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

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE LAS FLORES DE *Melia azedarach* L.

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Licenciadas en Bioanálisis

www.bdigital.ula.ve

Autores:
Andrea Rachely Caceres Diaz
C.I: V-26.332.872
Fragdimar Norielsy Peraza Melendez
C.I: V-25.506.899
Tutor:
Prof. Julio César Rojas

Mérida, Diciembre de 2023

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

DEDICATORIA

A Dios por darme la fortaleza en los momentos de debilidad, la paciencia, sabiduría y entendimiento para superar todos los obstáculos y dificultades a lo largo de este camino y permitirme, entre muchas cosas, alcanzar la culminación de mi formación académica.

A mi mamá por darme las fuerzas que en algún momento me faltaron, por ayudarme mediante todos los medios a conseguir esta meta, por enseñarme a valorar las pequeñas cosas de la vida, a disfrutar cada momento y a conseguir siempre el lado positivo de cada experiencia y por creer en mí a pesar de mis miedos.

www.bdigital.ula.ve

Andrea

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación lo dedico principalmente a Dios, por tener cuidado de mí y ser mi guía en todo tiempo, por llenarme de paciencia, constancia, sabiduría e inteligencia para alcanzar poco a poco mis metas y sueños.

A mis padres por el apoyo continuo e incondicional, por ser mi motor y mi fuerza, por enseñarme a ser valiente y esforzada, brindarme su ayuda económica en todo tiempo aunque implicó partir a países lejanos, por creer en mí desde el día cero y nunca dejar de hacerlo, finalmente por enseñarme a ser perseverante a pesar de los obstáculos y adversidades.

www.bdigital.ula.ve

Fragdimar

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser el creador de la vida, quien nos ha dotado de capacidades, aptitudes, inteligencia y perseverancia para lograr esta meta. Por guiarnos y cuidarnos en cada decisión a lo largo de nuestra carrera.

A la Ilustre Universidad de Los Andes y Facultad de Farmacia y Bioanálisis por recibirnos, permitirnos ser parte de ella y formarnos como profesionales de excelencia y calidad.

Al Laboratorio de Investigación de Toxicología Analítica, Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis “Dr. Alfredo Usubillaga del Hierro” y los laboratorios de Micología y Actinomicetos por ser parte fundamental en la realización de la parte experimental de esta investigación.

A nuestro Tutor Dr. Julio Rojas por todas las horas que dedicó en esta investigación, por su paciencia, apoyo constante pero sobre todo por el cariño y la alegría con la que nos recibe siempre.

A las profesoras Clara Díaz, Ysbelia Obregón, Yndra Cordero y en especial a la Dra. Rosa Aparicio por los consejos, dedicación, orientación y ayuda constante, por estar cuando más las necesitamos y hacer de esta investigación una experiencia inolvidable.

A nuestros padres Yadira Caceres, Digna Melendez y Francisco Peraza por su amor, por siempre creer en nosotras, nunca rendirse, motivarnos día a día y ayudarnos a alcanzar este sueño tan anhelado; ustedes son la razón fundamental por la cual seguimos aquí dando lo mejor.

A nuestros familiares y amigos que aún desde la distancia se hacían presente para llenarnos de ánimo, motivarnos a finalizar con éxito y ayudarnos de diversas maneras a llegar a este punto.

A los amigos que nos regaló Mérida, la Iglesia GCD’FE y la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por el apoyo incondicional, el cariño y la constante compañía que hicieron de este largo recorrido un disfrute total.

Andrea y Fragdimar

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

TABLA DE CONTENIDO

	Pág
ÍNDICE DE FIGURAS……	ix
ÍNDICE DE TABLAS…….……....	x
ÍNDICE DE ANEXOS……..……..……..	xi
RESUMEN…….	xii
INTRODUCCIÓN……	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA……...	3
Planteamiento del Problema……..	3
Justificación de la Investigación……	4
Objetivos de la Investigación…….....	6
Objetivo General…….	6
Objetivos Específicos…….....	6
Alcances y Limitaciones de la Investigación……	6
Alcances de la Investigación…….	6
Limitaciones de la Investigación……...	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO…….....	8
Trabajos Previos……...	8
Antecedentes Históricos…….....	18
Bases Teóricas…….	20
Familia Meliaceae……..	20
Género Melia……...	22
Especie Melia azedarach L…….....	25
Productos naturales…….....	27
Extractos vegetales…….....	28
Análisis Fitoquímico Preliminar o Tamizaje fitoquímico……..	34
Bacterias…….……..	38
Actividad antibacteriana……..……	40

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

TABLA DE CONTENIDO
(Continuación)

Pág

Hongos..... 44

Actividad antifúngica..... 47

Definición Operacional de Términos..... 50

Operacionalización de las Variables..... 51

Hipótesis..... 52

CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO..... 53

Tipo de Investigación..... 53

Diseño de Investigación..... 53

Población y Muestra..... 54

Unidad de Investigación..... 54

Selección del Tamaño de la Muestra..... 54

Sistema de Variables..... 54

Instrumentos de recolección de datos..... 55

Procedimiento de la Investigación..... 55

Recolección del material vegetal..... 55

Preparación de los extractos..... 55

Tamizaje fitoquímico..... 57

Determinación de la Actividad antibacteriana por el Método de Difusión en disco (Kirby-Bauer)..... 60

Determinación de la Actividad antifúngica por el Método de Difusión en disco..... 63

Diseño de Análisis..... 65

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 66

Resultados..... 66

Estudio fitoquímico de los extractos de hexano y etanol de las flores de Melia azedarach L..... 67

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

TABLA DE CONTENIDO (Continuación) **Pág**

Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de hexano y etanol de las flores de Melia azedarach L..... 72

Discusión..... 75

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... 80

Conclusiones..... 80

Recomendaciones..... 81

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS..... 82

ANEXOS..... 89

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE FIGURAS

N° Figura		Pág
1	Familia Meliaceae…….	20
2	Algunos compuestos aislados de la familia Meliaceae..	21
3	Género *Melia*……	22
4	Algunos compuestos aislados del género *Melia*…..……	24
5	Árbol *Melia azedarach* L…….	25
6	Algunos compuestos aislados de *Melia azedarach* L….	26
7	Equipo Soxhlet…….....	33
8	Procedimiento de la obtención de los extractos de hexano y etanol a través de la técnica de reflujo en caliente……...	57
9	Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de hexano y etanol de las flores de *Melia azedarach* L……..	74
10	Resultados de la actividad antifúngica del extracto de etanol de las flores de *Melia azedarach* L……	75

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE TABLAS

N° Tabla		Pág
1	Operacionalización de la variable dependiente. Actividad antimicrobiana de los extractos de las flores *Melia azedarach* L…….	51
2	Operacionalización de la variable independiente. Composición química de los extractos de las flores de *Melia azedarach* L…….	52
3	Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC) para evaluar la actividad antibacteriana ……..…….	60
4	Antibióticos empleados como control positivo para el estudio de la actividad antibacteriana……	62
5	Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC) para evaluar la actividad antifúngica……....	64
6	Características físicas del extracto de hexano y etanol de las flores de *Melia azedarach* L……..……	66
7	Resultados del estudio fitoquímico de los extractos de hexano y etanol de las flores de la especie *Melia azedarach* L…….....	68
8	Resultados del estudio fitoquímico de los extractos de hexano y etanol de las flores de la especie *Melia azedarach* L…….....	69
9	Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de las flores de *Melia azedarach* L…….	73

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ÍNDICE DE ANEXOS

N° Figura		Pág
1	Voucher C A y P F 01……	89
2	Certificado de identificación taxonómica de *Melia azedarach* L……..	89

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

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

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE LAS FLORES DE *Melia azedarach* L.

Autores:

Andrea Rachely Caceres Diaz

Fragdimar Norielsy Peraza Melendez

RESUMEN

La especie *Melia azedarach* L. es un árbol caducifolio de 10 a 15 metros de altura perteneciente a la familia Meliaceae, conocido comúnmente como Paraíso y ampliamente distribuido por las regiones tropicales y subtropicales del mundo. El objetivo de esta investigación fue confirmar la actividad antimicrobiana y la composición química de los extractos obtenidos de las flores de *Melia azedarach* L. Los extractos de hexano y etanol de las flores se prepararon mediante la técnica de reflujo en caliente. En tal sentido, la composición química fue determinada mediante el tamizaje fitoquímico. Mientras que, la actividad antimicrobiana se evaluó a través del método de difusión en disco (Kirby-Bauer). El resultado del tamizaje fitoquímico demostró la presencia de alcaloides, triterpenos, esteroles, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, lactonas sesquiterpénicas y glicósidos cardiotónicos; la actividad antimicrobiana se evidenció frente a las cepas ATCC de *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 10000 ppm y no se observó actividad sobre *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Candida albicans* y *Candida krusei.* En los estudios anteriormente realizados no existe un reporte donde se evidencie la presencia de glicósidos cardiotónicos; Este es el primer estudio de la Actividad antimicrobiana y Composición química de los extractos de las flores de *Melia azedarach* L. del Estado Mérida - Venezuela.

Palabras clave: Meliaceae, actividad antimicrobiana, composición química.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad las plantas medicinales han sido empleadas mayormente como tratamientos en todas las sociedades. Además de ser utilizadas para cuidar y preservar la salud, presentan también diversas actividades biológicas. Por tal motivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2013 diseñó la estrategia de Medicina Tradicional y Complementaria (MTC) para el periodo 2014-2023, la cual tiene dos objetivos principales: prestar apoyo a los Estados Miembros que le permitan aprovechar la contribución mediante la MTC a la salud, el bienestar y la atención de la salud dirigido a las personas; de igual manera, promover la utilización de la MTC de una forma segura y eficaz mediante el cumplimiento de la reglamentación de los productos, prácticas y profesionales (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

www.bdigital.ula.ve

Melia azedarach L. es una planta cuyo origen no se conoce con exactitud aunque es ampliamente asociada a Asia, sin embargo, este no representa un limitante para su localización puesto que tiene la capacidad de crecer en diferentes climas, incluyendo los tropicales, templados, cálidos y estaciones secas en las que soportan temperaturas desde 30 °C hasta los 5 °C. Se caracteriza por ser un árbol cuya altura oscila entre los 6 a 20 metros, lo que favorece su uso como sombra gracias a su capacidad de crecer en diversos suelos, ya sean naturales o cultivados. Presenta una madera suave y de color rosa-marrón amarillento muy parecido a la caoba, además de ser resistente y fácil de trabajar, su duración puede variar entre 1 a 15 años en el suelo, siendo un factor atractivo y que explica su uso en la carpintería decorativa y funcional. No obstante, su composición química favorece la aparición de diversas actividades biológicas, que han sido ampliamente utilizados por sus efectos medicinales en el hombre (Calderón, 2020).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

El estudio de los productos naturales y sus metabolitos secundarios han tomado gran valor a lo largo del tiempo debido a que permite conocer las diversas actividades biológicas que estos presentan, permitiendo así, el desarrollo de nuevas terapias farmacológicas que permitan salvaguardar la salud de la población mundial. En este orden de ideas, el estudio de la actividad antimicrobiana que pueden presentar los extractos vegetales ha tomado gran importancia en el mundo científico, el cual busca cada día nuevos compuestos farmacológicos que permitan controlar las enfermedades, este interés ha tomado impulso debido a la rápida aparición de resistencia por parte de los microorganismos a las terapias ya existentes (Marcano y Hasegawa, 2018).

El objetivo general de esta investigación será Confirmar la actividad antimicrobiana y la composición química de los extractos obtenidos de las flores de *Melia azedarach* L.

www.bdigital.ula.ve

El siguiente trabajo de investigación ha sido estructurado en V capítulos. El Capítulo I, titulado El Problema, está constituido por: Planteamiento del Problema, Justificación de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II, llamado Marco Teórico, corresponde a: Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las variables e Hipótesis. El Capítulo III, denominado Marco Metodológico, comprende: Tipo de investigación, Diseño de Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Instrumento de recolección de datos, Procedimiento de la Investigación y Diseño de Análisis. El Capítulo IV, constituido por: Resultados y Discusión. Finalmente, el Capítulo V que abarca: Conclusiones, Recomendaciones y Referencias Bibliohemerográficas.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Desde tiempos históricos los seres humanos han utilizado variedades de plantas con efectos medicinales para el tratamiento de diversas enfermedades que permanecían de forma persistente en su entorno. Es así como los productos naturales han ejercido un papel importante en el desarrollo de diversos fármacos, siendo la actividad antimicrobiana uno de los mecanismos que ha causado mayor interés en la medicina al pasar de los años; la cual es estudiada por ser capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos, tales como bacterias u hongos, impidiendo así que estos causen enfermedad (Porcel, 2020; Corzo, 2012).

www.bdigital.ula.ve

De esta manera, la actividad antimicrobiana ha sido clasificada de acuerdo al tipo de microorganismo a estudiar. La actividad antibacteriana, encargada de inhibir el crecimiento o destruir a las bacterias causantes de infecciones y la actividad antifúngica conocida como un método que busca evaluar el efecto antimicótico que presenta cierta sustancia o extracto (De la Fuente, Villarreal, Díaz y García, 2015; Gregorí 2005).

Por otra parte, Gregorí (2005) define el antifúngico como cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien sea directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

El uso de las plantas en el área farmacéutica ha tomado un mayor impulso en las últimas décadas por la capacidad que tienen para sintetizar distintos metabolitos secundarios, los cuales les proporcionan diversos mecanismos de defensa, entre los que destacan compuestos como terpenos, fenoles, compuestos nitrogenados y azufrados, siendo obtenidos por la industria en concentrados denominados extractos vegetales y utilizados en las terapias farmacológicas (Carrión y García, 2010; Mesa, Marín, Ocampo, Calle y Monsalve, 2019).

El árbol del paraíso, *Melia azedarach* L., constituye una de las especies más utilizadas siendo considerado un árbol multipropósito gracias al amplio uso que el proporciona, destacando las diversas propiedades medicinales que presenta, como lo son las antimicrobianas (Falasca, Ulberich y Miranda, 2015).

www.bdigital.ula.ve

Es por ello que con base al sustento en la literatura, los autores de esta investigación formulan el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál será la relación entre la actividad antimicrobiana y la composición química de los extractos de las flores de *Melia azedarach* L.?

Justificación de la Investigación

La justificación debe responder a los por qués o razones de la investigación. De esta manera, los autores identificaron razones por las cuales se ratifica la importancia de esta investigación, tales como: la especie *Melia azedarach* L. es considerada exótica agroforestal, sin embargo, entre sus diversos fines sobresale el uso medicinal e insecticida que se le ha otorgado a través de los años y que se mantiene hasta la actualidad (Falasca y cols., 2015). Además, el estudio que se ha llevado a cabo acerca de los

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

metabolitos secundarios presentes en los extractos de este producto natural, permite confirmar el uso de la especie en estudio como una opción terapéutica para tratar infecciones de tipo bacteriana o micótica. En el mismo orden de ideas, el uso de la especie *Melia azedarach* L. ha sido foco de interés científico al observar que su alto contenido en alcaloides le otorga la característica de ser un antibiótico altamente eficaz para el control de bacterias grampositivas y gramnegativas y como tratamiento de enfermedades micóticas (Farook y cols., 2019; Kathiresham, Priya, Jasmine, Gayathri, y Ramesh, 2019).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la actividad antimicrobiana y la composición química de los extractos de las flores de *Melia azedarach* L.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos de hexano y etanol a partir de las flores de *Melia azedarach* L. mediante la técnica de reflujo en caliente.
- Identificar mediante tamizaje fitoquímico los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos de las flores de *Melia azedarach* L. a través de pruebas químicas de coloración y/o precipitación.
- Determinar la actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* de los extractos obtenidos de las flores de *Melia azedarach* L. a través del método de difusión en disco (Kirby-Bauer), con cepas de referencia ATCC.

www.bdigital.ula.ve

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

Los alcances hacen referencia a la profundidad del estudio, es decir, al grado de elaboración. Por consiguiente, el alcance de la investigación estuvo representado por el análisis de la composición química de los extractos obtenidos de las flores de *Melia azedarach* L. para evaluar su actividad antimicrobiana, dando como resultado la confirmación de su acción inhibitoria

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

frente a diversas cepas microbianas, permitiendo así aportar nueva información de interés en el área farmacéutica.

Limitaciones de la Investigación

Las limitaciones representan los factores externos al equipo de investigadores y se convierten en obstáculos que pudieran colocar en peligro el desarrollo del estudio. De tal forma, en la presente investigación, es importante considerar los aspectos relacionados con las teorías y los trabajos previos que la sustentan. También existen limitaciones referentes a los elevados costos de materiales y reactivos necesarios para la elaboración del trabajo de investigación; así como, problemas eléctricos y de internet, que complicaron la búsqueda de información. Igualmente, la dificultad para la recolección del material vegetal debido a la escasa cantidad de árboles presentes en el estado.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Hemdan y cols., (2023), publicaron un trabajo titulado: Extractos bioactivos de hojas de *Azadirachta indica* y *Melia azedarach* con actividad anti-SARS-CoV2 y antibacteriana. El objetivo del estudio fue evaluar las actividades anti-SARS-CoV-2, antibacterianas y su perfil fenólico por medio de fracciones de acetato de etilo frente al virus pandémico SARS-CoV-2 y algunas cepas bacterianas patógenas seleccionadas. Las hojas frescas de *Azadirachta* L. y *Melia azedarach* L. fueron recolectadas y envueltas inmediatamente en envases de plástico después de secarlas al aire. La extracción se realizó mediante el método de extracción en frío, las hojas se empaparon por separado con disolvente metanol al 80 % durante 72 horas, posteriormente dicho disolvente fue eliminado por completo mediante el rotavapor, el extracto se traspasó a un embudo de decantación para completar el proceso de desgrasado utilizando éter de petróleo (40 - 60 °C) y el fraccionamiento utilizando acetato de etilo repetidamente, para finalmente concentrarlas en un evaporador rotatorio a 40 °C. Para caracterizar la composición química de la fracción de acetato de etilo se utilizó el método de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), mientras que los compuestos principales se evaluaron mediante cromatografía en columna de gel de sílice eluyendo con *n*-hexano al 100 % y diferentes proporciones de mezcla de acetato de etilo y metanol. La evaluación de la actividad del virus anti-SARS-CoV-2 se realizó mediante la línea celular de riñón de mono Vero-E6 el cual fue cultivado en medio de Eagle modificado de Dulbecco para el

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

crecimiento, complementado con una mezcla de penicilina/estreptomicina al 1 % y suero bovino fetal al 10 %; la solución de los extractos de las especies examinadas se establecieron en DMSO al 10 % y se diluyó en diluciones seriadas con DMEM (1 µ/mL – 10 mg/mL) para estimar la mitad de la concentración citotóxica máxima (CC_{50}) y la concentración inhibidora media (CI_{50}). El potencial bactericida de 50 µg/mL de *A. indica* L. y *M. azedarach* L. se evaluaron mediante ensayos de disco y de difusión en pozo mediante la formación de una zona de inhibición. Luego, se utilizó el enfoque de microdilución en caldo para estimar los valores de concentración inhibitoria mínima, las cepas bacterianas utilizadas fueron *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella entérica* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) que representan bacterias gramnegativas; *Listeria monocytogenes* (ATCC 3552), *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 43845) que representan bacterias grampositivas. El análisis descubrió la existencia de 10 y 11 fenólicos en *A. indica* L. y *M. azedarach* L. respectivamente, así como la presencia de 4 flavonoles. Los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana mediante el ensayo de la zona inhibidora indicó que a una concentración de 50 µg/mL de *A. indica* L. y *M. azedarach* L. presenta un alto potencial inhibitorio frente a cepas gramnegativas, además para la determinación de la CIM estos extractos demostraron que a diversas concentraciones (10 - 100 mg/mL) y durante diferentes tiempos de exposición (5, 10, 20 y 30 minutos) manifiestan un notable efecto bactericida, demostrando que el extracto de *M. azedarach* L. tiene un claro efecto bactericida frente a *E. coli* (CIM= 50 mg/mL en 30 min), *S. enterica* (CIM= 25 mg/mL en 30 min), *P. aeruginosa* (CIM= 50 mg/mL en 30 min), *S. aureus* (CIM= 75 mg/mL en 30 min), *E. faecalis* (CIM= 75 mg/mL en 30 min) y *L. monocytogenes* (CIM= 100 mg/mL en 30 min). La caracterización química demostró que ambas especies son ricas en compuestos fenólicos y flavonoides, además la evaluación *in vitro* reveló que

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

tienen una sólida actividad tanto antiviral como antibacteriana contra un espectro más amplio de bacterias grampositivas y gramnegativas. Este trabajo se incluye como antecedente ya que estos datos subrayan el valor medicinal de amplio espectro de *M. azedarach* L. incentivando a nuevas investigaciones.

Tuan y cols., (2022), realizaron un trabajo titulado: Los Limonoides y otros constituyentes de los frutos de *Melia azedarach* y su actividad biológica. El objetivo del estudio fue analizar los componentes y la actividad biológica de los frutos de *Melia azedarach* L. Los frutos de *Melia azedarach* fueron secados al aire, extraídos con metanol utilizando un sonicador para proporcionar metanol bruto el cual se suspendió en agua y se repartió sucesivamente en *n*-hexano, diclorometano y acetato de etilo. Posteriormente, la fracción obtenida se determinó por cromatografía en una columna de gel de sílice eluyendo con *n*-hexano/acetato de etilo (100/1 a 0/1 v/v) para proporcionar siete fracciones. Los compuestos aislados se disolvieron en DMSO al 2 % con un intervalo de concentración de 62,5 - 500 µg/mL para ser probados mediante la técnica de comida envenenada con el fin de determinar su actividad antifúngica *in vitro* frente a cuatro hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Magnaporthe grisea*, *Phytophthora* spp., y *P. capsici*, la concentración inhibidora media (CI_{50}) contra el crecimiento micelial se calculó mediante el análisis Probit del software WINPEPI. Se identificaron 11 componentes químicos, los cuales se purificaron con la combinación de técnicas cromatográficas para dilucidar la estructura del nuevo compuesto aislado al cual denominaron trichilinina G. En cuanto al estudio de la actividad antifúngica se demostró que las especies de hongos mostraron una mayor sensibilidad a los compuestos: trichilinina G y meliatoxina B1. La trichilinina G con una concentración de 500 µg/mL ejerció una actividad antifúngica de débil a moderada contra los cuatro hongos a

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

prueba inhibiendo el 52,8 %; 27,2 %; 31,9 % y 34,5% del crecimiento micelial de *F. oxysporum*, *M. grisea*, *Phytophthora* spp. y *P. capsici*, respectivamente. Se determinó que los valores de CI_{50} calculados de la meliatoxina B1 eran 103,8 µg/mL para *Phytophthora* spp. y por debajo de 62,5 µg/mL para *P. capsici*, respectivamente. En conclusión, la especie *Melia azedarach* presenta una diversidad de compuestos químicos que favorecen la presencia de las diversas actividades biológicas que la caracterizan, este estudio logró demostrar la presencia de 11 componentes químicos, incluido un nuevo triterpenoide denominado trichilinina G, a partir del extracto de frutos de esta especie, su estructura fue establecida mediante varios análisis espectroscópicos y espectrométricos de masas. Los compuestos que presentaron una mejor actividad antifúngica fueron la trichilinina G y la meliatoxina B1, en el que esta última demostró la mejor actividad antifúngica en el estudio frente a *Phytophthora* spp. y *P. capsici*. El presente estudio se incluye como antecedente debido a la presencia de una efectiva actividad antifúngica frente a las cepas fúngicas evaluadas.

www.bdigital.ula.ve

Bakht, Bukhari, Iqbal y Shafi (2021), presentaron un trabajo titulado: Potencial antimicrobiano *in vitro* de muestras de hojas y frutos de *Melia azedarach*, de importancia medicinal. El objetivo general del estudio fue evaluar la actividad antibacteriana y antifúngica de las hojas y los frutos de *Melia azedarach*. Los materiales vegetales (hojas y frutos) de *Melia azedarach* L. se recolectaron y lavaron a fondo con agua destilada, se secaron a la sombra y se trituraron con un molinillo eléctrico. Para la preparación del extracto crudo, las muestras se remojaron por separado en 5 litros de metanol por 7 días agitando 3 veces por día para asegurar la disolución completa de los compuestos bioactivos. Posteriormente se filtraron y se secaron a 45 °C a presión de vacío mediante evaporador rotatorio, el extracto se dividió en dos partes, uno se utilizó como extracto metanólico

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

crudo. La otra parte se fraccionó con diversos solventes y se sometió a un evaporador rotatorio a 45 °C para obtener los extractos secos de *n*-hexano, acetato de etilo, *n*-butanol y acuoso. Se utilizó agar nutritivo para el cultivo y crecimiento y caldo nutritivo para la incubación por agitación y estandarización de diferentes microorganismos. Para la determinación antimicrobiana se empleó el método de difusión en disco, utilizando un inóculo estandarizado (1-2x10^7 UFC/mL-1 0,5 MacFarland Standard) en condiciones estériles, soluciones madres de los extractos a diferentes concentraciones (1, 2 y 3 mg por disco) en DMSO estéril, y se sellaron e incubaron a 37 °C por 24 horas, se utilizaron antibióticos como control positivo y DMSO como control negativo. La actividad antimicrobiana de las muestras de hojas de *Melia azedarach* L. reveló que los extractos de metanol crudo redujeron eficazmente a *Bacillus subtilis* mostrando una zona de inhibición (ZI) del 70 % a una concentración de 3 mg/disco. *Staphylococcus aureus* fue más sensible al extracto de *n*-butanol con una zona de inhibición de 67 % a una concentración de 3 mg/disco, seguido de unas ZI de 63 %, 51 % y 28 % de los extractos de acetato de etilo, *n*-hexano y metanol crudo respectivamente. Se observó una mayor ZI de 48 % frente *Escherichia coli* para el extracto de *n*-hexano con una concentración de 3 mg/disco, mientras que para los extractos de metanol crudo, acetato de etilo y *n*-butanol se observó una ZI de 48 % y 39 % para los tres últimos. Asimismo, *Klebsiella pneumoniae* presentó una ZI de 55 % frente al extracto *n*-butanol a 3 mg/disco. *Pseudomonas aeruginosa* presentó una mayor inhibición de 55 % con los extractos de *n*-butanol y acetato de etilo a una concentración de 3 mg/disco, mientras que para el extracto de metanol a la misma concentración presentó una ZI de 41 %. Por último, el extracto de acetato de etilo inhibió en un 54 % a *Candida albicans* al utilizar una concentración de 2 y 3 mg/disco. Por otra parte, el estudio de los extractos provenientes de la muestras de los frutos de *Melia azedarach* L. lograron inhibir en un 63 % a *B. subtilis* al ser

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

tratado con acetato de etilo a una concentración de 3 mg/disco. Para *S. aureus* se observó una mayor inhibición de 60 % con el extracto de acetato de etilo a 3 mg/disco, mientras que con *n*-butanol (3 mg/disco), acuoso y *n*-hexano (1 mg/disco) se observaron unas ZI de 54 % y 23 % respectivamente. Se observó una ZI de 60 % con el extracto de acetato de etilo (3 mg/disco) frente a *E. coli*, así como unas ZI de 48 % y 22 % con los extractos de *n*-butanol y metanol crudo a igual concentración. El extracto de *n*-butanol (3 mg/disco) demostró una ZI de 80 % y 58 %, mientras que el de acetato de etilo (3 mg/disco) una ZI de 55 % y 52 % para *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* respectivamente. Para finalizar, evaluaron los extractos de acetato de etilo (3 mg/disco) y de metanol crudo (1 mg/disco) frente a *C. albicans* demostrando una ZI de 88 % y 23 % respectivamente. Los autores concluyeron que los microorganismos ensayados mostraron una alta sensibilidad a las muestras de *n*-butanol y acetato de etilo derivadas de las hojas y frutos de *Melia azedarach* L., en contraparte estos microorganismos mostraron resistencia al extracto acuoso de las hojas, mientras que presentaron una sensibilidad moderada al derivado de los frutos. Este trabajo se incluye como antecedente por la alta presencia de la actividad antimicrobiana presente en los extractos evaluados a diversas concentraciones.

www.bdigital.ula.ve

Mwale, Makunike y Mangoyi (2019). Publicaron un trabajo titulado: Actividad antibacteriana de las hojas de *Melia azedarach* L. contra *Salmonella typhi* y *Streptococcus pneumoniae.* El objetivo del estudio fue evaluar el uso de las hojas de *Melia azedarach* L. con fines medicinales determinando su actividad antibacteriana contra *S. pneumoniae* y *S. typhi*, el agente causante de la fiebre tifoidea. Las hojas verdes fueron recolectadas y se secaron al aire libre, se molieron hasta obtener un polvo fino y se almacenaron en recipientes herméticos a temperatura ambiente. Los

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

extractos se realizaron durante 3 días a partir del polvo obtenido, el cual se dividió en 5 porciones iguales añadiendo a cada porción un disolvente (diclorometano, acetato de etilo, etanol, hexano y metanol) y se mezclaron bien. La mezcla se filtró utilizando papel de filtro, algodón y se recogió el filtrado. A continuación, se dejaron evaporar los disolventes a temperatura y presión ambiente. Los extractos secos se almacenaron en refrigeración a 4 °C hasta el momento de su utilización. Para la determinación de los extractos contra *S. typhi* y *S. pneumoniae* se utilizó el ensayo de difusión en disco de agar para determinar la susceptibilidad de la especie mezclando regularmente el contenido y posteriormente se impregnaron discos de papel de filtro estéril (6 mm) con 500 µg de extracto crudo de cada disolvente. Los inóculos de *S. typhi* y *S. pneumoniae* se prepararon hasta una concentración final de 10^6 UFC/mL utilizando el estándar de McFarland 0,5M y se vertieron en placas de agar. Los disolventes puros utilizados para la extracción se utilizaron como controles negativos. Los efectos de los extractos de *Melia azedarach* L. sobre el crecimiento de *S. typhi* y *S. pneumoniae* se muestran mediante zonas de inhibición, conociendo que las concentraciones inhibitorias mínimas para el etanol y el hexano frente a *S. typhi* fueron < 1 µg/mL y 15,6 µg/mL respectivamente, mientras que sus concentraciones bactericidas mínimas fueron 31,25 µg/mL y 250 µg/mL. Las CIM de los extractos de diclorometano y hexano contra *S. pneumoniae* fueron de 31,25 µg/mL y 62,5 µg/mL respectivamente, mientras que sus CBM fueron de 31,25 µg/mL y 125 µg/mL. El extracto de hexano a 500 µg inhibió ambas especies de bacterias, siendo *S. pneumoniae* la más inhibida. El extracto de etanol a una concentración de 500 µg inhibió a *S. typhi* y el diclorometano con igual concentración sólo inhibió a *S. pneumoniae*. Los extractos de metanol y acetato de etilo no mostraron ninguna actividad inhibidora contra estas dos especies bacterianas. Aunque ambos extractos de las plantas inhibieron las especies bacterianas, los efectos fueron menores que los de la

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

estreptomicina, un antibiótico conocido, excepto en el caso del extracto de hexano, que mostró una zona de inhibición de 17 ± 4 mm contra *S. typhi*, mientras que la estreptomicina tenía 12 ± 2 mm. La ineficacia de algunos antibióticos, como la ciprofloxacina en el tratamiento de la fiebre tifoidea, y la penicilina, los macrólidos y las cefalosporinas en el tratamiento de las infecciones por neumococos, ha llevado a investigar las propiedades antibacterianas de los fitocompuestos presentes en las plantas siendo el caso de la *S. typhi* y el *S. pneumoniae* que se han vuelto cada vez más multirresistentes al desarrollar diversos mecanismos para defenderse de los efectos de los fármacos. Este trabajo se relaciona como antecedente ya que los autores estudiaron la misma especie, mostrando como resultado una amplia actividad biológica.

Kathiresham y cols., (2019). Llevaron a cabo un trabajo titulado: Evaluación de las actividades antibacterianas y antifúngicas *in vitro* de extractos foliares de *Melia azedarach* Linn. El objetivo del presente estudio fue analizar *in vitro* la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de las hojas de *Melia azedarach* L. Las hojas secas se pulverizaron, se llenó el extractor de Soxhlet con 100 g de polvo de hojas y se cargó el matraz de fondo con 2 litros de disolvente como etanol, metanol y acetona por el método de percolación en caliente durante 72 horas. Los extractos se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y se cargaron en los pozos con concentraciones de 50, 100, 150 y 200 µg/mL. La actividad antibacteriana y antifúngica se midió mediante el ensayo de difusión en pozos de agar, microdifusión y microdilución en caldo, contra diferentes bacterias y hongos patógenos. Se realizó una bioautografía dirigida por cromatografía en capa fina para determinar los fitoquímicos de los extractos y su actividad antimicrobiana. Entre los diversos extractos probados con concentraciones de 50, 100, 150 y 200 µg/ml, el extracto de etanol mostró una actividad

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

antimicrobiana significativa y una zona de inhibición de 16 mm contra *Bacillus subtilis*, 15 mm contra *Staphylococcus aureus*, 14 mm contra *Vibrio cholerae* y *Klebsiella pneumoniae*, y de 12 mm contra *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, con una concentración inhibitoria mínima de 250 µg/mL contra *Aspergillus niger* y *Candida albicans*. Los fitocompuestos del extracto de etanol se separaron mediante cromatografía de capa fina (CCF) mostrando siete manchas; la bioautografía de CCF mostró una única banda con actividad antibacteriana y el fitocompuesto fué aislado e identificado como 5,6,7,8-tetrahidro-1,2,4-benzotriazina-3-amina mediante un análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas, el cual podría ser el responsable de la actividad antimicrobiana. Por último, concluyeron que los extractos de las semillas de *Melia azedarach* L podrían ser un antibiótico eficaz, tanto en el control de bacterias grampositivas y gramnegativas como para el tratamiento de enfermedades causadas por hongos patógenos. Este trabajo se incluye como antecedente ya que guarda relación con el tema en cuanto a las actividades evaluadas.

www.bdigital.ula.ve

Farook y cols., (2019). Presentaron un trabajo titulado: Cribado fitoquímico, actividad antibacteriana y antioxidante de *Melia azedarach* L. El objetivo fue confirmar que la *Melia azedarach* L. contiene alcaloides, carbohidratos, taninos, saponina, terpenoides, oxalato, glucósido, ausencia de aminoácidos, fenoles, flavonoides, quinonas y cumarina con actividad antibacteriana. Las hojas de *Melia azedarach* L. se recolectaron y fueron lavadas con agua para eliminar las partículas de polvo, se secaron a la sombra a temperatura ambiente y se redujeron a polvo grueso utilizando un mezclador mecánico. El polvo se sometió a extracción por maceración utilizando diversos disolventes y agua para obtener sus respectivos extractos. Se añadieron 10 g de polvo de planta seca en 100 mL de disolvente (acetona, benceno, metanol y agua) y se agitó ocasionalmente en

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

un agitador orbital. La mezcla se filtró el segundo día y el disolvente se evaporó a temperatura ambiente durante 18-24 horas para obtener una masa sólida, que se almacenó en el frigorífico (4 °C) para su uso posterior. La actividad antibacteriana de los extractos se evidenció mediante el método de difusión en disco en el cual se utilizó para la prueba *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus*. El estudio fitoquímico reveló que la especie Melia azedarach contiene alcaloides, carbohidratos, taninos, saponina, terpenoides, oxalato y glucósido en el extracto de acetona; alcaloides, carbohidratos, fenol, saponina, terpenoides, cumarina y glucósido en el extracto de benceno; alcaloides, carbohidratos, taninos, saponinas, terpenoides y oxalato presentes en el extracto de metanol. También identificaron alcaloides, aminoácidos, fenoles, flavonoides, terpenoides y quinonas en el extracto acuoso de *Melia azedarach.* Los extractos utilizados de la especie muestran actividad contra los patógenos analizados con la mayor zona de inhibición para *Staphylococcus aureus* (10 mm) *Escherichia coli* (9 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (7 mm) *Bacillus subtilis* (5 mm) para el extracto de acetona *Staphylococcus aureus* (6 mm), *Bacillus subtilis* (5 mm), *Escherichia coli* (5 mm) y *Pseudomonas aeruginosa* (4 mm). El extracto de benceno mostró que *Staphylococcus aureus* (16 mm), *Escherichia coli* (13 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (9 mm) y *Bacillus subtilis* (6 mm) son resistentes al extracto acuoso de *Melia azedarach* al igual que *Pseudomonas aeruginosa* (6 mm) y otros patógenos utilizando el extracto de metanol como disolvente. Este trabajo se incluye como antecedente debido a que los autores lograron confirmar que *Melia azedarach* L. es rico en alcaloides y también en compuestos fenólicos, lo que demuestra que tiene un alto contenido de compuestos medicinales con actividad antibacteriana, por lo que puede utilizarse como antimicrobiano natural de origen vegetal.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Antecedentes Históricos

Las plantas tienen importancia vital para el ser humano, acompañándolo a lo largo de su vida. Se conoce desde la antigüedad la utilización de sus diferentes partes como la semilla, corteza, tallo, vaina, capullo y hojas, aprovechando con mayor concentración el aroma y sabor en los medicamentos, conservantes, sazonador o aderezo de perfumes. En tal sentido, las plantas fueron las primeras medicinas utilizadas por el hombre para la cura de las enfermedades que padecía. Las civilizaciones antiguas utilizaban las plantas en su vida cotidiana, el desconocimiento de su composición no delimitaba su aplicación en diferentes fines, evidencias demuestran su uso en el antiguo Israel durante sus celebraciones religiosas; en el Egipto de los faraones se utilizaba para las momificaciones y embalsamamiento; en la antigua China se empleaba la canela para los procesos de invocación de los espíritus ancestrales y en la Europa medieval tomó gran importancia el uso de la nuez moscada durante la peste, para el tratamiento de la misma (Porcel, 2020).

www.bdigital.ula.ve

A través del tiempo el hombre ha encontrado en los recursos naturales la solución a diferentes problemáticas. Es así como los productos naturales han desempeñado un papel importante en el desarrollo de fármacos, los cuales han sido la base de las primeras medicinas permitiendo el descubrimiento de diferentes productos, entre ellos los antibacterianos; como ejemplo de ello existen alcaloides muy conocidos como la cafeína, la codeína, la gramicina, primer antibiótico obtenido de bacterias del suelo; la insulina, purificada de extractos pancreáticos de animales; y el ácido salicílico, analgésico extraído por primera vez de la corteza del sauce y antecesor del ácido acetilsalicílico (Corzo, 2012).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

De este modo han surgido importantes estudios sobre las plantas de Meliaceae en busca de sus metabolitos secundarios, en los que destacan compuestos como triterpenoides, sesquiterpenoides, alcaloides, flavonoides y quinonas aislados de la planta y de sus hongos endófitos proporcionando información importante sobre la identificación de especies, así como del aislamiento de compuestos y su papel en la medicina mediante las actividades biológicas presentes, los cuales incluyen efectos citotóxicos, antiplasmodiales, antimicrobianos, antidiabéticos, antivirales y antiiflamatorios (Mulyani, Sinaga y Supratman, 2023; Riyadi, Naini y Supratman, 2023).

Por otro lado, estudios revelan que a partir de las flores de *Melia azedarach* Linn se identificaron los componentes de 8 extractos y fracciones diferentes mediante CG-EM, siendo 38 compuestos identificados por primera vez en las flores, en el que solo 14 de ellos se conocían en partes del árbol distintas de la flor y 24 se reportaron por primera vez en cualquier parte de la especie. Además, analizaron el potencial antimicrobiano evaluando de esta forma los extractos de las flores contra hongos como las especies de *Candida, Microsporum, Penicillum, Rhizopus y Aspergillus* en las cuales observaron que dichos extractos solo inhibieron el crecimiento de hongos dermatofitos; por su parte para evaluar la actividad antibacteriana les resultó de importancia utilizar diferentes extractos incluyendo el de flores, estudiado en dieciséis bacterias gramnegativas incluidas las especies *de Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Salmonella* y *Shigella* demostrando que solo el metanol mostró actividad contra *Pseudomonas* sp (Muhammad y cols., 2015).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Bases Teóricas

Familia Meliaceae

TAXONOMÍA

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Meliaceae
(Valera, 2010)

Figura 1. Familia Meliaceae.
Tomado y modificado de Botanic Gardens.

www.bdigital.ula.ve

La familia Meliaceae engloba un conjunto de plantas y arbustos descrita por primera vez por Ventenat en 1799, las cuales presentan diversas propiedades de acuerdo al género al cual pertenezcan. Sin embargo, se encuentra emparentada con las familias Anacardiaceae, Burseraceae, Rutaceae, Sapindaceae, Simaroubaceae y Zygophyllaceae. De manera general, estos árboles son mayormente leñosos, de hojas compuestas, con flores pentámeras y presentan tejidos secretores de exudados aceitosos, resinosos y otras sustancias aromáticas en las hojas, ramas y tallos lo que los convierte en una familia de interés para la ciencia por las diversas propiedades que presentan (Figura 1) (Valera, 2010).

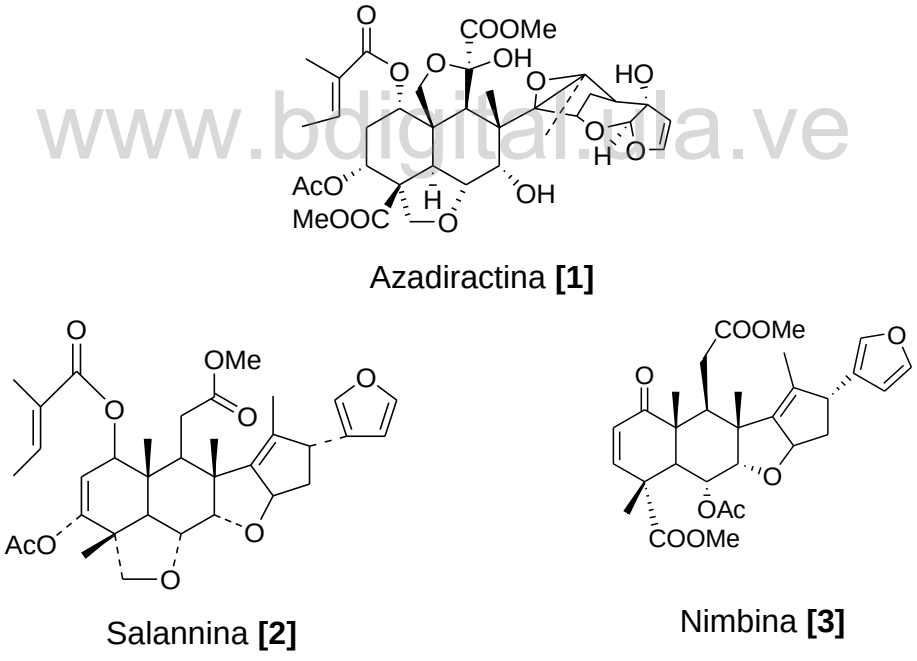
La familia Meliaceae se encuentra ampliamente distribuida en los trópicos y subtrópicos con algunas representaciones en las zonas templadas, se observa su presencia en América, Asia, África, Nueva Zelanda y la Costa oriental de Australia, siendo importante destacar su existencia en Venezuela.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Comprende alrededor de 50 géneros y 550 especies aproximadamente (Villalobos, 2011).

Estas plantas se caracterizan por producir una variedad de metabolitos secundarios, siendo uno de los más importantes los limonoides especialmente la azadiractina **[1]**, así como la salannina **[2]** y nimbina **[3]** (Figura 2) caracterizados por poseer actividad antialimentaria, aunque también se han logrado aislar otros compuestos químicos, tales como: flavonoides, taninos, quinonas, saponinas, alcaloides y antocianinas (Araiza, 2001; Rojas, Pérez, Martínez, y Mieles, 2012).

www.bdigital.ula.ve



Azadiractina **[1]**

Salannina **[2]**

Nimbina **[3]**

Figura 2. Algunos compuestos aislados de la familia Meliaceae.
Tomado y modificado de Fong, Berenguer, De la Vega, Wawoe y Puente, 2014; Araiza, 2001.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

La familia de Meliaceae contiene varias especies altamente explotadas por la calidad de su madera para la fabricación de muebles, tableros, carpintería y leña; sin embargo, es aceptada fácilmente por las comunidades debido a que es considerada un árbol multipropósito, ya que es utilizado para sombra, cortavientos en plantaciones de avenidas y se le da un uso ornamental. Además, presenta importantes actividades biológicas, siendo utilizado como insecticida, antimicrobiano, antiviral, antipalúdica, antiparasitaria, anticonceptivo antifoliculogénico y citotoxicidad debidamente probada (Calderón, 2020).

Género *Melia*

El género *Melia* fue descrito por primera vez por Carlos Linneo en 1753, está constituido por una diversidad de árboles que oscilan entre los 15 a 20 metros de altura, comparten la mayoría de las características propias de la familia, distinguiéndose por la morfología de sus flores, frutos y semillas. Se encuentra distribuida en climas tropicales y subtropicales; aunque se ha naturalizado con facilidad a diversos climas desde cálidos hasta húmedos, por ello se encuentra ampliamente distribuida en diferentes estados venezolanos (Figura 3) (Varela, 2010; Villalobos, 2011).

www.bdigital.ula.ve

TAXONOMÍA

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Sapindales

Familia: Meliaceae

Género: *Melia*

(Varela, 2010; Villalobos, 2011).

Figura 3. Género *Melia*.
Tomado y modificado de Botanic Gardens.

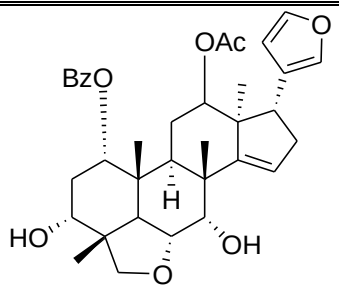
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Se han logrado aislar e identificar varios tipos de compuestos químicos de diferentes partes de las plantas provenientes del género *Melia* incluidos los limonoides, alcaloides, flavonoides, antraquinonas, terpenos/esteroles, saponinas, taninos, antocianina y compuestos fenólicos (Rojas y cols., 2012; Calderón, 2020; Hemdan y cols., 2023; Fan, Fan, Wang y Yang, 2022).

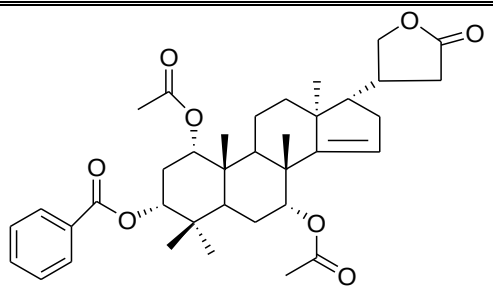
Las diversas investigaciones de tipo farmacológicas empleadas en las diferentes especies pertenecientes a este género, han demostrado la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos siendo estos los compuestos bioactivos dominantes ampliamente distribuidos en el reino animal y vegetal, específicamente se puede encontrar diversos metabolitos como derivados de Trichilinina E **[4]** aislados de la corteza de las raíces de *Melia toosedan*; Melianina C **[5]** aislada de *Melia volkensii Gürke*; Meliatoosenina A **[6]** aislada de las raíces de *Melia toosendan*; 1*α*-hidroxil-3*α*-acetil-7*α*-tigloil-12*β*-etoxilo-nimbolinina (12-etoxinimbolininaH) **[7]** que fue aislado de la corteza; Azedarachina C **[8]** (Figura 4) aislados de la corteza de *Melia toosendan* y *Melia azedarach* L.; entre otros. La gran diversidad de metabolitos secundarios presentes son los responsables de las actividades biológicas presentes en estas especies, tales como: antioxidantes, citotóxicas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antiparasitario y antifúngico (Hemdan y cols., 2023; Fan y cols., 2022).

www.bdigital.ula.ve

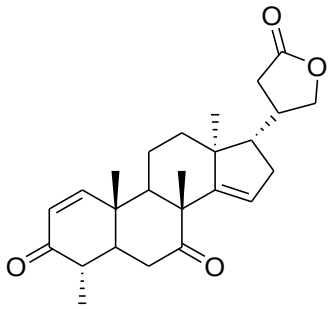
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)



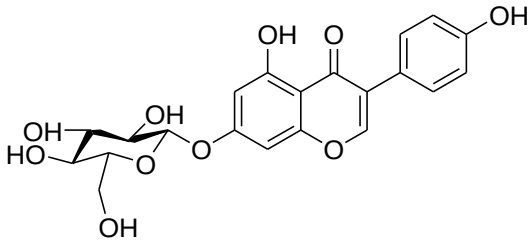
Trichilinina E **[4]**



Melianina C **[5]**

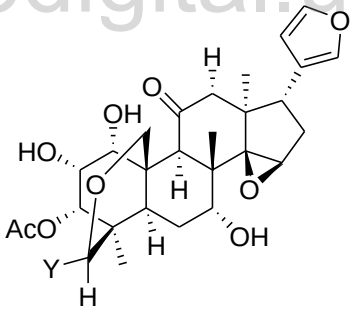


Meliatoosenina A **[6]**



1*α*-hidroxil-3*α*-acetil-7*α*-tigloil-12*β*-etoxilo-nimbolinina (12-etoxinimbolinina H) **[7]**

www.bdigital.ula.ve



Azedarachina C **[8]**

Figura 4. Algunos compuestos aislados del género *Melia.*

Tomado y modificado de Fan y cols., 2022.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Especie *Melia azedarach*

Melia azedarach L. es un árbol caducifolio que presenta entre 10 a 15 metros de altura, su tronco es recto y delgado, con una corteza oscura y fisurada y una copa globosa, sus ramas parten del inferior del tronco, con hojas alternas, pecioladas larga, bipinnadas, con foliolos ovales o lanceolados, agudos, presenta flores pequeñas, fragantes de color lila y con anteras de color amarillo, presenta crecimiento rápido y se puede cultivar en una amplia variedad de suelos bien drenados. *Melia azedarach* L. es comúnmente conocido como Paraíso, Syringa, Azedarach, Lilas, Cinnamomo, Jacinto, Aleli (Venezuela), Persian lilac, Chinatree, Umbrella tree, Chinaberry, Indian lilac, nativo del Asia tropical y ampliamente distribuido por todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo, introduciéndose especialmente en Filipinas, Estados Unidos, Brasil, Argentina, varios países africanos y árabes (Figura 5) (Rodríguez, 2018; Echevarría, 2022; Falasca y cols., 2015). Su clasificación taxonómica es:

www.bdigital.ula.ve

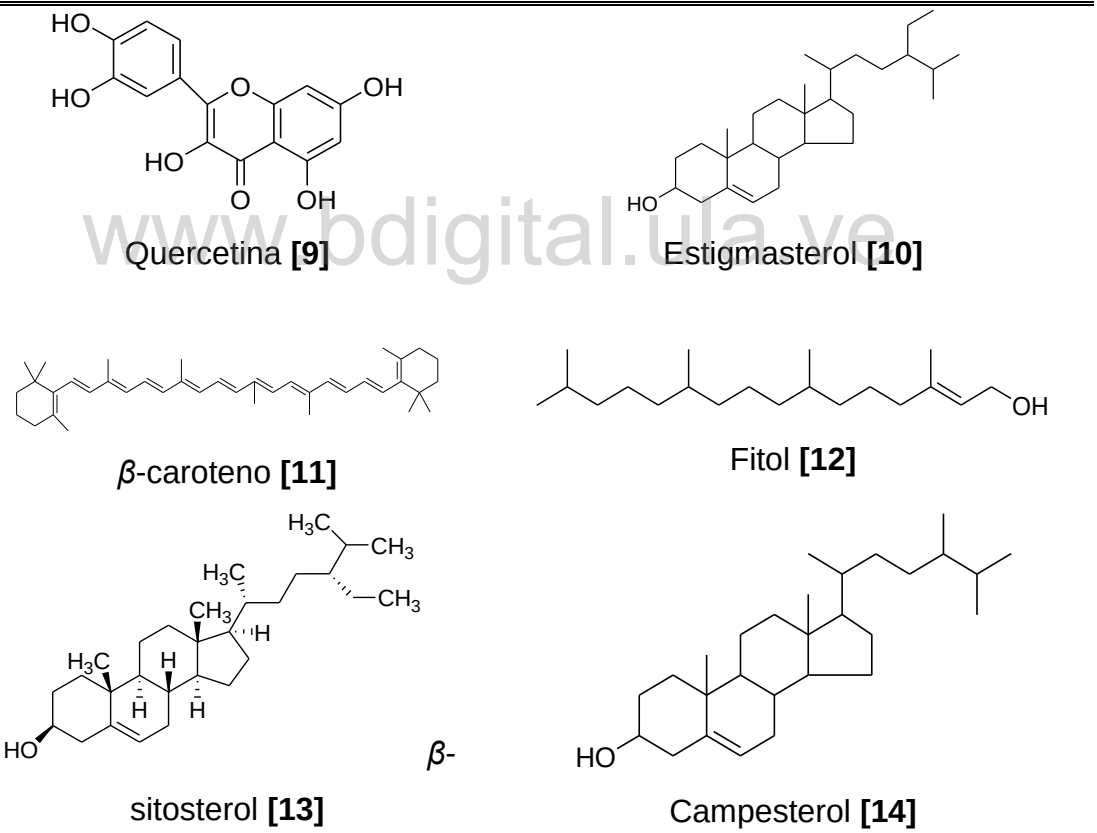
TAXONOMÍA

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Sapindales
Familia: Meliaceae
Género: *Melia*
Especie: *Melia azedarach*
(Alonzo y Luzardo, 2011)

Figura 5. Árbol *Melia azedarach* L.
Fuente: Cáceres, Peraza y Rojas, 2023.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

La especie *Melia azedarach* L. puede presentar cierta toxicidad causada por diversos factores ambientales que interfieren en la producción de sus metabolitos secundarios; de las raíces, hojas, corteza y frutos se han logrado aislar compuestos limonoides conocidos como meliacarpinas, azedarachtinas, nimbolidinas, entre otros. Se ha detectado gran variedad de compuestos en el extracto de las hojas de *Melia azedarach* L. que incluye Quercetina **[9]** (Flavonoides), Estigmasterol **[10]**, *β*-Caroteno **[11]** (fitoesteroles), Fitol **[12]** (Diterpeno), *β*-sitosterol **[13]**, y Campesterol **[14]** (Figura 6) (Alonzo y Luzardo, 2011; Echevarría, 2022).



www.bdigital.ula.ve

Figura 6. Algunos compuestos aislados de *Melia azedarach* L.
Tomado y modificado de López, 2015; Huma y cols., 2016; Meco y cols., 2016.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tiene varios usos etnobotánicos, tales como: uso ornamental por su rápido crecimiento, capacidad de dar sombra y por la producción de vistosas flores y frutos, también como fuente de madera para diversas aplicaciones de carpintería o leña, y dependiendo de la región donde se encuentre puede ser utilizado por las diversas culturas para sus rituales tradicionales. La especie *Melia azedarach* L. presenta diversas actividades farmacológicas y biológicas, destacándose las actividades: antibacteriana, antifúngica y antiviral (Baldini, Alvarado y Guajardo, 2020).

Productos naturales

Los productos naturales se definen como cualquier compuesto químico y orgánico que es sintetizado por un organismo vivo, en este caso plantas. Sin embargo, estas son capaces de sintetizar dos tipos de compuestos: los metabolitos primarios y metabolitos secundarios. En primer lugar, los metabolitos primarios o productos bioquímicos, son productos sintetizados por las plantas con el fin de ser utilizados como fuente de energía y alimentación para sí mismos, tales como: carbohidratos, lípidos, proteínas, aminoácidos, ácidos grasos, ácidos nucleicos, aminas, clorofilas e intermediarios metabólicos de las vías anabólicas y catabólicas. No obstante, las plantas también son capaces de sintetizar diversos metabolitos secundarios restringidos a un grupo taxonómico en particular, que aunque no otorgue un beneficio directo sobre sí, estos cumplen un rol ecológico, ya que pueden ser utilizados como atractores para la polinización o como defensa contra diversos microorganismo (Marcano y Hasegawa, 2018; Verde, García y Rivas, 2016; Lock, 1987).

Debido a su acción antimicrobiana, se ha despertado un interés en la ciencia por conocer a profundidad su utilidad específica para diversos

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

microorganismos, siendo importante estudiar la composición fitoquímica de las plantas, en los que destacan la determinación de compuestos alifáticos, compuestos aromáticos, terpenos, alcaloides, y antibióticos; los cuales son sintetizados mediante vías biosintéticas, siendo la vía enzimática la más utilizada ya que permite la formación de metabolitos tanto primarios como secundarios. En el mismo orden de ideas, el establecimiento de las vías biosintéticas de cada producto natural parte del conocimiento en que la composición química fundamental de un compuesto orgánico está caracterizado por la presencia de carbono e hidrógeno; no obstante, se puede encontrar relacionado con la presencia de otros compuestos, tales como: oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo y halógenos. La formación de los productos naturales parte con la fotosíntesis, el cual es un proceso endotérmico en el que se requiere de la luz solar, y que tiene lugar en plantas superiores, algas y algunas bacterias; en contra parte, aquellos organismos incapaces de absorber la luz obtienen su energía de la degradación de carbohidratos, utilizándolos como su principal fuente de carbono. De esta manera, los fragmentos pequeños obtenidos se recombinan para generar grandes moléculas dando lugar a la síntesis de los metabolitos secundarios por diversas vías (Marcano y Hasegawa, 2018).

www.bdigital.ula.ve

Extractos vegetales

Los extractos vegetales son compuestos producidos biológicamente por las plantas, preparados por la industria en concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia, derivados generalmente de material vegetal desecado. De este modo, según Carrión y García, (2010) los extractos pueden ser clasificados de acuerdo a su composición y concentración de principio activo:

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- Extractos fluidos: extractos de drogas que con la concentración prescrita de etanol, están preparados en diluciones 1:1 o 1:2; generalmente se obtienen por percolación.
- Extractos secos: extractos cuya consistencia es seca y fácilmente pulverizables, se obtienen por evaporación del disolvente y desecación del residuo.
- Extractos blandos: presentan una consistencia semisólida y una concentración de principio activo superior a la de la droga. Sin embargo, suelen ser inestables y por ello no se utilizan.
- Crioextractos: estos extractos son muy útiles debido a que sus principios activos no se ven alterados mediante su obtención por molturación, aunque el proceso suele resultar muy costoso.

Uno de los componentes más importantes es la presencia de metabolitos secundarios debido a las funciones relacionadas con los mecanismos de defensa de la planta, los cuales dependerán de la síntesis de ciertos compuestos químicos como terpenos, fenoles, compuestos nitrogenados como alcaloides y compuestos azufrados. De este modo, la obtención de los extractos dependerá no solo de la planta en estudio y la fracción que se utilice de la misma, sino además del procedimiento seleccionado para la extracción; ambas características son las encargadas de aportar la calidad de los líquidos extraídos (Mesa, Marín, Ocampo, Calle y Monsalve, 2019). Asimismo, se exponen a continuación diversos métodos que según Carrión y García, (2010) se pueden utilizar para este proceso:

www.bdigital.ula.ve

- **Percolación**

Es el método extractivo menos adecuado cuando se trata de muestras muy voluminosas, un aspecto muy importante a considerar es la humectación previa de la muestra con el disolvente antes del procedimiento, debido a que

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

su esponjamiento facilita la entrada del menstruo en las membranas celulares de la misma. En tal sentido, la percolación consiste en que el menstruo atraviesa la masa de la planta pulverizada en una sola dirección, ocasionando un desequilibrio en las concentraciones del disolvente, puesto que se encuentra de forma creciente durante todo el proceso, por consiguiente, luego de repetir el proceso seguidamente el menstruo logra que la planta ceda todos sus componentes solubles. Este tipo de extracción es llevada a cabo en cilindros o recipientes cónicos que posean dispositivos de carga y descarga, lo que permite un extracción aproximada del 95 % del total de los componentes activos de la planta en estudio.

- **Decocción**

Denominada también como cocimiento, consiste en llevar a la mezcla (planta más menstruo) a la temperatura de ebullición del agua por un tiempo entre 15 a 30 minutos.

www.bdigital.ula.ve

- **Infusión**

En este proceso la mezcla es previamente humedecida con el solvente a la temperatura de ebullición del agua durante 5 minutos, luego se deja enfriar a temperatura ambiente y finalmente se prepara al 5 %.

- **Digestión**

Es similar al proceso de la maceración, cuya diferencia radica en la temperatura a emplear, la cual oscila entre los 50 a 60 °C. Este procedimiento suele ser más eficaz debido a la temperatura empleada, ya que permite que el solvente ingrese rápidamente al interior de las células y así logre extraer los principios activos.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Por el contrario, para evaluar las propiedades de un producto vegetal, se deben aplicar métodos de extracción más complejos que permitan establecer procedimientos que sean reproducibles, con cuantificación de los principios activos determinados. Así pues, según Verde y cols., (2016) los métodos extractivos más empleados para lograr este objetivo son los siguientes:

- **Extracción por maceración**

Es un método de extracción sólido-líquido en el que el material vegetal que se desea extraer contiene compuestos solubles en el líquido de extracción. Para llevar a cabo este procedimiento, el material vegetal debe ser primeramente cortado en pequeños trozos o debe ser molido, fresco o seco se debe colocar en recipientes adecuados, añadiendo el solvente seleccionado por polaridad: hexano o éter de petróleo, cloroformo y finalmente metanol o etanol en reposo o en un equipo con agitación continua, a temperatura ambiente durante 5 días de extracción. Sin embargo, existe otra vía de para su obtención mediante una forma directa al agregar una mezcla de solventes, constituidos por metanol:cloroformo:hexano en la proporción 7:2:1 respectivamente, obteniendo así el extracto.

www.bdigital.ula.ve

- **Extracción por lixiviación**

El fundamento se basa en el desplazamiento de sustancias solubles por medio de un disolvente líquido. El procedimiento inicia con colocar el material vegetal fresco en un recipiente a temperatura ambiente durante 3 días, con acetona u otro solvente. Finalmente, se decanta y se evapora la acetona en un rotavapor.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- **Extracción por Soxhlet**

Se basa en un proceso de extracción continua de un material sólido que contiene compuestos de interés. En primer lugar, se coloca dentro de un dedal de papel filtro grueso, que se carga en la cámara principal del extractor Soxhlet (Figura 7), en el que se hace pasar el solvente. Este ciclo puede repetirse durante horas o días, dependiendo de lo que considere el investigador.

Para la extracción del material vegetal se divide en parte aérea, constituida por las flores, fruto, semillas, hojas, tallo y la raíz, debido a que el estudio fitoquímico puede realizarse de la planta completa o realizar un análisis específico, utilizando alguna de sus partes. De esta manera, la planta seca y molida se coloca en un equipo Soxhlet con éter de petróleo o hexano por un tiempo de 7 días a una temperatura que oscile entre 20 °C a 30 °C. Al terminar este tiempo, si se observa la presencia de un precipitado se debe filtrar inmediatamente, luego evaporarlo y con el mismo solvente recuperado se debe seguir lavando el precipitado y evaporándolo para poder recuperar y guardar el solvente. Se recomienda que los extractos obtenidos respectivamente, sean concentrados en un rotavapor para la recuperación del solvente y su utilización en otro proceso.

www.bdigital.ula.ve

Por otra parte, se puede llevar a cabo una extracción directa con metanol en el que se coloca el material vegetal previamente seco y molido en un soxhlet y directamente se le añade el metanol reflujando durante un periodo de 7 días, al terminar este tiempo se debe dejar enfriar el extracto, si se logra observar la formación de un precipitado, este se debe someter a filtración o decantación dependiendo del caso.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

El extracto de metanol que no forme precipitado se debe evaporar en el rotavapor a sequedad para reflujar con hexano, aproximadamente de 15 a 20 mL de hexano por gramo de extracto, por un tiempo de 2 horas, posteriormente se deja enfriar para lograr la separación soluble e insoluble en hexano. Lo insoluble en hexano se refluja con cloroformo, entre 15 a 20 mL de cloroformo por gramo de extracto, durante 2 horas, luego se deja enfriar y por último se separa la soluble e insoluble en acetato de etilo.

En aquellos extractos que son solubles en hexano, cloroformo y acetato de etilo, y el que es insoluble en acetato de etilo puede ser sometido a bioensayos para evaluar cualquier actividad biológica en las muestras e iniciar la separación de los principios activos.

www.bdigital.ula.ve

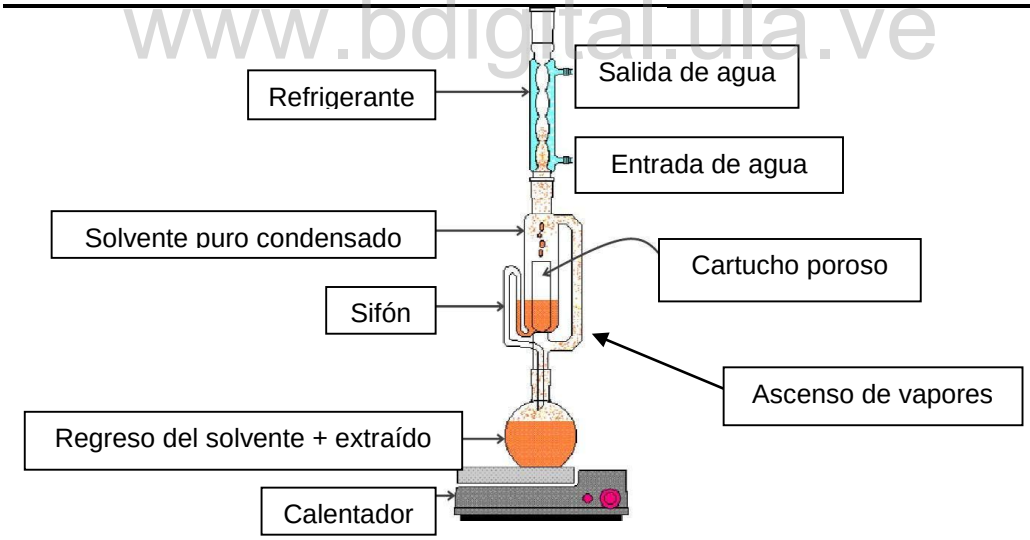


Figura 7. Equipo Soxhlet.

Tomado y modificado de Verde, García y Rivas, 2016.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- **Arrastre por vapor**

Se emplea el vapor saturado a presión atmosférico con el objetivo de extraer los compuestos orgánicos volátiles o aromáticos presente en los aceites esenciales, que pueden ser: alcoholes, cetonas, éteres, aldehídos. Al líquido acuoso obtenido del arrastre por vapor se le debe realizar la extracción con cloroformo en un aparato líquido-líquido por un tiempo de 5 días a una temperatura entre 30 °C a 40 °C, al terminar este tiempo, el extracto clorofórmico se somete a evaporación en el rotavapor y se monta en una columna para separación cromatográfica que permitirá la separación de cada compuesto necesaria para su posterior identificación.

Análisis Fitoquímico Preliminar o Tamizaje Fitoquímico

www.bdigital.ula.ve

También conocido como análisis fitoquímico preliminar, se basa principalmente en la detección e identificación de todos los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos de los diferentes productos naturales mediante diversas reacciones, análisis químicos y solventes apropiados como agua, acetona, alcohol, cloroformo y éter. Aunque en la actualidad existen técnicas más precisas y avanzadas, el análisis fitoquímico se mantiene como un método tradicional que permite la detección de compuestos químicos con una alta sensibilidad y fácil reproducción, permitiendo así poder diferenciar las plantas que contengan metabolitos de interés científico de aquellas que no las poseen (García, Tamargo, Salas, Calzadilla, Acevedo y Sierra, 2020; Castillo, Zavala y Carrillo, 2017).

Existen diversas pruebas químicas que permiten la determinación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de los productos

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

naturales, los cuales se dividen de acuerdo al compuesto químico a determinar. Entre los ensayos más utilizados tenemos:

Determinación de alcaloides: Ensayo de Dragendorff, Wagner y Mayer.

Los alcaloides se caracterizan por representar un grupo de bases vegetales nitrogenadas en un heterociclo. El análisis fitoquímico de estos compuestos se basa en la capacidad que presentan los alcaloides en estado ácido de poder precipitar al estar en contacto con soluciones que contengan yodo y metales pesados. Mayormente la determinación de estos metabolitos secundarios, se realiza con la utilización de tres reactivos: Dragendorff (Yoduro de bismuto), Mayer (Mercurio-yoduro de potasio) y Wagner (Yodo-yoduro de potasio).Estos procedimientos se basan en la capacidad de los átomos de nitrógeno de muchos alcaloides, para unirse a metales pesados formando sólidos insolubles en agua acidificada (Domínguez, 1979; Martínez, 2020).

www.bdigital.ula.ve

Determinación de saponinas: Ensayo de la Espuma

Las saponinas se caracterizan por ser un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial de ésta; por lo tanto, al sacudir sus soluciones se forma una espuma abundante y relativamente estable (Domínguez, 1979).

Determinación de compuestos fenólicos: Ensayo de Cloruro Férrico

Esta prueba permite determinar oxidrilos fenólicos los cuales producen un precipitado rojo, azul-violeta o verde al colocar en contacto la solución de la planta del extracto a evaluar con unas gotas de $FeCl_3$ al 12,5 % en agua (Espinosa, Treviño, Garza, Verde, Rivas y Morales, 2015).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Determinación de antraquinonas y quinonas

Las antraquinonas son una clase de metabolitos secundarios con una funcionalidad *p*-quinoide en un núcleo antracénico. Por su parte, las quinonas son dicetonas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles los que fácilmente las regeneran por oxidación. La determinación se realiza mediante pruebas colorimétricas, en las que tienden a dar colores rojos o púrpuras con álcalis concentrados y con ácido sulfúrico, lo que puede usarse para identificarlas (Domínguez, 1979).

Determinación de cumarinas: Ensayo de Fluorescencia

Las cumarinas son consideradas derivados de la lactona del ácido *o*-hidroxicinámico, usualmente llamada coumarina. La mayoría de estos compuestos presentan una fluorescencia azul al ser expuestas a la luz ultravioleta, sin embargo, existen ciertas moléculas que al presentar un oxígeno en la posición 7 pueden exhibir fluorescencia hasta con luz visible especialmente al ser tratadas con ácido sulfúrico (Domínguez, 1979).

www.bdigital.ula.ve

Determinación de triterpenos y esteroles: Ensayo de Lieberman-Bourchard

Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en los reinos animal y vegetal. Para su determinación en análisis fitoquímicos se emplea frecuentemente el ensayo de Liebermann-Burchard, aunque se sigue sin conocer el mecanismo. En esta prueba, a una solución de acetato de etilo de la muestra que se analiza se le debe adicionar un volumen igual de anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico concentrado al 98 % dando como resultado positivo la producción de coloraciones verdes, violetas, rojas o azules (Martínez, 2020).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Determinación de Flavonoides:

Los flavonoides son pigmentos vegetales que presentan un esqueleto carbonado, son sintetizados por una gran variedad de plantas y a excepción de algunas flavonas encontradas en las alas de las mariposas, se puede decir que no se encuentran en animales (Domínguez, 1979). La determinación de estos compuestos se puede realizar mediante dos pruebas:

1. **Ensayo de Shinoda:** Los flavonoides presentan un núcleo benzopirona o 4-cromenona el cual produce coloraciones rojizas a magenta cuando a sus disolucionas acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado (Martínez, 2020).

2. **Ensayo de NaOH al 10 %:** A través de una hidrólisis alcalina empleando NaOH al 10 %, el núcleo del flavonoide se rompe por el anillo central liberando sustancias de menor peso molecular (Martínez, 2020).

www.bdigital.ula.ve

Determinación de lactonas

Las sesquiterpenlactonas poseen un esqueleto fundamental con 15 átomos de carbono, que teóricamente deriva de la unión de tres fragmentos de isopreno (2-metilbutadieno-1,3), cabeza, cola y algunos productos de transposición; parte del esqueleto es un anillo de metilbutenólido. Para la determinación mediante el análisis fitoquímico se emplea una mezcla de extracto con NaOH al 10 % que toma una coloración amarilla, la cual desaparece al adicionar una solución ácida (Domínguez, 1979; Espinosa y cols., 2015).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Determinación de glicósidos cardiotónicos

Los glicósidos cardiotónicos son sustancias amargas derivadas de los esteroides, que actúan sobre el corazón. Estos metabolitos secundarios se hidrolizan fácilmente en soluciones ácidas liberando la sapogenina y los carbohidratos ligados (Domínguez, 1979).

Determinación de taninos: Prueba de la gelatina

Estos polifenoles tienen la propiedad de unirse a las proteínas y precipitarlas, por ello para su determinación en extractos, se emplea el reactivo de gelatina-sal, el cual produce un precipitado blanco en presencia de taninos (Carvajal, Hata, Sierra y Rueda, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares y procariotas que presentan una gran diversidad de tamaño oscilando entre 0,1-0,2 micrómetros de diámetro hasta varias micras de longitud. Aunque su tamaño promedio llega apenas a alcanzar 1 micrómetro de largo representan el mayor número de organismos que habitan sobre la tierra. La interacción entre las bacterias y los seres humanos es compleja porque a pesar de que se le atribuyen coloquialmente la mayoría de las infecciones, la realidad es muy distinta, ya que algunas de ellas participan en diversos procesos biológicos que favorecen al ser humano mientras que otras establecen una relación parasitaria temporal (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2021).

La clasificación biológica de las bacterias va a depender de dos características fundamentales: una basada en las relaciones de evolución ancestral conocido como filogenética, pudiendo clasificarlos de acuerdo a

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

pequeñas variaciones en sus taxones, para así poder distinguirlas en géneros y especies. De manera similar, las características fenotípicas presentes en el microorganismo, tales como morfología, fisiología, bioquímica, ecología, biología molecular y genéticas, permiten clasificarlas. Una forma sencilla de realizarlo es a través de tinciones que permiten categorizarlas como grampositivas, gramnegativas y ácido-alcohol resistentes lo cual proporciona la base para las diferencias entre medios de transmisión, presentación de la enfermedad y sensibilidad a los antibióticos por parte de cada microorganismo (Murray y cols., 2021).

Como parte de su evolución, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para conservar su existencia, sobre todo a nivel del contacto con antibióticos. En tal sentido se describen los siguientes procesos específicos de las bacterias (Barrera, 2021):

www.bdigital.ula.ve

- Producción de enzimas que inactivan antibióticos: estas bacterias sintetizan diversas enzimas que se unen al sitio de acción de los antibióticos ocasionando el cese o bloqueo de su acción.
- Bombas de expulsión: es un mecanismo capaz de expulsar del interior de la bacteria cualquier agente antibacteriano que haya logrado atravesar la pared celular.
- Impermeabilidad de la membrana: este mecanismo consiste en el cambio de la estructura de la membrana celular, evitando de esta manera el ingreso de antibacterianos a su interior.

Ante la presencia de tales microorganismos en el organismo humano, animal o vegetal, se ha visto la necesidad de desarrollar compuestos químicos capaces de eliminarlos del huésped. En tal sentido, toma importancia la utilización de antibióticos, siendo estos los productos farmacológicos utilizados para tratar infecciones ocasionadas por las

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

bacterias. Los antibióticos ejercen su acción a través de diferentes mecanismos que actúan directamente sobre la bacteria: inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, alterando la integridad de la membrana citoplasmática, impidiendo la síntesis proteica o bloqueando las funciones de los ácidos nucleicos. De manera general, se han clasificado a los antibióticos de dos formas diferentes de acuerdo a su actividad antimicrobiana. En primer lugar, bactericidas a todos aquellos que presentan una acción directa sobre la bacteria ocasionando su muerte o lisis; en segundo lugar, bacteriostáticos, a aquellos antibióticos que solo inhiben de forma transitoria el crecimiento de las bacterias (Barrera, 2021; Calvo y Martínez, 2009).

Actividad antibacteriana

www.bdigital.ula.ve

Se define como la capacidad que poseen los antibióticos para eliminar, matar, inactivar, inhibir o impedir el crecimiento de microorganismos causantes de infecciones bacterianas (Rodríguez, 2006). Los métodos para la determinación de actividad antibacteriana están clasificados en tres grupos principales:

- **Métodos de difusión**

Son métodos sencillos, de fácil realización en los laboratorios de rutina, indicado para microorganismos no exigentes y de crecimiento rápido. La técnica de difusión del disco fue estandarizada por Kirby y Bauer en 1966, de allí surge el nombre del método (Kirby-Bauer), el cual brinda información cualitativa o semicuantitativa sobre la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico determinado y los resultados obtenidos son de gran valor clínico para iniciar, mantener o modificar una antibióticoterapia (Rivas, Oranday y verde, 2016; Ramírez y cols., 2010).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado; el microorganismo de ensayo debe provenir de un cultivo puro y el inóculo bacteriano debe estar ajustado al patrón 0,5 de turbidez de McFarland, posteriormente, se deposita en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe el agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación a temperatura óptima, los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Ramírez y cols., 2010).

www.bdigital.ula.ve

- **Métodos de dilución**

Son apropiados para la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana llevada a cabo tanto en medio sólido como en medio líquido. Algunos métodos se describen a continuación:

El método de **dilución en agar** es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima inhibitoria (CMI), definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas, y la (CMB) concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado, estas variables son una herramienta para investigar nuevos antimicrobianos (Reyes, Palou y López, 2014).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Los métodos de **dilución en medio líquido** (dilución en caldo), se llevan a cabo utilizando tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la CMI es determinada después de la incubación. Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar CMI, en un gran número de muestras. La ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales, además permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático (Reyes y cols., 2014).

En la técnica de dilución y microdilución son utilizados tubos o pozos en medios líquidos (caldos), los cuales contienen concentraciones crecientes (serie de dilución doble) de aceites esenciales diluido en caldo, en el cual se inocula un número definido de células bacterianas. El volumen final de la prueba define si el método es realizado por dilución (cuando se utilizan tubos con un volumen de 1-10 mL) o de microdilución (si se realiza en placas de pozos usando un máximo de 500 µL por pozo). Posteriormente, se incuba por un tiempo de 16-24 h dependiendo del microorganismo, en el cual la presencia de turbidez o sedimentación indicará el crecimiento del microorganismo. Finalmente, para rectificar la inhibición, se toman alícuotas de los tubos o pozos sin turbidez y se hace un sembrado en agar. La Concentración Inhibitoria Mínima en esta técnica se determina de acuerdo a la concentración más baja que impida el crecimiento visible del microorganismo (Reyes y cols., 2014).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- **Método Epsilométrico (Etest)**

El método epsilométrico es una técnica cuantitativa para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de antibióticos y antifúngicos mediante un gradiente de concentración del antimicrobiano sobre una tira con una matriz plástica que tiene una concentración decreciente de un antibiótico determinado. El medio que se usa es agar sangre con sangre de caballo al 5 % y con una base de Müeller-Hinton o agar chocolate suplementado. Las placas se incuban en posición invertida a 36 °C durante 48 h, se realiza la lectura de CIM de manera muy cuidadosa en el punto de intersección de la elipse de inhibición con la tira en el cual se recomienda que, si la interfase cae entre dos puntos, se elija la concentración más alta. La técnica empleando las tiras de Etest es considerablemente más rápida y requiere una menor cantidad de medio de cultivo que la técnica de dilución en agar, por lo que puede adaptarse fácilmente al trabajo de laboratorio para el análisis de numerosas cepas bacterianas (Cavalieri y cols., 2005).

www.bdigital.ula.ve

- **Bioautografía**

El término bioautografía se utiliza principalmente cuando las propiedades antimicrobianas de los analitos se miden en placas de CCF. Se realiza usando técnicas de cromatografía planas tales como cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía en capa fina de alto rendimiento, cromatografía de capa de sobrepresión y electrocromatografía plana. Se puede subdividir por diferentes métodos: contacto, inmersión o superposición de agar y bioautografía directa (Rivas y cols., 2016).

La técnica de cromatografía (CCF), se desarrolla por dos métodos diferentes, el primer método es directo en el cual la placa de CCF se coloca

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

sobre una superficie de agar inoculado durante un tiempo determinado permitiendo su difusión, posteriormente se debe retirar la placa de CCF e incubar; las zonas de inhibición del crecimiento aparecen en los lugares en los cuales los compuestos antimicrobianos estén en contacto con la capa de agar. El segundo método es doble capa agar en donde la placa de CCF es puesta por inmersión en una capa delgada de agar, sobre esta placa se coloca un medio de agar sembrado con el microorganismo de ensayo y en los lugares donde hay zonas de inhibición se encuentran los agentes antimicrobianos. La visualización de zonas de inhibición presente en los diversos tipos de bioautografía se lleva a cabo en su mayoría utilizando sales de tetrazolium que son convertidas en formazán coloreado intensamente por los microorganismos vivos, las zonas de color crema que aparecen sobre un fondo de color púrpura se deben a la presencia de agentes antimicrobianos en contacto con la bioautografía (Rivas y cols., 2016).

www.bdigital.ula.ve

Hongos

Los hongos son organismos eucariotas muy complejos, presentándose en diversas formas particulares: los mohos, cuya morfología predominante son las hifas las cuales son estructuras alargadas, multicelulares, que representan un mecanismo de patogenicidad muy importante puesto que esta forma les facilita el ingreso e infección a las células de los organismos, las levaduras que son unicelulares, de pequeño tamaño y que en su mayoría predominan las blastoconidias; por último, las células levaduriformes, que constituyen estructuras cuya morfología puede variar desde blastoconidias, pseudohifas e hifas, dependiendo del género al cual pertenezcan y en pocos casos a la temperatura en la cual se estén desarrollando (Guarro, 2012). Los hongos desarrollan un papel fundamental en el equilibrio de la ecología, es por ello, que fueron clasificados por Whittaker (1969) en el quinto reino

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

conocido como Fungi, sin embargo, en la actualidad los hongos son ubicados por los taxónomos en tres reinos: Hongos o Fungi, Chromista o Straminipila y Protozoa (Cepero, Restrepo, Franco, Cárdenas y Vargas, 2012).

El estudio del reino de los hongos cada vez se hace más profundo, actualmente han ocurrido diversos cambios en su clasificación, dando a conocer que el reino Fungi se divide entonces en dos subreinos, *Dykaria,* el cual agrupa las divisiones *Ascomycota* y *Basidiomycota;* y el llamado Hongos Basales que agrupa al resto de los hongos, en este último agrupa a las divisiones *Zigomycota* y los Hongos anamorfos, que anteriormente recibían el nombre de *Deuteromycota* (Guarro, 2012).

La mayoría de los hongos a los que nos encontramos normalmente expuestos son de tipo no patógeno, es decir oportunistas. Sin embargo, estamos siempre susceptibles a encontrarnos con ciertos hongos patógenos causantes de diversas micosis, o bien de estar en un estado inmunológico suprimido en cualquier momento de la vida que otorgue a los hongos oportunistas un medio adecuado para causar enfermedad. Es por ello la importancia de los antimicóticos, clasificados según su acción, tales como: fungitásticos, capaces de inhibir el crecimiento, o fungicidas encargados de producir la lisis de los hongos (Arenas, 2014).

www.bdigital.ula.ve

El tratamiento adecuado de las micosis se ha visto afectado por ser un tipo de enfermedad diagnosticada de forma tardía, ocasionado por la escasa cantidad de métodos que favorezcan una detección temprana. Actualmente el desarrollo de los antifúngicos se basa en el conocimiento de la estructura básica de los hongos caracterizada por la presencia de ergosterol, producción de quitina y *β*-glucanos, lo que ha permitido la adecuada aplicación de los fármacos dependiendo de la patogenicidad del

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

microorganismo (Arenas, 2014). En tal sentido, se han logrado clasificar según su mecanismo de acción en:

- Griseofulvina: actúa sobre la síntesis de proteínas de microtúbulos e inhibe la reproducción celular específicamente en dermatofitos (Arenas, 2014).
- 5-fluorocitosina (5-FC): impide la reproducción celular, el 5-FC es transportado por la citosina permeasa al citoplasma de la célula fúngica, en la que se convierte a 5-fluorouracil por acción de la citosina diaminasa. Luego, es fosforilado e incorporado dentro del ARN convirtiéndose en dexosinucleótido, inhibiendo la timidilato sintetasa, lo que ocasiona el impedimento en la síntesis de las proteínas celulares causando la muerte fúngica, sin embargo su efecto está limitado a la terapéutica combinada (Arenas, 2014; Gregorí, 2005).
- Polienos (anfotericina B y nistatina): afectan la molécula de ergosterol de las membranas fúngicas, generando la formación de canales que permite la pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causando la muerte del microorganismo (Arenas, 2014; Gregorí, 2005).
- Imidazoles y triazoles: presentan actividad primaria en el sistema enzimático de citocromo P450 involucrado en la síntesis de ergosterol de la membrana fúngica (Arenas, 2014).
- Terbinafina: actúa sobre la epoxidación de escualeno, además de presentar acción fungicida (Arenas, 2014).
- Alilaminas: es un antifúngico de tipo sintético que ejerce su acción al inhibir la síntesis a la enzima escualeno epoxidasa, implicada en la síntesis del ergosterol y aumentando los niveles de escualeno,

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

aumentando la permeabilidad de la membrana impidiendo el desarrollo y crecimiento del microorganismo (Gregorí, 2005).

- Lipopéptidos: este tipo de antifúngico ataca directamente la pared celular de los hongos inhibiendo la síntesis de los glucanos mediante la inactivación de la enzima 1,3-*β*-glucano sintetasa (Gregorí, 2005).
- Agentes misceláneos: que inhiben la mitosis celular (Gregorí, 2005).

Actividad antifúngica

La actividad antifúngica se basa en el estudio de la capacidad adquirida de un hongo para resistir los efectos quimioterapéuticos o antifúngicos causados por diversas mutaciones en su estructura molecular (Rivas y cols., 2016). La información colectada sobre la sensibilidad que presenten los hongos frente a diversos antifúngicos es de vital importancia en la salud pública debido a la alta resistencia que se ha observado en los últimos años. Por tal motivo, los objetivos principales de un antifungigrama se basan en: conocer la actividad *in vitro* de los antifúngicos, pronosticar el resultado terapéutico de un determinado antifúngico, detectar la aparición de cepas resistentes dentro de la población sensible, correlacionar la actividad *in vitro* con los resultados *in vivo* y determinar la utilidad terapéutica de los nuevos antifúngicos desarrollados (Castro, García y Martín, 2019).

www.bdigital.ula.ve

Para la interpretación de los antifungigramas se han establecido diferentes métodos para su adecuado análisis, los cuales son: Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), definida como la concentración más baja de un determinado antifúngico que inhibe el crecimiento del hongo; Concentración Inhibitoria Efectiva (CIE), definida como la concentración más baja de candina que produce un cambio morfológico, transformando las hifas filamentosas que son altamente virulentas a colonias pequeñas redondeadas

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

y compactas, la cual se utiliza para definir la actividad que presentan las candinas frente a hongos filamentosos; Puntos de Corte Clínicos (CBP, por sus siglas en inglés) que se basan en clasificar a los hongos como sensibles o resistentes dependiendo de su comportamiento en las pruebas de susceptibilidad y en correlación a la eficacia terapéutica que presentan y Puntos de Corte Epidemiológicos (ECV, por sus siglas en inglés) la cual se basa en separar las cepas salvajes, definidas como aquellas cepas que carecen de mecanismos de resistencia, de las cepas aisladas con algún mecanismo de resistencia (Castro y cols., 2019).

La determinación de la actividad antifúngica dependerá de la morfología del hongo. En tal sentido, para la determinación de hongos dermatofitos se recomienda el uso de medios sólidos, como el medio Lactrimel, para la propagación y evaluación de los fármacos. Se debe preparar el inóculo de la cepa de interés por picadura en medio Lactrimel y Müeller-Hinton, luego se incuba por 7 a 15 días a una temperatura de 25 °C para que se produzca la formación de microconidias y macroconidias. Posteriormente, se cosechan las conidias en un tubo cónico estéril con agua destilada estéril, se cuentan las conidias en un hematocitómetro y se ajusta la densidad a $1x10^6$ conidias/mL para asegurar la uniformidad en el estudio. A continuación, se inoculan las placas de Müeller-Hinton, se espera a que seque la superficie del medio y se coloca sobre ésta los discos de papel filtro a evaluar, los cuales han sido previamente impregnados con 10 µL del agente antifúngico a evaluar, se vuelve a incubar bajo las mismas condiciones iniciales. Finalmente, al concluir la incubación, se procede a observar y medir el halo de inhibición para determinar su categorización según los cortes de puntos clínicos. Sin embargo, la metodología para la determinación de las levaduras indica la preparación de un inóculo del hongo a evaluar en un subcultivo de agar Sabouraud Dextrosa, incubando a 35 °C por el tiempo correspondiente

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

al género en estudio. Luego, se prepara un inóculo con agua estéril con 0,5-2,5x10^2 UFC/mL. Posteriormente, se preparan placas con medio de cultivo RPMI-1640 adicionado con ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico 0,165M a pH 7,0 ± 0,1. Los agentes antifúngicos que se desean evaluar deben ser preparados a diferentes concentraciones y luego se le adiciona 0,1 mL de estas soluciones a tubos de ensayo estériles; después, se agregan 0,9 mL de la solución de dilución y se incuba bajo las mismas condiciones iniciales. La interpretación de los resultados se realiza al comparar la turbidez obtenida en los tubos incubados con controles, tanto positivos como negativos (Rivas y cols., 2016).

Por otra parte, para la determinación de hongos filamentosos se determina la concentración inhibitoria mínima empleando el método de microdilución establecido por la CLSI M38-A 2008. En el cual indica la preparación de un inóculo de conidias a una densidad óptica de 0,08-0,01 UA, luego se procede a leer en un espectrofotómetro bajo la longitud de onda de 625 nm. De forma paralela, se toma una alícuota de la solución anterior y se realiza una dilución 1:50 en medio RPMI-1640 y por separado se preparan una serie de diluciones del antifúngico a evaluar. Para determinar la actividad se procede a colocar en una placa de 96 pozos 100 µL de la solución diluida de conidias más 100 µL de la dilución de los antifúngicos y controles, se llevan a incubar por un tiempo de 7 días a 25 °C. Al finalizar este tiempo se observan los pozos comparándolos con los controles para verificar el crecimiento del hongo, la CIM es la última concentración en la que no se observó crecimiento del mismo. Aunque los métodos aquí descritos son laboriosos, llevan un periodo de tiempo largo y su aplicación debe ser realizada por personal experimentado, siguen siendo la mejor opción al momento de evaluar la actividad de nuevos antifúngicos (Rivas y cols., 2016).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Definición Operacional de Términos

Viabilidad

Es la habilidad que posee una población microbiana para multiplicarse y producir una colonia, bien sea macroscópica en un medio de cultivo sólido, o con una turbidez en un medio líquido apropiado (Negroni, 2009).

Cepa

Grupo de organismos emparentados, como las bacterias, los hongos o los virus, cuya ascendencia común es conocida (RAE, 2023)

Toxicidad

www.bdigital.ula.ve

Es la capacidad de una sustancia para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad o dosis de sustancia administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo, tipo y severidad del daño, tiempo necesario para producir éste, la naturaleza del organismo afectado y otras condiciones intervinientes (Repetto, 1997)

Microorganismos

Son un grupo grande y diverso de organismos microscópicos que pueden llevar a cabo sus procesos metabólicos de crecimiento, generación de energía y reproducción, de manera independiente de otras células (López y Fernández, 2020)

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Halo de inhibición

Es la zona clara alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el microorganismo (Hervas y Prieto, 2011).

Operacionalización de las Variables

Las variables se operacionalizan para convertir los conceptos abstractos en empíricos, con el fin de medirlos a través de un instrumento y una metodología pertinente. A continuación, se definen y categorizan las variables para identificar el indicador específico:

Tabla 1. Operacionalización de la variable dependiente. Actividad antimicrobiana de los extractos de las flores de *Melia azedarach* L.

www.bdigital.ula.ve

Variable	Tipo de variable	Definición Conceptual ¿Qué es?
Actividad antimicrobiana de los extractos de las flores de *Melia azedarach* L.	Dependiente	Es la sensibilidad o susceptibilidad que presenta cierto microorganismo (bacteria y hongo) al entrar en contacto con una concentración estandarizada de un fármaco en específico (Fernández, 2015).
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
Se realiza a través del método de Kirby-Bauer mediante difusión en agar con disco.	Actividad antimicrobiana • Presente • Ausente	Tamaño del halo de inhibición del crecimiento microbiano (medición en mm).

Fuente: Cáceres, Peraza y Rojas, 2023.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente. Composición química de los extractos de las flores de *Melia azedarach* L.

Variable	Tipo de variable	Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química de los extractos de las flores de *Melia azedarach* L.	Independiente	Los metabolitos secundarios aislados principalmente en esta especie son los limonoides, flavonoides, entre otros. Además, presenta alto contenido de alcaloides y compuestos fenólicos (Marcano y Hasegawa, 2018).
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
A través del tamizaje fitoquímico.	Compuestos químicos (Alcaloides, flavonoides, fitoesteroles, diterpeno, entre otros). • Presentes • Ausentes	• Color • Precipitado • Turbidez • Fluorescencia

www.bdigital.ula.ve

Fuente: Cáceres, Peraza y Rojas, 2023.

Hipótesis

Estudios anteriores han demostrado que géneros pertenecientes a la familia Meliaceae biosintetizan metabolitos secundarios que poseen actividad biológica; por lo cual, es de esperar que los extractos de las flores de *Melia azedarach* L., posean compuestos relacionados con la actividad antimicrobiana.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

La investigación permite conocer todo lo referente a un fenómeno, de esta manera el tipo de investigación que se utilizó guarda una estrecha relación con el alcance del fenómeno estudiado, con el fin de obtener respuesta a las interrogantes planteadas por los investigadores. Según Hurtado (2012), existen diferentes tipos de investigación: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. En tal sentido, la investigación confirmatoria requiere de una explicación previa o una serie de hipótesis, cuyo objetivo radica en confirmar la veracidad de la misma (Hurtado, 2012). Al respecto, esta investigación es de tipo confirmatoria, en la que se busca confirmar la relación entre la composición química de los extractos obtenidos de las flores de *Melia azedarach* L. y la actividad antimicrobiana.

www.bdigital.ula.ve

Diseño de Investigación

Corresponde a la estructura de la investigación, la forma en cómo se desarrolló el procedimiento para obtener las respuestas a las interrogantes planteadas. Al respecto, Hurtado (2012) refirió que tales estrategias están representadas por el dónde, cuándo y la amplitud de la información que se quiere recolectar. Específicamente, el dónde en esta investigación está representado por el Laboratorio del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis “Dr. Alfredo Usubillaga del Hierro” de la Universidad de Los Andes; por lo tanto, el diseño será experimental.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Respecto al cuándo, el diseño es de tipo contemporáneo y transeccional, ya que la información se recolecta en el presente y una sola vez en cada unidad de investigación. Con relación a la amplitud de la información, el diseño es univariable, ya que el evento de estudio está constituido por un objeto y un sujeto de estudio.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

La unidad de investigación de este estudio estuvo representada por la especie *Melia azedarach* L. planta conocida comúnmente como alelí, procesada en el Laboratorio de Investigación de Toxicología Analítica de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes y procedente del Estado Mérida - Venezuela

www.bdigital.ula.ve

Selección del Tamaño de la Muestra

La selección de las flores que se utilizó en el muestreo fue sometido a juicio con el fin de separar muestras homogéneas según la disponibilidad de la especie vegetal ubicada en El Sector Chamita de la ciudad de Mérida, en las que las unidades seleccionadas cumplieron con las mismas características.

Sistema de Variables

Las variables que guardan relación con el objeto de estudio se clasifican de la siguiente manera: variable independiente: composición química de los

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

extractos de las flores de *Melia azedarach* L.; variable dependiente: actividad antimicrobiana de los extractos de las flores de *Melia azedarach* L.

Instrumento de recolección de datos

Un instrumento permite recolectar los datos relacionados con los objetivos y los indicadores obtenidos de la operacionalización de las variables. En tal sentido, los instrumentos que se utilizaron para la recolección de datos durante esta investigación están constituidos por tablas e imágenes que reflejen las diversas reacciones y resultados obtenidos sobre la composición química y la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos.

Procedimiento de la Investigación

www.bdigital.ula.ve

Recolección del material vegetal

Las flores frescas de *Melia azedarach* L., fueron recolectadas durante los meses de Abril y Mayo del año 2023; en la Calle Los Cedros, Sector Chamita de la Cuenca del Chama (Altitud: 1215 msnm y Latitud: 8°33´32´´), Parroquia Jacinto Plaza, Municipio Libertador del Estado Mérida – Venezuela; cuya muestra de colección Voucher C A y P F # 01 fue identificada y examinada por el Dr. Pablo Meléndez G. en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (Anexos 1 y 2).

Preparación de los extractos

El material vegetal recolectado obtuvo un peso neto de 72,09 g, el cual fue llevado a estufa a 40 °C. Luego de transcurrido el tiempo de secado de la

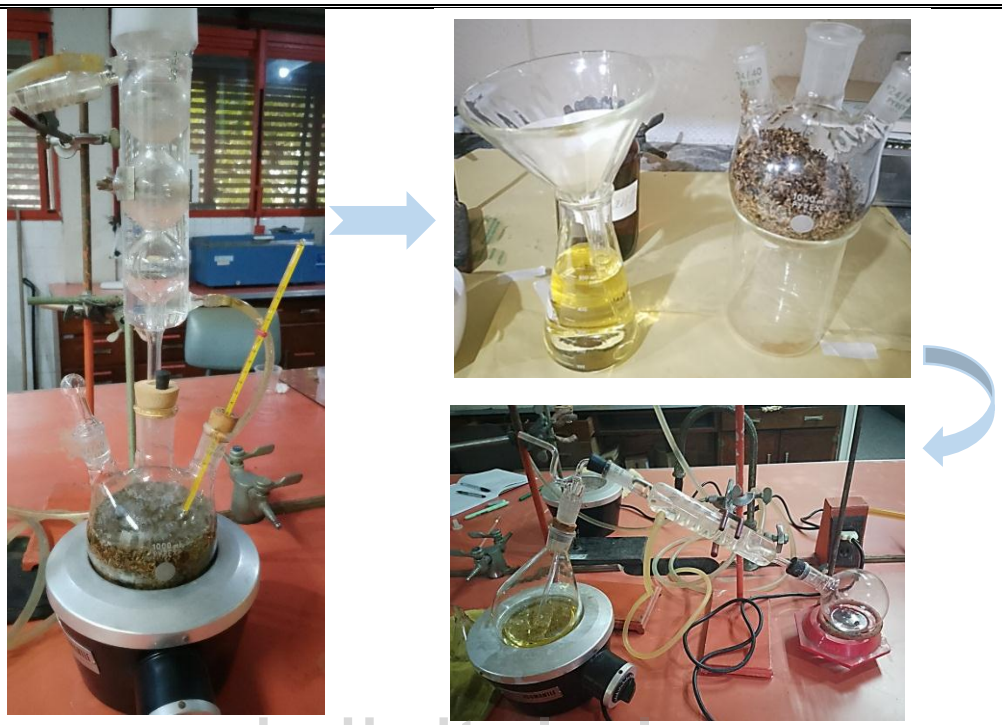
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

muestra vegetal fueron trituradas las flores en un mortero con el fin de minimizar las partículas y se realizaron 2 extracciones:

- **Extracción con hexano:** Se agregó 72,09 g del material vegetal seco y molido en un balón de 1000 mL con 600 mL de hexano como solvente de extracción, cantidad suficiente para cubrir el material vegetal, dicha mezcla fue sometida a calentamiento y se dejó hervir durante una hora manteniendo una temperatura de 60 °C. Luego de la extracción se dejó enfriar y se filtró para separar el solvente del soluto. Posteriormente, se eliminó el resto de solvente mediante un proceso de destilación permitiendo la concentración del extracto (Figura 8). Finalmente, se dejó reposar bajo campana de extracción y estufa permitiendo la evaporación total del solvente obteniéndose 1,76 g de extracto de hexano y se almacenó en la nevera en frascos de vidrio.
- **Extracción con etanol:** En este caso fue utilizado el material vegetal resultante de la preparación del extracto de hexano. En la elaboración de dicho extracto se utilizó etanol como solvente del cual se adicionaron 500 mL en el balón. Al igual que el extracto anterior la mezcla fue sometida a calentamiento, se dejó hervir durante una hora manteniendo una temperatura inferior a los 65 °C para luego ser filtrado y mediante la destilación permitir el concentrando del extracto (Figura 8). Finalmente, se dejó reposar bajo campana de extracción obteniendo 4,75 g de extracto que al igual que el extracto de hexano se almacenó en la nevera en frascos de vidrio.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)



www.bdigital.ula.ve

Figura 8. Procedimiento de la obtención de los extractos de hexano y etanol a través de la técnica de reflujo en caliente.
Fuente: Caceres, Peraza y Rojas, 2023.

Tamizaje fitoquímico

Una vez obtenidos los extractos de hexano y etanol se realizaron los ensayos correspondientes al estudio fitoquímico con el objetivo de determinar la presencia de metabolitos secundarios, teniendo en cuenta lo propuesto por Domínguez (1979), Marcano y Hasewaga (2018) y Martínez (2020). En los que se analizaron los siguientes metabolitos:

Alcaloides: Se usaron pequeñas porciones de los extractos de hexano y etanol por separado, adicionando entre 5-10 mL de ácido clorhídrico al 10 %, llevándolos a baño de María aproximadamente por 1 hora, el cual se dejó

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

enfriar y posteriormente se filtró. Se dividió el filtrado en 3 tubos (aproximadamente 2 mL cada uno) de ensayo identificados para cada reactivo (Mayer, Wagner y Dragendorff) y finalmente se adicionó al respectivo tubo 5 gotas del reactivo correspondiente.

Saponinas: Se tomó una pequeña cantidad del extracto de hexano y etanol (por separado) en un tubo y se diluyó con agua destilada. Se agitó vigorosamente durante un minuto.

Compuestos fenólicos: En dos tubos que contenían una pequeña porción del extracto de hexano y etanol (por separado), se diluyó uno con agua destilada y el otro con etanol. Posteriormente se adicionaron dos gotas de cloruro férrico al 1 %.

Antraquinonas: Se diluyó el extracto de hexano y etanol (por separado) en etanol y se adicionaron dos gotas de hidróxido de amonio concentrado a cada tubo.

www.bdigital.ula.ve

Quinona en cápsula: Una cápsula de porcelana se dividió por la mitad y se colocó una pequeña porción de los extractos de hexano y etanol en su respectiva división, luego se adicionaron dos gotas de ácido sulfúrico concentrado en cada porción.

Cumarinas: Se diluyeron los extractos con etanol en 2 tubos, uno con el de hexano y el otro con etanol, luego se adicionaron dos gotas de hidróxido de amonio concentrado y posteriormente fueron leídos bajo luz ultravioleta (UV).

Triterpenos y/o Esteroles: Se tomó una pequeña cantidad del extracto de hexano y etanol adicionando acetona en cantidad suficiente hasta cubrir la muestra, esta mezcla fue disuelta con mayor rapidez con ayuda del

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ultrasonic, seguidamente se adicionaron 0,5 mL de anhídrido acético y dos gotas de ácido sulfúrico concentrado cuidadosamente por las paredes del tubo.

Flavonoides (Shinoda): Una porción del extracto de hexano y etanol (por separado) se diluyó en etanol al cual se le añaden virutas de magnesio metálico y 5 gotas de ácido clorhídrico concentrado.

Flavonoides (NaOH al 10 %): En dos tubos (uno para cada extracto) se diluyó en etanol una fracción del extracto de hexano y etanol donde se adicionaron 5 mL de hidróxido de sodio respectivamente.

Lactonas sesquiterpénicas: Una fracción del extracto de hexano y etanol (por separado) se diluyó con etanol adicionando 5 mL de hidróxido de sodio. Posteriormente se añadieron 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado.

www.bdigital.ula.ve

Glicósidos cardiotónicos: En un tubo se colocaron 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado, en otro se realizó una mezcla que contenía una porción del extracto de hexánico y etanol, se adicionaron 2,5 mL de agua destilada, 2 mL de ácido acético glacial y 1 gota de cloruro férrico. La mezcla anterior se adicionó al primer tubo.

Taninos: En un tubo se agregó solo el extracto de etanol para ser disuelto en agua destilada al cual se le adicionó una pequeña cantidad del reactivo de gelatina (gelatina sin sabor diluida en agua).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Determinación de la Actividad Antibacteriana por el Método de Difusión en disco (Kirby-Bauer)

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 asesoria de las Profesoras Yndra Cordero, Ysbelia Obregón y el auxiliar de laboratorio Emilio Salazar. Para este estudio se seleccionaron cinco especies de bacterias: dos especies pertenecen a las bacterias Gram-positivas y tres pertenecientes a las bacterias Gram-negativas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), estas bacterias fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes a cargo de la Licenciada María Eugenia Nieves (tabla 3).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 3. Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC) para evaluar la actividad antibacteriana.

Bacterias Gram positivas (ATCC)	
Staphyloccus aureus	ATCC 25923
Enterococcus faecalis	ATCC 29212
Bacterias Gram negativas (ATCC)	
Escherichia coli	ATCC 25922
Klebsiella pneumoniae	ATCC 23357
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853

Tomado y modificado de CLSI, 2020.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Preparación de placas

En las placas de Petri se preparó el medio de cultivo colocándo aproximadamente de 20 a 25 mL de Agar Müeller-Hinton (Merck ®) estéril, dejandose solidificar a temperatura ambiente.

Preparación de los inóculos bacterianos

Las cepas a ensayar se sembraron en agar BHI y se incubaron a 37 ºC por 16 a 18 horas antes de hacer el ensayo microbiano. Una vez obtenidas las cepas bacterianas frescas y purificadas, se preparó el inóculo bacteriano el cual se realizó tomando unas colonias de la cepa en estudio con un asa estéril, se suspendieron en 5 mL de solución salina fisiológica al 0,9% estéril y se comparó la turbidez con el patrón $0,5x10^6$ UFC/mL de Mac Farland.

www.bdigital.ula.ve

Inoculación de las placas

Una vez preparadas las placas, se sembraron en forma homogénea en la superficie de cada una de ellas los inóculos bacterianos previamente preparados en solución de NaCl al 0,9 % (bacterias en estudio), utilizando para ello un hisopo de algodón estéril.

Preparación y colocación de los discos

Se utilizaron discos de papel filtro Whatmann Nº 1 de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los cuales se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), durante toda una noche. En las placas de Petri con Agar Müeller-Hinton previamente inoculados con cada cepa estudio, se colocaron los discos impregnados con 10 µL de cada uno de los extractos a estudiar a una dilución de 10000 ppm. También se utilizaron discos de antibióticos comerciales como control positivo correspondiente a cada de las cepas en

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

estudio, con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar y como control negativo discos impregnados con 10 µL del solvente dimetil sulfóxido (DMSO) (tabla 4).

Tabla 4. Antibióticos empleados como control positivo para el estudio de la actividad antibacteriana.

Bacterias (ATCC).	**Antibióticos comerciales**		
	E (15 µg)	AMP (10 µg)	PIP (100 µg)
Staphylococcus aureus ATCC 25923	32 mm	-	-
Enterococcus faecalis ATCC 29212	-	32 mm	-
Escherichia coli ATCC 25922	-	-	27 mm
Klebsiella pneumoneae ATCC 23357	-	-	27 mm
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	-	-	27 mm

Leyenda: E: Eritromicina ®. **AMP:** Ampicilina ®. **PIP:** Piperacilina ® **mm:** milimetros
Tomado y modificado de CLSI, 2020.

www.bdigital.ula.ve

Incubación de las placas

Después de colocar los discos en las placas con Agar Müeller-Hinton previamente inoculados, estas se dejaron en la nevera a temperatura de 4 ºC aproximadamente durante 30 min con la finalidad de que los discos impregnados con sus diferentes muestras difundieran a través del agar, luego fueron llevadas a la estufa durante 24 h a temperatura de 37 ºC.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Lectura de las placas

Luego de ser incubadas cada una de las placas por un lapso de tiempo de 24 h fueron revisadas para realizar la lectura de las mismas. Se consideró un resultado positivo o sensible (presencia de actividad antibacteriana) al observar un halo de inhibición alrededor del disco y se tomó como resultado negativo o resistente (sin actividad antibacteriana) la ausencia de dicho halo. El diamétro de la zona de inhibición producto de la actividad antibacteriana de las muestras en estudio se midió con una regla y se expresó el resultado en milímetros (mm).

Determinación de la Actividad Antifúngica por el Método de Difusión en disco

www.bdigital.ula.ve

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer y cols, (método de Kirby-Bauer), que permite la evaluación antifúngica que presenten diversos extractos o medicamentos a emplear sobre los distintos tipos morfológicos de hongos existentes en la naturaleza.

Hongos estudiados

Para este estudio se seleccionaron dos especies de hongos (Tabla 5) clasificados morfológicamente como levaduras, pertenecientes a la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), dichas cepas de hongos fueron obtenidos en el cepario del Laboratorio de Micología Dr. Corrado Capretti de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la asesoria de la profesora Clara Díaz y el profesor Alexander Moreno.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 5. Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC) para evaluar la actividad antifúngica.

Hongos (ATCC)
Candida albicans CDC 385
Candida krusei ATCC 6258

Tomado y modificado de CLSI, 2020.

Materiales utilizados

- Extractos de las flores de la especie *Melia azedarach* L.
- Discos de papel de filtro (6 mm).
- Discos de Fluconazol de 25 µg (Control Positivo).
- Discos de Voriconazol de 25 µg (Control Positivo).
- Dimetilsulfóxido (Control negativo).
- Medio de cultivo Agar Müeller-Hinton modificado.

www.bdigital.ula.ve

Metodología

- Los discos de papel de filtro se llevaron a esterilizar 1 hora en luz ultravioleta 24 horas antes del ensayo y luego se impregnaron con 20 µL del extracto de etanol.
- Preparación del inóculo: A partir de las cepas frescas (24 horas) (Tabla 5) sembradas en Agar Sabouraud dextrosa con antibiótico, se preparó una suspensión ajustada al patrón 1 Mac Farland (3 x 10^8 UFC/mL) en Solución salina fisiológica al 0,9 % estéril.
- Medio de cultivo: El agar Müeller-Hinton modificado (HIMEDIA®) se suplementó con 2 % de glucosa y azul de metileno (CLSI, 2020). A cada placa se le agregaron 20 mL del medio de cultivo y el inóculo preparado de cada cepa; se mezcló y se dejó solidificar. Se utilizó una placa para control de crecimiento y otras dos donde posteriormente se colocaron discos impregnados con las muestras, un disco impregnado

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

con Fluconazol (*Candida albicans)* y Voriconazol (*Candida krusei)* como controles positivos y un disco impregnado con DMSO como control negativo.

- Control positivo Incubación: Una vez colocados los discos, se dejaron las placas a temperatura ambiente durante 20 minutos. Luego se llevaron a 4 °C por 4 horas para permitir la difusión de los extractos. Por último, se incubaron a 37 °C por 24 horas.
- Lectura del ensayo: Transcurrido el tiempo de incubación, se observó la presencia o no de halos de inhibición alrededor del disco, lo cual indicó Sensibilidad o Resistencia respectivamente, realizando la medición en milímetros (mm).
- El estudio se realizó por duplicado.

www.bdigital.ula.ve

Diseño de Análisis

Los datos fueron recolectados durante la fase interactiva de la investigación y analizados a través de un enfoque cualitativo y cuantitativo mediante operaciones matemáticas. Es importante resaltar que el universo estadístico de esta investigación estuvo representado por las plantas, la población de estudio fué la especie *Melia azedarach* L. en la que la muestra es representativa de la población constituida por las flores de dicha especie.

Las variables medidas se clasificaron según su naturaleza cualitativa o cuantitativa. En relación con esto, las variables cualitativas presentan una escala de medida nominal y ordinal. Por otra parte, las variables cuantitativas son discretas o continuas con una escala de medida de intervalo y de razón.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

Del proceso de extracción mediante la técnica de reflujo en caliente de las flores de la especie de *Melia azedarach* L. se obtuvieron las siguientes características macroscópicas de los extractos (tabla 6):

Tabla 6. Características físicas del extracto de hexano y etanol de las flores de *Melia azedarach* L.

CARACTERÍSTICA	EXTRACTO DE HEXANO	EXTRACTO DE ETANOL
Aspecto	Viscoso	Viscoso
Color	Verde oliva	Verde oscuro
Olor	Característico	Característico
Peso de material seco	72,09 g	72,09 g
Peso de extracto	1,76 g	4,75 g
% De rendimiento	2,44 %	6,58 %

Fuente: Cáceres, Peraza y Rojas, 2023.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Estudio fitoquímico de los extractos de hexano y etanol de las flores de *Melia azedarach* L.

Se llevó a cabo una serie de pruebas para conocer cualitativamente los compuestos químicos presentes en los extractos de hexano y etanol de las flores de *Melia azedarach* L.

El análisis preliminar reveló la presencia de varios metabolitos secundarios de interés biológico presentes en los extractos de las flores de *Melia azedarach* L., siendo de forma cualitativa la revelación de cada uno de los componentes por fenómenos químicos de reacción como: viraje de color principalmente, aparición de precipitados, turbidez del medio, producción de espuma por agitación y fluorescencia por exposición a la luz ultravioleta (UV). Estos fenómenos fueron los indicativos primordiales para dicha caracterización donde se observó una importante presencia de metabolitos secundarios entre los que destacan alcaloides, triterpenos, esteroles, compuestos fenólicos, flavonoides, lactonas sesquiterpénicas y glicósidos cardiotónicos en los extractos de etanol, mientras que en los extractos de hexano solo se encontró la presencia de triterpenos, esteroles y quinonas (tabla 7 y 8).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 7. Resultados del estudio fitoquímico de los extractos de hexano y etanol de las flores de la especie *Melia azedarach* L.

Metabolito	Pruebas Químicas	Flores	
		Extracto de Hexano	Extracto de Etanol
Alcaloides	Ensayo de: • Mayer • Dragendorff • Wagner	- - -	+ + +
Triterpenos y Esteroles	Ensayo de Liebermann -Burchard	+ Verde	++ Rojo
Compuestos fenólicos	Ensayo de $FeCl_3$	ND	++ Verde/negro
Saponinas	Prueba de altura y estabilidad de espuma	-	-
Taninos	Ensayo de Gelatina	ND	-
Flavonoides	Ensayo de Shinoda	-	++ Magenta
	Ensayo con NaOH al 10 %	-	+ Ligeramente naranja
Cumarinas	Ensayo con NH_4OH conc.	-	-
Quinonas	Reacción en Cápsula con H_2SO_4 conc.	+ Ligeramente rojo	-
Antraquinonas	Ensayo con NH_4OH conc.	-	-
Lactonas sesquiterpénicas	Ensayo de NaOH al 10 % con HCl	-	+
Glicósidos cardiotónicos	Prueba Keller killiani	ND	+ Anillo Ligeramente marrón

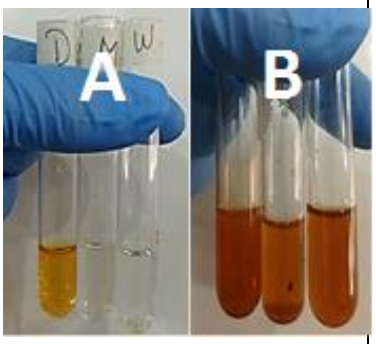
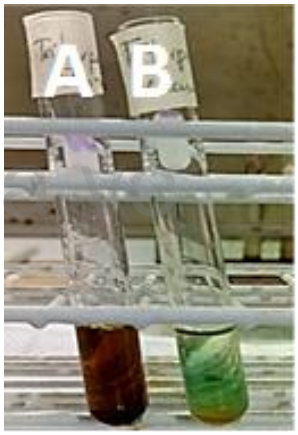
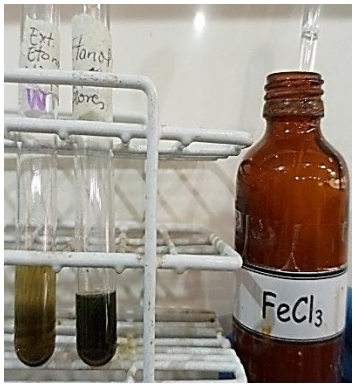
Leyenda: **(+):** Presente en pocas concentraciones **(++):** Abundante **(ND):** No determinado **(-):** Ausente

Fuente: Cáceres, Peraza y Rojas, 2023.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

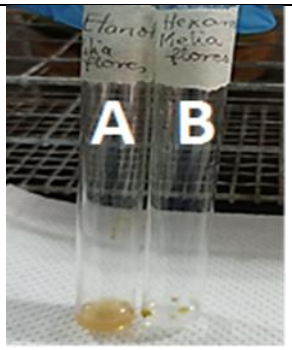
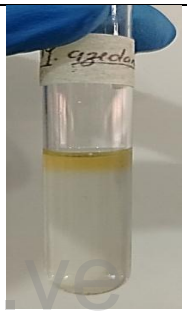
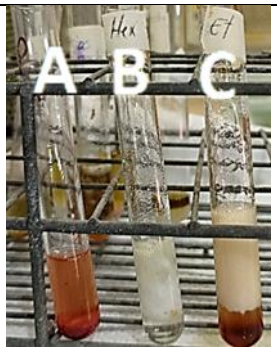
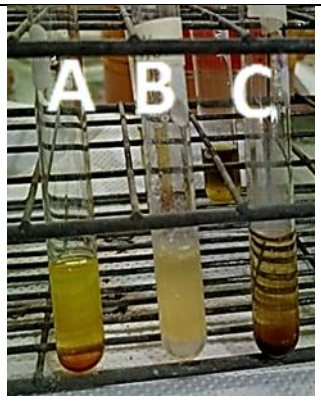
Tabla 8. Resultados del estudio fitoquímico de los extractos de hexano y etanol de las flores de la especie *Melia azedarach* L.

• **Metabolito determinado:** Alcaloides. • **Prueba:** Dragendorff, Mayer y Wagner. • **Reporte:** Positivo (B) Presencia de turbidez y/o precipitados de color naranja **Tubos A:** Con extracto de hexano **Tubos B:** Con extracto de etanol	
• **Metabolito determinado:** Triterpenos y Esteroles. • **Prueba:** Ensayo de Liebermann –Burchard. • **Reporte:** Positivo (A y B). Coloración magenta: Presencia de triterpenos (A) Coloración verde: Presencia de esteroles (B) **Tubo A:** Con extracto de etanol **Tubo B:** Con extracto de hexano	
• **Metabolito determinado:** Compuestos fenólicos • **Prueba:** Ensayo de $FeCl_3$ • **Reporte:** Positivo Coloración verde oscuro o negro. **Tubos:** Con extracto de etanol	

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

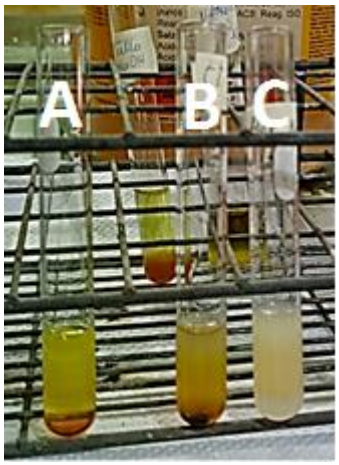
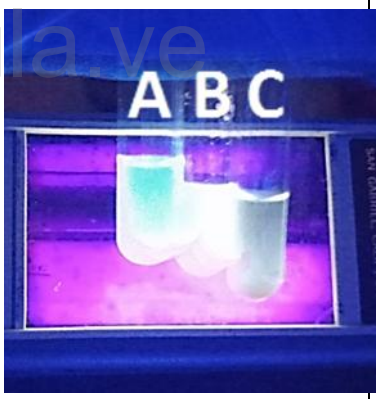
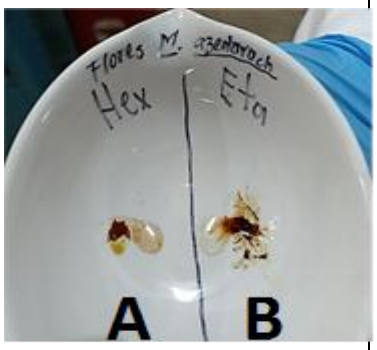
Tabla 8. Resultados del estudio fitoquímico de los extractos de hexano y etanol de las flores de la especie *Melia azedarach* L. (continuación).

• **Metabolito determinado:** Saponinas • **Prueba:** Altura y estabilidad de la espuma • **Reporte:** Negativo No se observa la formación de una espuma estable **Tubo A:** Con extracto de etanol. **Tubo B:** Con extracto de hexano.	
• **Metabolito determinado:** Taninos • **Prueba:** Ensayo de Gelatina. • **Reporte:** Negativo Ausencia de un precipitado blanco **Tubo:** Con extracto de etanol	
• **Metabolito determinado:** Flavonoides • **Prueba:** Ensayo de Shinoda • **Reporte:** Positivo (C) Presencia de una coloración magenta **Tubo A:** Control positivo. **Tubo B:** Con extracto de hexano. **Tubo C:** Con extracto de etanol.	
• **Metabolito determinado:** Flavonoides • **Prueba:** Ensayo con NaOH al 10 % • **Reporte:** Positivo (C) Presencia de una coloración ligeramente naranja **Tubo A:** Control positivo. **Tubo B:** Con extracto de hexano. **Tubo C:** Con extracto de etanol	

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

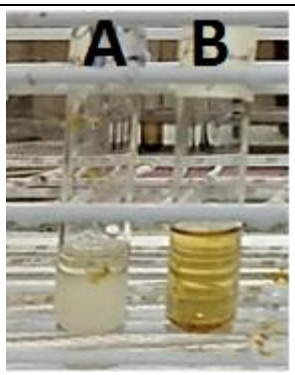
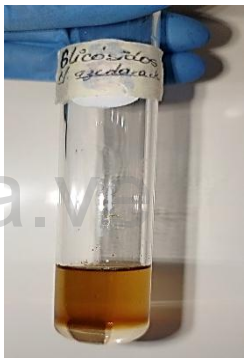
Tabla 8. Resultados del estudio fitoquímico de los extractos de hexano y etanol de las flores de la especie *Melia azedarach* L. (continuación).

• **Metabolito determinado:** Lactonas sesquiterpénicas • **Prueba:** NaOH al 10 % con HCl conc. • **Reporte:** Positivo (B) Al agregar 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado se observó la desaparición del color naranja indicando la positividad de la prueba **Tubo A:** Control positivo. **Tubo B:** Con extracto de etanol **Tubo C:** Con extracto de hexano.	
• **Metabolito determinado:** Cumarinas • **Prueba:** Ensayo con NH_4OH. • **Reporte:** Negativo. Ausencia de una fluorescencia azul-violeta al ser irradiados con luz UV **Tubo A:** Control positivo. **Tubo B:** Con extracto de hexano. **Tubo C:** Con extracto de etanol	
• **Metabolito determinado:** Quinonas • **Prueba:** Reacción en Cápsula con H_2SO_4 • **Reporte:** Positivo (A) Formación de un precipitado rojo **División A:** Con extracto de hexano. **División B:** Con extracto de etanol	

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 8. Resultados del estudio fitoquímico de los extractos de hexano y etanol de las flores de la especie *Melia azedarach* L. (continuación).

• **Metabolito determinado:** Antraquinonas • **Prueba:** Ensayo con NH_4OH conc. • **Reporte:** Negativo Ausencia de una coloración roja **Tubo A:** Con extracto de etanol **Tubo B:** Con extracto de hexano.	
• **Metabolito determinado:** Glicósidos cardiotónicos • **Prueba:** Para glicósidos cardiotónicos • **Reporte:** Positivo Formación de un anillo ligeramente marrón **Tubo:** Con extracto de etanol	

Fuente: Cáceres, Peraza y Rojas, 2023.

www.bdigital.ula.ve

Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de hexano y etanol de las flores de *Melia azedarach* L.

En el estudio de la actividad antibacteriana, se evaluaron los extractos de hexano y etanol de las flores de *Melia azedarach* L. por separado con una concentración de 10000 ppm en Agar Müeller-Hinton (Merck ®), utilizando como controles positivos los antibióticos: Eritromicina, Ampicilina y Piperacilina. En el resultado emitido, el extracto de hexano no tuvo actividad frente a las bacterias evaluadas. En el caso del extracto de etanol no

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

manifestó actividad frente a *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, pero si *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Con respecto a la actividad antifúngica, el extracto de etanol no presentó actividad frente a las cepas de *Candida albicans* y *Candida krusei* (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de las flores de *Melia azedarach* L.

Halo de inhibición (mm)								
Microorganismos evaluados	Extracto		Antibióticos			Antifúngico		
	MAL Hex	MAL Et	ERI 15 µg	AMP 10 µg	PIP 100 µg	FLO 25 µg	VOR 25 µg	DMSO
Staphylococcus aureus ATCC 25923	-	-	32*	-	-			
Enterococcus faecalis ATCC 29212	-	-	-	32*	-			
Escherichia coli ATCC 25922	-	7*	-	-	27*			
Klebsiella pneumoniae ATCC 23357	-	7*	-	-	27*			
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	-	7*	-	-	27*			
Candida albicans CDC 385	ND	-				21*	-	0
Candida krusei ATCC 6258	ND	-				-	20*	0

Leyenda: MALHex: *Melia azedarach* L. hexano. **MALEt:** *Melia azedarach* L. etanol. **ERI:** Eritromicina. **PIP:** Piperacilina. **AMP:** Ampicilina. **FLO:** Fluconazol. **VOR:** Voriconazol. **DMSO:** Dimetilsulfóxido. **mm:** milímetros. **ND:** No determinado.

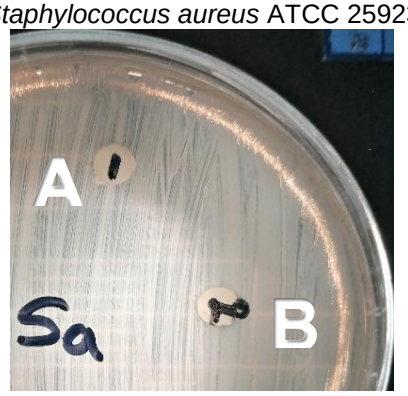
Fuente: Cáceres, Peraza y Rojas, 2023.

www.bdigital.ula.ve

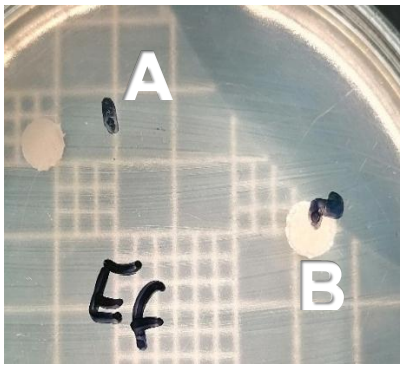
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Figura 9. Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de hexano y etanol de las flores de *Melia azedarach* L.

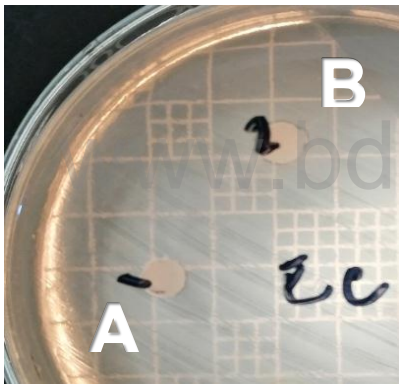
Staphylococcus aureus ATCC 25923



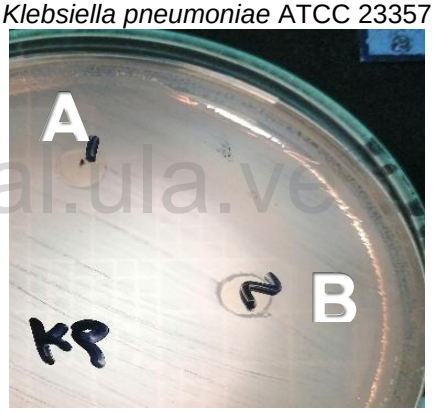
Enterococcus faecalis ATCC 29212



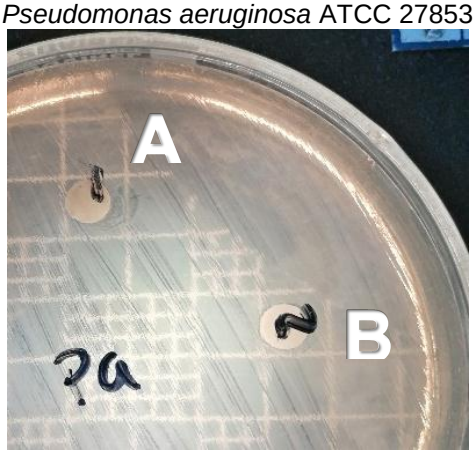
Escherichia coli ATCC 25922



Klebsiella pneumoniae ATCC 23357



Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853



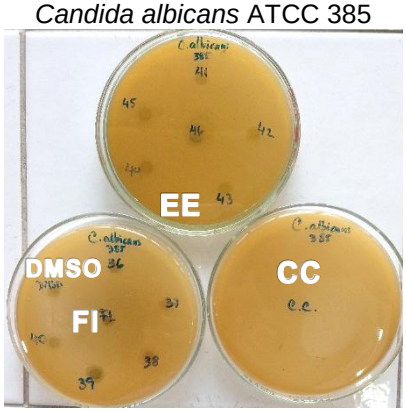
www.bdigital.ula.ve

Leyenda: A: Extracto de hexano. **B:** Extracto de etanol.
Fuente: Cáceres, Peraza y Rojas, 2023.

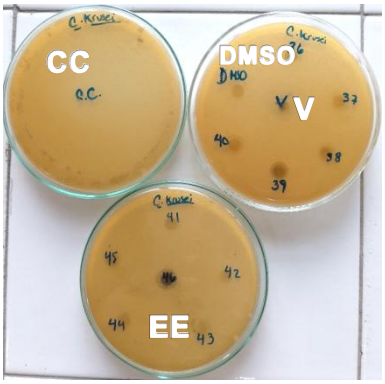
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Figura 10. Resultados de la actividad antifúngica del extracto de etanol de las flores de *Melia azedarach* L.

Candida albicans ATCC 385



Candida krusei ATCC 6258



Leyenda: EE: Extracto de etanol. **CC:** Control de crecimiento. **Fl:** Fluconazol. **V:** Voriconazol. **DMSO:** Dimetilsulfóxido.
Fuente: Cáceres, Peraza y Rojas, 2023.

www.bdigital.ula.ve

DISCUSIÓN

La determinación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de hexano y etanol de las flores de la especie de *Melia azedarach* L. obtenidos por la técnica de reflujo en caliente, fue llevada a cabo mediante pruebas químicas de coloración y/o precipitación. En el análisis se observó la presencia de alcaloides, triterpenos, esteroles, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, lactonas sesquiterpénicas y por primera vez, glicósidos cardiotónicos. El hallazgo de estos resultados es sustentado por la investigación de las hojas mediante el método de extracción en frío realizada por Hemdan y cols., 2023, en el que describen el hallazgo de compuestos fenólicos y flavonoides a partir de extractos de acetato de etilo, estos

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

metabolitos fueron asociados a la actividad tanto antiviral como antibacteriana que presenta la especie en estudio.

De igual manera, Tuan y cols., 2022, procesaron los frutos de *Melia azedarach* L. obteniendo extractos de *n*-hexano, diclorometano y acetato de etilo mediante un sonicador, descubriendo con ello, un nuevo compuesto perteneciente a los triterpenoides, los cuales se encuentran en una alta concentración siendo así vinculados a la actividad antifúngica observada frente a las cepas evaluadas. Además, los resultados coinciden con los expuestos por Farook y cols., 2019, en el cual después de someter a las hojas a un proceso de extracción por maceración para obtener los extractos de acetona, benceno, metanol y agua solo determinaron alcaloides y flavonoides, no observaron triterpenos, esteroles, compuestos fenólicos, quinonas, lactonas sesquiterpénicas y glicósidos cardiotónicos; sin embargo, estos investigadores lograron determinar saponinas, taninos y cumarinas.

www.bdigital.ula.ve

Melia azedarach L. presenta una composición química similar a pesar de las diferencias geográficas en las que se encuentra cultivada la especie, sin embargo se puede concluir que la determinación de los metabolitos secundarios está altamente asociada al tipo de método utilizado para la extracción así como a los disolventes de diferentes polaridades utilizados para tal fin, ocasionando una pequeña variación en los resultados obtenidos en la determinación del tamizaje fitoquímico.

En cuanto a la actividad antibacteriana el extracto de hexano no mostró actividad contra ninguna de las cepas evaluadas, mientras que el extracto de etanol solo logró inhibir a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* mostrando una zona de inhibición de 7 mm en cada cepa estudiada. Estos resultados son comparables con los hallados por los investigadores Hemdan y cols., (2023), en el que el extracto de acetato

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

de etilo a una concentración de 50 µg/mL de *Melia azedarach* L. presenta un alto potencial inhibitorio frente a cepas gramnegativas, específicamente *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Pseudomonas aeruginosa*. Asimismo, Bakht y cols., (2021), evaluaron extractos de *n*-hexano, acetato de etilo, *n*-butanol y acuoso preparados a partir de hojas y frutos de *Melia azedarach* L. y con concentraciones de 1, 2 y 3 mg/disco, este estudio reveló que las cepas bacterianas presentan una buena sensibilidad a los extractos de *n*-butanol y acetato de etilo a una concentración de 3 mg/disco.

Por su parte, Mwale y cols., 2019, evaluaron las hojas mediante extractos a base de diclorometano, acetato de etilo, etanol, hexano y metanol cada uno con una concentración de 500 µg/mL, como resultado obtuvieron que las concentraciones inhibitorias mínimas para los extractos de hexano y de etanol frente a *Salmonella typhi* fueron 15,6 µg/mL y <1 µg/mL. Además, Kathiresham y cols., 2019, evaluaron hojas tratadas por el método de percolación en caliente para la obtención de extractos de etanol, metanol y acetona a concentraciones de 50, 100, 150 y 200 µg/mL, estos extractos presentaron un efecto inhibitorio contra *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 15 mm, *Klebsiella pneumoniae* con un halo de 14 mm y *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con un halo de 12 mm cada una, demostrando la buena actividad antibacteriana de la especie en cuestión. Por último, Farook y cols., 2019, estudiaron hojas procesadas por extracción por maceración para la obtención de extractos de acetona, benceno, metanol y agua, en esta investigación la actividad antibacteriana se observó pronunciada en las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa.*

De igual manera, en la evaluación de la actividad antifúngica en el extracto de etanol no se observó inhibición a las cepas de *Candida albicans* y *Candida krusei*. En la investigación realizada por Tuan y cols., 2022,

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

estudiaron la actividad antifúngica de los extractos de frutos, obtenidos mediante un sonicador y empleando como solventes metanol, *n*-hexano, diclorometano y acetato de etilo con un intervalo de concentración de 62,5 – 500 µg/mL para posteriormente ser probados a través de la técnica de comida envenenada para evaluar *in vitro* a las especies de *Fusarium oxysporum*, *Magnaporthe grisea*, *Phytophthora* spp., y *P. capsici*, observando que los compuestos que presentaron una mejor actividad antifúngica fueron la trichilinina G y la meliatoxina B1, en el que esta última demostró la mejor actividad antifúngica. Por otra parte, Bakht y cols., 2021, presentaron una investigación sobre las hojas y frutos de *Melia azedarach* L. en el que determinaron que los extractos de acetato de etilo y metanol presentan una alta actividad inhibitoria contra *Candida albicans*, resultados que difieren en esta investigación en el que la muestra evaluada fueron flores.

www.bdigital.ula.ve

Por último, Kathiresham y cols., 2019, observaron una concentración inhibitoria mínima de 250 µg/mL contra *Aspergillus niger* y *Candida albicans* al utilizar extractos de etanol, metanol y acetona con concentraciones de 50, 100, 150 y 200 µg/mL obtenidos por el método de percolación en caliente de muestras provenientes de las hojas de *Melia azedarach* L. Los resultados obtenidos de los extractos de las flores de *Melia azedarach* L. varían de los reportados por los investigadores por diversas razones, entre las que destacan el uso de métodos diferentes a la técnica de reflujo en caliente para la evaluación de la actividad antimicrobiana, además de que se utilizaron otros tipos de disolventes con polaridades diferentes aunado al uso de concentraciones elevadas que difieren de la concentración utilizada en esta investigación.

La aparición de la resistencia a las terapias de antibióticos existentes ha generado un gran problema en la salud pública a nivel mundial y ha incentivado la investigación de los productos naturales con la finalidad de

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

aprovechar el efecto antimicrobiano que se observan principalmente a partir del extracto crudo para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Sin embargo, la aparición de efectos secundarios a los tratamientos sintéticos ha ocasionado que la demanda mundial de antimicrobianos naturales aumente y con eso ha elevado el estudio de los fitoquímicos presentes en las plantas, cuyo mecanismo de acción está orientado a ocasionar una alteración considerable en las diversas funciones biológicas de la célula patógena, lo cual conduce a un deterioro de los procesos celulares vitales necesarios para la supervivencia del microorganismo (Prakash, B., Kumar, A., Singh, P y Songachan, L. 2020).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

1. A partir de los 72,09 g de las flores secas de la especie *Melia azedarach* L. se obtuvieron los extractos de hexano y etanol con un peso neto de 1,76 g.
2. En los extractos de hexano y etanol de las flores de la especie de *Melia azedarach* L., se determinó la presencia de alcaloides, triterpenos, esteroles, compuestos fenólicos, flavonoides, lactonas sesquiterpénicas, quinonas y glicósidos cardiotónicos.
3. El extracto de etanol de las flores de *Melia azedarach* L. solamente presentó actividad antibacteriana frente a las cepas de ATCC de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa.*
4. El extracto de etanol de las flores de la especie *Melia azedarach* L. no presentó actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Candida krusei.*

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

RECOMENDACIONES

1. Cuantificar e identificar los metabolitos secundarios de los extractos de hexano y etanol de la parte analizada u otras partes poco estudiadas (frutos) empleando diferentes técnicas como cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), entre otras.
2. Determinar la actividad antimicrobiana del extracto de etanol de las flores de *Melia azedarach* L. empleando concentraciones mayores a las evaluadas en esta investigación.
3. Determinar las actividades antioxidante, antiparasitaria y citotóxica de los extractos de hexano y etanol de las flores de la especie de *Melia azedarach* L.
4. Continuar investigaciones sobre extractos del género y la especie con el fin de establecer referencias sobre estas y así permitir la incorporación de estos recursos naturales en el campo de la farmacología , medicina, entre otros.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

Alonso, M y Luzardo, S. (2011). Investigación sobre la toxicidad de *Melia azedarach* (Paraíso) para los bovinos (Tesis de pregrado). Universidad de la República, Montevideo-Uruguay.

Araiza, L. (2001). Extractos de plantas de la familia Meliaceae: una alternativa en control de insectos de impacto agrícola (Tesis de maestría). Centro de investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Sinaloa-México.

Arenas, R. (2014). Micología médica ilustrada. México: Editorial: McGraw-Hill interamericana.

Bakht, J., Bukhari, A., Iqbal, A y Shafi, M. (2021). *In vitro* antimicrobial potential of samples from the leaves and fruits of medicinally important *Melia azedarach*. Revista de Ciencias Biológicas – PJSIR, 64, 109-115.

Baldini, A., Alvarado, A y Guajardo, F. (2020). Paraíso, árbol del paraíso, melia, lila de la India. Revista Chile Forestal N° 396. Chile forestal, 66, 32-35.

Barrera, S. (2021). Las bacterias y su resistencia a los antibióticos. Transferencia tecnológica México. Revista TecScience, 1, 18-21.

Calderón, E. (2020). Actividad antibacteriana del extracto oleoso de hojas de *Melia azedarach* Linn (árbol del paraíso) sobre *Streptococcus pyogenes; Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* (Tesis de pregrado). Universidad Alas Peruanas, Perú.

Calvo, J y Martínez, L. (2009). Mecanismo de acción de los antimicrobianos. Formación Médica Continuada, 27, 44-52.

Carrión, A y García, C. (2010). Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Ecuador.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Carvajal, L., Hata, Y., Sierra, N y Rueda D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana krukoff*). Revista Colombia Forestal, 12, 161-170.

Castillo, G., Zavala, D y Carrillo, M., (2017). Análisis fitoquímico: una herramienta para develar el potencial biológico y farmacológico de las plantas. Revista Académica de Investigación, 8, 71-86.

Castro, C., García, E y Martín, E. (2019). Revista Actualización de los métodos de estudio de sensibilidad *in vitro* a los antifúngicos. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica 27: 32-39.

Cavalieri, S., McCarter, Y., Ortez, J., Rankin, I., Sautter, R., Sharp, S. y Spiegel, C. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Estados Unidos: Editorial American Society for Microbiology.

www.bdigital.ula.ve

Cepero, M., Restrepo, S., Franco, A., Cárdenas. M y Vargas, N. (2012). Biología de Hongos. Bogotá-Colombia: Ediciones Uniandes.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2020). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.

Corzo, D. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Cestrum buxifolium* Kunth. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 43, 81-86.

De la Fuente, N., Villarreal, J., Díaz, M y García, A. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. Revista mexicana de ciencias farmacéuticas, 46, 7-16.

Domínguez, X. (1979). Métodos de Investigación Fitoquímica. México: Editorial Limusa.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Echevarría, J. (2022). Actividad desinfectante del extracto etanólico de hojas de *Melia azedarach* Linn en el cultivo *in vitro* de ajo *(Allium sativum)* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima.

Espinosa, C., Treviño, J., Garza, R., Verde, M., Rivas, C y Morales, M. (2015). Contenido de fenoles totales y actividad anti-radical de extractos metanólicos de la planta silvestre y cultivada *in vitro* de *Leucophyllum frutescens*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 46, 52-56.

Falasca, S., Ulberich, A y Miranda, C. (2015). Potenciales áreas de cultivo de *Melia azedarach* L. en Argentina, como productora de aceite para biodiesel y bioinsecticida. Revista de Ciencias Forestales, 23, 18-19.

Fan, W., Fan, L., Wang, Z y Yang, L. (2022). Limonoids From the Genus *Melia* (Meliaceae): Phytochemistry, Synthesis, Bioactivities, Pharmacokinetics, and Toxicology. Revista Frontiers in Pharmacology, 12, 1-25.

www.bdigital.ula.ve

Farook, M., Muthu, H., Mohamed, N., Paranjothi, M., Santhosh, G., Subash, S., Naveez, V., Naveen, M y Madhan K. (2019). Phytochemical screening, Antibacterial and Antioxidant activity of *Melia azedarach*. International Journal of Research and Analytical Reviews, 6, 248-255.

Fernández, P. (2015). Farmacología basica y Clínica. El Salvador: Editorial Médica Panamericana S.A.

Fong, O., Berenguer, C., De la Vega, J., Wawoe, N y Puente, E. (2014). Potencial antioxidante de un extracto acuoso de hojas del NIM (*Azadirachta Indica* A. Juss). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 19 (2): 205-207.

García, A., Tamargo, B., Salas, E., Calzadilla, C., Acevedo, R y Sierra G. (2020). Tamizaje fitoquímico de extractos obtenidos de la planta *Sapindus saponaria* L que crece en Cuba. Revista Bionatura, 5, 1209-1214.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

García, D., Rivas, C y Leos, C. (2016). Actividad antifúngica. En Rivas, C., Oranday, M., Verde, M. (Eds.). Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona-España: Editorial Médica Panamericana.

Gregorí, B. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. Revista Cubana de Farmacia, 39, 1-1.

Guarro, J. (2012). Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. Revista Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 30, 33-39.

Hemdan, B., Mostafa, A., Elbatanony, M., El-Feky, A., Paunova, T., Stoitsova, S., El-Liethy, M., El-Taweel, G y Mraheil, M. (2023). Bioactive *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* leaves extracts with anti-SARS-CoV-2 and antibacterial activities. Revista PLoS ONE 18, 1-25.

Hervas, F y Prieto, J. (2011). Midiendo la infección. España: Editorial Díaz de Santos, S.A.

www.bdigital.ula.ve

Huma, Q., Muhammad, A., Abida, A., Naveed, I., Sammer, F y Muhammad, S. (2016). Ethnopharmacological and phytochemical account of Paradise tree (*Melia* azedarach L.: Meliaceae). Pure and Applied Biology, 5, 5-14.

Hurtado, J. (2012). Metodología de la investigación, guía para la comprensión holística de la ciencia. Bogotá: Ediciones Quirón.

Kathiresham, A., Priya, T., Jasmine, K., Gayathri, G y Ramesh, M. (2019). Assessment of *in vitro* Antibacterial and Antifungal Activities of Leaf Extracts of *Melia azedarach* Linn. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 81, 380-384.

Lock, O. (1987). Productos naturales: importancia y perspectivas. Revista de Química, 1, 49-54.

López, M. (2015). Fitoesteroles y fitoestanoles. Ámbito farmacéutico fitoterapia, 24, 90-94.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

López, M y Fernández M. (2020). Biología, Pruebas de acceso a ciclos formativos de grado superior. España: Ediciones Paraninfo S.A.

Marcano, D y Hasegawa, M. (2018). Fitoquímica orgánica. Caracas: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico-Universidad Central de Venezuela.

Martínez, A. (2020). Química de Productos Naturales. Colombia: Universidad de Antioquia.

Meco, J., Fuster, V y Alberich, R. (2016). La utilización de los esteroles vegetales en la práctica clínica: de la química a la clínica. Revista Clínica e Investigación en Arteriosclerosis, 28, 283-294.

Mesa, V., Marín, P., Ocampo, O., Calle, J y Monsalve, Z. (2019). Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. Revista de Investigaciones Agropecuarias, 45, 23-30.

www.bdigital.ula.ve

Muhammad, M., Lubna, Fayyaz, N., Tauseef, S., Razaq. U., Versiani, M., Ahmad, A., Faizi, S y Rasheed, M. (2015). Antibacterial activity of flower of *Melia azedarach* Linn. and identification of its metabolites. Revista Journal of Applied Biological Chemistry, 58, 219–227.

Mulyani, Y., Sinaga, S y Supratman, U. (2023). Phytochemistry and Biological Activities of Endophytic Fungi from the Meliaceae Family, 28, 1-25.

Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2021). Microbiología médica. Barcelona, España: Editorial Elsevier.

Mwale, C., Makunike, K y Mangoyi, R. (2019). Antibacterial Activity of *Melia azedarach* Leaves against *Salmonella typhi* and *Streptococcus pneumonia*. Revista International Annals of Science. 8, 47-53.

Negroni, M. (2009). Microbiología Estomatológica. Buenos Aires-Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Porcel, R. (2020). Eso no estaba en mi libro de botánica**.** Córdoba: Editorial Guadalmazan.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Prakash, B., Kumar, A., Singh, P. y Songachan, L. (2020). Propiedades funcionales y conservantes de los fitoquímicos. India: Editorial Prensa académica.

RAE (2023). Cepa. Extraído de: https://dle.rae.es/cepa

Ramírez, A., García, E., Longa, A., Sánchez, K., Nieves, M., Velasco, J., Araque, M y Mosqueda, N. (2010). Manual práctico de bacteriología general. Mérida, Venezuela: Colección Textos Universitarios de la Universidad de Los Andes.

Repetto, M. (1997). Toxicología Fundamental. España: Ediciones Díaz de Santos S.A.

Reyes, F., Palou, E y López, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. Revista Temas selectos de Ingeniería de Alimentos, 8, 68-78.

www.bdigital.ula.ve

Riyadi, S., Naini, A y Supratman, U. (2023). Revista Sesquiterpenoids from Meliaceae Family and Their Biological Activities, 28, 4874.

Rivas, C., Oranday, M y Verde, M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona, España: Editorial OmniaScience.

Rodríguez, A. (2006). La desinfección-antisepsia y esterilización en instituciones de salud: Atención primaria. Revista Cubana de Medicina General Integral, 22.

Rodríguez, L. (2018). Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales y de bacterias endófitas aisladas de *Melia azedarach* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Tesis de pregrado). Universidad de Sucre, Sincelejo-Colombia.

Rojas, J., Pérez, A., Martínez, J y Mieles, J. (2012). Actividad antibacteriana de extracto de hojas de *Melia azedarach* L. Revista Colombiana de Biotecnología, 14, 224-232.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tuan, N., Kuo, P., Hoang, V., Hien, V., Quang, L., Hieu, T., Li, Y., Thanh, N., Wu, T y Thang, T. (2022). The limonoids and other constituents from the fruits of *Melia azedarach* and their biological activity. Revista de Registros de Productos Naturales, 16, 307-315.

Varela, C. (2010). La familia Meliaceae en los herbarios de Venezuela: Clave para los géneros venezolanos. Revista Acta Botánica Venezuelica, 33, 137-150.

Verde, M., García, S y Rivas, C. (2016). Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. En Rivas, C., Oranday, M., Verde, M. Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona, España: Editorial OmniaScience.

Villalobos, M. (2011). Tratamiento taxonómico de Meliaceae (Cabralea, Cedrela, Guarea, Ruagea, Swietenia) en la región de Madidi, Bolivia (Tesis de pregrado). Universidad Mayor de San Andrés, La Paz.

www.botanicgardens.org/

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ANEXOS

Anexo 1. Voucher C A y P F 01.

www.bdigital.ula.ve

CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN

Quien suscribe, Dr. Pablo Meléndez G., hace constar que la muestra de colección **# 01**, correspondiente a las bachilleres **Andrea Cáceres**, CI: **26332872** y **Fragdimar Peraza** CI**: 25506899,** la cual desarrollan su tesis de grado en Bioanálisis, bajo la tutoria del Prof. Julio Rojas, fue procesada e identificada taxonómicamente por mi persona en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, cuya especie resultante es: ***Melia azedarach*** L.

Certificado realizado en Mérida, a los 09 días del mes de junio de 2023.

Dr. Pablo Meléndez González

Director-Curador Herbario MERF

REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA Facultad de Farmacia HERBARIO MERF Universidad de Los Andes

Anexo 2. Certificado de identificación taxonómica de *Melia azedarach* L.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)