



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**  
**SEDE CUENCA**  
**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

DETERMINACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS  
EXTRACTOS ELABORADOS CON HIERBA LUISA (*Cymbopogon citratus*) FRENTE  
A LAS BACTERIAS *Escherichia coli* Y *Staphylococcus aureus*

Trabajo de titulación previo a la obtención del  
título de Ingeniera Biotecnóloga

AUTORA: NOELIA SALOMÉ ORTIZ GALINDO

TUTORA: DRA. MÓNICA JUDITH ESPADERO BERMEO, MSc

Cuenca - Ecuador

2023

## CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Noelia Salomé Ortiz Galindo con documento de identificación N° 0105773600, manifiesto que:

Soy la autora y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Cuenca, 22 de septiembre del 2023

Atentamente,

Handwritten signature in black ink, reading "NOELIA ORTIZ G." with a vertical line extending downwards from the "N".

---

Noelia Salomé Ortiz Galindo

0105773600

## CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Yo, Noelia Salomé Ortiz Galindo con documento de identificación No. 0105773600, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autora del Trabajo experimental: “Determinación in vitro de la actividad antimicrobiana de los extractos elaborados con hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*”, mismo que se ha desarrollado para optar el título de: Ingeniera Biotecnóloga, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 22 de septiembre del 2023

Atentamente,

Handwritten signature in blue ink that reads "NOELIA ORTIZ G." with a vertical line extending downwards from the letter 'N'.

---

Noelia Salomé Ortiz Galindo

0105773600

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Mónica Judith Espadero Bermeo con documento de identificación N°0103645412, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: DETERMINACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS ELABORADOS CON HIERBA LUISA (*CYMBOPOGON CITRATUS*) FRENTE A LAS BACTERIAS *ESCHERICHIA COLI* Y *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*, realizado por Noelia Salomé Ortiz Galindo con documento de identificación N°0105773600, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción de Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Cuenca, 22 de septiembre del 2023

Atentamente,

A handwritten signature in blue ink, enclosed within a large, hand-drawn oval. The signature appears to read 'Mónica Judith Espadero Bermeo'.

---

Dra. Mónica Judith Espadero Bermeo, MSc

0103645412

## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar en primer lugar a mis padres Isaac y Jenny, con su amor, apoyo incondicional y sacrificio han sido una inspiración para mí.

A mis hermanas Ángeles y Cami, quienes han estado a mi lado durante todo el proceso. Su apoyo, palabras de aliento y risas compartidas me han permitido seguir adelante.

También quiero dedicarme a mí misma, como un recordatorio de mi capacidad para alcanzar mis metas.

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi agradecimiento, en primer lugar, a Dios por sus bendiciones y por brindarme la oportunidad de tener una extraordinaria familia que siempre han creído en mí.

A mis padres Isaac y Jenny; a mis hermanas Ángeles y Cami, y a mi abuelito Cesitar que se encuentra en el cielo. Gracias por ser los principales impulsores de mis sueños, por confiar y creer en mí.

Quiero hacer una mención especial a mi madre, Jenny, por ser ejemplar y siempre estar a mi lado. Gracias por inculcarme valores y principios que me han convertido en la mujer que soy. A ti Tato, gracias por haber compartido mi sueño y por recordarme constantemente que puedo lograr todo aquello que me proponga.

A mis profesores, Dra. Inés, Dra. Myriam, Dr. Pablo, Ing. Mateo, Ing. Edmond, gracias por brindar sus conocimientos y experiencias conmigo, su dedicación me ha dejado una huella duradera en mi vida, y siempre recordaré con gratitud el impacto positivo que me han brindado.

A mi tutora Dra. Mónica Espadero y la Ing. Sandy por ser guía en la elaboración de este proyecto. Su apoyo y orientación han construido al éxito de este proyecto.

A mis amigos, Xime, Gaby, Cami, Eri, Yorly, Anto y Mady quienes se han encargado de apoyarme de manera infinita en los buenos y malos momentos.

Por último, quiero agradecer a todas las personas que me han apoyado a hacer realidad este sueño. Su apoyo ha sido fundamental en cada paso del camino.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
CAPÍTULO I .....	3
Introducción .....	3
1.1 Planteamiento del Problema .....	4
1.2 Pregunta de Investigación .....	5
1.3 Delimitación del Problema .....	5
1.4 Justificación.....	5
1.5 Objetivos .....	6
1.5.1 Objetivo General .....	6
1.5.2 Objetivos Específicos.....	6
1.6 Hipótesis .....	7
1.6.1 Hipótesis Nula.....	7
1.6.2 Hipótesis Alternativa .....	7
CAPÍTULO II .....	8
Marco de Referencia.....	8
Antecedentes Investigativos .....	8
Bases Teóricas .....	10
2.1 Hierba Luisa ( <i>Cymbopogon citratus</i> ) .....	10
2.1.1 Clasificación Taxonómica.....	10
2.1.2 Descripción botánica.....	11
2.1.3 Composición química <i>Cymbopogon citratus</i> (hierba luisa).....	12
2.1.4 Usos de la planta .....	13

2.2	Extractos vegetales .....	15
2.2.1	Pretratamientos de material vegetal.....	15
2.2.2	Métodos de obtención de extractos.....	16
2.3	Microorganismos Patógenos .....	19
2.3.1	<i>Escherichia Coli</i> .....	20
2.3	Actividad Antimicrobiana de extractos vegetales.....	22
2.3.1	Difusión en discos o prueba de Kirby- Bauer.....	23
2.4	Caracterización de metabolitos secundarios .....	24
2.4.1	Cromatografía de capa fina (TLC).....	25
2.4.2	Bioautografía.....	26
CAPÍTULO III .....		28
Marco Metodológico.....		28
3.1	Nivel de Investigación .....	28
3.2	Diseño de Investigación.....	28
3.3	Unidad Experimental.....	28
3.4	Población y Muestra .....	28
3.5	Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	29
3.6	Técnicas de procesamiento de datos.....	29
3.7	Procedimientos Experimentales.....	29
3.7.1	Acondicionamiento de la materia prima.....	30
3.7.2	Caracterización Fitoquímica Cualitativo .....	31
3.7.3	Activación de la Bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 .....	33
3.7.4	Verificación de la Cepa bacteriana <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739.....	34



3.7.5 Difusión en discos.....	34
3.7.6 Bioautografía.....	36
CAPÍTULO IV .....	38
Resultados y discusión .....	38
4.1 Extracción por percolación y concentración de los extractos .....	38
4.2 Caracterización Fitoquímica Cualitativo .....	38
4.3 Determinación de la actividad antimicrobiana (Difusión en discos) .....	42
4.4 Análisis estadístico para verificar el solvente o tratamiento que genera mayor inhibición frente a la cepa <i>S. aureus</i> ATCC 25923 .....	44
4.5 Detección de compuestos con propiedades antimicrobianas del extracto de etanol contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 .....	46
CAPÍTULO V .....	50
Conclusiones y Recomendaciones .....	50
5.1 Conclusiones .....	50
5.2 Recomendaciones .....	51
Referencias.....	53
Apéndices y Anexos .....	66

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Taxonomía de la planta de <i>Cymbopogon citratus</i> .....	11
<b>Tabla 2</b> Resultados volumétricos de los extractos (etanólico, metanólico e hidroalcohólico).....	38
<b>Tabla 3</b> Tamizaje fitoquímico .....	38
<b>Tabla 4</b> Actividad antimicrobiana de los diferentes tipos de extractos frente a <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .....	42
<b>Tabla 5</b> Resultados obtenidos en la bioautografía.....	47

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Fitocomponentes presentes en el aceite esencial de hojas de hierba luisa .....	12
<b>Figura 2</b> Medio Agar sangre para preservar las colinas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 .....	33
<b>Figura 3</b> CHROMagar para verificar la existencia de <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 .	34
<b>Figura 4</b> Tamizaje fitoquímico de Alcaloides .....	39
<b>Figura 5</b> Tamizaje fitoquímico de las Saponinas .....	40
<b>Figura 6</b> .....	40
<b>Figura 7</b> Tamizaje fitoquímico de flavonoides .....	41
<b>Figura 8</b> Método de Kirby-Bauer de la bacteria <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 .....	43
<b>Figura 9</b> Método de Kirby-Bauer de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25623 .....	43
<b>Figura 10</b> Densidad .....	44
<b>Figura 11</b> Histograma .....	45
<b>Figura 12</b> Comparación de la distribución de los tratamientos utilizados .....	46
<b>Figura 13</b> Cromatografía en capa fina.....	47
<b>Figura 14</b> Bioautografía en capa fina .....	48

## RESUMEN

El estudio de las plantas ha generado un descubrimiento de compuestos bioactivos con potencial terapéutico heredados del conocimiento ancestral, que pueden revolucionar el tratamiento de enfermedades y generar nuevas perspectivas en el campo de la medicina moderna y su lucha contra las bacterias patógenas que amenazan la salud. El objetivo de esta investigación fue determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de *Cymbopogon citratus* frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, comprobando su capacidad inhibitoria. Mediante tamizaje fitoquímico, se evaluaron los extractos obtenidos con diferentes solventes (etanólico, metanólico e hidroalcohólico) y su actividad antimicrobiana con el método en discos (también conocido como prueba de Kirby-Bauer). Asimismo, por medio de la técnica de bioautografía, se trató de identificar los supuestos metabolitos secundarios responsables de la inhibición. Los resultados del tamizaje fitoquímico determinaron la presencia de taninos y fenoles en los extractos analizados, y se observó inhibición contra la bacteria *Staphylococcus aureus* en los extractos metanólicos y etanólicos. Mediante análisis estadístico, utilizando RStudio, se determinó que el tratamiento etanólico generó mayor inhibición. La bioautografía permitió determinar los posibles metabolitos secundarios responsables de la inhibición como el geraniol (Rf de 0,225), el borneol (Rf de 0,25) o el safrol (Rf de 0,8875). Los compuestos bioactivos presentes en *Cymbopogon citratus* podrían ser utilizados como una alternativa al uso de compuestos sintéticos para combatir con bacterias patógenas ya sea en la medicina, industria, cosmética, etc.

**Palabras claves:** *Cymbopogon citratus*, planta medicinal, extractos, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, actividad antimicrobiana

## ABSTRACT

The study of plants has led to the discovery of bioactive compounds with therapeutic potential inherited from ancestral knowledge, which can revolutionize the treatment of diseases and generate new perspectives in the field of modern medicine and its fight against pathogenic bacteria that threaten health. The objective of this research was to determine the antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria, proving their inhibitory capacity. By means of phytochemical screening, the extracts obtained with different solvents and their antimicrobial activity were evaluated with the disc diffusion test. Likewise, by means of the bioautography technique, we tried to identify the putative secondary metabolites responsible for the inhibition. The results determined the presence of tannins and phenols in the extracts analyzed, and inhibition against *Staphylococcus aureus* bacteria was observed in the methanolic and ethanolic extracts. Statistical analysis, using RStudio, determined that the ethanolic treatment generated greater inhibition. Bioautography made it possible to determine the possible secondary metabolites responsible for the inhibition, such as geraniol (Rf of 0.225), borneol (Rf of 0.25) or safrole (Rf of 0.8875). The bioactive compounds present in *Cymbopogon citratus* could be used as an alternative to the use of synthetic compounds to fight with pathogenic bacteria in medicine, industry, cosmetics, etc.

**Key words:** *Cymbopogon citratus*, medicinal plant, extracts, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, antimicrobial activity.

## CAPÍTULO I

### Introducción

El estudio de las plantas se ha venido desarrollando debido a la detección y análisis de compuestos bioactivos, con el objetivo de aprovechar tales compuestos para la elaboración de productos naturales procesados de uso medicinal destinados a curar o tratar algún tipo de padecimiento o enfermedad (Gobierno del Ecuador, 2022).

Actualmente, el éxito de una droga depende de un estudio minuciosamente realizado que generalmente conlleva a una publicación científica, no obstante, estos conocimientos plasmados como revisiones bibliográficas son el producto de una acumulación de conocimientos que vienen desde un saber empírico ancestral (Sneader, 2005), puesto que el reino vegetal ha sido pionero en el desarrollo de estas drogas con el uso de plantas completas o sus partes y sus principios activos y metabolitos siendo capaces de actuar como agentes terapéuticos (Süntar, 2020).

Debido a la falta de acceso a medicinas modernas, muchos países han recurrido al uso de plantas como primera respuesta (Zolla, 1980), pues en algunos casos, estos países poseen gran parte de la biodiversidad mundial; siendo este el caso de Latinoamérica, una región megadiversa tanto en flora y fauna, como en conocimientos ancestrales bien conservados que han trascendido por generaciones (Calixto, 2005). Muchas de estas especies vegetales han sido objeto de estudio farmacológico, toxicológico, fitoquímico, etc., para el desarrollo de nuevos medicamentos, siendo un 35% aproximadamente de estas especies validadas en estudios clínicos para uso etnomédico (Salazar-Gómez & Alonso-Castro, 2022). Algunos ejemplos citados por (Juárez-Vázquez et al., 2013) como plantas medicinales encontradas en territorio Latinoamericano son la manzanilla (*Matricaria recutita*) usada para aliviar infecciones urinarias, conjuntivitis, dolores de estómago, etc.; la uña de gato (*Mimosa albida Humb*) para gastritis, heridas, cáncer; la verbena (*Verbena menthifolia Benth*) para aliviar la fiebre, entre otros ejemplares.

Los microorganismos pueden encontrarse en alimentos, agua, superficies, ambiente, etc.; por lo que existe una constante exposición a estos. Sin embargo, cuando estos microorganismos atacan un huésped son considerados patogénicos, pues pueden causar alteración de la fisiología normal de un organismo pluricelular (Van Baarlen et al., 2007). A pesar de los avances en diagnósticos, tratamientos, y procedimientos médicos y farmacológicos; las consecuencias para el ser humano de esta patogenicidad pueden ir desde las más leves (una infección controlable), hasta los más graves (una hospitalización con riesgo de agravamiento y muerte) (Svetaz et al., 2010).

### **1.1 Planteamiento del Problema**

La creciente frecuencia de infecciones por microorganismos se ha acrecentado en los últimos años debido a que actualmente se enfrenta una crisis global por el alarmante crecimiento de resistencia antimicrobiana impactando en la tasa de mortalidad mundial pues se dice que para el 2050 el número estimado de muertes debido a la resistencia ascenderá a los 10 millones (Aminov, 2017). Las bacterias son parte de este grupo de microorganismos que pueden ser benéficas o patógenos en la salud humana, algunas de estas últimas son *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, entre otras de interés.

*Staphylococcus aureus* son microorganismo facultativos intracelulares; su bacteriemia es considerada de suma importancia ya que cuenta con una tasa de incidencia de entre 20 y 50 casos por cada diez mil habitantes al año, de los cuales entre del 10 al 30% son más propensos a fallecer (Wozniak et al., 2020) ya que factores como la edad, acceso a los sistemas de salud, estado del sistema inmunológico y resistencia bacteriana son ejes claves para aumentar la probabilidad de un resultado positivo o negativo de la infección (van Hal et al., 2012). Así mismo, *Escherichia coli* es una bacteria anaerobia facultativa encontrada comúnmente dentro del sistema gastrointestinal. Frecuentemente está implicada en las infecciones bacterianas del sistema gástrico y urinario, infecciones sanguíneas y bacteriemias (Bonten et al., 2021). Las infecciones presentadas por estas bacterias tienen una tasa de

incidencia estimada de 48 personas por cada cien mil y una tasa de mortalidad de 12.4%; al igual que el *Staphylococcus aureus*, factores como la edad aumentan estas tasas de incidencia y respuesta positiva al tratamiento, en conjunto con la resistencia a los antimicrobianos (Doua et al., 2023).

Debido a esta acrecentada resistencia a los antimicrobianos tradicionales, se ha optado por la utilización de recursos biológicos como las hojas de *Cymbopogon citratus*, como posibles coadyuvantes frente a estos microorganismos. Es una especie comercialmente usada en diferentes campos entre ellos médicos tradicionales por sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, antiinflamatorias, etc. (Manvitha & Bidya, 2022).

## **1.2 Pregunta de Investigación**

*¿Los extractos elaborados a partir de *Cymbopogon citratus* presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*?*

## **1.3 Delimitación del Problema**

El desarrollo del proyecto titulado “Determinación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de los extractos elaborados con hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se realizará en la Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca dentro de los laboratorios de Ciencias de la Vida durante un periodo de 4 meses.

## **1.4 Justificación**

Los saberes ancestrales son conocimientos que se han transmitido de generación en generación y que han permitido a las comunidades aprovechar los recursos naturales de manera sostenible. A medida que la tecnología avanza, muchas culturas han abandonado las tradiciones convencionales en favor de soluciones modernas (Bastida, 2018). Sin embargo, las consecuencias de estas soluciones modernas pueden llegar a ser negativas para el medio ambiente, y generar una contaminación en ecosistemas, pues según datos obtenidos por (Winter et al., 2010), se han encontrado productos farmacéuticos, muchos de ellos biológicamente activos en hábitats acuáticos, los cuales representan una inminente amenaza contra especies silvestres.



La salud de las personas, como la conocida resistencia microbiana a los antibióticos, la cual según la (World Health Organization, 2022), los niveles de resistencia para *E. coli* y *S. aureus* en países en vías de desarrollo donde existe un número limitado de hospitales y un tratamiento inadecuado con antibióticos son del 42% y 35% respectivamente, siendo necesario recuperar dichos conocimientos ancestrales sobre las propiedades medicinales que ciertas plantas puedan proveer, como ejemplo la *Cymbopogon citratus*, es utilizada tradicionalmente como infusión para aliviar los dolores de estómago, cabeza y trastornos de sueño (Reina et al., 2022), así también la *Mentha piperita* la cual es usada por sus beneficios analgésicos, antiinflamatorios y antimicrobianos (P. Shah & Mello, 2004).

Considerando investigaciones previas sobre los extractos elaborados con *Cymbopogon citratus*, se plantea la determinación *in vitro* de la actividad antimicrobiana frente a bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Para verificar dicha actividad, se empleará la técnica de bioautografía, la cual permitirá identificar los posibles metabolitos secundarios que estén relacionados.

## **1.5 Objetivos**

### **1.5.1 Objetivo General**

Determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de *Cymbopogon citratus* frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, comprobando su capacidad inhibitoria

### **1.5.2 Objetivos Específicos**

- Obtener extractos de las hojas de *Cymbopogon citratus* con solventes de diferente polaridad mediante percolación, identificando metabolitos secundarios presentes en ellos.
- Determinar el porcentaje de efecto de inhibición de los extractos de *Cymbopogon citratus* mediante el método de difusión en discos, evaluando la actividad antimicrobiana.
- Identificar el posible metabolito secundario que presenta actividad antimicrobiana, determinando la presencia de compuestos bioactivos en la muestra y su potencial uso como agentes antimicrobianos mediante la técnica de bioautografía.

## **1.6 Hipótesis**

### **1.6.1 Hipótesis Nula**

Los extractos de *Cymbopogon citratus* no presentan actividad antimicrobiana frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

### **1.6.2 Hipótesis Alternativa**

Los extractos de *Cymbopogon citratus* presentan actividad antimicrobiana frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

## CAPÍTULO II

### Marco de Referencia

#### Antecedentes Investigativos

La necesidad de encontrar nuevos compuestos naturales con actividad antimicrobiana empieza como una respuesta a la resistencia a los antibióticos se debe a la utilización inadecuada de los fármacos, lo cual pone en peligro nuestra capacidad para combatir enfermedades infecciosas comunes, ya que algunas veces se vuelven imposibles de tratar a medida que los antibióticos pierden su capacidad de acción (Organización Mundial de la Salud, 2020). Así también como lo cita Cabrera Cao, Fdragas Fernández, & Guerrero Guerrero, 2005, es esencial llevar a cabo acciones médicas específicas que promuevan un estilo de vida saludable, utilizando para ello métodos naturales o tradicionales de curación. En este sentido, las plantas medicinales se han convertido en una fuente importante de nuevos compuestos bioactivos con potencial antimicrobiano. Además, los compuestos naturales derivados de plantas también desempeñan un papel como conservantes ya sea en la industria alimentaria o cosmética. Estos componentes poseen propiedades antioxidantes y antimicrobianas, prolongando vida útil de los productos e impidiendo una contaminación por microorganismos (Ángel Enríquez-Estrella et al., 2023). Asimismo, existen plantas inmunomoduladores, capaces de implementar una acción farmacológica generando una respuesta inmune (López Luengo, 2008), aunque los datos disponibles aún son limitados, requiriendo más estudios para detectar su actividad anticancerígena (Fan, Midori, & David, 2021).

Desde 1997 se han reportado casos de fracaso terapéutico de la vancomicina debido a cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia intermedia, en las cuales la resistencia se debe a un engrosamiento de la pared celular y una disminución del entrecruzamiento, lo que dificulta la llegada del antibiótico al blanco (Andrés Rodríguez & Vesga, 2005).

La *Cymbopogon citratus*, conocida en Ecuador como "Hierba Luisa", es una planta herbácea originaria del Suroeste Asiático, concretamente de India. Esta especie se encuentra

ampliamente distribuida en zonas tropicales, subtropicales y templadas de todo el mundo, y destaca por su característico aroma cítrico y sus propiedades medicinales. La *Cymbopogon citratus* pertenece al género *Cymbopogon* y a la familia *Poaceae*. Esta planta herbácea ha sido utilizada en la medicina tradicional debido a sus propiedades curativas. En la actualidad, investigaciones recientes han encontrado compuestos químicos con propiedades antibacterianas, antiespasmódicas, antiinflamatorias y antioxidantes (Andramuño, 2022). Además, se ha demostrado que la *Cymbopogon citratus* contiene varios metabolitos secundarios, entre ellos limoneno, citral, geraniol, sesquiterpenos, verbenona, aldehído y cetonas (Loachamín, 2016). Estos componentes químicos se han asociado con diferentes beneficios para la salud y pueden ser de gran interés para su uso en la medicina moderna.

En el estudio realizado por (Okigbo & Mmekka, 2008) se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos de hojas de *Cymbopogon citratus* frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los resultados demostraron que tanto los extractos obtenidos con etanol, como aquellos obtenidos en agua fría y caliente, presentaron efectos inhibitorios sobre los dos microorganismos. Estudios realizados por (Mendoza Buñay, 2018) también dio a conocer que los aceites de *Cymbopogon citratus* presentaron actividad antimicrobiana.

La identificación de los metabolitos presentes en la planta se desarrolló mediante la técnica de la cromatografía, propuesta por el químico alemán Mikhail Tsvet en 1906, permitiendo la separación de los componentes de una mezcla y su posterior identificación (Claros Díaz, 2003). En contraste, la técnica de "TLC bioautography" fue desarrollada por el científico japonés Yoshinori en 1960 como una técnica de análisis cuantitativa para la identificación de compuestos bioactivos en extractos de plantas, alimentos, productos naturales, productos farmacéuticos y otros materiales biológicos que son ampliamente reportados como beneficiosos para la salud humana (Salehi et al., 2018).

La técnica de bioautografía consiste en la separación de los componentes de los extractos por cromatografía y su posterior detección mediante la incubación de la placa

cromática con una suspensión bacteriana. Los compuestos antimicrobianos presentes en el extracto se detectan como zonas de inhibición de crecimiento bacteriano (Aguirre Loaiza & Coraizaca Guzmán, 2022).

Con base en los argumentos presentados en investigaciones relacionadas con el tema de la tesis, se ha podido sintetizar información teórica, resultados y conclusiones de diferentes estudios que fundamentan la importancia de verificar, a través de la investigación, el efecto de un potencial antimicrobiano, ya que esto podría generar un producto que, al ser utilizado, permita un control adecuado

## **Bases Teóricas**

### **2.1 Hierba Luisa (*Cymbopogon citratus*)**

La planta de *Cymbopogon citratus* tiene orígenes en el sureste de Asia, no obstante, en la actualidad se la encuentra esparcida alrededor del mundo por su forma espontánea y fácil de crecimiento, principalmente en zonas tropicales o biomas tipo sabanas. Su vocablo deriva del griego y latín antiguo ya que *Cymbopogon* proviene de “kymbe” (barco) y “pogon” (barba) haciendo referencia a la disposición de las espigas de las flores; por otro lado, el vocablo latín de *citratus* significa hojas con olor a limón, una característica sumamente presente en esta especie (Negrelle & Gomes, 2007).

Esta planta tiene una gran cantidad de nombres dependiendo del lugar en donde crezca. En Francia se la conoce como “Citronnelle”; en países de habla inglesa se la conoce como “Lemon Grass”; en Brasil, “Capim-santo” (Machraoui et al., 2018) y en diferentes regiones hispanohablantes su nombre cambia respondiendo a limoncillo, malojillo, zacate de limón, pasto limón y conocido en Ecuador como hierba luisa (Soto Ortiz et al., 2002).

#### **2.1.1 Clasificación Taxonómica**

La clasificación taxonómica dada por (Nambiar, 2012) para la planta de hierba luisa se define en la tabla 1.

**Tabla 1**

*Taxonomía de la planta de Cymbopogon citratus*

<b>Nombre Científico</b>	<b><i>Cymbopogon citratus</i></b>
<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Liliopsida
<b>Orden:</b>	Poales
<b>Familia:</b>	Poaceae
<b>Subfamilia:</b>	Panicoideae
<b>Tribu</b>	Andropogoneae
<b>Género:</b>	<i>Cymbopogon</i>
<b>Especie:</b>	<i>Citratus</i>

Fuente: Autor

### **2.1.2 Descripción botánica**

Esta planta es considerada una hierba perenne, su crecimiento frondoso forma matas de hasta 3 metros de altura con racimos en pares de espigas de aproximadamente 30 a 60 cm de largo para inflorescencia parcial. Sus glumas son iguales o casi iguales siendo las inferiores lanceoladas, bicarinata, con ápice bilobulado y con márgenes agudamente curvados de la mitad hacia arriba, mientras que la superior es lanceolada y nervada (Negrelle & Gomes, 2007). Su propagación se da mediante divisiones de la raíz, su crecimiento se potencia en climas tropicales dado que las precipitaciones abundantes permiten que la planta pueda ser cosechada con mayor regularidad durante todo el año, aunque también puede crecer en suelos pobres ya que es resistente a la sequía (Lawal et al., 2017).

Sus hojas diminutas, largas y aciculares tienen una forma peculiar de tira midiendo entre 1.3 y 2.5 cm de ancho, 0.9 cm de largo y sus puntas son sueltas y color verde azulado brillante con un aroma cítrico cuando se muelen debido a la presencia de citral y alto contenido

de neral y aldehído geranial. El limbo de las mismas es de unos 18 a 36 cm con venación paralela y características de caída vistosa. Las hojas contienen del 1 al 2% de aceite esencial (Oladeji et al., 2019). Este tipo de plantas no producen flores ni panículas (cultivares) (G. Shah et al., 2011).

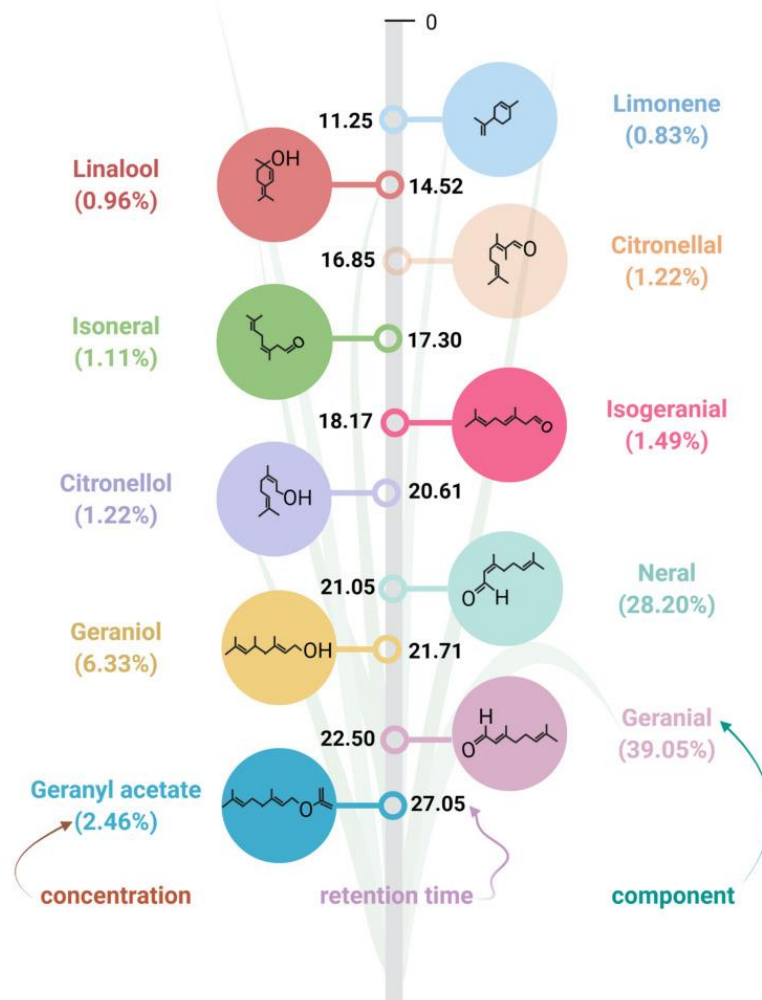
### **2.1.3 Composición química *Cymbopogon citratus* (hierba luisa)**

Los metabolitos presentes en la planta de hierba luisa son extensos, cada uno con una concentración y función diferente. Para evaluar cada uno de ellos se usa extracto o aceite esencial proveniente en su mayoría de las hojas de esta planta, pues son aquellas que concentran los principios activos (Kiani et al., 2022) en donde el citral, una mezcla de dos aldehídos y un terpeno estereoisomérico, es uno de los componentes mayoritarios (65-85%) de esta planta, pues es aquel que le confiere su aroma característico a limón (Alzate O et al., 2009).

Los aldehídos son uno de los grupos funcionales más prevalentes, sin embargo, existen otros constituyentes como terpenos (linalool, geraniol, citronelol, nerol, acetato de linalino, acetato de linalino,  $\alpha$ -pineno, limoneno, mireceno, etc) evidenciados en la Figura 1 (Joy et al., 2006)), componentes fenólicos- flavonoides (eugenol, ácido quínico, tricín, etc.) (Oladeji et al., 2019) así también presencia de taninos, saponinas, alcaloides, esteroides, cumarinas y otros compuestos minerales como sodio, potasio, calcio, hierro, magnesio, zinc y fósforo (Nambiar, 2012)

#### **Figura 1**

*Fitocomponentes presentes en el aceite esencial de hojas de hierba luisa*



Fuente: (Mukarram et al., 2021)

#### 2.1.4 Usos de la planta

Gracias a su rica estructura en metabolitos y principios activos, esta planta y sus semejantes se han abierto paso en varias industrias, pues se ha demostrado científicamente que las aplicaciones y efectos que esta puede llegar a tener frente a problemáticas o tendencias actuales. Las partes de la planta que se usan dependen de la industria a la que se apliquen, siendo así por ejemplo que sus hojas pueden ser utilizadas como fuente de celulosa para la producción de papel y cartón (Joy et al., 2006). Dentro de la industria cosmética, dada su fragancia se usa como ingrediente en la fabricación de productos como jabones, perfumes, vela, repelente de algunos insectos e incluso por sus estudios preliminares se podría usar en la formulación cosméticas con actividad antioxidante puesto



que previene daños en la piel causados por el estrés oxidativo, es decir, presentándose en el mercado una emulsión “anti-edad” dado que este efecto antioxidante podría mejorar los desórdenes degenerativos de la piel que aceleran el proceso de envejecimiento (Menut et al., 2000).

Así mismo en la industria culinaria o alimenticia es empleado como ingrediente tanto en comidas (curries, sopas, ensaladas) como bebidas (cocteles, infusiones) (Nambiar, 2012), inclusive su actividad antioxidante y antimicrobial lo hace apto para muchas funciones entre ellas su uso como preservante alimenticio (Faheem et al., 2022)

Por otro lado, en la industria médica - farmacológica el uso de esta planta se ha venido dando hace ya milenios atrás, pues sus hojas, tallo y parte aérea son usadas como tratamiento para diferentes sintomatologías o enfermedades como fiebres, dolores menstruales, problemas del estómago, etc. (Siew et al., 2014). También gracias a sus metabolitos puede ayudar a reducir el riesgo de padecer hipertensión y obesidad y posibles enfermedades causadas por el colesterol alto. Sus fenoles y flavonoides pueden actuar como antiinflamatorios y antioxidantes. De la misma manera puede ejercer efecto ansiolítico leve y como un potencial inhibidor de tumores cancerosos, es decir un efecto anti cancerígeno (Kiani et al., 2022).

Tanto el aceite como el extracto han demostrado también un potencial efecto antimicrobiano frente a una gran variedad de microorganismos patógenos (hongos, bacterias, virus); su capacidad antibacteriana es de amplio espectro frente a bacterias tanto grampositivas como gramnegativas (Enríquez-Estrella et al., 2023) induciendo la destrucción de biopelículas bacterianas y dificultando el crecimiento y desarrollo bacterianos, además de desestabilizar los enlaces entre la bicapa lipídica y neutralizar las bacterias mediante la desintegración de la membrana (Mukarram et al., 2021).

## **2.2 Extractos vegetales**

La extracción no es más que la separación o de la mezcla de muchos componentes activos naturales contenidos dentro de los tejidos o partes de las plantas (El-Shemy, 2022). El proceso de extracción de biomoléculas a partir de plantas es uno de los más utilizados actualmente, este se lleva a cabo de diferentes maneras utilizando diversos métodos y solventes, tomando en cuenta las polaridades de los mismos con respecto a los principios activos. Se pueden considerar a los extractos como una fuente importante de compuestos para el descubrimiento de nuevos fármacos que parten de activos naturales por las propiedades que estas plantas pueden ofrecer frente a ciertas enfermedades, desórdenes o afecciones. Para poder determinar el uso y acción de estos bioactivos es necesario hacer un análisis y evaluar, clasificar y estudiar los metabolitos presentes en estos extractos (Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components, 2013).

### **2.2.1 Pretratamientos de material vegetal**

Para poder extraer los bioactivos de las plantas, el material vegetal a utilizar (hojas, raíces, tallos, flores) deben cumplir con ciertas preparaciones o pre-tratamientos que preserven estas biomoléculas.

El uso de las muestras frescas es común, sin embargo, dado el tiempo que se necesita para realizar un proceso de experimentación el uso de material seco es el más óptimo para prevenir el deterioro de los mismos. Por otro lado, al disminuir el tamaño de partícula de una muestra se aumenta la superficie de contacto con el solvente, por lo que moler las muestras o hacerlas polvo puede aumentar la eficiencia de extracción de los compuestos bioactivos deseados (Azwanida, 2015).

Existen otras técnicas de secado y pretratamiento de muestras partiendo del secado convencional al aire en donde el tiempo total depende del tipo de muestra, su ventaja es la preservación mayoritaria de componentes al no aplicar altas temperaturas, sin embargo, se corre un mayor riesgo de contaminación. El secado por microondas utiliza radiación

electromagnética que posee campos eléctricos y magnéticos, este método puede acortar el tiempo de secado, pero a veces provoca la degradación de los fitoquímicos. El secado al horno es otro método de pre extracción que utiliza energía térmica para eliminar la humedad de las muestras, a este se lo considera como uno de los procesos térmicos más fáciles y rápidos que puede preservar los fitoquímicos, no obstante, existen otros compuestos con alta sensibilidad a altas temperaturas (Azwanida, 2015). Por último, la liofilización es un método basado en el principio de la sublimación, un proceso en el que un sólido pasa a fase gaseosa sin entrar en fase líquida, es decir, la muestra se congela entre  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  antes para solidificar cualquier líquido (solvente, humedad) para posteriormente remover este hielo por sublimación aplicando presión al vacío. Por su complejidad y altos costos su uso está restringido a materiales delicados, sensibles al calor y de alto valor (Krakowska-Sieprawska et al., 2022).

### **2.2.2 Métodos de obtención de extractos**

La extracción no es más que la separación de productos naturales deseados de los compuestos de una materia prima (Dekebo, 2019). En el caso de plantas generalmente se extraen los metabolitos secundarios como alcaloides, terpenos, flavonoides, fenoles, etc, utilizando procedimientos estandarizados. La extracción con solventes es el método más utilizado, en donde el tamaño de las partículas de las materias primas, la relación solvente-sólido, la temperatura de extracción y la duración de la extracción afectarán a la eficacia de la extracción (Zhang et al., 2018).

Los solventes son sustancias químicas que se clasifican según el grupo químico al que pertenecen. Dentro de la familia de los alcoholes se encuentra el metanol, el etanol y el isopropanol (Gadea , Romano, & Santos, 2007). Los solventes polares se expresan con un polo positivo y otro negativo, en cambio los solventes apolares son sustancias que carecen de esta polaridad (Cova, 2018). Los alcoholes son compuestos que tiene un grupo hidroxilo (-OH) y la estructura es parecida a la del agua C-O-H donde el Hidrógeno (H) es reemplazado por un grupo alquilo.

El metanol con punto de ebullición de 65<sup>a</sup>C se le considera polar y pueden disolver componentes polares. Por otro lado, el etanol, con punto de ebullición 78<sup>a</sup>C, es empleado como combustible y capaz de disolver componentes polares. Además, los solventes polares también pueden disolver sustancias apolares mediante interacciones de fuerzas de Van der Waals con los solutos (Martínez & Iriondo, 2013).

La elección del solvente es necesario para la eficiencia de la extracción, donde se considere la polaridad. Es importante que el solvente tenga capacidad de disolver el componente deseado de la muestra llamado “analito” mientras se evita la extracción de otros componentes presentes en la muestra (Soto-García & Rosales-Castro, 2016).

Para la extracción con solventes es crucial tomar en cuenta la selectividad, la solubilidad, el coste y la seguridad de este; así como la estabilidad al calor de la muestra, la duración de la extracción, el uso al que se dispone y el volumen final requerido. El etanol, metanol y agua son considerados como solventes universales para investigación fitoquímica (Abubakar & Haque, 2020). Algunos de los tipos de extracción convencionales se enlistan a continuación.

#### **2.2.2.1 Maceración**

Uno de los métodos más antiguos de este tipo de extracción es de tipo sólido-líquido en donde los materiales sólidos son colocados en un recipiente cerrado, añadiendo a la par el solvente y dejándolo reposar con agitación ocasional durante el tiempo suficiente para que el solvente se difunda a través de la pared celular y pueda solubilizar el componente presente en la planta. Este método es beneficioso para ciertas sustancias que son muy poco solubles y sólo requiere un contacto prolongado con el solvente, así como para fármacos menos potentes y baratos. Desafortunadamente el tiempo de extracción es largo y no extrae exhaustivamente la droga (Rasul, 2018) .

#### **2.2.2.2 Decocción**

Es un método adecuado para la extracción de los componentes solubles en agua, estos no pueden utilizarse para componentes termolábiles o volátiles. En este proceso, la preparación líquida se hace hirviendo el material vegetal (generalmente plantas duras y fibrosas, cortezas y raíces) con agua, es decir, el material vegetal seco, molido y pulverizado se coloca en un recipiente limpio con agua y agitación, aplicando a continuación calor durante todo el proceso para acelerar la extracción (Rasul, 2018). La proporción entre solvente y fármaco crudo suele ser de 4:1 o 16:1 (Abubakar & Haque, 2020).

#### **2.2.2.3 Infusión**

Es un proceso muy similar a la extracción por maceración, ya que sus procedimientos son semejantes. Aquí el material farmacológico se muele hasta obtener un polvo fino y colocarlo dentro de un recipiente limpio. A continuación, se vierte el solvente caliente o frío sobre este material, se deja en remojo y se mantiene durante un breve periodo de tiempo. Este método es apropiado para la preparación de extracto fresco antes de su uso (Abubakar & Haque, 2020).

#### **2.2.2.4 Digestión**

Se trata de un método de extracción que implica el uso de calor moderado durante el proceso de extracción. El solvente de extracción se vierte en un recipiente seguido del material en polvo. La mezcla se coloca sobre un baño de agua o en horno durante todo el proceso para disminuir la viscosidad del solvente de extracción y mejorar la eliminación de metabolitos secundarios. Este método es adecuado para materiales vegetales que son fácilmente solubles (Abubakar & Haque, 2020).

#### **2.2.2.5 Percolación**

El aparato utilizado en este proceso se llama percolador (un recipiente de vidrio de forma cónica estrecha con abertura en ambos extremos). El material vegetal seco, molido y pulverizado se humedece con el solvente de extracción en un recipiente limpio. Se añade

más cantidad de solvente y la mezcla se mantiene durante en reposo (aproximadamente 4 horas) para luego transferir el contenido a otro percolador con el extremo inferior cerrado y nuevamente dejándolo en reposo mínimo 24 horas. El solvente de extracción se vierte desde la parte superior hasta que el material farmacológico esté completamente saturado. A continuación, se abre la parte inferior del percolador y se deja gotear lentamente el líquido. Se añade continuamente cierta cantidad de solvente, y la extracción tiene lugar por fuerza gravitacional, empujando el solvente a través del material de la droga hacia abajo, es decir el solvente saturado se sustituye constantemente por solvente fresco (Hidayat & Wulandari, 2021). La adición de solvente se detiene cuando el volumen del solvente añadido alcanza el 75% de la cantidad prevista de todo el preparado. El extracto se separa por filtración seguida de decantación (Abubakar & Haque, 2020).

Dado que la transferencia de masa del principio activo también depende de su solubilidad con el solvente, el calentamiento del mismo puede mejorar la transferencia de masa. Además, si el solvente en equilibrio con el material vegetal se sustituye por solvente fresco, se modifica el gradiente de concentración. Esto da lugar a distintos tipos de extracciones: percolación en frío, percolación en caliente y concentración (Handa et al., 2008).

Existen otro tipo de extracciones más complejas que difieren la una de las otras por sus ventajas y desventajas con respecto al resultado final requerido, algunos de ellos son: la extracción por Soxhlet, extracción asistida por ultrasonido, asistida por microondas, asistida por enzimas, extracción acelerada con solventes, por fluidos supercríticos, entre otros (Dekebo, 2019).

### **2.3 Microorganismos Patógenos**

Los organismos superiores como plantas, animales y seres humanos viven en frecuente contacto con innumerables microorganismos, estos utilizan a un huésped como fuente nutritiva resultando en relaciones de comensalismo (relación entre dos organismos en

la que uno se beneficia mientras que el otro no se ve afectado), sinergismo (una relación en la que ambos miembros se benefician), amensalismo (una relación no nutricional en la que uno de los miembros se ve perjudicado) o parasitismo (en donde un organismo obtiene sus necesidades nutricionales de otro resultando perjudicial de algún modo) (Wilson, 2008).

De estas interrelaciones biológicas nacen nuevos términos que definen las nuevas interacciones de microorganismos con su hospedero, como patógeno, que hace referencia a uno de estos microorganismos capaces de causar un daño a su hospedero por su acción microbiana o por la respuesta inmune del huésped (Casadevall & Pirofski, 1999). La interacción de estos patógenos con un hospedero es para su beneficio propio resultado en algunos casos en que la salud del hospedero se vea afectada (Casadevall & Pirofski, 2014).

Las bacterias son microorganismos unicelulares que carecen de membrana nuclear, son metabólicamente activos, se dividen por fisión binaria a una gran velocidad. Desde el punto de vista médico, son una de las principales causas de enfermedades. Estos organismos existen tanto en forma parasitaria como de vida libre. Las bacterias patógenas constituyen sólo una pequeña proporción de las especies bacterianas; muchas bacterias no patógenas son beneficiosas para el ser humano (Baron, 1996).

### **2.3.1 *Escherichia Coli***

El género *Escherichia*, debe su nombre al pediatra alemán Theodor Escherich, está formado por bacilos gramnegativos y perteneciente a la familia bacteriana de las enterobacterias, es el comensal más frecuente del tracto gastrointestinal humano y de los animales de sangre caliente, así como uno de los patógenos más importantes (Gomes et al., 2016). Como comensal, vive en una asociación mutuamente beneficiosa con los hospedadores y rara vez causa enfermedades, sin embargo, también es uno de los patógenos humanos y animales más comunes, ya que es responsable de un amplio espectro de enfermedades. Las *E. coli* tienen características peculiares tales como facilidad de manipulación, disponibilidad de la secuencia completa del genoma y su capacidad para crecer

tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, lo que la convierte en un importante organismo para la biotecnología (Allocati et al., 2013).

Existen varios clones de *E. coli* que han adquirido atributos específicos de virulencia, lo que les confiere una mayor capacidad para adaptarse a nuevos ambientes y les permite causar un amplio espectro de enfermedades dentro y fuera del tracto digestivo, a estas últimas se las conoce como *E. coli* patogénica extraintestinal (Smith et al., 2007). Las consecuencias de la acción patológica de esta bacteria pueden presentarse como enfermedades entéricas, diarreicas, infecciones del tracto urinario, sepsis o meningitis manifestadas desde neonatos, niños, jóvenes, adultos hasta adultos mayores (Kaper et al., 2004).

### **2.3.2 *Staphylococcus aureus***

Desde el año de 1880 tras el descubrimiento de estas bacterias nombradas *Staphylococcus aureus* por el médico Alexander Ogston, han sido estudiadas por sus diferentes comportamientos, en su mayoría patogénicos, dentro del mundo microbiológico. Las *S. aureus* son bacterias gram positivas que tienen forma de cocos y tienden a disponerse en racimos que se asemejan a la "forma de uva" (Taylor & Unakal, 2023). Estos microorganismos pueden crecer de forma facultativa, es decir de forma aeróbica o anaeróbica. Se encuentra en el medio ambiente y también en la flora humana normal, localizada en la piel y las mucosas (con mayor frecuencia en la zona nasal) de la mayoría de los individuos sanos. La transmisión suele producirse por contacto directo, no obstante, algunas infecciones implican otros métodos de transmisión (J. Foster, 2002).

Existen compuestos producidos por estas bacterias como las adhesinas que le permiten adherirse y colonizar el huésped, así como también la secreción de enzimas y toxinas que fortalecen la invasión del mismo, así como son también aquellas responsables de las enfermedades como tal (Cervantes-García et al., 2014). Normalmente, las *S. aureus* no causan infecciones en la piel sana; sin embargo, si se permite que penetre en el torrente



sanguíneo y avance a los tejidos internos, esta bacteria puede causar diversas infecciones potencialmente graves derivando a neumonías, endocarditis u osteomielitis, siendo por esto que se la considera como un patógeno importante en la comunidad médica y en los hospitales por su elevada morbilidad y mortalidad (Berga, 2009).

### **2.3 Actividad Antimicrobiana de extractos vegetales**

El uso de plantas para tratar enfermedades es tan antiguo como la especie humana. Las observaciones populares sobre el uso y la eficacia de las plantas medicinales contribuyen significativamente a la divulgación de sus propiedades terapéuticas, aunque no siempre se conozcan del todo sus componentes químicos (Silva & Fernandes Júnior, 2010)

Es por esto que la creencia de que ciertas plantas tenían potencial curativo, abarca también a lo que actualmente caracterizarían como principios antimicrobianos. Inclusive algunas de estas medicinas todavía forman parte del tratamiento habitual de diversas enfermedades. Por ejemplo, el uso del ajo (*Allium sativum*) y el árbol del té (*Melaleuca alternifolia*) se describen como agentes antimicrobianos de amplio espectro (Ríos & Recio, 2005).

La flora de diferentes regiones como África o Latinoamérica no sólo es megadiversa, sino que además es en su mayoría endémica (Van Vuuren, 2008). Además de este patrimonio botánico único, también cuentan con una diversidad cultural de saberes ancestrales, en donde la curación tradicional es parte de estos grupos étnicos y aledaños formando parte inclusive del sistema medicinal más antiguo y de primera (Montenegro & Stephens, 2006). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha afirmado que el 80% del mundo en desarrollo todavía se beneficia del uso de medicinas tradicionales derivadas de plantas medicinales (WHO, s/f)

El uso extensivo, inapropiado, irregular e indiscriminado de antibióticos ha provocado la aparición de resistencia a los antimicrobianos, lo que hace que muchos de los medicamentos actualmente disponibles no sean efectivos, por lo que existe una creciente demanda para

desarrollar nuevos agentes antimicrobianos que sean capaces de disminuir el uso de antibióticos y hacer frente al desarrollo de resistencias. Esto ha llevado a los investigadores a aislar e identificar nuevas sustancias químicas bioactivas de las plantas para actuar contra esta resistencia (Dabur et al., 2008).

Algunos de esos compuestos activos muestran tanto actividad antibacteriana intrínseca como actividades modificadoras de la resistencia a los antibióticos, y algunos de ellos, aunque no son eficaces como antibióticos por sí solos cuando se combinan con antibióticos, pueden ayudar a superar la resistencia a los antibióticos en las bacterias. Los compuestos químicamente complejos tienen un gran potencial terapéutico, ya que tienen menos efectos secundarios que los fármacos sintéticos y menos probabilidades de desarrollar resistencia. La eficacia de los extractos de plantas medicinales para inhibir el crecimiento bacteriano también está relacionada con el efecto sinérgico entre los compuestos activos de los extractos (Vaou et al., 2021).

### **2.3.1 Difusión en discos o prueba de Kirby- Bauer**

Tras el aumento significativo de la resistencia a antimicrobianos y la imposibilidad actual de emplear fármacos de forma empírica. Los médicos necesitan una interpretación rápida y correcta con pruebas no automatizadas para aplicar estrategias terapéuticas adecuadas, sin embargo, estos sistemas automatizados de notificación no siempre proporcionan información completa y precisa sobre el fenotipo de resistencia a los antimicrobianos, lo que dificulta su interpretación (March Rosselló & Bratos Pérez, 2016).

El antibiograma es una prueba microbiológica utilizada en la actualidad para determinar la sensibilidad o susceptibilidad de un microorganismo a un tratamiento, es decir la respuesta que tienen generalmente bacterias hacia medicamentos antibióticos (Vazquez-Pertejo, 2022). La lectura interpretativa de un antibiograma pretende analizar el patrón global de susceptibilidad, no sólo el resultado para un antibiótico individual, y así predecir los mecanismos de resistencia subyacentes (Hernández, 2013).

Para realizar el antibiograma suelen utilizarse discos producidos comercialmente bajo normativas internacionales; estos discos permiten una correlación más o menos precisa de la concentración mínima inhibitoria que un antibiótico alcanzaría de manera “*in vivo*”. Las cepas utilizadas deben tener un patrón de sensibilidad ya conocido frente a antimicrobianos para que los resultados del antibiograma sean fiables. Por otro lado, la selección del antibiótico es crítica dependiendo del tipo de microorganismo tratado ya que estas pueden servir inclusive como controles positivos en un estudio. En cuanto al medio de cultivo, este generalmente es Müller-Hinton para cepas poco exigentes, sin embargo, existen adaptaciones dependiendo del microorganismo y sus requerimientos (Bernal R. & Guzmán, 1984). La lectura y comprensión de un antibiograma por tanto su interpretación, se basa en el reconocimiento del posible mecanismo en la base de la resistencia, que puede extenderse a fármacos no testados o que conducen el cambio de categoría obtenido *in vitro*, es decir, analizar fenotípicamente la sensibilidad y por ende deducir posibles mecanismos de resistencia (Tascini et al., 2016).

#### **2.4 Caracterización de metabolitos secundarios**

Las plantas están muy enriquecidas con metabolitos secundarios que a lo largo de los años se ha prestado para la producción y aplicación en los campos de la medicina popular, farmacéuticos, alimentos, fragancias, cosméticos y otras industrias. La presencia de estos metabolitos ha arrojado una pauta para innovar métodos únicos de caracterización de compuestos (Waseem & Low, 2015).

En los últimos años, el interés por el estudio de estos compuestos orgánicos proveniente de plantas y su actividad han aumentado. Pues luego de extraer el material por los diferentes métodos es necesario aislar y clarificar su estructura para poder comprender y evaluar su potencial terapéutico. Muchos factores influyen en la calidad de las hierbas, como la variación de las especies, las condiciones ambientales, el momento de la recolección, el almacenamiento y el procesado. Además, los extractos de hierbas pueden añadirse con otras plantas imprevistas. Por estas razones, el control de calidad de los extractos de hierbas estandarizadas es una parte esencial de cualquier investigación que tenga que ver con la

seguridad, la eficacia y la reproducibilidad terapéutica. El control de calidad no es fácil, porque los extractos medicinales son mezclas complejas de distintos compuestos y a menudo su identidad sólo se conoce parcialmente (Mauri & Pietta, 2000).

A la actualidad existen varios métodos de extracción y métodos analíticos para identificar los componentes de las plantas como la espectrofotometría, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), electroforesis capilar (CE), cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de gases (GC) con detección por ionización de llama (FID), cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS), etc., La combinación de procesos de separación e identificación forman técnicas ideales para el estudio cualitativo y cuantitativo de compuestos (Iordache et al., 2009).

#### **2.4.1 Cromatografía de capa fina (TLC)**

La cromatografía en capa fina (TLC) es uno de los métodos analíticos previstos por la Farmacopea Europea utilizados en el análisis de medicamentos a base de plantas, ya que se utiliza habitualmente para el análisis de muestras crudas con una preparación y purificación mínimas; es decir, esta técnica se utiliza ampliamente para la detección de moléculas biológicamente activas en matrices complejas (Ferey et al., 2017). Todos estos avances, equipos de TLC y automatización, lo han permitido encontrar un lugar en el ámbito de la cromatografía, debido a sus ventajas como simplicidad, versatilidad, rapidez de obtención de resultados, sensibilidad específica, alto rendimiento y preparación sencilla de la muestra (Bārzdīņa et al., 2022). La TLC es también el único método cromatográfico que puede mostrar los resultados como una imagen, lo que permite un enfoque diferencial más conveniente.

El TLC utiliza una fina placa de vidrio recubierta con óxido de aluminio o gel de sílice como fase sólida, y como fase móvil un disolvente elegido en función de las propiedades de los componentes de la mezcla. El principio de esta técnica es la distribución de un compuesto entre una fase fija sólida (la capa fina) aplicada a una placa de vidrio o plástico y una fase móvil líquida (solvente de elución) que se desplaza sobre la fase sólida (Geiss, 1987).

Se aplica una pequeña cantidad de un compuesto o mezcla a un punto inicial justo por encima del fondo del plato de TLC. Seguido de esto, la placa se revela en una cámara

de revelado que posee una piscina poco profunda de solvente por debajo del nivel en el que se aplicó la muestra. El disolvente es atraído a través de las partículas de la placa por la acción capilar, y a medida que el solvente se desplaza sobre la mezcla, cada compuesto permanecerá en la fase sólida o se disuelve en el solvente y asciende por la placa (Poole, 2003). El hecho de que el compuesto ascienda por la placa o no depende de las propiedades físicas de cada compuesto individual y, por tanto, de su estructura molecular, especialmente los grupos funcionales (Bele & Khale, 2011). Una vez eliminado los restos de solvente de la placa de TLC, se evalúan los resultados obtenidos de diferentes formas; una de ellas es a simple vista, pues esta no requiere mucho gasto ni aparatos y sigue siendo validada por las farmacopeas. La evaluación puede realizarse a la luz del día, utilizando luz reflejada o transmitida, o bien puede ser asistida por el uso de equipos UV que proporcionan iluminación de onda corta y/o larga. Si la placa de TLC tiene una capa que contiene un indicador de fluorescencia, las sustancias activas por UV hacen que la fluorescencia se apague total o parcialmente y se vea como puntos oscuros sobre un fondo brillante, esto puede ser observado con ayuda de un equipo UV a longitudes de onda de 254 y 365 nm (Hahn-Deinstrop, 2006).

#### **2.4.2 Bioautografía**

El análisis cromatográfico unido al método de detección biológica se denomina bioautografía. Se trata de una técnica eficaz y barata para el análisis fitoquímico de extractos de plantas con el fin de identificar esquemas bioactivos como actividad antimicrobiana. Puede realizarse tanto en laboratorios altamente desarrollados como en pequeños laboratorios de investigación que tienen un acceso mínimo a equipos sofisticados (Balouiri et al., 2016).

El cribado puede definirse como el primer procedimiento, que se aplica a una muestra analizada, para establecer la presencia o ausencia de determinados analitos. Los métodos de cribado por bioautografía se basan en las actividades biológicas, por ejemplo, antibacterianas, antifúngicas, antitumorales y antiprotozoarias de las sustancias analizadas (Homans & Fuchs, 1970).

Este método de detección puede combinarse con éxito con técnicas de cromatografía líquida en capas, como la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía en capa fina de alto rendimiento (HPTLC), la cromatografía en capa sobrepresionada (OPLC) y la electrocromatografía planar (PEC) (Choma & Grzelak, 2011).

En la bioautografía por TLC directa, la placa de TLC revelada se rocía con una suspensión fúngica o bacteriana o se sumerge en ella. Para esto se utiliza una suspensión de bacterias u hongos de ensayo. A continuación, la bioautografía se incuba a 25 °C durante 48 h en condiciones de humedad. Para la visualización del crecimiento microbiano se utilizan sales de tetrazolio; estas sales se pulverizan sobre el bioautografía y se reincuban a 25 °C durante 24 h o a 37 °C durante 3-4 h. Las deshidrogenasas de los microorganismos vivos convierten la sal de tetrazolio en un formazán púrpura (I. Choma & Jesionek, 2015). Las zonas blancas claras sobre un fondo púrpura en la placa de TLC indican la actividad antimicrobiana de la muestra (Dewanjee et al., 2015).

## CAPÍTULO III

### Marco Metodológico

#### 3.1 Nivel de Investigación

El proyecto se basó en una metodología descriptiva y correlacional, permitiendo determinar la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos, hidroalcohólicos y metanólicos elaborados con *Cymbopogon citratus* frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

#### 3.2 Diseño de Investigación

El diseño de investigación se consideró como experimental puro con un corte transversal ya que se manipula una variable de entrada o variable independiente, que en este caso son los tipos de solventes utilizados para la elaboración de los extractos mediante el análisis comparativo de *Cymbopogon citratus*. El propósito es obtener como variable dependiente de salida la actividad antimicrobiana.

#### 3.3 Unidad Experimental

La unidad experimental para este proyecto investigativo se basó en el crecimiento controlado de cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 8739. en un medio de agar Müller Hinton, sometidas a los tres tratamientos (hidroalcohólico, etanol y metanol) con su respectivo control positivo y negativo.

#### 3.4 Población y Muestra

La muestra de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) se obtuvo en el mercado municipal “9 de octubre” de la ciudad de Cuenca, Ecuador; se recolectó una muestra de 8 kg con un método de selección aleatoria para asegurar que la muestra sea representativa de la población total.

Variables

#### **Variable Dependiente**

Actividad antimicrobiana

### ***Variable Independiente***

Tipos de solvente utilizados para la elaboración del extracto de las hojas de *Cymbopogon citratus* (3 niveles)

### **3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

En la primera fase del proyecto, se llevó a cabo una revisión bibliográfica exhaustiva para identificar todos los metabolitos secundarios presentes en las hojas de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y obtener información relevante acerca de las propiedades antimicrobianas de la planta. Para ello, se utilizó diversos instrumentos de recolección de datos, como artículos científicos, bases de datos y libros. Todos estos recursos fueron citados y referenciados según la normativa APA de la séptima edición.

La fase experimental analizó la actividad antimicrobiana de los extractos de la planta mediante la técnica de difusión de discos y bioautografía en capa fina para identificar los posibles metabolitos secundarios responsable de la actividad antimicrobiana. Los resultados observados fueron recolectados y analizados de manera manual.

### **3.6 Técnicas de procesamiento de datos**

Los datos obtenidos se recolectaron y tabularon en el programa Microsoft Excel en donde se crearon tablas, gráficas, etc., que pudieron ordenar y mejorar la interpretación inicial de los resultados. Por otro lado, el análisis estadístico se evaluó empleando el software R-Studio en donde se trabajó con un diseño en bloque completamente aleatorizado.

### **3.7 Procedimientos Experimentales**

La marcha experimental consistió en seis fases que comprenden desde el acondicionamiento de la materia prima, extracción por percolación, caracterización fitoquímica y verificación de las bacterias hasta la determinación de la actividad microbiana y detección de compuestos, fundamentados con revisiones bibliográficas previas.



### **3.7.1 Acondicionamiento de la materia prima**

Siguiendo la investigación propuesta por Solís Bowen (2014), se llevará a cabo un proceso de acondicionamiento de hojas de la planta de *Cymbopogon citratus*.

#### **3.7.1.1 Recolección**

Se recolectaron 8 kg de hojas de la planta de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) del mercado "9 de octubre", las cuales serán colocadas dentro de bolsas plásticas.

#### **3.7.1.2 Lavado**

Se eliminaron las hojas que presenten signos de parasitismo y se seleccionan aquellas sin lesiones ni zonas oscuras, aptas para su utilización. Posteriormente, se procedió a lavar las hojas con agua potable, de manera individual; para luego colocar las hojas en agua destilada durante 10 minutos. Finalmente, se colocaron las hojas lavadas sobre una malla de acero inoxidable, cubierta con papel periódico para eliminar el exceso de agua durante un período de 24 horas.

#### **3.7.1.3 Secado**

Para el proceso de secado, se colocaron las hojas sobre una nueva bandeja en la estufa precalentada a 40°C durante 12 horas. Posterior a esto, se desecaron las hojas durante un período de 24 horas nuevamente y finalizar con el almacenamiento dentro de bolsas de papel.

#### **3.7.1.4 Pulverizado**

Para llevar a cabo este proceso, se utilizó el molino pulverizador para reducir el tamaño de las hojas secas en fragmentos más finos.

### **3.7.1.5 Extracción por Percolación**

La técnica de extracción por percolación con solventes es utilizada para la separación de los principios activos presentes en las hojas de *Cymbopogon citratus*. Este método de extracción se realiza de manera sólido-líquido continua. Para llevar a cabo la preparación del extracto, se seguirá el proceso descrito por USP30-NF25, 2007.

Se utilizó 790.76 g de materia sólida total de las cuales 250 g fueron para cada tratamiento en conjunto con 250 mL de cada solvente (etanol, metanol, hidroalcohólico) en un percolador con volumen de 500 mL, dejándolo en reposo durante 72 horas. Luego, se transfirió la mezcla percolada a un matraz de 250 mL llevándolo a posterior refrigeración durante 24 horas. Seguido de esto, el extracto se colocó dentro de un rotavapor a 50°C dejándolo hasta que se separe del solvente. El extracto permaneció en refrigeración a 4°C durante 5 días con el fin de asegurar la estabilidad de los metabolitos secundarios, posterior análisis y caracterización.

### **3.7.2 Caracterización Fitoquímica Cualitativo**

La identificación cualitativa de metabolitos secundarios en los tres tipos de extractos de las hojas de *Cymbopogon citratus* se llevará a cabo mediante el procedimiento descrito en el Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales de la Universidad de La Habana (Miranda Martínez, 2000).

#### **3.7.2.1 Ensayo de Dragendorff para determinación de alcaloides**

Con una alícuota de extracto (1 mL) en un tubo de ensayo, se agregó una gota de ácido clorhídrico al 1%. Luego, se calienta suavemente en un baño maría a 55°C para evaporar el solvente y adicionar tres gotas del reactivo Dragendorff. El ensayo se considera positivo si se observa:

Opalescencia (+)

Turbidez definida (++)

Precipitado anaranjado (+++)

### **3.7.2.2 Ensayo de cloruro férrico para determinación de taninos**

Para la determinación de taninos, se tomó una alícuota del extracto de 2 mL en un tubo de ensayo agregando tres gotas de tricloruro férrico al 5% (V/V). El ensayo se considera positivo:

Presenta un color azul oscuro (+)

### **3.7.2.3 Ensayo de reactivo de Fehling + $Na_2CO_3$ para la determinación de Saponinas**

Con una nueva alícuota del extracto (0,5 mL) en un tubo de ensayo, se agregan 0,5 mL de reactivo de Fehling y 0,5 mL de  $Na_2CO_3$  al 5% para luego llevar el tubo de ensayo a ebullición por 30 minutos. El ensayo se considera positivo:

Si se aprecia coloración rosa (+).

### **3.7.2.4 Ensayo de reactivo de Fehling + $Na_2CO_3$ al 5% para la determinación de Fenoles**

Se tomó una alícuota de extracto de 0,5 mL en un tubo de ensayo y se agregó 0,5 mL de reactivo de Fehling más 0,5 mL de  $Na_2CO_3$  al 5%. El ensayo se considera positivo:

Si se aprecia un color azul intenso

### **3.7.2.5 Ensayo de Shinoda para determinación de flavonoides**

Se tomó una alícuota del extracto (2 mL) en un tubo de ensayo y se agregó (1 mL) de ácido clorhídrico concentrado y una pequeña porción de cinta de magnesio metálico. Después de 5 minutos, se agregó 1 mL de alcohol amílico. El ensayo se considera positivo:

Si el alcohol amílico se tiñe amarillo, anaranjado o rojo intenso (+++).

### 3.7.2.6 Ensayo para la determinación de terpenoides

El ensayo requiere una alícuota del extracto (0,5 mL) a la cual se le adiciona tres gotas de anhídrido acético y tres gotas ácido sulfúrico concentrado. El ensayo es positivo:

Si desarrolla color morado intenso o café.

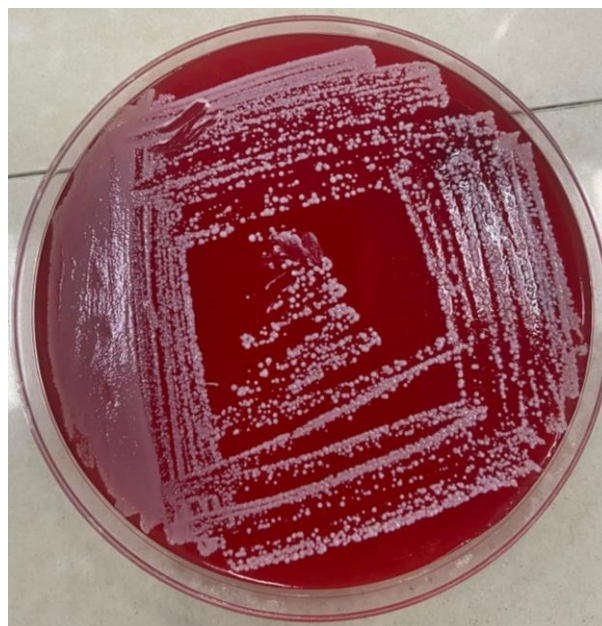
Manejo de las Bacterias

### 3.7.3 Activación de la Bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

El kit comercial "*Kwik Stick Duo*" fue adquirido en los laboratorios de ciencias de la vida de la Universidad politécnica salesiana. Para la activación de la cepa, se siguieron las indicaciones de acuerdo a la ficha técnica en el catálogo de la empresa MEDIBAC. Se extrajo un hisopo, el mismo que se encontraba sumergido en un fluido hidratante. Finalmente, se inoculó en dos cajas Petri que contenían agar sangre para su conservación y en un tubo con caldo nutritivo. Estos se colocaron en la estufa a una temperatura de  $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. (Figura 2).

#### Figura 2

*Medio Agar sangre para preservar las colinas de Staphylococcus aureus ATCC 25923*



Fuente: Autor

### 3.7.4 Verificación de la Cepa bacteriana *Escherichia coli* ATCC 8739

Se verificó la autenticidad de la cepa bacteriana *Escherichia coli* ATCC 8739 obtenidas en el laboratorio de ciencias de la vida por medio de una siembra en medios selectivos. Se preparó 1.52 g de medio de cultivo cromogénicos “CHROMagar” para un volumen de 40mL el cual fue depositado en dos cajas Petri. Posteriormente, la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739, se sembró en los medios utilizando la técnica de estriado (figura 3). Si la cepa se torna de color violeta- azulado en el medio CHROMagar, se considera que es la cepa correspondida.

#### Figura 3

*CHROMagar para verificar la existencia de Escherichia coli ATCC 8739*



Fuente: Autor

### 3.7.5 Difusión en discos

Para llevar a cabo la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de difusión en discos, se siguió el protocolo establecido en el manual de procedimientos de Sacsquispe Contreras & Velásquez Pomar (2002).

Inicialmente se preparó 23.94 g de Agar Mueller Hinton en 630 mL de agua destilada para un total de 30 cajas Petri estériles. Las suspensiones bacterianas se obtuvieron a partir de cultivos en “CHROMagar” y agar sangre con 24 horas de incubación. Se tomaron 6 colonias de *E. coli* y se suspendieron en 2.5 mL de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril. La turbidez se ajustando a 0,5 según la escala de McFarland, midiendo una absorbancia de 0.087 a una longitud de onda de 600nm, asegurando la concentración bacteriana adecuada ( $1.5 \times 10^8$  UFC-unidades formadoras de colonias). Finalmente, se utilizó la concentración para sembrar en las cajas Petri mediante siembra masiva. Para el cultivo de *S. aureus* se tomaron 4 colonias del medio de agar sangre y nuevamente se suspendió en 2.5 mL de suero fisiológico para ajustar la turbidez a 0.5 en la escala de McFarland, midiendo la absorbancia a 0.087 a una longitud de onda de 600 nm.

Al finalizar la siembra masiva, se llevó a cabo la colocación de los discos en blanco en cada extracto durante 10 minutos para garantizar la adecuada absorción. Una vez transcurrido el tiempo, se procedió a colocar los discos en la caja Petri en sus respectivas divisiones (metanólico en la parte izquierda, etanólico en la parte derecha e hidroalcohólico en la parte inferior). En el centro disco de Amikacina o Vancomicina, antibióticos utilizados como control positivo y a su vez, un apartado del disco con agua destilada estéril sin ningún tratamiento que corresponde al control negativo.

Por último, se incubó la placa a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2$  en la estufa durante 24 horas. El porcentaje de efecto de inhibición se determinó mediante la ecuación 1, tomando como referencia la medición del diámetro de la zona de inhibición del control positivo y la medición del halo de los extractos (Corzo Barragán, 2012).

### **Ecuación 1**

*Ecuación para determinar el porcentaje de efecto de inhibición*

$$\% \text{ Inhibición: } \frac{(\text{halo extracto} - \text{halo blanco})}{(\text{halo control positivo} - \text{halo blanco})} \times 100$$

Fuente: (Corzo Barragán, 2012).

### 3.7.6 Bioautografía

La técnica de bioautografía se ha establecido como un método efectivo para la detección y localización de los compuestos con propiedades antimicrobianas presentes en una muestra. Utilizando cromatogramas, los componentes activos de la muestra pueden ser separados e identificados (Sanchez Perez, 2019). Este proceso se realizó en los extractos que presentan la mejor actividad antimicrobiana contra las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Dewanjee et al., 2015).

Después de realizar la prueba de difusión en discos con las cepas bacterianas obtenidas, se procedió a preparar el inóculo de *S. aureus*. Este fue resembrado previamente durante 24 horas en un medio con caldo nutritivo, y posteriormente se colocó en un frasco de vidrio junto con 200 mL de caldo nutritivo + agar-agar (50:50 v/v).

A continuación, se realizó la lectura de la densidad óptica del cultivo mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm. Obteniendo una absorbancia aproximada de 0.4. Esta lectura confirmó que el inóculo alcanzó la concentración necesaria para la inmersión en las placas.

Posteriormente, en placas de sílica gel 60 con dimensiones de 3x10 cm se realizó cromatografía en capa fina (TLC), señalando longitudes de inicio y final con un lápiz de grafito. Se aplicó 20 µL de extracto etanólico en el inicio de la placa con micropipeta de 100 µL. Después, se eluyó la placa TLC en una cámara cromatográfica saturada con la fase móvil Cloroformo/éter dietílico/metanol (30:10:9, v/v/v) (Jesionek et al., 2015).

El solvente avanzó en la placa hasta 1cm antes de llegar al final. Se secó la placa con aire frío hasta la evaporación total de los solventes y se observaron las bandas por fluorescencia a 254 nm y 366 nm para evidenciar la separación de los compuestos.

Finalmente, la placa fue sumergida 10 segundos en 50 mL de la suspensión bacteriana de *S. aureus*, se dejó secar durante 2 minutos para luego colocarla en la estufa dentro de una cámara de vapor de agua a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2$  por 24 horas. Se retiró la placa y se sumergió en 50 mL de solución acuosa de colorante MTT de 0.5 (g/L) en 0.1% Tritón X-100 durante 60 segundos y fue empleada nuevamente en la cámara de vapor a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Finalmente, la placa se retiró y se sumergió en 50 mL de etanol al 70% por 10 segundos para su inhibición y observación de los resultados.



## CAPÍTULO IV

### Resultados y discusión

#### 4.1 Extracción por percolación y concentración de los extractos

De 790.76 gramos de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), al ser secado y molido se obtuvo por percolación 220 mL del extracto etanólico de aspecto verde oscuro; 140 mL de extracto metanólico de aspecto marrón verdoso, y 195 mL de extracto hidroalcohólico de aspecto marrón. Los extractos etanólico, metanólico e hidroalcohólico fueron concentrados utilizando el equipo rotavapor ajustando la temperatura a 50°C, como se indica en la tabla 2.

**Tabla 2**

*Resultados volumétricos de los extractos (etanólico, metanólico e hidroalcohólico)*

<b>Solvente utilizado</b>	<b>Materia prima (g)</b>	<b>Volumen inicial (mL)</b>	<b>Volumen final (mL)</b>	<b>Volumen concentrado (mL)</b>
<b>Etanol</b>	250	250	220	46
<b>Metanol</b>	250	250	140	40
<b>Hidroalcohólico</b>	250	250	195	60

Fuente: Autor

#### 4.2 Caracterización Fitoquímica Cualitativo

**Tabla 3**

*Tamizaje fitoquímico*

<b>Metabolito secundario</b>	<b>Extracto Etanólico</b>	<b>Extracto Metanólico</b>	<b>Extracto hidroalcohólico</b>
<b>Alcaloides</b>	+++	-	++
<b>Taninos</b>	+	+	+

<b>Saponinas</b>	-	-	-
<b>Fenoles</b>	+	+	+
<b>Flavonoides</b>	-	-	+++
<b>Terpenoides</b>	-	-	-

*Nota:* (+) Presencia del metabolito secundario (-) Ausencia del metabolito secundario

Fuente: Autor

En la tabla 3, se encuentran los datos obtenidos de cada ensayo. La presencia de alcaloides se evidenció en los extractos etanólicos, e hidroalcohólicos. El extracto etanólico, se encontró con un precipitado anaranjado (+++), mientras que en el extracto hidroalcohólico con una turbidez (++) según el estudio de Emoe Betancourt Morgado et al. (2015). Por otro lado, el estudio de Ruth et al. (2018) evidenció que no existe presencia de alcaloides en los extractos metanólicos como se evidencia en la figura 4.

#### **Figura 4**

*Tamizaje fitoquímico de Alcaloides*

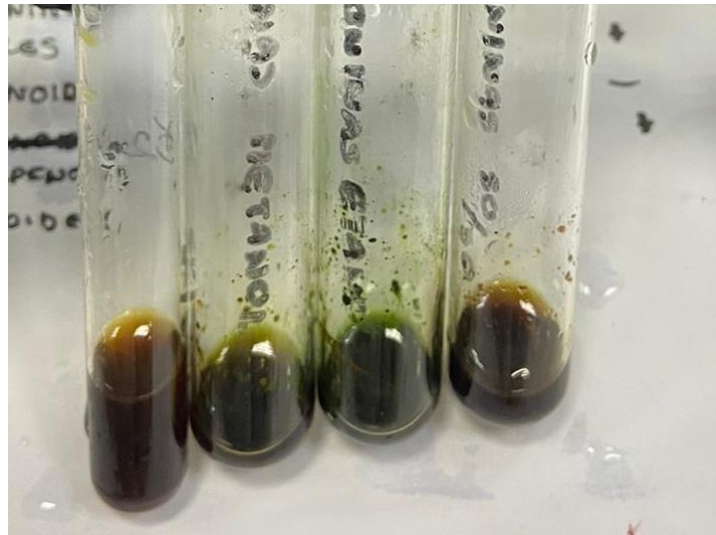


Fuente: Autor

Los tres diferentes extractos no presentaron saponinas (figura 5), ya que no existió la apreciación de un color rosa, por lo que resulta negativo (-) como en el estudio de Oña Cisneros et al. (2018).

### Figura 5

*Tamizaje fitoquímico de las Saponinas*

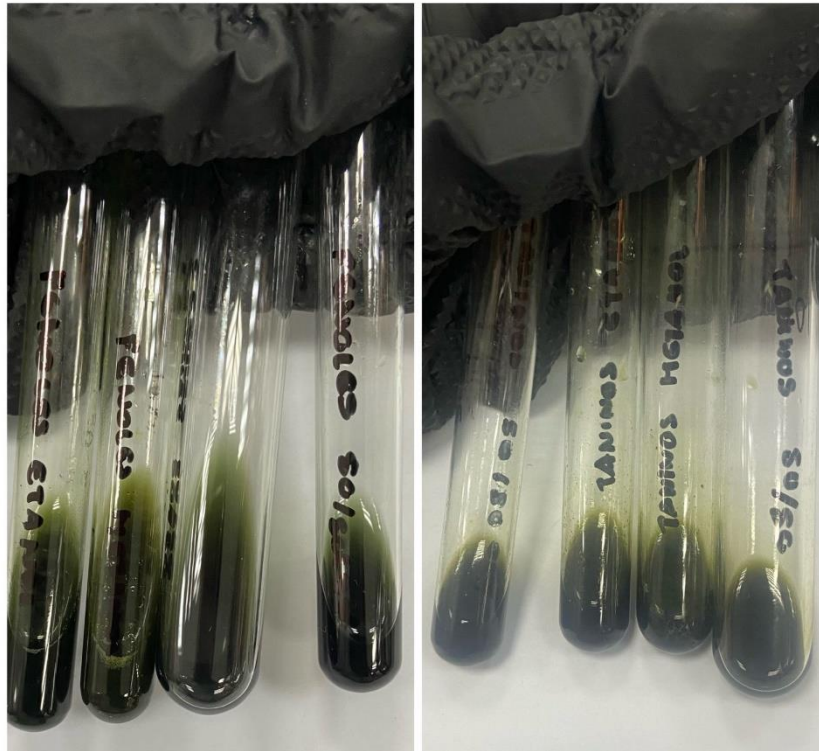


Fuente: Autor

Asimismo, la presencia de taninos y fenoles se evidenció en los tres diferentes extractos (figura 6) los cuales presentaron una coloración azul oscuro (+) mostrando resultados positivos según el estudio presentado por Andramuño Villarreal & Rojas Pilay (2021).

### Figura 6

*Tamizaje fitoquímico de Fenoles y Taninos*



Fuente: Autor

Finalmente, la presencia de Flavonoides solo se presentó en el extracto hidroalcohólico (figura 7), manifestando una coloración anaranjado intenso (+++) según el estudio realizado por Tacuri & Oderay (2022).

### Figura 7

*Tamizaje fitoquímico de flavonoides*



Fuente: Autor

#### 4.3 Determinación de la actividad antimicrobiana (Difusión en discos)

**Tabla 4**

*Actividad antimicrobiana de los diferentes tipos de extractos frente a E. coli y S. aureus*

BACTERIA	TIPO DE EXTRACTO					
	ETANOL		METANOL		HIDROALCOHÓLICO	
	Diámetro	%Inhibición	Diámetro	%Inhibición	Diámetro	% Inhibición
<i>E.coli</i>	0	0	0	0	0	0
<i>S.aureus</i>	13,2 ±1,46	66,0 ±11,23	11,1±1,89	55,4±9,62	0	0

*Nota:* Los valores empleados son las medias de 30 muestras ( ± SE)

Fuente: Autor

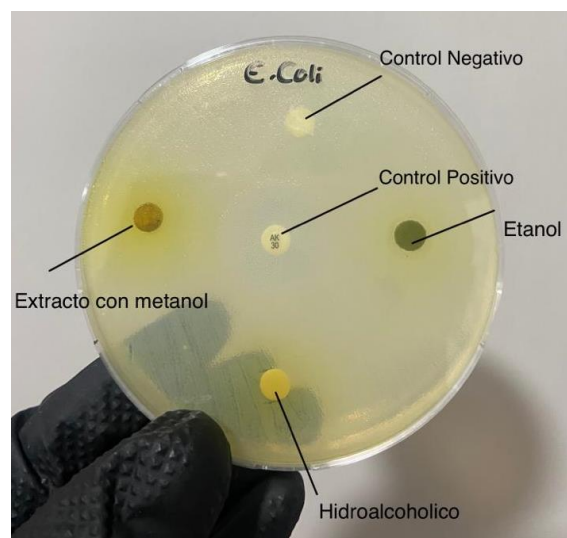
Se evaluó la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos, metanólicos e hidroalcohólicos frente a dos cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 8739 (tabla 4). Los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana revelaron que solo los discos que contenían extractos etanólicos y metanólicos generaron halos de inhibición en presencia únicamente de la bacteria *S. aureus* ATCC 25923 (figura 9), lo que significa que presenta actividad específica contra dicha bacteria. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por Zulfa, Chia, & Rukayadi (2015) y Nyamath & Karthikeyan (2018) donde el extracto etanólico con hojas de *Cymbopogon citratus* presentaron un halo de inhibición de 12.50mm.

Se puede evidenciar que los extractos de *Cymbopogon citratus* no mostraron actividad antimicrobiana frente a la cepa *Escherichia coli* ATCC 8739 (figura 8). Sin embargo, en un estudio realizado por Ruth et al., 2018 se encontró que el extracto de *Cymbopogon citratus* utilizando solventes acuosos y metanólicos presentaron actividad contra la cepa. Estas diferencias en los resultados sugieren que ciertas cepas bacterianas pueden ser más susceptibles o resistentes a los compuestos presentes en los extractos que a otras. Además, los métodos de extracción empleados podrían no ser los adecuados para extraer compuestos

antimicrobianos, ya que, según Ortega Ramírez, 2017, observó inhibición de la cepa *Escherichia coli* cuando utilizó aceite de *Cymbopogon citratus* ATCCC 8739. Estos resultados indican que es importante considerar varios factores en la investigación, como el tipo de extracto, el solvente utilizado, la cepa bacteriana y las concentraciones del extracto. Todos estos factores pueden influir en la obtención de metabolitos secundarios antimicrobianos.

### **Figura 8**

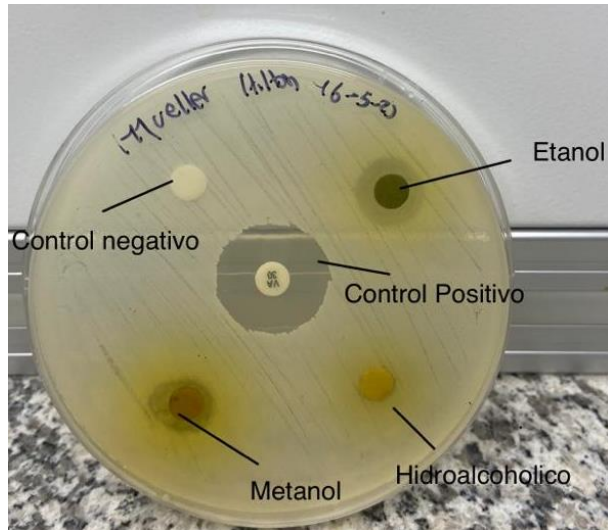
*Método de Kirby-Bauer de la bacteria Escherichia coli ATCC 8739*



Fuente: Autor

### **Figura 9**

*Método de Kirby-Bauer de la bacteria Staphylococcus aureus ATCC 25623*



Fuente: Autor

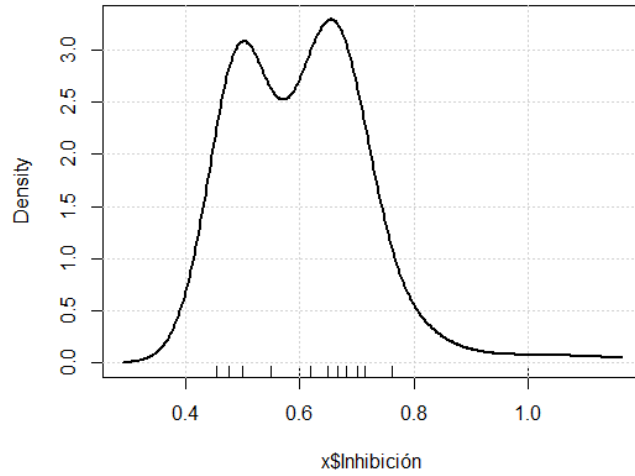
#### 4.4 Análisis estadístico para verificar el solvente o tratamiento que genera mayor inhibición frente a la cepa *S. aureus* ATCC 25923

Para determinar si los datos de inhibición por el método Kirby- Bauer frente a la bacteria *S. aureus* provienen de una distribución normal, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk.

Los resultados de esta prueba indicaron un valor de p de 0.003741, el cual es menor al nivel de confianza de 0.05. Se puede observar en la (figura 10 y 11) que los datos no siguen una distribución normal, apreciando la presencia de sesgos tanto a la izquierda como a la derecha.

#### Figura 10

*Densidad*

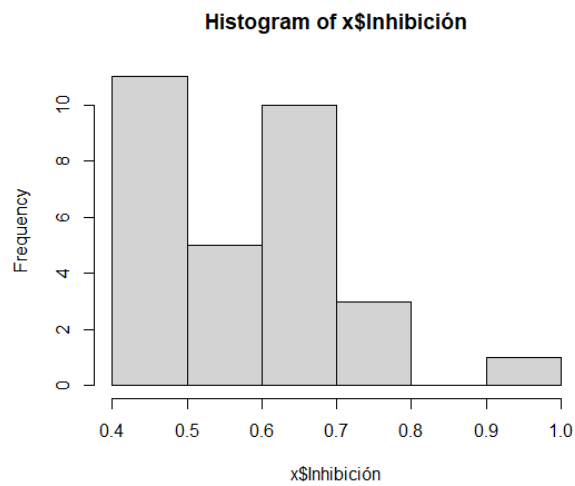


*Nota:* En el gráfico de densidad se observan la distribución de los datos presentando sesgos

Fuente: Autor en el programa de RStudio

### Figura 11

#### *Histograma*



*Nota:* En el histograma se observa la distribución mediante el uso de barras rectangulares presentando distribuciones asimétricas

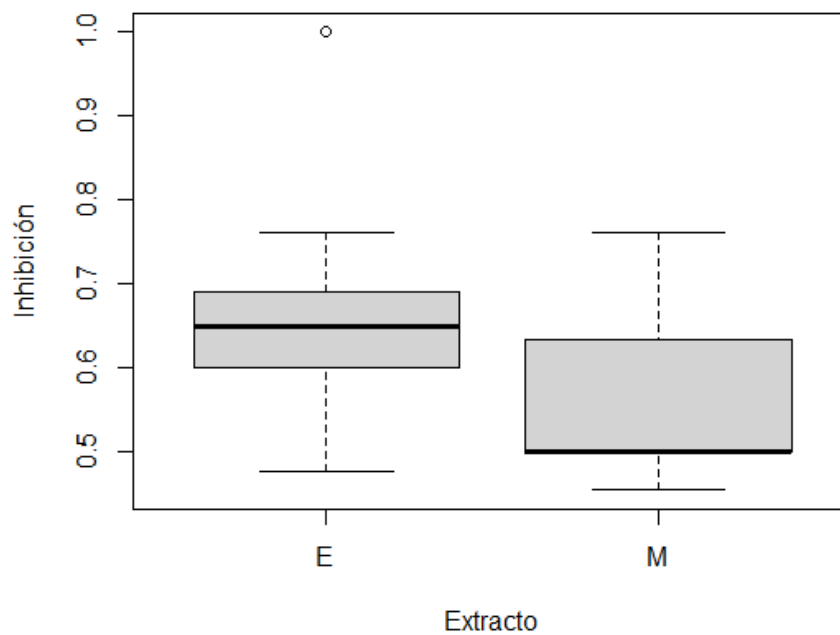


Fuente: Autor en el programa de Rstudio

Se procedió a realizar una prueba de Wilcoxon Rank sum test para comparar las medianas entre los extractos de Metanol y Etanol. El valor de  $p > 0.02035$ , se puede decir que, existe diferencias significativas entre las medianas de los grupos, por ende, rechazamos la hipótesis nula, lo que connota que el tratamiento que utiliza etanol es el más eficiente como se observa en la figura 12.

### Figura 12

*Comparación de la distribución de los tratamientos utilizados*



*Nota:* En el gráfico de cajas se observa la diferencia significativa entre Etanol (“E”) y Metanol (“M”)

Fuente: Autor en el programa Rstudio

#### **4.5 Detección de compuestos con propiedades antimicrobianas del extracto de etanol contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923**

Mediante la técnica de bioautografía (figura 13 y 14), se puede detectar el supuesto compuesto responsable de la actividad biológica al observar la inhibición color amarillenta o

blanquecina. Es fácil detectar en comparación con los compuestos inactivos porque mantienen una coloración violeta- azulado.

En la tabla 5 se detalla la distancia recorrida por las sustancias, el frente del disolvente, el frente de referencia (Rf), el supuesto componente antimicrobiano y el color que es detectado a 366 nm.

**Tabla 5**

*Resultados obtenidos en la bioautografía*

	<b>Distancia (cm) recorrida</b>	<b>Frente del disolvente</b>	<b>Frente de referencia (RF)</b>	<b>Componente</b>	<b>Color detectado a 366 nm</b>
<b>1</b>	1,8	8	0,225	Geraniol	Verde
<b>2</b>	2	8	0,25	Borneol	Amarillo
<b>3</b>	7,1	8	0,8875	Safrol	Rojo-Marrón

Fuente: Autor

En la inhibición de los compuestos bioactivos se determinaron con el frente de referencia (RF) y son:

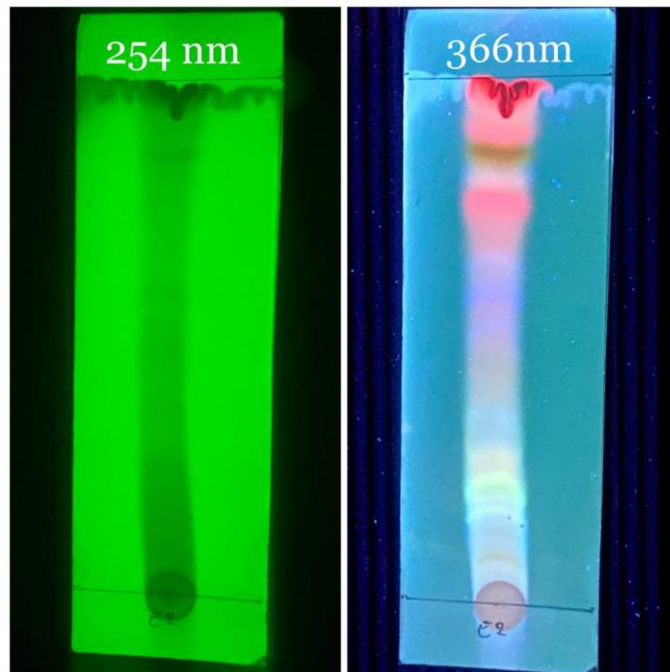
Rf1: Geraniol con nombre IUPAN 3,7-dimetil-2,6-heptadien-1-ol

Rf2: Borneol con nombre IUPAC endo-1,7,7-trimetil-biciclo [2.2.1] heptan-2-ol

Rf3: Safrol con nombre IUPAC 5-(2-propenyl)-1,3-benzodioxole

**Figura 13**

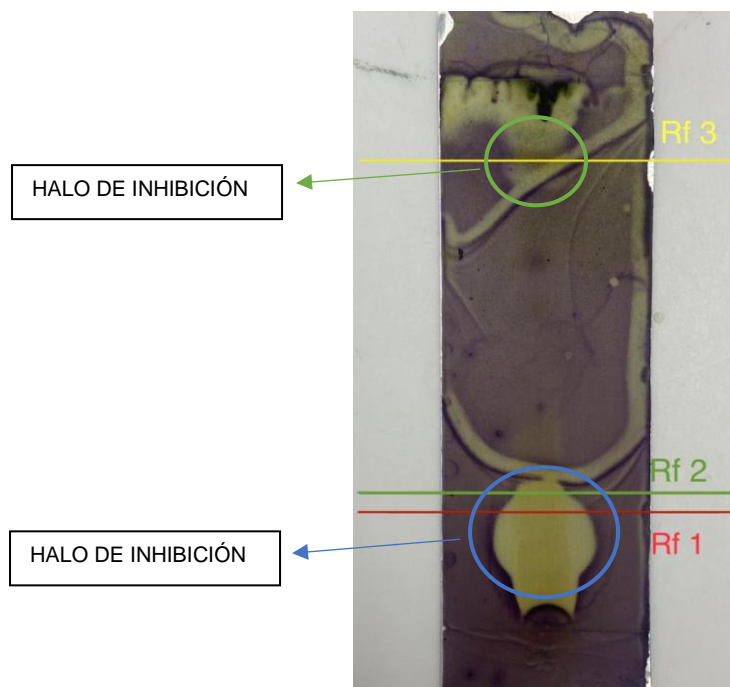
*Cromatografía en capa fina*



Fuente: Autor

**Figura 14**

*Bioautografía en capa fina*



Fuente: Autor

Los componentes obtenidos a través del valor de frente de referencia (Rf) es el que permite conocer la presencia del supuesto compuesto antimicrobiano y es evidenciado mediante el análisis de Wagner & Bladt (2009).

Según Enríquez Estrella, Poveda Díaz, & Alvarado Huatatoca (2023), el geraniol es un componente monoterpeno con actividad antimicrobiana, siendo uno de los principales componentes del *Cymbopogon citratus*. Este compuesto es capaz de adherirse a los lípidos de la membrana celular del microorganismo lo que le confiere el efecto inhibitor (Lira et al., 2020).

El borneol, otro componente monoterpeno, el cual ha sido considerado por tener efectos antibacterianos, antifúngico, antiespasmódico, coleréticos y tranquilizantes Tabanca, Kirimer, Demirci, Demirci, & Baser (2001).

El safrol, por su parte, es un compuesto fenilpropanoide que puede actuar en sinergia con otros componentes de la planta aumentando su actividad biológica, en donde se ha demostrado efectos antibacterianos frente a bacterias gramnegativas (Sánchez, Pino, Correa, Naranjo, & Iglesia, 2009; Arevalo, 2020).

## CAPÍTULO V

### Conclusiones y Recomendaciones

#### 5.1 Conclusiones

Al finalizar esta investigación se puede concluir que:

Por medio del tamizaje fitoquímico preliminar de los diferentes tipos de extractos de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) fue posible determinar la presencia de taninos y fenoles en los tres extractos (metanólicos, etanólicos e hidroalcohólicos), alcaloides en los extractos etanólicos e hidroalcohólicos, y flavonoides solo en el extracto hidroalcohólico.

A través de la técnica de difusión en discos (prueba de Kirby- Bauer), se determinaron que los extractos metanólicos y etanólicos de las hojas de *Cymbopogon citratus* en su actividad antimicrobiana frente a la cepa *Staphylococcus aureus*. Después del trabajo realizado el extracto etanólico mostró mayor actividad inhibidora en comparación con el extracto metanólico. El extracto etanólico presentó un promedio del porcentaje de inhibición del 66%. Por otro lado, el extracto metanólico registró un promedio del porcentaje de inhibición del 55.4%.

El resultado estadístico obtenido con el método de Wilcoxon Rank-sum aceptó la hipótesis alternativa que establece que los extractos de *Cymbopogon citratus* presentan actividad antimicrobiana frente a las bacterias *Staphylococcus aureus*. Además, se identificó que el extracto etanólico genera mayor inhibición en comparación con el extracto metanólico.

Mediante el método de Bioautografía se determinaron los posibles compuestos que poseen actividad antimicrobiana, frente a la bacteria *Staphylococcus aureus*, entre ellos están: Geraniol (7-dimetil-2,6-heptadien-1-ol), Borneol (endo-1,7,7-trimetil-biciclo [2.2.1] heptan-2-ol) y Safrol (5-(2-propenyl)-1,3-benzodioxole). Estas revelaciones pueden ser usadas como posibles coadyuvantes o agentes antimicrobianos naturales, lo que permite futuras investigaciones y aplicaciones en diversos campos como en la medicina, la industria farmacéutica, la industria alimenticia y la cosmetología.

Al concluir el estudio de investigación, se puede determinar que los resultados experimentales obtenidos demuestran la efectividad de las plantas para el control de bacterias, brindando beneficios significativos tanto para la salud como para el medio ambiente. Debido a que la cantidad y composición química de los metabolitos secundarios varían según la especie de la planta, existe la posibilidad de desarrollar nuevos productos naturales reemplazando a los sintéticos.

## 5.2 Recomendaciones

Es importante probar diferentes métodos y solventes con diferentes polaridades que sean capaces de disolver los componentes deseados para genera un mayor rendimiento.

Para garantizar resultados precisos al realizar la prueba de Kirby- bauer, es fundamental llevar a cabo todo el proceso en condiciones estériles. De lo contrario, puede existir el riesgo de contaminar las cepas puras y perjudicar la integridad de los datos obtenidos.

Cuando se realice la prueba de difusión en discos, es importante trabajar con un patrón de 0,5 de McFarland, garantizando que la concentración bacteriana sea estandarizada y se obtengan resultados más precisos. Esta normalización asegura que no exista una sobrepoblación bacteriana

De igual manera, al realizar la bioautografía, pretender leer la densidad óptica del cultivo con un espectrofotómetro UV/Vis a 600nm para obtener una absorción específica de 0,4. Es una medida empleada para evitar una sobrepoblación bacteriana y garantizar que el cultivo se encuentre en una concentración adecuada.

Por cuestiones de tiempo, no se llevó a cabo la cuantificación por cromatografía líquida (HPLC) de los componentes presentes en los diferentes extractos de las hojas de *Cymbopogon citratus*. Sin embargo, son resultados indispensables para verificar y confirmar

la concordancia de los resultados obtenidos relacionados con las propiedades antimicrobianas y otros efectos de la hierba luisa.

Se sugiere continuar con los estudios debido a que las plantas naturales, pueden ofrecer una gran cantidad de metabolitos secundarios beneficiosos para la salud y aplicaciones en diversas áreas.

## Referencias

- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(1), 1–10. [https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19)
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M., & Di Ilio, C. (2013). Escherichia coli in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), 6235–6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- Alzate O, D. A., Mier M, G. I., Afanador K, L., Durango R, D. L., & García P, C. M. (2009). Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad antifúngica contra Colletotrichum acutatum de los aceites esenciales de tomillo (Thymus vulgaris), limoncillo (Cymbopogon citratus), y sus componentes mayoritarios. *Vitae*, 16(1), 116–125.
- Aminov, R. (2017). History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical Pharmacology*, 133, 4–19. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.10.001>
- Andramuño Villarreal, D. K., & Rojas Pilay, M. de los Á. (2021). *Estudio comparativo farmacognóstico y fitoquímico de las hojas de hierba luisa (Cymbopogon citratus) y cedrón (Lippia citriodora)*. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/58342>
- Andrés Rodríguez, C., & Vesga, O. (2005). Staphylococcus aureus resistente a vancomicina. *Biomédica*, 25, 575–587.
- Ángel Enríquez-Estrella, M., Sonia, §, Poveda-Díaz, E., & Alvarado-Huatatoca, G. I. (2023). Bioactivos de la hierba luisa utilizados en la industria. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, ISSN 2007-0934, Vol. 14, N°. 1, 2023, Págs. 1-11, 14(1), 1–11. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8770175&info=resumen&idioma=ENG>
- Arevalo, D. V. (2020). Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de plantas del género Piper frente a Pseudomonas aeruginosa y Chromobacterium violaceum. *Biología*. <https://ciencia.lasalle.edu.co/biologia/81>



- Azwanida, N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal & Aromatic Plants*, 04(03).  
<https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.  
<https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Baron, S. (1996). Bacterial Pathogenesis. En *Medical Microbiology* (Vol. 4). University of Texas Medical Branch at Galveston. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8147/>
- Bārzdiņa, A., Paulausks, A., Bandere, D., & Brangule, A. (2022). The Potential Use of Herbal Fingerprints by Means of HPLC and TLC for Characterization and Identification of Herbal Extracts and the Distinction of Latvian Native Medicinal Plants. *Molecules*, 27(8), 2555. <https://doi.org/10.3390/molecules27082555>
- Bele, A. A., & Khale, A. (2011). AN OVERVIEW ON THIN LAYER CHROMATOGRAPHY. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(2), 256–267.
- Berga, A. P. (2009). *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. MARGE BOOKS.
- Bernal R., M., & Guzmán, M. (1984). El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*, 4(3–4), 112. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v4i3-4.1891>
- Bonten, M., Johnson, J. R., van den Biggelaar, A. H. J., Georgalis, L., Geurtsen, J., de Palacios, P. I., Gravenstein, S., Verstraeten, T., Hermans, P., & Poolman, J. T. (2021). Epidemiology of Escherichia coli Bacteremia: A Systematic Literature Review. *Clinical Infectious Diseases*, 72(7), 1211–1219. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa210>
- Calixto, J. B. (2005). Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1), 131–134.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.004>
- Casadevall, A., & Pirofski, L. (1999). Host-Pathogen Interactions: Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. *Infection and Immunity*, 67(8), 3703–3713.  
<https://doi.org/10.1128/iai.67.8.3703-3713.1999>

- Casadevall, A., & Pirofski, L. (2014). Microbiology: Ditch the term pathogen. *Nature*, 516(7530), Article 7530. <https://doi.org/10.1038/516165a>
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28–40.
- Chinedum, I. E. (2005). Microbial resistance to antibiotics. *African Journal of Biotechnology*, 4(13), Article 13. <https://doi.org/10.4314/ajfand.v4i13.71776>
- Choma, I. M., & Grzelak, E. M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2684–2691. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.069>
- Choma, I., & Jesionek, W. (2015). TLC-Direct Bioautography as a High Throughput Method for Detection of Antimicrobials in Plants. *Chromatography*, 2(2), 225–238. <https://doi.org/10.3390/chromatography2020225>
- Corzo Barragán, D. (2012, April 21). *Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico*. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-01952012000300009](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952012000300009)
- Cova, V. (2018). Soluciones acuosas. *Físico- química biológica*.
- Dabur, R., Gupta, A., Mandal, T., Singh, D., Bajpai, V., Gurav, A., & Lavekar, G. (2008). Antimicrobial Activity Of Some Indian Medicinal Plants. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 4(3), 313. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v4i3.31225>
- <https://www.zotero.org/google-docs/?T0yT12>
- Dekebo, A. (2019). Introductory Chapter: Plant Extracts. En A. Dekebo (Ed.), *Plant Extracts*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85493>
- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., & Dua, T. K. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2014.06.002>

- Doua, J., Geurtsen, J., Rodriguez-Baño, J., Cornely, O. A., Go, O., Gomila-Grange, A., Kirby, A., Hermans, P., Gori, A., Zuccaro, V., Gravenstein, S., Bonten, M., Poolman, J., & Sarnecki, M. (2023). Epidemiology, Clinical Features, and Antimicrobial Resistance of Invasive Escherichia Coli Disease in Patients Admitted in Tertiary Care Hospitals. *Open Forum Infectious Diseases*, 10(2), ofad026. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofad026>
- El-Shemy, H. (2022). *Natural Medicinal Plants*. BoD – Books on Demand.
- Emoe Betancourt Morgado, L., González Madariaga, Y., Escobar Román, R., Bermúdez Toledo, D., Freisman Blanco Machado, T., & Celia María Martínez Montalván, L. (2015). Evaluación del potencial hipolipemiante de *Cymbopogon citratus* S. en un modelo de hiperlipidemia aguda. *Medicentro Electrónica*, 19(1), 2–12. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1029-30432015000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432015000100002&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Enríquez-Estrella, M. Á., Poveda-Díaz, S. E., & Alvarado-Huatatoca, G. I. (2023). Bioactivos de la hierba luisa utilizados en la industria. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 14(1), 1–11. <https://doi.org/10.29312/remexca.v14i1.3249>
- Faheem, F., Liu, Z. W., Rabail, R., Haq, I.-U., Gul, M., Bryła, M., Roszko, M., Kieliszek, M., Din, A., & Aadil, R. M. (2022). Uncovering the Industrial Potentials of Lemongrass Essential Oil as a Food Preservative: A Review. *Antioxidants*, 11(4), 720. <https://doi.org/10.3390/antiox11040720>
- Fan, W., Midori, A., & David, C. (2021). Polisacáridos antitumorales e Inmunomoduladores de *Cymbopogon Citratus* (Hierba Luida). *Revista de Biología y Química* .
- Ferey, J., Da Silva, D., Lafite, P., Daniellou, R., & Maunit, B. (2017). TLC-UV hyphenated with MALDI-TOFMS for the screening of invertase substrates in plant extracts. *Talanta*, 170, 419–424. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.040>
- Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components. (2013). *Plant Extract—An overview*. ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/plant-extract>

- Gadea , R., Romano, D., & Santos, T. (2007). *Sustitución de sustancias disolventes peligrosas*. Madrid: Paralelo Edición, SA.
- Geiss, F. (1987). *Fundamentals of thin layer chromatography*.  
<https://www.osti.gov/biblio/6723641>
- Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Rayo Morfín-Otero, M. del, Torres-López, F. J., Alcántar-Curiel, M. D., Giono-Cerezo, S., Santos-Preciado, J. I., Rayo Morfín-Otero, M. del, Torres-López, F. J., & Alcántar-Curiel, M. D. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta Médica de México*, 156(2), 172–180. <https://doi.org/10.24875/GMM.20005624>
- Gobierno del Ecuador. (24 de 02 de 2022). Obtenido de Productos naturales de uso medicinal:  
<https://www.controlsanitario.gob.ec/productos-naturales/>
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Hahn-Deinstrop, E. (2006). *Applied Thin-Layer Chromatography: Best Practice and Avoidance of Mistakes* (1a ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527610259>
- Handa, S. S., Singh Khanuja, S. P., Longo, G., Rakesh, D. D., United Nations Industrial Development Organization, & International Centre for Science and High Technology. (2008). *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies.
- Hernández, R. N. (2013). Lectura interpretada del antibiograma. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 42(4), 502–506.
- Hidayat, R., & Wulandari, P. (2021). Methods of Extraction: Maceration, Percolation and Decoction. *Eureka Herba Indonesia*, 2(1), Article 1.  
<https://doi.org/10.37275/ehi.v2i1.15>
- Homans, A. L., & Fuchs, A. (1970). Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography A*, 51, 327–329. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)96877-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)96877-3)

- J. Foster, T. (2002). 39—Staphylococcus aureus. En M. Sussman (Ed.), *Molecular Medical Microbiology* (pp. 839–888). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012677530-3/50258-0>
- Jesionek, W., Móricz, Á. M., Alberti, Á., Ott, P. G., Kocsis, B., Horváth, G., & Choma, I. M. (2015). TLC-Direct Bioautography as a Bioassay Guided Method for Investigation of Antibacterial Compounds in *Hypericum perforatum* L. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 98(4), 1013–1020. <https://doi.org/10.5740/JAOACINT.14-233>
- Joy, P., Skaria, B., Mathew, S., Mathew, G., Joseph, A., & Sreevidya, P. (2006). Lemongrass. KERALA AGRICULTURAL UNIVERSITY AROMATIC AND MEDICINAL PLANTS RESEARCH STATION. [https://www.researchgate.net/profile/Pp-Joy/publication/305495607\\_Lemongrass/links/5791f10108ae33e89f74e6cf/Lemongrass.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Pp-Joy/publication/305495607_Lemongrass/links/5791f10108ae33e89f74e6cf/Lemongrass.pdf)
- Juárez-Vázquez, M. D. C., Carranza-Álvarez, C., Alonso-Castro, A. J., González-Alcaraz, V. F., Bravo-Acevedo, E., Chamarro-Tinajero, F. J., & Solano, E. (2013). Ethnobotany of medicinal plants used in Xalpatlahuac, Guerrero, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 148(2), 521–527. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.04.048>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kiani, H. S., Ali, A., Zahra, S., Hassan, Z. U., Kubra, K. T., Azam, M., & Zahid, H. F. (2022). Phytochemical Composition and Pharmacological Potential of Lemongrass (*Cymbopogon*) and Impact on Gut Microbiota. *AppliedChem*, 2(4), 229–246. <https://doi.org/10.3390/appliedchem2040016>
- Krakowska-Sieprawska, A., Kielbasa, A., Rafińska, K., Ligor, M., & Buszewski, B. (2022). Modern Methods of Pre-Treatment of Plant Material for the Extraction of Bioactive Compounds. *Molecules*, 27(3). <https://doi.org/10.3390/molecules27030730>
- Lawal, O. A., Ogundajo, A. L., Avoseh, N. O., & Ogunwande, I. A. (2017). *Cymbopogon citratus*. En *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (pp. 397–423). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00018-2>

- Lira, M. H. P. de, Andrade Júnior, F. P. de, Moraes, G. F. Q., Macena, G. da S., Pereira, F. de O., & Lima, I. O. (2020). Antimicrobial activity of geraniol: an integrative review. *Https://Doi.Org/10.1080/10412905.2020.1745697*, 32(3), 187–197. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1745697>
- Loachamín, N. L. (2016). *UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA SEDE QUITO*. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/11655/1/UPS-QT09222.pdf>
- López Luengo, M. T. (2008). Plantas medicinales con actividad inmunomoduladora. Revisión. *Offarm*, 27(11), 58–61. <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-plantas-medicinales-con-actividad-inmunomoduladora--13130885>
- Machraoui, M., Kthiri, Z., Ben-Jabeur, M., & Hamada, W. (2018). Ethnobotanical and phytopharmacological notes on *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Journal of New Science*, 55(5).
- Manvitha, K., & Bidya, R. S. A. (2022). Review on Pharmacological Activity of *Cymbopogon Citratus*. *International Journal For Multidisciplinary Research*, 4(6), 1015. <https://doi.org/10.36948/ijfmr.2022.v04i06.1015>
- March Rosselló, G. A., & Bratos Pérez, M. Á. (2016). Antibiograma rápido en Microbiología Clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(1), 61–68. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.11.014>
- Martínez, J., & Iriondo, C. (2013). Fuerzas intermoleculares.
- Mauri, P., & Pietta, P. (2000). Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23(1), 61–68. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00264-8](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00264-8)
- Menut, C., Bessiére, J. M., Samaté, D., Djibo, A. K., Buchbauer, G., & Schopper, B. (2000). Aromatic Plants of Tropical West Africa. XI. Chemical Composition, Antioxidant and Antiradical Properties of the Essential Oils of Three *Cymbopogon* Species from Burkina Faso. *Journal of Essential Oil Research*, 12(2), 207–212. <https://doi.org/10.1080/10412905.2000.9699499>

- Montenegro, R. A., & Stephens, C. (2006). Indigenous health in Latin America and the Caribbean. *The Lancet*, 367(9525), 1859–1869. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68808-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68808-9)
- Mukarram, M., Choudhary, S., Khan, M. A., Poltronieri, P., Khan, M. M. A., Ali, J., Kurjak, D., & Shahid, M. (2021). *Lemongrass Essential Oil Components with Antimicrobial and Anticancer Activities* [Preprint]. LIFE SCIENCES. <https://doi.org/10.20944/preprints202106.0500.v1>
- Nambiar, D. V. S. (2012). Potential Functions of Lemon Grass *Cymbopogon citratus* in Health and Disease. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*, 3(5), Article 5. <http://www.ijpba.info/index.php/ijpba/article/view/816>
- Negrelle, R., & Gomes, E. (2007). *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: Chemical composition and biological activities. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 9(1), 80–92.
- Nyamath, S., & Karthikeyan, B. (2018). In vitro antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) leaves extract by agar well method. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 1185-1188.
- Okigbo, R. N., & Mmeka, E. C. (2008). Antimicrobial Effects Of Three Tropical Plant Extracts On *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 5(3), 226–229. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v5i3.31277>
- Oladeji, O. S., Adelowo, F. E., Ayodele, D. T., & Odelade, K. A. (2019). Phytochemistry and pharmacological activities of *Cymbopogon citratus*: A review. *Scientific African*, 6, e00137. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00137>
- Oña Cisneros, F. D., Viteri Rodríguez, J. A., & Mendoza Buñay, A. F. (2018). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de Cymbopogon citratus frente a cepas de Staphilococcus Aureus y Escherichia Coli*. <https://dspace.uniandes.edu.ec/handle/123456789/8754>
- Ortega Ramíz, L. A. (2017). ACEITE ESENCIAL DE *Cymbopogon citratus* COMO INHIBIDOR DE GLUCOSILTRANSFERASA RESPONSABLE DE LA PRODUCCIÓN DE

BIOPELÍCULAS DE *Escherichia coli* O157:H7. *Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo*, A. C.

Poole, C. F. (2003). Thin-layer chromatography: Challenges and opportunities. *Journal of Chromatography A*, 1000(1), 963–984. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00435-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00435-7)

Rasul, M. G. (2018). *Conventional Extraction Methods Use in Medicinal Plants, their Advantages and Disadvantages*. 2(6).

Reina, C., Lourdes, L., Fernández, T., Andrés, B., Katherine, E., Manzano, A., Tutor, M., Fabián José, I., & Carrera, Z. (2022). *I ANEXO XI.-FICHA DE REGISTRO DE TRABAJO DE TITULACIÓN REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA FICHA DE REGISTRO DE TRABAJO DE TITULACIÓN TÍTULO Y SUBTÍTULO: Estudio de la Hierba Luisa y Propuesta Culinaria para la aplicación de postres Fríos Desarrollo local y emprendimiento socio-económico, sostenible y sustentable AUTOR(ES) (apellidos/nombres): REVISOR(ES)/TUTOR(ES) (apellidos/nombres)*. <https://secure.urkund.com/view/125740523-921498-105589>

Ríos, J. L., & Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1–2), 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>

Ruth, Haydelba, ;, Armas, D. ', Carmita, ;, Jaramillo-Jaramillo, Elington, ;, & Vélez. (2018). Metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil). *FACSALUD-UNEMI*, 2(2), 31–39. <https://doi.org/10.29076/issn.2602-8360vol2iss2.2018pp31-39p>

Salazar-Gómez, A., & Alonso-Castro, A. J. (2022). Medicinal Plants from Latin America with Wound Healing Activity: Ethnomedicine, Phytochemistry, Preclinical and Clinical Studies—A Review. *Pharmaceuticals*, 15(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/ph15091095>

Salehi, B., Mishra, A. P., Nigam, M., Sener, B., Kilic, M., Sharifi-Rad, M., Fokou, P. V. T., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2018). Resveratrol: A Double-Edged Sword in Health Benefits. *Biomedicines*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES6030091>



- Sánchez, Y., Pino, O., Correa, T., Naranjo, E., & Iglesia, A. (2009). ESTUDIO QUÍMICO Y MICROBIOLÓGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Piper auritum* KUNTH (CAISIMÓN DE ANÍS). *Revista de Protección Vegetal*.
- Shah, G., Shri, R., Panchal, V., Sharma, N., Singh, B., & Mann, A. S. (2011). Scientific basis for the therapeutic use of *Cymbopogon citratus*, stapf (Lemon grass). *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 2(1), 3–8. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.79796>
- Shah, P., & Mello, P. M. (2004). A review of medicinal uses and pharmacological effects of *Mentha piperta*. *Natural Product Radiance*, 3, 8.
- Siew, Y.-Y., Zareisedehizadeh, S., Seetoh, W.-G., Neo, S.-Y., Tan, C.-H., & Koh, H.-L. (2014). Ethnobotanical survey of usage of fresh medicinal plants in Singapore. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(3), 1450–1466. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.07.024>
- Silva, N. C. C., & Fernandes Júnior, A. (2010). Biological properties of medicinal plants: A review of their antimicrobial activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 16, 402–413. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992010000300006>
- Smith, J. L., Fratamico, P. M., & Gunther, N. W. (2007). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(2), 134–163. <https://doi.org/10.1089/fpd.2007.0087>
- Sneider, W. (2005). *Drug Discovery: A History*. John Wiley & Sons.
- Soto Ortiz, R., Vega Marrero, G., & Tamajón Navarro, A. L. (2002). Instructivo técnico del cultivo de *Cymbopogon citratus* (D.C) Stapf (caña santa). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 7(2), 0–0.
- Soto-García, M., & Rosales-Castro, M. (2016). Effect of solvent and solvent-to-solid ratio on the phenolic extraction and the antioxidant capacity of extracts from *Pinus durangensis* and *Quercus sideroxyla* bark. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 18(4), 701–714. <https://doi.org/10.4067/S0718-221X2016005000061>

- Süntar, I. (2020). Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: Role of medicinal plants. *Phytochemistry Reviews*, 19(5), 1199–1209. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09629-9>
- Svetaz, L., Zuljan, F., Derita, M., Petenatti, E., Tamayo, G., Cáceres, A., Cechinel Filho, V., Giménez, A., Pinzón, R., Zacchino, S. A., & Gupta, M. (2010). Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(1), 137–158. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.09.034>
- Tabanca, N., Kirimer, N., Demirci, B., Demirci, F., & Baser, H. (2001). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Micromeria cristata* subsp. *phrygia* and the Enantiomeric Distribution of Borneol. *Journal of AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY*, 4300-4303.
- Tacuri, P., & Oderay, J. (2022). Elaboración de un desodorante orgánico a base de extractos de plantas. *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo*, 50-51.
- Tascini, C., Sozio, E., Viaggi, B., & Meini, S. (2016). Reading and understanding an antibiogram. *Italian Journal of Medicine*, 10(4), 289. <https://doi.org/10.4081/itjm.2016.794>
- Taylor, T. A., & Unakal, C. G. (2023). *Staphylococcus aureus* Infection. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441868/>
- Van Baarlen, P., Van Belkum, A., Summerbell, R. C., Crous, P. W., & Thomma, B. P. H. J. (2007). Molecular mechanisms of pathogenicity: How do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps? *FEMS Microbiology Reviews*, 31(3), 239–277. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00065.x>
- van Hal, S. J., Jensen, S. O., Vaska, V. L., Espedido, B. A., Paterson, D. L., & Gosbell, I. B. (2012). Predictors of Mortality in *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 362–386. <https://doi.org/10.1128/CMR.05022-11>
- Van Vuuren, S. F. (2008). Antimicrobial activity of South African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), 462–472. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.05.038>

- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2021). Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Microorganisms*, 9(10), 2041. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102041>
- Vazquez-Pertejo, M. (2022). *Pruebas de sensibilidad o antibiogramas*. Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msmanuals.com/es-ec/professional/enfermedades-infecciosas/diagn%C3%B3stico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas>
- Vélez, R., D'Armas R. PhD., H., Jaramillo Jaramillo, C., & Vélez, E. (2018). Metabolitos secundarios, actividad antimicrobiana y letalidad de las hojas de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa) y *Melissa officinalis* (toronjil). *FACSalud UNEMI, ISSN-e 2602-8360, Vol. 2, N.º. 2, 2018, Págs. 31-39, 2(2), 31–39.* <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=8277743&info=resumen&idioma=S>  
PA
- Wagner, H., & Bladt, S. (2009). *Plant Drug Analysis*. Germany: Springer.
- Waseem, R., & Low, K. H. (2015). Advanced analytical techniques for the extraction and characterization of plant-derived essential oils by gas chromatography with mass spectrometry: Other Techniques. *Journal of Separation Science*, 38(3), 483–501. <https://doi.org/10.1002/jssc.201400724>
- WHO. (s/f). *Global Centre for Traditional Medicine*. World Health Organization. Recuperado el 27 de julio de 2023, de <https://www.who.int/initiatives/who-global-centre-for-traditional-medicine>
- Wilson, M. (2008). *Bacteriology of humans: An ecological perspective*. Blackwell Pub.
- Winter, M. J., Owen, S. F., Murray-Smith, R., Panter, G. H., Hetheridge, M. J., & Kinter, L. B. (2010). Using data from drug discovery and development to aid the aquatic environmental risk assessment of human pharmaceuticals: Concepts, considerations, and challenges. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 6(1), 38–51. [https://doi.org/10.1897/IEAM\\_2009-044.1](https://doi.org/10.1897/IEAM_2009-044.1)

- Wise, R., Hart, T., Cars, O., Streulens, M., Helmuth, R., Huovinen, P., & Sprenger, M. (1998). Antimicrobial resistance. *BMJ*, 317(7159), 609–610. <https://doi.org/10.1136/bmj.317.7159.609>
- World Health Organization. (2022). *Report signals increasing resistance to antibiotics in bacterial infections in humans and need for better data*. <https://www.who.int/news/item/09-12-2022-report-signals-increasing-resistance-to-antibiotics-in-bacterial-infections-in-humans-and-need-for-better-data>
- Wozniak, J. M., Mills, R. H., Olson, J., Caldera, J. R., Sepich-Poore, G. D., Carrillo-Terrazas, M., Tsai, C.-M., Vargas, F., Knight, R., Dorrestein, P. C., Liu, G. Y., Nizet, V., Sakoulas, G., Rose, W., & Gonzalez, D. J. (2020). Mortality Risk Profiling of *Staphylococcus aureus* Bacteremia by Multi-omic Serum Analysis Reveals Early Predictive and Pathogenic Signatures. *Cell*, 182(5), 1311-1327.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.040>
- Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13, 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
- Zolla, C. (1980). Traditional medicine in Latin America, with particular reference to Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 2(1), 37–41. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(80\)90028-8](https://doi.org/10.1016/0378-8741(80)90028-8)
- Zulfa, Z., Chia, C., & Rukayadi, Y. (2015). In vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) extracts against selected foodborne pathogens. *International Food Research Journal*.

## Apéndices y Anexos

### Apéndice A. Obtención de los extractos

#### Figura A1

##### *Percolación*



Fuente: Autor

#### Figura A2

##### *Concentración de los extractos en el rota vapor*



Fuente: Autor

### Figura A3

*Extractos obtenidos de la hoja de Cymbopogon citratus*

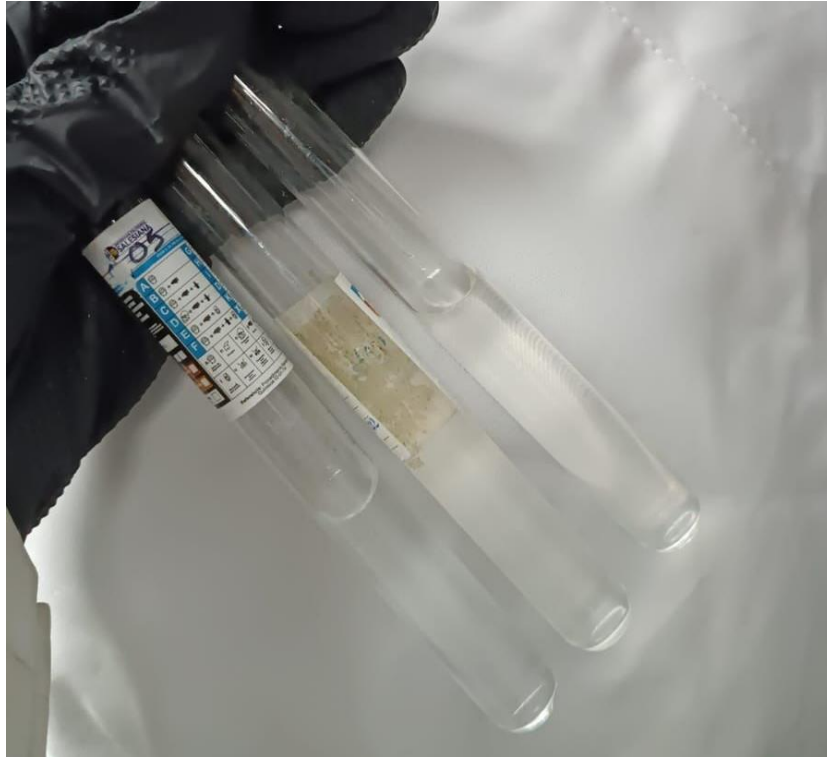


Fuente: Autor

## Apéndice B. Difusión en Discos

### Figura B1

*Escala 0,5 de McFarland*

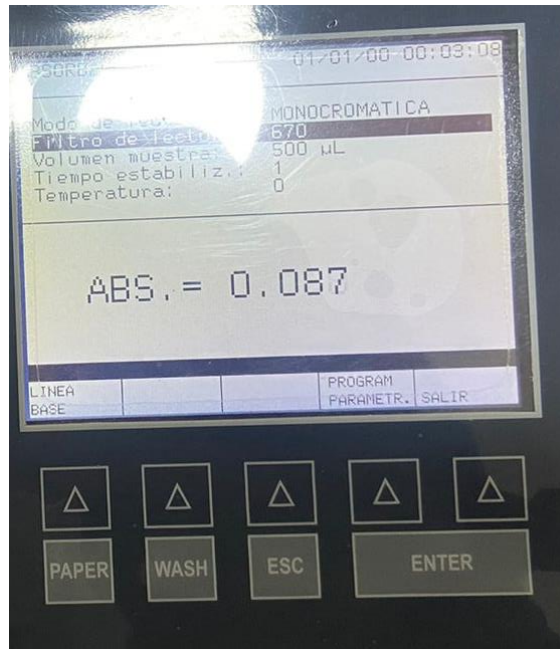


Fuente: Autor

### Figura B2

*Absorbancia a 600nm*





Fuente: Autor

### Figura B3

*Discos en blanco dentro de los extractos*

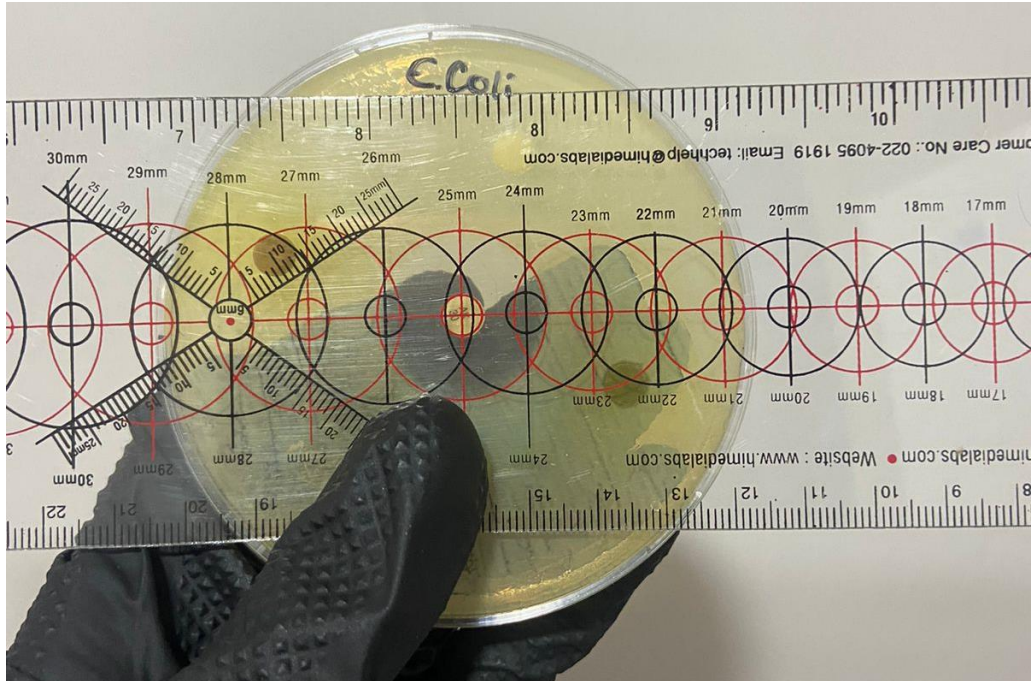




Fuente: Autor

### Figura B4

*Medición del halo de inhibición*



Fuente: Autor

**Apéndice C.** Resultados crudos del porcentaje de inhibición alcanzados por los extractos de *Cymbopogon citratus* frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus Aureus*

**Tabla C1**

Resultados crudos del porcentaje de inhibición alcanzados por los extractos de *Cymbopogon citratus* frente a la bacteria *Escherichia coli* ATCC

8739

<i>Escherichia coli</i>	Control Positivo	Control Negativo	Etanol	Inhibición	%	Metanol	Inhibición	%	Hidroalcohólico	Inhibición	%
Muestra 1	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestra 2	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestra 3	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestra 4	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestra 5	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestra 6	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestra 7	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestra 8	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestra 9	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestra 10	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestra 11	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestra 12	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestra 13	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestra 14	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Muestra 15	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fuente: Autor

**Tabla C2**

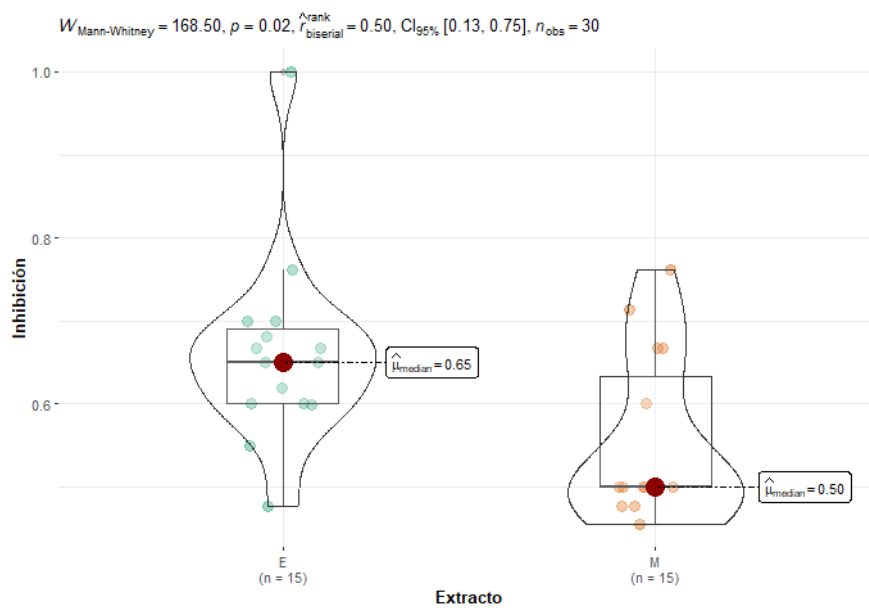
*Resultados crudos del porcentaje de inhibición alcanzados por los extractos de Cymbopogon citratus frente a la bacteria Staphylococcus aureus ATCC 25923*

<b>S. aureus</b>	<b>Control Positivo</b>	<b>Control Negativo</b>	<b>Etanol</b>	<b>Inhibición</b>	<b>%</b>	<b>Metanol</b>	<b>Inhibición</b>	<b>%</b>	<b>Hidroalcohólico</b>	<b>Inhibición</b>	<b>%</b>
<b>Muestra 1</b>	21	0	10	0,47619048	47,6190476	10	0,47619048	47,6190476	0	0	0
<b>Muestra 2</b>	20	0	11	0,55	55	10	0,5	50	0	0	0
<b>Muestra 3</b>	20	0	13	0,65	65	12	0,6	60	0	0	0
<b>Muestra 4</b>	20	0	13	0,65	65	10	0,5	50	0	0	0
<b>Muestra 5</b>	21	0	14	0,66666667	66,6666667	16	0,76190476	76,1904762	0	0	0
<b>Muestra 6</b>	20	0	12	0,6	60	10	0,5	50	0	0	0
<b>Muestra 7</b>	21	0	16	0,76190476	76,1904762	14	0,66666667	66,6666667	0	0	0
<b>Muestra 8</b>	22	0	15	0,68181818	68,1818182	11	0,5	50	0	0	0
<b>Muestra 9</b>	20	0	12	0,6	60	10	0,5	50	0	0	0
<b>Muestra 10</b>	20	0	14	0,7	70	10	0,5	50	0	0	0
<b>Muestra 11</b>	14	0	14	1	100	10	0,71428571	71,4285714	0	0	0
<b>Muestra 12</b>	20	0	14	0,7	70	10	0,5	50	0	0	0
<b>Muestra 13</b>	22	0	13	0,59090909	59,0909091	10	0,45454545	45,4545455	0	0	0
<b>Muestra 14</b>	21	0	13	0,61904762	61,9047619	10	0,47619048	47,6190476	0	0	0
<b>Muestra 15</b>	21	0	14	0,66666667	66,6666667	14	0,66666667	66,6666667	0	0	0

Fuente: Autor

## Figura C1

Prueba de U de Mann-Whitney-Wilcoxon aplicada en los tratamientos



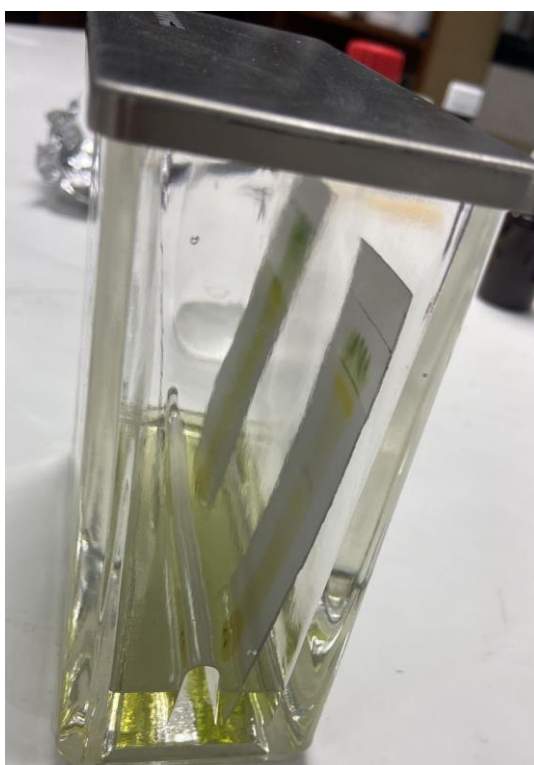
*Nota:* Diagrama de violín donde se evidencia la diferencia significativa de los tratamientos

Fuente: Autor

## Apéndice D Técnica Bioautografía

### Figura D1

*Cromatografía en capa fina*



Fuente: Autor

**Figura D2**

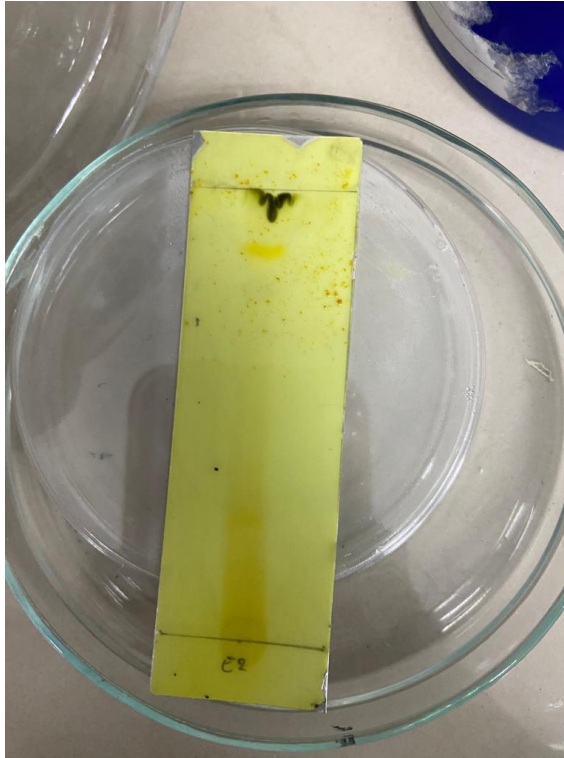
*Suspensión de la placa TLC en el inóculo*



Fuente: Autor

**Figura D3**

*Aplicación del colorante MTT en la placa de cromatografía TLC*



Fuente: Autor