



**Somos calidad,
somos USC**

**Actividad antibacteriana de extractos de semilla de hinojo (*Foeniculum vulgare*)
obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido**

Autor

Santiago Caro Alvarez

Título por el que opta

Microbiólogo

Director

Jimmy Alexander Morales Morales

Grupo de Investigación

Quibio

Línea de Investigación

Desarrollo Tecnológico y Biotecnológicos

Facultad de Ciencias Básicas

Programa de Microbiología

Universidad Santiago de Cali

Santiago de Cali, Colombia

2026

IMPACTOS

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico	Potencial desarrollo de agentes antimicrobianos de origen natural aplicables en la industria biomédica y farmacéutica.	Empresas farmacéuticas, comunidad en general y medio ambiente.
Responsabilidad social	Extracción de aceites esenciales con técnicas alternativas o poco convencionales.	Comunidad en general y estudiantes.
Científico	Generación de nuevo conocimiento.	Comunidad en general y estudiantes.
Indicadores de Gestión	Formación de talento humano.	Estudiantes de la Universidad Santiago De Cali.
Tecnológico	Extracción alterna de aceites esenciales.	Industria y farmacéutica.
Técnico	fortalece el conocimiento sobre procesos de extracción no convencionales.	diseño de productos naturales antibacterianos.
Ambiental	búsqueda de alternativas sostenibles frente al uso de antimicrobianos sintéticos.	Comunidad en general y medio ambiente.
Social	Apropiación social del conocimiento.	Comunidad en general.
Cultural	reconocimiento de los recursos naturales y la biodiversidad como fuentes de compuestos bioactivos.	Comunidad en general.

Actividad antibacteriana de extractos de semilla de hinojo (*Foeniculum vulgare*) obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido

Santiago Caro Alvarez ¹, Jimmy Morales ²

Grupo de investigación en Química y Biotecnología (QUIBIO), facultad de Ciencias Básicas.
Universidad Santiago de Cali, campus pampalinda calle 5 # 62-00. Santiago de Cali, Colombia

RESUMEN

Foeniculum vulgare es una especie vegetal reconocida por la presencia de metabolitos secundarios con potencial actividad biológica. En el presente estudio se evaluó el comportamiento antibacteriano del extracto etanólico obtenido a partir de semillas de *F. vulgare* mediante extracción asistida por ultrasonido, utilizando el método de microdilución en caldo y un ensayo complementario de contacto superficial. Las pruebas se realizaron frente a cepas bacterianas de interés clínico, incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. Los resultados obtenidos mediante el método de microdilución en caldo no permitieron determinar una concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a las cepas evaluadas bajo las condiciones experimentales utilizadas. Sin embargo, el ensayo de contacto superficial evidenció un efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano en *S. aureus* y *E. coli*, así como una reducción parcial del crecimiento en *K. pneumoniae*, sugiriendo un comportamiento dependiente del método de evaluación empleado.

La caracterización fitoquímica preliminar confirmó la presencia de metabolitos secundarios como taninos, compuestos fenólicos, diterpenos y fitoesteroles en el extracto etanólico evaluado. Los resultados obtenidos sugieren que las características fisicoquímicas de algunos metabolitos presentes en el extracto podrían influir en su comportamiento bajo diferentes sistemas experimentales, particularmente en metodologías desarrolladas en fase líquida.

En conjunto, los hallazgos obtenidos aportan información sobre el comportamiento antibacteriano del extracto etanólico de *F. vulgare* y resaltan la importancia de emplear enfoques metodológicos complementarios en la evaluación microbiológica de compuestos bioactivos de origen vegetal.

Palabras clave: (cavitación acústica, metabolitos secundarios, resistencia bacteriana, microdilución en caldo, contacto superficial).

ABSTRACT

Foeniculum vulgare is a plant species recognized for the presence of secondary metabolites with potential biological activity. In the present study, the antibacterial behavior of the ethanolic extract obtained from *F. vulgare* seeds through ultrasound-assisted extraction was evaluated using broth microdilution and a complementary surface contact assay. The tests were performed against clinically relevant bacterial strains, including *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae*.

The results obtained through the broth microdilution method did not allow the determination of a minimum inhibitory concentration (MIC) against the evaluated strains under the experimental conditions used. However, the surface contact assay showed an inhibitory effect on bacterial growth in *S. aureus* and *E. coli*, as well as a partial reduction in the growth of *K. pneumoniae*, suggesting a behavior dependent on the evaluation method employed.

Preliminary phytochemical characterization confirmed the presence of secondary metabolites such as tannins, phenolic compounds, diterpenes, and phytosterols in the evaluated ethanolic extract. The obtained results suggest that the physicochemical characteristics of some metabolites present in the extract could influence their behavior under different experimental systems, particularly in liquid-phase methodologies.

Overall, the findings provide information regarding the antibacterial behavior of the ethanolic extract of *F. vulgare* and highlight the importance of employing complementary methodological approaches in the microbiological evaluation of plant-derived bioactive compounds.

Keywords: (*acoustic cavitation*, secondary metabolites, bacterial resistance, broth microdilution, surface contact assay).

1. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) se ha consolidado como una de las principales amenazas para la salud pública a nivel mundial, debido a la disminución progresiva de la eficacia de los antibióticos utilizados en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Este fenómeno ha sido reconocido por la World Health Organization como una problemática prioritaria, asociada al incremento de infecciones causadas por microorganismos resistentes y al aumento de la mortalidad relacionada con enfermedades infecciosas [1], [2]. Entre los microorganismos de mayor relevancia clínica se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, bacterias asociadas frecuentemente a infecciones intrahospitalarias y reportes crecientes de resistencia antimicrobiana [3].

Frente a esta problemática, los productos naturales han despertado un interés creciente como fuente potencial de compuestos bioactivos con aplicaciones farmacológicas y antimicrobianas. Diversos estudios han demostrado que metabolitos secundarios presentes en plantas medicinales, como compuestos fenólicos, terpenos y flavonoides, pueden ejercer actividad antimicrobiana mediante mecanismos de acción dirigidos a diferentes estructuras celulares bacterianas [4], [5]. Debido a esto, las especies vegetales representan una alternativa de interés en la búsqueda de nuevas estrategias frente a la resistencia bacteriana.

Dentro de estas especies, *Foeniculum vulgare* Mill. (hinojo) se destaca por su amplio uso tradicional y por la presencia de metabolitos secundarios asociados a diferentes propiedades biológicas [6], [7]. Investigaciones previas han reportado actividad antioxidante, antiinflamatoria y antibacteriana en extractos obtenidos a partir de esta especie vegetal [8]. Particularmente, las semillas de *F. vulgare* representan una fuente importante de compuestos bioactivos, lo que las convierte en una materia prima de interés para la obtención de extractos con posible actividad antimicrobiana [9].

Para la obtención de estos compuestos se han empleado diferentes metodologías de extracción, entre ellas la extracción asistida por ultrasonido (EAU), técnica basada en el fenómeno de cavitación acústica. Este proceso favorece la ruptura de estructuras celulares y facilita la liberación de metabolitos hacia el solvente extractor [10], [11]. En el presente estudio, la EAU fue utilizada como método para la obtención de extractos etanólicos a partir de semillas de *F. vulgare*, con el propósito de evaluar posteriormente su actividad antibacteriana.

La presente investigación se desarrolló con el fin de evaluar el potencial antibacteriano del extracto etanólico obtenido a partir de semillas de *F. vulgare* frente a bacterias de interés clínico. Este estudio busca aportar información sobre el comportamiento antibacteriano de compuestos de origen vegetal y contribuir al conocimiento de posibles alternativas naturales frente a la problemática de la resistencia antimicrobiana.

La pregunta de investigación planteada fue: ¿El extracto etanólico obtenido a partir de semillas de *Foeniculum vulgare* mediante extracción asistida por ultrasonido presenta actividad antibacteriana frente a bacterias de interés clínico?

La hipótesis de investigación establece que el extracto etanólico obtenido a partir de semillas de *Foeniculum vulgare* mediante extracción asistida por ultrasonido presenta actividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas de interés clínico.

El objetivo general del presente trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico obtenido a partir de semillas de *Foeniculum vulgare* mediante métodos de microdilución en caldo y contacto superficial frente a cepas bacterianas de interés clínico

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Obtención del material vegetal

Las semillas de hinojo (*Foeniculum vulgare*) fueron adquiridas comercialmente en la galería La Alameda, ubicada en Santiago de Cali, Valle del Cauca, Colombia. La selección del material vegetal se realizó considerando semillas libres de insectos y alteraciones visibles. Posteriormente, las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad Santiago de Cali para su procesamiento y análisis [9], [12].

2.2 Secado del material vegetal

El secado del material vegetal se realizó en horno a 40 °C durante una semana, con el fin de reducir el contenido de humedad y obtener una muestra apta para su posterior molienda. Antes y después del secado, las muestras fueron pesadas para determinar el porcentaje de humedad perdida durante el proceso.

$$\text{Humedad perdida (\%)} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100$$

Pi: Peso inicial de la muestra

Pf: Peso final de la muestra después del secado

2.3 Molienda del material vegetal

Posterior al secado, las semillas fueron molidas hasta obtener un polvo fino. El material obtenido fue tamizado para separar partículas de mayor tamaño y posteriormente almacenado en frascos oscuros previamente rotulados con información correspondiente al nombre común, nombre científico y fecha de almacenamiento. Finalmente, las muestras fueron conservadas en un lugar fresco y seco hasta su utilización.

2.4 Obtención del extracto

El extracto etanólico de semillas de *F. vulgare* fue obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido. Para la preparación del solvente se utilizó etanol al 70% (v/v), preparado a partir de etanol al 97% y agua destilada. Se pesaron 30 g del hinojo molido, los cuales fueron mezclados con 100 mL de etanol al 70%, manteniendo una relación sólido-líquido de 3:10 (p/v). La extracción se realizó en un baño ultrasónico con frecuencia nominal de 40 kHz y potencia constante de 120 W [13] [14].

El procedimiento fue realizado utilizando tiempos de extracción de 2, 4 y 6 horas, manteniendo una temperatura inicial de 20 °C con el fin de minimizar la evaporación del solvente. Durante el procedimiento se registró un aumento de temperatura inferior a 8 °C, determinado mediante mediciones con termómetro.

Posteriormente, las muestras fueron filtradas y centrifugadas a 7800 rpm durante 30 minutos para separar el sobrenadante del material sólido. Finalmente, el sobrenadante obtenido fue concentrado mediante evaporación al vacío en rotavapor a 40 °C para eliminar el solvente en cada una de las 3 muestras [10], [11], [14], [15].

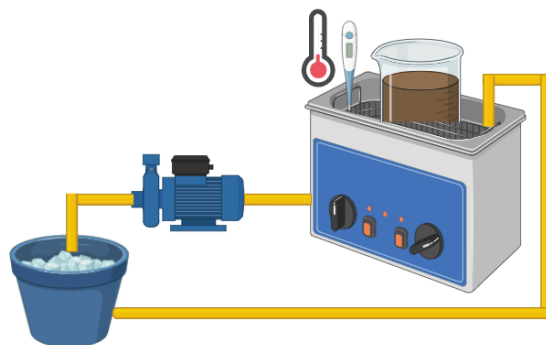


Figura 1. Procedimiento de extracción por baño ultrasónico.

2.5 Caracterización fitoquímica preliminar

La caracterización fitoquímica preliminar del extracto etanólico obtenido a partir de semillas de *F. vulgare* se realizó mediante pruebas colorimétricas cualitativas orientadas a la detección de metabolitos secundarios para cada uno de los extractos de 2, 4 y 6 horas. [16]

2.5.1. Detección de flavonoides (Prueba de Shinoda)

Se colocaron 2 mL del extracto etanólico en un tubo de ensayo y se adicionaron pequeñas cantidades de limadura de magnesio metálico, seguidas de unas gotas de ácido clorhídrico concentrado. La prueba se hubiera considerado positiva si se hubiera observado una coloración rojiza o rosada, indicativa de la presencia de flavonoides. La ausencia de cambio de color o la permanencia del color original del extracto se interpretó como un resultado negativo.

2.5.2. Detección de taninos (Prueba de precipitación con gelatina)

A 2 mL del extracto se añadieron 2 mL de una solución de gelatina al 1 % preparada en cloruro de sodio al 10 %. La formación de un precipitado blanco o turbidez evidente indicó un resultado positivo para la presencia de taninos. La ausencia de precipitado o de cambios visibles en la solución se hubiera considerado un resultado negativo.

2.5.3. Detección de compuestos fenólicos (Prueba de cloruro férrico)

Se agregaron unas gotas de solución de cloruro férrico (FeCl_3) al 5 % a 2 mL del extracto. La aparición de una coloración negra indicó un resultado positivo para compuestos fenólicos. Cuando no se observan cambios de color o la solución mantiene su apariencia inicial, el resultado se considera negativo.

2.5.4. Detección de diterpenos (Prueba de acetato de cobre)

Se adicionaron unas gotas de solución de acetato de cobre al extracto etanólico y se agitó suavemente. La aparición de una coloración verde esmeralda o un precipitado verdoso fue considerada una reacción positiva para diterpenos. La ausencia de cambios de color o de precipitación se hubiera considerado un resultado negativo.

2.5.5. Detección de fitoesteroles (Prueba de Liebermann-Burchard)

Se mezclaron 2 mL del extracto con 2 mL de anhídrido acético y posteriormente se añadieron cuidadosamente unas gotas de ácido sulfúrico concentrado por la pared del tubo. La aparición de una coloración marrón indicó un resultado positivo para fitoesteroles. La ausencia de estas coloraciones características se hubiera interpretado como un resultado negativo.

2.5.6. Detección de fitoesteroles (Prueba de Salkowski)

Se mezclaron 2 mL del extracto con 2 mL de cloroformo y posteriormente se adicionó cuidadosamente ácido sulfúrico concentrado para formar dos fases. La presencia de una coloración rojiza marrón en la interfase indicó un resultado positivo para fitoesteroides. Cuando no se observa ninguna coloración característica de las antes mencionadas, la prueba se considera negativa.

2.5.7. Detección de saponinas (Prueba de espuma)

Se mezclaron 1 mL del extracto con 2,5 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente durante aproximadamente 30 segundos. La formación de una espuma estable con una altura apreciable y persistencia superior a 10 minutos hubiera indicado un resultado positivo para saponinas. La ausencia de espuma estable después de la agitación fue considerada un resultado negativo.

2.6 Evaluación de la actividad antibacteriana mediante microdilución en caldo

Los microorganismos utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *F. vulgare* corresponden a dos cepas Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Escherichia coli* ATCC 25922) y una cepa Gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213); donadas por el Laboratorio de Ciencias Básicas de Investigación en Microbiología, de la Universidad Santiago de Cali. Las cepas se inocularon en agar nutritivo para su posterior uso. [17]

El ensayo se realizó empleando caldo Mueller-Hinton estéril como medio de cultivo. Para la preparación de la solución madre, el extracto fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) al 4%, obteniéndose una concentración inicial de 4000 mg/mL. A partir de esta solución se realizaron diluciones seriadas dobles (1:2), obteniéndose concentraciones comprendidas entre 4000 y 7.81 mg/mL.

Posteriormente, se adicionaron 50 µL de la suspensión bacteriana previamente estandarizada a 0.5 de acuerdo con la escala de McFarland, alcanzando un volumen final de 100 µL por pozo. Cada ensayo fue realizado por duplicado.

Se incluyeron controles de crecimiento bacteriano (caldo Mueller-Hinton e inóculo bacteriano), control negativo (caldo estéril) y control de solvente (DMSO), con el fin de verificar que el solvente empleado no ejerciera efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano.

Las microplacas fueron incubadas a 35 °C durante 24 horas. Posteriormente, el crecimiento bacteriano fue evaluado con la ayuda de un indicador llamado resazurina el cual es un colorante redox ampliamente utilizado como indicador de viabilidad celular y actividad metabólica microbiana. Su uso se basa en que cambia de color dependiendo de la capacidad de los microorganismos o células vivas para reducirla mediante sus procesos metabólicos.

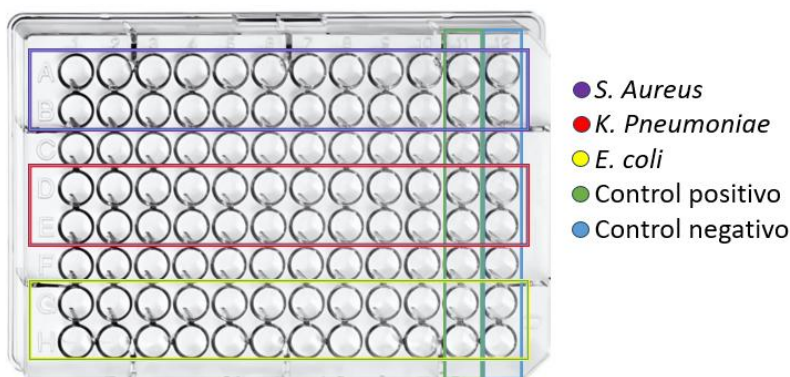


Figura 2. Esquema de inoculación en microplaca para la evaluación de la actividad antibacteriana mediante microdilución en caldo

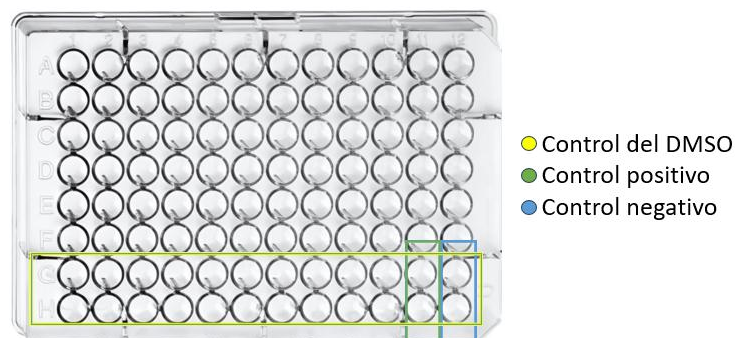


Figura 3. Esquema del control de DMSO en microplaca para la evaluación de la actividad antibacteriana mediante microdilución en caldo

Tabla 2. Concentración del extracto etanólico de *Foeniculum vulgare* en microplacas.

# de pozos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentración del extracto	4000m g/mL	2000m g/mL	1000m g/mL	500m g/mL	250m g/mL	125m g/mL	62.5m g/mL	31.25m g/mL	15.62m g/mL	7.81m g/mL	0 mg/mL	0 mg/mL

2.7 Evaluación complementaria de la actividad antibacteriana mediante ensayo de contacto superficial

Considerando la naturaleza fisicoquímica de algunos compuestos presentes en los extractos vegetales, por su características lipofílica y limitada solubilidad en medios acuosos, se implementó un ensayo complementario de contacto superficial con el fin de evaluar la actividad antibacteriana bajo condiciones de interacción directa entre el extracto y las células bacterianas. [18]

Para la preparación de la solución de ensayo, se adicionaron 400 μ L de DMSO al 4% en un tubo estéril y el volumen se llevó a 10 mL con agua destilada estéril. Posteriormente, se incorporaron 4000 μ L del extracto etanólico obtenido a partir de semillas de *F. vulgare*, homogenizando la mezcla hasta obtener una solución uniforme.

De manera paralela, se preparó un control de solvente adicionando 200 μ L de DMSO en un tubo estéril y llevando el volumen a 5 mL con agua destilada estéril.

Para la realización del ensayo se emplearon porta objetos como superficie de contacto. Con el fin de facilitar la localización de las zonas de inoculación, se trazó una cuadrícula de 1cm x 1cm.

Previo a su utilización, los porta objetos fueron esterilizados mediante exposición a radiación ultravioleta durante 10 minutos por cada cara dentro de la cabina de flujo laminar.

Posteriormente, se depositaron 100 μ L de las soluciones preparadas sobre cada superficie correspondiente y se dejaron secar en presencia de luz ultravioleta dentro de la cabina.

Las suspensiones bacterianas se prepararon a partir de cultivos frescos de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*. Para ello, se tomaron alícuotas de cada microorganismo y se suspendieron inicialmente en solución salina estéril. La turbidez de cada suspensión fue ajustada de acuerdo con la escala de 0.5 McFarland, con el fin de estandarizar la concentración bacteriana utilizada en el ensayo.

Una vez ajustada la turbidez, se tomaron 10 μ L de cada suspensión bacteriana y se adicionaron a tubos que contenían medio Mueller-Hinton estéril, llevando el volumen final a 10 mL para obtener una suspensión homogénea utilizada en la inoculación de las superficies de contacto.

A partir de la suspensión bacteriana preparada, se depositaron 100 µL sobre cada superficie previamente tratada. Las superficies inoculadas se dejaron secar nuevamente en condiciones asépticas dentro de la cabina de flujo laminar.

Una vez seco el inóculo, las zonas de inoculación fueron cubiertas con fragmentos de material plástico estéril, con el fin de favorecer el contacto directo entre los microorganismos y la película formada por la solución del extracto en DMSO, así como minimizar el riesgo de contaminación externa.

Las muestras fueron incubadas a 35 °C durante 24 horas, permitiendo el contacto prolongado entre los microorganismos y la película formada sobre la superficie del vidrio.

Posterior al periodo de incubación, las muestras fueron trasladadas nuevamente a la cabina de flujo laminar. Sobre cada superficie se adicionaron 100 µL de solución salina estéril con el fin de rehidratar la muestra y facilitar la recuperación de las células bacterianas.

El volumen recuperado fue transferido a tubos tipo Eppendorf estériles. Posteriormente, se adicionaron 900 µL de agua destilada estéril para obtener un volumen final de 1 mL.

A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas decimales desde 10^{-2} hasta 10^{-6} .

Para la evaluación del crecimiento bacteriano se seleccionaron las diluciones 10^{-1} , 10^{-3} y 10^{-5} . Cada una de estas diluciones fue sembrada en cajas de Petri divididas en tres compartimentos, permitiendo evaluar simultáneamente diferentes diluciones en una misma placa.

Este procedimiento se realizó de forma independiente para cada uno de los microorganismos evaluados (*E. coli*, *S. aureus* y *K. pneumoniae*).

Adicionalmente, se sembraron los controles correspondientes, incluyendo el control de solvente (DMSO) y controles de crecimiento bacteriano sin tratamiento.

3 RESULTADOS

3.1 Determinación de la humedad del material vegetal

Los resultados del proceso de secado de las semillas de *F. vulgare* se presentan en la tabla 1. La pérdida de masa registrada fue de 32.48 g, correspondiente a un porcentaje de humedad del 5.55 % respecto al peso inicial del material vegetal. La reducción del contenido de humedad permitió obtener un material más estable para el posterior proceso de extracción.

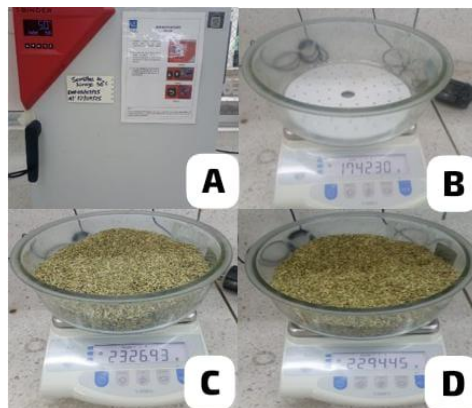


Figura 4. A) Horno de secado Drying/Heating Ovens with Natural Convection, Avantgarde.line ED Series, BINDER B) Bandeja de vidrio C) Hinojo Húmedo D) Hinojo Seco

Tabla 1. Determinación de humedad de las semillas de *Foeniculum vulgare*.
PARÁMETRO VALOR (g)

PESO DE LA BANDEJA VACÍA	1742.30
PESO DE LA BANDEJA + HINOJO (ANTES DEL SECADO)	2326.93
PESO DEL HINOJO INICIAL	584.63
PESO DE LA BANDEJA + HINOJO (DESPUÉS DEL SECADO)	2294.45
PESO DEL HINOJO SECO	552.15
HUMEDAD PERDIDA	32.48
% DE HUMEDAD PERDIDA	5.55%

3.2 Obtención del extracto etanólico

La extracción asistida por ultrasonido permitió obtener un extracto etanólico de color marrón oscuro y apariencia homogénea. Las figuras 5, 6 y 7 muestran las principales etapas del procedimiento experimental, incluyendo la preparación del material vegetal, el proceso de extracción y el extracto obtenido después de la evaporación del solvente.



Figura 5. Material vegetal empleado

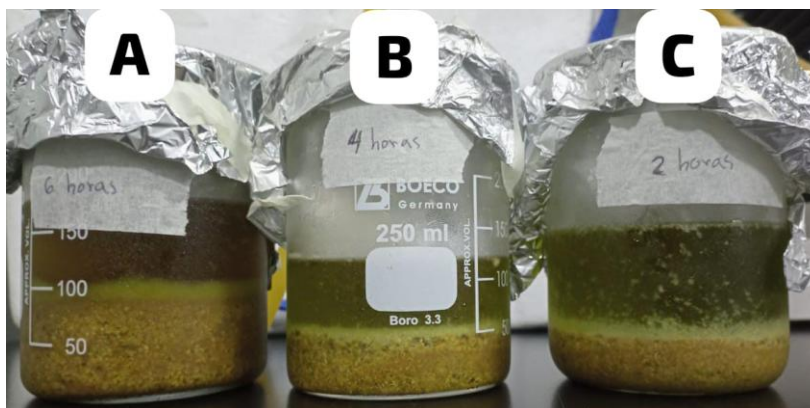


Figura 6. A) Extracto a las 6 horas B) Extracto a las 4 horas C) Extracto a las 2 horas.



Figura 7. A) Extracto de 2 horas B) Extracto de 6 horas C) Extracto de 4 horas

3.3 Caracterización fitoquímica preliminar del extracto etanólico

Las pruebas cualitativas evidenciaron la presencia de taninos, compuestos fenólicos, diterpenos y fitoesteroles tan solo para el extracto de 6 horas. Por el contrario, no se observó respuesta positiva para flavonoides ni saponinas bajo las condiciones experimentales empleadas para el extracto anterior mente mencionado.

Cabe aclarar que tanto el extracto de 2 horas como el de 4 horas dieron resultados negativos en todas las pruebas fitoquímicas dándonos a entender que no tenían presente metabolitos de interés, por ende, a partir de este punto se tomó la decisión de trabajar solo con el extracto de 6 horas el cual era el único que cumplía con las necesidades requeridas para las pruebas microbiológicas.

Los resultados de la caracterización fitoquímica preliminar se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Caracterización fitoquímica preliminar del extracto etanólico de *Foeniculum vulgare*.

Metabolito secundario por identificar	Prueba	Resultado 2 horas	Resultado 4 horas	Resultado 6 horas
Flavonoides	Shinoda	-	-	-
Taninos	Precipitación con gelatina	-	-	+
Fenoles	Cloruro férrico	-	-	+
Diterpenos	Acetato de cobre	-	-	+
Fitoesteroles	Libermann-Burchard	-	-	+
Fitoesteroles	Salkowski	-	-	+
Saponinas	Prueba de espuma	-	-	-

La figura 8 muestra algunos de los cambios observados durante las pruebas colorimétricas utilizadas para la identificación preliminar de metabolitos secundarios.

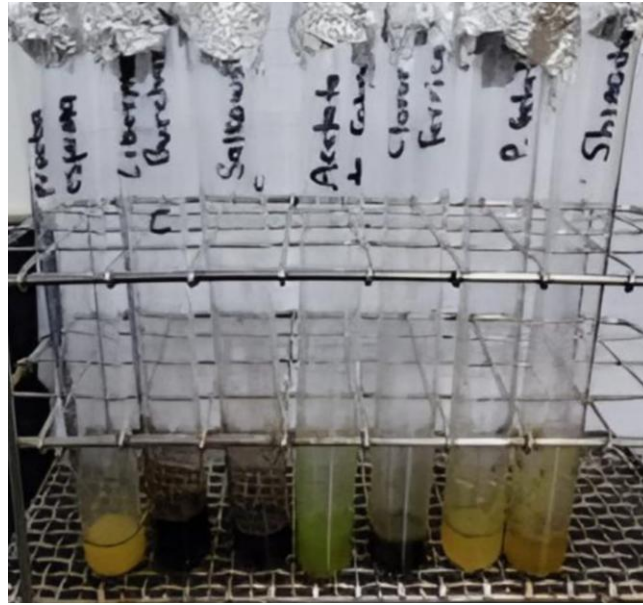


Figura 8. Resultados de las pruebas fitoquímicas cualitativas realizadas al extracto etanólico de 6 horas de *F. vulgare*.

3.4 Evaluación de la actividad antibacteriana mediante microdilución en caldo

La actividad antibacteriana del extracto etanólico fue evaluada mediante el método de microdilución en caldo utilizando las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

La viabilidad celular fue determinada mediante resazurina como indicador metabólico. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 9 y figura 10.

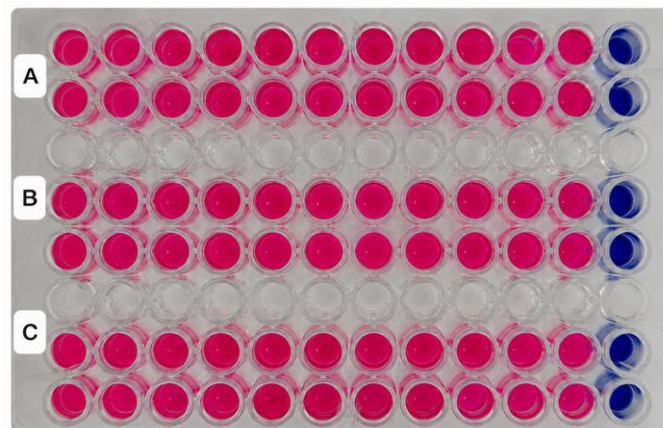


Figura 9. Evaluación de la viabilidad bacteriana mediante microdilución en caldo (A) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, (B) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 y (C) *Escherichia coli* ATCC 25922.

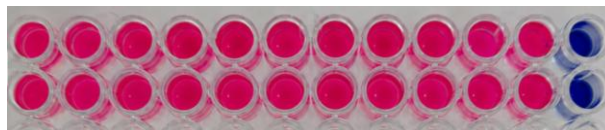


Figura 10. Control del DMSO para la evaluación de la viabilidad bacteriana mediante microdilución en caldo.

En las tres cepas evaluadas se observó coloración rosada en los pozos correspondientes a las diferentes concentraciones del extracto, indicando reducción metabólica de la resazurina y, por consiguiente, crecimiento bacteriano bajo las condiciones del ensayo.

No se identificaron concentraciones capaces de inhibir completamente el crecimiento de los microorganismos evaluados, por lo que no fue posible determinar una concentración mínima inhibitoria (CMI) para el extracto etanólico de 6 horas mediante este método.

3.5 Evaluación de la actividad antibacteriana mediante ensayo de contacto superficial

Con el fin de complementar la evaluación microbiológica, se realizó un ensayo de contacto superficial empleando las mismas cepas bacterianas utilizadas en la prueba de microdilución.

Los resultados obtenidos se presentan en la figura 11 y en las tablas 3.

La ausencia visible de colonias en las placas correspondientes a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* contrastó con el crecimiento abundante observado en los controles positivos. En el caso de *Klebsiella pneumoniae* se observó crecimiento reducido respecto al control.

Los resultados resumidos en la tabla 3 indicaron inhibición total para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, mientras que para *Klebsiella pneumoniae* se observó inhibición parcial.

Tabla 3. Crecimiento bacteriano observado en el ensayo de contacto superficial.

Microorganismo	Control crecimiento	Extracto etanólico	Interpretación
<i>S. aureus</i>	Incontable	Sin crecimiento	inhibición total
<i>E. coli</i>	Incontable	Sin crecimiento	inhibición total
<i>K. pneumoniae</i>	Incontable	2.2 x 10 ⁻³ UFC	inhibición parcial

Para cuantificar el crecimiento residual de *Klebsiella pneumoniae* se realizó el recuento de unidades formadoras de colonia (UFC).

En el ensayo de contacto superficial se evidencio inhibición total del crecimiento para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* pero en *Klebsiella pneumoniae* el recuento obtenido fue de 2.2 x 10⁻³ UFC.

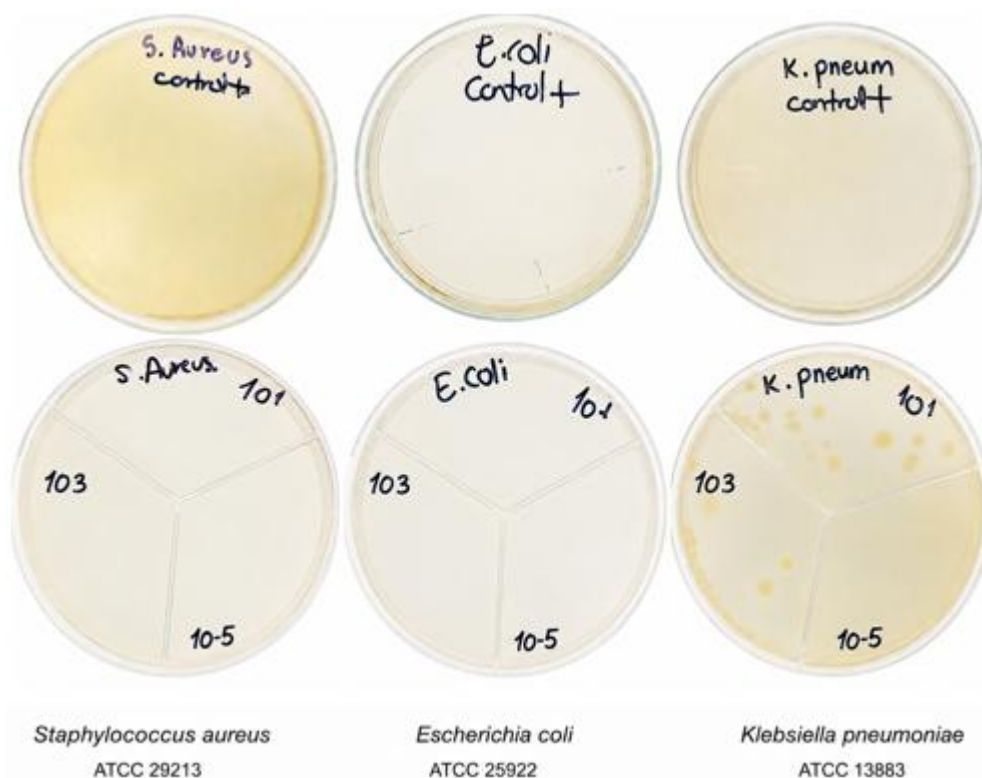


Figura 11. Evaluación complementaria de la actividad antibacteriana mediante ensayo de contacto superficial y lectura de la viabilidad de los microorganismos. *S. aureus* ATCC 29213; *K. pneumoniae* ATCC 13883; *E. coli* ATCC 25922

4 DISCUSIÓN

4.1 Perfil fitoquímico del extracto etanólico y su posible relación con la actividad antibacteriana

La caracterización fitoquímica preliminar del extracto etanólico de *F. vulgare* evidenció la presencia de taninos, compuestos fenólicos, diterpenos y fitoesteroides. Estos resultados son consistentes con reportes previos que describen a *F. vulgare* como una especie rica en metabolitos secundarios con potencial actividad biológica, incluyendo compuestos fenólicos, terpenoides y derivados aromáticos responsables de diversas propiedades farmacológicas y antimicrobianas [5], [7], [19], [20].

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de metabolitos más ampliamente asociados con actividad antimicrobiana. Diversos autores han reportado que estos compuestos pueden alterar la integridad de la membrana celular bacteriana, modificar la permeabilidad de la pared celular e interferir con procesos metabólicos esenciales para el crecimiento microbiano [3], [21]. De manera similar, los taninos han sido relacionados con la precipitación de proteínas extracelulares y enzimas microbianas, así como con la formación de complejos que afectan la funcionalidad de componentes celulares esenciales [22], [23].

La identificación de diterpenos y fitoesteroides también resulta relevante debido a que estos metabolitos presentan estructuras químicas predominantemente hidrofóbicas que favorecen su interacción con membranas biológicas. Estudios recientes han señalado que diversos terpenoides pueden ejercer efectos antimicrobianos mediante la alteración de la organización lipídica de las membranas celulares, generando pérdida de integridad estructural y afectando procesos fisiológicos fundamentales [3], [4], [5].

Aunque el presente estudio no incluyó técnicas analíticas de cuantificación o identificación molecular específica, la presencia simultánea de estos grupos de metabolitos sugiere que el extracto etanólico obtenido posee

componentes potencialmente asociados con actividad antibacteriana. Esta observación resulta particularmente relevante considerando que diversos estudios realizados con extractos y aceites esenciales de *F. vulgare* han reportado actividad frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos de interés clínico [19], [22], [28].

Por otra parte, la ausencia de respuesta positiva para flavonoides y saponinas bajo las condiciones empleadas indica que estos metabolitos no fueron detectados mediante las pruebas cualitativas realizadas. Sin embargo, esto no descarta completamente su presencia, ya que las metodologías utilizadas poseen limitaciones inherentes de sensibilidad y especificidad [16], [24].

En conjunto, el perfil fitoquímico obtenido proporciona una base razonable para interpretar la actividad antibacteriana observada en los ensayos microbiológicos desarrollados en el presente estudio.

4.2 Actividad antibacteriana evaluada mediante microdilución en caldo

La evaluación microbiológica mediante microdilución en caldo no permitió determinar una concentración mínima inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. La persistencia de la actividad metabólica bacteriana observada mediante el ensayo con resazurina indicó que las concentraciones evaluadas no fueron suficientes para generar inhibición completa bajo las condiciones experimentales utilizadas.

No obstante, este resultado no debe interpretarse necesariamente como ausencia total de actividad antibacteriana. Diversos autores han señalado que la respuesta observada en ensayos de microdilución puede verse influenciada por múltiples factores asociados a la naturaleza química de los metabolitos presentes en los extractos vegetales [3], [21], [23].

En particular, los compuestos terpenoides y algunos fitoesteroides presentan características hidrofóbicas que pueden limitar su dispersión homogénea en medios acuosos. Esta condición puede disminuir la disponibilidad efectiva de los metabolitos bioactivos para interactuar con las células bacterianas durante el ensayo. Adicionalmente, fenómenos de agregación molecular, adsorción a superficies plásticas y distribución heterogénea dentro del medio de cultivo pueden afectar la concentración real de los compuestos disponibles para ejercer actividad antimicrobiana [23], [25].

Otro aspecto relevante corresponde a la complejidad química inherente de los extractos vegetales. A diferencia de los antibióticos convencionales, los extractos constituyen mezclas complejas de metabolitos cuyas interacciones pueden modificar tanto la estabilidad como la biodisponibilidad de los compuestos activos [3], [21]. Por esta razón, la ausencia de una CMI detectable mediante microdilución no necesariamente implica ausencia de actividad biológica del extracto.

En consecuencia, los resultados obtenidos mediante este ensayo deben interpretarse considerando las limitaciones metodológicas asociadas a la evaluación de matrices vegetales complejas y las propiedades fisicoquímicas de los metabolitos identificados en el extracto.

4.3 Actividad antibacteriana evaluada mediante contacto superficial

A diferencia de los resultados observados mediante microdilución en caldo, el ensayo de contacto superficial evidenció actividad antibacteriana frente a las tres cepas evaluadas. La ausencia de crecimiento observada para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* sugiere una elevada susceptibilidad de estos microorganismos frente a los compuestos presentes en el extracto etanólico.

Este comportamiento podría estar relacionado con la interacción directa entre los metabolitos bioactivos y las células bacterianas cuando ambos permanecen en contacto sobre una superficie sólida. En estas condiciones experimentales, las limitaciones asociadas a la dispersión de compuestos hidrofóbicos en medios líquidos pueden reducirse considerablemente, favoreciendo una exposición más efectiva de los microorganismos a los metabolitos presentes en el extracto.

La inhibición observada frente a *Staphylococcus aureus* resulta consistente con diversos estudios que reportan sensibilidad de bacterias Gram positivas frente a extractos y aceites esenciales de *F. vulgare* [19], [22]. Las características estructurales de la pared celular de estos microorganismos podrían facilitar la interacción de compuestos fenólicos y terpenoides con componentes celulares esenciales, favoreciendo la manifestación de efectos antimicrobianos [3], [18] [22].

Por otra parte, la inhibición observada para *Escherichia coli* adquiere especial relevancia debido a que las bacterias Gram negativas presentan una membrana externa adicional que frecuentemente dificulta la acción de numerosos agentes antimicrobianos [2], [25]. La respuesta observada sugiere que algunos de los metabolitos presentes en el extracto poseen capacidad para interactuar con este tipo de microorganismos bajo condiciones de contacto directo.

En el caso de *Klebsiella pneumoniae* se observó un comportamiento diferencial caracterizado por inhibición parcial. Aunque el crecimiento no fue completamente eliminado, la disminución observada en los recuentos sugiere un efecto inhibitorio relevante. Esta respuesta podría estar asociada a mecanismos de protección estructural propios de la especie, particularmente la presencia de una cápsula polisacáridica que actúa como barrera frente a diversos agentes antimicrobianos [2], [3].

Por lo tanto, los resultados obtenidos mediante contacto superficial constituyen evidencia de actividad antibacteriana del extracto etanólico y permiten establecer diferencias en la susceptibilidad de las cepas evaluadas.

4.4 Influencia del método de evaluación sobre la actividad antibacteriana observada

El hallazgo más relevante del presente estudio corresponde a la diferencia observada entre los resultados obtenidos mediante microdilución en caldo y aquellos obtenidos mediante contacto superficial. Mientras que el primer método no permitió detectar inhibición completa del crecimiento bacteriano, el segundo evidenció actividad antibacteriana frente a las tres cepas evaluadas.

Esta discrepancia pone de manifiesto la importancia de considerar las características fisicoquímicas de los extractos vegetales al seleccionar metodologías de evaluación microbiológica. Los compuestos presentes en extractos complejos pueden comportarse de manera diferente dependiendo del entorno experimental, particularmente cuando contienen metabolitos con distintos grados de polaridad, solubilidad y afinidad por superficies biológicas [3], [21], [23].

Los resultados obtenidos sugieren que la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *F. vulgare* se manifiesta con mayor claridad cuando se favorece el contacto directo entre los metabolitos bioactivos y las células bacterianas. En consecuencia, la ausencia de inhibición detectable mediante microdilución no debe interpretarse como evidencia concluyente de inactividad biológica.

Desde una perspectiva metodológica, estos hallazgos resaltan la conveniencia de emplear estrategias complementarias para la evaluación de extractos vegetales, evitando depender exclusivamente de un único método de análisis. La combinación de diferentes enfoques permite obtener una visión más completa del potencial biológico de las matrices naturales y reduce el riesgo de subestimar actividades que pueden estar condicionadas por factores experimentales específicos [26] [27].

4.5 Limitaciones del estudio y perspectivas futuras

Si bien los resultados obtenidos permiten evidenciar actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Foeniculum vulgare*, el presente estudio presenta algunas limitaciones que deben considerarse al interpretar los hallazgos. La caracterización química realizada fue de naturaleza cualitativa, por lo que no fue posible identificar ni cuantificar individualmente los compuestos responsables de la actividad observada. Técnicas analíticas complementarias como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) o espectrometría de masas permitirían profundizar en la composición química del extracto y establecer relaciones más precisas entre composición y actividad biológica [28], [29].

Asimismo, futuros estudios podrían incluir la determinación de concentraciones expresadas en unidades de masa por volumen, la evaluación de concentraciones mínimas bactericidas y la exploración de posibles mecanismos de acción frente a microorganismos clínicamente relevantes.

Finalmente, la evaluación de extractos obtenidos mediante diferentes condiciones de extracción y la comparación con aceites esenciales de *Foeniculum vulgare* podrían aportar información adicional sobre los factores que influyen en la actividad antimicrobiana de esta especie vegetal.

5 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente estudio evidenciaron que el extracto etanólico de semillas de *Foeniculum vulgare* obtenido mediante extracción asistida por ultrasonido durante 6 horas presentó un perfil fitoquímico diferenciado respecto a los extractos obtenidos a 2 y 4 horas, siendo el único en el que se detectó la presencia de taninos, compuestos fenólicos, diterpenos y fitoesteros. Por el contrario, no se evidenció la presencia de flavonoides ni saponinas mediante las pruebas cualitativas empleadas.

En la evaluación microbiológica mediante microdilución en caldo no fue posible determinar una concentración mínima inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, debido a que todas las concentraciones evaluadas permitieron el crecimiento bacteriano bajo las condiciones experimentales utilizadas. Sin embargo, el ensayo de contacto superficial mostró un comportamiento diferente, evidenciando inhibición total del crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*, así como una inhibición parcial de *K. pneumoniae*.

Estos hallazgos indican que la actividad antibacteriana del extracto estuvo influenciada por las condiciones de exposición y la forma de interacción entre los metabolitos presentes y las células bacterianas, lo que explica las diferencias observadas entre ambos métodos de evaluación.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que el extracto etanólico de *Foeniculum vulgare* presenta actividad antibacteriana cuando se favorece el contacto directo con los microorganismos, resaltando además la importancia de emplear metodologías complementarias para la evaluación microbiológica de extractos vegetales complejos.

6 AGRADECIMIENTOS

La realización de esta investigación fue posible gracias al apoyo de la Universidad Santiago de Cali, institución que facilitó las instalaciones necesarias para el desarrollo de la fase experimental.

Expreso un especial agradecimiento al profesor Jimmy Morales, tutor de esta tesis, por su orientación académica, sus valiosos aportes al proceso investigativo y su acompañamiento constante durante todas las etapas del trabajo.

Asimismo, agradezco al profesor Carlos Andrés Martínez Garay por su apoyo en el planteamiento y fortalecimiento de los métodos microbiológicos empleados en esta investigación, cuya contribución fue fundamental para la adecuada ejecución de la fase experimental.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] World Health Organization, "Antimicrobial resistance," 2020. [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

[2] K. I. L. Martínez and U. Á. Garay, "Antimicrobial resistance impact on mortality in patients with healthcare-associated infections," *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, vol. 44, no. 3, pp. 96–104, 2024.

- [3] S. Woo, L. Marquez, W. J. Crandall, C. J. Risener and C. L. Quave, "Recent advances in the discovery of plant-derived antimicrobial natural products to combat antimicrobial resistant pathogens: insights from 2018–2022," *Natural Product Reports*, vol. 40, no. 7, pp. 1271–1320, 2023.
- [4] D. P. de Sousa, "Essential oils: Chemistry and pharmacological activities," *Biomolecules*, vol. 13, no. 7, p. 1144, 2023.
- [5] S. Ivanova, "Essential oils – a review of the natural evolution of perspectives and applications," *South African Journal of Botany*, vol. 170, pp. 380–391, 2025.
- [6] S. B. Badgujar, V. V. Patel and A. H. Bandivdekar, "Foeniculum vulgare Mill: A review of its botany, phytochemistry, pharmacology and contemporary application," *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 68, no. 7, pp. 845–854, 2014.
- [7] M. A. Rather et al., "Foeniculum vulgare: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety," *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 9, pp. S1574–S1583, 2016.
- [8] F. Zakikhani et al., "Investigating the antibacterial effects of Cuminum cyminum and Foeniculum vulgare essential oils," *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, vol. 11, no. 4, pp. 163–170, 2024.
- [9] M. A. Munar Velandia, D. S. Nieto Lara and M. F. Padilla Fajardo, "Análisis comparativo del contenido de ácido rosmarínico en semillas de Foeniculum vulgare por HPLC," Tesis de pregrado, Univ. Nacional de Colombia, 2023.
- [10] F. Chemat et al., "Ultrasound assisted extraction of food and natural products: Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 34, pp. 540–560, 2017.
- [11] S. U. Kadam, B. K. Tiwari, C. Alvarez and C. P. O'Donnell, "Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 46, no. 1, pp. 60–67, 2015.
- [12] P. Alam, M. S. Abdel-Kader, M. H. Alqarni, H. H. Zaatout, S. R. Ahamad and F. Shakeel, "Chemical composition of fennel seed extract and determination of fenchone in commercial formulations by GC–MS method," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 56, pp. 2395–2403, 2019.
- [13] L. A. Lima et al., "Optimization of heat and ultrasound-assisted extraction of Eucalyptus globulus leaves reveals strong antioxidant and antimicrobial properties," *Food Chemistry*, vol. 436, p. 143755, 2025.
- [14] H. Che et al., "Ultrasound-assisted extraction of polyphenols from Phyllanthi Fructus," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 111, p. 107083, 2024.
- [15] K. Rasool et al., "Sustainable ultrasound-assisted thyme oil extraction: Harnessing thyme residue for enhanced recovery of bioactive compounds," *Food Chemistry*, vol. 437, p. 143942, 2025.
- [16] R. U. Granados, F. Cruz-Sosa, F. J. Alarcón-Aguilar, A. Nieto-Trujillo and M. E. Gallegos-Martínez, "Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos de Thalassia testudinum," *Polibotánica*, no. 48, 2019.
- [17] M. Kalleli, I. Ksouri, H. Chaabane, W. Sebai, H. Salem and R. Ksouri, "Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of *Foeniculum vulgare* Mill. essential oil and extract," *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 42, p. 102355, 2022.
- [18] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 35th ed., CLSI supplement M100. Wayne, PA: CLSI, 2025.

- [19] M. D. C. M. Torres et al., "Estudios farmacológicos sobre *Foeniculum vulgare* y su concordancia con usos tradicionales," *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, vol. 27, no. 2, 2022.
- [20] S. Noreen, T. Tufail, H. Badar UI Ain and C. G. Awuchi, "Pharmacological, nutraceutical, functional and therapeutic properties of fennel (*Foeniculum vulgare*)," *International Journal of Food Properties*, vol. 26, no. 1, pp. 915–927, 2023.
- [21] S. Li, Y. Zhao, J. Wang and H. Chen, "Natural antimicrobials from plants: Recent advances and future perspectives," *Food Chemistry*, vol. 437, p. 137984, 2024.
- [22] Z. Breijyeh and R. Karaman, "Antibacterial activity of medicinal plants and their role in wound healing," *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 10, no. 1, p. 68, 2024.
- [23] N. Zouine, N. El Ghachtouli, S. El Abed and S. Ibensouda Koraichi, "A comprehensive review on medicinal plant extracts as antibacterial agents: Factors, mechanism insights and future prospects," *Scientific African*, vol. 26, p. e02395, 2024.
- [24] A. Altemimi, N. Lakhssassi, A. Baharlouei, D. G. Watson and D. A. Lightfoot, "Phytochemicals: Extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts," *Plants*, vol. 6, no. 4, p. 42, 2021.
- [25] M. M. Hegazy et al., "Essential Oils: The Science of Extraction and Its Implications for Composition and Biological Activity—A Review," *Food Analytical Methods*, vol. 18, pp. 1483–1513, 2025.
- [26] A. Sukasri, W. B. Utomo, R. Sjafruddin and M. Nursam, "The Use of Soxhlet Techniques in the Essential Oil Extraction from Anise Seeds (*Pimpinella anisum*)," *Equilibrium Journal of Chemical Engineering*, vol. 7, no. 1, pp. 59–68, 2023.
- [27] R. Dutta and U. Sarkar, "Design modifications and scale-up of a novel Soxhlet apparatus: Optimization of batch extraction of a biofuel oil from *Crotalaria juncea* seeds," *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, vol. 60, p. 103472, 2023.
- [28] C. Cordova, J. Guillén and T. Tuesta, "Extracción por microondas libre de solvente del aceite esencial de naranja (*Citrus sinensis*) y efecto de las condiciones de proceso en su rendimiento, composición y actividad antimicrobiana," *Revista Chilena de Nutrición*, vol. 47, no. 6, pp. 965–974, 2020.
- [29] Y. Chen et al., "Ionic liquid ultrasound-assisted hydrodistillation high-efficiency extraction of turmeric (*Curcuma longa* L.) essential oil and study of its extraction mechanism," *Separation and Purification Technology*, vol. 359, p. 130504, 2025.
- [30] G. Horna, L. Astocondor, J. Jacobs and C. García, "Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina," *Rev. Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, vol. 32, no. 2, pp. 321–327, 2015.
- [31] H. A. Abdallah, N. Afifi, E. I. Mohamed, M. Sebak, R. Mohammed and M. A. Zaki, "A comparative study of the essential oil extracts of *Centaurea alexanderina* different parts: GC-MS analysis, antimicrobial, antioxidant, and anti-hyperglycemic activities," *BMC Complementary Medicine and Therapies*, vol. 25, no. 1, p. 90, 2025.
- [32] G. Aguilar-Hernández et al., "Contenido de acetogeninas a partir de semillas del fruto de guanábana (*Annona muricata* L.): Evaluación de diferentes condiciones de extracción," *Biotecnica*, vol. 24, no. 2, 2022.

[33] D. A. Aguilar Pérez et al., "Control in vitro de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) con extractos vegetales," *Revista Espacio I+D Innovación más Desarrollo*, 2022.

[34] H. V. Márquez, G. M. P. Martín and L. J. la Hoz Hernández, "Efecto de la aplicación de extractos vegetales en *Vigna unguiculata*," *Avances*, vol. 25, no. 3, pp. 410–423, 2023.