



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
“Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”**



**ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE  
LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE LAS HOJAS DE *Buddleja  
americana***

Trabajo presentado ante la Ilustre Universidad de Los Andes para optar al  
título de Licenciado en Bioanálisis

**Autores:**

Ana Yusmily Arellano

C.I 20.828.441

Grecia Mariana Pérez

C.I: 25.079.432

**Tutor(a):**

Prof. Dra.Yndra Cordero

**Mérida, Junio 2023**

## DEDICATORIA

*A Nohemi, Luis, Oriana, Betzabeth y Luz. Mis personas favoritas en este mundo. Este logro es de ustedes también. **Grecia Pérez***

*Este gran logro se lo dedico a:*

*Mis padres Reyes y Lisbeth, Papi y mami ustedes son lo más importante en mi vida, sin duda alguna Dios me premio al dejarme ser su hija.*

*A mis Hermanos Yorman y Leonardo Arellano, con quienes compartí la mejor infancia y de quienes tengo los más lindos recuerdos.*

*Mi amor, me siento muy afortunada por haber coincidido en tu camino, tu amor y tu apoyo han sido invaluable para mí.*

*Mis abuelos Nevardo y Ana María, por su paciencia infinita, sabiduría y amor, su recuerdo siempre estarán presente en mi corazón.*

*Mi mamá Rita y mis tías Yadira, Neoreima, Yanira, Neida, Elimar y Tibisay por ser mi apoyo incondicional, por impulsarme a ser mejor y lograr el éxito en mi carrera.*

*Mi Familia Arellano, tíos y primos maravillosos quienes guían y aconsejan, ejemplo de superación y humildad.*

*Mi Orianny, mi princesa adorada, deseo ser tu mayor ejemplo, ser tu guía y estar para ti siempre que necesites de mí.*

*Yusney, Marianny, Karla, Carly, Yessica, Sendy, Ambar, Yoselin y Grecia, doy gracias a Dios por ustedes, por su presencia en mi vida, sin dudas él ha sido muy bueno conmigo al enviarme a las mejores amigas y compañeras en cada etapa de mi vida. **Yusmily Arellano***

## **AGRADECIMIENTOS**

Dicen que la gratitud es la memoria del corazón...

Estamos muy agradecidas con nuestra tutora Yndra Cordero, gracias por su guía, confianza, apoyo y sentido del humor brindado en esta investigación. Unas gracias enormes a las profesoras Ysbelia Obregon y Rosa Aparicio, sus correcciones y consejos fueron muy valiosos. Su atención, paciencia y cariño es algo que recordaremos siempre.

Gracias Dios porque tu amor y tu bondad no tienen fin, gracias por permitirnos sonreír y celebrar de estos logros, porque cada uno de ellos es el resultado de tu ayuda.

Nuestra gratitud para todos los profesores que nos brindó la Universidad de Los Andes, sus enseñanzas trascendieron mucho más allá de los cuadernos. Nos enseñaron a ser constantes y a luchar por nuestros sueños.

Aunque no es suficiente, gracias infinitas a nuestros padres. Gracias por siempre creer en nosotras. Gracias por tenernos presentes en sus oraciones cada noche, por su amor incondicional y por sus incontables sacrificios por nuestra educación y felicidad, los amamos con el corazón.

Gracias a nuestros hermanos, familiares y amigos por siempre estar presentes, hicieron de este camino una aventura maravillosa. Gracias por su compañía y apoyo.

Y un especial gracias a nuestras amigas Yessica Miranda y Maira Pérez, ustedes llegaron a nuestras vidas para hacerla más bonita, nos demostraron que la familia no siempre está unida por lazos de sangre, sabemos que su apoyo y su cariño estará presente por siempre.

***Grecia Pérez y Yusmily Arellano***

## **AGRADECIMIENTOS**

Néstor "Amor", la ayuda que me has brindado ha sido sumamente importante, Gracias por tus enseñanzas y aportes en esta investigación, Gracias por tu tolerancia y paciencia, por estar siempre cuando más lo necesito, valoro tu presencia y tus palabras certeras, tu amor para mi es invaluable... **Te amo**

***Yusmily Arellano***

Esta soy yo intentando expresar mi gratitud a Oriana y Betzabeth, por estar siempre a mi lado. Aunque la distancia nos separe siempre habrá un hilo invisible que nos una. Recuerdo demasiado bien todas esas videollamadas interminables donde compartimos nuestra felicidad, libertad, desaciertos y soledades (a veces todo al mismo tiempo). Gracias por las carcajadas, el apoyo y los consejos que me reiniciaron el día y me dieron ánimos para continuar.

Gracias a Noraima Rodulfo, por abrirme las puertas de su hogar y tratarme como a una hija. Gracias por enseñarme a hornear, por los almuerzos de los domingos y por dejarme estudiar y escribir esto en el mesón de su cocina. No hay suficientes palabras de gratitud para describir todo lo que hizo por mí. Mención especial a Kay, que fue mi fiel compañera en las largas noches de estudio.

Y por último, pero no menos importante, gracias a Luisana, Yessica, Yusmily, Maira, Yesnaie, Maylin, Eliana, Jhoander y Alberto. Amigos que con su presencia y apoyo hicieron este camino muchísimo más fácil y divertido.

***Grecia Pérez***

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
Resumen.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: El problema .....	3
Planteamiento del problema.....	3
Justificación e importancia de la investigación.....	5
Objetivos de la investigación .....	7
Objetivo general.....	7
Objetivos específicos.....	7
Alcances y limitaciones de la investigación.....	8
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	9
Trabajos previos.....	9
Antecedentes históricos y epistemológicos.....	12
Antecedentes teóricos.....	13
Familia Scrophulariaceae.....	13
Historia taxonómica.....	13
Aspectos botánicos.....	14
Distribución geográfica.....	14
Clasificación taxonómica de la familia Scrophulariaceae .....	15
Géneros de la familia Scrophulariaceae.....	15
Género <i>Buddleja</i> .....	16
Historia taxonómica.....	16
Aspectos botánicos.....	16
Distribución geográfica.....	16

**ÍNDICE DE CONTENIDO**  
**(Continuación)**

	Pág
Clasificación taxonómica del genero <i>Buddleja</i> .....	17
Metabolitos aislados.....	17
Propiedades medicinales.....	18
Especie <i>Buddleja americana</i> .....	19
Actividad Etnobotánica y Farmacológica de <i>Buddleja americana</i> .....	19
Metabolismo primario de las plantas.....	20
Metabolismo secundario de las plantas.....	20
Metabolitos secundarios.....	21
Extractos vegetales.....	26
Clasificación de los extractos vegetales.....	27
Métodos de obtención de los extractos vegetales.....	27
Bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	30
Bacterias Gram positivas.....	31
<i>Staphylococcus aureus</i> .....	31
<i>Enterococcus faecalis</i> .....	32
Bacterias Gram negativas.....	33
<i>Escherichia coli</i> .....	33
<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	34
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	35
Microorganismos fúngicos.....	35
Género <i>Candida</i> .....	36
Técnicas para la determinación de la actividad antibacteriana.....	38
Método de difusión en disco (Kirby-Bauer).....	39
Método modificado de pozos de agar.....	40
Métodos de dilución.....	40

**ÍNDICE DE CONTENIDO**  
**(Continuación)**

	Pág.
Dilución en agar.....	40
Dilución en medio líquido.....	41
Definición operacional de términos.....	42
Operacionalización de las variables.....	45
Hipótesis.....	47
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO.....	48
Tipo de investigación.....	48
Diseño de investigación.....	48
Población y muestra.....	49
Unidad de investigación.....	49
Selección del tamaño de la muestra.....	49
Sistema de variables.....	50
Instrumentos de recolección de datos.....	50
Procedimientos de la investigación.....	50
Diseño de análisis.....	61
CAPÍTULO IV: Resultados y Discusiones.....	63
Resultados.....	63
Análisis fitoquímico de las hojas de <i>Buddleja americana</i> .....	64
Determinación de la Actividad Antibacteriana.....	70
Determinación de la Actividad Antifúngica.....	73
Discusiones.....	74
CAPÍTULO V: Conclusiones y Recomendaciones.....	78
Conclusiones.....	78
Recomendaciones.....	79
BIBLIOHEMEROGRAFÍA.....	78

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura n°	Pág.
1. Estructura química de Iridoide, Saponinas y Esteres aromáticos	16
2. Estructura química de un terpeno	23
3. Estructura química de un flavonoide	24
4. Estructura química de un alcaloide	25
5. Estructura química de un glicósidos	26
6. Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas	30
7. <i>Staphylococcus aureus</i>	31
8. <i>Enterococcus faecalis</i>	32
9. <i>Escherichia coli</i>	33
10. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	34
11. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35
12. <i>Candida</i>	38
13. Procedimiento para el análisis fitoquímico de <i>Buddleja americana</i>	51
14. Extracción por reflujo en caliente	52
15. Filtrado de los extractos	52
16. Concentración de los Extractos	56
17. Procedimiento para determinar la actividad antimicrobiana	61
18. Resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de <i>B. americana</i>	66
19. Resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de <i>B. americana</i>	67
20. Resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de <i>B. americana</i>	68
21. Resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de <i>B. americana</i>	69
22. Método de difusión en disco utilizado cepa ATCC de <i>Staphylococcus aureus</i>	70

**ÍNDICE DE FIGURAS**  
**(Continuación)**

23. Método de difusión en disco utilizado cepa ATCC de <i>Enterococcus faecalis</i>	70
24. Método de difusión en disco utilizado cepa ATCC de <i>Escherichia coli</i>	71
25. Método de difusión en disco utilizado cepa ATCC de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	71
26. Método de difusión en disco utilizado cepa ATCC de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	72
27. Método de difusión en disco utilizado cepas ATCC de <i>Candida</i> .	75

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°	Pág.
1. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas de <i>Buddleja americana</i> .	45
2. Operacionalización de la variable independiente: Análisis fitoquímico de los extractos obtenidos de las hojas de <i>Buddleja americana</i> .	46
3. Resultado del rendimiento de los extractos.	63
4. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de hexano y etanol de <i>Buddleja americana</i> .	65
5. Resultado de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de <i>Buddleja americana</i> expresado en milímetro.	72
6. Resultado de los halos de inhibición de la actividad antifúngica del extracto de etanol de <i>Buddleja americana</i> expresado en milímetro.	73



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
” Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”



**ANÁLISIS FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS  
EXTRACTOS OBTENIDOS DE LAS HOJAS DE *Buddleja americana*  
(Trabajo de grado II)**

**Autores:**

Ana Yasmily Arellano  
Grecia Mariana Pérez

**Tutor(a):**

Prof. Dra. Yndra Cordero

**RESUMEN**

El género *Buddleja*, pertenece a la familia Scrophulariaceae. Son plantas con gran valor medicinal, constituidas por numerosas sustancias bioactivas y se caracterizan por ser usadas como tratamiento frente a enfermedades de origen hepático, reumáticas, afecciones bronquiales y diversas infecciones; es por ello que surge la necesidad de estudiar las posibles propiedades terapéuticas con las que cuenta la especie *Buddleja americana*. El objetivo fue confirmar la composición fitoquímica y la actividad antimicrobiana de los extractos de las hojas de *Buddleja americana*. Las muestras estudiadas fueron cepas de bacterias Gram negativas y Gram positivas y cepas de *Candida albicans* y *C. krusei*. Se determinó los metabolitos secundarios de los extractos de hexano y etanol siendo positivos para alcaloides, triterpenos y esteroides. Se probó la actividad antibacteriana por el método de Kirby-Bauer y la actividad antifúngica por el método de difusión del disco en agar Müller Hinton suplementado con glucosa y azul de metileno. El resultado de los extractos contra las bacterias estudiadas fue para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* de 7 mm, y para *K. pneumoniae* de 8 mm, las cepas de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y las cepas de *C. albicans* y *C. krusei* no presentaron actividad frente al extracto.

**Palabras claves:** *Buddleja*, *Buddleja americana*, actividad antimicrobiana, análisis fitoquímico, cepas bacterias, resistencia, antibióticos, extractos.

## INTRODUCCIÓN

El uso de prácticas de salud complementarias es tan antiguo como la aparición de la especie humana, ya que desde el principio de la civilización son parte de las habilidades de atención médica dirigidas al ser humano y la sociedad. Entre estas prácticas utilizadas y difundidas a través de la cultura popular, las plantas medicinales siempre ocupan un lugar destacado, que durante mucho tiempo fueron el principal recurso terapéutico empleado para tratar la salud de las personas en sus diferentes ambientes y localidades, encontrando así una gran diversidad de usos y formas de aplicación de diferentes especies de plantas a nivel mundial (Heisler, Budo. Schmit, Bodke y Ceolin, 2015).

Los productos naturales, tales como los extractos de plantas y/o sus compuestos puros, proveen oportunidades ilimitadas para el desarrollo de nuevas drogas que puedan ser utilizadas para el control microbiano (Sánchez, Loruhamá y García, 2016). Con respecto a esto, el desarrollo de fármacos comienza con el análisis fitoquímico que permite la identificación de los principios activos responsables de las propiedades atribuidas a la planta, para después, aplicando diversos ensayos biológicos, obtener información sobre la capacidad antimicrobiana del compuesto de interés (Sánchez y cols., 2016), generando así una diversidad infinita de posibilidades de usos y empleos de compuestos químicos que permitan la evolución y la creación de medicamentos que contribuyan al avance de la biología y la medicina como ciencias fundamentales en la preservación de la especie humana.

Para determinar su correcta evaluación, existen pruebas estandarizadas *in vitro* que se llevan a cabo con el fin de valorar su actividad, en especial la antimicrobiana, de este modo poder establecer a qué microorganismos son sensibles o muestran resistencia, ya sean a bacterias, hongos y protozoos (Ramírez y Marin, 2009).

En la actualidad se han realizado diversas investigaciones sobre la actividad antimicrobiana que poseen los extractos de algunas plantas sobre los microorganismos de interés. El género *Buddleja*, cuenta con diferentes especies que han sido estudiadas con anterioridad en esta área, obteniendo muy buenos resultados en cuanto a su uso terapéutico en diferentes patologías, sin embargo, la especie *Buddleja americana* ha sido estudiada con menos frecuencia y es por ello que surge la necesidad de realizar esta investigación.

El trabajo se estructuró bajo el sistema de la Asociación Psicológica Americana (APA) y estará dividido en cinco capítulos: El capítulo I; que abarca El Problema, y que consta de: Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones. El capítulo II; titulado Marco Teórico, estará formado por: los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las variables y Las Hipótesis. El capítulo III; titulado Marco Metodológico que contempla el Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Unidad de Investigación, Selección del Tamaño de la Muestra, Sistema de Variables, Instrumento de Recolección de Datos, Procedimiento de la Investigación y Diseño de Análisis. El capítulo IV; titulado resultados y discusiones, y finalmente El capítulo V; que comprende conclusiones y recomendaciones. Además de la Bibliohemerografía.

La investigación planteo como objetivo general: Confirmar la relación que existe entre la composición fitoquímica y la actividad antimicrobiana del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Buddleja americana*.

## **CAPÍTULO I**

### **EL PROBLEMA**

#### **Planteamiento del problema**

En la actualidad, los microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia frente a muchos fármacos, definiendo un mecanismo de resistencia como la capacidad de un organismo para seguir siendo viable y subsistir en condiciones que lo podrían destruir o inhibir. En el caso de las bacterias ocurre cuando pueden sobrevivir y no son susceptibles a una concentración de agente antibacteriano utilizado; el mecanismo de acción que ejercen los microorganismos para su protección tiene serias implicaciones económicas y ambientales en la sociedad humana (Breyers, 1993).

Desde tiempos prehistóricos, el hombre utiliza las plantas con propósitos medicinales, y aun en la actualidad tienen un papel clave en el mantenimiento y la recuperación de la salud en la mayor parte de la población mundial, pese a los avances de la medicina moderna (Carbajal, Hata y Sierra, 2009). La acción preventiva o curativa de las plantas se debe a sustancias químicas que provocan un efecto fisiológico en el organismo. Estas sustancias se conocen como principios activos, y generalmente son productos del metabolismo secundario de las mismas (Torres y Martínez, 2013).

Los principios activos tienen diferentes propiedades pudiendo ser medicinales, preventivas y regenerativas, que funcionan incrementando el bienestar humano; pero a su vez pueden contener factores nocivos, es por ello que resulta fundamental estudiar la composición fitoquímica de las

plantas medicinales (Riccardi, 2020). El estudio de estas sustancias que poseen una virtud medicinal se conoce como farmacognosia y el efecto que ocasionan esas sustancias en el organismo se estudia en farmacología (Torres y Martinez, 2013).

El análisis fitoquímico comprende el estudio de metabolitos secundarios presentes en las especies vegetales. Los ensayos fitoquímicos tradicionales constituyen aún una forma confiable de realizar un análisis cualitativo de los extractos, ya que arrojan información preliminar acerca de su composición, siendo así una herramienta eficaz en la investigación del potencial biológico y farmacológico que poseen las plantas (Prashant, Bimlesh, Mandeep, Gurpreet, Harleen, 2011).

En tal sentido se han desarrollado muchos estudios con la finalidad de demostrar la actividad antimicrobiana de manera natural del género *Buddleja*, perteneciente a la familia Scrophulariaceae, que tiene más de 100 especies, muchas de ellas distribuidas en regiones mediterráneas y asiáticas (Khan, Ullah y Zhang, 2019). Alrededor de 50 especies de *Buddleja* son autóctonas de América, desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina y Chile y el 50 % de estas especies se encuentran en los Andes del Continente (Norman, 2000).

Entre los compuestos aislados en las diferentes especies de este género se encuentran lignanos, fenilpropanoides, terpenoides, flavonoides, esteroides, ésteres aromáticos, compuestos fenólicos y varias saponinas (Joshi, Mishra, Bisht y Khetwal, 2012). Además, los estudios farmacológicos de las especies de *Buddleja* concentran funciones principales como: la cicatrización de heridas, problemas hepáticos, afecciones bronquiales, comportamiento diurético, propiedades antioxidantes, antirreumático y en algunos casos analgésico (Khan y cols., 2019).

Después de describir la situación actual del problema de estudio, se plantea el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación que existe entre la actividad antimicrobiana y la composición fitoquímica de los extractos obtenidos de las hojas de *Buddleja americana*?

### **Justificación e importancia de la investigación**

Una de las premisas en las que se basó esta investigación, es cómo el hombre desde la antigüedad ha empleado las plantas para diferentes fines, principalmente en la medicina, enfocándose en curar o prevenir enfermedades (Sánchez y cols., 2016). Así como también, la inquietud en el hecho de que actualmente organismos como la Organización Mundial de la Salud, han manifestado un fuerte incremento de la resistencia a los antimicrobianos en la población mundial, que surge cuando las bacterias, los virus, los hongos y los parásitos cambian y dejan de responder a medicamentos, lo que hace más difícil el tratamiento de infecciones e incrementa el riesgo de propagación de enfermedades, siendo esto un problema apremiante que, de no combatirse a tiempo, puede comprometer la salud de las generaciones futuras, con un retorno a la era pre antibiótica (Grayson y Heyman 2012).

Por otra parte, se considera entre las potencialidades, el amplio espectro de metabolitos secundarios que producen las plantas, los cuales participan en sus mecanismos de defensa contra la depredación por microorganismos, insectos y herbívoros. Estos metabolitos son compuestos que no se asocian directamente a los procesos de crecimiento y desarrollo, sino que confieren a la planta propiedades biológicas. El estudio de estas propiedades ha sido el punto de partida para la búsqueda de nuevos fármacos y antibióticos (Croteau, Ketchum y Lewis, 2000).

Las razones mencionadas anteriormente constituyen el motivo por el cual, se considera de gran importancia investigar el género *Buddleja* ya que ha

sido motivo de estudio en diferentes oportunidades, demostrando su capacidad terapéutica frente a diferentes enfermedades, así como también la prevención de otras patologías. La especie *Buddleja americana* no ha sido estudiada ampliamente, es por ello que se requiere conocer sus propiedades biológicas y su actividad frente a diferentes enfermedades, contribuyendo a contrarrestar la resistencia a los antimicrobianos que se presenta actualmente como una problemática a nivel mundial.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## **Objetivos de la investigación**

### ***Objetivo general***

Confirmar la relación que existe entre la composición fitoquímica y la actividad antimicrobiana del extracto etanólico obtenido de las hojas de *Buddleja americana*.

### ***Objetivos específicos***

- Obtener los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Buddleja americana* mediante la técnica de reflujo.
- Analizar la composición química de los extractos de las hojas del *Buddleja americana* a través del tamizaje fitoquímico.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos obtenidos de las hojas de *Buddleja americana* contra bacterias Gram positivas, Gram negativas y cepas de *Candida albicans* y *C. krusei*.
- Comprobar la relación entre la actividad antimicrobiana y la composición química de los extractos obtenidos de las hojas de *Buddleja americana*.

## **Alcances y limitaciones de la investigación**

### ***Alcances de la Investigación***

El alcance de este estudio permitirá confirmar la actividad antimicrobiana y el análisis fitoquímico de los extractos obtenidos de las hojas de *Buddleja americana*, obteniendo así evidencias de la eficacia que tiene esta especie como método terapéutico frente a diversas enfermedades, logrando contribuir en el desarrollo de nuevas investigaciones para la creación de nuevos fármacos.

### ***Limitaciones de la Investigación***

Algunas de las limitaciones que se han presentado durante el desarrollo de este trabajo están relacionadas con la revisión de la literatura ya que la información y los trabajos previos que se obtienen como sustento y respaldo de la investigación son escasos.

Por otra parte, los continuos cortes del fluido eléctrico y las constantes fallas de internet generan una limitante al momento de avanzar en la elaboración del trabajo de estudio

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Trabajos Previos

El trabajo realizado por Otero, Fuentes, Atala, Cuadros-Orellana, Fuentes y Gordillo (2022), titulado Propiedades antimicrobianas de las plantas nativas chilenas en su aplicación en la industria alimentaria, cuyo objetivo fue describir las propiedades antimicrobianas encontradas en plantas endémicas chilenas para proponer futuros usos en la industria alimentaria.

Los autores se basaron en la revisión del trabajo aislamiento del verbacósido, un constituyente con actividad antimicrobiana de las hojas de *Buddleja globosa*, concluyeron que los extractos etanólicos de las hojas presentan monoterpenos, sesquiterpenos y glicósidos, siendo el verbacósido (un tipo de glicósido) responsable de las actividad bacteriostática contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, También se observó un efecto disruptor en la membrana del patógeno Gram positivo formador de esporas *Paenibacillus larvae*, agente causal de la loque americana, una enfermedad destructiva para las larvas de abejas productoras de miel. El extracto mostró también actividad antifúngica contra las especies de dermatofitos *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale* y *Epidermophyton floccosum*. Esta investigación guarda relación con el presente trabajo por el estudio de la actividad antimicrobiana de los extratos de etanólico de una especie de *Buddleja*.

Por otra parte, el trabajo realizado por Gutierrez, Perez, Miranda, Mayanga y Tapia (2020) titulado Uso etnomedicinal, fitoquímico y actividad biológica

de la planta andina *Buddleja incana* (Scrophulariaceae), ideó como objetivo reunir la información existente sobre la importancia de la milenaria especie *Buddleja incana*.

Los autores afirman que el género *Buddleja*, tiene más de 100 especies, distribuidas en diferentes regiones mediterráneas y asiáticas, alrededor de 50 especies son autóctonas de América. Así mismo demuestran la importancia que tiene el género *Buddleja*, en el ámbito de la medicina, especificando que *Buddleja incana* presenta diferentes efectos y actividades biológicas, empleando diferentes partes y extractos de la especie, entre las que se puede destacar: la actividad reumática, antiinflamatoria, genitourinaria, antiespasmódica, antibacteriana, antimicótica, vigorizante, entre otros. Los extractos de *Buddleja incana* obtenidos con diferentes solventes evidenciaron diversos perfiles de componentes químicos. Los extractos metanólicos presentaron entre otros metabolitos: flavonoides, esteroides y saponinas. Guardando relación dicho trabajo con la investigación realizada, ya que se evaluaron propiedades fitoquímicas y antimicrobianas del género *Buddleja*, en especial de la especie *Buddleja incana*.

Por otra parte, el trabajo realizado por Khan, Ullah y Zhang (2019), titulado: Constituyentes Bioactivos de especies *Buddleja*; proyectó como objetivo realizar una revisión de la literatura y discutir las sustancias naturales estructuralmente establecidas y farmacológicamente significativas de una amplia variedad de diferentes especies de este género. Para esta revisión, recopilaron información reciente descrita por diferentes autores y describieron detalladamente alrededor de 154 compuestos aislados de más de 100 especies diferentes pertenecientes al género *Buddleja*. Entre los compuestos comúnmente encontrados en este género están: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, flavonoides, feniletanoides, fenilpropanoides, lignanos y esteroides. Concluyeron que los extractos y compuestos aislados de diferentes partes de las plantas relacionadas con

este género han sido probadas como potente antimicrobiano y antiinflamatorio, teniendo, así como funciones principales la cicatrización de heridas, contra disfunciones en el hígado, afecciones bronquiales, propiedades antioxidantes, sedante, antirreumático y en algunos casos analgésico. Guardando relación dicho trabajo con la investigación a realizar, puesto que se evaluaron propiedades fitoquímicas y antimicrobianas del género *Buddleja*.

Así mismo, el trabajo realizado por Hernández, Phaedra, Bermúdez, Reyes, Vibrans y Soto (2019) titulado: Evaluación *in vitro* de la actividad cicatrizante y antibacteriana de los extractos de *Buddleja cordata* y *Vismia baccifera*; planteó como objetivo evaluar *in vitro* el potencial de estas especies para promover el cierre de heridas y como agentes antibacterianos contra *Pseudomonas aeruginosa*. Los autores obtuvieron extractos de las hojas secas de ambas especies mediante el método de maceración en frío, denominándolos como vismia y tepozán. Los extractos de diferente polaridad de tepozán se obtuvieron a partir de 470 g de hoja seca y molida bajo el mismo procedimiento; realizaron una extracción con hexano, acetato de etilo y finalmente metanol. En todos los casos se hizo una solución stock a partir de 1 mg de extracto seco disuelto con dimetilsulfoxido (DMSO). Los extractos de vismia y tepozán se evaluaron en las concentraciones 5, 10, 50 y 100 µg/mL, mientras que los extractos de diferente polaridad de tepozán se usaron en las concentraciones 5, 10 y 50 µg/ mL. Así mismo evaluaron la viabilidad celular y el cierre de la herida *in vitro* usando como ensayo en monocapas celulares.

Consiguieron como resultado que el extracto de metanol de la *Buddleja cordata* a 50 µg/ml incrementó un 35% el cierre de herida en monocapa celular. Ninguno de los extractos evaluados en las dos especies presentó efecto citotóxico; tampoco se inhibió el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

## **Antecedentes Históricos o Epistemológicos**

Durante la evolución y la historia de la humanidad las plantas han sido utilizadas de numerosas maneras, siendo la parte medicinal y curativa una de las más emblemáticas, ya que desde los orígenes el hombre ha empleado las diferentes propiedades de las plantas para su beneficio. El tratamiento de las enfermedades del ser humano comenzó probablemente, en el íntimo contacto con la naturaleza, con la observación de las costumbres de los animales y con la experiencia acumulada tras la ingestión accidental o provocada de algunas especies vegetales, naciendo así de esta manera un conocimiento empírico sobre la utilización de las plantas de forma medicinal (Artexe, 2000).

Este conocimiento ha ido evolucionando a través de la historia, donde podemos evidenciar su transformación y sus usos curativos empleados por el hombre. El discernimiento sobre las plantas medicinales y sus propiedades se ha ido transmitiendo en las distintas culturas a través del tiempo, logrando así mantenerse de generación en generación, permitiendo que no se pierda el saber adquirido con los años. Esta información ha sido la base de gran parte de la medicina tradicional y es considerada un patrimonio de la humanidad (Artexe, 2000).

Existen reseñas o puntos de la historia que nos demuestran estas teorías, como es el caso de la medicina tradicional China y asiática que data el uso de la flora medicinal con una antigüedad de unos 10.000 años. Entre los textos más antiguos figura el Pen Tsao (año 2.800 a.C.) que cita plantas conocidas como el alcanfor o el ginseng. El famoso papiro de Ebers, del año 1.700 a.C, cita aproximadamente 700 plantas utilizadas con fines medicinales. Los libros sagrados indios vedas, mencionan el tratamiento con plantas curativas autóctonas de ese país, como método de sanación a varias enfermedades (Cruz, 2007).

Así también, en la literatura podemos evidenciar registros del uso de plantas medicinales como en las epopeyas de Homero, La Ilíada y La Odisea, escritas alrededor del año 800 a.C, donde hacen referencia a 63 especies de plantas de la farmacoterapia minoica, micénica y asiria egipcia (Cruz, 2007).

En la actualidad la ciencia moderna ha realizado numerosas investigaciones donde se ha encontrado que las plantas tienen una habilidad casi sin límites de sintetizar compuestos químicos, que en muchos casos les sirven como mecanismos de defensa contra microorganismos, insectos y herbívoros. Atendiendo a esto, el hombre ha dirigido sus investigaciones a la identificación y aislamiento de estas sustancias que tienen actividad antimicrobiana y ha logrado probar que un gran número de especies vegetales inhiben el crecimiento de bacterias resistentes a numerosos antibióticos y hongos patógenos para el hombre (Castillo, 2014).

## **Antecedentes Teóricos**

### **Familia Scrophulariaceae**

#### **Historia Taxonómica**

Según Ortega y Devesa, 1993, la primera referencia al nombre *Scrophularia* es prelinneana y se debe a Matthaeus Silvaticus, quien en su libro “Liber pandetarum medicinae” (Un libro de medicina pandetas) en el año 1492, empleó dicho término para referirse a una planta curativa contra las “escrófulas”. Luego en 1565, Pietro Matthioli publicó una lámina de *Scrophularia nodosa* y comentó acerca de sus propiedades curativas. Gaspard Bauhin mencionó seis especies en su publicación titulada “Pinax Theatri Botanici” (Pinax del teatro botánico) en el año 1623, estas especies más tarde recibieron denominaciones binominales por parte de Carlos

Linneo. Joseph Tournefort en el año 1700, reconoció el género en su publicación “Institutiones Rei Herbariae” (Instituciones de herboristería), más tarde Carlos Linneo lo ratificó en el año 1754, describiendo diferentes géneros botánicos en su publicación “Species plantarum”, siendo doce especies de Scrophularia, a las que añadiría dos más en la décima edición de su “Systema Naturae”.

### **Aspectos botánicos**

Aizpuru, Aceguinolaza, Uribe-Eche-Barria, Urritia, y Zorrakin , 1999 afirman que son una familia de plantas, que comprenden entre 200 géneros y 3000 especies. Son plantas herbáceas, arbustos y algunas especies arbóreas cuentan con hojas simples y sin estípulas, flores con 4-5 pétalos soldados en una corola de morfología muy diversa: puede ser zigomorfa bilabiada, tubulosa, en ocasiones con un espolón, o regular, el cáliz está formado por 5 sépalos soldados en la base, androceo de 2-5 estambres insertos en la corola; gineceo súpero, el fruto de tipo cápsula o baya, las semillas con testa ornamentada, a veces con alas para su dispersión por el viento.

### **Distribución Geográfica**

Tiene una distribución casi cosmopolita, pero es más diversa en las zonas templadas y en las montañas tropicales. Algunas de sus especies son plantas ornamentales, medicinales o parásitas

La distribución geográfica de la familia Scrophulariaceae varía según los géneros y las especies. Algunos tienen una amplia distribución, como Verbascum, que se encuentra en Europa, Asia y África; otros son endémicos de ciertas regiones, como Calceolaria, que es nativa de América del Sur. En México, se han registrado 446 especies de Scrophulariaceae, repartidas en

63 géneros y 12 tribus. En Argentina, hay 37 géneros y 158 especies, de las cuales 6 son endémicas (Ortegas y Devesa, 1993).

### **Clasificación taxonómica de la familia Scrophulariaceae:**

Según Ortegas y Devesa, 1993 la familia Scrophulariaceae es un grupo de plantas que comprende entre 220 y 300 géneros y unas 4000 a 4500 especies, según la interpretación taxonómica.

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub clase: Asteraide

Orden: Scrophulariales

Familia: Scrophulariaceae (Aizpuru y cols., 1999)

### **Géneros de la familia Scrophulariaceae:**

La familia Scrophulariaceae está representada por más de 100 géneros y 3000 especies. A continuación, se mencionan los géneros con el mayor número de especies: *Verbascum* (360), *Eremophila* (215), *Scrophularia* (200), *Selago* (190), *Buddleja* (125), *Manulea* (75), *Diascia* (70), *Nemesia* (65), *Zaluzianskya* (55), *Sutera* (50). En Argentina viven 18 especies, repartidas en los géneros *Buddleja*, *Capraria* y *Verbascum*, de los cuales, el primero tiene 15 especies nativas y una endémica; el segundo una nativa y el tercero 2 especies adventicias o introducidas, respectivamente (Zuloaga, Morrone, Belgrano 2008).

Según el estudio realizado por Ghorbani, Langenberger, Sauerborn. (2017), analizaron 118 especies pertenecientes a 34 géneros de esta familia y registraron cerca de 1039 fitoquímicos diferentes, de los cuales 691 eran exclusivos de esta familia. Los géneros con mayor diversidad química fueron *Scrophularia*, *Verbascum*, *Buddleja* y *Rehmannia*. Los tipos de fitoquímicos más abundantes fueron los iridoides, los fenilpropanoides y los flavonoides.

## **Género *Buddleja***

### **Historia taxonómica**

*Buddleja*, es un género reconocido por Linneo desde el siglo XVIII, ubicado dentro de la familia Scrophulariaceae por Bentham en el año 1846. Solereder en 1895, clasifica a *Buddleja*, en la familia Loganiaceae; en esta familia se incluyen géneros con hojas dentadas glandulares y tallos sin floema intraxilemático con corcho de origen en el periciclo. Posteriormente Wilhelm en 1910 y Hutchinson en 1973 separan a *Buddleja*, de Loganiaceae por el tipo de polen y tricomas. Para el año 1975, Dahlgren ubica a *Buddleja* en la familia Buddlejaceae, pero en el orden Gentianales por contener iridoides. Cronquist en 1981, reconoce a Buddlejaceae dentro de los Scrophulariales y más recientemente otros autores como Carlquist en 1992, Struwe y Albert en 1992 sugieren, con base a los caracteres embriológicos y xilemáticos, remover a Buddlejaceae del orden Gentianales, para luego por sus caracteres moleculares confirmar su ubicación en el orden Scrophulariales (Aguilar y Terrazas, 2001).

### **Aspectos botánicos:**

Generalmente son árboles o arbustos con hojas opuestas, flores hermafroditas, con cáliz y corola soldados, formados normalmente por 5 piezas, corola de campanulada a embudada, androceo con 4-5 estambres y gineceo súpero, con dos cavidades, fruto en cápsula, raramente carnoso e indehiscente. Su distribución es tropical y subtropical; incluye unas 150 especies. En ocasiones este género es tratado como una subfamilia de las Loganiaceae (Gutiérrez y cols., 2020).

### **Distribución geográfica**

El género *Buddleja*, tiene más de 100 especies, muchas de ellas están distribuidas en regiones mediterráneas y asiáticas. Alrededor de 50 especies

de *Buddleja*, son autóctonas de América, desde el sur de los Estados Unidos hasta Argentina y Chile. El 50 % de estas especies se encuentran en Perú, se distribuye en la Cordillera de Los Andes, creciendo en eco regiones cuya distribución está comprendida entre 1400 a 4500 msnm (Gutierrez y cols., 2020)

**Clasificación taxonómica del género *Buddleja*:**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteraide

Orden: Scrophulariales

Familia: Scrophulariaceae

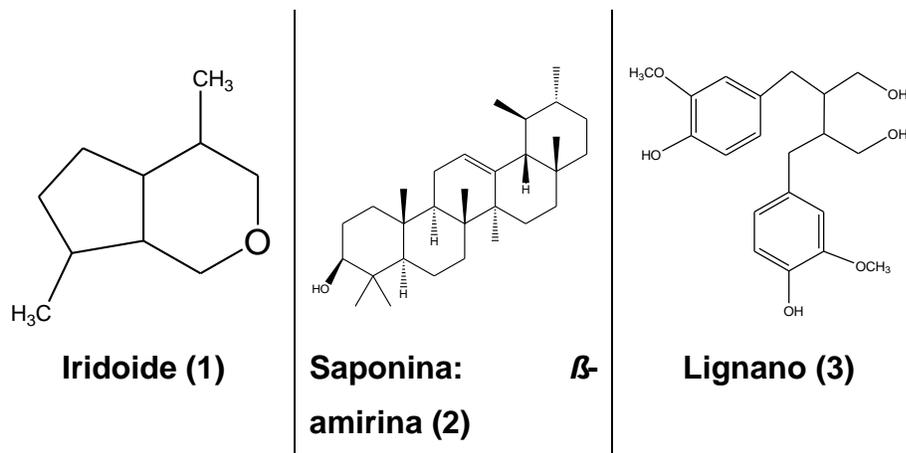
Tribu: Buddlejeae

Género: *Buddleja* (Aizpuru y cols., 1999).

**Metabolitos aislados:**

Estudios realizados demuestran que el género *Buddleja*, está formado por muchos constituyentes bio-activos entre los que se encuentran: iridoides, lignanos, feniletanoides, terpenoides (sesquiterpenos, di y tri terpenos), neolignanos, flavonoides, esteroides, ésteres aromáticos y varias saponinas (Figura 1). Muchas de estas sustancias muestran diversos biopotenciales (Khan y cols., 2019).

**Figura 1: Estructuras químicas de Iridoide (1), Saponinas (2) y Esteres aromáticos- Lignano (3)**



**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023.

**Propiedades medicinales:**

Tradicionalmente, se ha informado que las especies del género *Buddleja* se utilizan para el tratamiento de enfermedades hepáticas posiblemente por los lignanos presentes en la fracción polar, también se utiliza en afecciones bronquiales, reumáticas y manejo del dolor seguramente por el efecto antiinflamatorio que varias especies de *Buddleja* han demostrado por intermedio de la inhibición de mediadores inflamatorios como las lipooxigenasa y ciclooxigenasa, y así como también actividades antimicrobianas (Pardo, Perich, Villarroel y Torres,1993) y antimicóticas a través de los sesquiterpenos presentes en algunas especies de *Buddleja* (Ali, Idbal, Naz, Malik, 2011) y propiedades antioxidantes (Khan y cols., 2019).

## **Especie *Buddleja americana***

La especie *Buddleja americana* es una especie de arbusto que pertenece a la familia de las Scrophulariaceae. Es originaria de América, desde México hasta Bolivia, y también se encuentra en algunas islas del Caribe y las Galápagos. Tiene hojas lanceoladas, elípticas u ovado-lanceoladas, de color verde oscuro por el haz y blanco tomentoso por el envés. Sus flores son pequeñas, de color amarillo y blanco, y se agrupan en inflorescencias terminales de forma cilíndrica o cónica (Pérez y Condit, 2023).

### **Actividad Etnobotánica y Farmacológica de *Buddleja americana***

Su uso etnomedicinal se basa en sus propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, antifúngicas, analgésicas y antioxidantes, que se atribuyen a sus componentes fitoquímicos. En México, se utiliza para tratar problemas dermatológicos como ronchas, granos, heridas e inflamación de la piel. En general, se emplean las hojas en cocción y se aplican compresas en la zona afectada o bien, se administra de manera oral en caso de ronchas; también se utiliza en trastornos digestivos como dolor de estómago, espasmos, infecciones estomacales, males gástricos y en afecciones como úlcera. En Bolivia, se ha descrito el uso de sus hojas para el tratamiento de heridas infectadas y como emplasto antirreumático. También la ingesta de la decocción de su corteza se ha indicado para el tratamiento de gonorrea y otras infecciones genitales. A la luz de lo poco que hoy se conoce de esta planta posiblemente estos efectos medicinales pueden atribuirse a los polifenoles, flavonoides, triterpenos, e iridiodes, que se han reportado en años recientes (Gutierrez y cols, 2020).

## **Metabolismo primario de las plantas**

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples (García, 2004). El metabolismo primario de las plantas comprende procesos químicos que deben llevar a cabo para sobrevivir y reproducirse, como son: fotosíntesis, glicólisis, ciclo del ácido cítrico, síntesis de aminoácidos, transaminación, síntesis de proteínas, enzimas y coenzimas, síntesis de materiales estructurales, duplicación del material genético, absorción de nutrientes, entre otros. Es así como los metabolitos primarios productos de estos procesos se caracterizan por tener una función metabólica directa, ser compuestos esenciales intermedios en las vías catabólica y anabólica, siendo algunos de ellos: carbohidratos, azúcares, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos o clorofilas (Pérez, 2009).

## **Metabolismo secundario de las plantas**

Las plantas son organismos autótrofos, que además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa, conocidos como metabolitos secundarios. Las rutas metabólicas secundarias son debidas al acervo genético del organismo en mayor grado que las rutas del metabolismo primario. En algunos casos, sólo son activadas durante estados particulares del crecimiento o durante períodos de condiciones adversas (déficit hídrico y nutricional, ataque, etc.). Entre los organismos que presentan metabolismo secundario se encuentran bacterias, hongos, levaduras y animales, los vegetales son los organismos con mayor actividad y riqueza de metabolismo secundario (Creus, 2004).

## **Metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios no presentan una función definida en los procesos del metabolismo primario de la planta, y además difieren también de los metabolitos primarios que ciertos grupos presentan, una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Pérez, 2009).

Algunos de estos metabolitos secundarios tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas. Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Pérez, 2009).

Estos productos del metabolismo secundario en las plantas reciben también el nombre de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas y colorantes (Pérez, 2009).

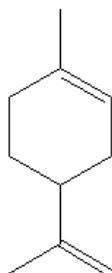
Los metabolitos secundarios se agrupan en cuatro grupos principales: terpenos, flavonoides, alcaloides y glicósidos.

**Terpenos:**

Los terpenos o también llamados terpenoides son compuestos que están constituidos por unidades de isopreno, por lo que sus estructuras se pueden dividir en unidades de cinco carbonos (Figura 2), es así como estos son clasificados de acuerdo al número de las unidades de isopreno que contienen. Los terpenos constituyen la familia más grande de productos naturales y se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, la cual ocurre en el citosol, y la ruta del metileritritol fosfato, que se encuentra en los cloroplastos (Aharoni, Jongsma y Bouwmeester, 2005).

La ruta metabólica biosintética de los isoprenoides genera metabolitos primarios y secundarios que son de gran importancia en el crecimiento y supervivencia de las plantas. Los terpenos están a cargo de diversas funciones en las plantas, por ejemplo, son reguladores del crecimiento vegetal, forman parte de los pigmentos fotosintéticos, transportan electrones y son componentes estructurales de las membranas. Además, muchos de ellos están relacionados con la comunicación y la defensa de las plantas, pueden funcionar como atrayentes de polinizadores y dispersores de semillas, fitotoxinas competitivas, antibióticos y repelentes de herbívoros, también se pueden encontrar en numerosos aceites esenciales, resinas y ceras (Schwab, Fuchs y Huang, 2013).

**Figura 2: Estructura química de un terpeno**



**Limoneno (4)**

**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023

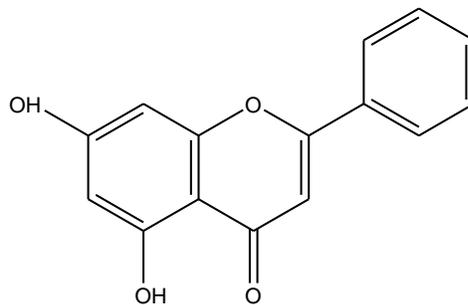
### **Flavonoides:**

Los flavonoides son un grupo de moléculas producto del metabolismo secundario de los vegetales, se originan mediante una ruta biosintética mixta. Son compuestos fenólicos, es decir, su estructura es del tipo C6-C3-C6, con dos anillos aromáticos (bencénicos) unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno (Figura 3). Están ampliamente distribuidos entre las plantas, abundan, sobre todo, en las partes aéreas y más expuestas al sol, como hojas, frutos y flores, ya que la luz solar favorece su síntesis. Estos compuestos son importantes para la planta, al igual que ocurre con la mayor parte de metabolitos secundarios, porque además de ser responsables de la coloración de muchas flores, frutos y hojas, intervienen en la polinización atrayendo a los insectos, tienen efecto antioxidante (López, 2002).

Farmacológicamente, los flavonoides destacan por su baja toxicidad, tienen efecto antioxidante, pueden inhibir la peroxidación lipídica, poseen efectos antimutagénicos y tienen la capacidad de inhibir diversas enzimas relacionadas con la funcionalidad vascular. La acción antioxidante de los flavonoides depende principalmente de su capacidad de reducir radicales

libres y quelar metales, impidiendo las reacciones catalizadoras de los radicales libres. Además de esto, los flavonoides ejercen otras acciones como: diurética, antiespasmódica, antiulcerosa gástrica y antiinflamatoria, se utilizan en proctología, metrorragias y retinopatías (López, 2002).

**Figura 3: Estructura química de un Flavonoide**



www.bdigital.ula.ve **Crisina (5)**

**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023

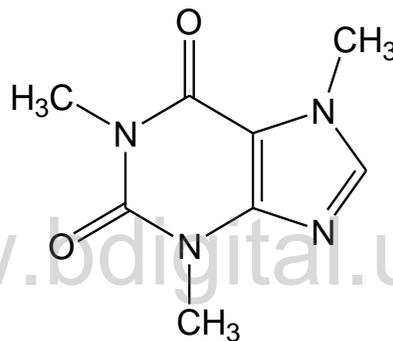
### **Alcaloides:**

Los alcaloides, son un grupo de metabolitos secundarios de las plantas, sintetizados a partir de aminoácidos, por lo tanto son compuestos nitrogenados (Figura 4). Son básicos (excepto colchicina), y poseen acción fisiológica intensa en los animales aun a bajas dosis con efectos psicoactivos, por lo que son muy usados en medicina para tratar problemas mentales y calmar el dolor. Algunos alcaloides conocidos son: la cocaína, la morfina, la atropina, la colchicina, la quinina, y la estricnina (Robinson, 1981).

Generalmente los alcaloides actúan sobre el sistema nervioso central, algunos afectan al sistema nervioso parasimpático y otros el sistema

nervioso simpático. Su actividad biológica es muy diversa, la más estudiada es la acción euforizante como la que presenta la cocaína, que actúa impidiendo la recaptación de dopamina de la terminal sináptica, lo que produce un mayor efecto de los receptores dopaminérgicos. También existen alcaloides como la morfina con efectos depresores del sistema nervioso central (Robinson, 1981).

**Figura 4: Estructura química de un Alcaloide**



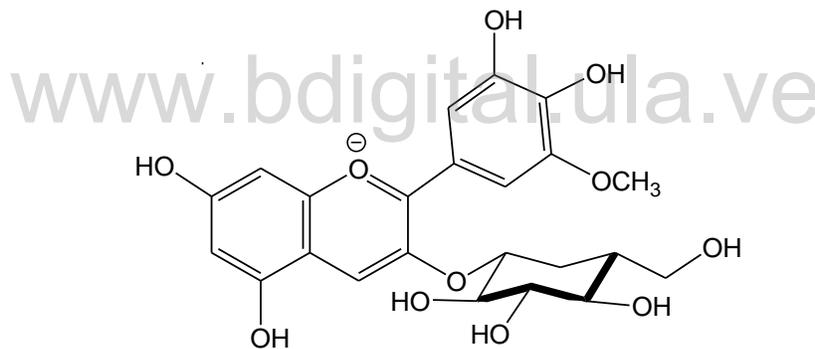
**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023

#### **Glicosidos:**

Los glicósidos son compuestos que se forman a través del metabolismo secundario en las plantas, su nombre deriva del enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo, pueden presentar diversas modificaciones estructurales que son el origen de la enorme diversidad estructural que se encuentra en esta familia de productos naturales (Figura 5). Existen tres grupos de interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogenicos (Ávalos y Pérez, 2009).

Estos compuestos poseen gran interés terapéutico e industrial, muchos glicósidos son empleados en procesos biotecnológicos o como materia prima para la síntesis de diversos fármacos, por ejemplo, en la síntesis de medicamentos esteroideos (anticonceptivos, anabolizantes, antiinflamatorios), algunos de ellos presentan gran potencial para estimular la respuesta inmune. Sus amplios campos de aplicación, y su presencia en diversas especies vegetales hacen de estos compuestos un interesante objetivo de bioprospección para el desarrollo de productos de química fina de alto valor agregado (Ferreira y Olivero, 2015).

**Figura 5: Estructura química de un Glicósido**



**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023

### **Extractos vegetales**

Son compuestos producidos a través de sustancias biológicamente activas presentes en las plantas, por el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado. De una misma planta, es posible obtener diferentes extractos o sustancias, esto depende de la parte de la planta que sea utilizada, del

solvente y de la técnica de extracción (Santamaría, Gonzales y Astorga 2015).

### **Clasificación de los extractos vegetales:**

Los extractos vegetales pueden clasificarse dependiendo del grado de concentración de solventes extractivos, algunos de ellos son:

- **Extractos Fluidos o líquidos:** son preparaciones de drogas vegetales que contienen alcohol como disolvente o como preservante, o ambos, preparados de tal manera que cada mililitro contiene los constituyentes extraídos de 1 g del material crudo que representa (Solís, De Solís, Gattuso, y Cáceres, 2003).
- **Extractos Secos:** este tipo de extractos se obtienen evaporando todo el solvente hasta que se tiene una consistencia en polvo. Son altamente estables, de fácil manipulación, y se pueden utilizar para preparar tinturas de extractos fluidos (Kuklinski, 2003).
- **Extractos Semisólidos o blandos:** son extractos que tienen una riqueza superior a la droga de partida, se obtienen evaporando el disolvente hasta obtener un producto de textura semisólida pero que a pesar de esto no moja el papel de filtro (Cañigueral, 2003).

### **Métodos de obtención de extractos vegetales:**

Los extractos vegetales se pueden obtener por procesos físicos y químicos, algunos de estos son:

- **Extracción Mecánica:** Esta técnica se realiza por expresión, que consiste en ejercer presión sobre la planta y así se obtiene un jugo, en el que se encuentra disueltos los principios activos de interés, también se la puede

hacer mediante cortes por los que caen los fluidos de la planta (Osorio, 2009).

- **Destilación:** Esta técnica se basa en la diferente volatilidad de los principios activos de la planta, lo cual permite la separación de los componentes volátiles, como son los aceites esenciales, por ejemplo, de otros que son menos o nada volátiles (Santana, 2014).
- **Extracción con fluidos supercríticos:** El proceso consiste en colocar el material vegetal molido en una cámara de acero inoxidable y hacer circular, a través de la muestra, un fluido en estado supercrítico (Sánchez, 2009).
- **Extracción con Solventes:** Este método consiste en la separación de los principios activos de la planta al ponerla en contacto con un solvente o la mezcla de ellos, capas de solubilizar dichos principios (Pérez, 2009).
- **Extracción continua o progresiva:** En la extracción continua, el solvente se va renovando o recirculando y actúa sobre la planta en una sola dirección (Sharapin, 2000). La percolación, la repercolación y el soxhlet son las técnicas que pertenecen a este grupo y se describen a continuación:
  - a) Percolación:** En este método el menstuo (alcohólico o mezcla hidroalcohólica) atraviesa la droga pulverizada en un solo sentido, la droga es bañada por nuevas proporciones de menstuo y cede todos sus componentes solubles (Sharapin, 2000).
  - b) Repercolación:** Consiste en hacer recircular el mismo solvente a través del material vegetal (Naveda, 2010).

**c) Soxhlet:** Esta técnica se centra en la extracción sólido-líquido mediante un equipo Soxhlet que tiene como función recircular los vapores condensado (Caldas, 2012).

**Extracción discontinua o simultánea:** La maceración, la infusión, la digestión y la decocción, son métodos que pertenecen a este grupo y se describen a continuación:

**a) Maceración:** es un método de extracción que se aplica a temperatura ambiente y sin exposición a la luz (Voigt, 1982). Consiste en sumergir el material vegetal, previamente troceado, en un solvente (agua, etanol o glicerina) durante 2 a 14 días, con agitaciones ocasionales. Después se separa el líquido del residuo, se evapora el solvente en un rotavapor y se obtiene el extracto (González, 2004).

**b) Infusión:** se debe colocar la planta en un recipiente con tapa que no permita la salida de los componentes activos. Luego, se le agrega agua hervida y se deja reposar entre 5 y 15 minutos (Guerra, 2005).

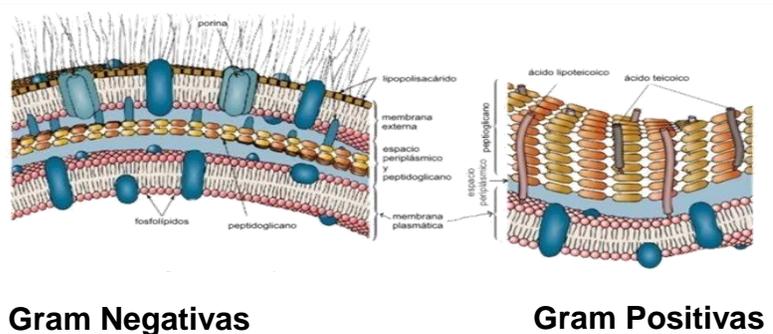
**c) Digestión:** Se aplica normalmente en algunas plantas que presentan principios activos de difícil extracción, por estar contenidos en las partes leñosas de la planta, o bien que requieren un calor prolongado (Velastegui, 2005).

**d) Decocción:** es un método de extracción de principios activos de las plantas que consiste en hervir las partes más duras (raíces, cortezas y semillas) en agua durante un tiempo determinado (entre 15 a 30 minutos). El líquido resultante contiene los compuestos solubles de la planta (Selles, Sánchez, Solan, Suiñe y Tico, 1992).

## Bacterias Gram positivas y Gram negativas

Una forma de clasificar las bacterias es según su reacción a la tinción de Gram, que depende de la composición de su pared celular (figura 6). La tinción de Gram consiste en aplicar un colorante principal (azul de metileno) y un colorante secundario (fucsina) a una muestra bacteriana. El color dependerá de la estructura de la pared celular bacteriana, que tiene más o menos peptidoglicano, un polímero formado por azúcares y aminoácidos. El peptidoglicano se une al colorante principal y al mordiente (lugol) para formar un complejo insoluble que se mantiene en las bacterias Gram positivas, tiñéndolas de color azul/purpura. Por el contrario, las bacterias Gram negativas adquieren el color rojo/fucsia del colorante secundario, ya que tienen una pared celular delgada y pobre en peptidoglicano, pero una capa externa de lípidos y proteínas que se disuelve con el alcohol, que extrae el colorante principal (Koneman, Allen, Janda, Schreckenberger, Winn, 2001).

**Figura 6: Pared celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas**



**Gram Negativas**

**Gram Positivas**

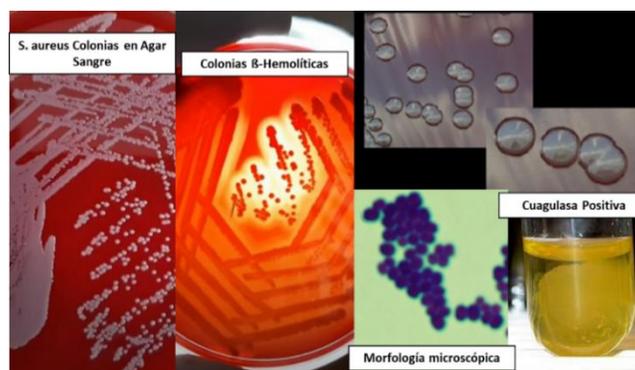
Tomado y modificado de Fernández y Paredes (1994)

## Bacterias Gram Positivas

### ***Staphylococcus aureus*:**

Bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa,  $\beta$ -hemolítica, coagulasa y catalasa positiva. Tiene forma de coco y se agrupa en racimos irregulares que recuerdan a racimos de uvas (Figura 7). Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y puede colonizar la piel y las mucosas de los seres humanos y animales. Es una de las bacterias más patógenas del género *Staphylococcus* y puede causar desde infecciones cutáneas leves hasta enfermedades graves como endocarditis o septicemia. Está involucrado en procesos infecciosos de origen nosocomial y de la comunidad, ya sea por la producción de toxinas como: Intoxicación alimentaria, síndrome de la piel escaldada, síndrome del shock tóxico. O por la inducción de la inflamación piogénica, como: Carbuncos, impétigo, foliculitis, forúnculos e infección de heridas. Otras de mayor gravedad como: Artritis séptica, empiema, osteomielitis y neumonía. Algunas cepas de *S. aureus* han desarrollado resistencia a varios antibióticos, lo que dificulta su tratamiento. *S. aureus* se distingue de otras especies de estafilococos por su capacidad de coagular el plasma y por su color dorado en los medios de cultivo (Levinson, Chin-Hong, Joyce, Nussbaum, Schwartz, 2022).

**Figura 7: *Staphylococcus aureus*.**

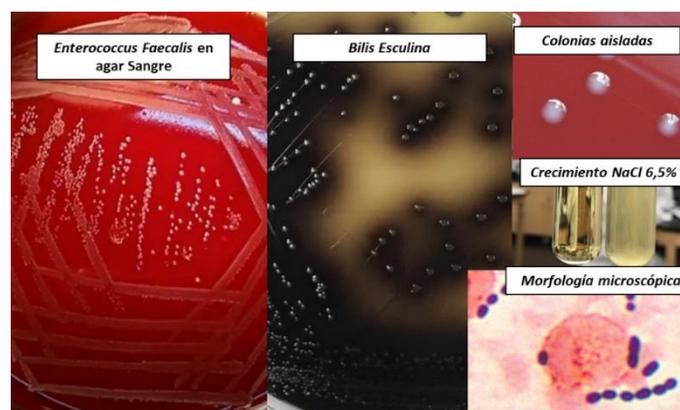


Tomado y modificado de “Atlas of Bacteria: Introduction and List of Bacteria and Related Features,” 2021

### ***Enterococcus faecalis*:**

Coco Gram positivo, anaerobio facultativo, fermentador de glucosa, no produce gas y es catalasa negativa (Figura 8), forma parte de la microbiota de las vías intestinales y biliares de humanos y otros mamíferos. Puede vivir en ambientes extremos con pH altamente alcalino de 9,6 (bilis) y elevadas concentraciones de sal. *E. faecalis* puede causar diversas infecciones en humanos, especialmente en ambiente hospitalario, siendo más susceptibles, aquellos pacientes que reciben antibióticoterapia de amplio espectro. Entre las enfermedades más frecuentes que produce se encuentran: endocarditis, infecciones urinarias e intraabdominales, prostatitis, celulitis e infecciones de las heridas, así como bacteriemias concurrentes. *E. faecalis* es resistente a muchos antibióticos, como aminoglicósidos, aztreonam, cefalosporinas, clindamicina y penicilinas semisintéticas. Algunas cepas también son resistentes a vancomicina y se denominan ERV (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

**Figura 8: *Enterococcus faecalis***



Tomado y modificado de “Atlas of Bacteria: Introduction and List of Bacteria and Related Features,” 2021

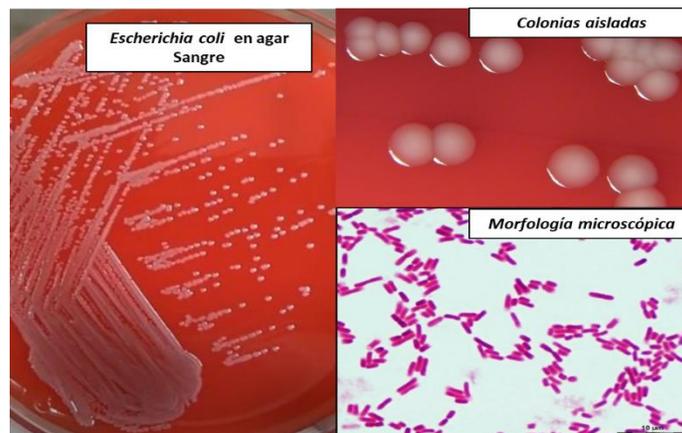
## Bacterias Gram Negativas

### *Escherichia coli*

Bacilo Gram negativo, al microscopio se observa de forma individual o en parejas, tolera ambientes de pH ácido y es móvil por flagelos peritricosos (Figura 9). Algunas cepas pueden tener fimbrias o cápsulas de polisacárido que les confieren mayor adherencia o resistencia, *E. coli* está asociado a la microbiota habitual del intestino en humanos, portándose como patógeno oportunista, cuando los intestinos se perforan y acceden a la cavidad peritoneal. Es el agente causal más común de gastroenteritis, infecciones del aparato urinario y de sepsis por bacilos Gram negativos, además, es una de las dos causas más importantes de meningitis neonatal. Es el agente más comúnmente asociado con la diarrea del viajero y las infecciones de origen nosocomial (Levinson y cols, 2022).

www.bdigital.ula.ve

**Figura 9: *Escherichia coli*.**



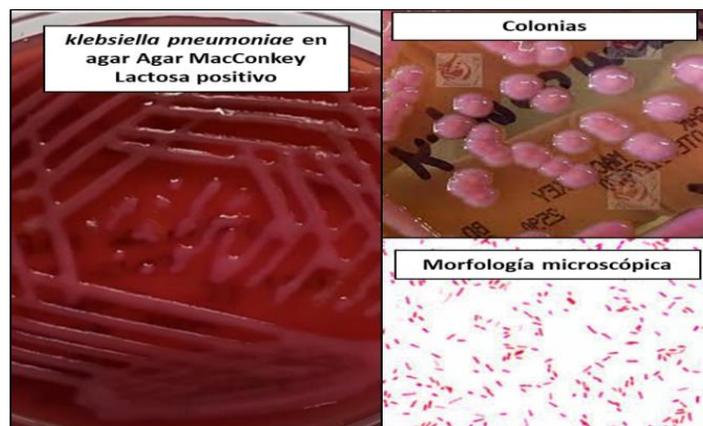
Tomado y modificado de “Atlas of Bacteria: Introduction and List of Bacteria and Related Features,” 2021

### ***Klebsiella pneumoniae*:**

Pertenece a la familia Enterobacteriaceae y al grupo de los coliformes. Bacilo Gram negativo inmóvil no flagelado. Está rodeada por una cápsula de polisacáridos que le confiere apariencia mucosa ayudándolo a evadir el sistema inmune del hospedero (Figura 10). Es una bacteria anaeróbica facultativa, fermentadora de la lactosa con producción de gas. Forma parte de la microbiota normal de la boca, piel y tracto intestinal de los humanos y otros vertebrados, sin embargo, puede causar infecciones oportunistas o cuando hay una alteración de las barreras naturales del cuerpo. Entre las enfermedades que provoca se encuentran: infecciones del tracto urinario, neumonías, sepsis, infecciones de tejidos blandos e infecciones de heridas quirúrgicas. Es capaz de adquirir fácilmente mecanismos de resistencia a múltiples fármacos, lo que dificulta su tratamiento y control (Levinson y cols., 2022).

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Figura 10: *Klebsiella pneumoniae***



Tomado y modificado de “Atlas of Bacteria: Introduction and List of Bacteria and Related Features,” 2021

### ***Pseudomonas aeruginosa*:**

Es un bacilo Gram negativo, aerobio obligado y catalasa y oxidasa positiva (figura 11). Productor de pigmento y posee un flagelo unipolar y pilis, lo que les confiere motilidad y adherencia a otras células. Es un patógeno oportunista de plantas, vegetales y humanos. Capaz de crecer en casi todos los entornos, siendo comúnmente aislado en ambientes hospitalarios de todo el mundo. Tiene muchos factores estructurales, toxinas y enzimas que potencian su virulencia que le confiere resistencia a la mayor parte de los antibióticos de uso habitual (Murray y cols, 2009).

**Figura 11: *Pseudomonas aeruginosa*.**



Tomado y modificado de "Atlas of Bacteria: Introduction and List of Bacteria and Related Features," 2021

### **Microorganismos fúngicos**

Los microorganismos fúngicos, son organismos eucariotas que pueden ser unicelulares o multicelulares. A diferencia de las plantas, no pueden realizar la fotosíntesis y necesitan alimentarse de compuestos orgánicos. La estructura de la pared celular de los hongos es similar entre ellos compartiendo un carbohidrato en común, la Quitina. Los hongos pueden

causar infecciones en humanos, animales y plantas. La OMS ha publicado una lista de patógenos fúngicos prioritarios, que incluye *Cryptococcus neoformans*, *Candida auris*, *Aspergillus fumigatus* y *Candida albicans*, entre otros. Los factores de virulencia de los hongos patógenos incluyen las adhesinas y la conversión morfogénica del microorganismo (Bonifaz, 2015).

### **Género *Candida*:**

El género *Candida*, pertenece al filo Ascomycota y se reproduce de forma asexual por gemación. En agar Sabouraud, crece formando colonias blancas, blandas, cremosas y lisas (Figura 12) Este género representa los patógenos fúngicos oportunistas más frecuente a nivel mundial. Actualmente se sabe que estos microorganismos colonizan la mucosa digestiva y pasan al torrente circulatorio para invadir tejidos profundos de distintos órganos diana, como el hígado, el bazo, el riñón, el corazón y el cerebro (Bonifaz, 2015).

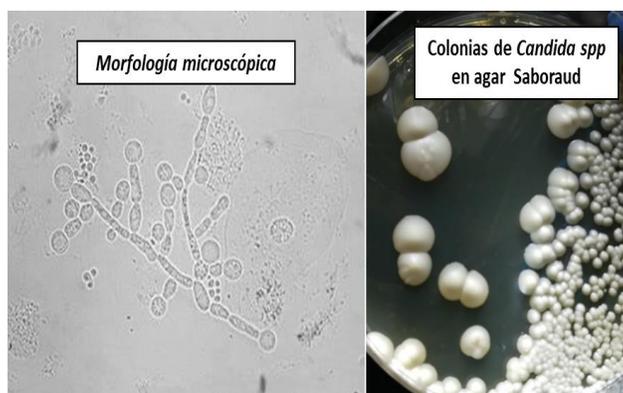
Entre las características del microorganismo que podrían contribuir a su potencial patogénico se encuentran la capacidad de adhesión a tejidos, el dimorfismo levadura-micelio, la hidrofobicidad de su superficie celular, la secreción de proteinasas, y el cambio de fenotipo. Se han descrito más de 100 especies del género *Candida*, aunque tan sólo un pequeño número de ellas se ha implicado en infecciones clínicas. *C. albicans* es la especie aislada con mayor frecuencia a partir de muestras clínicas, otras especies de *Candida*, como *C. glabrata*, *C. krusei* y *C. tropicalis*, también pueden causar infecciones en humanos, especialmente en pacientes inmunocomprometidos o en aquellos que han sido sometidos a tratamientos médicos invasivos (Bonifaz, 2015).

***Candida albicans*:** Se caracteriza por formar colonias extendidas con una superficie blanquecina-amarillenta y un aspecto de grano de arroz, al microscopio. *C. albicans* tiene la capacidad de cambiar su forma entre levadura y hifa (dimorfismo), lo que le permite adaptarse a diferentes condiciones

ambientales y escapar de las defensas del hospedador. Puede producir micotoxinas o compuestos cancerígenos que afectan a la salud. Las infecciones micóticas producidas por las levaduras del género *Candida*, especialmente por *Candida albicans*, son complicaciones importantes en los pacientes inmunosuprimidos. Las tasas de morbilidad y mortalidad de estas infecciones se han incrementado considerablemente durante las últimas dos décadas. Frecuentemente, la candidosis de las mucosas (oral, gastrointestinal y vaginal), es el primer signo del deterioro de la función inmunológica (Bonifaz, 2015).

***Candida krusei***: Es otra especie de hongo del género *Candida* que puede causar infecciones en personas inmunodeprimidas o con neoplasias hematológicas. Algunos de los aspectos más importantes de este hongo son: Es un patógeno nosocomial que tiene resistencia natural al fluconazol, su tratamiento se realiza con voriconazol, anfotericina B o equinocandinas, pero puede presentar resistencia a algunos de ellos. Su nombre anamórfico es *Candida krusei* y su nombre teleomórfico es *Pichia kudriavzevii*. Su diagnóstico se basa en la observación de las lesiones, cultivos especiales con adición de sustratos cromogénicos y el análisis molecular (Jamiu, Albertyn, Sebolai, Pohl 2021).

**Figura 12: *Candida***



Tomado y modificado de Villacís, Ávila, Marly y Silverio (2020).

### **Técnicas para la Determinación de la Actividad Antimicrobiana**

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana son técnicas esenciales en la investigación y los resultados pueden variar dependiendo de una gran cantidad de factores involucrados en el desarrollo de las mismas (Bakht, Humaira, Madiha y Ihsan, 2015). Desde la selección de las plantas, el tipo de extracción, la elección de bioensayos apropiados, detalles como la cantidad de inóculo y técnica utilizada para la determinación de la actividad, pueden influir en los resultados de manera determinante. Los métodos antimicrobianos y antifúngicos, están clasificados en tres grupos principales: difusión, dilución y métodos bioautográficos (Ramírez y Marín, 2009).

Las técnicas de difusión han sido ampliamente empleadas para evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de plantas. En general, se recomienda el uso de métodos de difusión, ya sea en papel o en pozo, para estudiar compuestos polares, mientras que los métodos de dilución se utilizan para sustancias polares y no polares (Ramírez y Martin, 2009).

Los ensayos de sensibilidad deben estar estandarizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad. Y aunque no existe una reglamentación y/o estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de los extractos de plantas, como está establecido para los antibióticos, la mayoría de los métodos están basados en los utilizados para evaluar la resistencia y/o susceptibilidad a antibióticos. Los métodos para evaluar la actividad de extractos sobre bacterias y levaduras suelen ser similares, variando la preparación del inóculo, medio de cultivo, temperatura y el tiempo de incubación (Bakht y cols., 2015).

### **Método de Difusión en Disco (Kirby-Bauer)**

En el método de Kirby Bauer, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35-37 °C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al microorganismo en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos, por ejemplo, el Comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (CLSI) (Pedrique, 2002).

## **Método Modificado de Pozos de Agar**

Es un método cualitativo utilizado para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas. Consiste en crear pozos con un sacabocados estéril de 6 mm en una placa de agar que ha sido inoculada previamente con el microorganismo de interés, en cada pozo se deposita de 10 a 25  $\mu\text{L}$  de los extractos, más estándares (control positivo y negativo) y blanco por triplicado, se deja reposar y finalmente se incuba  $35\pm 2$  °C por 24 h para bacterias y a  $29\pm 2$  °C por 48 h en caso de levaduras. El extracto se difunde en el agar y, si tiene actividad antimicrobiana, inhibirá el crecimiento del microorganismo alrededor del pocillo, creando una zona clara de inhibición. El tamaño de la zona de inhibición se mide y se usa para determinar la potencia del extracto. Este método se recomienda para microorganismos que no son exigentes y tienen una tasa de crecimiento rápida (Sánchez, Loruhamá y García, 2016).

## **Métodos de Dilución**

Estos métodos son apropiados para la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana. En esta técnica una cantidad de extracto de planta o compuesto activo, es mezclado con una cantidad de medio de cultivo. Puede ser llevado a cabo tanto en medio sólido como en medio líquido. La concentración final deseada debe ser considerada en peso/volumen (p/v) o volumen/volumen (v/v) con respecto al medio de cultivo (Ramírez y Marín, 2009).

### **Dilución en Agar**

En este método, el agar es mezclado con una cantidad de extracto de planta o compuesto activo para obtener una concentración final con el medio. Para este método, la concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como

la menor concentración capaz de inhibir al microorganismo y por lo tanto no hay crecimiento visible. La desventaja de este método radica en la gran cantidad de medio que se coloca en la placa Petri regular (23 mL aprox) por lo que se requiere gran cantidad de extracto y/o compuesto. Para contrarrestar esto, pueden utilizarse placas pequeñas o placas de tres divisiones sembrando 100  $\mu$ L de cultivo microbiano, esto con el fin de utilizar menor cantidad de agar y extracto (Sanchez y cols, 2016). También puede sembrarse por goteo mediante el método de Miles y Misra con lo que podrían sembrarse en una misma placa, cepas diferentes (Ramírez y Marín, 2009).

#### **Dilución en medio líquido:**

En el caso de dilución en medio de cultivo líquido (dilución en caldo), se procederá de la misma forma descrita anteriormente para obtener una concentración final del extracto en el medio, sin embargo, la interpretación de los resultados se realiza por turbidimetría e indicadores de óxido reducción REDOX, que son utilizados generalmente para la determinación del crecimiento/viabilidad microbiana. Para este tipo de técnicas se requiere un espectrofotómetro en el cual se realizan lecturas a una densidad óptica (DO) de 600 nm para la determinación de crecimiento microbiano y de 540-570 nm cuando se utiliza REDOX. Las desventajas de la turbidimetría se presentan en aquellos compuestos no solubles que pudieran interferir con la lectura. Es por ello que es de suma importancia utilizar un control de crecimiento (medio de cultivo y microorganismo sin adición de compuesto o extracto) así como un blanco que contenga medio de cultivo y el compuesto en cuestión sin adición del microorganismo (Ramírez y Marín, 2009).

La CMI se considera aquella concentración en la que no haya viabilidad por lo tanto no hay cambio de color. El método de dilución en medio líquido permite también determinar efecto bacteriostático o bactericida. Para hacer esta determinación se debe realizar un conteo en placa antes y después de

la incubación, mediante la utilización de diluciones seriadas (1:10) en tubos con 9 mL de solución salina al 0,85 %. Posteriormente se adiciona 1 mL del cultivo y se va diluyendo en serie pasando 1 mL del tubo anterior al tubo nuevo las veces que se desee. Para determinar si el efecto del extracto o compuesto en cuestión es bacteriostático o bactericida, se toma en cuenta el conteo en placa obtenido. Para considerarse bactericida, no debe haber crecimiento en el cultivo, mientras que, al obtener un crecimiento igual al inóculo inicial, se considera bacteriostático (Ramírez y Marín, 2009).

Los métodos de dilución en caldo son métodos que han permitido determinar la CMI de una gran cantidad de compuestos. Las ventajas de estos métodos sobre la difusión son la sensibilidad y reproducibilidad, además de ser utilizados para una gran cantidad de microorganismos. Uno de los medios que se recomienda para este tipo de ensayos es el Müeller Hinton (MH) para aquellos microorganismos que no se consideran fastidiosos, también el Soya Tripticasa junto con el agar nutritivo, podrían considerarse para estos microorganismos. Hay que considerar los factores que pudiesen generar variaciones en el resultado, entre ellos el inóculo. Se recomienda un inóculo de  $10^5$  UFC para bacterias y de  $10^4$  UFC para levaduras. Un inóculo muy bajo dará falsos positivos, mientras que uno alto dará falsos negativos (Ramírez y Marín, 2009).

## **Definición Operacional de Términos**

### **Producto Natural**

Se define “producto natural” o “metabolito secundario”, como propio de una especie, se le conoce también como producto químico y en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza, a diferencia los metabolitos primarios o productos bioquímicos presentan una

utilidad definida y que son comunes a todos los seres vivos: carbohidratos, lípidos, proteínas, etc (Marcano y Hasegawa, 2002).

### **Fitoquímico**

Los fitoquímicos son compuestos químicos producidos por las plantas que generalmente juegan un papel en su crecimiento y defensa contra competidores, patógenos, depredadores y radiación ultravioleta, además de entregarles colores y sabores a frutas y verduras. Son sustancias biológicamente activas, pero no son nutrientes esenciales para la vida (Gasaly, Riveros, y Gotteland, 2020).

### **Tamizaje Fitoquímico**

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe permitir el análisis rápido, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente en una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del *screening* farmacológico (Sharapin, 2000).

## **Bacterias**

Son microorganismos unicelulares, procariotas que se reproducen por fisión binaria. Son los organismos celulares más pequeños descritos hasta ahora y solo pueden ser visualizados a través de un microscopio. Las bacterias se identifican según su aspecto macroscópico y microscópico, sus propiedades metabólicas, antigenicidad y genotipo (Murray., y cols 2009).

## **Antibióticos**

Los antibióticos son sustancias que incluso en pequeñas concentraciones inhiben el crecimiento y la multiplicación de bacterias y hongos. Son compuestos relativamente sencillos producidos por bacterias, hongos o de origen sintético, que atacan específicamente a estos microorganismos, Interfiriendo en algún paso del metabolismo donde encuentran un blanco de acción (Sánchez y cols., 2016).

## **Antibacteriano**

Los antibacterianos son producidos por la fermentación de mohos (antibióticos) o son sintetizados químicamente. Tienen dos tipos de actuaciones, matan a las bacterias, en cuyo caso se llaman bactericidas, o inhiben la multiplicación bacteriana, llamándose bacteriostáticos (Sánchez, 2016).

## **Hongos**

Son organismos heterótrofos, pertenecientes al reino Fungi. Los hongos pueden ser unicelulares, como las levaduras, o multicelulares, como los hongos filamentosos. Estos organismos también tienen múltiples beneficios, algunos de ellos en la alimentación y salud, al ser usados en

procesos fermentativos de índole industrial, producción de antibióticos, enzimas, hormonas, vitaminas y ácidos orgánicos (Cortes y Mosqueda, 2013).

### Operacionalización de las Variables

Para operacionalizar el sistema de variables o el evento de estudio con el respectivo criterio de análisis, es necesario la definición conceptual y operacional de las mismas (Hurtado, 2015). En tal sentido, las variables se operacionalizan con la finalidad de identificar los elementos y datos empíricos que expresan su presencia. En esta investigación las variables (discretas) admiten valores intermedios, por lo tanto, los indicadores derivarán de las bases teóricas. El proceso de la operacionalización de las variables garantizará que los objetivos propuestos sean alcanzados (Tabla 1-2)

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Tabla 1. Operacionalización de la variable dependiente:** Actividad antimicrobiana de los extractos de *Buddleja americana*.

Variable	Tipo de Variable	Definición conceptual
Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>Buddleja americana</i>	Dependiente Cuantitativa	Es la capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de una población microbiana o para eliminarla, y que se puede expresar cuantitativamente con pruebas <i>in vitro</i> (Ramírez y Marín, 2009).
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
-Método de difusión en Disco (Kirby-Baüer).	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Escherichia</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Klebsiella pneumoniae</i> - <i>Candida albicans</i> y <i>C. krusei</i>	-Sensible -Sensibilidad Intermedia -Resistente -Presencia o ausencia del halo de inhibición frente a bacterias y hongos

**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023

**Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente:** Análisis fitoquímico de los extractos de *Buddleja americana*

Variable	Tipo de Variable	Definición conceptual
Análisis fitoquímico de los extractos de <i>Buddleja americana</i>	Independiente Cualitativa Discreta	Comprende el estudio de metabolitos secundarios presentes en especies vegetales (Ramírez y Marín, 2009)
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Tamizaje fitoquímico.	<b>1. Alcaloides:</b> Reacciones de Dragendorff, Wagner y Mayer.	Aparición de turbidez o precipitados
	<b>2. Esteroles y/o triterpenos:</b> Reacción de Lieberman Bouchard.	Esteroles: coloración azul o verde. triterpenos.; coloración es rosa, rojo, magenta o violeta
	<b>3. Saponinas:</b> prueba de espuma	Formación de abundante espuma,
	<b>4. Compuestos fenólicos simples:</b> con tricloruro férrico.	Coloración de azul a negro.
	<b>5. Taninos:</b> prueba de gelatina	Presencia de precipitado blanco
	<b>6. Flavonoides:</b> Reacción de Shinoda y NaOH 10%	Flavonas: naranja a rojo. Flavonoles; rojo. Flavononas: magenta
	<b>7. Quinonas y Antraquinonas:</b> con hidróxido de amonio y ácido sulfúrico roja. Concentrado respectivamente	Presencia de coloración roja.
	<b>8. Cumarinas:</b> Hidróxido de amonio.	La presencia de fluorescencia azul-violeta
	<b>9. Glicósidos cardiotónicos:</b> Ensayo de Kedde	coloración púrpura o violácea
	<b>10. Lactonas Sesquiterpenlactonas:</b> con Hidroximato férrico	Las coloraciones roja, violeta o rosa.

**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023

## Hipótesis

Investigaciones previas reportan la presencia de metabolitos secundarios en varios extractos del género *Buddleja* al igual que diversas actividades biológicas, por lo que es posible que el extracto etanólico de las hojas de la especie *B. americana* tenga actividad antimicrobiana frente a cepas ATCC de bacterias Gram positivas, Gram negativas y especies de *Candida albicans* y *C. krusei*.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPÍTULO III

### MARCO METODOLÓGICO

#### Tipo de Investigación

Un tipo particular de investigación se deriva del objetivo, pues se relaciona con la profundidad y el tipo de resultado, y mantiene concordancia con el logro general de la investigación. Cada tipo de investigación tiene características y procesos propios. Pueden ser de tipo exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa (Hurtado, 2015). La presente investigación es de tipo confirmatoria, la cual busca verificar hipótesis derivadas de teorías e indagar acerca de la posible relación causa–efecto entre la composición química de los extractos de *Buddleja americana* y la actividad antimicrobiana frente a diferentes bacterias y levaduras.

#### Diseño de Investigación

Arias (2006), refiere que: “El diseño de investigación es la estrategia general que adopta el investigador para responder al problema planteado. En atención al diseño, la investigación se clasifica en: documental, de campo y experimental”. Adicionalmente, Hurtado (2015) señala que el diseño de investigación en relación con el procedimiento. Específicamente, se refiere a la amplitud de la información, la perspectiva temporal y la fuente de información. En consecuencia, la pregunta de investigación fue respondida de la manera más idónea posible.

De acuerdo con lo antes expuesto, esta investigación posee un diseño de campo, experimental y de laboratorio, ya que la especie vegetal fue recolectada en su hábitat natural y tratada en un ambiente creado como el del Laboratorio de Química de Productos Naturales “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”, del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes (ULA).

## **Población y Muestra**

### **Unidad de Investigación**

En términos de investigación, la población se refiere al conjunto de elementos que se desea estudiar. Por otro lado, la muestra es un subconjunto representativo de la población o universo en cuestión (Palella y Martins, 2003). En este caso, la unidad de investigación fue la especie *Buddleja americana*, la cual se recolectó en el Municipio Libertador del Estado Mérida para su análisis.

### **Selección del Tamaño de la muestra**

La “n” muestral está representada por las hojas de la especie a estudiar *Buddleja americana*. El tipo de muestra utilizada fue no probabilística, respecto a que la elección de los elementos no depende de la probabilidad, sino de causas relacionadas con las características de la investigación o de quien hace la muestra (Hernández, Fernández y Baptista, 2010).

## **Sistema de Variables**

En esta investigación se han categorizado las variables en dos tipos: La variable dependiente, que está relacionada con la actividad antimicrobiana y su dependencia de los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos de la especie en estudio. Por otro lado, se encuentra la variable independiente, correspondiente a la caracterización química de los extractos obtenidos de las hojas de *Buddleja americana*.

## **Instrumento de recolección de datos**

En la investigación, se utilizaron recursos que permitieron a los investigadores acercarse a los fenómenos del evento de estudio. Se emplearon tablas para clasificar las variables de estudio y se realizó observación directa para identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto de las hojas de *Buddleja americana*. También se realizaron para las pruebas de susceptibilidad que permitieron clasificar a los microorganismos como sensibles o resistentes frente a los extractos obtenidos de las hojas, observando la presencia de halos de inhibición.

## **Procedimientos de la Investigación**

### **Recolección de la planta y preparación del material vegetal**

La planta fue recolectada en el jardín de plantas medicinales Doctor Luis Ruiz Terán, ubicado en la facultad de Farmacia y Bioanálisis, su identificación botánica se realizó en el herbario MERF.

### **Obtención de los extractos de hexano y etanol de *Buddleja americana* por la técnica de reflujo en caliente**

En primer lugar, se llevó el material vegetal (hojas) con un peso de 53,77 g a una estufa a 40 °C hasta total sequedad, se trituró con un mortero y se agregaron a un balón. Posteriormente se llevó a cabo el ensamblaje del equipo de extracción (Figura 13), se agregaron 500 mL de solvente, utilizando hexano y etanol para obtener los extractos por separados de cada uno. Se conectó el equipo a una manta eléctrica y se mantuvo a una temperatura de 45 °C para el extracto de hexano y 40 °C para el extracto de etanol durante una hora. Se dejó enfriar durante unos minutos y se filtró en un matraz utilizando un embudo y papel filtro. (Figura 14). Este proceso se realizó en el Laboratorio “A” de productos naturales del IIFFB, bajo la asesoría de la Dra. Rosa Aparicio y la colaboración del técnico Emilio Salazar y la Br. Bianne Briceño.



**Elaborado por:** Arellano, Perez y Cordero, 2023

**Figura 13.** Extracción por reflujo en caliente

**Figura 14.** Filtrado de los extractos



**Elaborado por** Arellano, Perez y Cordero, 2023

### **Concentración de los extractos con el Rotavapor**

Se llenó hasta la mitad un matraz de fondo redondo con los extractos anteriormente filtrados. El matraz se conectó a un rotavapor digital, el baño maría del rotavapor se calentó a una temperatura adecuada para evaporar el solvente y se activó el equipo. Se bajó el montaje hasta que tocó el baño de maría y se destiló el contenido. Posteriormente, se desmontó el equipo y se transfirió el contenido remanente del matraz a un frasco ámbar. Este procedimiento se repitió para ambos extractos (Figura 15).

**Figura 15.** Concentración de los extractos.



**Elaborado por:** Arellano, Perez y Cordero, 2023

## Determinación del perfil fitoquímico de los extractos de hexano y etanol de *Buddleja americana*

Los extractos fueron sometidos a un tamizaje fitoquímico cualitativo para identificar los metabolitos secundarios presentes. Esta prueba consiste en someter los extractos a diferentes reacciones químicas, descritas a continuación.

- 1. Alcaloides:** En tres tubos se disolvieron de 1-2 mg de la muestra del extracto etanólico en 5 mL de ácido clorhídrico (HCl) al 10 %, se llevó a calentamiento en baño de María por 1 hora, se dejó enfriar y luego se filtró la muestra. Posteriormente se dividió el filtrado (1,0 mL) en 3 tubos de ensayo identificados para cada reactivo.
  - **Prueba de Dragendorff:** Se agregó gotas de sales de metales pesados como el ioduro de potasio al tubo identificado como “D”, La prueba es positiva si se aprecia un precipitado de color naranja. Es positivo si hay opalescencia (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++).
  - **Prueba de Mayer:** Se agregó yoduro de potasio y mercurio al tubo identificado como “M”, La prueba es positiva si se aprecia un precipitado de color blanco.
  - **Prueba de Wagner:** Se agregó Reactivo de Wagner (sol de yoduro de potasio) al tubo identificado como “W”, La prueba es positiva si se aprecia un precipitado de color pardo rojizo (Silva, 2022).

## 2. Triterpenos/esteroles:

- **Ensayo de Liberman-Burchard.** Se disolvieron cada uno de los extractos en 10 mL de cloroformo; a una alícuota de 5 mL se le adicionaron 0.25 mL de anhídrido acético más dos gotas de ácido sulfúrico concentrado. La formación de diferentes colores indica la presencia de fitoesteroles o terpenos. El color verde indica la presencia de fitoesteroles, mientras que de rosa a morado indica la presencia de terpenos y triterpenos (Bulugahapitiya, 2013).

## 3. Compuestos Fenólicos:

- **Prueba de tricloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ):** se disolvió la muestra (1-2 mg) en 1 mL de etanol añadiendo unas gotas de cloruro férrico al 5 %, la coloración verde azul o negra indica la positividad de la prueba (Alarcón, 2018).

## 4. Saponinas

- **Ensayo de Espuma.** En un tubo de ensayo se agrega 1 mL de extracto acuoso, agitar vigorosamente y se toma la altura de la espuma. Se considera positiva la prueba si se obtiene de 8 mm a 10 mm de altura estable por 30 minutos (Alarcón, 2018).

## 5. Taninos:

- **Ensayo de la gelatina:** permitió reconocer la presencia de taninos en el extracto etanólico, se tomó 1-2 mg de la muestra y se disolvió en 2 mL de solución de gelatina. Se observó la presencia de precipitado blanco que indica la positividad de la prueba (Marcano y Hasewaga 2002).

## 6. Flavonoides:

- **Prueba de Shinoda:** se disolvieron 1-2 mg de la muestra en 1 mL de etanol y luego se adicionaron virutas de magnesio y unas gotas de HCl concentrado; si se obtiene una coloración roja indica la presencia de auronas o chalconas. En cambio, si se forma una coloración naranja a rojo, indica la presencia de flavonas; si es rojo flavonoles y si es magenta flavononas.
- **Prueba de NaOH al 10 %:** se agregó unas gotas de NaOH al 10 %, la presencia de un precipitado color pardo se toma como positivo (Silva, 2022).

#### 7. Cumarinas:

- **Reacción con  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado:** Se disolvió la muestra (1-2 mg) en 1 mL de etanol se agregaron unas gotas de hidróxido de amonio concentrado y se expuso el tubo a la lámpara de luz ultravioleta (UV) a 365 nm, la presencia de fluorescencia azul/verde indicó la positividad de la misma (Domínguez y Xorge, 1973).

#### 8. Antraquinonas:

- **Reacción con  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado.** Al extracto de etanol se le agregó una gota de hidróxido de amonio concentrado. Si la capa orgánica toma una coloración roja al alcalinizarla, hay antraquinonas presentes (Marcano y Hasegawa, 2002).

#### 9. Quinonas:

- **Reacción con ácido sulfúrico:** Se agregó 1 gota de ácido sulfúrico concentrado a una porción del extracto (Hexano y etanol) que se ha colocado en una capsula de porcelana. La formación de una coloración roja indica la presencia de quinonas (Marcano y Hasegawa, 2002).

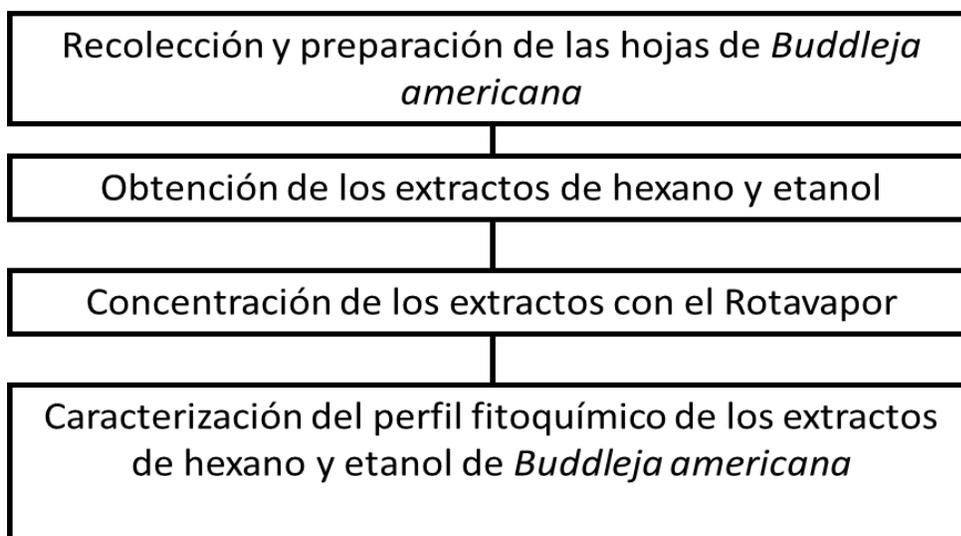
## 10. Lactonas sesquiterpénicas

- **Prueba de Baljet.** Disolver los extractos y adicionar de 3 a 4 gotas del reactivo de Baljet; un cambio de coloración de naranja a rojo demuestra la presencia de lactonas sesquiterpénicas (García, Cruz, Alarcón, Nieto y Gallegos, 2019).

## 11. Glicósidos cardiotónicos:

- **Ensayo de Keller-Kiliani.** Disolver el extracto en 1 mL de agua destilada, se agregan 2 mL de ácido acético glacial y posteriormente se adicionan algunas gotas de cloruro férrico al 5 %. Verter cuidadosamente en tubos de ensayo con 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. La formación de un anillo marrón en la interfaz indica la presencia de glicósidos cardiotónicos, al igual que la formación de un anillo violeta debajo del anillo marrón o bien en la fase de ácido acético; un anillo verdoso también puede formarse gradualmente, indicando la presencia de estos compuestos (Bulugahapitiya, 2013).

**Figura 16.** Procedimiento para el análisis fitoquímico de *Buddleja americana*



**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023.

## **Procedimiento para determinar la actividad antimicrob**

### **Determinación de la actividad antibacteriana**

La técnica se basó en el método originalmente descrito por Bäuer, Kirby, Sherris y Turck en 1966, denominado Método de Kirby-Bäuer. Esta prueba se desarrolló en el Laboratorio de actinomicetos del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA), bajo la asesoría de la Prof. Ysbelia Obregon y el técnico Emilio Salazar, donde se evaluó la técnica de difusión en disco.

### **Determinación de la actividad antifúngica**

Se utilizaron cepas ATCC de *Candida albicans* y *Candida krusei*. La técnica se basó en la técnica modificada de difusión del disco en agar Müller Hinton suplementado con 2 % La investigación se realizó por el método de difusión en agar con discos descrita por Velasco, Rojas, Salazar, Rodríguez, Díaz, Morales y Rondón (2007), frente cepas de referencia internacional. En los laboratorios de Micología “Dr Corrado Capretti” y de Actinomicetos “Dr. José A. Serrano R.” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo la asesoría de los Profesores Yndra Cordero, Ysbelia Obregon, Clara Díaz, Alexander Moreno y el Auxiliar de Laboratorio Emilio Salazar.

### **Preparación de las muestras**

Se usó solo la fracción del extracto etanólico para la actividad antibacteriana en concentración de 10 mg/mL y de 20 mg/mL para la actividad antifúngica, pues fue la fracción de la que se obtuvo mayor barrido fitoquímico.

## Microorganismos utilizados

Para esta investigación se seleccionaron cinco especies bacterianas: dos Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*), tres Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*) y dos fúngicas (*Candida albicans* y *Candida krusei*). Estas especies son de referencia internacional y forman parte de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC). Las bacterias se obtuvieron del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

## Método de difusión de discos en agar para actividad antimicrobiana:

### Preparación de los inóculos

Las cepas bacterianas a ensayar se incubaron previamente en placas con agar Müller Hinton por 16-18 horas a 37 °C, posteriormente se preparó un inóculo N° 0.5 McFarland ( $1 \times 10^8$  UFC/mL). Para la cepa de *C. albicans* y *C. krusei* se repicaron en agar Sabouraud por 24 horas. Los inóculos se prepararon a partir de un cultivo fresco de 24 h, luego en un tubo con solución salina, las cepas de referencia internacional se llevaron a una turbidez correspondiente al del patrón de McFarland patrón de McFarland N° 1,5 ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL).

### **Preparación de las placas para la actividad antibacteriana**

Para la actividad antibacteriana, se preparó el medio Agar Müller Hinton (HIMEDIA ®) según indicaciones del fabricante. Se vertieron 20 mL de cada medio en placas de Petri y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

### **Prueba de difusión en disco para la actividad antibacteriana**

Con la ayuda de un hisopo, se inoculó la superficie de placas de agar Müller Hinton con las soluciones bacterianas previamente preparadas. Se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro los cuales se esterilizaron bajo luz ultravioleta (LUV), durante 1 hora. Se impregnaron con 10 µL del extracto de etanol de *Buddleja americana* con concentración de 10 mg/mL.

### **Interpretación de la actividad antibacteriana**

Se considera un resultado positivo o sensible, cuando se observa un halo de inhibición alrededor del disco, y se toma como resultado negativo o resistente la ausencia de dicho halo. El diámetro de la zona de inhibición producto de la actividad antibacteriana de las muestras en estudio se expresa en milímetros (mm)

### **Preparación de las placas para la actividad antifungica**

Por su parte, las placas de Petri con 20 mL Agar de Müller-Hinton suplementado con 2 % de glucosa se dejó solidificar a temperatura ambiente.

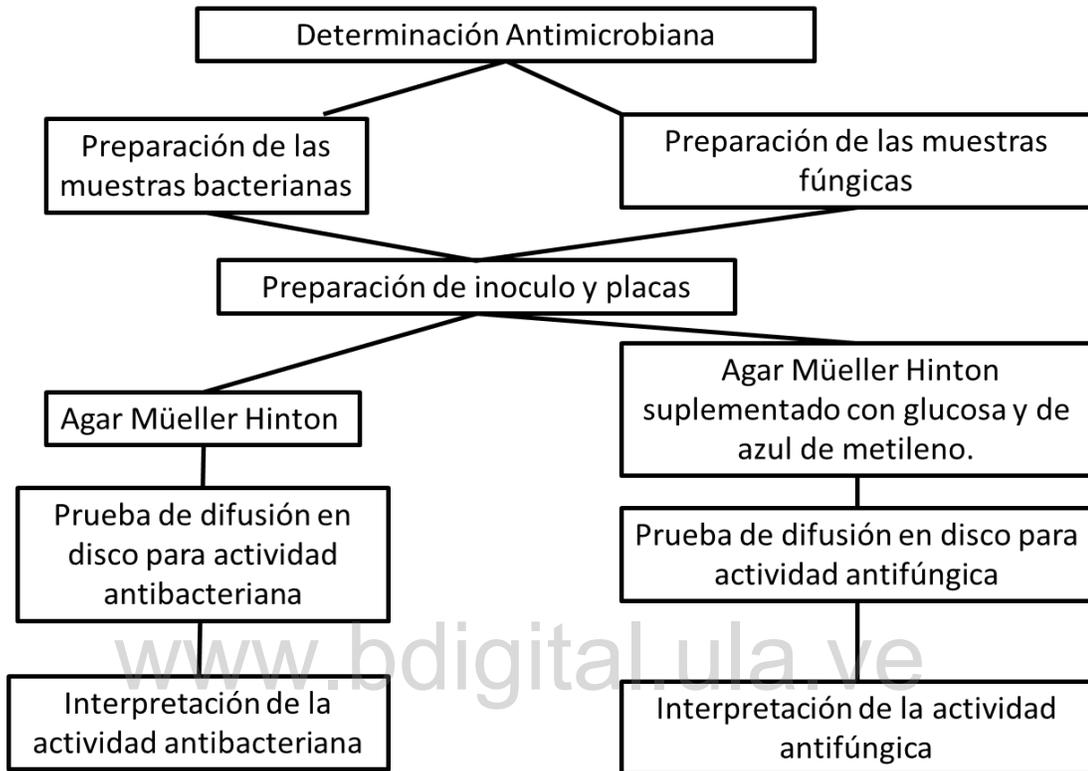
### **Prueba de difusión de disco para la actividad antifúngica**

Se realizó el control de esterilidad y se conservaron las placas a 4 °C hasta su uso. Con ayuda de un hisopo esteril se inoculó la superficie de la placa y con una pinza estéril se posicionaron discos de papel de filtro de 2 mm de grosor por 6 mm de diámetro, que previamente se esterilizaron bajo luz ultravioleta (LUV) durante 90 minutos. Luego, se impregnaron con 20 µL del extracto de etanol de las hojas de *Buddleja americana*. Se incubaron los discos a 4 °C por 4 horas previamente a la inoculación del extracto. Luego, se posicionaron los discos de Fluconazol 25 µg para *Candida albicans* y Voriconazol 25 µg para *Candida krusei* como discos de controles positivos y a su vez el disco de dimetilsulfóxido (DMSO) que se utilizó como control negativo. Se dejó a temperatura ambiente por 30 min y se incubó a 37 °C por 24-48 horas.

### **www.bdigital.ula.ve** **Interpretación de la actividad antifúngica**

Para su lectura se identificaron regiones sin crecimiento microbiano (halos) y se registró su diámetro en milímetros. Si el halo de inhibición es mayor a 7 mm, se considera que el extracto tiene una actividad antifúngica significativa. (Rojas, Bustamante, Bauer, Fernandez, Alban y Lock. 2003).

**Figura 17: Procedimiento para determinar la actividad antimicrobiana**



**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero. 2023

### **Diseño de Análisis**

Según Palella y Martins (2003) en el campo de la investigación, hay dos enfoques principales: el cualitativo y el cuantitativo. Para esta investigación en particular, se utilizó un enfoque combinado de ambos métodos. El enfoque cuantitativo se basa en la medición numérica de datos y su análisis a través de operaciones matemáticas. Este caso se midió los halos de inhibición en milímetros (mm) registrados en las pruebas de susceptibilidad.

Por otro lado, el enfoque cualitativo se centra en las características de la unidad de investigación y no se basa en mediciones numéricas. En este caso, se observaron características químicas en las pruebas preliminares de identificación realizadas en el tamizaje fitoquímico.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### Resultados

#### Determinación del % de rendimiento de los extractos de hexano y etanol de *Buddleja americana*

A partir de 30,24 g de las hojas secas y molidas, se logró obtener 0,28 g del extracto de hexano y 1,52 g del extracto de etanol, con un porcentaje de rendimiento de 0,93% y 5,03% respectivamente (Tabla 3).

**Tabla 3.** Resultados del rendimiento

Extractos	Hexano	Etanol
Peso inicial de las hojas secas y molidas (g)	30.24	30.24
Peso final del extracto (g)	0.28	1.52
Porcentaje del Rendimiento	0.93%	5.03%

**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023.

### **Análisis fitoquímico de las de hojas de *Buddleja americana***

Se determinaron los metabolitos secundarios contenidos en *Buddleja americana*, al someter los extractos de hexano y etanol a las diferentes reacciones químicas descritas en el capítulo anterior. Estas pruebas se basan en reacciones de cambios de color, formación de precipitados, producción de espuma y fluorescencia por exposición a la luz UV. Los resultados se interpretaron como negativo (-) o positivo (poco: +, moderado: ++, abundante: +++).

Los resultados del análisis indicaron la existencia de una gran cantidad de alcaloides y esteroides en ambos extractos. Tanto el extracto de hexano como de etanol presentaron triterpenos, que se manifestaron por la formación muy débil de un anillo color rojo, mientras que el anillo verde, que señala la presencia de esteroides en la muestra, fue más evidente. Las pruebas de alcaloides se realizaron solo en el extracto de etanol, resultando positivas las pruebas de Drangendorff mostrando un precipitado abundante de color naranja y blanco en las pruebas de Meyer y Wagner.

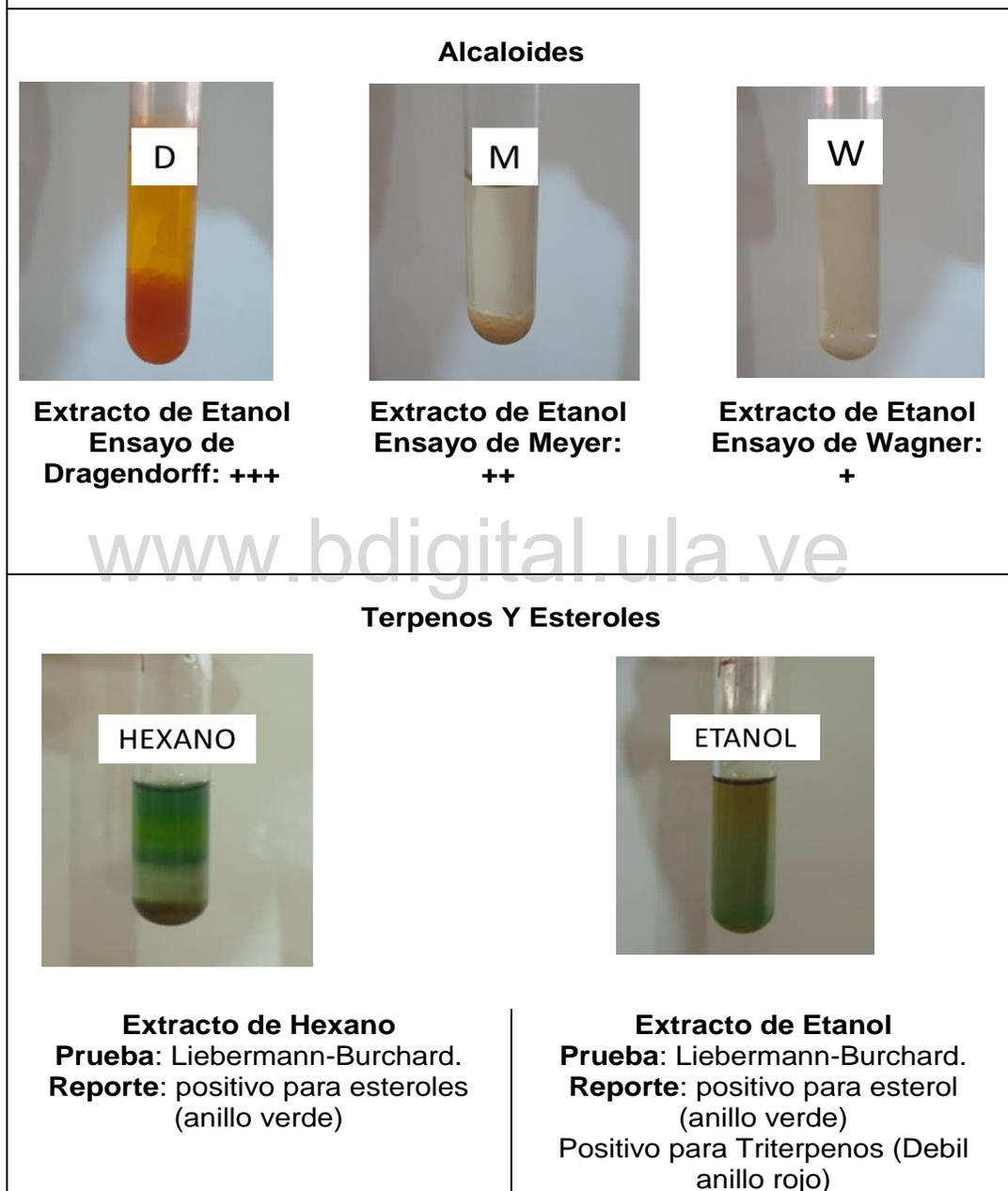
La muestra no presentó indicios de contener compuestos fenólicos, saponinas, taninos, flavonoides, cumarinas, quinonas, antraquinonas, lactonas sesquiterpénicas, ni glicósidos. Se puede ver los resultados de estas pruebas en la (Tabla 4).

**Tabla 4.** Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de hexano y etanol del *Buddleja americana*

Prueba Química		Extracto Hexano (apolar)	Extracto Etanol (polar)
Alcaloides	Dragendorff	ND	+++
	Meyer		++
	Wagner		+
Triterpenos y esteroides:		Triterpenos: Rojo +	Triterpenos: Rojo -
		Esteroides: Verde ++	Esteroides: Verde ++
Compuestos Fenolicos		ND	-
Saponinas		ND	-
Taninos		ND	-
Flavonoides		Shinoda: -	Shinoda: -
		NaOH: -	NaOH: -
Cumarina		-	-
Antroquinonas		-	-
Quinonas		-	-
Lactonas sesquiterpenicas		-	-
Glicósidos Cardiotónicos		ND	-
<b>Leyenda: Negativo: -, Positivo: Abundante: +++, Moderado: ++, Escaso: +. No Determinado: ND</b>			

**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023.

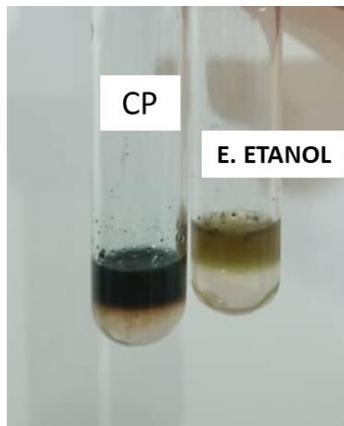
**Figura 18:** Resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de las hojas de *Buddleja americana*.



**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023

**Figura 19:** Resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de las hojas de *Buddleja americana* (Continuación)

### Compuestos Fenólicos



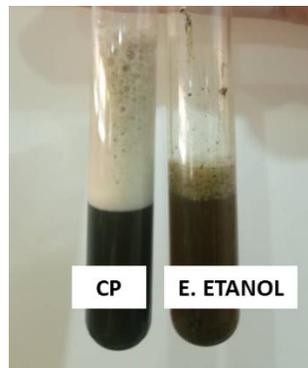
#### Extracto de Etanol

**Prueba:** Tricloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ )

**Reporte:** - (Negativo)

CP: Control Positivo

### Saponinas



#### Extracto Etanol

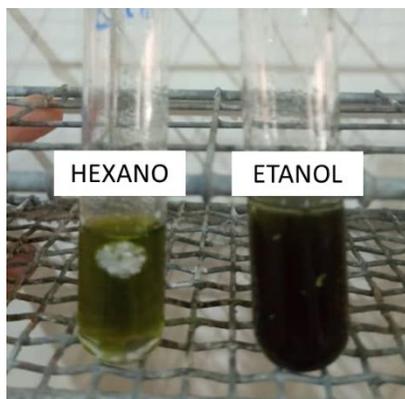
**Prueba:** Espuma

**Reporte:** Negativo

**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023

**Figura 20:** Resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de las hojas de *Buddleja americana* (Continuación)

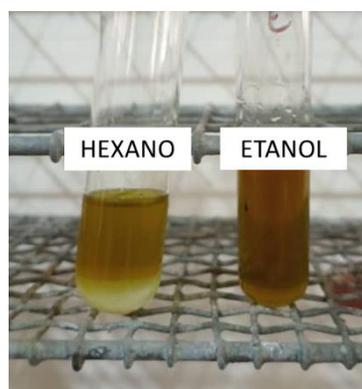
### Flavonoides



**Extracto Hexano y Etanol**

**Prueba:** Shinoda

**Reporte:** - (Negativo)

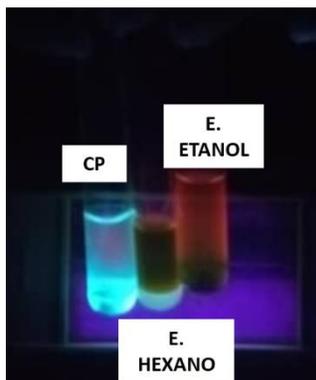


**Extracto Hexano y Etanol**

**Prueba:** Hidroxido de Sodio al 10%

**Reporte:** - (Negativo)

### Cumarinas



**Extracto Hexano y Etanol**

**Prueba:**  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado

**Reporte:** - (Negativo)

**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023

**Figura 21:** Resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de las hojas de *Buddleja americana*

### Quinonas

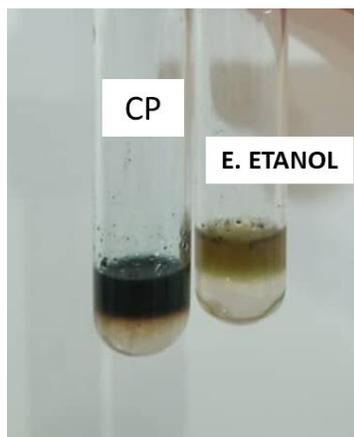


### Extracto de Hexano y Etanol

**Prueba:** Ácido Sulfúrico

**Reporte:** - (Negativo)

### Glicósidos Cardiotónicos



### Extracto de Etanol

**Prueba:** Ensayo de Keller-Kiliani

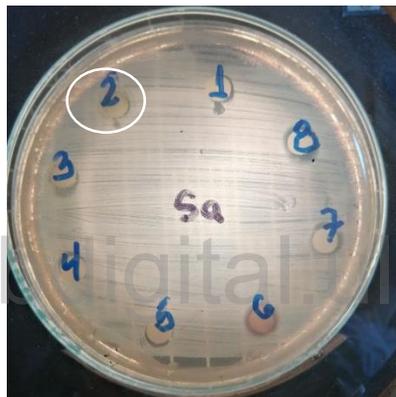
**Reporte:** Negativo -

**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023

### Determinación de la actividad antibacteriana

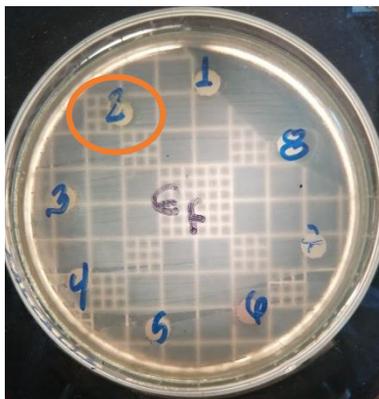
La actividad antimicrobiana se realizó a través del método de difusión en disco (Kirby-Baüer) y fue estudiado solo en el extracto etanólico de *Buddleja americana* a una concentración de 10 mg/mL, los resultados obtenidos son presentados en las siguientes figuras (figura 22 - 26)

**Figura 22.** Método de difusión en disco utilizando cepa ATCC de *Staphylococcus aureus*



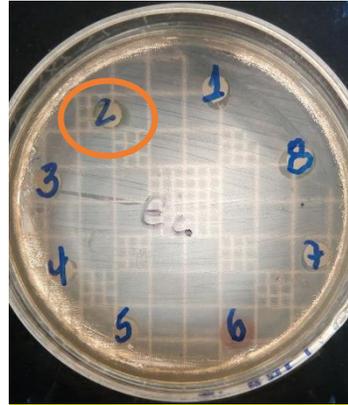
**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023

**Figura 23.** Método de difusión en disco utilizando cepa ATCC de *Enterococcus faecalis*



**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023

**Figura 24:** Método de difusión en disco utilizando cepa ATCC de *Escherichia coli*



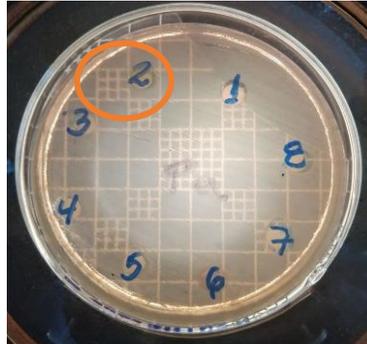
**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023

**Figura 25:** Método de difusión en disco utilizando cepa ATCC de *Klebsiella pneumoniae*



**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023

**Figura 26:** Método de difusión en disco utilizando cepa ATCC de *Pseudomonas aeruginosa*



**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023

**Tabla 5.** Resultados de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de *Buddleja americana*, expresados en milímetros (mm).

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

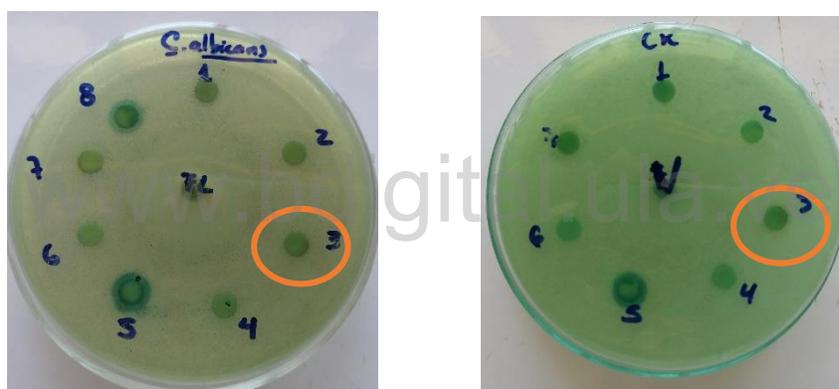
Cepas bacterianas ATCC	Extracto de etanol [10 mg/mL]
<i>Staphylococcus aureus</i>	7 mm
<i>Enterococcus faecalis</i>	0 mm
<i>Escherichia coli</i>	0 mm
<i>Klebsiella pneumonia</i>	8 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7 mm

**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023

### Determinación de la actividad antifúngica

La actividad antifúngica se realizó a través del método de difusión en disco modificado avalado por el documento M44-A2 del CLSI y fue estudiado solo en el extracto de etanol de *Buddleja americana* a una concentración de 20 mg/mL, los resultados obtenidos son presentados en la siguiente figura (Figura 27).

**Figura 27:** Método de difusión en disco modificado utilizando cepa ATCC de *C. albicans* y *C. krusei*



**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023

**Tabla 6.** Resultados de los halos de inhibición de la actividad antifúngica del extracto de etanol de *Buddleja americana*, expresados en milímetros (mm).

Cepas fúngicas ATCC	Extracto de etanol [20mg/mL]
<i>Candida albicans</i>	0 mm
<i>Candida krusei</i>	0 mm

**Elaborado por:** Arellano, Pérez y Cordero, 2023.

## Discusiones

Los autores Ghorbani y colaboradores en 2017, registraron más de mil fitoquímicos diferentes, de los cuales cerca de 700 eran exclusivos de la familia Scrophulariaceae. Los géneros con mayor diversidad química fueron *Scrophularia*, *Verbascum*, *Buddleja* y *Rehmannia*. Los tipos de fitoquímicos más abundantes fueron los iridoides, los fenilpropanoides y los flavonoides. Esto coincide con la revisión bibliográfica titulada Constituyentes bioactivos de *Buddleja*, publicada en 2019 por Khan y colaboradores, se reporta que las especies de este género contienen aproximadamente 150 compuestos químicos, entre los que se encuentran los fitoquímicos anteriormente nombrados mas monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, flavonoides, lignanos, glicósidos y esteroides. Los alcaloides, triterpenos y esteroides tienen actividad antibacteriana que inhiben la síntesis de la membrana bacteriana y la síntesis de proteínas, causando la desestabilización en la integridad y permeabilidad de la membrana bacteriana (Bueno, Martínez, y Stashenko. 2009). En este contexto, el análisis fitoquímico de los extractos de las hojas de *Buddleja americana* realizado en la presente investigación mostró similitudes con los componentes aislados anteriormente en esta planta, así como también en otras especies del mismo género. Se determinó la presencia de triterpenos en el extracto de hexano y de esteroides en ambos extractos (hexano y etanol). Además, según los ensayos de Dragendorff, Meyer y Wagner, *B. americana* contiene alcaloides, coincidiendo con lo reportado por Gutierrez y cols en en el año 2020 para *B. incana*. Conjuntamente, lo expuesto por Velázquez en 2008 indica que las propiedades diuréticas que se atribuyen a esta planta se debe a la presencia de un alcaloide, que además es analgésico, emético, hipnótico y purgante, aunque produce vómitos y evacuaciones.

En la investigación realizada en 1990 por Masanori, Tadahiro, Takatoshi y Yukio, se analizaron los glicósidos presentes en los extractos de hexano, cloroformo, acetona y metanol de las hojas de *B. americana*. Mediante cromatografía en columna con sílica gel, se identificaron cuatro compuestos: nigrosido, martynosido, acteosido y lanarina. En la presente investigación no se encontraron glicósidos en las muestras analizadas usando el método de Keller-Kiliani, que es específico para detectar glicósidos cardiotónicos. Los autores de esta investigación sugieren que esta discrepancia con el trabajo anteriormente citado se debe a los distintos métodos y pruebas utilizados. Es posible que existan otros glicósidos en las muestras, pero el método usado no es lo suficientemente sensible para identificarlos, puesto que *Buddleja americana* ha reportado en otros estudios la presencia de Glicosidos saponinicos (Velázquez, 2008). La situación geográfica, el clima, los depredadores, tipo de suelo y cuidados de la planta, también es un factor determinante para el desarrollo o no de ciertos metabolitos secundarios

Para complementar el análisis de la actividad antimicrobiana de *B. americana*, se compararon los resultados obtenidos en este estudio con los reportados por otros autores que han investigado el potencial antibacteriano de otras especies del género *Buddleja*. Cuevas, Lorenzo, Hernandez, Arreola y Bach en 2022, evaluaron la actividad antimicrobiana, tóxica e inflamatoria de los extractos clorofórmicos de *B. perfoliata* frente a varias cepas bacterianas, incluyendo *S. aureus*, y encontraron una inhibición significativa a una concentración de 100 µg/ml (0,1 mg/ml). Estos hallazgos coinciden con los de Otero y colaboradores. (2022), quienes estudiaron las propiedades antimicrobianas de plantas nativas chilenas y su potencial aplicación en la industria alimentaria. Ellos demostraron que los extractos etanólicos de *B. globosa* presentaban actividad bacteriostática contra *S. aureus* y *E.coli*, y atribuyeron este efecto al verbacósido, un glicósido fenilpropanoide presente en las hojas de esta planta. Sin embargo, en el presente trabajo no se

observó una actividad antibacteriana significativa de los extractos etanólicos de las hojas de *B. americana*, frente a *S. aureus* o *E.coli*, aun siendo probado a una concentración mayor (10mg/ml). Los investigadores aquí coinciden con lo expresado en el artículo de revisión bibliográfica "Fitoquímica, propiedades medicinales, compuestos biactivos y potencial terapéutico del genero *Eremophilia* (Scrophulariaceae)" (2022), Cock, Baghtchedjin, Cordon y Dumont analizan diversos estudios del genero *Eremophilia*, algunos de esos estudios evalúan la actividad antibacteriana de terpenos purificados de bajo peso molecular (hexano) frente a *S. aureus*. Según los autores, estos terpenos mostraron mejores resultados que los extractos purificados de terpenos de alto peso molecular (etanol y fenilpropanol) y los del extracto en crudo de la planta, lo que sugiere que el método de ensayo de difusión en fase sólida puede no ser el más adecuado para determinar la actividad real de estos extractos. Ellos argumentan que la difusión de las moléculas en los geles de agar depende de sus características fisicoquímicas, y que las moléculas de alto peso molecular tienden a difundir menos, dando lugar a zonas de inhibición pequeñas que no reflejan la verdadera actividad antibacteriana. Por tanto, es posible que la actividad inhibidora del crecimiento bacteriano se subestime en algunos estudios debido a la elección del método. Además, los autores señalan que la actividad antibacteriana de los extractos purificados suele ser mayor que la de los extractos crudos, ya que en estos últimos la concentración individual de cada compuesto fitoquímico puede no ser suficiente o puede haber interacciones entre ellos que modifiquen su acción. Otras posibles causas de las diferencias entre estudios podrían deberse a la especie vegetal, las condiciones de crecimiento y el método de extracción utilizados.

En este estudio, *Klebsiella pneumoniae* fue la única bacteria que presentó una actividad significativamente mayor que las demás especies evaluadas. Este hallazgo concuerda con lo reportado por Apaza y colaboradores (2022)

en el artículo "Compuestos aislados de *Buddleja Coriacea* con actividades antibacterianas y antiinflamatorias en el tracto urinario", donde se ensayaron cepas de *K. pneumoniae* frente a subextractos hexanólicos de *B. coriacea* a concentraciones similares a las empleadas en el presente trabajo. Se sugiere que un compuesto común en ambos extractos hexanólico y etanólico aún no determinado podría ser el responsable de la actividad contra *K. pneumoniae*.

Los resultados del análisis antifúngico coinciden con los hallazgos previos de Otero y colaboradores (2022), y de Khan y colaboradores (2019), cuyos trabajos fueron citados anteriormente. En ambos estudios se observó la falta de efectividad de los extractos del género *Buddleja* spp. contra levaduras del género *Candida* spp. En contra parte Cock y colaboradores recoge evidencia que los compuestos purificados en especies de la familia Scrophulariaceae como diterpenos y flavonoides a concentraciones determinadas tienen actividad contra *Candida* spp.

Por otro lado, en todos los artículos revisados el género *Buddleja* spp. mostró actividad antifúngica contra cepas de dermatofitos como *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton interdigitale* y *Epidermophyton floccosum*, lo que respalda su uso etnomedicinal tradicional para tratar afecciones de la piel.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

- Mediante la aplicación de la técnica de extracción por reflujo en caliente, partiendo de un peso de hojas secas y molidas de 30,24 g de hojas de *Buddleja americana* se obtuvieron los extractos de hexano y etanol, presentando un rendimiento del 0.9 % y 5.03 %, respectivamente.
- El tamizaje fitoquímico realizado al extracto de hexano del *Buddleja americana* demostró la presencia de esteroides escasos y triterpenos moderados.
- En el extracto de etanol se encontraron alcaloides abundantes y esteroides moderados. Siendo este el extracto de mayor interés.
- La mejor actividad antibacteriana observada del extracto de etanol de *Buddleja americana* se presentó en la cepa de *Klebsiella pneumoniae* con un halo de inhibición de 8 mm.
- Las demás cepas estudiadas, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* no fueron afectadas por el extracto, ya que no se observaron halos de inhibición. *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecalis* presentaron una inhibición moderada, con halos de 7 mm de diámetro.

- En cuanto a la actividad antifúngica contra levaduras de la especie *Candida albicans* y *C. krusei* no se observó ninguna alteración en el cultivo *in vitro* que favoreciera la actividad.

### **Recomendaciones**

- Se sugiere realizar ensayos adicionales con diferentes concentraciones de los extractos y con una mayor variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas. De esta manera, se podrá determinar el espectro de acción de los extractos y su potencial terapéutico.
- Evaluar el potencial de los extractos de *Buddleja americana* como agente antimicótico en otros generos de mohos y levaduras, para ampliar el conocimiento sobre sus propiedades y aplicaciones.
- Evaluar la capacidad de los extractos de *Buddleja americana* para inhibir el crecimiento de microorganismos mediante la técnica CIM y establecer la concentración mínima en la cual presenta actividad antibacteriana y antimicótica.
- Evaluar otras actividades biológicas en los extractos de *Buddleja americana* como la actividad antioxidante y antiinflamatoria.

## BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Aguilar, S. y Terrazas, T. (2001) Anatomía de la madera de *Buddleja* L. (Buddlejaceae): análisis fenético. *Maderas y Bosques* 7(2) 63-85
- Aharoni, A., Jongsma, M. A., y Bouwmeester, H. J. (2005). Volatile science  
Metabolic engineering of terpenoids in plants. *Trends in Plant Science*. 10 (12), 594–602.
- Aizpuru, I. Aceguinolaza, C. Uribe, E. P, Urritia, P y Zorrakin. I, (1999) Claves ilustrada de la flora del país Vasco y territorios limítrofes. Servicio central de publicaciones del gobierno Vasco.
- Alarcón, M. (2018) Actividad antioxidante y tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de las hojas de *Oyedaea verbesinoides* DC [Tesis de pregrado]. Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Mérida, Venezuela.
- Ali, F, Idbal, M, Naz, R, Malik. (2011) Antimicrobial constituents from *Buddleja asiatica*. *Journal Chemical Society of Pakistan* 33(1) 90-95
- Apaza, L. Rico, F. Sánchez-Corral, J. Domenech, M. Sánchez, A. (2022). Isolated Compounds from *Buddleja Coriacea* with Antibacterial and Anti-Inflammatory Activities in the Urinary Tract. *Planta Medica International*.
- Arias, F. (2006). El Proyecto de Investigación. Introducción a la metodologíacientífica. 5ta Ed, Caracas-Venezuela, Editorial Episteme, C.A.

Artexe, A (2000). Historia de la medicina naturista española. España: Editorial Madrid.

Atlas of Bacteria: Introduction and List of Bacteria and Related Features. (2021, April 10). Retrieved May 4, 2023, from universe84a website: <https://universe84a.com/atlas-of-bacteria/>

Ávalos, A., y Perez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología*. 2 (3), 119-145.

Bakht Nasir, Humaira Fatima, Madiha Ahmad and Ihsan-ul-Haq (2015). Recent Trends and Methods in Antimicrobial Drug Discovery from Plant Sources. *Austin J Microbiol*. 1(1): 1002.

Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496.

Bonifaz A (2015). *Micología médica básica*. 5ª ed. México: McGraw-Hill.

Breyers, J. (1993). Bacterial Biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, 2 (4). 17-20.

Bueno. J, Martínez. J, y Stashenko. E. (2009). Actividad antimicobacteriana de terpenos. *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 41(3), 231-23

- Bulugahapitiya, V. (2013). *Plants based natural products extraction, isolation and phytochemical screening methods*. 1ra. ed. Matara, Editorial Indika Graphics
- Caldas, A. (2012). *Optimización, Escalamiento y Diseño de una planta piloto de extracción sólido-líquido*. (Trabajo de investigación). Universidad de Cuenca. Ecuador
- Carbajal, L., Hata, Y. y Sierra, N. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupata. *Revista. Colombia Forestal*. 12 (1); 161-170.
- Castillo, A. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas y semillas. *Revista. cubana plantas medicinales*. 19 (4): 1028- 4796.
- Cañigueral, S. (2003). *Identidad y pureza de drogas vegetales y extractos. Seminario Taller sobre Estandarización de Extractos vegetales y Garantía de Calidad de Productos Fitoterápicos*. (Trabajo de investigación) Cartajena –Colombia.
- CLSI (2009). *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Guideline, 2nd Edition*. CLSI guideline, M44-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009
- Cock, I, Baghtchedjin, L Cordon. M y Dumont. E. (2022) Phytochemistry, Medicinal Properties, Bioactive Compounds, and Therapeutic Potential of the Genus *Eremophila* (Scrophulariaceae). *Molecules* 2022, 27, 7734.

- Cortes, O y Mosqueda, T (2013). Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Revista. Química Viva*. 2 (12), 12-15.
- Creus, E. (2004). Compuestos fenólicos: Un análisis de sus beneficios para la salud. *Revista. Offarm*, 24, 80-84.
- Croteau. R, Ketchum, T y Lewis, N. (2000). Natural products (Secondary Metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 7 (20), 1250-1318
- Cruz, J. (2007). *Plantas medicinales para la historia*. (Trabajo de investigación). Universidad de verano de Lanzarote, España.
- Cuevas. S., Lorenzo. A., Hernández, L., Sánchez. E., & Bach. H. (2022). *Antimicrobial, toxicity, and anti-inflammatory activities of Buddleja perfoliata* Kunth. 2(4), 100357–100357.
- Domínguez, S., y Xorge, A. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica*. México. Editorial Limusa.
- Fernández, M., Paredes F. (1994). *Microbiología clínica práctica*. España: Servicio de Publicaciones. Universidad de Cádiz.
- Ferreira, F y Olivero, C (2015). *Glicósidos vegetales y su importancia en la bioprospección* (Trabajo de investigación). Universidad de investigación agropecuaria, Uruguay.

- García, D. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Revista. Pastos y Forrajes*. 1 (27) 3-4.
- García, R., Cruz, F., Alarcón, J., Nieto, A., y Gallegos, M. (2019). Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos de *Thalassia testudinum* banks ex köning et sims de la localidad de Champotón, Campeche, México, durante el ciclo anual 2016-2017. *Polibotánica*, 48; 151-168.
- Gasaly, Naschla, Riveros, Karla, y Gotteland, Martín. (2020). Fitoquímicos: una nueva clase de prebióticos. *Revista chilena de nutrición*, 47(2), 317-327
- Ghorbani. A, Langenberger. G , Sauerborn. J (2017). A comparison of the wild food plant use knowledge of ethnic minorities in Naban River Watershed National Nature Reserve, Yunnan, SW China. *Ethnobiology Ethnomedicine* 8 (17).
- Gonzalez, A. (2004). *Obtención de Aceites Esenciales y Extractos Etanólicos de Plantas Amazónicas* (trabajo de investigación). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Grayson, M. y Heyman, D (2012). *The evolving threat of antimicrobial resistance*. (Trabajo de investigación). University of Melbourne, Australia.
- Guerra, E. (2005). Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas químicas de los extractos fluidos, blandos y secos, así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala

(*Phlebodium pseudoaureum*) a nivel de laboratorio. (trabajo de investigación). Universidad de San Carlos de Guatemala.

Gutiérrez, J., Perez, J., Miranda, V., Mayanga, A., Tapia, S. (2020). Uso etnomedicinal, fitoquímico y actividad biológica de la planta andina *Buddleja incana* (Scrophulariaceae). *Ethnobotany Research & Applications*.

Heisler, E., Budo, M., Schmith, M., Bodke, M., Ceolin, S. (2015). Uso de plantas medicinales en el cuidado de la salud: la producción científica. *Disertaciones de enfermería brasileña*. 14 (39): 1695-6141.

Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, L. (2010). Metodología de la investigación. Quinta edición. Perú: McGrawHill.

Hernández, G., Phaedra, S., Bermúdez, S., Reyes, R. Vibrans, A y Soto, M. (2019). Evaluación *in vitro* de la actividad cicatrizante y antibacteriana de los extractos de *Buddleja cordata* y *Vismia baccifera*. *Revista. Fitotec. Mexico*. 42 (2), 93 - 99

Hurtado, J. (2015). *El proyecto de investigación*. Comprensión holística de la metodología y la investigación. Caracas Venezuela. Ediciones Quirón.

Joshi, S., Mishra, D., Bisht, G. y Khetwal, K. (2012). Comparative study of essential oil composition of *Buddleja asiatica* and *Buddleja davidii* 6(1):23-25.

- Jamiu, A. T., Albertyn, J., Sebolai, O. M., & Pohl, C. H. (2021). Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen. *Medical mycology*, 59(1), 14–30.
- Khan, S., Ullah, H., y Zhang, L (2019). *Bioactive constituents form Buddleja species*. (Trabajo de investigación). Gomal University, Dera Ismail Khan, Pakistan.
- Koneman E., Allen S., Janda W., Schreckenberger, P y Winn, W (2001). Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas color. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires.
- Kuklinski, K. (2003). *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. (Trabajo de investigación) Barcelona.
- Levinson, W., Hong, P, & Joyce E.A., & Nussbaum J, & Schwartz B (Eds.), (2022). Microbiología médica e inmunología. Una guía acerca de las enfermedades infecciosas, 17 e. McGraw Hill.
- Lopez, M. (2002). Flavonoides, *Revista. Elsevier*. 21(4), 108-113.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (1991). *Fitoquímica Orgánica*. Universidad Central de Venezuela Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico Caracas.
- Marcano, D y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Segunda edición, Editorial Universidad Central de Venezuela consejo de desarrollo científico y humanístico. Caracas.

- Masanori. M, Tadahiro. T, Takatoshi. N y Yukio. O. (1990). Studies on the Glycosides from *Buddleja americana* L. 44(3). 167-170.
- Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller. (2009). Microbiologia Medica. Sexta edición. España. Elsevier.
- Naveda, G. (2010). *Establecimiento de un proceso de obtención de extracto de ruda, con alto contenido de Polifenoles.* (Trabajo de investigación) Escuela Politécnica Nacional, Quito.
- Norman, E. (2000). Buddlejaceae. Flora Neotropica 81(1). Recuperado el 05 de Junio de 2022, de [www.jstor.org/stable/4393899](http://www.jstor.org/stable/4393899)
- Ortega, A. Devesa, A. (1993) Revisión del género *Scrophularia* L (Scrophulariaceae) en la península Ibérica e Islas Baleares. Consejo superior de investigaciones científicas.
- Osorio, E. (2009). *Aspectos Básicos de Farmacognosia.* (Trabajo de investigación) Universidad de Antioquia, Colombia.
- Otero, M. Fuentes, J. Atala, C. Cuadros-Orellana, S. Fuentes, C. Gordillo-Fuenzalida, F. (2022) Antimicrobial Properties of Chilean Native Plants: Future Aspects in Their Application in the Food Industry. *Foods*. 11, 1763.
- Parella Stracuzzi, S, Martins Pestana, F. (2003). Metodología de la investigación cuantitativa. Venezuela: Fondo Editorial de la Universidad Pedagógica Experimental Libertador.

Pardo, F., Perich, F. Villarroel, L, Torres, R. (1993). Isolation of verbascoside, and antimicrobial constituent of *Buddleja globosa* leaves. Journal of Ethnopharmacology. 39 (3); 221-222.

Pedrique, M. (2002). *Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (antibiograma)*. (Trabajo de investigación). Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela, Caracas.

Perez, R. y Condit, R., Tree Atlas of Panama, STRI Research Portal - *Buddleja americana*. (2023). Recuperado Mayo 13, 2023, en Panamabiota.org website: <https://panamabiota.org/stri/taxa/index.php?php?taxon62536&clid=109>

Pérez, T. (2009). *Obtención de extractos vegetales a partir de plantas medicinales*. (Trabajo de investigación). Academia de Cuba, Cuba.

Prashant, T., Bimlesh, K., Mandeep, K., Gurpreet, K. y Harleen, K. (2011). Phytochemical Screening and Extraction: A Review. Internationale Pharmaceutica Scientia. 1 (1); 98-106.

Ramírez, L., Marin, D. (2009). Metodología para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Revista. Scientia y Tecnica*. (42): 263-268.

Ricciardi., B (2020). *Evaluación fitoquímica y biológica (actividades antimicrobiana y alexitérica) de extractos de Cissampelos pareira*. (Trabajo de investigación). Universidad Nacional del Nordeste, Argentina.

- Robinson T. 1981. *The biochemistry of alkaloids*. Nueva York. Editorial Springer.
- Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O.( 2003). Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol.*; 88 (3); 199-204
- Sánchez, E., Loruhamá, S., García, P. (2016). Actividad antimicrobiana. *Investigación en plantas de importancia médica*. (77-100), México, OmniaScienc
- Sánchez, F. (2009). II Congreso Nacional de Plantas Medicinales y Aromáticas.Extracción de Aceites Esenciales. Recuperado el 5 de Junio, de: [http://sisav.valledelcauca.gov.co/CADENAS\\_PDF/AROMATICAS/c05.pdf](http://sisav.valledelcauca.gov.co/CADENAS_PDF/AROMATICAS/c05.pdf)
- Sánchez, P. Muñoz, R. Gutiérrez, N. (2012) Resistencia bacteriana a los antibióticos: mecanismos de transferencia; 8(17):31-37.
- Santana, R. (2014). *Evaluación de Métodos de Extracción y Dosis de Aplicación de cola de caballo (Equisetum arvense) para el Control Ecológico de roya (Puccinia sp.) en el cultivo de cebolla blanca (Allium fistulosum)*. (Trabajo de investigación) Universidad Técnica de Ambato.
- Santamaria, C., Gonzales, A y Astorga, F. (2015). European natural additives, *Extractos vegetales. Aplicación para la reducción del estrés*. (pp 75-80). Madrid.

- Selles, E., Sánchez, J., Solan , C., Suiñe, J., & Tico, J. (1992). *Tratado de Farmacia Galénica*. Madrid.
- Silva, J. (2022). "Optimización del proceso de extracción hidroalcohólica a partir del eneldo (*Anethum graveolens*) en función del contenido de polifenoles totales y actividad antioxidante". [Tesis de Postgrado]. Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga, Ecuador.
- Schwab, W., Fuchs, C., y Huang, F. C. (2013). Transformation of terpenes into fine chemicals. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(1), 3-8.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Bogota-Colombia. Primera edición, Editorial Convenio Andrés Bello.
- Solís, P., De Solís, N., Gattuso, S., y Cáceres, A. (2003). *Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos*.16.43-91
- Torres, A., Martínez, I. (2013). *Estudio Fitoquímico de plantas medicinales propias del estado de Querétaro*. (Trabajo de investigación). México.
- Velastegui, J. (2005). *Alternativas ecológicas para el manejo integrado fitosanitario en los cultivos*. (Trabajo de investigación) Universidad de Quito, Ecuador
- Velasco, J., Rojas, J., Salazar, P., Rodríguez, M., Díaz, T., Morales, A., Rondón, M. (2007). Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia*

*oreganoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. *Natural Product Communications*, 2:85-88.

Villacís. A, Ávila. T, Marly. K y Silverio. C (2020). Evaluación de susceptibilidad en *Candida* spp por colorimetría obtenida en gestantes de un hospital obstétrico. *Vive Revista de Salud*, 3(9), 227-246.

Voigt, R. (1982). *Tratado de tecnología Farmacéutica*. España: Editorial Acriba.

Zuloaga, F.; Morrone O. y Belgrano M. (2008). Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur (Argentina, Sur de Brasil, Chile, Paraguay, y Uruguay). *Rev. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*. 3 (107); 2413-2424.

www.buigital.ula.ve