

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE FRACCIONES
ENRIQUECIDAS EN FLAVONOIDES A PARTIR DE: *Psidium guajava* L.
(GUAYABA), *Calendula officinalis* L. (CALÉNDULA), L. (ROMERO) Y *Matricaria
chamomilla* L. (MANZANILLA) SOBRE: *Erwinia carotovora* (Dye).**

FREDDY MAURICIO RUIZ HURTADO

GERMÁN CAMILO BETANCOURT CALDERÓN

Tesis de pregrado para obtener el título de: Ingeniero Agrónomo

Director:

**Jorge Enrique Hernández Carvajal.
MSc. En Ciencias Farmacéuticas**

Codirectores:

**Elizabeth Murillo Perea. MSc. En Química
Luis Eduardo Gómez Caicedo. MSc. En Fitopatología**

UNIVERSIDAD DEL TOLIMA

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

IBAGUÉ – COLOMBIA

2014

ACTA DE SUSTENTACIÓN

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
COMITÉ DE INVESTIGACIONES
ACTA DE SUSTENTACIÓN

Estudiante **GERMÁN CAMILO BETANCOURT CALDERÓN**
INGENIERÍA AGRONÓMICA

TÍTULO: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN FLAVONOIDES A PARTIR DE: Psidium guajava L. (GUAYABA), Calendula officinalis L. (CALÉNDULA), Rosmarinus officinalis L. (ROMERO) Y Matricaria chamomilla L. (MANZANILLA) SOBRE: Erwinia


Fecha Sustentación: 21 de abril de 2014

Director: Jorge Enrique Hernández, y la codirección de Luis Eduardo Gómez Caicedo y Elizabeth Murillo Perea

Jurado No.1: LAILY SALTAREN GARCIA

Jurado No.2: OSCAR FERNANDO CARDOZO CARO

Factores Evaluados	Jurado 1	Jurado 2	Definitiva
Relevancia Científica (30%)	4.0	4.0	4.0
Complejidad y Profundidad (20%)	4.0	4.0	4.0
Calidad Estructural (10%)	4.2	4.2	4.2
Estilo y Presentación (10%)	4.6	4.6	4.6
Sustentación del trabajo (30%)	4.8	4.8	4.8
Definitiva	4.3	4.3	4.3



RAFAEL ANTONIO FLOREZ FAURA
Coordinador del Comité de Investigaciones

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
COMITÉ DE INVESTIGACIONES
ACTA DE SUSTENTACIÓN

Estudiante **FREDDY MAURICIO RUÍZ HURTADO**
INGENIERÍA AGRONÓMICA

TÍTULO: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE FRACCIONES ENRIQUECIDAS EN FLAVONOIDES A PARTIR DE: Psidium guajava L. (GUAYABA), Calendula officinalis L. (CALÉNDULA), Rosmarinus officinalis L. (ROMERO) Y Matricaria chamomilla L. (MANZANILLA) SOBRE: Erwinia

Fecha Sustentación: 21 de abril de 2014

Director: Jorge Enrique Hernández, y la codirección de Luis Eduardo Gómez Caicedo y Elizabeth Murillo Perea

Jurado No.1: LAILY SALTAREN GARCIA

Jurado No.2: OSCAR FERNANDO CARDOZO CARO

Factores Evaluados	Jurado 1	Jurado 2	Definitiva
Relevancia Científica (30%)	4.0	4.0	4.0
Complejidad y Profundidad (20%)	4.0	4.0	4.0
Calidad Estructural (10%)	4.2	4.2	4.2
Estilo y Presentación (10%)	4.6	4.6	4.6
Sustentación del trabajo (30%)	4.8	4.8	4.8
Definitiva	4.3	4.3	4.3



RAFAEL ANTONIO FLOREZ FAURA
Coordinador del Comité de Investigaciones

Dedicamos esta tarea académica a nuestras familias por su constante ayuda e incondicional apoyo, por ser fuente de inspiración y fuerza en momentos de abatimiento.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios por permitirnos superar las dificultades que se presentaron en el camino y llevar a feliz término este proyecto.
- A nuestras familias por estar siempre en los momentos difíciles y darnos el aliento para seguir adelante.
- A esas personas cercanas que se convirtieron en apoyo durante todo el camino que fue este proyecto.
- Al profesor Jorge Enrique Hernández C. por su constancia e incondicional apoyo para la realización de este trabajo.
- A la profesora Elizabeth Murillo por su colaboración en el trabajo de laboratorio.
- Al profesor Luis Eduardo Gómez por su asesoría en el área de fitopatología y pruebas de laboratorio.
- A la Fundación Alejandro Ángel Escobar mediante el fondo de becas Colombia Biodiversa por el apoyo económico para la realización de este trabajo de grado.
- Al grupo de investigación GIPRONUT por su colaboración en la disposición de laboratorios, materiales y equipos para el desarrollo de este trabajo.
- Al C.I.A.T. de Colombia sede Palmira – Valle del Cauca.
- Al grupo de investigación GIMFRUT por su apoyo en el trabajo de campo.
- A la profesora Martha Lili Ocampo y a su equipo de trabajo por su colaboración.
- Al Biólogo Ángel Jiménez del grupo de investigación GIPRONUT por su acompañamiento en las pruebas de actividad biológica.

CONTENIDO

	Pág.
<u>INTRODUCCIÓN</u>	16
<u>1. MARCO TEÓRICO</u>	18
<u>1.1 IMPORTANCIA DE LAS ENFERMEDADES FITOPATÓGENAS</u>	18
<u>1.2 FITOENFERMEDADES POR BACTERIAS</u>	19
<u>1.3 CONTROL DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS</u>	22
<u>1.3.1 Uso de Antibióticos</u>	22
<u>1.4 EXTRACTOS VEGETALES Y SU PAPEL EN LA AGRICULTURA</u>	23
<u>1.4.1 Uso Mundial, Regional y Local.</u>	23
<u>1.4.2 Uso en el campo.</u>	23
<u>1.5 DESCRIPCIÓN DE <i>E. carotovora</i>.</u>	27
<u>1.5.1 Generalidades.</u>	27
<u>1.5.2 Situación actual</u>	28
<u>1.5.3 Identificación taxonómica según la N.C.B.I.</u>	28
<u>1.5.4 Tratamiento</u>	29
<u>1.5.5 Incidencia.</u>	29
<u>1.6 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES VEGETALES</u>	30
<u>1.6.1 Descripción botánica <i>P. guajava</i></u>	30
<u>1.6.1.1 Flavonoides reportados y actividad biológica</u>	31
<u>1.6.2 Descripción botánica <i>R. officinalis</i></u>	32

<u>1.6.2.1 Flavonoides reportados y actividad biológica</u>	32
<u>1.6.3 Descripción botánica <i>C. officinalis</i></u>	33
<u>1.6.3.1 Flavonoides reportados y actividad biológica</u>	34
<u>1.6.4 Descripción botánica <i>M. Chamomilla</i></u>	35
<u>1.6.4.1 Flavonoides reportados y actividad biológica</u>	36
<u>1.7 FLAVONOIDES</u>	36
<u>2. PARTE EXPERIMENTAL</u>	39
<u>2.1 EQUIPOS REACTIVOS Y MATERIALES</u>	39
<u>2.1.1 Equipos</u>	39
<u>2.1.2 Reactivos</u>	39
<u>2.1.3 Materiales</u>	40
<u>2.2 MATERIAL VEGETAL</u>	41
<u>2.2.1 Material microbiológico</u>	41
<u>2.3 METODOLOGIA - ENSAYOS FITOQUIMICOS</u>	41
<u>2.3.1 Elaboración de los extractos etanólicos de <i>P. quajava</i>, <i>C. officinalis</i>, <i>R. officinalis</i> y <i>M. chamomilla</i></u>	41
<u>2.3.2 Fraccionamiento del extracto etanólico</u>	43
<u>2.3.3 Detección de flavonoides en extractos etanólicos y fracciones primarias de <i>P. quajava</i>, <i>C. officinalis</i>, <i>R. officinalis</i> y <i>M. chamomilla</i></u>	44
<u>2.4 METODOLOGÍA BIOLÓGICA</u>	45
<u>2.4.1 Bioensayo de la actividad bactericida de los extractos y fracciones sobre <i>E. carotovora</i></u>	45

<u>2.4.2 Determinación de la concentración inhibitoria para el control positivo (Cefalexina)</u>	46
<u>2.4.3 Disolución de los extractos etanólicos y fracciones primarias</u>	47
<u>2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u>	48
<u>2.5.1 Método estadístico</u>	48
<u>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	49
<u>3.1 EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS</u>	49
<u>3.2 ESTUDIO FITOQUÍMICO POR CCD DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES</u>	52
<u>3.2.1 Análisis de los extractos</u>	52
<u>3.2.2 Análisis de las fracciones</u>	54
<u>3.3 PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y FRACCIONES OBTENIDAS DE <i>P. GUAJAVA</i>, <i>R. OFFICINALIS</i>, <i>C. OFFICINALIS</i> Y <i>M.CHAMOMILLA</i> SOBRE <i>E. CAROTOVORA</i></u>	59
<u>3.4 RESULTADOS ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u>	66
<u>4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</u>	78
<u>4.1 CONCLUSIONES</u>	78
<u>4.2 RECOMENDACIONES</u>	79
<u>5. REFERENCIAS</u>	80

LISTA DE TABLAS

	Pag.
<u>Tabla 1: Clasificación taxonómica de bacterias fitopatógenas y plantas hospederas</u>	18
<u>Tabla 2: Producción mundial y pérdidas en porcentaje de diferentes cultivos, ocasionadas por tres tipos de patologías</u>	21
<u>Tabla 3: Trabajos de investigación donde se han evaluado extractos de origen botánico contra cepas bacterianas.</u>	25
<u>Tabla 4: Relación material vegetal - solvente (etanol)</u>	42
<u>Tabla 5: Cantidad de solventes utilizados en el fraccionamiento primario de los extractos etanólicos.</u>	44
<u>Tabla 6: Sustancias utilizadas como vehículos en la disolución de fracciones y extractos</u>	47
<u>Tabla 7: Rendimiento de extractos etanólicos y fracciones. Estudio fitoquímico preliminar por CCD en la identificación de flavonoides.</u>	50
<u>Tabla 8: Análisis de varianza para la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de la fracción acetato de etilo por concentración en <i>C. Officinalis</i> a las 24 horas.</u>	67
<u>Tabla 9: Análisis de varianza para la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de la fracción acetato de etilo por concentración en <i>C. officinalis</i> a las 48 horas.</u>	68
<u>Tabla 10: Análisis de varianza para la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de la fracción acetato de etilo por concentración en <i>P. guajava</i> a las 24 horas.</u>	68
<u>Tabla 11: Análisis de varianza para la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de la fracción acetato de etilo por concentración en <i>P. guajava</i> a las 48 horas.</u>	69

<u>Tabla 12: Análisis de varianza para la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición en <i>P. guajava</i> a las 24 horas.</u>	70
<u>Tabla 13: Análisis de varianza para la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición en <i>P. guajava</i> a las 48 horas.</u>	70
<u>Tabla 14: Análisis de varianza para la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición en <i>P. guajava</i> a las 48 horas.</u>	71
<u>Tabla 15: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por concentración ($\mu\text{g/mL}$) en la fracción acetato de etilo de <i>P. guajava</i> a las 24 horas.</u>	72
<u>Tabla 16: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por concentración ($\mu\text{g/mL}$) en la fracción n-butanol de <i>P. guajava</i> a las 24 horas.</u>	72
<u>Tabla 17: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por concentración ($\mu\text{g/mL}$) en la fracción acuosa de <i>P. guajava</i> a las 24 horas.</u>	73
<u>Tabla 18: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por fracción en la concentración 5.000 ($\mu\text{g/mL}$) en <i>P. guajava</i> a las 24 horas.</u>	73
<u>Tabla 19: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por fracción en la concentración 7.000 ($\mu\text{g/mL}$) en <i>P. guajava</i> a las 24 horas.</u>	74
<u>Tabla 20: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por fracción en la concentración 10.000 ($\mu\text{g/mL}$) en <i>P. guajava</i> a las 24 horas.</u>	75
<u>Tabla 21: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por fracción en la concentración 5.000 ($\mu\text{g/mL}$) en <i>P.</i></u>	75

guajava a las 48 horas.

Tabla 22: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por fracción en la concentración 7.000 ($\mu\text{g/mL}$) en *P. guajava* a las 48 horas. 76

Tabla 23: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por fracción en la concentración 10.000 ($\mu\text{g/mL}$) en *P. guajava* a las 48 horas. 76

Tabla 24 Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por fracción en *P. guajava* a las 48 horas. 77

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
<u>Figura 1: Planta de <i>P. guajava</i></u>	30
<u>Figura 2: Planta de <i>R. officinalis</i></u>	32
<u>Figura 3: Planta de <i>C. officinalis</i></u>	33
<u>Figura 4: Planta de <i>M. chamomilla</i></u>	35
<u>Figura 5. Estructura basica de los flavonoides</u>	36
<u>Figura 6: Clasificación de los flavonoides.</u>	37
<u>Figura 7: Fraccionamiento del extracto etanólico de las 4 especies de plantas.</u>	43
<u>Figura 8: Perfil cromatográfico CCD de extractos etanólicos de <i>P. guajava</i>, <i>R. officinalis</i>, <i>C. officinalis</i> y <i>M. chamomilla</i>, empleando, Reveladores NP/PEG. Patrones rutina y ácido clorogénico; Observación UV 365nm; fase móvil (F1).</u>	53
<u>Figura 9: Perfil cromatográfico CCD de extractos etanólicos de <i>P. guajava</i>, <i>R. officinalis</i>, <i>C. officinalis</i> y <i>M. chamomilla</i>, empleando, Reveladores NP/PEG. Patrones quercetina y ácido clorogénico; Observación UV 365nm; fase móvil (F2).</u>	54
<u>Figura 10: Perfil cromatográfico CCD de las fracciones obtenidas de <i>M. chamomilla</i> y <i>C. officinalis</i>, empleando, Reveladores NP y PEG; Observación UV 365nm; fase móvil (F1). Éter de petróleo, Acetato etilo, n-butanol y acuosa.</u>	55
<u>Figura 11: Perfil cromatográfico CCD de la fracción acetato de etilo de <i>P. guajava</i>, <i>R. officinalis</i>, <i>C. officinalis</i> y <i>M. chamomilla</i>, empleando, Reveladores NP/PEG. Patrones rutina y ácido clorogénico; Observación UV 365nm; fase móvil (F1).</u>	56
<u>Figura 12: Perfil cromatográfico CCD de la fracción acetato de etilo de (1) <i>P.</i></u>	56

[guajava, \(2\) R. officinalis, \(5\)R. officinalis y \(6\) M. chamomilla, empleando, Reveladores NP/PEG. Patrones \(3\) quercetina y \(4\) ácido clorogénico; Observación UV 365nm; fase móvil \(F2\).](#)

Figura 13: [Perfil cromatográfico CCD de la fracción butanólica de \(1\) P. guajava, \(2\) R. officinalis, \(5\) C. officinalis y \(6\) M. chamomilla, empleando, Reveladores NP/PEG. Patrones \(3\) rutina y \(4\) ácido clorogénico; Observación UV 365nm; fase móvil \(F1\).](#) 57

Figura 14: [Perfil cromatográfico CCD de la fracción butanólica de \(1\) P. guajava, \(2\) R. officinalis, \(5\) C. officinalis y \(6\) M. chamomilla, empleando, Reveladores NP/PEG. Patrones \(3\) quercetina y \(4\) ácido clorogénico; Observación UV 365nm; fase móvil \(F2\).](#) 58

Figura 15: [Perfil cromatográfico CCD de la fracción acuosa de \(1\) P. guajava, \(2\) R. officinalis, \(5\) C. officinalis y \(6\) M. chamomilla, empleando, Reveladores NP/PEG. Patrones \(3\) rutina y \(4\) ácido clorogénico; Observación UV 365nm; fase móvil \(F1\).](#) 59

Figura 16: [Pruebas de Actividad Biológica, extracto etanólico P. guajava, 24 horas.](#) 60

Figura 17: [Pruebas de Actividad Biológica, fracción acuosa P. guajava, 48 horas.](#) 60

Figura 18: [Pruebas de Actividad Biológica, fracción acetato de etilo C. officinalis, 48 horas.](#) 61

Figura 19: [Porcentaje de inhibición de los tratamientos: extracto etanólico, fracción acetato de etilo, fracción n-butanol y fracción acuosa de P. guajava, frente a E. carotovora a las 24 horas.](#) 62

Figura 20: [Porcentaje de inhibición de los tratamientos: extracto etanólico, fracción acetato de etilo, fracción n-butanol y fracción acuosa de P. guajava, frente a E. carotovora a las 48 horas.](#) 64

Figura 21: Porcentaje de inhibición de los tratamientos: extracto etanólico, fracción acetato de etilo, fracción n-butanol y fracción acuosa de *C. officinalis*, frente a *E. carotovora* a las 24 horas. 65

Figura 22 Porcentaje de inhibición de los tratamientos: extracto etanólico, fracción acetato de etilo, fracción n-butanol y fracción acuosa de *C. officinalis*, frente a *E. carotovora* a las 48 horas. 66

RESUMEN

Las plantas alimenticias son infectadas por bacterias originando graves problemas fitosanitarios que generan pérdidas económicas a los agricultores. Estos microorganismos desarrollan resistencia hacia los antibióticos debido a su uso inadecuado. Una alternativa en el control de bacterias fitopatógenas es el empleo de extractos botánicos, con lo cual se busca reducir el impacto económico y ambiental en el sector agrícola.

Empleando diversos órganos de *Psidium guajava* L. (guayaba), *Calendula officinalis* L. (caléndula), *Rosmarinus officinalis* L. (romero) y *Matricaria chamomilla* L. (manzanilla) se elaboraron extractos etanólicos, de los cuales se obtuvieron cuatro (4) fracciones mediante una serie eluotrópica de solventes (éter de petróleo, acetato de etilo, n-butanol y agua).

Los extractos y sus fracciones fueron caracterizados fitoquímicamente con cromatografías en capa delgada para detectar flavonoides (fracción etérea descartada) y su actividad *in vitro* se evaluó frente a la cepa *E. carotovora* mediante el método de inhibición zonal (método de difusión en agar), utilizando concentraciones de 5.000, 7.000 y 10.000 ($\mu\text{g/mL}$), con mediciones de halos de inhibición a las 24 y 48 horas. Los resultados obtenidos mediante estas pruebas determinaron un control positivo de las plantas *P. guajava* con su extracto etanólico y sus 3 fracciones y *C. officinalis* en su fracción acetato de etilo.

Los resultados obtenidos a partir del estudio de actividad biológica *in vitro* sugieren que las fracciones n-butanol y acuosa en la especie *P. guajava* y la fracción acetato de etilo en la especie *C. officinalis* son promisorias para futuros ensayos de actividad bactericida y otros estudios químicos.

Palabras clave: Extractos Botánicos, Flavonoides, *Erwinia carotovora*, *Psidium guajava*, *Calendula officinalis*, *Rosmarinus officinalis* y *Matricaria chamomilla*.

ABSTRACT

Food plants are infected by causing serious phytosanitary problems caused economic losses to farmers bacteria. These microorganisms develop resistance to antibiotics due to improper use. An alternative in the control of plant pathogenic bacteria is the use of botanical extracts, which seeks to reduce the economic and environmental impact on the agricultural sector.

Using various organs of *Psidium guajava* L. (guava), *Calendula officinalis* L. (marigold), *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) and *Matricaria chamomilla* L. (chamomile) ethanol extracts were prepared , of which four (4) fractions were obtained by eluotropic series of solvents (petroleum ether, ethyl acetate, n-butanol and water).

The extracts and fractions were characterized phytochemically with thin layer chromatography for any flavonoids (ethereal fraction discarded) and its *in vitro* activity was evaluated against strain *E. carotovora* by the method of zonal inhibition (diffusion method on agar) using concentrations of 5.000, 7.000 and 10.000 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), with measurements of zones of inhibition at 24 and 48 hours. The results obtained by these tests determined a positive control of plants with *P. guajava* ethanol extract and its fractions and its 3 in the *C. officinalis* ethyl acetate fraction.

The results obtained from the study of biological activity *in vitro* suggest that n - butanol fraction and water at *P. guajava* spice and ethyl acetate fraction in the spice *C. officinalis* are promising for future trials and other studies bactericidal activity chemicals.

Keywords: Botanical Extracts, Flavonoids, *Erwinia carotovora*, *Psidium guajava*, *Calendula officinalis*, *Rosmarinus officinalis* and *Matricaria chamomilla*.

INTRODUCCIÓN

Las plagas y enfermedades de las plantas, anualmente hacen que se reduzca la producción agrícola a nivel mundial entre un 20 y 40% (CIPF, 2012), originando que aspectos fitosanitarios sean de importancia en la producción agrícola.

En Colombia el mercado de agroquímicos tiene un tamaño mínimo de \$2.282.626.000, (Ministerio de Agricultura, ANDI Cámara Procultivos & Econometría Consultores, 2007)g y se cultivan cerca de 4'000.000 de has en los cuales se aplican 49'000.000 de Kg de agroquímicos (Revista semana sostenible, 2014) para control de plagas y enfermedades, entre ellas de origen bacteriano que afectan un número considerable de plantas alimenticias; Estas enfermedades y su difícil control originan importantes problemas fitosanitarios con lo cual se genera bajo rendimiento en los cultivos y su tratamiento conlleva a elevar los costos de producción y pérdidas económicas a los agricultores.

Entre los métodos utilizados para controlar enfermedades bacterianas en plantas se encuentra la dispersión de sustancias como oxitetraciclina y estreptomina o productos comerciales que incluyen en su composición estos fármacos. La incorrecta aplicación y los periodos prolongados de contacto entre las sustancias y las fitobacterias han generado la aparición de resistencia bacteriana (Mc Manus, 2002), dejando los cultivos vulnerables al ataque de microorganismos resistentes.

E. carotovora es una fitobacteria que a nivel mundial presenta alta incidencia en cultivos alimenticios durante la época de pre y pos cosecha. Este microorganismo es una especie cuarentenaria en Estados Unidos y la Unión Europea debido a su alto riesgo de convertirse en una enfermedad transfronteriza (FAO, 2003).

En Colombia múltiples cultivos de importancia económica como: *Solanum tuberosum* L. (papa), *Solanum lycopersicum* L. (tomate), *Mangifera indica* L. (mango), *Musa x paradisiaca* L. (plátano), *Cucumis melo* L. (melón), *Daucus carota* L. (zanahoria) y algunas especies de flores como *Zantedeschia* spp. (Cartuchos) son afectados por *E.*

carotovora, bacteria causante de pudriciones blandas en diferentes tejidos de la planta (García R. , 2000).

La diversidad botánica en Colombia oscila entre 30.000 y 40.000 especies de plantas (García, 2000). A partir de ellas se pueden obtener sustancias químicas que presenten diferentes actividades biológicas, entre ellas actividad bactericida; es por ello que la obtención de extractos vegetales constituye una alternativa promisoriosa en el control de fito-enfermedades (Domingo y López-Brea, 2003).

El departamento de Tolima es una región que presenta pisos termicos y condiciones medio ambientales optimas para la producción de plantas silvestres y cultivadas de las cuales se pueden obtener extractos botánicos crudos o fracciones semipurificadas que pueden ser fuente de sustancias químicas con actividad bactericida o bacterioestática.

Extractos y fracciones obtenidas a partir de *P. guajava*, *C. officinalis*, *R. officinalis* y *M. chamomilla*, pueden ser utilizados para el control de *E. carotovora*, pues presentan dentro de sus metabolitos secundarios flavonoides, los cuales están asociados con la acción bactericida frente a microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus fecalis* (Bárbara Águila Gil, 2000) además de *Salmonella Typha*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Staphylococcus epidermidis* (Rodríguez, 2010).

Con la realización de este trabajo se buscó evaluar la actividad bactericida *in vitro* de extractos etanólicos y fracciones enriquecidas en flavonoides a partir de *P. guajava*, *C. officinalis*, *R. officinalis* y *M. chamomilla*, frente a *E. carotovora*; se evaluó la presencia de flavonoides mediante cromatografías en capa delgada (CCD) en extractos y fracciones. Se aportó información sobre similitudes y diferencias químicas y biológicas entre las cuatro especies de plantas evaluadas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 IMPORTANCIA DE LAS ENFERMEDADES FITOPATÓGENAS.

La producción agrícola correspondiente a plantaciones de frutas, vegetales y hortalizas está expuesta a diferentes tipos de bacterias fitopatógenas que pertenecen a los géneros: *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Agrobacterium* y *Erwinia*, siendo estos los más comunes en plantaciones comerciales. Estas bacterias son causante de pudriciones, tizones, agallas y marchitamientos en plantas cultivadas (tabla 1) (Agrios, 2005).

Actualmente está reportado que un alto porcentaje de bacterias fitopatógenas están clasificadas como bacterias Gram negativas, las cuales poseen mecanismos de multiresistencia que les permiten sobrevivir ante diferentes antibióticos. Los mecanismos empleados por estas bacterias son: modificación enzimática de antibióticos, bombas de salida, cierre de porinas y alteraciones en los sitios de acción. Estos mecanismos pueden ser activados de forma sincronizada y funcionar armónicamente para proteger la célula bacteriana (Tafur, Torres, y Villegas, 2008). En la siguiente tabla se muestra el listado de algunas bacterias fitopatógenas y sus plantas hospederas.

Tabla 1: Clasificación taxonómica de bacterias fitopatógenas y plantas hospederas.

Clasificación fitobacteria	Familia	Género	Cultivos que afecta
Parte 1. Cocos y bacilos aerobios gram negativos.	Pseudomonadacea	<i>Pseudomonas</i>	Olivo, lilas, plátano y solanáceas
		<i>Xanthomonas</i>	Cebolla de bulbo, nuez y cítricos.
		<i>Xylella</i>	Caña de azúcar, pasto, roble, moral.
	Rhizobiaceae		Frambuesas, zarzamoras,

		<i>Agrobacterium</i>	manzanos.
Parte 2. Bacilos anaerobios facultativos gram negativos.	Enterobacteriaceae	<i>Erwinia</i>	Papa, tomate, cebolla, tabaco, zanahoria,calas, plátano, mango.
Parte 3. Bacilos de forma irregular, gram positivos y que no forman esporas.		<i>Clavibacter</i>	Papa, alfalfa, frijol, tomate
Parte 4. Actinomicetos: bacterias que forman ramificados		<i>Streptomyces</i>	Papa.
Parte 5. Mollicutes: procariontes con membrana celular, pero sin pared celular.	Mycoplasmataceae	<i>Mycoplasma</i>	Zanahoria, cebolla, tomate, manzano.
	Spiroplasmataceae	<i>Spiroplasma.</i>	Maíz, lechuga, durazno,

Fuente: (Agrios, 2005).

1.2 FITOENFERMEDADES POR BACTERIAS.

A nivel mundial se estima que la mayor cantidad de pérdidas en los cultivos son atribuidas al daño ocasionado por enfermedades, entre ellas las de origen bacteriano, insectos y malezas, los cuales disminuyen de manera directa la producción y utilización de productos alimenticios (Agrios 2005).

De acuerdo con Agrios (2005) los datos que se tienen acerca de las pérdidas en cultivos por epifitotias se resumen en la tabla 2. Donde se muestran los datos correspondientes a pérdidas en cultivos por diferentes fuentes de fitoenfermedades.

La mayoría de las bacterias fitopatógenas se desarrollan principalmente como organismos parásitos en plantas hospederas y parcialmente en el suelo como saprofitos. Sin embargo, hay grandes diferencias entre especies, en cuanto al grado de desarrollo en uno u otro ambiente (Agrios, 2005).

Tabla 2: Producción mundial y pérdidas en porcentaje de diferentes cultivos, ocasionadas por tres tipos de patologías.

Cultivos	Producción real (Millones de toneladas)	Porcentaje de pérdidas en los cultivos (%)			Porcentaje total de pérdidas en los cultivos (%)
		Enfermedades	Insectos	Malezas	
Cereales	1695	9.20	13.90	11.40	34.50
Papas	255	21.80	6.50	4.00	32.30
Otros cultivos de vegetales de raíces	556	16.7	13.6	12.7	43.00
Remolachas azucareras	319	10.40	8.30	5.80	24.50
Caña de azúcar	811	19.20	20.10	15.70	55.00
Leguminosas	45	11.30	13.30	8.70	33.30
Hortalizas	368	10.10	8.70	8.90	27.70
Frutos	302	12.60	7.80	3.00	23.40
Café, cacao y té	8	17.70	12.10	13.20	42.40
Cultivos de oleaginosas	240	9.80	10.50	10.40	30.70
Cultivos de fibras	40	11.00	12.90	6.90	30.80
Tabaco	6	12.30	10.40	8.10	30.80
Caucho natural	4	15.00	5.00	5.00	25.00
Promedio del porcentaje de las pérdidas:		11.80	12.20	9.70	33.70

Fuente: (Agrios, 2005).

Las bacterias fitopatógenas originan pérdidas económicas considerables en la producción agrícola, para el cultivo de papa donde se calculan pérdidas anuales entre 50 y 100 millones de dólares a nivel mundial por pudriciones blandas típicas del género *Erwinia* (Franco, Stefanova & Coronado, 2004).

1.3 CONTROL DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS.

1.3.1 Uso de Antibióticos:

El uso de estas moléculas se ha vuelto popular por ofrecer resultados rápidos, además se conoce que se usan contra diferentes géneros de bacterias entre ellas: *Pseudomonas sp.*, *Xanthomonas sp.*, *Agrobacterium sp.* y *Erwinia sp.* (Vidaber, 2002; McManus, 1999) empeorando el panorama de los agroecosistemas.

Debido al alto rango de hospederos y el difícil manejo de bacterias fitopatógenas, los agricultores han implementado en su actividad agronómica el uso de antibióticos, esta práctica ha originado que las bacterias adquieran resistencia. Un ejemplo de esta situación la representa *Erwinia amylovora*, la cual presenta resistencia a la estreptomicina (Guevara et al. 2002; Mc Manus, 1999).

Para el control de la bacteria *E. carotovora* la cual afecta el cultivo de papa, remolacha dulce, crisantemo y plantas del género: *Dieffenbachia* en los E.E.U.U se realiza la aplicación de antibióticos como: estreptomicina y oxitetraciclina; otro antimicrobiano que se reporta en países centro americanos como: Costa Rica, Honduras, Guatemala, El Salvador y México, es la gentamicina para el control de *E. carotovora* en cultivos de papa. En México se usa la gentamicina en cultivos de Agave (Vidaber, 2002). En Colombia se reporta la resistencia a antibióticos por parte de cepas bacterianas asociadas a cultivos de pasifloráceas, entre ellas el género: *Erwinia s.p.*, esto debido al uso de productos como: estreptomicina, validamicina, oxitetraciclina y productos cupricos en campo. (Farfán y Hoyos Carvajal, 2010).

1.4 EXTRACTOS VEGETALES Y SU PAPEL EN LA AGRICULTURA.

1.4.1 Uso Mundial, Regional Y Local.

El uso de extractos vegetales para control de enfermedades agrícolas era una práctica ancestral, ampliamente utilizada en diversas culturas y regiones del planeta hasta la aparición de los plaguicidas sintéticos; en los últimos años, en la búsqueda de un equilibrio entre el ambiente, la producción y el hombre, se ha desarrollado un nuevo concepto de protección de cultivos mediante productos, en cuyo diseño se considera: acción específica sobre el objetivo, impacto bajo o nulo en organismos circundantes, el ambiente y en el cultivo (Molina, 2001).

Es por ello que los extractos de origen vegetal juegan un papel importante en la agricultura, debido a que no perduran en el medio ambiente por su fácil degradación; además, al ser compuestos de origen natural no perjudican la salud humana. A nivel nacional se pueden resaltar los trabajos realizados por Gracia De García, Correa A. & Rojas C.(1995) donde se evaluó la actividad bactericida de 16 especies de plantas pertenecientes a doce familias, encontrando actividad biológica sobre cepas bacterianas de tipo gram positivo y gram negativo. Otro trabajo que resulta importante es el aporte realizado por Celis (2008) donde realiza una revisión especialmente utilizando la familia Piperaceae y resaltando los diferentes usos de sus extractos en la agricultura para el tratamiento de enfermedades, plagas y malezas.

En el departamento del Tolima se han realizado estudios sobre extractos vegetales contra bacterias de la especie *Staphylococcus aureus* procedentes de *Diplostegium tolimense* Cuatrec. encontrando actividad biológica *in vitro* (Ávila, Baquero, Viña, y Murillo, 2006).

1.4.2 Uso en el campo.

La alternativa de usar extractos vegetales para el control biológico se muestra como una opción sana para la salud y alimentación del ser humano, debido a que los productos y materias primas que están

llegando del campo, están siendo asperjados con gran cantidad de agroquímicos sin respetar periodos de carencia (Ministerio de salud: Argentina, 2011).

Los extractos vegetales al ser de origen natural presentan una rápida degradación y no son residuales. Es por ello que este nuevo reporte de actividad biológica por parte de extractos vegetales sobre bacterias fitopatógenas, se muestra como un nuevo hallazgo que puede ser usado en modelos de producción orgánica, donde se conservan las características esenciales de los compuestos que están presentes en los vegetales.

La mayoría de estos estudios sobre actividad biológica de extractos vegetales se realizan en laboratorio y se obtienen importantes resultados, pero la verdadera esencia de estos trabajos debe ser el estudio de la posibilidad de usarlos en campo; con lo cual surgen nuevos inconvenientes debido a que los diferentes factores del medio pueden alterar la relación de los microorganismos con su entorno, esta variable puede llegar a generar efectos que favorecen el control biológico

Buscando conservar el equilibrio ecológico y disminuir el impacto en el ambiente que originan los plaguicidas sintéticos se investigan nuevas alternativas en cuyo diseño se considera: acción específica sobre el objetivo, impacto bajo o nulo en organismos circundantes, el ambiente y en el cultivo (Molina, 2001).

Atendiendo a esta necesidad de los agricultores una alternativa nuevamente utilizada son los extractos de origen vegetal, los cuales proporcionan nuevas entidades químicas capaces de presentar actividad frente a organismos que causan daños en los cultivos, además son biodegradables en el ambiente y posiblemente no generan toxicidad al hombre. En la tabla 3. se reportan trabajos de investigación en los cuales se evalúan extractos vegetales frente a diferentes microorganismos patógenos y fitopatógenos:

Tabla 3: Trabajos de investigacion donde se han evaluado extractos de origen botanico contra cebras bacterianas.

Familia	Especie	Extracto	Bacteria	Resultado	Autor
Winteraceae	<i>Drymisgranadensis</i> L.f.	Etanólico	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> y <i>Salmonella panama</i> .	Ausencia de crecimiento o reducción en la población.	(Gracia De García, Correa A. y Rojas C, 1995)
Melastomatáceae	<i>Monochaetum myrtoideum</i> Bonpl.	Etanólico	<i>E. coli</i> .	Reducción en la población.	(Gracia De García, Correa A. y Rojas C, 1995)
Polygonacea	<i>Polygonums.p.</i>	Etanólico	<i>E. coli</i> y <i>S. typhi</i> .	Ausencia de crecimiento o reducción en la población.	(Gracia De García, Correa A. y Rojas C, 1995)
Polygalaceae	<i>Monnina cf. molis</i> PI & Lind	Etanólico	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>S. typhi</i> .	Ausencia de crecimiento.	(Gracia De García, Correa A. y Rojas C, 1995)

Labiatae	<i>Savia scutellaroides</i> H.B.K.	Etanólico	<i>Escherichia coli.</i>	Ausencia de crecimiento.	(Gracia De García, Correa A. y Rojas C, 1995)
Geuneraceae	<i>Kohleriatriane</i> (Regel) Hanst.	Etanólico	<i>E. coli, S. typhi</i> y <i>S. panama.</i>	Ausencia de crecimiento o reducción en la población.	(Gracia De García, Correa A. y Rojas C, 1995)
Anacardiaceae	<i>Schinopsis balansae</i> Engl.	Cocción	<i>Xanthomonas campestris</i>	Inhibición en el crecimiento	(Stauffer et al. 2000)
Miyraceae	Eucalyptus s.p. L'Her	Cocción	<i>Xanthomonas campestris</i>	Inhibición en el crecimiento	(Stauffer et al. 2000)
Myrtaceae	<i>Psidium guajava</i> L.	Cocción	<i>X. campestris</i>	Inhibición en el crecimiento	(Stauffer et al. 2000)
Amarillidaceae	<i>Alliumsativum</i> L.	Cocción	<i>X. campestris</i>	Inhibición en el crecimiento	(Stauffer et al. 2000)
Amarillidaceae	<i>Allium cepa</i> L.	Cocción	<i>X. campestris,</i> <i>E. coli, P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella s.p.</i>	Inhibición en el crecimiento	(Stauffer et al. 2000) (Herrera & García, 2006)

Rutaceae	<i>Citrus s.p.</i>	A base de semillas	<i>Xanthomonas s.p.</i> , <i>Pseudomonas s.p.</i> y <i>Erwinias.p.</i>	Efecto bactericida	(Molina . 2001)
Lauraceae	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> J.P.	Acuosos	<i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>Salmonella s.p.</i>	Efecto bactericida	(Herrera & García, 2006)
Fabaceae	<i>Prosopisalba</i> Griseb	Maceración con etanol	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y <i>Pseudomonas corrugata</i> .	Inhibición en el crecimiento	(Corzo, Bravo, Serrano, & Vattuone, 2009)
Asteraceae	<i>Diplostephium tolimense</i> Cuatrec.	Etanólico y partición biodirigida	<i>Staphylococcus aureus</i>	Efecto bactericida	(Ávila, Baquero, Viña, y Murillo, 2006).

[1.5DESCRIPCIÓN DE *E. carotovora*.](#)

[1.5.1 Generalidades.](#)

Bacterias de género *Erwinia sp*, presentan forma de bastón recto, con dimensiones de 0,5 a 1,0 X 1,0 a 3 µm. Se desplazan por medio de varios a muchos flagelos peritricos. Las bacterias de este género son las únicas fitopatógenas que son anaerobias facultativas. Algunas especies de *Erwinia* no producen enzimas pépticas y causan marchitamiento o enfermedades necróticas (como el grupo “*amylovora*”), mientras que otras presentan una notable actividad peptolítica y causan pudriciones blandas en las plantas (como el grupo “*carotovora*”)(Agrios, 2005).

Erwinia ocasiona la marchitez bacteriana de las cucurbitáceas (*E. tracheiphila*), la marchitez o Stewart del maíz (*E. stewartii*) y el tizón de fuego de los frutos de pomo (*E. amylovora*) (Agrios, 2005).

Las especies de *Erwinia* son oxidasa negativas, es decir que en la prueba para determinar la presencia de la enzima oxidasa no se reporta, además resulta ser catalasa positiva, por tanto se presenta la enzima catalasa en este tipo de bacterias; no decarboxilan el ácido glutámico y se detectan raramente decarboxilasas de arginina, lisina u ornitina, ureasas y lipasas. El porcentaje molecular de GxC del DNA es de 50-58% (Smith, Dunez, Phillips, Lelliott, &Archer, 1992).

1.5.2 Situación actual.

Uno de los microorganismos causantes de pudriciones blandas que atacan a los tejidos vivos de las plantas en el campo o durante su almacenamiento pertenecen al género: *Erwinia*; el grupo de *Erwinia* “*carotovora*” o de las “pudriciones blandas”, origina la pudrición blanda de numerosos frutos carnosos, hortalizas y plantas de ornato (Agrios, 2005).

La especie *E. carotovora* tiene una fuerte actividad proteolítica (ruptura enzimática del enlace aminopeptídico acompañada de la liberación de agua), ocasionando pudriciones blandas (Niño *et al.*, 2008). Las bacterias de las especies: *E. carotovora* *pv. carotovora*, *E. carotovora* *pv. Atroseptica* y *E. chrysanthemi* producen respectivamente la pierna negra de la papa y la pudrición blanda, menos común de varios cultivos (Agrios, 2005).

1.5.3 Identificación taxonómica según la N.C.B.I.

Reino: *Prokaryotae* “bacteria”

Filo: *Proteobacteria*

Clase: *Gammaproteobacteria*

Orden: *Enterobacteriales*

Familia: Enterobacteriaceae

Género: *Pectobacterium*

Especie: *Pectobacterium carotovorum*. Sinónimo: *Erwinia carotovora*

1.5.4 Tratamiento.

En países como E.E.U.U. y Venezuela las lesiones ocasionadas por *Erwinia sp.* en plantaciones de: manzana, pera, pimentón, tomate, papa, durazno, nectarina, mango y plantas ornamentales se han estado tratando con bactericidas de tipo sintético a base de estreptomycina y oxitetraciclina cuyos nombres comerciales corresponden a: Agri-mycin 17, Mycoshield o Agricultural Terramycin y cuprimicin 500. Estas medidas son tomadas por los agricultores debido a las pocas alternativas de control que les ofrece el mercado actual, con lo cual la resistencia de estos microorganismos aumenta por la poca rotación de moléculas (McManus, 1999 & Vidaber, 2002).

1.5.5 Incidencia.

La presencia de *E. carotovora* se reporta en cultivos tales como: Agave, tabaco, lirios, calas, espinaca, mango, ajo y yuca (Alvarez, *et al.* 2002; Guevara, Maselli, Mireles, Figueroa, Marcano, & Rondón, 2002; McManus, 1999; Schnetter Moralez, Mera Sáez, & Pihán Soriano, 2006; Vidaber, 2002).

En plantaciones de papa en la Habana – Cuba, la degradación de tejidos y pérdidas por *Erwinia* oscilan entre 63.52 % y 74.38%, en cultivos de pimentón variedad chile bell en Obregón - México se reportan pérdidas entre el 10 y el 60%, en la industria de las flores en Araucanía – Chile, las

pérdidas pueden llegar al 100%.En plantaciones de plátano en Colombia ha causado pérdidas de hasta el 70%,(Alvarez, *et al.*, 2002; Aquino *et al.* 2011; Franco, Stefanova, & Coronado, 2004;García *et al.*2000; Guevara *et al.* 2002; Niño *et al.* 2009; Schnetter Moralez, Mera Sáez, y Pihán Soriano, 2006; Trujillo, Hernández, & Muñoz, 2000).

1.6DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES VEGETALES

1.6.1 Descripción botánica *P. guajava*

Figura 1. Planta de *P. guajava*



Fuente: Tomado de (<http://www.aromaticsinternational.com/guavaleaf101>)

Arbusto grande o árbol pequeño y perennifolio de la familia Myrtaceae, generalmente de 3 a 10 metros de altura con abundantes ramas; los fustes tortuosos, la corteza de color entre pardo claro y rojizo, delgada, lisa y en continua exfoliación; el sistema radicular generalmente superficial y muy extenso, que rebasa con frecuencia la copa, con algunas raíces profundas pero sin una raíz principal inconfundible. Las

hojas opuestas y simples, sin estipulas; el peciolo corto de 3 a 10 mm de largo; lamina oblongo elíptica de 5 a 15 cm de largo y 4 a 6 cm de ancho, el ápice entre obtuso y acuminado sin punta, la base entre redondeada y subcumeada, las márgenes enteras, algo gruesa y coriácea de color entre gris apagado y verde amarillo por el haz, ligeramente pubescente en el envés, las venas prominentes, salpicada de glándulas. La inflorescencia axilar, con 1 a 3 flores los pedicelos de unos 2 cm de largo, dos brácteas, lineales. Cáliz escindido irregularmente en 2 a 4 lóbulos, blancuzco y escasamente veloso por dentro; de 4 a 5 pétalos, blancos lineal ovados, de unos dos cm de largo. El fruto es una baya ovoide o en forma de pera, de 4 a 12 cm de largo, el mesocarpio grueso y comestible (Rangel, 2002).

1.6.1.1 Flavonoides reportados y actividad biológica.

Los reportes de flavonoides encontrados en la planta indican la presencia de miricetina, quercetina, leucocianidina, apigenina, luteolina y kaempferol (Vargas, Soto, González, Engleman, y Martínez, 2006). Los extractos hidroalcohólicos de la planta de guayaba presentan actividad biológica contra bacterias de tipo Gram negativas como: *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa* (Espinosa, *et al.* 2012; Martínez, Molina, y Boucourt, 1997; Souza, *et al.* 2011).

1.6.2 Descripción botánica *R. officinalis*

Figura 2. Planta de *R. officinalis*



Fuente: Tomado de (http://www.elicriso.it/es/plantas_aromaticas/romero/)

Se trata de un arbusto aromático perenne, perteneciente a la familia de las labiadas (Lamiaceae), puede medir de 50 a 150 cm de altura, frondoso y muy ramificado. Las hojas son opuestas, coriáceas y estrechamente lineales; pueden llegar a medir hasta 3 cm de largo y 4 cm de ancho, y sus márgenes enteros enrollados hacia abajo hacen que parezcan casi cilíndricas. La cara superior de las hojas jóvenes es pelosa y de color verde intenso, las hojas adultas son glabras. Esta cara es rugosa y esta surcada por el nervio medio, que está hendido. Este mismo nervio sobresale claramente en el envés, que está cubierto por un denso tomento blanco. La floración dura casi todo el año y produce flores labiadas que se agrupan en inflorescencias densas, que se encuentran en las axilas de las hojas (López 2008).

1.6.2.1 Flavonoides reportados y actividad biológica.

Presenta compuestos de tipo flavonoide tales como: luteolina (y derivados), apigenina, genkwanina, diosmetina, hispidulina, 5-hidroxi-7, 4'-dimetoxi-flavona, cirsimaritina y los correspondientes heterósidos (Muñoz Centeno, 2002; Okamura, Haraguchi, Hashimoto,

y Yagi, 1994); extractos etanólicos y aceites esenciales de esta planta contra bacterias de tipo Gram negativo de interés alimentario y de interés veterinario tales como: *E. coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa* (Avila *etal.* 2011; Castaño P., Ciro G., Zapata M., & Jiménez G., 2010; Tavassoli y Emam Djomeh, 2011).

1.6.3 Descripción botánica *C. officinalis*

Figura 3. Planta de *C. officinalis*



Fuente: Tomado de

(http://www.floralimages.co.uk/page.php?taxon=calendula_officinalis,1)

Planta herbácea, anual de la familia: Asteráceae; de color verde claro y de 30 a 60 cm de altura. En los primeros estadios la planta está conformada por una roseta basal de hojas, posteriormente desarrolla tallos angulosos y pubescentes a menudo ramificado desde la base. Las hojas son oblongolanceoladas o espatuladas, alternas de hasta 13 cm de largo. En los extremos de los tallos se encuentran los capítulos cuyo diámetro oscila entre 3 y 6 cm y están formados por flores liguladas

marginales y tubulares en el centro. El involucro es gris-verdoso en forma de platillo de 1,5 a 3 cm de diámetro. El receptáculo desnudo, plano o ligeramente prominente, su fruto es en aquenio (Acosta de la Luz, Rodríguez Ferradá, y Sánchez Govín, 2001).

1.6.3.1 Flavonoides reportados y actividad biológica.

Para esta planta se reportan flavonoides cuyo contenido es de aproximadamente: 0.33 y 0.88% en receptáculos y flores liguladas respectivamente (Lastra Valdés & Piquet García, 1999), los compuestos identificados en este grupo de metabolitos secundarios son: isorhamnetina 3-O glicósido, isorhamnetina 3-O rutinósido, isorhamnetina neo hesperidósido, isorhamnetina 3-O rutinorhamnosido, quercetina 3-O glucósido, quercetina 3-O glucorhamnosido, calendoflosido, calendoflavosido, calendoflavobiosido, narcisina, isoquercetina, quercetina, rutosido y kaemferol. (Hadison, 1985; Vidal, Ollivier, 1988; Wagner, Bladt, y Zgainski, 1984). Extractos fluidos obtenidos a partir de esta planta presentan actividad biológica sobre microorganismos de tipo bacteriano como: *Staphylococcus aureus* y *S. fecalis* (Acosta de la Luz, *et al.* 2001; Lastra & Piquet, 1999; Muñoz, 2004).

1.6.4 Descripción botánica *M. Chamomilla*

Figura 4. Planta de *M. chamomilla*



Fuente: Tomado de (<http://www.abchomeopatia.com/chamomilla-dolores-insoportables/>)

Planta herbácea anual perteneciente a la familia de las compuestas, actualmente familia: Asteráceae; la planta se caracteriza por presentar una altura de 30 cm aproximadamente; tallo cilíndrico erguido, ramoso, de color verde blanquecino; hojas alternas divididas en pequeños segmentos lineales muy finos. Cada ramita presenta en su extremo el botón floral de color amarillo-dorado y lígulas de color blanco. Estas últimas corresponden a la parte unisexuada de la flor, mientras que la amarilla, ubicada en la zona central, es la parte hermafrodita. Los frutos son pequeños, elipsoidales y de color pardo (Mohammad, 2011).

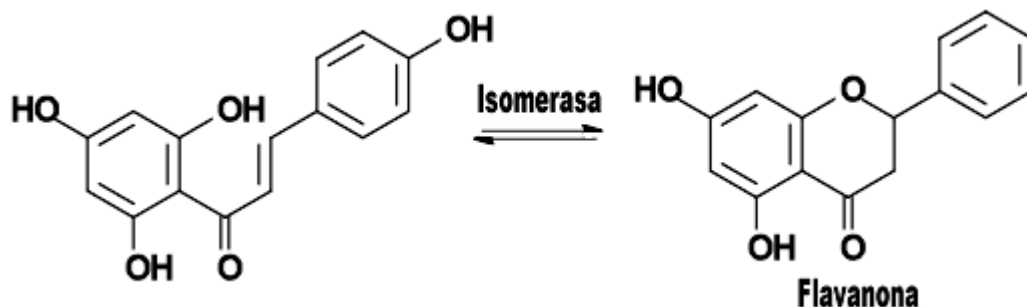
1.6.4.1 Flavonoides reportados y actividad biológica.

En su composición presenta una proporción de 0.5 - 3% de flavonoides totales, entre ellos: quercimeritrina, apigenina-7-glucosido, luteolina-7-O-glucosido, patuletina-7-O-glucosido y más de 7 agliconas, apiina, rutina y apigetrina (Hernández U., Valero, & Gil Otaiza, 2002; Wagner, Blatt, & Zgainski, 1984). Esta planta presenta actividad biológica contra bacterias como: *S. aureus*, *Candida albicans* y *C. krusei* (Nogueira, Diniz, & Lima, 2008).

1.7 FLAVONOIDES

Los flavonoides son metabolitos secundarios que tienen una estructura química muy definida. Puede observarse (Figura 5) que de manera general son moléculas que tienen dos anillos bencénicos (ó aromáticos) unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, los autores los denominan simplemente como compuestos C6 C3 C6 (Martinez, 2005)

Figura 5. Estructura básica de los flavonoides.



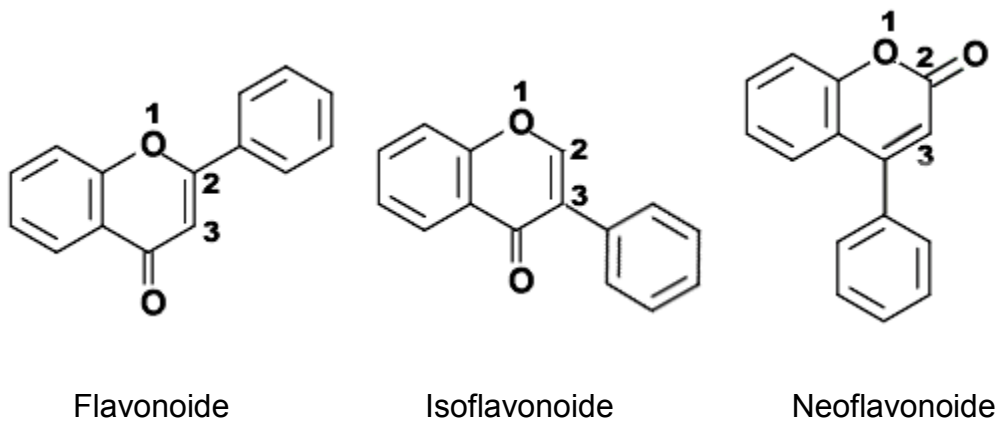
Fuente: Tomado de (<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flavonoide-flavanona-isomerasa.gif>)

Variando el estado de oxidación de la unidad C3 se determina el grupo de los flavonoides al cual pertenece cada compuesto. Los flavonoides son compuestos que presentan una biogénesis mixta, es decir, que el anillo A

proviene de la ruta de la malonilcoenzima A y el anillo B y la cadena C3 provienen de la ruta del ácido shikímico(Martinez, 2005).

Los flavonoides se biosintetizan en todas las "plantas terrestres" o embriofitas, la concentración de estos es muy variable entre especies y en respuesta al ambiente; los flavonoides están presentes de diferentes formas: libres como agliconas flavonoides, como glicósidos "la mayoría de las veces", como sulfatos y algunas veces como dímeros y polímeros. Las antocianinas se presentan en forma de sales (Martinez, 2005). Los glicosidos muestran el azúcar ligado de dos formas: por enlaces con los átomos de oxígeno (enlace hemiacetal) como O-glicosidos, estos son los más comunes de hallar en la naturaleza; la otra forma es con los carbohidratos unidos a través de átomos de carbono C-C, es decir, C-glicosidos (Martinez, 2005). Los flavonoides según la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada se clasifican en: flavonoides, isoflavonoides y neoflavonoides (Figura 6).

Figura 6. Clasificación de los flavonoides.



Fuente: Tomado de (<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:2-phenylchromen-4-one.gif>)

Los flavonoides entre ellos los pertenecientes al grupo de flavonas presentan su actividad frente a los microorganismos probablemente

porque forman complejos con las proteínas solubles y extracelulares y con las células de la pared bacteriana, de forma similar a las quinonas; un ejemplo de estas flavonas puede ser la catequina compuesto que ha expresado control sobre *Vibrio cholerae* y *Streptococcus mutans* entre otras bacterias (Domingo y López-Brea, 2003).

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 EQUIPOS REACTIVOS Y MATERIALES

2.1.1 Equipos

- Ensayos fitoquímicos

Estufa de aire circulante marca Memmert has 400 °C.

Balanza analítica Mettler Toledo, modelo AE 200. Sensibilidad: 0.01g, cap: 200g.

Balanza de plato externo Mettler Toledo, capacidad: 320g.

Rotavapor Büchi modelo R-114.

Cámara de luz ultravioleta marca Spectroline 254 nm y 365 nm.

Baño de agua termostático marca Memmert, T. max 120 °C.

Liofilizador

- Ensayos biológicos

Cabina de flujo laminar vertical marca C4, referencia FLC 85

Centrifuga marca EBA 6000 rpm

Autoclave marca Allamerican cap. 40 L

Vortex marca Heidolph

Incubadora marca Memmert

Espectrofotómetro UV-VIS marca Perkin Elmer

Equipos e implementos de bioseguridad

2.1.2 Reactivos

- Ensayos fitoquímicos

Solventes: Éter de petróleo 60 – 80 °C marca Sigma Aldrich, acetato de etilo marca Honeywell, n-butanol marca Panreac, ácido acético, ácido fórmico, metanol.

Reactivos: ácido difenilbórico aminoéster, polietilenglicol 4000.

Se emplearon solventes y reactivos de las marcas Merck y Sigma Aldrich.

Solventes grado técnico: etanol 96% de la fábrica de licores del Tolima.

Agua destilada y desionizada.

- Ensayos biológicos

R.A: Medio de cultivo Muller Hinton marca Oxoid, cefalexina (300 ppm), solución peptona al 10%, solución dextrosa al 20%, medio de cultivo YCDA, especial peptona, extracto de levadura, cloruro de sodio.

Solventes: Agua destilada estéril, dimetil sulfoxido al 10%, glicerina y twin 80.

Erwinia carotovora cepa de referencia ICA 68 y código 1027

- Compuestos de referencia

Quercetinay ácido clorogénico marca Merck.

2.1.3 Materiales

- Ensayos fitoquímicos

Mortero metálico y de porcelana con mazos, percoladores de vidrio, embudos de decantación en vidrio, frascos eppendorf, frascos ámbar, capsulas de porcelana, cromatoplacas en aluminio de sílica gel 60 GF₂₅₄ marca Macherey Nagel, cámaras para cromatografía en capa delgada, aspersores, capilares de vidrio y materiales de uso común del laboratorio.

- Ensayos biológicos

Cajas petri, pipetas pasteur de vidrio, frascos ámbar en vidrio (10 mL), pipetas transfer (100 - 1000, 1 - 50 μ L), puntas para pipeta transfer, agitadores de vidrio, punzón, hisopos. Material de uso común de laboratorio; todo material utilizado en estas pruebas fue esterilizado mediante autoclave.

2.2 MATERIAL VEGETAL

El abordaje en la selección del material vegetal se realizó usando un criterio quimiotaxonómico orientado a flavonoides. De la planta *P. guajava* y *R. officinalis* se emplearon hojas. Se utilizaron las partes aéreas de *M. chamomilla* y *C. officinalis*, que correspondían a hojas y flores.

Las hojas de *P. guajava* fueron recolectadas en el campus de la Universidad del Tolima a una altura de 1.166 m.s.n.m. bajo coordenadas N 4° 25' 49,1" – W 75° 13' 2.3". El resto del material vegetal fue colectado en el Municipio de Ibagué, zona pastales, Vereda el "Retiro", durante el primer semestre del año 2012 (época lluviosa); el sitio de colecta se encuentra a una altura de 1790 m.s.n.m. y sus coordenadas son: N 04° 31' 9,6" - W 75° 17' 43,1".

Estas plantas fueron clasificadas utilizando las muestras del Herbario "TOLI" de la Universidad del Tolima de la siguiente manera: *P. guajava* L. #8 (009196), *C. Officinalis* L. #36 (008702), *R. officinalis* L. #65 (005229) y *M. chamomilla* L. #5 (008721).

2.2.1 Material microbiológico

El material biológico empleado para realizar las pruebas microbiológicas fue la cepa *Erwinia carotovora*, código 1027, referencia ICA 68 y conservada mediante liofilización. La cepa bacteriana fue proporcionada por el CIAT (Centro internacional de agricultura tropical).

2.3 METODOLOGIA - ENSAYOS FITOQUIMICOS

2.3.1 Elaboración de los extractos etanólicos de *P. guajava*, *C. officinalis*, *R.officinalis* y *M. chamomilla*.

Al material vegetal utilizado se le retiró las impurezas (palos, ramas, tierra, etc.) y se eliminaron las hojas o flores con algún tipo de problema fitosanitario. Posteriormente el material vegetal se sometió a un proceso de secado pos colecta a temperatura de 40–

45 °C. Se tomaron los pesos de las muestras cada 8 horas, durante aproximadamente 3 días hasta obtener un peso constante. Se redujo el tamaño de partícula empleando un mortero metálico; este material fue depositado en frascos ámbar herméticamente cerrados.

Los extractos etanólicos de las 4 especies fueron preparados utilizando el método de percolación. Para cada una de las especies se utilizaron 266 g del material vegetal de tamaño reducido, los cuales se pusieron en contacto con el solvente (etanol al 96%) 24 horas antes de la obtención de los extractos.

Las proporciones material vegetal-solvente (etanol), se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4: [Relación material vegetal- solvente \(etanol\).](#)

ESPECIE DE PLANTA	MATERIAL VEGETAL SECO (g)	SOLVENTE (ETANOL 96% (mL)	RELACIÓN MATERIAL VEGETAL / SOLVENTE
<i>P. guajava</i>	266	532	1:2
<i>C. officinalis</i>	266	1.596	1:6
<i>R. officinalis</i>	266	1.064	1:4
<i>M. chamomilla</i>	266	1.596	1:6

Fuente: Autor

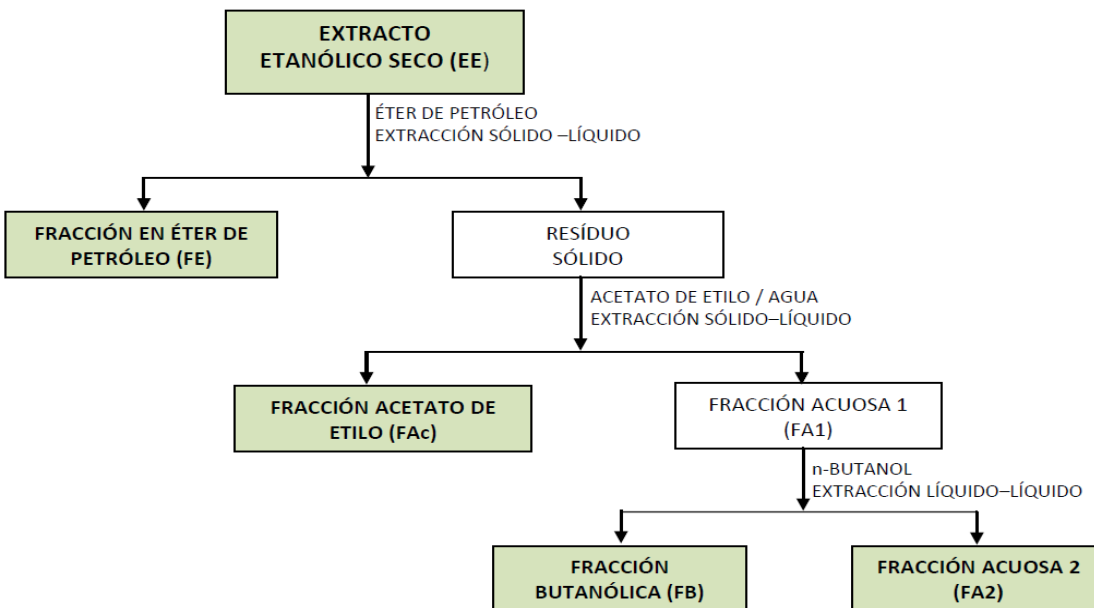
El proceso de extracción por percolación fue monitoreado hasta el agotamiento del material vegetal. El extracto obtenido fue concentrado en rotavapor, a presión reducida, a una temperatura entre 38 – 40 °C. El extracto etanólico se llevó a sequedad a baño maría a temperatura entre 40 – 45 °C.

2.3.2 Fraccionamiento del extracto etanólico

Se realizó el fraccionamiento del extracto etanólico de las cuatro especies vegetales utilizando un sistema de partición con solventes de diferente polaridad (éter de petróleo, acetato de etilo, n-butanol y agua), en diferentes proporciones, siguiendo la metodología reportada por Hernández et al, (2012). (Figura 7). Las fracciones orgánicas de acetato de etilo y n-butanol obtenidas a partir de los extractos etanólicos de todas las plantas fueron llevadas a sequedad de igual forma que los extractos etanólicos. Las fracciones acuosas obtenidas de todas las especies fueron concentradas mediante liofilización.

De las 4 fracciones obtenidas se evaluaron 3 de ellas (fracción acetato de etilo, fracción acuosa y fracción n-butanol) más el extracto etanólico.

Figura 7: Fraccionamiento del extracto etanólico de las 4 especies de plantas.



Fuente: (Hernández Carvajal, Universidad Nacional De Colombia, 2012)

Tabla 5: Cantidad de solventes utilizados en el fraccionamiento primario de los extractos etanólicos.

ESPECIE	CANTIDAD DE EXTRACTO INICIAL (g)	ETER DE PETROLEO (mL)	SOLUCIÓN ACETATO DE ETILO – AGUA (1:1) (mL)	1-BUTANOL (mL)
<i>P. guajava</i>	24	480	200	100
<i>C. officinalis</i>	24	400	300	150
<i>R. officinalis</i>	24	360	500	280
<i>M. chamomilla</i>	24	750	300	190

Fuente: Autor

2.3.3. Detección de flavonoides en extractos etanólicos y fracciones primarias de *P. guajava*, *C. officinalis*, *R. officinalis* y *M. chamomilla*.

Extractos etanólicos y fracciones primarias (acetato de etilo, n-butanol y agua) fueron evaluadas mediante CCD, con sílica gel 60F 254, empleando como fases móviles: acetato de etilo - ácido acético - ácido fórmico - agua en proporciones 100-8-4-8 (F1) para la identificación de flavonoides glicosidados. También se usó la fase móvil: tolueno-acetona-cloroformo en proporción 40-25-35 (F2) para la identificación de agliconas flavonoides. Los patrones usados fueron: rutina, quercetina y ácido clorogénico. El revelador empleado para flavonoides fue ácido difenil bórico amino etilester (revelador NP) y polietilenglicol 4000 (PEG 4000).

2.4 METODOLOGÍA BIOLÓGICA

2.4.1 Bioensayo de la actividad bactericida de los extractos y fracciones sobre *E. carotovora*

El método utilizado en la evaluación de la actividad bactericida de extractos y fracciones fue:

La inhibición zonal (método de difusión en agar) Kelman (1976), Se empleó la cepa de *Erwinia carotovora*, código 1027, referencia ICA 68. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar, sembrada con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha localizado un pozo inundado con una cantidad conocida de la sustancia.

Previamente se activó la cepa de *E. carotovora*, este procedimiento se inicia abriendo la ampolleta donde se encontraba la cepa bacteriana liofilizada, posteriormente se agregaron cuatro gotas de solución peptona-dextrosa en la ampolleta, quedando así las bacterias liofilizadas suspendidas en la solución; se extrae una alícuota de esta y se siembra en medio YCDA (levadura, carbonato de calcio, dextrosa, agar), las cajas se incubaron a 30°C durante 48 horas para realizar la replicación (Castellanos, Jara, y Mosquera, 2014).

Para adelantar la prueba de actividad biológica se utilizaron 20 mL de medio de cultivo (Mueller Hinton) por caja de Petri. Una vez solidificada esta capa, se dispersan con un hisopo estéril 200 µL de la solución del cultivo bacteriano el cual ha sido incubado por 24 horas en caldo nutritivo (especial peptona). La solución bacteriana se estandarizó mediante el 0,5 de Mcfarland equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL; para ello se utilizó un

espectrofotómetro con longitud de onda de 625 nm (Perilla, et al, 2004; Prat M., 2005).

Se hicieron 5 pozos de 0.5 cm de diámetro en el medio de cultivo solidificado por caja Petri, en cada uno se depositaron 30 µL de extracto o fracción. Las concentraciones a evaluar fueron de 5.000, 7.000 y 10.000 µg/mL. Se empleó como control positivo Cefalexina comercial de la casa comercial: LAFRACOL S.A. y como controles negativos: agua, DMSO y glicerol, sustancias utilizadas para solubilizar extractos o fracciones.

Seguidamente las cajas de Petri se llevaron a incubación a 30°C. La medición de los halos de inhibición se realizó a las 24 y 48 horas siguiendo el método descrito por Bauer et al (método de Kirby – Bauer).

Se evaluaron los resultados mediante la medida en cm del diámetro de halo de inhibición del crecimiento bacteriano. Se calculó el porcentaje del efecto inhibitorio relativo con respecto al control positivo, utilizando la fórmula siguiente: (Martínez, Molina & Boucourt, 1997)

$$\% \text{ Halo de Inhibición} = \frac{\text{Diámetro de halo de inhibición del extracto}}{\text{Diámetro de halo de inhibición del control positivo}} \times 100$$

[2.4.2 Determinación de la concentración inhibitoria para el control positivo \(Cefalexina\).](#)

Para determinar la concentración inhibitoria optima que permitiera manejar ciertos tamaños de halo en la caja petri y evitar que se interceptaran unos con otros, se realizaron pruebas con cefalexina, antibiótico de primera generación de amplio espectro (Prat M., 2005), se realizó la siembra de *E. carotovora* utilizando 200 µL de solución bacteriana por caja Petri, con medio Mueller Hinton, bajo las mismas

condiciones que tendrían las unidades experimentales. Se evaluaron concentraciones entre 50 y 2000 µg/mL.

La concentración inhibitoria de Cefalexina que mostró un tamaño adecuado de halo fue de 300 µg/mL, en una concentración bacteriana calibrada con el 0,5 estándar de Mcfarland (1.5×10^8 UFC).

2.4.3 Disolución de los extractos etanólicos y fracciones primarias.

En la Tabla 6.se mencionan las sustancias y mezclas de éstas, empleadas para solubilizar extractos y fracciones.

Tabla 6: Sustancias utilizadas como vehículos en la disolución de fracciones y extractos.

EXTRACTO O FRACCION EVALUADA	Guayaba	Romero	Caléndula	Manzanilla
Extracto etanólico	DMSO al 10% + Twin 80 al 2%	Agua	Agua	DMSO al 10% + Twin 80 al 2%
Fracción acetato de etilo	DMSO al 10% + Twin 80 al 2%	DMSO al 10% + Twin 80 al 2%	glicerol + Twin 80 al 2%	glicerol + Twin 80 al 2%
Fracción de n- butanol	Agua	Agua	Agua	Agua
Fracción acuosa	Agua	Agua	Agua	Agua

Fuente: Autor

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.5.1 Método estadístico

Para evaluar la actividad biológica de los extractos y/o fracciones obtenidas de cada planta, que presentaron un efecto inhibitorio, se utilizó un diseño completamente al azar con 4 réplicas, tomando como variable el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

La interacción entre concentración y extracto o fracción de una misma planta fue evaluada utilizando un arreglo factorial 3 x 4, completamente al azar con 4 réplicas donde los factores estimados fueron: **Factor a**: Concentración (a1: 5000 µg/mL) (a2: 7000 µg/mL) (a3:10000 µg/mL), **Factor b**: Fracción (b1: Extracto etanólico) (b2: Fase ac. Etilo) (b3: Fase n-butanol) (b4: Fase acuosa).

Con el objetivo de determinar si existía o no diferencia significativa entre las concentraciones y/o tratamientos utilizados, se realizaron pruebas de DMS (diferencia mínima significativa), utilizando la comparación múltiple de medias.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS.

Se realizó un secado del material vegetal a temperatura entre 40 – 45 °C, con lo cual se pretende disminuir la actividad enzimática y con ello detener reacciones químicas que pueden modificar estructuralmente sustancias activas, además se preserva el material vegetal de la acción de microorganismos (Sharapin, 2000). En la tabla 7 se observan los rendimientos de extractos etanólicos y fracciones obtenidos a partir de 266 g de material vegetal y 24 g de extracto etanólico respectivamente. Además se muestra el resultado del estudio químico por CCD en la detección de flavonoides en extractos y fracciones.

Tabla 7: Rendimiento de extractos etanólicos y fracciones. Estudio fitoquímico preliminar por CCD. en la identificación de flavonoides.

ESPECIE DE PLANTA	ORGANO	EXTRACTO / FRACCIÓN	PRESENCIA DE FLAVONOIDES	PESO (g)	% RENDIMIENTO
<i>P. guajava</i> (Guayaba)	Hojas	Extracto etanólico	+++	85.00	31.94
		Fracción éter de petróleo	-	1.28	5.30
		Fracción Acetato de etilo	+++	1.38	5.70
		Fracción butanólica	++	2.64	11.00
		Fracción acuosa	+	6.74	28.08
<i>R. officinalis</i> (Romero)	Hojas	Extracto etanólico	++	79.33	29.78
		Fracción éter de petróleo	-	2.12	8.83
		Fracción Acetato de etilo	++	7.97	33.20
		Fracción butanólica	++	1.29	5.30
		Fracción acuosa	++	1.42	5.91
<i>C. officinalis</i> (<i>Calendula</i>)	Hojas y flores	Extracto etanólico	+++	58.00	21.77

		Fracción éter de petróleo	-	6.43	26.70
		Fracción Acetato de etilo	++	0.90	3.70
		Fracción butanólica	+++	1.41	5.80
		Fracción acuosa	++	3.17	13.20
<i>M. chamomilla</i> (Manzanilla)	Hojas y flores	Extracto etanólico	+++	48.47	18.20
		Fracción éter de petróleo	-	7.80	32.60
		Fracción Acetato de etilo	+++	1.90	8.00
		Fracción butanólica	+++	3.57	14.87
		Fracción acuosa	+	4.81	20.04

Fuente: Autor

Detección de flavonoides: Muy abundante (+++), Abundante (++) , baja cantidad (+) y ausentes (-).

El mayor porcentaje en la extracción se observó en la fracción etérea de *C. officinalis* y *M. chamomilla*, esto se puede atribuir a una alta concentración de compuestos apolares como: carotenoides y terpenos presentes en las flores que hacen parte del material vegetal de partida (Lastra Valdés & Piquet García, 1999; Ríos R. et al 2008). Para *R. officinalis* el mayor rendimiento se observó en la fracción acetato de etilo la cual presenta compuestos de mediana polaridad como: apigenina, hispidulina y kaempferol, los cuales son agliconas flavonoides y junto a compuestos de baja polaridad que

posiblemente no se extrajeron con éter de petróleo (Kontogianni, et al 2013; Pires Amaral, et al 2013). En fracciones de mayor polaridad es importante destacar el 11% y 28% en la fracción butanólica y acuosa de *P. guajava* que puede estar relacionada con la presencia de los compuestos glicosidados o presentar grupos químicos que aumentan su polaridad como: Quercetin 3- α -L-arabinofuranoside, Quercetin 3- β -D-glucoside, Kaempferol-3-glucoside, Guaijaverin y Avicularin (Metwally, et al 2011; Pérez, et al 2008; Petrulivá-Poracká, et al 2013).

3.2 ESTUDIO FITOQUÍMICO POR CCD DE LOS EXTRACTOS Y FRACCIONES

3.2.1 Análisis de los extractos

Mediante los perfiles cromatográficos realizados a los extractos etanólicos de las distintas especies seleccionadas se confirma la presencia de flavonoides. Al revelar la cromatoplaca con NP/PEG revelador específico para flavonoides (Hernández y Luengas, 2013; Wagner, Bladt, y Zgainski, 1984) en dos sistemas diferentes de elusión F1 y F2, se apreció abundancia de este tipo de metabolitos en *P. guajava* con manchas de color naranja (figura 8). En los extractos de *C. officinalis*, *M. chamomilla* y *R. officinalis* (Figuras 8 y 9) se observaron manchas de color naranja, amarillo y azul empleando UV a longitud de onda de 365 nm, que indican la presencia de flavonoides y ácidos carboxílicos fenólicos (Wagner, Bladt, y Zgainski, 1984). Estos resultados son comparables con los mostrados por Agatonovic-Kustrin y Loescher, (2013); Kontogianni, et al (2013), Metwally, et al (2011) y Wagner, Bladt, & Zgainski, (1984), quienes identificaron este tipo de metabolitos secundarios en las plantas anteriormente mencionadas.

Figura 8: Perfil cromatográfico CCD de extractos etanólicos de (1) *P. guajava*, (2) *R. officinalis*, (5) *C. officinalis* y (6) *M. chamomilla*, empleando, Reveladores NP/PEG. Patrones (3) rutina y (4) ácido clorogénico; Observación UV 365nm; fase móvil (F1).



Fuente: Autor

Figura 9: Perfil cromatográfico CCD de extractos etanólicos de (1) *P. guajava*, (2) *R. officinalis*, (5) *C. officinalis* y (6) *M. chamomilla*, empleando, Reveladores NP/PEG. Patrones (3) quercetina y (4) ácido clorogénico; Observación UV 365nm; fase móvil (F2).



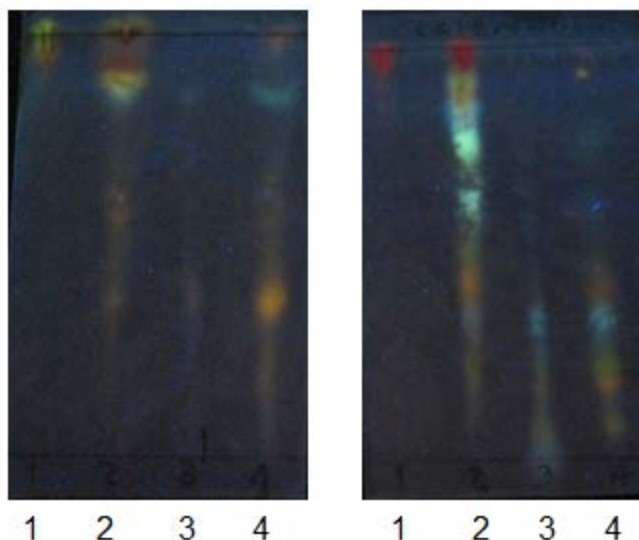
Fuente: Autor

3.2.2 Análisis de las fracciones

Se siguió el fraccionamiento propuesto por Hernández, 2012 (figura 7) con el cual se obtuvieron cuatro (4) fracciones a partir del extracto etanólico empleando una serie eluotrópica de solventes (éter de petróleo, acetato de etilo, n-butanol y agua).

Mediante el estudio cromatográfico por CCD de las fracciones etéreas para cada especie, no se observaron manchas características en la detección de flavonoides. Este resultado era esperado ya que los flavonoides como aglicona o glicosilados son sustancias de mediana a alta polaridad, que no son extraídos con éter de petróleo. Además se descarta la posible presencia de flavonoides como agliconas altamente metoxiladas, compuestos apolares (Figura 10) (Martinez, 2005). Este resultado permitió descartar la fracción etérea como tratamiento en las pruebas de actividad biológica por la ausencia de flavonoides.

Figura 10: Perfil cromatográfico CCD de las fracciones obtenidas de *M. chamomilla (der)* y *C. officinalis (izq)*, empleando, Reveladores NP y PEG; Observación UV 365nm; fase móvil (F1). (1) Éter de petróleo, (2) Acetato etilo, (3) n-butanol y (4) acuosa.

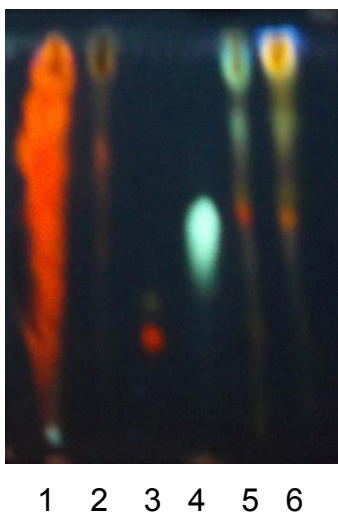


Fuente: Autor

Los perfiles cromatográficos para las fracciones acetato de etilo, butanólica y acuosa bajo las mismas condiciones que los ext. etanólicos, permitieron establecer la presencia de flavonoides cuyas manchas de color naranja, amarilla y verde pueden corresponder con flavonoides del tipo flavona, flavonol y flavonona. Los ácidos carboxílicos fenólicos son evidentes con la aparición de manchas de color azul (figuras 11 a 15). Estos resultados son confirmados por los reportes de coloración presentados por Wagner, Bladt, & Zgainski, (1984).

El perfil cromatográfico en la fracción acetato de etilo de *P. guajava*, permite establecer parámetros de coloración e intensidad semejantes a las del patrón utilizado (quercetina) además de compartir igual valor en su factor de retención ($R_f = 0,20$) (Figura 12), evidenciando posiblemente la presencia de este flavonoide en *P. guajava* como se reporta en Wagner, Bladt, & Zgainski, 1984.

Figura 11: Perfil cromatográfico CCD de la fracción acetato de etilo de (1) *P. guajava*, (2) *R. officinalis*, (5) *C. officinalis* y (6) *M. chamomilla*, empleando, Reveladores NP/PEG. Patrones (3) rutina y (4) ácido clorogénico; Observación UV 365nm; fase móvil (F1).



Fuente: Autor

Figura 12: Perfil cromatográfico CCD de la fracción acetato de etilo de (1) *P. guajava*, (2) *R. officinalis*, (5) *C. officinalis* y (6) *M. chamomilla*, empleando, Reveladores NP/PEG. Patrones (3) quercetina y (4) ácido clorogénico; Observación UV 365nm; fase móvil (F2).

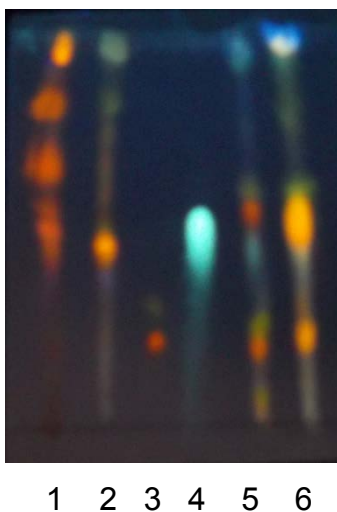


Fuente: Autor

Los perfiles cromatográficos para *C. officinalis* y *M. chamomilla* en las fracciones acetato de etilo y butanólica muestran manchas cuyos parámetros de coloración y desplazamiento en la placa son semejantes (tabla 7) (figuras 11, 12 y 13), con lo cual se puede tratar del mismo tipo de compuestos polifenólicos, esto puede ser atribuido a que las dos plantas pertenecen a la familia Asteraceae.

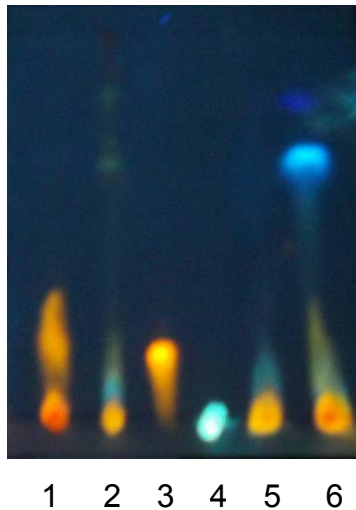
La coloración observada para el patrón ácido clorogénico, permite establecer la posible presencia de ácidos carboxílicos fenólicos en *C. officinalis* y *M. chamomilla* con la fase móvil (F1), (figura 13) (Wagner, Bladt, & Zgainski, 1984).

Figura 13: Perfil cromatográfico CCD de la fracción butanólica de (1) *P. guajava*, (2) *R. officinalis*, (5) *C. officinalis* y (6) *M. chamomilla*, empleando, Reveladores NP/PEG. Patrones (3) rutina y (4) ácido clorogénico; Observación UV 365nm; fase móvil (F1).



Fuente: Autor

Figura 14: Perfil cromatográfico CCD de la fracción butanólica de (1) *P. guajava*, (2) *R. officinalis*, (5) *C. officinalis* y (6) *M. chamomilla*, empleando, Reveladores NP/PEG. Patrones (3) quercetina y (4) ácido clorogénico; Observación UV 365nm; fase móvil (F2).



Fuente: Autor

En las fracciones acetato de etilo y butanólica de *P. guajava* se observaron manchas de una alta intensidad en su coloración la cual está asociada con la concentración de flavonoides que en comparación con las otras especies estudiadas es mayor (figuras 11 y 13); esta alta concentración puede estar asociada a la época de colecta del material vegetal como es reportado por Vargas, Soto, González, Mark y Martínez (2006).

Figura 15: Perfil cromatográfico CCD de la fracción acuosa de (1) *P. guajava*, (2) *R. officinalis*, (5) *C. officinalis* y (6) *M. chamomilla*, empleando, Reveladores NP/PEG. Patrones (3) rutina y (4) ácido clorogénico; Observación UV 365nm; fase móvil (F1).

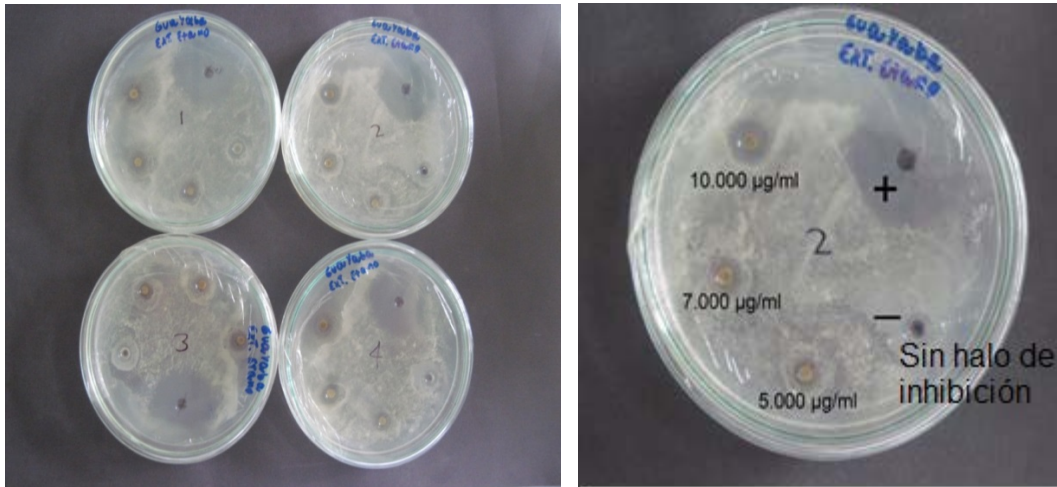


Fuente: Autor

3.3 PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y FRACCIONES OBTENIDAS DE *P. GUAJAVA*, *R. OFFICINALIS*, *C. OFFICINALIS* Y *M. CHAMOMILLA* SOBRE *E. CAROTOVORA*

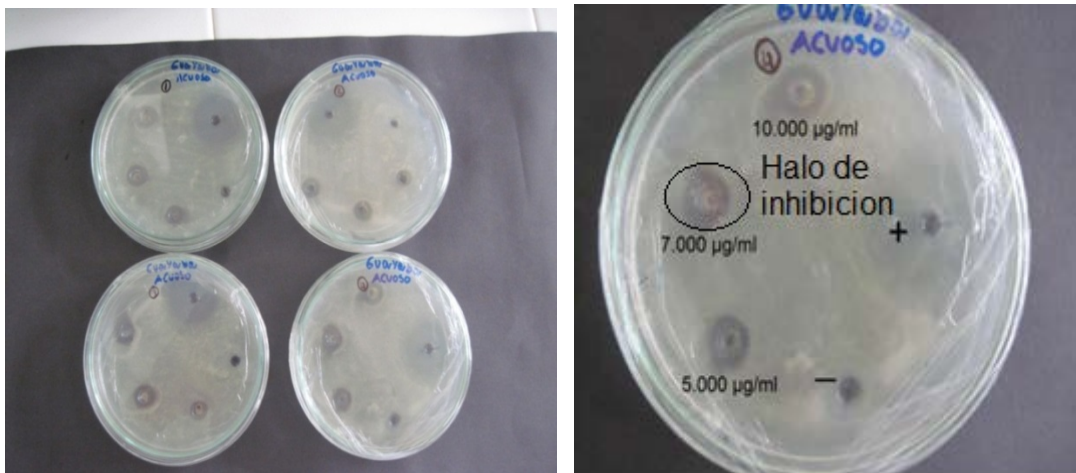
Extractos etanólicos y fracciones orgánicas obtenidas de *P. guajava*, *R. officinalis*, *C. officinalis* y *M. chamomilla* se evaluaron sobre el crecimiento de *E. carotovora* a concentraciones de 5000, 7000 y 10000 µg/mL. Los resultados obtenidos a partir de las pruebas de actividad biológica revelaron que existió control frente a la cepa bacteriana en 2 de las 4 plantas evaluadas: *P. guajava* en todos los tratamientos (figura 16 y 17) y *C. officinalis* en la fracción acetato de etilo (figura 18).

Figura 16: Pruebas de Actividad Biológica, extracto etanólico *P. guajava*, 24 horas.



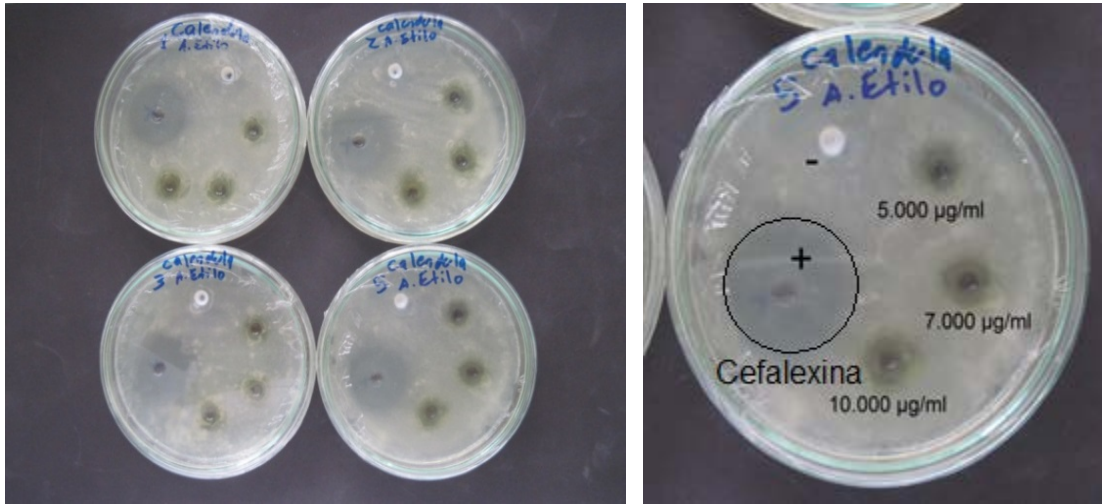
Fuente: Autor

Figura 17: Pruebas de Actividad Biológica, fracción acuosa *P. guajava*, 48 horas.



Fuente: Autor

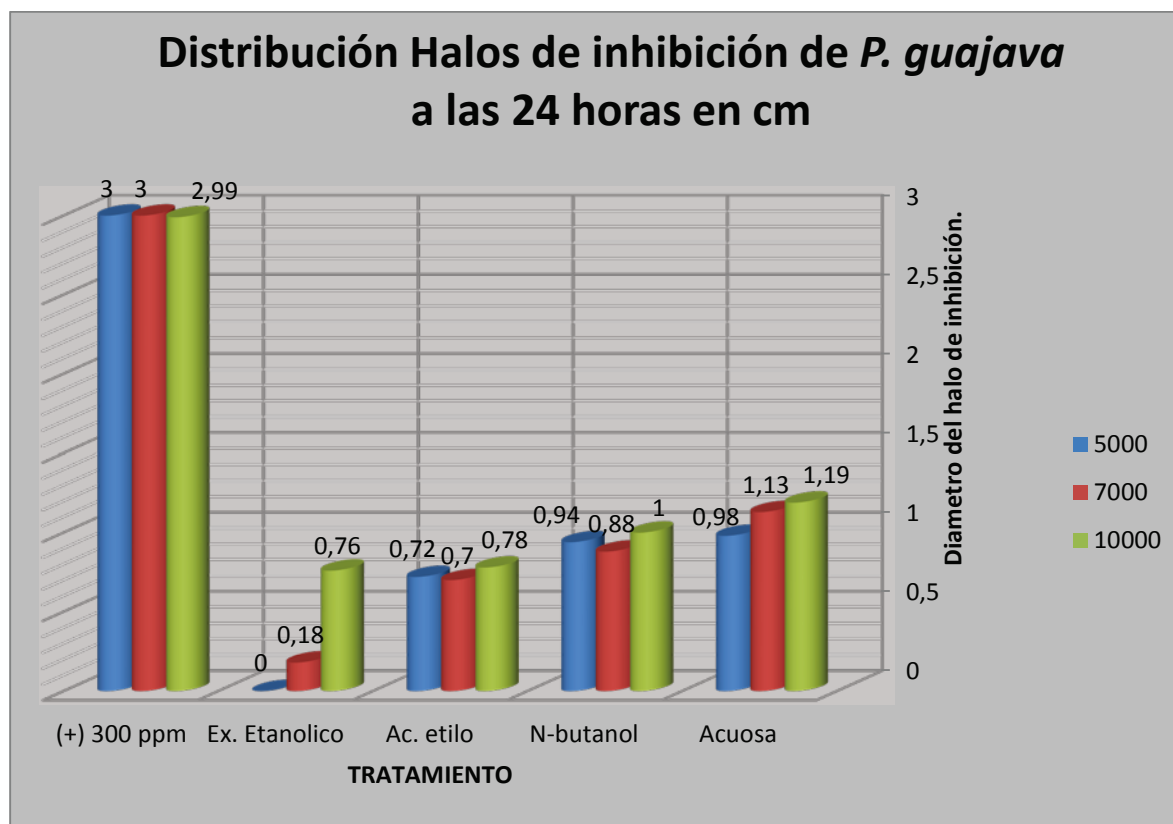
Figura 18: Pruebas de Actividad Biológica, fracción acetato de etilo *C. officinalis* 48 horas.



Fuente: Autor

Los resultados obtenidos en las pruebas de actividad biológica fueron graficados de forma comparativa (figuras 19 a 22).

Figura 19: Porcentaje de inhibición de los tratamientos: extracto etanólico, fracción acetato de etilo, fracción n-butanol y fracción acuosa de *P. guajava*, frente a *E. carotovora* a las 24 horas.



Fuente: Autor

En la figura 19 se observa el comportamiento de 4 tratamientos diferentes: extracto etanólico, fracción acetato de etilo, fracción n-butanol y fracción acuosa obtenidos de *P. guajava*. El valor promedio en el porcentaje de inhibición obtenido a las 24 horas para los tratamientos fracción acetato de etilo, fracción butanólica y fracción acuosa fue de 30% en la concentración de 5000 µg/mL. La capacidad de inhibición de los tratamientos aumenta a medida que se aumenta la concentración hasta la máxima empleada de 10.000 µg/mL. En el caso del tratamiento extracto etanólico la concentración inicial no presenta actividad biológica la cual aumenta a medida que aumenta la concentración del extracto hasta llegar a 10.000 µg/mL. Este comportamiento demuestra una relación directamente proporcional entre la concentración de compuestos activos presentes en el extracto y la actividad bactericida. Además se puede establecer que el fraccionamiento del extracto etanólico

empleando solventes de diferente polaridad como acetato de etilo, butanol y agua mejora la actividad biológica para *P. guajava*.

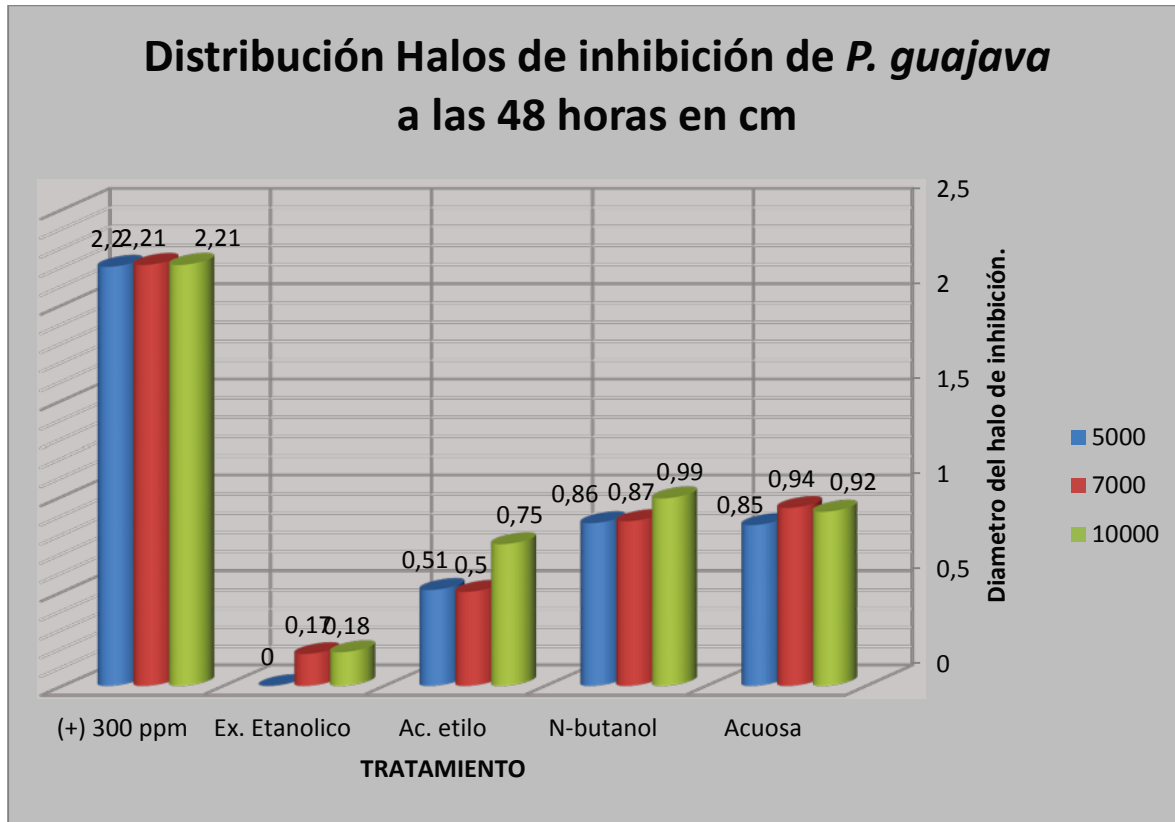
La actividad bactericida del extracto etanólico y fracciones a partir de *P. guajava*, puede estar relacionada con la presencia de ciertos metabolitos secundarios, entre los cuales se tienen: fenoles simples, quinonas, taninos, cumarinas, alcaloides y flavonoides, estos últimos identificados en este trabajo, cuyos mecanismos de acción son variables (Domingo y López-Brea, 2003).

Se conoce que los fenoles simples actúan en la inhibición enzimática de compuestos oxidados; las quinonas actúan formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, lo que genera una inactivación de esta biomolécula. Las cumarinas presentan su actividad antimicrobiana a través de la interacción con el DNA eucariota. Por último se tienen alcaloides, que actúan mediante intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo (Domingo y López-Brea, 2003).

En *P. guajava* se reportan compuestos tipo flavonoide como: flavonoles (miricetina, quercetina y kaempferol) y flavonas (luteolina y apigenina) que han reportado actividad bactericida (Vargas Alvarez, et al 2006).

Las flavonas y compuestos relacionada presentan actividad antimicrobiana mediante la formación de complejos con las proteínas solubles, extracelulares y de la pared bacteriana de forma similar a las quinonas.

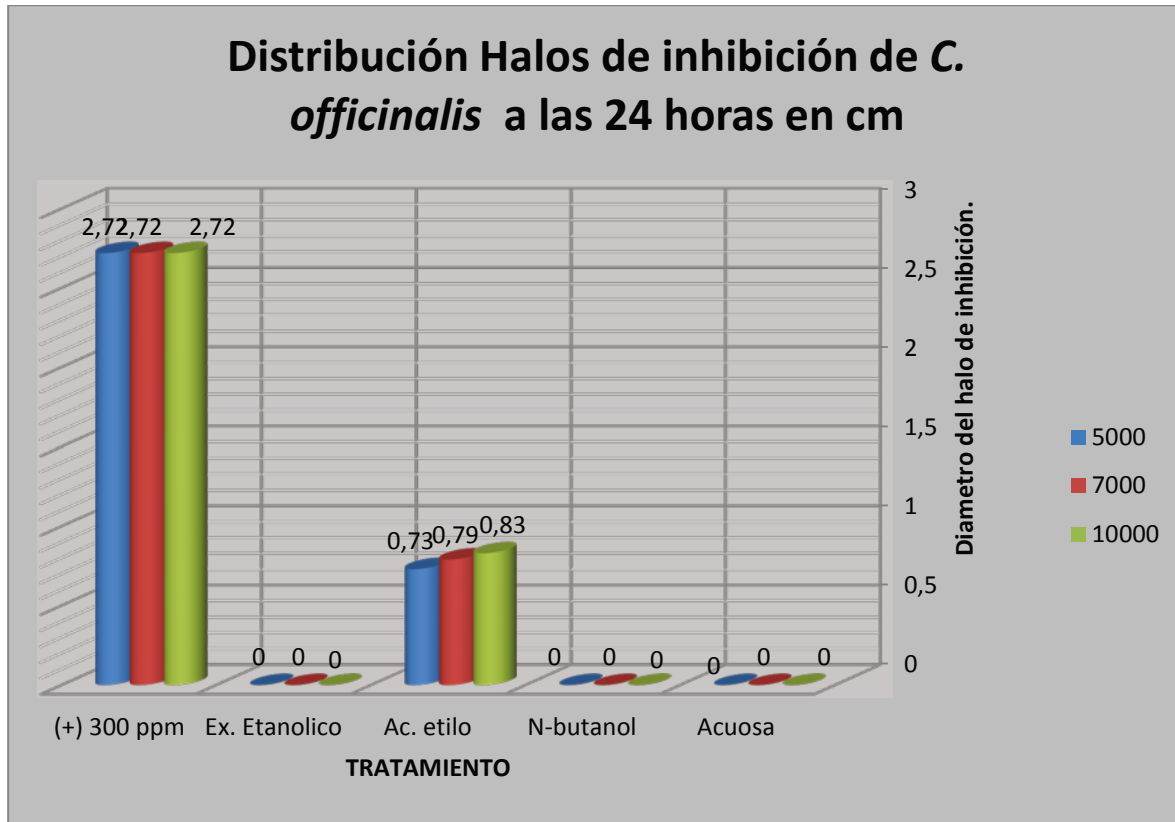
Figura 20: Porcentaje de inhibición de los tratamientos: extracto etanólico, fracción acetato de etilo, fracción n-butanol y fracción acuosa de *P. guajava*, frente a *E. carotovora* a las 48 horas.



Fuente: Autor

En la figura 20 se observa que transcurridas 48 horas la actividad de los tratamientos fracción n-butanol y fracción acuosa conservan su comportamiento de sustancias activas en todas sus concentraciones. Para el tratamiento acetato de etilo las concentraciones de 5000 y 7000 µg/mL pierden su actividad. En cuanto la concentración de 10.000 µg/mL conserva su acción bactericida. Este comportamiento puede estar asociado a la degradación de compuestos activos o coadyudantes de la actividad en este tratamiento frente a *E. carotovora*, que aun en la concentración de 10.000 µg/mL contiene suficientes sustancias activas capaces de generar actividad bactericida.

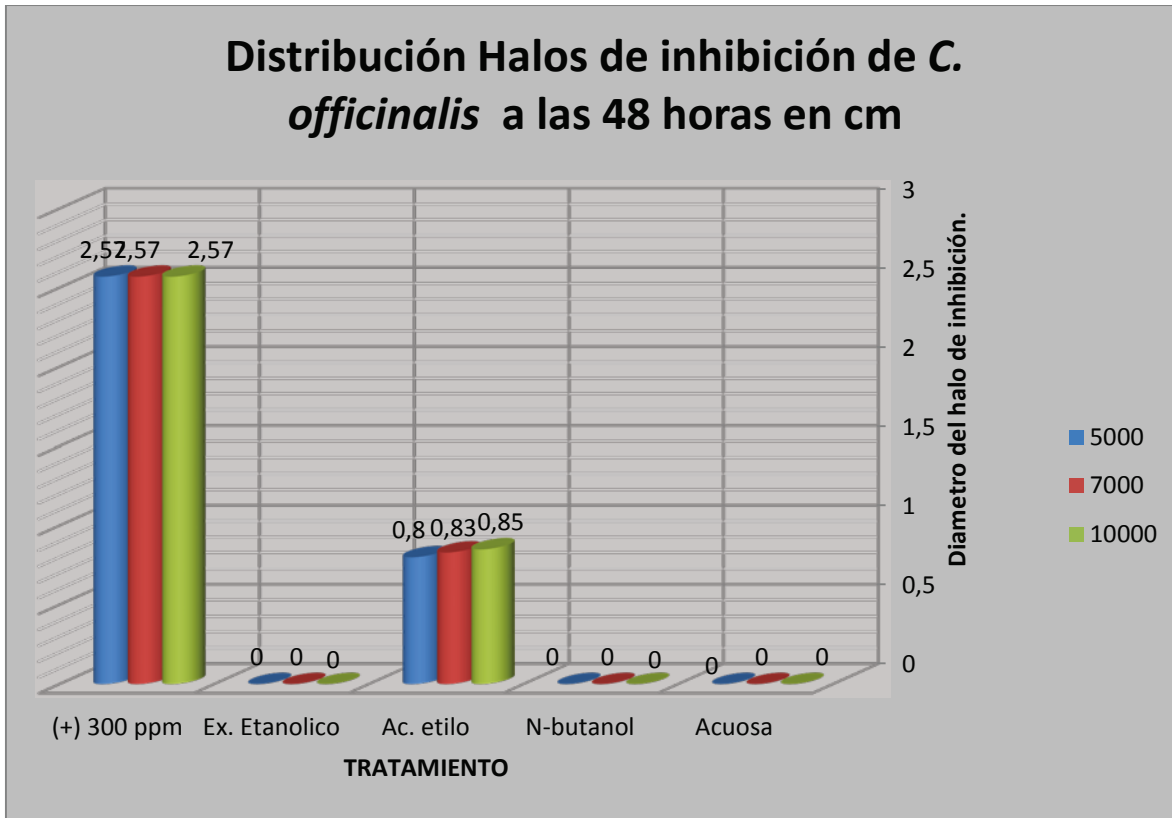
Figura 21: Porcentaje de inhibición de los tratamientos: extracto etanólico, fracción acetato de etilo, fracción n-butanol y fracción acuosa de *C. officinalis*, frente a *E. carotovora* a las 24 horas.



Fuente: Autor

La planta *C. officinalis* no presentó actividad bactericida en ninguna de sus concentraciones en los tratamientos extracto etanolico, fracción n-butanol y fracción acuosa. El tratamiento acetato de etilo presentó actividad bactericida entre el 30 – 35% en todas las concentraciones empleadas. La evaluación de este tratamiento a las 48 horas presentó un comportamiento similar al observado a las 24 horas. Los compuestos encargados de la actividad bactericida frente a *E. carotovora* en *C. officinalis* se encuentran en el tratamiento fracción acetato de etilo. Lo anterior permite establecer la importancia de separar compuestos empleando el fraccionamiento del extracto etanolico que se ve reflejado en su actividad biológica.

Figura 22: Porcentaje de inhibición de los tratamientos: extracto etanólico, fracción acetato de etilo, fracción n-butanol y fracción acuosa de *C. officinalis*, frente a *E. carotovora* a las 48 horas.



Fuente: Autor

A pesar que para *R. officinalis* y *M. chamomilla* se reporta actividad contra bacterias de tipo Gram negativo de interés alimentario y veterinario tales como: *E. coli*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *S. fecalis* (Acosta de la Luz, et al. 2001; Lastra y Piquet, 1999; Muñoz, 2004), (Avila et al. 2011; Castaño P., Ciro G., Zapata M., & Jiménez G., 2010; Tavassoli & Emam Djomeh, 2011). Las fracciones obtenidas a partir de los extractos etanólicos no presentaron actividad bactericida frente a *E. carotovora*. En este caso el fraccionamiento no produjo sistemas de sustancias activas a partir de los extractos etanólicos.

3.4 RESULTADOS ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

La evaluación de la actividad bactericida de la fracción acetato de etilo de *C. officinalis* fue valorada mediante análisis de varianza de los datos obtenidos a partir de la medida del halo de inhibición del crecimiento bacteriano, durante 24 y 48 horas. Para *P.*

guajava se usó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3x4, pues los cuatro (4) tratamientos mostraron actividad. Las mediciones para estos análisis fueron recolectadas en cm para determinar el % de halo de inhibición. La variable a evaluar es el porcentaje de halo de inhibición.

El análisis de varianza para el tratamiento fracción acetato de etilo obtenida de *C. officinalis*, transcurridas 24 y 48 horas permite establecer que no existe diferencia alguna en la variable respuesta halo de inhibición al emplear las tres concentraciones, es decir el efecto de las tres concentraciones sobre la actividad bactericida en *E. carotovora* es igualmente efectiva, lo cual se ratifica con los valores de $P= 0.1595$ y $P= 0.2492$, que corresponden a el análisis de varianza pasadas 24 y 48 horas respectivamente (Tabla 8 y 9).

Tabla 8: Análisis de varianza para la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de la fracción acetato de etilo por concentración en *C. Officinalis* a las 24 horas.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F. calculado	Valor de P.	Significancia estadística
Concentración	12,0031	2	6,0016	2,2601	0,1595	N.S.
E.E. (Dentro de C)	23,8994	9	2,6555			
Total	35,9025	11				

Fuente: Autor

Tabla 9: Análisis de varianza para la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de la fracción acetato de etilo por concentración en *C. officinalis* a las 48 horas.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F. calculado	Valor de P.	Significancia estadística
Concentración	3,243	2	1,6215	1,6255	0,2492	N.S.
E.E. (Dentro de C)	8,9778	9	0,9975			
Total	12,2208	11				

Fuente: Autor

En la fracción de acetato de etilo de la planta *P. guajava* se observó que no existió diferencia en la actividad bactericida de las tres concentraciones durante 24 y 48 horas. Esto indica que las tres concentraciones presentan igual actividad biológica. El análisis en los dos casos es no significativo con valor de $P=0,3483$ y $P= 0,5054$ (tabla 10 y 11).

Tabla 10: Análisis de varianza para la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de la fracción acetato de etilo por concentración en *P. guajava* a las 24 horas.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F. calculado	Valor de P.	Significancia estadística
Concentración	9,8191	2	4,9096	1,0689	0,3483	N.S.
E.E. (Dentro de C)	41,3393	9	4,4933			
Total	51,1585	11				

Fuente: Autor

Tabla 11: Análisis de varianza para la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de la fracción acetato de etilo por concentración en *P. guajava* a las 48 horas.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F. calculado	Valor de P.	Significancia estadística
Concentración	271,4049	2	135,7024	0,7444	0,5054	N.S.
E.E. (Dentro de C)	1640,5735	9	182,2859			
Total	1911,9784	11				

Fuente: Autor

Para evaluar de manera más detallada el comportamiento de la planta *P. guajava*, se realizó el análisis estadístico del efecto de los diferentes factores o fuentes de variación sobre el halo de inhibición. Las fuentes de variación se nombraron con letras (A, B y AB) organizadas de manera que A = (Concentración), B = (Fracción) y AB = (interacción).

Los análisis de varianza indican que la concentración (factor A), la fracción (factor B) y la interacción AB poseen valores muy significativos en el diámetro de los halos de inhibición, debido a que los valores de (P=0) calculados para estos factores son inferiores al de nivel de significancia 0.01 y 0.05, indicando que la actividad antimicrobiana de los diferentes tratamientos de *P. guajava* a las 24 horas depende de la concentración, del tratamiento y de su interacción (Tabla 12).

Tabla 12: Análisis de varianza para la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición en *P. guajava* a las 24 horas.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor de P.	Significancia estadística
A	813,34	2	406,67	0	**
B	4373,69	3	1457,9	0	**
AB	1334,59	6	232,43	0	**
Error	835,99	36	23,22		
Total	7417,61	47			

Fuente: Autor

Transcurridas 48 horas la influencia de la fracción (factor B) continuó siendo muy significativo ($P=0$), mientras que la concentración (factor A) ($P=0,2739$) y la interacción AB ($P=0,8555$) no tienen influencia sobre la actividad bactericida, es decir que no existe significancia estadística.

Tabla 13: Análisis de varianza para la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición en *P. guajava* a las 48 horas.

Fuentes de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	Valor de P.	Significancia estadística
A	257,34	2	128,67	0,2739	N.S.
B	9253,83	3	3084,61	0	**
AB	246,86	6	41,14	0,8555	N.S.
Error	3456,78	36	96,02		
Total	13214,81	47			

Fuente: Autor

El extracto etanólico y las fracciones obtenidas de *P. guajava* fueron analizados mediante pruebas D.M.S. (diferencia mínima significativa) con un 95 y 99% de significancia, para determinar el efecto de la concentración, el tiempo y el tratamiento sobre los diámetros de halo de inhibición, de manera independiente.

El orden fue A>B>C, dependiendo de los niveles de significancia estadística sobre los halos de inhibición.

El extracto etanólico de *P. guajava* presentó un comportamiento diferente con cada una de las concentraciones sobre la medida de los halos de inhibición a las 24 horas, siendo mayor el de 10.000 µg/mL con un valor promedio de 31,40% respecto al valor del control positivo (Tabla 14).

Tabla 14: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por concentración (µg/mL) en el extracto etanólico de *P. guajava* a las 24 horas.

Concentración (µg/mL)	Valor promedio	Significancia estadística 0,01
10.000	31,40	A
7.000	7,60	B
5.000	0	C

Fuente: Autor

En la fracción acetato de etilo de *P. guajava* el efecto de las diferentes concentraciones sobre el halo de inhibición es igual a las 24 horas, lo cual representa que no existe una diferencia significativa entre las tres (3) concentraciones evaluadas (Tabla 15).

Tabla 15: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por concentración ($\mu\text{g/mL}$) en la fracción acetato de etilo de *P. guajava* a las 24 horas.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Valor promedio	Significancia estadística 0,05
10000	32,88	A
5000	31,45	A
7000	30,98	A

Fuente: Autor

Para la fracción de n-butanol de *P. guajava* transcurridas 24 horas, se presentó un comportamiento similar al de la fracción acetato de etilo donde no existe diferencia significativa entre las medidas de los halos de inhibición a las diferentes concentraciones evaluadas (Tabla 16).

Tabla 16: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por concentración ($\mu\text{g/mL}$) en la fracción n-butanol de *P. guajava* a las 24 horas.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Valor promedio	Significancia estadística 0,05
10000	36,18	A
5000	34,73	A
7000	33,46	A

Fuente: Autor

La fracción acuosa de *P. guajava* presentó los halos de inhibición con mayor diámetro transcurridas 24 horas, mediante las pruebas D.M.S. no se encontró diferencia significativa entre las 3 concentraciones evaluadas (Tabla17).

Tabla 17: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por concentración ($\mu\text{g/mL}$) en la fracción acuosa de *P. guajava* a las 24 horas.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Valor promedio	Significancia estadística 0,05
10000	39,01	A
7000	37,86	A
5000	34,76	A

Fuente: Autor

Posteriormente se realizó la comparación múltiple del extracto etanólico y las tres fracciones de *P. guajava* en las diferentes concentraciones, obteniendo los siguientes resultados. Mediante esta comparación múltiple se considera que la fracción que mostró el mejor control transcurridas 24 horas a una concentración de 5.000 $\mu\text{g/ml}$ fue la fracción acuosa (34.76%). Las fracciones n-butanol y acetato de etilo tuvieron un efecto menor sobre la cepa bacteriana y el extracto etanólico no presentó efecto (tabla 18).

Tabla 18: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por fracción en la concentración 5.000 ($\mu\text{g/mL}$) en *P. guajava* a las 24 horas.

Fracción	Valor promedio	Significancia estadística 0,01
F. acuosa	34,76	A
F. n-butanol	34,73	A B
F. acetato de etilo.	31,45	A B C
Ext. Etanólico	0	D

Fuente: Autor

A una concentración de 7.000 $\mu\text{g/ml}$ la fracción acuosa continuó exhibiendo el mejor control sobre la cepa bacteriana; el extracto etanólico presentó actividad con un 7.6% respecto al control positivo (Tabla19).

Tabla 19: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por fracción en la concentración 7.000 ($\mu\text{g/mL}$) en *P. guajava* a las 24 horas.

Fracción	Valor promedio	Significancia estadística 0,05	Significancia estadística 0,01
F. acuosa	37,86	A	A
F. n-butanol	33,46	A B	A B
F. acetato de et.	30,98	A B C	A B C
Ext. Etanólico	7,60	D	D

Fuente: Autor

A una concentración de 10.000 $\mu\text{g/mL}$ la fracción acuosa continúa tendiendo el mayor efecto sobre la cepa bacteriana; las fracciones n-butanol y acetato etilo fueron un poco menos efectivas y el extracto etanólico aumento notoriamente su efecto inhibitorio alcanzando los 31.40 % (tabla 20).

Tabla 20: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por fracción en la concentración 10.000 ($\mu\text{g/mL}$) en *P. guajava* a las 24 horas.

Fracción	Valor promedio	Significancia estadística 0,05
F. acuosa	39,01	A
F. n-butanol	36,18	A B
F. acetato de et.	32,88	B
Ext. Etanólico	31,40	B

Fuente: Autor

Transcurridas 48 horas a una concentración de 5.000 $\mu\text{g/mL}$ se presentó una variación en la fracción que exhibió el mejor control; fue la fracción de n-butanol la que presentó el valor promedio más alto de inhibición (38.63%) (tabla 21).

Tabla 21: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por fracción en la concentración 5.000 ($\mu\text{g/mL}$) en *P. guajava* a las 48 horas.

Fracción	Valor promedio	Significancia estadística 0,05
F. n-butanol	38,63	A
F. acuosa	38,23	A B
F. acetato de et.	24,92	C
Ext. Etanólico	0	D

Fuente: Autor

A una concentración de 7.000 µg/mL nuevamente fue la fracción acuosa la que mostró el mayor diámetro en el halo de inhibición, seguido por la fracción n-butanol (tabla 22).

Tabla 22: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por fracción en la concentración 7.000 (µg/mL) en *P. guajava* a las 48 horas.

Fracción	Valor promedio	Significancia estadística 0,05
F. acuosa	40,79	A
F. n-butanol	38,79	A B
F. acetato de et.	24,08	C
Ext. Etanólico	8,29	D

Fuente: Autor

En la comparación múltiple de los halos de inhibición a 10.000 µg/mL, transcurridas 48 horas, la fracción de n-butanol se mostró como la fracción más promisoría (41,99%) (tabla 23).

Tabla 23: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por fracción en la concentración 10.000 (µg/mL) en *P. guajava* a las 48 horas.

Fracción	Valor promedio	Significancia estadística 0,05
F. n-butanol	41,99	A
F. acuosa	40,06	A B
F. acetato de et.	34,59	C
Ext. Etanólico	8,55	D

Fuente: Autor

Esta variación entre cuál de los tratamientos era más eficaz en las dos mediciones realizadas (24 y 48 horas) puede indicar que los compuestos de la fracción n-butanol continúan siendo más estables a medida que pasa el tiempo y esto le confiere un mayor efecto bactericida.

Para determinar cuál fracción se comportó mejor a las 48 horas se tomaron todos los promedios de inhibición de los 4 tratamientos y se obtuvo promedio general, que al ser analizado por D.M.S. muestra que la fracción n-butanol mostro un mayor efecto que la fracción acuosa.

Tabla 24: Comparación múltiple de la transformación arco-seno $\sqrt{\%}$ de los halos de inhibición por fracción en *P. guajava* a las 48 horas.

Fracción	Valor promedio	Significancia estadística 0,01
F. n-butanol	39,8	A
F. acuosa	39,69	A B
F. acetato de et.	27,86	C
Ext. Etanólico	5,61	D

Fuente: Autor

Por último cabe destacar que los halos de inhibición de los controles positivos disminuían a medida que avanzaba el tiempo, es decir que a las 48 horas estos halos eran más pequeños que a las 24 horas.

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

- Las pruebas de actividad bactericida empleando la fitobacteria *Erwinia carotovora* mediante el método difusión en agar permitió establecer que *P. guajava* presentó actividad bactericida en el extracto etanólico y en las tres fracciones y *C. officinalis* mostró actividad en la fracción acetato de etilo.
- Las fracciones que mostraron mejor control contra *E. carotovora* fueron la fracción acuosa y la fracción de n-butanol obtenidas de *P. guajava*, fracciones en las que se detectaron flavonoides.
- La evaluación cromatográfica por CCD permitió establecer la presencia de compuestos tipo flavonoides en los extractos y fracciones de: *P. guajava*, *R. officinalis*, *C. officinalis* y *M. chamomilla*.
- Las plantas *P. guajava* y *C. officinalis* son dos especies promisorias para continuar con los estudios de actividad biológica sobre bacterias fitopatógenas.
- En las pruebas de actividad biológica la fase acuosa mostro mayor inhibición que la fase de n-butanol a las 24 horas de incubación, pero pasadas las 48 horas al realizar la segunda medición y de acuerdo con el análisis estadístico la fracción n-butanol muestra mejor control sobre la bacteria que la fracción acuosa.

4.2 RECOMENDACIONES

- Realizar la recolección de muestras (material vegetal) en época de verano con la finalidad de tener altas concentraciones de flavonoides debido a que estos participan como bloqueador solar de las plantas en épocas soleadas.
- Hacer un estudio fitoquímico complementario a la fracción acetato de etilo.
- Experimentar con más fases móviles para la planta *P. guajava* debido a que en cromatografía fue difícil su estudio.
- Evaluar las fases de éter de petróleo contra bacterias fitopatógenas, como otro estudio donde no solo se estén evaluando los flavonoides como agentes de control bactericida.

5. REFERENCIAS

Acosta de la Luz, L., Rodríguez Ferradá, C., & Sánchez Govín, E. (2001). Instructivo Técnico De Calendula Officinalis. *Rev. Cubana Plant Med*, 1, 23-27.

Agatonovic-Kustrin, S., & Loescher, C. M. (2013). Qualitative and quantitative high performance thin layer chromatography analysis of Calendula officinalis using high resolution plate imaging and artificial neural network data modelling. *Analytica Chimica Acta*, 798, 103-108.

Agrios, G. (2005). *fitopatología*. Mexico: Palma. Aquino Bolaños, T., Ruiz Vega, J., Giron, P. S., Pérez Pacheco, R., Martínez, T. S., & Silva Rivera, M. (2011). Interrelationships Of The Agave Weevil Scyphophorus acupunctatus (Gyllenhal), Erwinia carotovora (Dye), Entomopathogenic Agents And Agrochemicals. *African Journal Of Biotechnology*, 10 (68), 15402-15406.

Avila Sosa, R., Navarro Cruz, A. R., Vera López, O., Dávila Márquez, R. M., Melgoza Palma, N., & Meza Pluma, R. (2011). Romero (Rosmarinus officinalis L.): Una Revisión De Sus Usos No Culinarios. *Rev. Ciencia Y Mar.*, 15 (43), 23-36.

Ávila, L., Baquero, E., Viña, A., & Murillo, E. (2006). Actividad Antibacteriana De Diplostephium tolimense. *Vitae*, 13 (1), 55-60.

Castaño P., H. I., Ciro G., G., Zapata M., J. E., & Jiménez G., S. L. (2010). Actividad Bactericida Del Extracto Etanolico Y Del Aceite Esencial De Hojas De Rosmarinus officinalis L. Sobre Algunas Bacterias De Interés Alimentario. *Vitae*, 17 (2), 149-154.

Castellanos, G., Jara, C., & Mosquera, G. (4 de 2014). *C.I.A.T.* Recuperado el 20 de 1 de 2014, de Guía Practica 2: Manejo De La Bacteria En El Laboratorio: http://ciat.cgiar.org/wp-content/uploads/2013/04/guia_practica2.pdf

Celis, Á., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. E. (2008). Extractos Vegetales utilizados Como Biocontroladores Con Énfasis En La Familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 26 (1), 97-106.

CIPF. (03 de abril de 2012). *FAO Organización de las Naciones unidas para la alimentacion y la agricultura*. Recuperado el 29 de abril de 2013, de FAO Organización de las Naciones unidas para la alimentacion y la agricultura: <http://www.fao.org/news/story/es/item/131978/icode/>

CLASIFICACIÓN DE LOS FLAVONOIDES: Tomado de Wikipedia enciclopedia libre Recuperado el 20 de enero de 2014 (<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:2-phenylchromen-4-one.gif>)

Corzo, A. G., Bravo, E., Serrano, F., & Vattuone, M. A. (2009). Actividad Antibacteriana De Extractos De Hojas De Prosopis alba, Griseb, Frente A Cepas Patógenas Humanas Y Fitopatógenas. *Quebracho. Revista De Ciencias Forestales.*, 17 (1,2), 106-114.

Domingo, D., & López-Brea, M. (2003). Plantas Con Acción Antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap*, 16(4), 385-393.

Espinosa Mendoza, D. A., Ramírez García, E., González Bustamante, L. O., Cesáreo Castorena, K. A., Rosas Acevedo, H., & Sánchez García Figueroa, L. (2012). Actividad Antibacterial De Extractos De Psidium guajava L. Y Psidium guineense L. *Rev. Latinoamer. Quim. (Suplemento especial)*, 39, 197.

ESTRUCTURA BASICA DE LOS FLAVONOIDES: Tomado de Wikipedia enciclopedia libre (<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Flavonoide-flavanona-isomerasa.gif>)

FAO. (Julio de 2003). *Biota Del Suelo Y La Biodiversidad*. Obtenido de ftp://ftp.fao.org/paia/biodiversity/soilbiota_biod_es.pdf

Farfán, L., & Hoyos Carvajal, L. (5 de 11 de 2010). *Asohofrucol*. Recuperado el 11 de Enero de 2014, de Primer Congreso Latinoamericano De Passiflora: http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_57_varios.pdf#page=99

Franco, Y., Stefanova, M., & Coronado, M. F. (2004). Patogenicidad Y Virulencia De Aislamientos De *Erwinia* sp. En Semilla De Papa Importada. *Fitosanidad*, 8 (4), 45-47.

García Estrada, R. S., Juárez Reyes, C., Carrillo Fasio, J. A., Allende Molar, R., Márquez Zequera, I., & Muy Rangel, M. D. (2000). Marchitez Bacteriana En Chile Bell Causada por *Erwinia carotovora* sub. *carotovora*. *Revista Mexicana De Fitopatología*, 18 (2), 120-124.

García, H. M. (2000). *Estrategia Nacional para manejo de informacion sobre colecciones vivas en jardines botanicos de Colombia*. Bogota.

García, R. (2000). Especies Y Sub-especies De *Erwinia*, Causantes De Pudrición Blanda Y Pierna Negra En La Papa Cultivada, En El Estado De Mérida-Venezuela. *Rev. Forest. Venez.*, 44 (1), 107-114.

Gracia De García, C. L., Correa A., E., & Rojas C., N. (1995). Estudio Fitoquímico Preliminar y Evaluacion De La Actividad Antimicrobiana De Algunas Plantas Superiores Colombianas. *Revista Colombiana De Ciencias Químico-Farmacéuticas* (23), 42-48.

Guevara, Y., Maselli, A., Mireles, M., Figueroa, R., Marcano, M., & Rondón, A. (2002). Evaluación De Cuatro Productos Para El Control De La Bacteriosis (*Erwinia* spp.) En Frutos De Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana De Fitopatología.*, 20 (1), 110-113.

Hadison, V. (1985). Qualitative and quantitative analysis of flavonoids in plant products of cosmetic interest. *Clujul Med*, 58(4), 378-381.

Hernández Carvajal, J. E. (2012). *Universidad Nacional De Colombia*. Recuperado el 13 de 7 de 2013, de Biblioteca Digital: <http://www.bdigital.unal.edu.co/8021/1/1192542.2012.pdf>

Hernández Carvajal, J. E., & Luengas Caicedo, P. E. (2013). Estudio fitoquímico preliminar de *Cecropia membranacea* Estudio fitoquímico preliminar de *Cecropia membranacea*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18 (4), 586-595.

Hernández U., J. L., Valero, H., & Gil Otaiza, R. (2002). 23 Especies Vegetales Medicinales De Uso Frecuente En La Población De Tabay. *Revista De La Facultad De Farmacia*, 44, 51-58.

Herrera Arias, F. C., & García Rico, R. O. (2006). Evaluación In Vitro Del Efecto Bactericida De Extractos Acuosa De Laurel, Clavo, Canela Y Tomillo Sobre Cinco Cepas Bacterianas Patógenas De Origen Alimentario. *BISTUA. Revista De La Facultad De Ciencias Básicas.*, 4 (2), 13-19.

Kontogianni, V. G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A. A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., y otros. (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food chemistry*, 136, 120-129.

Lastra Valdés, H., & Piquet García, R. (1999). Artículos de revisión *Calendula officinalis*. *Revista Cubana Farm.*, 33 (3), 188-194.

López Luengo, M. T. (2008). El Romero Planta Aromática Con Efectos Antioxidantes. *Offarm. Ámbito Farmaceutico Fitoterapia*, 27 (7), 60-63.

Martínez, M. J., Molina, N., & Boucourt, E. (1997). Evaluación De La Actividad Antimicrobiana Del Psidium guajava L. (Guayaba). *Rev Cubana De Plant Med*, 2 (1), 12-14.

McManus, P. S. (1999). Uso De Antibióticos En El Control De Enfermedades De Las Plantas. *Apua. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología*, 19 (4), 192-196.

Metwally, A. M., Omar, A. A., Ghazy and F.M. Harraz, N. M., & El Sohafy, S. M. (2011). Monograph of Psidium guajava L. leaves. *Pharmacognosy Journal*, 3 (21), 89-104.

Ministerio de Agricultura, ANDI Cámara Procultivos y Econometría Consultores. (Noviembre de 2007). Ministerio de Agricultura. Recuperado el 17 de Abril de 2014, de <https://www.minagricultura.gov.co/ministerio/direcciones/Documents/Informe%20Final%20Estudio%20Competencia%20y%20Precios%20Agroqu%C3%ADmicos.pdf>

Ministerio de salud, Presidencia de la Nación (Argentina). (Noviembre de 2011). *Información Toxicológica*. Recuperado el 9 de 7 de 2013, de Guía De Uso Responsable De Agroquímicos: http://www.msal.gov.ar/images/stories/ministerio/intoxicaciones/laboral/guia_de_uso_de_agroquimicos.pdf

Mohammad, S. M. (2011). Study On Cammomile(Matricaria chamomilla L.) Usage And Farming. *American Eurasian Network For Scientific Information*, 5 (7), 1446-1453.

Molina, N. (2001). Uso De Extractos Botánicos En Control De Plagas Y Enfermedades. *Manejo Integrado De Plagas. Avances En El Fomento De Productos Fitosanitarios No-Sintéticos*. (59), 76-77.

Muñoz Centeno, L. M. (2004). Plantas Medicinales Españolas Calendula officinalis L.(Asteracea). *Medicina Naturista*, 5, 257-261.

Muñoz Centeno, L. M. (2002). Plantas Medicinales Españolas. *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) (Romero). *Ediciones Universidad de Salamanca. Biblid. Stud. Bot.*, 21, 105-118.

Niño, J., Mena, J., Valvueda, E., Zapata, F., Devia, A., & Restrepo, E. (2008). Estudio Del Proceso Infeccioso De La Pudrición Blanda En Bulbos De Lirios Callas Utilizando Las Técnicas De ESEM Y FTIR. *Revista Colombiana De Física*, 40 (2), 463-465.

Niño, N. E., Espinosa B., L., Gil, R., Menza, G., & Jiménez, J. A. (2009). Enfermedades De La Espinaca (*Spinacia oleracea* L.) en Cota (Cundinamarca) y manejo del mildew velloso (*Peronospora farinosa*, Byford). *Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas.*, 3 (2), 161-174.

Nogueira, J. C., Diniz, M. d., & Lima, E. O. (2008). In Vitro Antimicrobial Activity Of Plants In Acute Otitis Externa. *Revista Brasileira Otorrinolaringologia (Engl Ed.)*, 74, 118.

Okamura, N., Haraguchi, H., Hashimoto, K., & Yagi, A. (1994). Flavonoids In *Rosmarinus Officinalis* L. Leaves. *Pergamon, Phytochemistry*, 37 (5), 1463-1466.

Pérez Gutiérrez, R. M., Mitchell, S., & Vargas Solis, R. (2008). *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of ethnopharmacology*, 117, 1-27.

Perilla, M., Ajello, G., Bopp, C., Elliot, J., Facklam, R., Knapp, J., y otros. (2004). OMS. Recuperado el 06 de 07 de 2013, de OMS: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16330s/s16330s.pdf>

Petruživá-Poracká, V., Repečák, M., Vilková, M., & Imrich, J. (2013). Coumarins of *Matricaria chamomilla* L.: Aglycones and glycosides. *Food Chemistry*, 141, 54-59.

Pires Amaral, G., Rodriguez de Cavalho, N., Pillon Berceles, R., Dobrachinski, F., De Lima Portella, R., Hinerasky da Silva, M., y otros. (2013). Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 48-55.

Prat M., S. (2005). *Gobierno De Chile Ministerio De Salud*. Recuperado el 07 de Julio de 2013, de Instituto De Salud Publica De Chile:
http://www.ispch.cl/lab_sal/doc/manual_susceptibilidad.pdf

PLANTA DE GUAYABA: Aromatic interntional web site. Recuperado el 7 de Octubre de 2013 (HYPERLINK "<http://www.aromaticsinternational.com/guavaleaf101>"
<http://www.aromaticsinternational.com/guavaleaf101>)

PLANTA DE ROMERO: Elicriso web site. Recuperado el 19 de Octubre de 2013 (HYPERLINK "http://www.elicriso.it/es/plantas_aromaticas/romero/"
http://www.elicriso.it/es/plantas_aromaticas/romero/)

PLANTA DE CALENDULA: Floral image web site. Recuerado el 19 22 de Octubre de 2013 (HYPERLINK "http://www.floralimages.co.uk/page.php?taxon=calendula_officinalis,1"
http://www.floralimages.co.uk/page.php?taxon=calendula_officinalis,1)

PLANTA DE MANZANILLA: ABC homeopatía web site. Recuperaado el 2 de Diciembre de 2013 (HYPERLINK "<http://www.abchomeopatia.com/chamomilla-dolores-insoportables/>"
<http://www.abchomeopatia.com/chamomilla-dolores-insoportables/>)

Rangel, J. O. (Diciembre de 2002). *CORPOICA*. Recuperado el 1 de Octubre de 2011, de Frutales tropicales potenciales para el pie de monte llanero.:
[http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Archivos/Publicaciones/Frutalestropicalescartilla.p
df](http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Archivos/Publicaciones/Frutalestropicalescartilla.pdf)

Revista semana sostenible. (2014). La intoxicación del campo. *Semana sostenible* (7), 74 - 75.

Ríos R., Y. K., Otero J., A. C., Muñoz H., D. L., Echeverry R., M., Robledo R., S. M., & Yepes C., M. A. (2008). Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla (*Matricaria chamomilla*). *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 37 (2), 200-211.

Rondina, R., Palacios, P., Filip, R., & D. Coussio, J. (1991). Fraccionamiento de Extractos Vegetales por Extracción Líquido/Sólido Utilizando un Soporte Diatomáceo Inerte. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 10 (1), 49-53.

Schnetter Moralez, B., Mera Sáez, A., & Pihán Soriano, R. (2006). Evaluación Técnico - Económica De La Producción De Calas Del Color En La Región De La Araucanía, Chile. *IDESIA*, 24 (1), 17-24.

Sharapin, N. (2000). Materias primas vegetales Para La Industria De Productos Fitofarmacéuticos. *Revista De Fitoterapia*, 1 (3), 197-203.

Smith, I., Dunez, J., Phillips, D., Lelliott, R., & Archer, S. (1992). *Manual De Enfermedades De Las Plantas*. Madrid: Mundi-Prensa.

Souza Prestes, C. L., Damé Schuch, L. F., Hörnke Alves, G., Ziemann dos Santos, M. A., Alves Rodrigues, M. R., & Araújo Meireles, M. C. (2011). Evaluación De La Actividad Bactericida De Aceites Esenciales De Hojas De Guayabo, Pitango Y Arazá. *Revista Cubana De Plantas Medicinales*, 16 (4), 324-330.

Tafur, J. D., Torres, J. A., & Vilegas, M. V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibioticos en bacterias gram negativas. *Asociación Colombiana de infectologia (Infectio)*, 12 (3), 217 - 226.

Tavassoli, S., & Emam Djomeh, Z. (2011). Total Phenols, Antioxidant Potential And Antimicrobial Activity Of Methanol Extract Of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Global Veterinaria*, 7 (4), 337-341.

Trujillo, G., Hernández, Y., & Muñoz, C. (2000). Semilleros De Tabaco Por *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* En El Estado Cojedes, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (Maracay)*., 26, 27-38.

Vargas Alvares, D., Soto Hernández, M., González Hernández, V. A., Engleman, E. M., & Martínez Garza, Á. (2006). Cinética De Acumulación Y Distribución De Flavonoides En Guayaba (*Psidium guajava* L.). *Agrociencia Colegio De Posgraduados*, 40 (1), 109-115.

Vidaber, A. M. (2002). Uses Of Antimicrobials In Plant Agriculture. *Papers In Plant Pathology*, 34 (3), 106-110.

Vidal-Ollivier, F. (1988). Flavonol glycoside from *C.officinalis* flowers. *Planta Med*, 55(1), 73-74.

Wagner, H., Bladt, S., & Zgainski, E. (1984). *Plant Drug Analysis A Thin Layer Chromatography Atlas*. Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer - Verlag.