistente a los carbapenémicos, Productoras de (BLEE)
<b>Elevada</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Helicobacter pylori</i>	Resistente a la meticilina. Resistente a Claritromicina
<b>Media</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Salmonella</i>	Resistente a vancomicina Salmonella resistente a fluoroquinolonas

**Fuente:** World Health Organization <sup>7</sup>.

Cabe recalcar que en nuestro país la planta *Verbena litoralis*, ha sido utilizada por nuestros ancestros para la cura de infecciones respiratorias, intestinales y vías urinarias.

## JUSTIFICACIÓN

*S. aureus* es una bacteria Gram positiva que provoca una infinidad de infecciones en el ser humano, el cual también se ha convertido en un microorganismo resistente <sup>8</sup>. Es por ese motivo que aprovechando nuestros recursos naturales en este caso la planta *Verbena litoralis kunth* se plantea evaluar su actividad antibacteriana ante *Staphylococcus aureus*.

La investigación realizada por Rachel (2013) identificó la presencia de fenoles, como componente que confiere la actividad antioxidante, luego años más tarde se realizó un estudio minucioso para determinar cuáles son los componentes presentes en la planta que le confieren la actividad hepatoprotectora <sup>9</sup> este metabolito posee propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas <sup>10</sup>.

*Verbena litoralis kunth* ha sido administrado como un anti anémico, dilatación de parto, cólicos, colinérgico, coraje, diarrea, dolor de corazón, dolor de estómago, paludismo <sup>11</sup>.

En nuestro país encontramos una infinidad de plantas que poseen metabolitos secundarios que nos permiten usarlos y aún no están identificados en su totalidad, sin embargo, poseen propiedades medicinales, bactericidas y anti fúngicas. La mayoría de la población ecuatoriana opta por la medicina tradicional, para aliviar dolores y afecciones de cualquier parte del organismo a pesar de que no se tiene conocimiento científico de la composición de todas las plantas que utilizan como medio de curación.

Según el Ministerio de Salud Pública (2016) se ha reportado 21 casos de letalidad producidos por infecciones gastrointestinales, 18 casos por vías urinarias, 60 casos de morbilidad por amigdalitis y 45 casos por faringitis, provocados por diferentes patógenos como *E.coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes*. El reporte elaborado por la Dra. Barba anuncia que existen casos de enfermedades que son transmitidas por alimentos contaminados y el principal agente causal es *S. aureus*, considerándose de importancia actualizar la investigación mediante tecnología de punta y proporcionar nuevos resultados a la comunidad científica <sup>12</sup>.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL.**

Evaluar la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico del tallo de *Verbena litoralis* K., mediante el método de pozos en agar para la inhibición de *Staphylococcus aureus*.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Evaluar la calidad físico química de la droga cruda de *Verbena litoralis* Kunth, mediante método gravimétrico.
- Investigar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de los tallos de *Verbena litoralis* Kunth, mediante tamizaje fitoquímico.
- Evaluar la sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus* frente al extracto metanólico del tallo de *Verbena litoralis* K mediante Concentración Mínima Inhibitoria.

## **HIPÓTESIS**

El extracto metanólico de los tallos de *Verbena litoralis* K., posee metabolitos secundarios que le confieren la actividad antibacteriana ante *S. aureus*

## **VARIABLES**

### **Variable independiente**

Concentración de los metabolitos secundarios.

### **Variable dependiente**

Sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus* ante el extracto metanólico de *Verbena litoralis* Kunth.

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1 *Verbena litoralis* Kunth

1.1.1. *Generalidades.* *Verbena litoralis*, a lo largo del tiempo ha sido un vegetal que proporciona diversos beneficios a la población, en su mayoría a las localidades indígenas. Las especies de la serie *Verbena* son familias de las dicotiledóneas con principios activos aromáticos considerándose muy importante, por poseer propiedades curativas para muchas enfermedades, ya sean digestivas o de las vías respiratorias. Rachel Lima (2018) señala que se han reportado hallazgos de esta especie en Brasil- Santa María, determinando en HPLC el contenido de compuestos químicos que a más de tener actividad antioxidante, poseen actividad antimicrobiana <sup>13</sup>.

1.1.2. *Taxonomía.* Esta especie abunda en las regiones tropicales y subtropicales, es conocida comúnmente como verbena blanca, verbena de campo, yapo, wirwina, yerba de hechizos y yapá. Su familia está ampliamente distribuida en varias regiones del mundo. En la tabla 2 se describe su taxonomía para conocer su organización y jerarquización sistemática de *Verbena litoralis kunth* <sup>14</sup>.

**Tabla 2. Taxonomía de *Verbena litoralis* Kunth**

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheobionta
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Dicotiledóneas
<b>Subclase</b>	Asteridae
<b>Orden</b>	Lamiales
<b>Familia</b>	Verbenaceae
<b>Género</b>	<i>Verbena</i>

**Tabla 2. ( continuación)**

<b>Especie</b>	<i>Verbena litoralis</i>
----------------	--------------------------

**Fuente:** United States Departmente of Agriculture <sup>14</sup>

1.1.3. *Descripción botánica.* *Verbena litoralis* Kunth, posee las siguientes características <sup>15,16</sup>.

- a. Es una planta herbácea perenne.
- b. Mide un metro de altura.
- c. Posee tallo cuadrangular, rígido, y ramificado en su parte superior.
- d. Sus hojas son opuestas, recortadas y velludas por su envés.
- e. Florece en época de verano; sus flores son pequeñas y de color violeta.
- f. Crece de manera silvestre y se extiende por Asia, Europa, y África

1.1.4. *Origen y distribución.* Es una planta originaria de Irán y Europa que tiene un historial de casi 200 años de uso, siendo utilizada en la medicina tradicional, además crece espontáneamente en terrenos de barbecho, bordes de caminos y escombros de Asia, África y actualmente se encuentra distribuida por toda América Latina <sup>2,16</sup>

1.1.5. *Datos ambientales.* El medio ambiente adecuado para que esta especie se desarrolle es en zonas húmedas y tropicales, con 1 500 a 3 200 mm de precipitación pluvial, temperaturas promedio entre 25° y 27° C, elevada intensidad solar y humedad relativa entre 70 y 80% y suelo arcillo-arenoso son cualidades propicias para que se desarrolle la planta <sup>13,16</sup>.

1.1.6. *Usos y propiedades.* *Verbena litoralis* Kunth ha sido utilizada desde hace miles de años por romanos y griegos, como una especie sagrada en rituales mágicos, además posee otras aplicaciones en la medicina tradicional que a continuación se detallan <sup>11,16,17,18,19</sup>.

- Se utiliza como tratamiento para el paludismo y la fiebre.



- Astringente, miorrelajante, laxante y depurativo.
- Para desintoxicar el hígado, bazo y riñones.
- Desinflamar las vías urinarias.
- Aliviar el cólico menstrual y dilatación del útero.
- Cicatrizante de úlceras de boca, y dolor de muela.
- Amigdalitis, gastroenteritis.
- Tranquilizante.

1.1.7. *Composición química.* Los estudios científicos realizados a la planta han sido muy pocos, pero sin embargo algunos autores que han investigado minuciosamente nos describen la presencia de metabolitos secundarios. En la tabla 3 se presenta la lista de componentes de la planta <sup>16,20</sup>.

**Tabla 3. Lista de compuestos presentes en *Verbena litoralis* Kunth.**

<b>Glucósidos: verbenalina y verbenina</b>
<b>Mucílagos</b>
<b>Saponinas</b>
<b>Taninos</b>
<b>Flavonoides</b>
<b>Fenoles</b>
<b>Fenilpropanoides</b>
<b>Feniletanoides</b>
<b>Triterpenos</b>
<b>Fuente:</b> Componentes químicos del extracto hidro etanólico de <i>Verbena litoralis</i> Kunth <sup>16,20</sup> .

## 1.2. Fitoquímica

Es la rama que se encarga del estudio de los componentes químicos de las plantas de uso medicinal, en la cual comprende una serie de métodos y técnicas de extracción que nos permiten obtener los diferentes principios activos de las plantas <sup>20</sup>.

### 1.3. Metabolitos secundarios

Son compuestos que se derivan del metabolismo secundario de las plantas, estos poseen diferentes propiedades biológicas, ecológicas, antibacterianas, antifúngicas, herbicidas, cosmetología, medicina ancestral y científica sus usos y aplicaciones que nos brindan son de gran beneficio para el ser humano <sup>20</sup>.

### 1.4. Metabolitos secundarios presentes en *Verbena litoralis* K con acción antibacteriana.

- a. **Compuestos Fenólicos.** La presencia de compuestos fenólicos en las plantas, es sinónimo de un compuesto aromático que contiene uno o varios grupos hidroxilo, teniendo como compuesto básico al fenol Verbenalin <sup>20</sup>. También constituyen un grupo de nutrientes que favorecen a la dieta humana, sus aplicaciones importantes son <sup>20,21</sup>.
  - a. Prevención de células cancerígenas.
  - b. Tratamiento en enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares.
  - c. Enfermedades de carácter inflamatorio.
- b. **Flavonoides.** Son compuestos que poseen en su estructura un grupo hidroxilo fenólicos, además son quienes forman los pigmentos presentes en los vegetales que ayudan a proteger al organismo del daño producido por agentes extraños u oxidantes, como los rayos ultravioletas, la contaminación ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, cabe recalcar que recientemente se comprobó su actividad antimicrobiana, antioxidante, anti fúngica, antimalaria y antiinflamatoria <sup>21,22,23</sup>.
- c. **Terpenoides.** Su característica principal es que posee cualidades aromáticas, y forma parte importante de la medicina ancestral, y se investigan sus posibles efectos antibacterianos y otros usos farmacéuticos, pero sí está comprobado que tiene una excelente actividad antifúngica, especialmente para tratar enfermedades producidas por *Candida albicans* <sup>24</sup>.
- d. **Iridoides.** Son estructuras químicas abiertas o cerradas, mayormente como glucósidos, estos compuestos confieren propiedades medicinales como; cicatrización de heridas,

mejora la actividad hepática, biliar, antimicrobiana, antiviral, amebicida y antitumoral<sup>9,25</sup>.

- e. **Saponinas.** Son compuestos oleosos, son solubles en agua produciendo espuma de larga durabilidad cuando son agitadas, sus propiedades terapéuticas: anticancerígena, antiinflamatoria, hipocolesterolemia<sup>26,27</sup>.

## 1.5. Staphylococcus aureus

1.5.1. *Generalidades.* Es un microorganismo que está constituido de cocos en forma racimo de uvas, con un diámetro de 0.5 a 1.5 um, Son bacterias anaerobias facultativas, no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, pero existen algunas cepas que llegan a desarrollar resistencia debido al uso indiscriminado de antibióticos<sup>4,28</sup>.

La incidencia de *Staphylococcus aureus* ha aumentado elocuentemente en los últimos años, es una bacteria Gram positiva, productora de enterotoxinas se encuentra en el ambiente, mucosas de las personas y de animales, un vector para producir una infección en los seres humanos es a través de alimentos y agua<sup>29</sup>.

1.5.2. *Viabilidad y propagación.* Es una bacteria que forma parte de la protección de la piel, mucosas de humanos y animales, además es un microorganismo que puede sobrevivir varios días o hasta semanas en cadáveres de animales, y mucho más tiempo en el suelo, objetos de vidrio o de metal<sup>4</sup>.

1.5.3. *Mecanismo de transmisión.* La transmisión se produce al consumir alimentos contaminados que contengan toxinas del microorganismo, heridas infectadas, mucosas irritadas y dolorosas, cortes o pinchazos con objetos que se encuentren con cepas de *S. aureus*, hay que tener en cuenta que este patógeno es también el responsable de las enfermedades nosocomiales<sup>4,29</sup>.

1.5.4. *Acción patógena de S. aureus. Desarrolla dos tipos de infecciones*<sup>31</sup>:

- a. **Forma directa:** se produce por destrucción tisular que conlleva a un proceso de supuración después de haber ingresado por el torrente sanguíneo.

- b. **Por toxinas:** a continuación, en la tabla 3, se detallan algunas de las infecciones que se desarrollan a partir de estas toxinas que contiene esta bacteria.

### 1.5. Análisis microbiológico

Para identificar este microorganismo, es importante tener en cuenta los medios de cultivo y pruebas bioquímicas que son específicos para el crecimiento idóneo aprovechando las enzimas y toxinas que posee este microorganismo y que ayudan a caracterizar y aislar la cepa de *S.aureus* <sup>31</sup>.

### 1.6. Medios de cultivos

Son preparaciones líquidas, sólidas y semisólidas, es un método que se utiliza en los laboratorios porque se asemeja al ambiente y hábitat de los microorganismos, además cumplen las exigencias y nutrientes que necesitan, permitiendo el desarrollo e identificación del patógeno <sup>32</sup>.

*1.6.1. Medios de cultivo apropiados para el crecimiento de Staphylococcus aureus:*

*1.6.1.1. Agar sangre.* Es un medio de cultivo que se utiliza para aislar e identificar numerosos microorganismos, entre esos a *Staphylococcus aureus* al ser enriquecido con sangre de cordero nos permite visualizar los diferentes tipos de hemólisis que algunas bacterias producen al ser inoculadas en este medio <sup>33</sup>.

*1.6.1.2. Agar Manitol Salado.* Es un medio de cultivo selectivo especialmente para diferenciar las colonias de *Staphylococcus aureus* y son inhibidas por el contenido de cloruro de sodio, otra característica que nos permite identificar es el cambio del color del medio que va desde rojo fenol, a amarillo cuando se trata de este microorganismo <sup>34</sup>.

### 1.7. Pruebas bioquímicas

*1.7.1. Catalasa.* Es una prueba que nos ayuda a identificar este microorganismo porque tiene la capacidad de convertir el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, esta prueba es positiva cuando la bacteria reacciona produciendo liberación de burbujas <sup>31</sup>.

1.7.2. *Coagulasa*. Esta es específicamente para identificar y diferenciar *S. aureus* este microorganismo tiene la capacidad de coagular la enzima, convirtiéndose en una prueba muy sensible y exacta para esta bacteria <sup>35</sup>.

### **1.8. Resistencia Bacteriana de *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* es un microorganismo que se encuentra con más periodicidad en los ambientes nosocomiales y comunitarios provocando enfermedades infecciosas e incluso hasta la muerte cuando existe una resistencia bacteriana <sup>36</sup>. La resistencia de *S. aureus* es un hecho que sucedió miles de años atrás desde que se empezó a utilizar de manera indiscriminada los antibióticos <sup>36</sup>.

Otro tema que preocupa hoy en día y que está relacionado con la resistencia antibacteriana es la contaminación de alimentos producida por *Staphylococcus aureus* que al ser estudiado y analizado en varios tipos de alimentos de consumo humano resultó resistente a metilina y oxacilina lo que preocupa aún más a la comunidad científica <sup>37</sup>.

## CAPÍTULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. Tipo de investigación

- **Exploratorio:** Se llevó a cabo una investigación meticulosa de los componentes, propiedades y zona de plantación adecuada para de *Verbena litoralis Kunth*.
- **Experimental:** Se realizó el análisis para identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en los tallos de *Verbena litoralis Kunth*.

#### 2.2. Lugar de Investigación.

La presente investigación se llevó a cabo en la Universidad Técnica de Machala en el Laboratorio de Bromatología y Laboratorio de Fitoquímica ubicada en la Avenida la Panamericana Km 5 ½ Vía a Pasaje de longitud: -79.965537; y latitud: -3.245207.

#### 2.3. Descripción del área de estudio.

El estudio se realizó en el Cantón Santa Rosa de la Provincia de El Oro, Zona 7.

El área de estudio está ubicada en la parroquia Bella María de la ciudad de Santa Rosa

- Latitud: -3.05
- Longitud: -79.7333333.

#### 2.4. Características de la zona del lugar de estudio (Zona 7).

Bella María es una parroquia que se encuentra se encuentra al Sur Oeste del cantón Santa Rosa, y de la provincia de El Oro, con una altitud de 26 a 289 m.s.n.m. A 5 km de la cabecera cantonal, cuenta con una superficie de territorio de 45,27 Km<sup>2</sup>. Limita al Norte con la cabecera cantonal de Santa Rosa, al Sur con Parroquia La Avanzada y San Antonio; al Este, con la Parroquia Bellavista; y, al Oeste con la parroquia de San Antonio y el Río Arenillas. El lugar donde se pudo encontrar la planta fue en parcelas y alrededor de las casas de la parroquia Bella maría, estas son sembradas y cultivadas por amas de

casas y propietarias de los terrenos, el tipo de suelo es arenoso acompañado de un clima húmedo tropical lo cual favorece el crecimiento de *Verbena litoralis kunth*.

## 2.5. Universo y muestra

- **Universo:** 60 plantas de *Verbena litoralis kunth*, recolectada en la Provincia de El Oro en el Cantón Santa Rosa.
- **Muestra:** 60 Tallos de *Verbena litoralis kunth*.

## 2.6. Materiales

### 2.6.1. Materiales de estudio.

2.6.1.1. *Observación de campo.* El estudio etnobotánico se llevó a cabo en los meses de enero y febrero del 2019 donde visitó a los habitantes con el fin informarlos sobre el estudio. Para obtener las coordenadas del lugar se utilizó un Sistema de Posicionamiento Global (GPS), además se realizó un registro de los lugares donde se cultivaba *Verbena litoralis kunth*, tomando en cuenta las condiciones ambientales en que se encontraba la planta, así mismo se procedió posteriormente a la recolección una vez seleccionado el lugar.

2.6.1.2. *Registro fotográfico.* Durante el periodo de estudio se tomaron fotografías que fueron digitalizadas e identificadas de la especie recolectada.

2.6.1.3. *Bibliografía primaria.* Para la recolección de información sobre *Verbena litoralis kunth*, se tomó en cuenta libros y publicaciones realizadas sobre esta especie.

### 2.6.2. Materiales de Laboratorio.

#### 2.6.2.1 Equipos.

- Autoclave (Fanem)
- Incubadora (Incucell)
- Estufa (mermmet)
- Turbidímetro (0.5 Mcfarland)
- Rotaevaporador Heidolph HB digital-Laborota 4001 efficient.

- TLC (Thin Layer Chromatography) plates sílica gel matrix UV 254 0.25mm de espesor.
- Balanza Analítica (OAHUS)
- Baño ultrasónico 5.7l Fisher Scientific
- Molino mecánico
- Tamiz (HUMBOLDT)

#### 2.6.2.2 *Materiales de vidrio.*

- Pipetas Volumétricas 1ml, 5ml, 10ml
- Pipetas Graduadas de 5ml, 10ml, 50ml.
- Varilla de vidrio
- Erlenmeyer de 250ml, 500ml, 1000ml
- Frascos de vidrio color ámbar de 120ml
- Fundas de plástico herméticas
- Cajas Petri estériles
- Asa platino redonda
- Gradilla
- Soporte
- Mechero de alcohol
- Papel aluminio
- Papel filtro libre de cenizas
- Hisopos estériles
- Gasas
- Regla
- Sacabocados
- Tijeras
- Lápiz graso
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Guantes
- Mascarilla
- Bata de laboratorio
- Zapatones



### 2.6.2.3. *Sustancias y reactivos.*

- Agua destilada
- Agar Mueller Hinton
- Agar sangre de cordero 5%
- Agar Manitol Salado
- Suero fisiológico o agua estéril inyectable
- Alcohol industrial
- Alcohol potable
- Metanol 99%
- BAW

### 2.6.3. *Material Vegetal.*

Tallos de *Verbena litoralis* Kunth.

### 2.6.4. *Material Microbiológico.*

Cepa de *Staphylococcus aureus*

## 2.7. **Métodos**

### 2.7.1. *Método para la obtención de la droga cruda*

2.7.1.1. *Recolección y selección de la materia vegetal.* Este proceso permitió clasificar o separar las partes de la planta que se van a utilizar, en este caso la parte a investigar son los tallos, los cuales deben estar libres de insectos, contaminación, tierra y materia extraña que puedan alterar la investigación.

2.7.1.2. *Preparación de la muestra.* Los tallos fueron lavados con agua potable y agua destilada para eliminar cualquier partícula de suciedad o materia extraña, luego se escurre y se secó por 48 horas mediante secado artesanal y luego por 48 horas más a 50°C en estufa, luego se procedió a triturar, pulverizar y tamizar la muestra.

## 2.7.2. Método para la obtención del extracto

2.7.2.1. *Maceración.* Consiste en mezclar la droga pulverizada con el solvente, durante varias horas o días logrando así obtener la mayor parte componentes.

## 2.7.3. Métodos cuantitativos

2.7.3.1. *Gravimétrico.* Consiste en el análisis de la composición de cierta sustancia teniendo en cuenta la diferencia de pesos del analito.

2.7.3.2. *Volumétrico.* Este método se basa en la medición cuantitativa de la capacidad de una sustancia.

## 2.7.4. Métodos Cualitativos

2.7.4.1. *Tamizaje fitoquímico.* Consiste en aislar e identificar varios componentes que son sintetizados por la planta y los cuales también le confieren la actividad farmacológica <sup>38</sup>.

2.7.4.2. *Cromatografía en capa delgada.* Es un proceso más rápido y preciso que nos permite diferenciar qué metabolitos contiene la planta en estudio mediante el cambio coloración que surge luego de haber aplicado un revelador específico.

## 2.7.5. Método Microbiológico

2.7.5.1. *Aislamiento bacteriano.* Es un proceso que ayuda a obtener un microorganismo puro, libre de otros con la finalidad de promover su crecimiento y facilitar su identificación.

2.7.5.2. *Escala Macfarland.* Es un método que permite medir la turbidez adecuada de una suspensión bacteriana, la cual se mide a 0,5 ug/ml.

2.7.5.3. *Pozos en Agar.* Es un método que ayudó a verificar la sensibilidad o resistencia de un extracto vegetal frente a un microorganismo.

2.7.5.4. *Contaje bacteriano.* Es una técnica que permite medir el total la población bacteriana (UFC) que se puede desarrollar en cualquier tipo de medio de cultivo.

## 2.8. Metodología

2.8.1. *Recolección y selección de la muestra.* La recolección materia prima se llevó a cabo en horas de la mañana, luego fueron trasladadas hasta el laboratorio para proceder con la selección de la muestra a trabajar en este caso los tallos, verificando que no tengan signos de deterioro o contaminación.

2.8.2. *Preparación de la muestra.* Los tallos fueron lavados con agua potable, y luego con agua estéril tratando de eliminar la suciedad y materia extraña que pueda interferir en la investigación, luego fueron secados a temperatura ambiente por tres días, y después tres días más a 50°C en estufa para así lograr eliminar cualquier exceso de agua para luego ser triturada, molida, y pulverizada.

2.8.3. *Preparación del extracto seco.* Se pesaron 20 g de droga pulverizada en 100 ml de metanol al 99% de pureza, se maceró por 45 minutos en ultrasonido, posteriormente se filtró y se llevó al rotaevaporador hasta obtener el extracto seco.

2.8.4. *Control de Calidad de la Droga* <sup>38</sup>:

2.8.4.1. *Ensayos Organolépticos.* Se analizó aspectos como color, olor, sabor de la droga que son importantes para el análisis de la misma <sup>38</sup>.

2.8.4.2. *Método gravimétrico.* Este método involucra someter al calor la muestra a investigar; produciendo la separación del componente que se desea cuantificar y luego pesar de forma exacta y precisa el componente separado <sup>38</sup>.

2.8.4.2.1 *Determinación del contenido de humedad.* Se realizó mediante el Método Termogravimétrico, en el cual se pesó 2 g de droga cruda y se transfirió a una cápsula de porcelana previamente tarada y desecada. El contenido fue llevado a la estufa de secado marca Memmert a 105°C durante 3 horas hasta obtener masa constante <sup>38</sup>.

La cápsula se colocó en el desecador hasta que alcance temperatura ambiente y fue pesada, colocándose nuevamente en la estufa de secado por 1 hora más, volviéndose a pesar, hasta obtener masa constante <sup>38</sup>:

Expresión de resultados <sup>38</sup>:

$$Hg = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Donde,

Hg = Pérdida en peso por desecación (%)

M<sub>2</sub> = Masa de la cápsula con la muestra de ensayo (g)

M<sub>1</sub> = Masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

M = Masa de la cápsula vacía (g)

100 = Factor matemático

*2.8.4.2.2 Determinación de cenizas totales.* Se pesó 2 g de la droga cruda en una balanza analítica, la droga se coloca en un crisol de porcelana previamente tarado <sup>38</sup>. Se calentó suavemente la porción de ensayo aumentando la temperatura hasta carbonizar y posteriormente se incineró en la mufla a una temperatura de 700-750°C durante 3 horas.

El crisol fue transferido al desecador hasta que alcance la temperatura ambiente y se pesa, repitiendo el proceso hasta obtener, masa constante <sup>38</sup>.

Expresión de resultados <sup>38</sup>:

$$C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

Donde, (%)

M = Masa del crisol vacío (g)

M<sub>1</sub> = Masa de crisol con la porción de ensayo (g)

M<sub>2</sub> = Masa del crisol con la ceniza (g)

100 = Factor matemático para los cálculos

2.8.4.2.3 *Determinación de cenizas solubles en agua.* A las cenizas totales obtenidas, se le añadieron de 15 a 20 ml de agua <sup>38</sup>. El crisol se tapa y se hierve durante 5 min <sup>38</sup>. La solución se filtra a través del papel de filtro libre de cenizas. El filtro con el residuo se transfiere al crisol inicial, se carboniza en un mechero y luego se incinera en un horno mufla de 700-750 °C, durante 3h <sup>38</sup>. Posteriormente se colocó en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta alcanzar peso constante <sup>38</sup>.

Expresión de los resultados <sup>38</sup>:

$$Ca = \frac{M_2 - Ma}{M_1 - M} \times 100$$

Ca = porcentaje de cenizas solubles en agua en base hidratada.

M<sub>2</sub> = masa del crisol con las cenizas totales (g).

Ma = masa del crisol con las cenizas insolubles en agua (g)

M<sub>1</sub> = masa del crisol con la muestra de ensayo (g)

M = masa del crisol vacío.

100 = factor matemático.

2.8.4.2.4. *Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico.* A las cenizas totales obtenidas, se le añaden de 2-3 ml de ácido clorhídrico al 10%. El crisol se tapó con un vidrio reloj y se calienta sobre un baño de agua hirviente durante 10 min <sup>38</sup>. Se lavó el vidrio reloj con 5mL de agua caliente y se une al contenido del crisol <sup>38</sup>. La solución se filtra a través de un papel de filtro libre de cenizas; se lava el residuo con agua caliente hasta que el filtrado acidulado con ácido nítrico p.a.; al cual se le añade una o dos gotas de solución de nitrato de plata 0.1mol/L, no muestre presencia de cloruros <sup>38</sup>. El filtrado con el residuo se deseca de 100 a 105 ° C, se transfiere al crisol inicial y se incinera en un horno mufla a una temperatura de 700-750 ° C durante 3 h <sup>38</sup>. Posteriormente se colocó en una desecadora y cuando alcance la temperatura ambiente se pesa. Se repite el procedimiento hasta obtener masa constante <sup>38</sup>.

Expresión de los resultados <sup>38</sup>:

$$B = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

B = porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

M = masa del crisol con la porción de ensayos (g)

M<sub>2</sub> = masa del crisol con la ceniza (g)

100 = factor matemático.

2.8.4.3. *Preparación y obtención del extracto puro.* Se pesó 20 g de droga pulverizada en 100 ml de Metanol al 99.9% de pureza, se llevó al ultrasonido a una temperatura de 30°C por 45 minutos, y luego a rotaevaporador para obtener el extracto seco <sup>38</sup>.

2.8.5. Determinación Cualitativa de los metabolitos presentes en *Verbena litoralis* Kunth <sup>39,38</sup>.

#### 2.8.5.1. Ensayos para identificar alcaloides

- *Ensayo de Dragendorff.* Se tomó 2 ml del extracto con el disolvente orgánico, se llevó a baño maría hasta evaporación y el residuo restante se lo disuelve con 1ml de ácido clorhídrico al 1% en agua. Luego se añade 3 gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++), precipitado (+++).
- *Ensayo de Mayer.* Se procedió de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añada una pizca de cloruro de sodio en polvo, agite y filtre. Añada 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).

En el caso de alcaloides cuaternarios y/o amino-óxidos libres, éstos sólo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia la reacción debe ser (++) ó (+++), en todos los casos, ya que un resultado (+), puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.

- *Ensayo de Wagner.* Se partió al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma.

#### 2.8.5.2. *Ensayo para identificar Azúcares Reductores.*

- *Ensayo de Fehling.* Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo disolverse en 1-2 ml de agua. Se adicionaron 2 ml del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo.

#### 2.8.5.3. *Ensayo para identificar Taninos.*

- *Ensayo del cloruro férrico.* Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionaron 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añadieron acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:
  - a. Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
  - b. Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
  - c. Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos

#### 2.8.5.4. *Ensayo para identificar flavonoides.*

- *Ensayo de Shinoda.* Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1ml de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen. Si la alícuota del extracto se encuentra en

agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos.

#### 2.8.5.5. *Ensayo para identificar saponinas.*

- *Ensayo de Espuma.* El extracto se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos. El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos.

2.8.6. *Cromatografía en Capa delgada.* Se acondicionó una cámara cromatográfica de sílica gel de 15 cm de largo x 6 cm de ancho, y 0,25 mm de espesor, se procedió a realizar el punteo de la muestra con un capilar sin heparina, luego se preparó las fases móviles, butanol: ácido acético: agua 65:25:10, y con ello se dejó reposar por 10 minutos. Se sumerge la cámara cromatográfica para iniciar la corrida por capilaridad donde los compuestos que son más polares ascienden más rápido, y los que son de menor polaridad se quedan estáticos.

Es una que se lleva a cabo utilizando una placa inmersa en forma vertical en una fase móvil, Esta placa cromatografía contiene una parte radica en una fase estacionaria polar (sílica gel) fijada en un soporte de aluminio.

- Fase estacionaria:** Silica Gel with fluorescent UV 254 MACHEREY-NAGEL 0.25 mm de espesor.
- Fase móvil:** Butanol: ácido acético: agua destilada (BAW 65:25:10)
- Siembra:** Extracto metanólico de tallos de *Verbena litoralis* (20 mg disuelto en 100 ml de metanol).
- Tiempo de corrida:** 1 hora aproximadamente.
- Revelado:** UV 254-366 nm, más vapores de ácido sulfúrico, calor y vainillina.



## 2.9. Evaluación antibacteriana

### 2.9.1. Método modificado de pozos de agar <sup>40</sup>:

- Una vez obtenida las cepas de la bacteria *S. aureus* se diluyeron en tubo de ensayo con 5ml de agua estéril o suero fisiológico hasta obtener una solución a 0.5 en la escala de McFarland.
- La actividad antibacteriana se la desarrolló por el método modificado de pozos de agar o también llamado difusión en pozo de agar.
- Se utilizó 5 cajas Petri con Mueller Hinton Agar, inoculadas con las cepas de *S. aureus* mediante la técnica de plateado.
- Posteriormente con la ayuda de un sacabocados, se procedió a realizar perforaciones de 6mm de diámetro.
- A cada uno de los pocillos se le añadió 50 ul de extracto puro de *Verbena litoralis Kunth*, por triplicado todo este procedimiento se realizó en una cabina de flujo laminar para conservar el ambiente estéril y seguir las normas de bioseguridad. Las placas fueron incubadas a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 h y 48h.

## 2.10. Análisis estadístico

Los resultados del control de Calidad de la Droga se procesaron por el software IBM SPSS versión 21, y expresados como media/desviación estándar, considerándose un nivel de significación ( $p=0.05$ ).

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADO Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Control de la calidad físico química de *Verbena litoralis Kunth*

*Tabla 5. Análisis de calidad de la droga cruda (media/SD; n=3)*

Muestra	H (%)	CT(%)	CSA(%)	CIHCl(%)
Tallos de <i>Verbena litoralis K.</i>	8,15/0,105	3.39/0,25	1.9/0,0	0.5/0,0

**Interpretación:** H: Humedad; CT: Cenizas Totales; CSA: Cenizas Solubles Agua; CIHCl: Cenizas Insolubles en Ácido Clorhídrico.

*Fuente:* Elaborado por la Autora

1. El porcentaje de humedad refleja un resultado óptimo, lo que se puede interpretar es que el proceso de secado de la droga fue el correcto, y que se encuentra dentro de los rangos establecidos. Lo que nos indica que la droga tiene menos posibilidades de verse atacada por microorganismos que podrían provocar una pérdida o rechazo del material <sup>41,42</sup>.
2. El porcentaje de cenizas totales se encuentra dentro del parámetro que nos indica la farmacopea española 2002, indicándonos que la droga cruda no excede en contenido de material inorgánico; como sales, carbonatos y metales pesados <sup>43,42</sup>.
3. En cuanto a las cenizas solubles en agua, es un valor que se encuentra dentro de los rangos establecidos, este es un parámetro que nos sirve como indicador de materia inorgánica <sup>44</sup>.

4. Las cenizas solubles en ácido clorhídrico se encuentra en un 0,5% indicando que no existe una cantidad excesiva de materia extraña, sílice, componentes silicos derivados de la contaminación por piedras, tierra, y arena <sup>13,44</sup>.

Los resultados de humedad, cenizas totales se trabajaron por triplicado, estos valores no mostraron variaciones entre los datos analizados sin embargo en cenizas solubles en agua y cenizas insolubles en HCl se observó dispersión en los resultados obtenidos.

En las tablas de contingencia presentadas a continuación se enuncian la relación que existe entre cenizas y humedad donde se determinó que todos estos factores se ven influenciados por condiciones geográficas y climáticas en que fue recolectada la planta, Sin embargo todos estos parámetros analizados se encontraron dentro de los rangos reportados en la literatura.

**Tabla de contingencia 5.1 Humedad-Cenizas Totales**

<b>Recuento</b>		<b>Cenizas Totales</b>			<b>Total</b>
		3,39	3,32	3,37	
<b>Humedad</b>	8,17	1	0	0	1
	8,15	0	1	0	1
	7,90	0	0	1	1
<b>Total</b>		1	1	1	3

**Tabla de contingencia 5.2**

<b>Recuento</b>		<b>Cenizas Insolubles</b>			<b>Total</b>
		0,51	0,52	0,51	

<b>Tabla de contingencia 5.2 (continuación)</b>					
<b>Cenizas</b>	3,39	1	0	0	1
<b>Totales</b>	3,32	0	1	0	1
	3,37	0	0	1	1
<b>Total</b>		1	1	1	3

**Tabla de contingencia 5.3.**

<b>Recuento</b>					
		<b>Cenizas Solubles</b>		<b>Total</b>	
		1,70	1,90	1,80	
<b>Cenizas</b>	3,39	1	0	0	1
<b>Totales</b>	3,32	0	1	0	1
	3,37	0	0	1	1
<b>Total</b>		1	1	1	3

**Tabla 6. Análisis organolépticos del extracto metanólico de los tallos Verbena litoralis Kunth**

<b>Extracto</b>	<b>color</b>	<b>Olor</b>	<b>sabor</b>
<b>Metanólico</b>	verde	característico	amargo

*Fuente: Elaborado por la Autora*

**Interpretación:** Éste es un análisis que nos ayuda a identificar posibles alteraciones en la droga.

### 3.2. Análisis cualitativo de metabolitos secundarios.

#### 3.2.1. Tamizaje Fitoquímico

Tabla 7. Resultados de tamizaje fitoquímico

Ensayo	Metabolitos	Extracto Metanólico
<b>Dragendorff (Alcaloides)</b>	Alcaloides	+
<b>Mayer(Alcaloides)</b>	Alcaloides	+
<b>Waner(Alcaloides)</b>	Alcaloides	+
<b>Feling</b>	Azúcares reductores	+++
<b>Cl<sub>2</sub>Fe<sub>3</sub></b>	Fenoles y Taninos	+++
<b>Espuma</b>	Saponina	++
<b>Shinoda</b>	Flavonoides	+
<b>Lieberman-Buchard</b>	Triterpenos y esteroides	++

**Interpretación:** +++ Alta evidencia, ++ Evidencia, + Poca evidencia

*Fuente:* Elaborado por la Autora

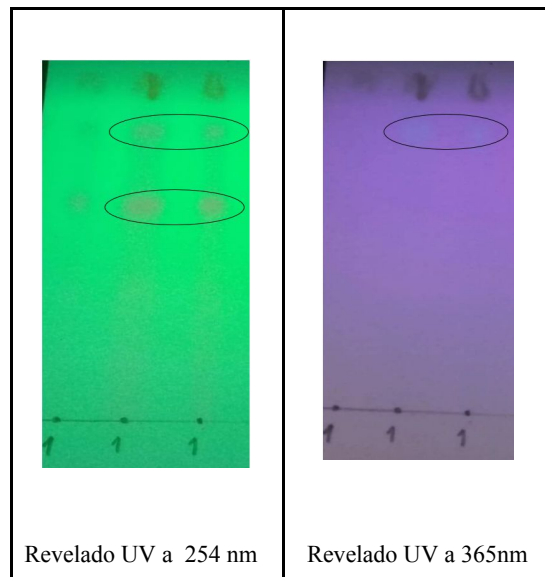
En este estudio se puede evidenciar la ausencia y presencia de los metabolitos que se encuentran presentes en la planta.

Mediante los diferentes ensayos realizados se identificó la presencia de alcaloides, azúcares reductores, fenoles y taninos, saponinas, triterpenos y cumarinas, lo cual se asemeja a lo reportado por Silverio, C<sup>45</sup>.

#### 3.2.2. Cromatografía en Capa Delgada (CCD o TLC)

##### 3.2.2.1. Revelado con UV 254 nm-365nm

**Ilustración 1.** Cromatografía en Capa Delgada. Revelado con luz UV 254 nm

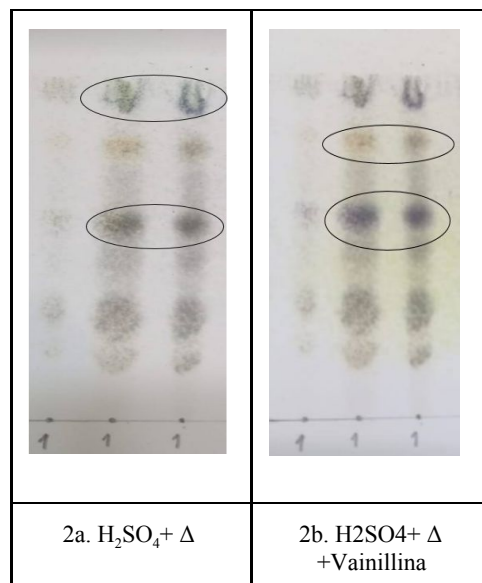


**Fuente:** Elaborado por la Autora

En los siguientes gráficos se evidencia cualitativamente la presencia de metabolitos bioactivos es decir que generan o cumplen una función en el ser humano, el extracto metanólico de los tallos de *Verbena litoralis* Kunth, con el revelado UV a 254 nm se puede evidenciar la fluorescencia con una coloración roja característica de los grupos cromóforos conjugados indicándonos compuestos cuya estructura posee anillos aromáticos, en el revelado UV a 365 nm se aprecian varias manchas lo que sugiere la presencia de metabolitos coloración azul que aparentemente se trataría de compuestos de naturaleza fenólica <sup>46,47</sup>.

### 3.2.2.2. Revelador ácido sulfúrico + $\Delta$ +vainillina + $\Delta$

**Ilustración 2.** Cromatografía en capa delgada-Revelador ácido sulfúrico +  $\Delta$



Tomando en cuenta lo sugerido por los autores Verdugo y Tola 2017, nos indican una posible similitud en cuanto al color y el metabolito sugerido; en la ilustración 2 a) podemos observar coloraciones de color verde y azul característico de compuestos glicósidos de flavonoides <sup>46</sup>, en cuanto a la ilustración 2 b) se observó coloraciones violáceas que corresponde a compuesto de naturaleza triterpénica, las coloraciones amarillas, indica la presencia de compuesto fenólicos <sup>47</sup>.

### 3.3. Evaluación de la actividad antibacteriana.

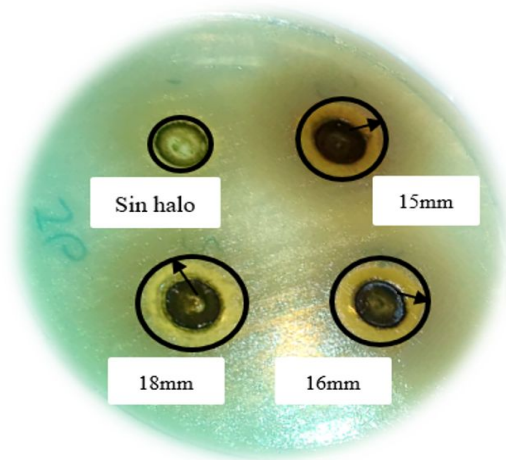
**Ilustración 3.** Crecimiento de *S. aureus* en solvente puro A.-Metanol B.



**Fuente:** Elaborado por Autora

Se realizó un control con el disolvente puro en este caso el metanol para determinar si interfiere ante dichos resultados, donde se evidenció crecimiento bacteriano, a lo cual podemos interpretar que es el extracto de la planta quien confiere la actividad antibacteriana gracias a sus componentes.

**Ilustración 4.** Halos de inhibición en agar Mueller Hinton por técnica de pozos en agar en diferentes concentraciones 200 mg/mL, 400 mg/mL, 600 mg/mL, 800 mg/mL.



Fuente: Elaborado por Autora

Para la concentración mínima inhibitoria, se realizó por triplicado y se pudo evidenciar que para lograr la susceptibilidad de la bacteria no podemos utilizar menos del 400 mg de extracto puro porque a partir de esta concentración se logró el primer halo de inhibición de 15mm.

**Tabla 8. Actividad antibacteriana del extracto puro de *Verbena litoralis* Kunth**

Diluciones	Diámetros del halo de inhibición (mm)		
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)		
	N <sub>o</sub> Replicas		
Extracto seco de <i>V. litoralis</i> Kunth	1	2	3
200 mg/mL	-	-	-
400 mg/mL	15	15	14.8
600 mg/mL	16	16	15.9
800 mg/mL	18	18	18
Metanol	-	-	-

Fuente: Elaborado por Autora



- **Medición de los halos de inhibición**

Con relación al efecto del extracto puro de *Verbena litoralis* Kunth ante la cepa de *Staphylococcus aureus*, los resultados obtenidos mostraron un promedio de halo de inhibición de 16.33 mm en 24 y 48 horas de incubación.

Para la evaluación antibacteriana del extracto metanólico de los tallos de *Verbena litoralis* Kunth se siguió el protocolo emitido por CLSI de susceptibilidad antimicrobiana por el método modificado de pozos en agar <sup>49</sup>. Se realizó un control de sensibilidad y resistencia de *Staphylococcus aureus* con antibióticos; vancomicina, cefotaxima, novobiocina presentando el microorganismo sensibilidad a novobiocina y cefotaxima, pero resistencia vancomicina.

### 3.4. Discusión

El extracto metanólico de *Verbena litoralis kunth* posee coloración verde, olor característico y sabor amargo. En el análisis químico realizado a la droga cruda se pudo determinar que el porcentaje de humedad fue 8,1%, indicando que el proceso de secado fue el adecuado y que no está expuesta a proliferación de microorganismos, con respecto a las cenizas totales se obtuvo un valor de 3,39%, el valor de cenizas solubles en agua fue de 1,9% y el valor de cenizas solubles en ácido clorhídrico fue 0,5 % cuyos valores se encuentran dentro del rango adecuado en la farmacopea española (2002), los resultados obtenidos en este estudio se asimilan a estudios de control de calidad realizados por de Lima (2013)<sup>13</sup> y Silverio (2016)<sup>45</sup>.

Según el análisis fitoquímico realizado en esta investigación, coincide con lo reportado por Silverio (2016)<sup>45</sup> donde se demuestra la presencia de metabolitos secundarios; en mayor concentración azúcares reductores, fenoles, taninos, saponinas y triterpenos; en menor concentración alcaloides y flavonoides siendo estos los componentes que poseen propiedades antibacterianas<sup>48</sup>. A diferencia de lo reportado por García (1995)<sup>49</sup> quien no reporta presencia de saponinas, alcaloides y cumarinas. Todos estos resultados fueron comprobados por otra técnica cualitativa llamada Cromatografía de Capa Delgada donde se logró evidenciar con revelado UV a 254 nm fluorescencia de color rojo característica de los grupos cromóforos conjugados, en revelado UV 365nm una coloración azul refiriéndose a compuestos de naturaleza fenólica, se realizó otros revelados con ácido sulfúrico +  $\Delta$  donde se observaron coloraciones verde y azul característico de compuestos glucósidos de flavonoides, en cambio con ácido sulfúrico + Vainillina se presenciaron coloraciones violetas correspondiente a compuestos terpénicos y las coloraciones amarillas propias de fenoles.

Se obtuvieron halos de inhibición; los mismos que fueron analizados según la técnica de comprobación de actividad terapéutica de las plantas medicinales dispuesta por el autor Alonso (2006); considerando una actividad antibacteriana sensible (S) si el halo mide mayor a 9mm; si el halo mide entre 6 a 9 mm la sensibilidad es intermedia o moderada (I), pero si el halo es menor a 6mm se considera negativo o resistente (R) a lo cual podemos interpretar que

nuestros resultados fueron positivos por el diámetro de los halos de inhibición fueron mayores a 9mm<sup>50</sup>.

La concentración mínima inhibitoria del extracto metanólico de los tallos de *Verbena litoralis kunth* fue 400 mg/mL logrando la sensibilidad de *Staphylococcus aureus*, debido a los metabolitos secundarios que posee la planta y que con ayuda del solvente se los pudo obtener; especialmente fenoles, flavonoides, cumarinas, taninos y saponinas que ayudan a combatir a microorganismos inhibiendo la biosíntesis de ácidos nucleicos, tienen la capacidad para formar complejos irreversibles a través de proteínas lo cual interfiere en sus funciones biológicas ocasionándoles la muerte<sup>51</sup>.

## CAPÍTULO IV

### 2. CONCLUSIONES

- Mediante el método gravimétrico se realizó el control de calidad físico químico de *Verbena litoralis Kunth*, se determinó que el porcentaje tanto de ceniza y humedad se encuentran dentro de los parámetros establecidos en la farmacopea española 2002, este es un indicativo que la droga está en perfectas condiciones de almacenamiento y libre de materia extraña o sustancia química que pueda producir alteraciones en la misma.
- Se pudo determinar cualitativamente los metabolitos secundarios como alcaloides, azúcares reductores, fenoles y taninos, saponinas, triterpenos y cumarinas, presente en el extracto metanólico de los tallos de *Verbena litoralis Kunth*, mediante tamizaje fitoquímico y cromatografía en capa delgada.
- La cantidad mínima inhibitoria del extracto metanólico de los tallos de *Verbena litoralis K*, que produce sensibilidad de *Staphylococcus aureus* es de 400mg/mL y 200 mg/mL resultó resistente.

## CAPÍTULO V

### 2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda el uso de nuevas tecnologías para cuantificar los metabolitos presentes en *Verbena litoralis Kunth*.
- Motivar el cultivo de *Verbena litoralis K*, porque gracias a sus componentes y propiedades farmacológicas se puede llevar a cabo la elaboración de una forma farmacéutica que permita el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias.
- Realizar estudios con otros microorganismos considerando que en otras literaturas se ha logrado la susceptibilidad de hongos y bacterias Gram negativas.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) Serra, M. Microbial resistance in the current context and the importance of knowledge and application in antimicrobial policy. *Rev. Habanera Ciencias Médicas* **2017**, 5 (3), 8-9.
- (2) Braga, V.; Mendes, G.; Oliveira, R.; Soares, C.; Resende, C.; Pinto, L.; De Santana, R.; Viccini, L. F.; Raposo, N.; Peixoto, P. Micropropagation, antinociceptive and antioxidant activities of extracts of *Verbena litoralis* Kunth (Verbenaceae). *An. Acad. Bras. Cienc.* **2012**, 84 (1), 139-147. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012000100014>.
- (3) Organización mundial de la salud. Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo. *Común. Prensa* **2018**, 1.
- (4) Piñeros, J. *Staphylococcus aureus* [http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas de agentes biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus aureus.pdf](http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas_de_agentes_biologicos/Fichas/Bacterias/Staphylococcus_aureus.pdf).
- (5) Arteaga, L.; Espinosa, Y.; Chávez, M. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* que coloniza el personal de salud de un hospital de la ciudad de Cali. *Ciencias la Salud* **2016**, 14 (1), 9-19. <https://doi.org/10.12804/revsalud14.01.2016.01>.
- (6) Abente, S.; Carpinelli, L.; Guillén, R.; Rodríguez, F.; Fariña, N.; Laspina, F.; López, Y. Frecuencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y del factor de virulencia PVL en pacientes ambulatorios con infección de piel y partes blandas de Asunción, Paraguay. *Investig. Cienc. Salud* **2016**, 14014 (202), 8-16. [https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014\(02\)](https://doi.org/10.18004/Mem.iics/1812-9528/2016.014(02)).
- (7) World Health Organization. Lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos

<https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> (accessed abr 20, 2019).

- (8) Martínez, A.; Montes de Oca, M.; Alemañy, J.; Marrero, I.; Reyna, R.; Cedeño, R. Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el Hospital Dr. Gustavo Aldereguía Lima. *MediSur* **2017**, *15* (2), 210-216.
- (9) Vestena, A.; Piton, Y.; de Loretto Bordignon, S. A.; Garcia, S.; Arbo, M.; Zuanazzi, J. A.; von Poser, G. Hepatoprotective activity of *Verbena litoralis*, *Verbena montevidensis* and their main iridoid, brasoside. *J. Ethnopharmacol.* **2019**, *239*, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.111906>.
- (10) Salcedo, G.; Trejo, J.; Martínez, B.; Cruz, F.; Trejo, G. Formación de raíces e inducción de haustorios de *Castilleja tenuiflora* Benth. con catequina y peróxido de hidrógeno. Root formation and haustoria induction of *Castilleja tenuiflora* Benth. with catechin and hydrogen peroxide. *Polibotánica* **2017**, *0* (44), 147-156. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.44.11>.
- (11) Lopez, M.; Aguilar, A.; Aguilar, S.; Xolalpa, S. The verbenaceae used as an herbal resource in mexico: an ethnobotanical-medical review. *Polibotánica* **2017**, *0* (44), 195-216. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.44.14>.
- (12) Barba Tapia, F. Brote de intoxicación alimentaria en el distrito 07D04 Balsas, Marcabelí, Piñas. *Salud Humana Rev. Académica Investig.* **2018**, *1* (1), 33-43.
- (13) De-Lima, R. Controle de qualidade e atividade antimicrobiana de *Verbena litoralis* kunth, 2013.
- (14) United States Department of Agriculture. Classification of *Verbena litoralis* Kunth  
<https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=VELI&fbclid=IwAR3Enov7i4Z9q>

B09yTOUhVJ9fZ0NPTc-7dzLZ5thEuuxI3ooVbjyHeypdzc (accessed abr 22, 2019).

- (15) Vera, B.; Sánchez, M. Registro de algunas plantas medicinales cultivadas en San Cristóbal, municipio de Medellín (Antioquia - Colombia). *Rev. Fac. Nac. Agron. Medellín* **2015**, *68* (2), 7647-7658. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v68n2.50979>.
- (16) Vega, M. "Cultivo de plantas medicinales: verbena, jengibre y piripri en la granja demostrativa de leda, periodo de preparación de terreno, siembra, mantenimiento y seguimiento", 2015.
- (17) Carrillo, T.; Díaz, A. Actividad antimalárica de extractos acuosos de *Lantana camara* L., *Verbena littoralis* L. y *Heliotropium indicum* L. en ratones infectados con *Plasmodium berghei*. *Rev. la Fac. Farm.* **2006**, *48* (1), 1-7.
- (18) Galvis, M.; Torres, M. Etnobotánica y usos de las plantas de la comunidad rural de Sogamoso, Boyacá, Colombia. *Rev. Investig. Agrar. y Ambient.* **2017**, *8* (2), 204. <https://doi.org/https://doi.org/10.22490/issn.2145-6453>.
- (19) Lalama Aguirre, J. M.; Montes Cruz, S. B.; Zaldumbide Verdezoto, M. A. Etnobotánica de plantas medicinales en el cantón Tena, para contribuir al conocimiento, conservación y valoración de la diversidad vegetal de la región amazónica TT - Ethnobotany of medicinal plants in the canton Tena, to contribute to the knowledge, con. *Dominio las Ciencias* **2016**, *2* (2), 26-48.
- (20) de Lima, R.; Gaube, C.; Hass, A.; Lima, C.; dos Santos, K.; Casoti, R.; Castro, R.; Ugale, M.; Leite, M.; de Freitas, L.; et al. Acute and subacute toxicity and chemical constituents of the hydroethanolic extract of *Verbena littoralis* Kunth. *J. Ethnopharmacol.* **2018**, *224*, 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.05.012>.



- (21) Ringuelet, J.; Viña, S. *Productos naturales vegetales*, Primera Ed.; Plata, E. de la U. N. de la, Ed.; Buenos Aires, Argentina, 2013.
- (22) Linares, C.; Quiñones, J.; Pérez, A.; Carvajal, C.; Rivas, M.; Cid, G.; Pérez, L.; La Rosa, S.; Capdesuñer, Y. Obtención de extractos fenólicos foliares de *Moringa oleifera* Lam mediante el uso de diferentes métodos de extracción. *Biotecnol. Veg.* **2018**, *18* (1), 47-56.
- (23) Macías, E.; Bullaín, M.; Torres, E. Análisis fitoquímico y actividad antimicrobiana in vitro de los extractos de raíz, tallos y hojas de *Priva lappulacea* (L). Pers (Amor seco). *Rev. Cient. Educ. la Prov. Granma* **2017**, *13* (4), 12-26.
- (24) Ilboudo, O.; Bonzi, S.; Tapsoba, I.; Somda, I.; Bonzi-Coulibaly, Y. L. In vitro antifungal activity of flavonoid diglycosides of *Mentha piperita* and their oxime derivatives against two cereals fungi. *Comptes Rendus Chim.* **2016**, *19* (7), 857-862. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2015.11.023>.
- (25) Boucherit, Z.; Touil, H.; Boucherit, K.; Soliman, S. Inhibition of *Candida albicans* biofilm by synergistic action of exogenous terpenoides. *J. Infect. Public Health* **2019**, *12* (1), 122. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.10.059>.
- (26) Jiménez Quesada, K.; Garro Monge, G. Establecimiento de calogénesis somática en *Plantago major* e identificación de compuestos con actividad biológica. *Rev. Tecnol. en Marcha* **2017**, *30* (1), 38. <https://doi.org/10.18845/tm.v30i1.3063>.
- (27) Lopez, T.; Corbin, C.; Falguieres, A.; Doussot, J.; Montguillon, J.; Hagège, D.; Hano, C.; Lainé, É. Secondary metabolite accumulation, antibacterial and antioxidant properties of in vitro propagated *Clidemia hirta* L. extracts are influenced by the basal culture medium Influence de la composition du milieu de culture sur la production de métabolites sec. *Comptes Rendus Chim.* **2016**, *19* (9), 1071-1076. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.03.012>.

- (28) López Carreras, N.; Miguel, M.; Aleixandre, A. Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutr. Clin. y Diet. Hosp.* **2012**, *32* (3), 81-91.
- (29) Ramírez Rueda, Román Y Mojica Ávila, D. N.; Espitia Mayorga, M. I. Actividad antibacteriana de extractos de plantas contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM). *Cienc. y Salud Virtual* **2015**, *8* (1), 3-12.
- (30) Elika. *Staphylococcus aureus* file:///C:/Users/Usuario/Desktop/Bibliografia Verbena litoralis/Staphylococcus a.pdf.
- (31) Mandell, G.; Bennett, J. Género *Staphylococcus*. En *Etiopatogenia microbiológica*; 2012; pp 255-272.
- (32) Zendejas, G.; Avalos, H.; Soto, M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev. Biomed.* **2017**, *25* (3), 129-143.
- (33) Nápoles, M. C.; Martínez, J.; Costales, D.; Gómez, G.; Somers, E. EN LA MULTIPLICACIÓN CELULAR DE *Bradyrhizobium elkanii*. **2006**, *27* (1), 35-38.
- (34) Laboratorios Britania S.A. Sangre Agar Base. *Britania* **2015**, *1*, 2.
- (35) Laboratorios Brizuela. Manitol Sal Agar ( Chapman ). **2015**, 9255.
- (36) Hamdan Partida, A.; González García, S.; Bustos Martínez, J. Identificación de *Staphylococcus aureus* utilizando como marcadores los genes *nucA* y *femB*. *Ciencias Clínicas* **2015**, *16* (2), 37-41. <https://doi.org/10.1016/j.cc.2016.02.002>.

- (37) Carmona Torre, F.; del Pozo, J. L. Tratamiento de las infecciones por *Staphylococcus aureus*. *Med.* **2018**, *12* (49), 2918-2923. <https://doi.org/10.1016/j.med.2018.02.007>.
- (38) Puig Peña, Y.; Espino Hernández, M.; Leyva Castillo, V.; Apórtela López, N.; Pérez Muñoz, Y.; Soto Rodríguez, P. Resistencia Antimicrobiana en Cepas de *Estafilococos Coagulasa Positiva Aisladas en Alimentos y Manipuladores*. *Cuba. Aliment. Nutr.* **2015**, *25* (2), 245-260.
- (39) Miranda, M.; Cuellar, A. Farmacognosia y Productos Naturales. En *Manual de Prácticas de Laboratorio*.; Varela, F., Ed.; La Habana, 2000; pp 44-49.
- (40) Pérez, J.; Sotelo, A.; Fuentes, Y.; Damas, R. Correo científico médico de holguín. *Correo Científico Médico de Holguín* **2017**, N.º 4, 1119-1127.
- (41) Morales, M.; Garza, R.; Espinosa, C. *Investigación en plantas de importancia médica*; Rivas, C., Oranday, M., Verde, M., Eds.; 2016. <https://doi.org/10.3926/oms.315>.
- (42) World Health Organization. Quality control methods for herbal materials. En *Quality control methods for herbal materials. Updated*; 2011; pp 11-178.
- (43) Zapata García, V. F. Estudio etnobotánico y farmacognóstico de especies vegetales en la Isla de Muisne (Esmeraldas)., 2017.
- (44) Cabrera, H.; Morón, F.; Amador, M.; García, A.; Acosta, C. Composición fitoquímica de partes aéreas frescas de *Phania matricarioides*. *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2012**, *17* (3), 268-278.
- (45) Pelaez Morillas, A. M.; Polo Luis, S. Y. Características farmacognósticas de las hojas de *Artemisia absinthium* “ajenjo” procedente del distrito de Contumazá, región Cajamarca, 2016.

- (46) Silverio, C. Determinación de flavonoides y glucósidos en *Verbena litoralis*, 2016.
- (47) Verdugo, M.; Tola, B. Capacidad antioxidante y composición química de varios extractos de propóleos de la zona sur del Ecuador, 2017.
- (48) Buestán, A.; Torres, M. Estudio de la composición química y actividad antifúngica de extractos de propóleos de la región del austro ecuatoriano, 2018.
- (49) Hernández, J.; Zaragoza, A.; López, G.; Peláez, A.; Olmedo, A.; Rivero, N. Actividad antibacteriana y sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: enfoque en Medicina Veterinaria. *Abanico Vet.* **2018**, 8 (1), 14-27. <https://doi.org/10.21929/abavet2018.81.1>.
- (50) Gracia, C. L.; Correa, E.; Rojas, N. Estudio Fitoquímico Preliminar De La Actividad Antimicrobiana De Algunas Plantas.Pdf. **1995**, N.º 23.
- (51) Tapia, W.; Armas, G. Estudio de la Actividad Antibacteriana y Tóxica del KUISHIP (*Jacaranda copaia*). *La Granja Rev. Ciencias la Vida* **2014**, 19 (1), 12-20.
- (52) Rubio Fontanills, Y.; Valdivia Ávila, A. L.; Camacho Campos, C.; Matos Trujillo, M.; Sosa del Castillo, M.; Pérez Hernández, Y. Composición fitoquímica y actividad antibacteriana de extractos de hoja de *Hamelia patens* Jacq . *Biotecnol. Veg.* **2018**, 18 (1), 37-45.

## ANEXOS



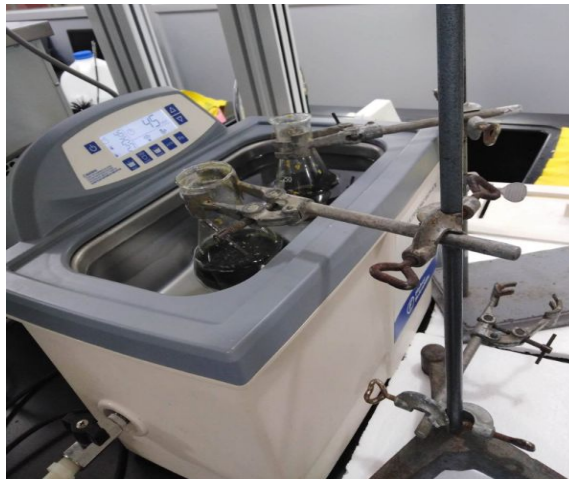
**A 1.** *Verbena litoralis* Kunth



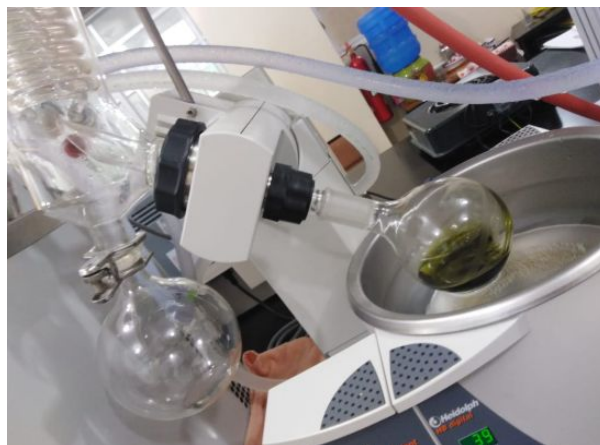
**A 2.** *Verbena litoralis* Kunth



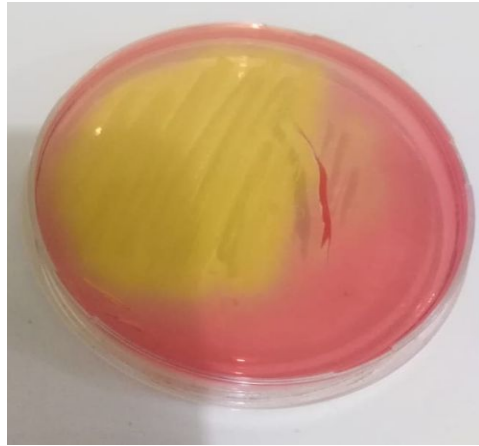
**A 3.** Tallos de *Verbena litoralis* Kunth



**A 4.** Extracción Maceración asistida por ultrasonido



**A 5.** Preparación del extracto seco por rotaevaporador



A 6. Cepa de *Staphylococcus aureus*



A 7. Autoclave



A 8. Preparación de diluciones.

