



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



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE LOS TALLOS DE
Thevetia peruviana EN CEPAS ATCC**

www.bdigital.ula.ve

Autores:

Mercedes Stephania Juárez Vielma

C.I: V-24.197.153

Gerardo José Quintero Dos Santos

C.I. V-20.397.271

Tutor: Prof. Yndra Cordero

Mérida, Junio de 2023



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



**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE LOS TALLOS DE
Thevetia peruviana EN CEPAS ATCC**

Autores:

Mercedes Stephania Juárez Vielma

Gerardo José Quintero Dos Santos

Tutor: Prof. Yndra Cordero

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

Desde el descubrimiento de los primeros antibióticos, las bacterias han sido capaces de evadir la acción de ellos mediante sus mecanismos de resistencia; por tal razón se decidió colocar a prueba los metabolitos secundarios contenidos en los extractos de hexano y etanol de los tallos de *Thevetia peruviana*. Con el fin de confirmar la relación entre la composición química de los extractos vegetales de los tallos de *Thevetia peruviana* y su actividad antibacteriana frente a cepas grampositivas y gramnegativas. Para el estudio se utilizaron los tallos de *T. peruviana*, sometidos a un proceso de extracción con hexano y etanol mediante la técnica de digestión en caliente. La composición química fue analizada cualitativamente mediante el tamizaje fitoquímico en el cual se lograron identificar metabolitos secundarios tales como alcaloides, triterpenos, esteroides, compuestos fenólicos, glicósidos cardiotónicos, quinonas y sesquiterpenlactonas. El ensayo de la actividad antibacteriana permitió conocer que los extractos de los tallos de *T. peruviana*, presentaron sensibilidad a una concentración de 10.000 ppm ante las bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus* 7 mm, *Enterococcus faecalis* 8 mm) y gramnegativas (*Scherichia coli* 7 mm, *Pseudomonas aeruginosa* 7 mm y *Klebsiella pneumoniae*, 11 mm) evaluadas con el método de difusión en agar (Kirby - Bauer) en disco.

Palabras claves: *Thevetia peruviana*, actividad antibacteriana, digestión en caliente, tamizaje fitoquímico.

DEDICATORIA

A Dios, por darme la fortaleza, sabiduría y paciencia para culminar esta etapa tan anhelada en mi vida. Sé y confío que, con Él de la mano, lo mejor está por venir. Gracias Padre Celestial.

A mis padres, Yajaira y Omar, por ser los formadores de mis valores morales, por su apoyo y ayuda incondicional durante mis estudios. Gracias infinitas, sin ustedes no hubiese sido posible. Los amo con mi vida.

A mis hermanos, Omar y Anthony, por siempre darme ánimos para continuar y nunca dejar de creer en mí. Los amo.

A mi compañero de tesis y amigo Gerardo, por su apoyo incondicional, por mantenerse de la mano conmigo en este largo recorrido.

A mis amigas Katy, Beta, Ange, Nini y Yose gracias por su amistad, las alegrías y tristezas vividas juntas, enfocadas en un mismo logro, las voy a recordar siempre, las quiero.

Mercedes

DEDICATORIA

A Dios, a la Virgen de Fátima y al Dr. José Gregorio, por brindarme salud, sabiduría, entendimiento, fortaleza y paciencia, y ser los guías para culminar con entusiasmo este trabajo de investigación y concretar los proyectos que he decidido realizar.

A mis padres Gerardo y Lourdes, por apoyarme siempre y creer en mí en cada paso que doy. Gracias por la motivación que me ofrecieron, los amo con el corazón.

A mi estimada profesora Clarita, por apoyarme siempre y brindarme una amistad sincera en todo momento. Gracias por los consejos para el cumplimiento de esta meta.

A mi compañera de tesis y amiga incondicional Mercedes, por ayudarme en todo momento, por tenerme paciencia en este largo camino de formación académica, como los consejos aportados. Gracias por la amistad.

Gerardo

AGRADECIMIENTOS

A nuestra alma mater Universidad de Los Andes y a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, que las llevaremos por siempre en nuestros corazones, porque en sus aulas adquirimos conocimientos invaluable y experiencias inolvidables. Orgullosos de pertenecer a tan prestigiosa casa de estudios.

A nuestra tutora, Prof. Yndra Cordero, por su confianza y acompañamiento para lograr la presentación de nuestro trabajo de grado, gracias por sus conocimientos, consejos, dedicación y orientación. Honrados por el compromiso que asumió con nosotros para formarnos como profesionales.

A las profesoras Ysbelia Obregón, Rosa Aparicio y Álida Pérez, gracias por la orientación y consejos brindados, la dedicación y esfuerzo que realizaron para llevar adelante los objetivos de nuestra investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	
Planteamiento del Problema.....	4
Justificación de la Investigación.....	6
Objetivos de la Investigación	8
<i>Objetivo General</i>	8
<i>Objetivos Específicos</i>	8
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	8
<i>Alcances de la Investigación</i>	8
<i>Limitaciones de la Investigación</i>	9
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	
Trabajos Previos.....	10
Antecedentes Históricos o Epistemológicos.....	12
Bases Teóricas.....	13
<i>Generalidades de la familia Apocynaceae</i>	13
<i>Género Thevetia</i>	17
<i>Generalidades de Thevetia peruviana</i>	19
<i>Productos naturales</i>	24
<i>Extractos vegetales</i>	31
<i>Método de obtención de los extractos</i>	31
<i>Tamizaje fitoquímico</i>	34
<i>Pruebas químicas para la determinación de fitoquímicos</i>	35
<i>Características generales de las bacterias</i>	37

ÍNDICE DE CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

	Pág.
<i>Mecanismo de resistencia bacteriana.....</i>	39
<i>Generalidades de los antibióticos.....</i>	41
<i>Clasificación y mecanismo de acción de los antibióticos</i>	41
<i>Actividad antibacteriana.....</i>	44
<i>Técnicas que se usan para determinar la actividad antibacteriana.....</i>	44
Definición Operacional de Términos.....	45
Operacionalización de la Variables.....	46
Hipótesis	49
 CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	
Tipo de Investigación.....	50
Diseño de Investigación	50
Población y Muestra.....	51
Instrumento de Recolección de Datos.....	52
Procedimiento de la Investigación	52
<i>Recolección y tratamiento de la planta</i>	52
<i>Obtención del extracto.....</i>	53
<i>Tamizaje Fitoquímico.....</i>	53
<i>Determinación de la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar (Kirby - Bauer).....</i>	56
Diseño de Análisis.....	58
 CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	
Resultados.....	59
Discusiones.....	65

**ÍNDICE DE CONTENIDO
(CONTINUACIÓN)**

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones.....	68
Recomendaciones.....	69
REFERENCIAS BIBLIOHEMERÓGRAFICAS.....	70

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Hojas y flores de <i>Nerium oleander</i> (Apocynaceae).....	14
Figura 2. Plantas floreadas de <i>Cathartus roseus</i> (Apocynaceae).....	14
Figura 3. Estructura química de un triterpenoide.....	15
Figura 4. Estructura química de un alcaloide.....	16
Figura 5. Estructura química de un iridoide	16
Figura 6. Hojas y flores de <i>Thevetia peruviana</i>	20
Figura 7. Fruto maduro de <i>Thevetia peruviana</i>	20
Figura 8. Semillas de <i>Thevetia peruviana</i>	21
Figura 9. Estructura de un glicósido cardiotónico	22
Figura 10. Estructura química de un flavonoide.	23
Figura 11. Origen de algunos metabolitos secundarios	25
Figura 12. Estructura química de un triterpeno	26
Figura 13. Estructura química de un polifenol	27
Figura 14. Estructura química de una cumarina.....	28
Figura 15. Estructura química de 1,4-naftoquinona.....	28
Figura 16. Estructura química de una sesquiterpenlactona.....	29
Figura 17. Estructura general de un glicósido cardiotónico.....	30
Figura 18. Estructura química un alcaloide.....	31
Figura 19. Esquema representativo de la pared celular bacteriana.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Thevetia peruviana</i>	19
Tabla 2. Operacionalización de la variable dependiente de la actividad antibacteriana de los extractos de los tallos de <i>Thevetia peruviana</i>	47
Tabla 3. Operacionalización de la variable independiente de la composición química de los extractos de los tallos de <i>Thevetia peruviana</i>	48
Tabla 4. Pesos de los extractos y sus rendimientos.....	59
Tabla 5. Reporte de resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de <i>Thevetia peruviana</i>	60
Tabla 6. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos de <i>Thevetia peruviana</i>	61
Tabla 7. Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de los tallos <i>Thevetia peruviana</i>	64

INTRODUCCIÓN

En la antigüedad la medicina se desarrolló de manera empírica utilizando principalmente las plantas disponibles en cada parte del mundo y atribuyendo con frecuencia a las mismas un poder sobrenatural, suscitando de sus virtudes terapéuticas toda clase de creencias y supersticiones. Igualmente, se fueron conociendo las plantas tóxicas y narcóticas, empleando las primeras para la caza y pesca siendo las segundas con fines medicinales y placenteros. A medida que los tiempos fueron evolucionando, el conocimiento sobre las plantas fue aumentando considerablemente. Se dio lugar a la clasificación de las mismas, recibiendo una denominación botánica, se analizaron químicamente, en muchos casos se consiguió aislar los principios activos responsables de su actividad terapéutica, se comprobaron dichas actividades y actualmente es posible conocer el mecanismo de acción de diversos productos naturales (Frisancho, 2012).

No obstante, en la actualidad las posibilidades terapéuticas se ven notablemente menguadas por la ausencia de nuevos medicamentos que actúen frente a diversos patógenos; y a pesar de la disponibilidad de fármacos para el tratamiento de estas infecciones, se presenta problemas de resistencia. En virtud de estas razones, se debe orientar los esfuerzos a la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos que superen dichas limitaciones. Debido a esta problemática, se ha implementado el estudio fitoquímico de los extractos de las plantas para conocer los metabolitos secundarios que la conforman y estudiar si dichos compuestos presentan actividad antibacteriana que pudiera aportar soluciones al problema de resistencia antibacteriana (González, Maguiña y González, 2019).

Si bien, los productos naturales en general, son compuestos que se originan en la naturaleza, son calificados como productos necesarios para la adaptación de un organismo a sobrevivir en un ecosistema particular. A partir de esta fuente natural ya sea las partes de una planta seca o fresca (hojas, tallos y raíces) se pueden obtener

extractos, mezcla compleja de compuestos químicos, obtenibles por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos utilizable en cualquier campo de la tecnología (Ringuelet y Viña, 2013).

Es así como estos productos son usados como una alternativa terapéutica, ya que algunos poseen actividad antibacteriana, siendo ésta definida como una sustancia empleada para el tratamiento de enfermedades infecciosas. En diversas investigaciones se ha demostrado, la gran variedad de géneros que poseen propiedades antibacterianas; entre ellas la especie *Thevetia peruviana*, la cual es una planta que pertenece a la familia Apocynaceae, conocida popularmente como “hueso o codo de fraile”. Es una planta de gran belleza con fines ornamentales y con elevados riesgos a su exposición (Aguilar y Maycotte, 2013).

T. peruviana es originaria del Sur de América y prolifera en las regiones tropicales del mundo, se distribuye hasta 1500 m.s.n.m. y crece en asocio con vegetación xerofítica en bosque muy seco tropical. Es considerada fuente de compuestos biológicos con actividad cardiotónica y antimicrobiana extraídos normalmente de diferentes partes de la planta. Ya que posee glucósidos cardíacos entre sus principios activos y en las semillas la que mayor porcentaje posee, por lo que tiene graves efectos tóxicos (Ramos, 2018).

Sin embargo, la tintura de la corteza y la decocción de las hojas se han utilizado como febrífugo, purgativo y emético; el látex se emplea contra las hemorroides, sarna, úlceras y llagas; el extracto de la planta entera se utiliza como antimalárico. Varios de los principios activos, entre ellos neriifolina, peruvósido, ruvósido, thevetina A y B, producen efectos inotrópicos positivos y en dosis altas en animales de laboratorio, producen paro cardíaco (Siyanbola, Sasidharn y Anjaneyulu, 2013).

Además, de las hojas se ha aislado flavonoides, tales como glicósidos sinápicos de kaempferol, quercetina, glucósidos flavonoles y flavanona, así como iridoides. En la corteza se han identificado triterpenos y monoterpenos (Torres, 2003).

Asimismo, se han encontrado iridoides en las raíces, a las cuales se le asocia efecto antibacteriano. No obstante, aún existen propiedades medicinales de la misma que faltan por estudiar, sobre todo en el campo de la fitoterapia y su actividad antibacteriana (Neira, 2018).

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo de investigación fue confirmar la composición química y actividad antibacteriana de los extractos de los tallos de *Thevetia peruviana* contra cepas de referencia internacional.

En tal sentido, metodológicamente esta investigación se desarrolló siguiendo las Normas APA, la cual estuvo segmentada en cinco capítulos. El Capítulo I, El Problema, en donde se desarrollarán puntos como: Planteamiento del Problema, Justificación de la Investigación, Objetivos de la Investigación y Alcances y Limitaciones de la Investigación. Por otra parte, en el Capítulo II, se presenta el contenido del Marco Teórico compuesto por: Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Operacionalización de Variables, Hipótesis y Definición de Términos. Asimismo, el Capítulo III, denominado Marco Metodológico, está estructurado de la siguiente manera: Tipo de Investigación, Diseño de Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Procedimiento o Metodología de la Investigación y Diseño de Análisis. Los Resultados y Discusiones se presentarán en el Capítulo IV y finalmente, las Conclusiones y Recomendaciones se expondrán en un último Capítulo V. Además del apartado de Referencias Bibliohemerográficas.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Desde el descubrimiento de los primeros antibióticos, los microorganismos han sido capaces de evadir su acción. Durante los últimos veinte años el uso indiscriminado de estos productos ha hecho que las bacterias dotadas de múltiples mecanismos (bioquímicos, genéticos-moleculares y celulares) desarrollen estrategias inherentes y adquiridas, que les permiten evadir con efectividad la acción de estos compuestos. Debido a que cada vez son más las bacterias que desarrollan resistencia a los antibióticos, se hace más difícil tratar y por supuesto curar una enfermedad de origen infeccioso (Cabrera, Gómez y Zúñiga, 2007).

En la actualidad, las posibilidades terapéuticas se ven notablemente menguadas por la ausencia de nuevos medicamentos que actúen frente a diversos patógenos y a pesar de la disponibilidad de fármacos para el tratamiento de estas infecciones, se presenta dicho problema de resistencia (Contreras, 2019).

Dado el caso, la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2004) promueve la búsqueda constante de nuevos antibióticos que contrarresten la resistencia de los microorganismos ya existentes y los reemergentes. Es por esto que es importante buscar fuentes bactericidas o bacteriostática frente a estos microorganismos con el fin de mejorar la calidad de vida de los seres humanos, plantas e incluso animales (Egwaikhide, Okeniyi y Gimba, 2009).

En efecto, se ha incrementado el interés del estudio de las plantas medicinales debido a que contienen una gran cantidad de principios activos que pueden ser útiles en el desarrollo de antibióticos. Debido a que las plantas tienen una habilidad casi sin límites de sintetizar compuestos químicos, que en muchos casos le sirven como

mecanismos de defensa contra microorganismos, insectos y herbívoros. Atendiendo a ello el hombre, ha dirigido sus investigaciones a la identificación, aislamiento de estas sustancias que tienen actividad antimicrobiana y ha logrado probar que un gran número de especies vegetales inhiben el crecimiento de bacterias resistentes a numerosos antibióticos patógenos para el hombre (Castillo, Pascual, Cunhanune, Lorente y Cañete., 2014). En virtud de estas razones, se debe orientar los esfuerzos a la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos que superen dichas limitaciones.

El estudio fitoquímico de los extractos de las plantas recobra mayor importancia a la hora de conocer los metabolitos secundarios que la conforman y así evaluar si dichos compuestos presentan actividad antibacteriana que pudiera aportar la solución a la actual problemática de resistencia bacteriana (Contreras, 2019).

En base a esto, un sin número de investigadores ya han profundizado sobre la base de la fitoquímica y la múltiple acción antibacteriana de los metabolitos secundarios. En el año 2016, Kumar, Joshi, Sati y Rai, evaluaron los componentes fitoquímicos y actividad antibacteriana de varias plantas, entre ellas *Thevetia peruviana*. Según estos análisis, todos los extractos de esta especie contenían terpenoides, fenoles, flavonoides, antraquinonas y aminoácidos libres. La presencia de estos metabolitos en diferentes géneros ha revelado excelente actividad antibacteriana. Los extractos de las hojas de *Thevetia peruviana* han evidenciado buenos efectos de actividad contra diferentes microorganismos.

Así mismo, Hassan., Saha., Khan., Islam., Mahabub-Uz-Zaman y Ahmed (2011), y Kareru., Keriko., Kenji y Gachanja (2010), reportaron actividad antibacteriana frente a diferentes cepas patógenas. Aunque cabe resaltar que toda la planta es tóxica para el hombre, los animales y ciertos insectos (Neira, 2018). Por lo tanto, son escasos los estudios actualmente realizados sobre la bioactividad antibacteriana de la especie *Thevetia peruviana*.

No obstante, con la finalidad de contribuir con el estudio de la especie, en la presente investigación se logró caracterizar la composición química de los extractos hexanólicos

y etanólicos de los tallos de *Thevetia peruviana*, y evaluar su actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar con discos frente a cepas de referencia internacional. Por consiguiente, unificados los aspectos que dieron origen a la problemática de investigación, se formula el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación que existe entre la composición química y la actividad antibacteriana del extracto de hexano y etanol de los tallos de *Thevetia peruviana* frente a cepas de referencia internacional (ATCC)?

Justificación e Importancia de la Investigación

La justificación de una investigación corresponde a los por qué de la búsqueda, los cuales están relacionados con las razones consideradas por el autor para realizar las fases operativas de un proceso indagatorio. En el mundo empírico se muestra la realidad del evento de estudio en función de varias características: necesidades, inquietudes, potencialidades, oportunidades, amenazas (Hurtado, 2010).

En tal sentido los autores de esta investigación consideraron varias razones para realizarla. Primeramente, en diversas investigaciones se ha demostrado, la gran variedad de géneros que poseen propiedades antibacterianas; entre ellas la especie *Thevetia peruviana*, la cual se caracteriza por contener en su mayoría sustancias tipo glucósidos cardiacos, además de flavonoides, tales como kaempferol y quercetina, así como iridoides, triterpenos y monoterpenos a los cuales se le asocia efecto antibacteriano (Pacheco, Taborda y De la Rosa, 2006). Este hecho representa una razón de potencialidad y oportunidad de conocer el fenómeno a estudiar.

Al observar la enorme variedad de efectos terapéuticos de distintas especies de la familia Apocynaceae es de pensar que existen algunas propiedades medicinales que aún faltan por conocer y esto apertura el interés hacia potenciales aplicaciones que tendría *Thevetia peruviana* en el campo de la fitoterapia. La cual podría brindar

propiedades medicinales que son de gran provecho para la industria farmacéutica (Ramos, 2018).

Debido al éxito que los productos naturales han tenido en el mercado, numerosos países retoman sus proyectos de bioprospección de sus plantas con el propósito de poder indagar en el descubrimiento de nuevos compuestos con bioactividad. Son cerca de 500 nuevas drogas en proceso de investigación para convertirse en fármacos de origen botánico que están siendo considerados. Estos podrían ser en un futuro cercano una nueva clasificación de fármacos (Ramos, 2018).

Por consiguiente, los investigadores enfocaron su evento de estudio en la composición química y la actividad antibacteriana de los extractos de los tallos de *Thevetia peruviana* desde el punto de vista confirmatorio por diversas razones. Principalmente, la poca información divulgada sobre la actividad antibacteriana de esta planta recaba sobre el interés de la presente investigación. Seguidamente, se desea confirmar la presencia de compuestos bioactivos en los extractos de hexano y etanol de los tallos de *T. peruviana* y conocer el rendimiento de la obtención de los mismos. Además de conocer las diferentes especies bacterianas que pudieran presentar sensibilidad o resistencia frente a los extractos evaluados. Y finalmente, la potencialidad de aportar información para próximas investigaciones sobre dicha planta.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la composición química y actividad antibacteriana de los extractos vegetales de los tallos de *Thevetia peruviana* contra cepas ATCC.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos de hexano y etanol a partir de los tallos de *Thevetia peruviana* mediante la técnica de digestión en caliente.
- Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios que se encuentran en los extractos obtenidos de los tallos de *Thevetia peruviana* a través del tamizaje fitoquímico.
- Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de los tallos de *Thevetia peruviana* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC, a través del método de difusión en disco en agar (Kirby – Bauer).

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

El logro de esta investigación está relacionado con la susceptibilidad antibacteriana que posee el extracto de los tallos de *Thevetia peruviana* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC.

Limitaciones de la Investigación

Según Arias (2006), son obstáculos que eventualmente pudieron presentarse durante el desarrollo del estudio y que escapan del control del investigador. Están relacionadas con los recursos teóricos, técnicos y de presupuesto económico durante el desarrollo de la investigación (Hernández., Fernández y Baptista, 2010). De allí pues, se considera que durante esta investigación hubo limitaciones de tipo teórico, debido a la escasa información actualizada y poco acceso al contenido de interés. Además, se presentaron limitaciones técnicas a la hora de ejecutar la parte experimental, debido a las fallas de los servicios públicos como eléctricos y suministro de agua en la zona, así como las limitaciones del tiempo para acceder a las áreas de investigación debido a horarios de contingencia cumplido por la institución conforme a la situación mundial de pandemia por el COVID-19. Así mismo, se encontraron limitaciones de tipo económicas, debido al alto costo de reactivos y material de laboratorio para realizar los experimentos requeridos.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Al-Rajhi, Yahya, Abdelghany, Fareid, Mohamed, Amin y Masrahi (2022). Efectuaron un estudio cuyo objetivo fue la actividad de las propiedades anticancerígenas, antioxidantes, anticoagulantes y antimicrobianas del látex de *Thevetia peruviana*. Utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) reveló que el contenido principal de los flavonoides es rutina (11,45 µg/mL), quercetina (7,15 µg/mL), naringina (5,25 µg/mL) e hesperidina (6,07 µg/mL), mientras que el fenólico tenía propiedades clorogénicas (12,39 µg/mL), jeringuino (7,45 µg/mL) y ferúlico (5,07 µg/mL). A través de la eliminación de radicales 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH), el experimento demostró que el látex tenía una potente actividad antioxidante con IC₅₀ de 43,9 µg/mL para la eliminación de DPPH. La inhibición de la hemólisis fue del 58,5 % con 1000 µg/mL de látex en comparación con el 91,0 % con 200 µg/mL de indometacina como control positivo. Se informaron propiedades anticoagulantes insignificantes del látex donde el tiempo registrado fue de 11,9 s de tiempo de protrombina (PT) y 29,2 s de tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPA) a 25 µg/mL, en comparación con la misma concentración de heparina (PT 94,6 s y CITA 117,7 s). El potencial anticancerígeno del látex se registró frente a PC-3 (97,11 % de toxicidad) y MCF-7 (96,23 % de toxicidad) a 1000 µg/mL con IC₅₀ 48,26 µg/mL y 40,31 µg/mL, respectivamente. La evaluación de la actividad antimicrobiana por difusión en disco registró que los microorganismos probados más sensibles al látex fueron *Bacillus subtilis* seguido de *Escherichia coli*, con una zona de inhibición de 31 mm con una concentración mínima inhibitoria (CMI) (10,2 µg/mL) y 30 mm (CMI, 12,51 µg/mL), respectivamente. Además, *Candida albicans* fue sensible (28 mm) al

látex, a diferencia del hongo negro (*Mucor circinelloides*). El examen de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) mostró cambios en la ultraestructura de las paredes celulares y las membranas celulares de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* tratadas con látex. Las puntuaciones de energía del acoplamiento molecular del ácido clorogénico con el ADN de *E. coli* (7C7N), y la rutina con el antígeno prostático específico humano (3QUM) y la proteína asociada al cáncer de mama (1JNX), dan como resultado una excelente armonía en comparación con los experimentales. En esta investigación se concluyó que existe una relación entre las variables de estudio, evidenciándose correlación directa y altamente significativa del látex de la planta, el cual se considera una fuente que contribuye a combatir los microorganismos patógenos y el cáncer.

Deshmukh, Dighe, Shelke (2019). Llevaron a cabo un estudio que trató sobre la actividad antibacteriana del extracto crudo de *Thevetia peruviana* en el cual se seleccionaron flores y frutos extraídos en agua y etanol. Se utilizaron cepas de bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) y bacterias gramnegativas (*Escherichia coli*). Ambos extractos mostraron una actividad antibacteriana significativa. La actividad antibacteriana de los extractos acuosos y etanólicos de las flores y frutos de *Thevetia peruviana* se ensayó *in vitro* por un método de difusión en pozo de agar contra las tres diferentes cepas bacterianas. Según lo obtenido, en las flores, el extracto acuoso y de etanol ha mostrado su máxima actividad antibacteriana contra *E. coli*, con zona de inhibición 16 mm y 17 mm respectivamente; mientras que para *S. aureus* presentó halos de inhibición de 14 mm y 13 mm. En los frutos, el extracto acuoso y de etanol mostró máxima actividad antibacteriana contra *E. coli* con zona de inhibición 13 mm y 15 mm respectivamente, y para *S. aureus* una zona de 11 mm y 12 mm.

Adeyemi, Ogunsola, Chijindu, Afonja, Odebisi-Omocanye, Ahmed, Krishnamurthy (2019). Realizaron la investigación que tuvo como finalidad determinar la actividad antibacteriana de las hojas de *Perquetina nigrescens* y las raíces de *Thevetia peruviana*. Se pesaron 500 g de polvo de hojas de *P. nigrescens* y raíces de *T. peruviana* y se maceraron en 1000 mL de metanol al 80 % durante 72 horas con agitación intermitente con espátula. Las mezclas se filtraron usando papel de filtro Whatman No.1 y se concentraron hasta sequedad usando un rotavapor. Los extractos crudos se dispensaron en viales de muestra etiquetados y se almacenaron a 4 °C antes de su uso posterior. Se calculó el rendimiento porcentual del extracto de metanol de las especies estudiadas reveló que *P. nigrescens* tuvo un rendimiento de 13,46% frente a *T. peruviana* (10%). El análisis fitoquímico de las dos plantas reveló la presencia de alcaloides, flavonoides y terpenoides. Los taninos están presentes en las raíces de *T. peruviana*, pero están ausentes en *P. nigrescens*. También, hay presencia de saponinas en la hoja de *P. nigrescens* pero ausente en *T. peruviana*. Se trató la actividad de ambos extractos a concentraciones de (50 - 300 mg/mL). Obteniendo halos de inhibición para *E. coli* de (7 mm) y para *S. aureus* (11,50 mm) respectivamente.

Antecedentes Históricos o Epistemológicos

La historia del hombre está estrechamente ligada con las plantas medicinales y aromáticas. Antes de conocer el fuego y domesticar los animales su subsistencia dependía en gran parte de las hierbas, los frutos, la miel y los jugos que extraían de las plantas. El siglo XVII marcó el apogeo de las plantas aromáticas y medicinales, que hasta entonces se emplearon de manera limitada como medicina, y su propagación y multiplicación había aumentado, pues aparecieron otras como la manigueta de Guinea y anís estrellado de la China. A finales del siglo XVII su utilidad y su valor era curativo (Méndez, 2008).

En la antigüedad ciertas especies de la familia Apocynaceae eran utilizadas como veneno. No fue sino hasta 1798, que el botánico francés Antoine L. de Jussieu propuso el nombre Apocynaceae a una familia de plantas pertenecientes al género *Apocynum* introducido por Linneo en 1753, en su *Systema Plantarum*. Su nombre deriva del significado en latín de mata perros o ahuyenta perros, término usado por Plinio en el siglo I d.C. refiriéndose a una planta *Perenne venenosa* (Websters, 1971).

Jussieu propuso por primera vez las Apocynaceae bajo una circunscripción poco clara, reconociendo 3 grupos con base en las características de los frutos. En 1810, Robert Brown separó las Asclepiadaceae de la circunscripción de Jussieu, apoyado en su compleja morfología floral. Desde entonces se ha aceptado tal propuesta y se han reconocido como 2 familias independientes, aunque cercanamente relacionadas (Juárez, Alvarado y Villaseñor, 2007).

Ahora bien, *Thevetia* procede de Thévet, en honor a André Thevet, quien fue misionero francés que colectó plantas en Suramérica. Y *peruviana* que significa procedente de Perú (Neira, 2018). Desde 1960, ha habido extensos estudios llevado a cabo en las raíces, cortezas, hojas, flores y semillas de la planta.

Bases Teóricas

Generalidades de la Familia Apocynaceae

La familia Apocynaceae, comprende plantas dicotiledóneas que incluye árboles, arbustos, hierbas y lianas. La mayoría de las especies de esta familia proceden de zonas tropicales y subtropicales. Muchos de sus integrantes producen un látex lechoso, rojizo o transparente; proveniente de lactíferos constituidos por células individuales (Ramos, 2018).

Las hojas son simples (Figura 1), opuestas o verticiladas, algunas presentan coléteres. Estos pueden localizarse en las axilas, en la base, sobre el pecíolo, en las

bases de las brácteas y de los sépalos. Las flores son hermafroditas (Figura 2), actinomorfas, pentámeras, vistosas y pueden ser fasciculadas o solitarias, surgen en la parte terminal de las ramas o en las axilas de las hojas (Mandevilla), y cuentan con una gran variedad de inflorescencias, sobre todo racemosas; por ejemplo, umbelas (Asclepias), corimbos (Cascabela), racimos (Mandevilla) o panículas. El cáliz es gamosépalo, dividido hasta su base, la corola es gamopétala, hipocraterimorfa, infundibuliforme. El limbo presenta una preloración dextrocontorta o sinistrocontorta. Los frutos se presentan como folículos, drupas, bayas y sámaras. Las semillas pueden ser aplanadas, ciliadas, aladas, cubiertas o desnudas (Ramos, De la Torre y Avilé, 2014).



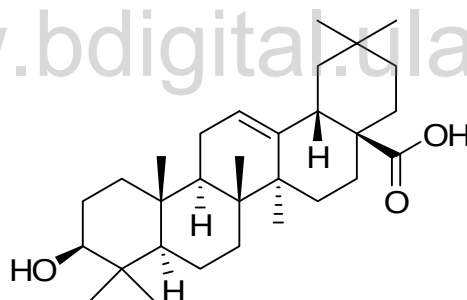
Figura 1. Hojas y flores de *Nerium oleander*. Tomado y modificado de Salinas, 2010.



Figura 2. Plantas floreadas de *Cathartus roseus*. Tomado y modificado de Salinas, 2010.

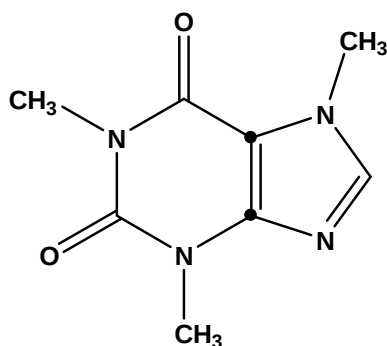
Se distribuyen en zonas tropicales como: las selvas y zonas pantanosas de la India y Malasia (*Alstonia* y *Dyera*), en el norte de Australia (*Cerbera* y *Ochrosia*), selvas africanas (*Carissa*, *Wrightia* y *Holarrhena*), el mediterráneo (*Nerium oleander*, *Vinca major* y *Vinca minor*), Latinoamérica (*Plumeria*, *Frangipani* y *Landolphia*). La familia está dividida en cinco subfamilias principales: *Rauvolfioideae*, 79 géneros; *Apocynoideae*, 82 géneros; *Periplocoideae*, 33 géneros; *Secamonoideae*, 8 géneros; *Asclepiadoideae*, 164 géneros (Ramos y cols., 2014).

Las especies de *Apocynaceae* son ricas en metabolitos como triterpenoides: ácido oleanólico (1) (figura 3), iridoides, alcaloides: cafeína (2) (figura 4) y glucósidos cardiotónicos. Estos compuestos poseen una gran cantidad de actividades biológicas y farmacológicas como cardioprotector, hepatoprotector, neuroprotector, hipoglicemiante y antiinflamatorio (Omino y Kokwaro, 1993).



Ácido oleanólico (1)

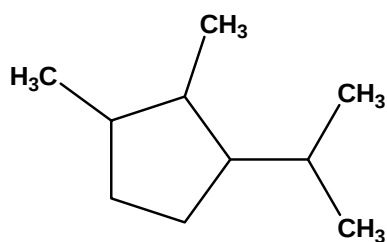
Figura 3. Estructura química de un triterpenoide (Bruneton, 2001).



Cafeína (2)

Figura 4. Estructura química de un alcaloide (Bruneton, 2001).

Esta familia posee una amplia variedad de propiedades farmacológicas, destacando principalmente su actividad antiproliferativa en contra de células de cáncer humanas. Esta actividad es debida a la presencia de compuestos tales como: alcaloides, cardenólidos, triterpenoides, iridoides: iridano (3) (figura 5), pregnanas y flavonoides. Decocciones de diferentes especies son usadas para el tratamiento de malaria, diarrea, diabetes y enfermedades de la piel. Extractos preparados de las hojas son usados como agentes antisépticos para la curación de heridas. Sin embargo, aún no se conoce la fitoquímica de muchas especies de esta familia que podrían contener compuestos nuevos con actividades farmacológicas importantes (Ramos, 2018).



Iridano (3)

Figura 5. Estructura química de un iridoide (Bruneton, 2001).

Género *Thevetia*

Thevetia es un género de plantas fanerógamas de la familia Apocynaceae. Son arbustos o árboles pequeños (raramente bejucos) que alcanzan un tamaño de hasta 10 m de altura, latescentes usualmente con látex blanco espeso. Tallos jóvenes ligeramente angulados, volviéndose teretes con la edad; líneas o crestas interpeciolares conspicuas. Hojas alternas o dispuestas en espiral, sésiles a pecioladas, submembranáceas a coriáceas; márgenes enteros y frecuentemente revolutos; nervaduras secundarias unidas cerca del margen en una serie de rizos o curvas. Inflorescencias axilares o terminales, cimosas, con pocas flores a multifloras; pedúnculos la mayoría alargados; brácteas pequeñas (Malaret, 1970).

Las flores son de color amarillo brillante y en forma de embudo con 5 pétalos retorcidos en espiral. Los frutos son algo globosos, ligeramente carnosos y tienen un diámetro de 4 a 5 cm. Los frutos, de color verde, se vuelven negros al madurar. Cada fruto contiene una nuez dividida longitudinal y transversalmente. Todas las partes de la planta contienen el jugo lechoso (Ravindra y Deepthi, 1989).

El género fue descrito por Carlos Linneo y publicado en Opera Varia. Es originario de las regiones tropicales de América y Asia (Antioquia, Bolivia, China, Costa Rica, Ecuador, Nicaragua, Pakistán, Panamá, Paraguay, Perú). Comprende 27 especies descritas y de estas, solo 3 aceptadas hasta octubre 2013 (*Thevetia ahouai* (L.) A.DC., denominada en el Río de la Plata aguái o aguay, *Thevetia amazonica* Ducke y *Thevetia bicornuta* Müll.Arg) (Malaret, 1970).

Composición química del género *Thevetia*

Entre los compuestos identificados, se encuentran en orden decreciente de toxicidad, Glucósidos cardíacos, Peruvósido, Rubósido, Thevetina A, Nerifolina, Cerebrina y Thevetina B. Se encuentran distribuidos en toda la planta pero no de manera

homogénea: semillas 4,8 %, hojas 0,070 %, frutas 0,045 % y en la savia 0,036 %. Las semillas contienen también ácido cianhídrico, en pequeñas proporciones, que puede provocar intoxicación en personas que la ingieren de manera constante y por periodos prolongados. El mecanismo de acción de los cardenólidos es similar al de los digitálicos con inhibición de la bomba Na/K ATPasa (Ravindra y Deepthi, 1989).

Usos Etnobotánicos

La planta es ampliamente cultivada como un árbol ornamental para adornar jardines y en sitios religiosos para ofrendas. El glucósido cardíaco peruvósido de la adelfa amarilla es utilizado medicinalmente para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca (Frohne y Pfander, 1983). Sin embargo, se ha encontrado que el margen entre lo terapéutico y lo tóxico de la dosis es demasiado pequeña para que thevetin sea terapéuticamente útil (Watt y Breyer-Bradwijk, 1962).

La adelfa es un arbusto atractivo y resistente que prospera en las regiones tropicales y subtropicales. La adelfa rosa común, *Nerium oleander*, y la adelfa amarilla, *Thevetia peruviana*, son las principales representantes de las adelfas de la familia Apocynaceae.

Taxonomía de *Thevetia peruviana*

La campanilla de oro o cabalonga (*Thevetia peruviana* Persoon K. Schum) es una planta perteneciente a la familia Apocynaceae, originaria del centro y sur de América (Tabla 1). Se encuentra distribuida desde México a Perú (Herrera, Bacab, Alejo, Tun y Ruíz 2011).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Thevetia peruviana*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Gentianales
Familia	Apocynaceae
Subfamilia	Rauvolfioideae
Tribu	Plumerieae
Género	<i>Thevetia</i>
Especie	<i>T. peruviana</i> (Pers.) K. Schum. = <i>Cascabela thevetia</i> (L.) Lippold

Nombres comunes: Chilca, Chilindrón, Covadonga, Covalonga, Codo defraile, Chira, Naranja amarillo, Yoyote, Caballón, Campanilla muerta, Pepade cruz, Lengua de gato, maichil.

Tabla 1. Tomado y modificado de Neira 2018, Prieto 1993 y TRAMIL 2014.

Generalidades de *Thevetia peruviana*.

Thevetia peruviana, arbusto o arbolito glabro, es un árbol que crece de 2 a 8 metros de altura, presenta un látex de color blanco en todas las partes de la planta. Posee hojas lineales de ápice agudo con base cuneado-atenuada, estrechamente acuminada, brillantes en el haz, de un color verde vivaz un poco más oscuro en la cara superior y están recubiertas por una cera para reducir la pérdida de agua. Inflorescencia terminal o lateral con pocas flores; lóbulos de la corola obovados a ovado-lanceolados; corola hipocraterimorfa, de color amarillo, naranja o rosado-amarillento (Figura 6). Florece durante el verano y otoño. Los frutos son transversalmente oblongos, drupas carnosas

redondeadas y con costillas, generalmente más o menos triangulares; al madurar cambian del verde al negro, pasando por el rojo (Figura 7). En su interior se encuentra una nuez o almendra conocida localmente en algunas regiones como codo de fraile, triangular o con forma de almeja, y que contiene en su interior de dos a cuatro semillas (Figura 8) (Ramos, 2018; Neira, 2018 y TRAMIL, 2014).



Figura 6. Hojas y flores de *Thevetia peruviana*. Tomado y modificado de Ramos 2018.



Figura 7. Fruto maduro de *Thevetia peruviana*. Tomado y modificado de MHNT 2007.



Figura 8. Semillas de *Thevetia peruviana*. Tomado y modificado de MHNT 2007.

Distribución Geográfica

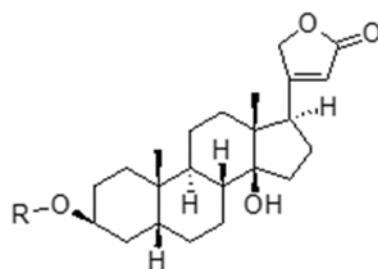
Esta planta es cultivada en las zonas tropicales y subtropicales como un árbol ornamental. Es originaria del centro y sur de América. Se distribuye por México, Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Panamá, Cuba, República Dominicana, Haití, Guayana Francesa, Surinam, Venezuela, Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú, Brasil, Argentina, Paraguay y Nicaragua donde es ampliamente cultivada en todo el país en alturas de 10–1200 metros (Cheers, Burnie, Van Schaik, T. y Leegsma, 2006).

Composición Química

Thevetia peruviana es ampliamente conocida por sus dos más importantes compuestos activos, Thevetina A, Thevetina B y Peruvosido. Entre ellos, el Peruvosido es un glucósido cardíaco que se ha introducido en el mercado alemán como Endocardin; a su vez, Thevetin es un cardenólido, junto a la neriifolina contenidas en altas concentraciones en los tejidos de la planta. Aparte de estos compuestos, se han aislado un total de 77 componentes del género *Thevetia*, de los cuales 34 son

constituyentes de la especie *T. peruviana*, categorizados de la siguiente manera: Enolides; flavona; Thevetosido; Thevesido; pentanodiol; pentanol; pentanotriol; Kaempferol-3-glucósido; Lupen-3-ol; Lupen-dien-3-ol; flavanona; quercetina-3-glucósido; Ursadien-3-ol; y pentanetetrol (Torres, 2003).

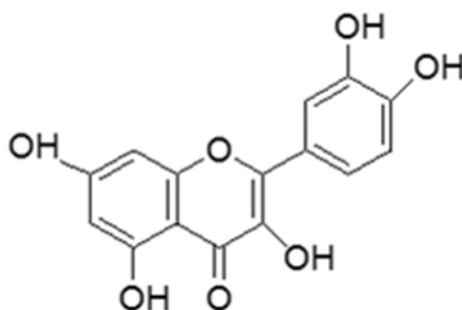
Entre los cardenólidos identificados en *T. peruviana* se encuentran en orden de creciente de toxicidad, Peruvosido, Rubosido, Thevetina A, Nerifolina, Cerebrina y Thevetina B (4) (Figura 9). Se encuentran distribuidos en toda la planta, pero no de manera homogénea: semillas 4,8 %, hojas 0,070 %, frutas 0,045 % y en la savia 0,036 % (Torres, 2003). Además, las hojas contienen triterpenos: α y β amirina, ácido ursólico y derivados; cardenólidos: derivados de 18-20-epoxi-digitoxigenina, derivados de digitoxigenina, derivados de canogenina, derivados de carda-I3(18)-20(22)-dienólido, derivados de tevetiogenina, tevetiósidos A-I7, derivados de uzarigenina; monoterpenos: teviridósidos; fenilpropanoides: ácidos ocumáricos, fenílico; bencenoides: ácido gentísico; flavonoides: derivados de canferol, quercetina (5) (Figura 10), y derivados. (TRAMIL, 2014).



Thevetina B (4)

R = Ram – Gluc – Gluc.

Figura 9. Estructura de un glicósido cardiotónico. Tomado y modificado de Amaringo, Hormaza y Arias 2011.



Quercetina (5)

Figura 10. Estructura química de un flavonoide. Tomado y modificado de Toiu, Vlase, Vodnar, Gheldiu y Oniga 2019.

Usos Etnobotánicos

La especie *Thevetia peruviana*, en medicina folklórica y herbaria se la suele usar como antiparasitaria, reductora de peso, como abortiva, para tratar enfermedades de piel y hemorroides, etc. Sin embargo, no tiene ninguna indicación terapéutica aceptada en el tratamiento de enfermedades, ni margen de seguridad que justifique su uso (Torres, 2003). Debido a que toda la planta es tóxica para el hombre, los animales y ciertos insectos; puede llegar a producir muchas reacciones adversas al inhalar, ingerir o llegar a tener contacto con la sabia o extractos de la planta. En este sentido varios autores han referido irritación de las mucosas, eritema bucal, náuseas, vómitos, salivación profusa, dolor abdominal, diarrea, dolor de cabeza, alteraciones mentales, disturbios visuales, midriasis, neuritis periférica y síntomas cardiovasculares (bloqueo sinusal y aurículo-ventricular) como respuesta al ingerir *T. peruviana*. También tiene efecto diurético, por lo que puede llegar a producir graves alteraciones hidroelectrolíticas (Neira, 2018 y Torres, 2003).

No obstante, hay quienes la usan con fines terapéuticos para procesos febrífugos, catártico, emético, antiartrítico, para conciliar el sueño; el látex se utiliza para el tratamiento de la sordera, la sarna, las úlceras, dolores de muela, tumores y cáncer.

Además, se le ha asociado actividad antibacteriana de acuerdo a su composición química. Según estudios fitoquímicos de la planta, contiene en todas sus partes metabolitos como: terpenoides, fenoles, flavonoides, antraquinonas y aminoácidos libres, los cuales algunos de estos podrían ser los que ejercen el efecto antibacteriano como es el caso de los terpenoides, que de acuerdo a las investigaciones si presentan dicho efecto (Virender, Munish, Jyoti y Pawan 2017).

Productos Naturales

Un producto natural es todo aquello que está formado por cualquier compuesto de la naturaleza. Aunque de forma muy distintiva, un producto natural comprende los productos del metabolismo de las plantas que no son necesarios para el crecimiento y la reproducción de las mismas. Diferenciándose, por lo tanto, de los productos químicos necesario para la vida, como son carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, los cuales se les denominan metabolitos primarios. Por ende, los productos naturales son conocidos también como metabolitos secundarios o fitoquímicos, e incluyen todas aquellas moléculas activas generadas por diversas especies vegetales, encargadas del mecanismo de defensa, agentes polinizadores, sustancias de reserva y cicatrizantes para las propias heridas de la planta. Así mismo, tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica (Ávalos y Pérez, 2009).

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

Según (Ávalos y Pérez, 2009), las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono (Figura 11). Los cuales se agrupan en cuatro clases principales:

- Terpenos: Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- Compuestos fenólicos: Cumarinas, flavonoides, ligninas y taninos.
- Glicósidos: Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- Alcaloides.

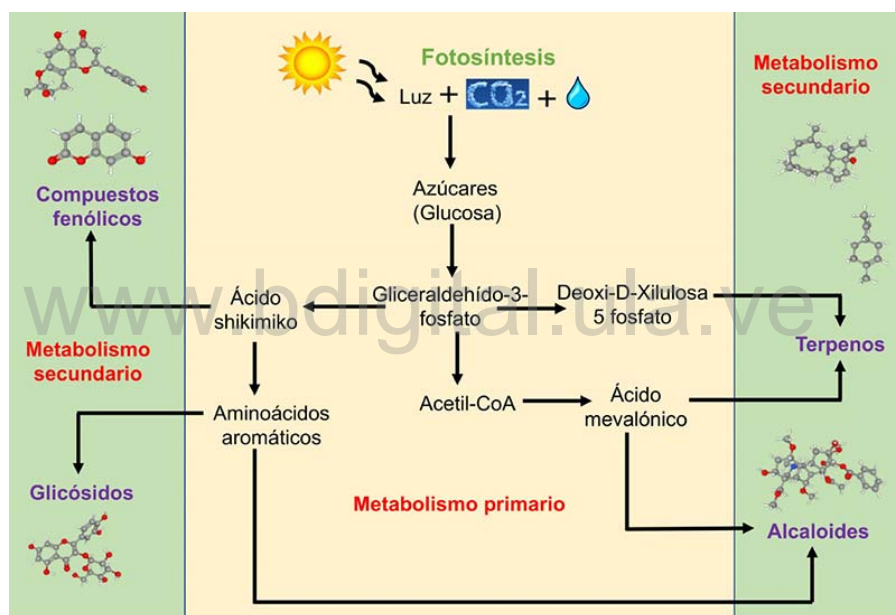


Figura 11. Origen de algunos metabolitos secundarios (alcaloides, compuestos fenólicos, glicósidos y terpenos). Tomado y modificado de Venancio, Pérez e Ibarra 2021.

Terpenos

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C). De esta forma,

los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C₅) que contienen: los terpenos de 10 C contienen dos unidades C₅ y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C₅ y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, como el ácido oleanólico (6) (Figura 12), los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno. Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenildifosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP (Ávalos y Pérez, 2009).

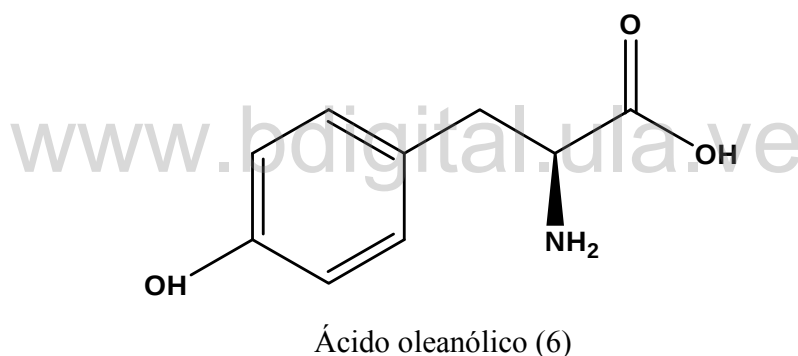
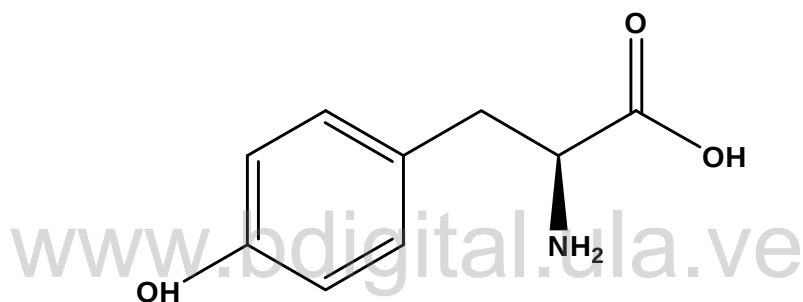


Figura 12. Estructura química de un triterpeno. Tomado y modificado de Toiu y cols 2019.

Compuestos fenólicos

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles (7) (Figura 13) o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico. La ruta del ácido shikímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos

fenólicos de plantas. A partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido shikímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los flavonoides, su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo las principales antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación (Ávalos y cols, 2009).

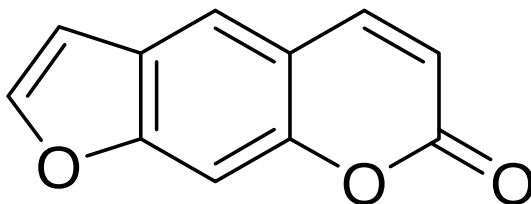


Tirosina (7)

Figura 13. Estructura química de un polifenol. Tomado y modificado de Toiu y cols 2019.

Cumarinas

Las cumarinas son un grupo muy amplio de principios activos fenólicos y tienen en común la estructura química de 1-benzopirán-2-ona (8) (Figura 14). Se caracterizan porque presentan fluorescencia bajo la luz ultravioleta a 365 nm. Son inhibidoras de la germinación y altamente tóxicas para la célula (Martínez, Valencia, Jiménez, Mesa y Galeano, 2008).

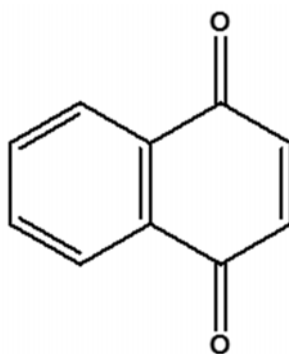


Psoraleno (8)

Figura 14. Estructura química de una Cumarina. Tomado y modificado de Amaringo y cols 2011.

Quinonas

Las quinonas son compuestos oxigenados, producto de la oxidación de derivados aromáticos, las quinonas pueden estar conjugadas con un núcleo bencénico (benzoquinonas) o con un sistema aromático policíclico naftoquinonas (9) (Figura 15), antraquinonas, también pueden asociarse con otros metabolitos secundarios formando flavonoides y quinonas con esqueleto terpénico. Se han descrito más de 1200 quinonas distribuidas ampliamente en el reino vegetal (Villarreal, 2015).

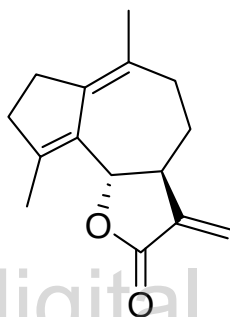


Naftoquinonas (9)

Figura 15. Estructura química de 1,4-naftoquinona. Tomado y modificado de Amaringo y cols 2011.

Sesquiterpenlactonas

Son una clase de sesquiterpenoides (Terpenoides C15) con un anillo lactónico, entre ellos el germacranólido (10) (Figura 16). Se clasifican comúnmente de acuerdo con el tipo de núcleo que posean con la terminación ólido que indica la existencia de un grupo funcional lactona. Inducen la apoptosis celular, por ende, tiene características antiinflamatorias y efecto citotóxico (Martínez y cols, 2008).



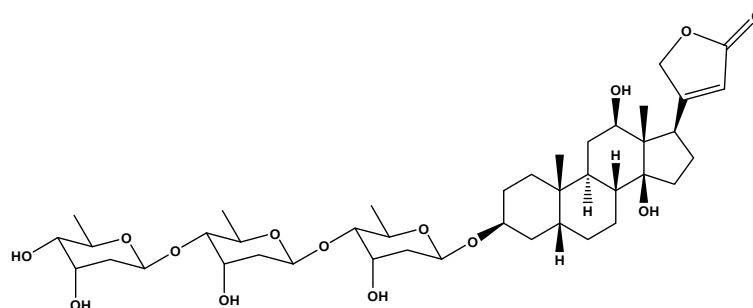
Germacranólido (10)

Figura 16. Estructura química de una sesquiterpenlactona. Tomado y modificado de Amaringo y cols 2011.

Glicósidos

Los glicósidos hacen referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos (11) (Figura 17) y glicósidos cianogénicos. Las saponinas se encuentran como glicósidos esteroideos, glicósidos esteroideos alcaloides o bien glicósidos triterpenos. Son por tanto triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. Se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar (el terpeno sin el azúcar, por ejemplo), en cuyo caso se denominan sapogeninas. La adición de un

grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas (Ávalos y Pérez, 2009).



Lanatosido A (11)

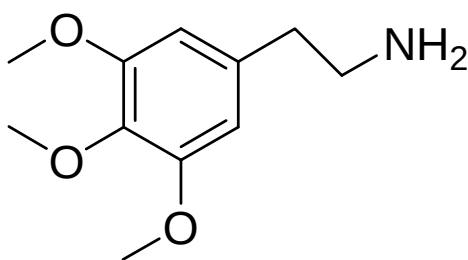
Figura 17. Estructura general de un glicósido cardiotónico. Tomado y modificado de Amaringo y cols 2011.

Los glicósidos cardíacos o cardenólidos son semejantes a las saponinas esteroideas, tienen también propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Se encuentran de forma natural en forma de glicósidos o de agliconas. Quizá el más conocido sea la digitoxina, o su análogo digoxina, aislada de *Digitalis purpurea* y utilizada como medicamento en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva (Ávalos y cols, 2009).

Alcaloides

Los alcaloides son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos, aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina (12) (Figura 18), o la colchicina, por ejemplo. Se encuentran en el

20 % aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas. Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina (Ávalos y Pérez, 2009).



Mescalina (12)

Figura 18. Estructura química un alcaloide. Tomado y modificado de Amaringo y cols 2011.

www.bdigital.ula.ve

Extractos vegetales

Se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos con una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (Ruiz y Susunaga, 2000).

Métodos de obtención de los extractos

Según González (2004), los procesos de extracción frecuentemente empleados, de acuerdo al disolvente utilizado se dividen en:

Extracción con agua

Infusión, destilación por arrastre con vapor de agua y decocción.

- *Infusión y Decocción:* Tanto la infusión como la decocción son procesos simples de extracción con agua, en el primer caso se agrega agua caliente o fría al material molido y luego se filtra; en el segundo el material se hierve por espacio de 15 minutos con el agua (González, 2004).

La destilación por arrastre con vapor puede realizarse de tres formas distintas y son comúnmente conocidas como:

- *La hidrodestilación simple o destilación con agua:* Consiste en sumergir directamente el material vegetal a tratar en agua, que a continuación se somete a ebullición. En éste método es máxima la acción del agua sobre el material, por ello se puede presentar hidrólisis y oxidaciones. Útil para materiales que tienden al apelmazamiento (flores pequeñas). Es aconsejable cargar el agua ya caliente para disminuir la hidrólisis y el tiempo (González, 2004).
- *Destilación con vapor saturado o destilación con agua y vapor:* El vegetal no está en contacto con el agua; el vapor de agua se inyecta a través de la masa vegetal dispuesta sobre placas perforadas. El material debe tener tamaño uniforme para favorecer el paso del vapor. Trabaja cerca de los 100 °C cuando lo hace a 1 atm de presión y el rendimiento es bueno siempre y cuando no se presenten apelmazamientos. Por su sencillez, bajo costo y rendimientos, esta técnica es la más usada en la industria de aceites esenciales (González, 2004).
- *La destilación con vapor seco o sobrecalentado:* Consiste en impulsar el vapor a través de la masa vegetal, colocada sobre columnas o cestones. El vapor tiende a recalentarse por la resistencia opuesta a su paso por el material y esto debe evitarse en lo posible, debido a que seca las membranas celulares e impide

la salida del aceite. Las instalaciones son más costosas, pero presentan mayores producciones (González, 2004).

Extracción con solventes orgánicos

Maceración, lixiviación o percolación, extracción de soxhlet, digestión y por fluido supercrítico.

- *Maceración:* Es un proceso de extracción sólido-líquido que se realiza a temperatura ambiente. Consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente (agua, hexano, etanol o metanol), en este caso se prefieren los solventes orgánicos puesto que, a largo tiempo de la extracción, el agua puede provocar la fermentación o la formación de mohos hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no sea atacado con el disolvente; en éste se coloca el material vegetal con el disolvente y tapado se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto (González, 2004).
- *Extracción de Soxhlet:* Método en caliente, que se desarrolla empleando solventes con puntos de ebullición bajo, para evitar la degradación de la muestra. Conveniente para obtener los extractos crudos de las plantas (González, 2004).
- *Digestión:* En este proceso se agrega solvente caliente (con temperaturas no mayores a los 50 °C) al material vegetal molido colocado en un matraz de vidrio de boca pequeña, la temperatura del solvente permite una mayor extracción de

compuestos ya que la solubilidad de la mayoría de las especies aumenta con la temperatura (González, 2004).

- *Percolación*: También conocido como lixiviación, es uno de los procesos más difundidos pues se puede realizar con disolventes orgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener el material. Consiste en colocar el material fragmentado en un embudo o recipiente cónico y hacer pasar un disolvente adecuado a través del mismo. No es apropiado para resinas o materiales que se hinchen dado que el disolvente no percolará. Se requiere agregar solvente constantemente (González, 2004).
- *Extracción de fluidos supercríticos*: Este proceso es una operación que aprovecha el poder disolvente de fluidos a temperaturas y presiones por encima de sus valores críticos (González, 2004).
- *Destilación al vacío*: Es un montaje muy parecido a los otros procesos de destilación con la salvedad de que el conjunto se conecta a una bomba de vacío o trompa de agua. Este montaje permite destilar líquidos a temperaturas más bajas, debido que la presión es menor que la atmosférica con lo que se evita en muchos casos la descomposición térmica de los materiales que se manipulan (González, 2004).

Tamizaje fitoquímico

Consisten en pruebas sencillas, sensibles y rápidas, que mediante una reacción química produce la alteración rápida en la estructura molecular del compuesto y permiten identificar grupos químicos. Estas reacciones pueden ser la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular, la formación de un complejo; lo

cual da como resultado una manifestación sensible como el cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas, mediante la utilización de reactivos específicos (Bruneton, 2001).

Pruebas químicas para la determinación de fitoquímicos

- *Ensayo de Lieberman-Bouchard (Triterpenos y/o Esteroles)*: Está compuesta por una mezcla de ácido sulfúrico y anhídrido acético que producen sustancias cromóforas con el ciclopentanoperhidrofenantreno (Bruneton, 2001). La positividad de la prueba se observa por la aparición de un color rojo, verde o azul.
- *Ensayo de Shinoda (Flavonoides)*: El magnesio en polvo reacciona con ácido clorhídrico concentrado. El hidrógeno generado produce por reducción el ion flavilio, observándose un color rojo escarlata que varía desde rosa muy débil hasta el rojo escarlata (Bruneton, 2001).
- *Solubilidad en Solución de Hidróxido de Sodio al 10 % (Flavonoides)*: Los flavonoides con la solución de hidróxido de sodio al 10 % dan soluciones coloreadas, que van del amarillo pasando por el rojo al violeta (Bruneton, 2001).
- *Ensayo de Dragendorff, Wagner y Mayer (Alcaloides)*: Se basa generalmente en la combinación de los alcaloides con metales pesados. El reactivo de Dragendorff es una mezcla de yoduro de potasio y nitrato de bismuto, detectándose el alcaloide al producirse un precipitado rojo-naranja; en la reacción de Mayer el yoduro de potasio y el bicloruro de mercurio junto con el alcaloide arrojan un precipitado de color blanco (Marcano y Hasewaga, 2002). Para el reactivo Wagner, el yoduro de potasio se evidencia con un precipitado marrón (Bruneton, 2001).

- *Ensayo de Hidróxido de Amonio (Cumarinas)*: Las cumarinas al ser examinadas en luz ultravioleta presentan fluorescencia en presencia de amoniaco (Bruneton, 2001).
- *Ensayo de Borntrager (Quinonas)*: La naftoquinonas y antraquinonas libres al ser tratadas con la solución de hidróxido amónico forman complejos de color rojo cereza (Bruneton, 2001).
- *Prueba de Tricloruro Férrico (Compuestos Fenólicos y Taninos)*: Las sustancias precipitan en presencia de cloruro férrico. Esta respuesta se debe al efecto producido por el ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo, provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (Marcano y Hasegawa, 2002).
- *Prueba de la Espuma (Saponinas)*: El extracto disuelto en agua se agita vigorosamente, la aparición de espuma es indicio de la presencia de saponinas (Marcano y Hasegawa, 2002).
- *Prueba de Baljet (Sesquiterpenlactonas)*: Se prepararon dos soluciones. La solución A se le agregó 1 g de ácido pícrico y se disolvió en 2 mL de etanol; para la solución B se añadieron 10 g de hidróxido de sodio y se disolvieron en 2 mL de agua. Para la prueba se colocó 3 a 4 mg del reactivo, se consideró positiva la prueba con la formación de una coloración naranja a rojo (Marcano y Hasegawa, 2002).
- *Prueba Keller-Kilani (Glucósidos Cardiotónicos)*: Se disolvieron 20 mg de los extractos en 5 mL de agua destilada, se agregaron 2 mL de ácido acético glacial y posteriormente se adicionaron algunas gotas de cloruro férrico al 5 %. Las soluciones se vertieron en tubos de ensayo con 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. La formación de un anillo marrón en la interfaz indica la presencia de glucósidos cardiotónicos, al igual que la formación de un anillo violeta debajo del

anillo marrón o bien en la fase de ácido acético; un anillo verdoso también puede formarse gradualmente, indicando la presencia de estos compuestos (Bulugahapitiya, 2013).

Características generales de las bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (entre 0,5 y 5 μm , por lo general) y diversas formas incluyendo esferas (cocos), barras (bacilos) y hélices (espirilos). Las bacterias son procariotas y, por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos, etc.), no tienen el núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. Generalmente, poseen una pared celular compuesta de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles. Por la necesidad, o no, que tienen de oxígeno también se distinguen entre: Aerobias estrictas, cuando dependen del oxígeno. Anaerobias estrictas, cuando se desarrollan en ausencia total de oxígeno. Anaerobias facultativas, pueden desarrollarse con o sin oxígeno. Microaerófilas, cuando solo pueden desarrollarse en bajas tensiones de oxígeno y altas de dióxido de carbono (Araque, Araujo, Longa, Nieves, Ramírez, Sánchez y Velazco, 1999).

Las bacterias, según la coloración que adopten (de acuerdo a la técnica de tinción de Gram), se agrupan en dos categorías, grampositivas y gramnegativas. Las grampositivas se observan de color morado mientras las gramnegativas adoptan un color rojo a rosado (Figura 16).

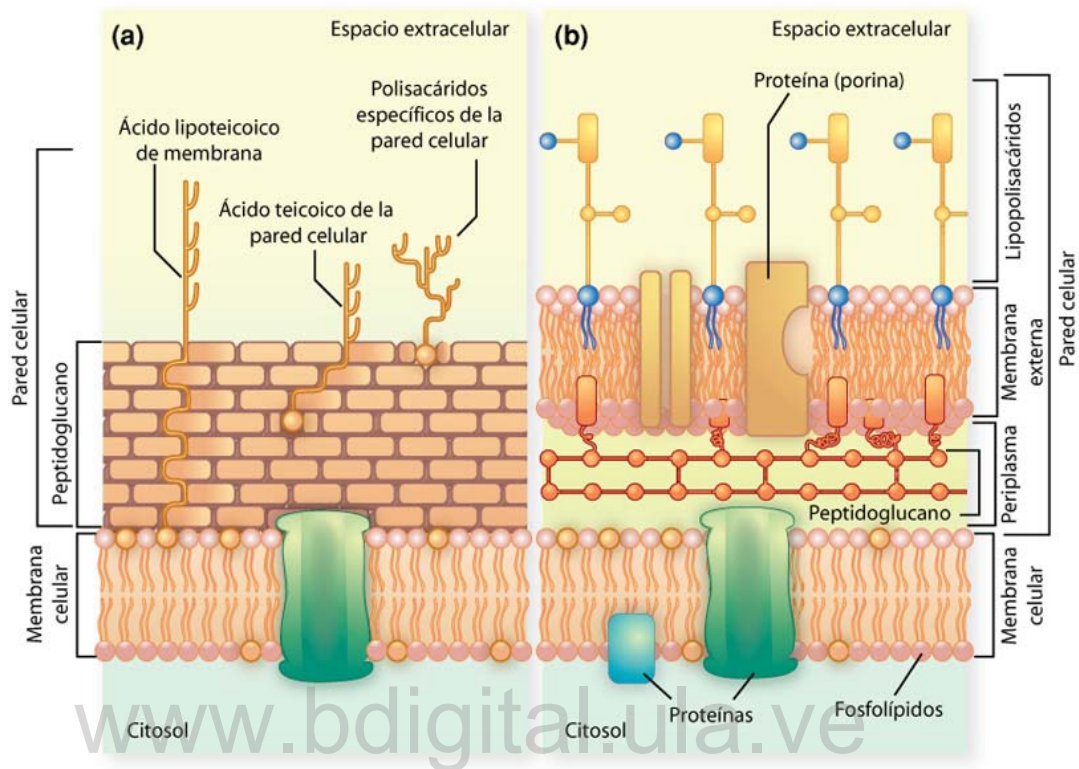


Figura 16. Esquema representativo de la pared celular bacteriana. Tomado y modificado de Rodríguez, Gamboa, Ureña, Quesada, Rodríguez, 2016.

Las bacterias grampositivas poseen una pared gruesa compuesta por 90 % de peptidoglucano y el resto de polisacáridos, tales como ácidos teicóicos y ácidos teicurónicos. Los ácidos teicóicos son polímeros de polifosfato unidos por enlaces tipo éster (fosfodiéster, glicerolfosfato o ribitolfosfato). Por su parte los ácidos teicurónicos, son polisacáridos del tipo ácido urónico, los cuales son responsables de la clasificación serológica, la asimilación selectiva de cationes, reserva de fosfatos, adhesión de bacteriófagos y el control de la actividad autocatalítica de la bacteria. Estas bacterias tienen la particularidad de no poseer membrana externa y son capaces de retener el colorante específico (Volk, 1996).

Por otro lado, las bacterias gramnegativas presentan una pared celular compleja, la cual presenta dos capas, la externa y la interna. La capa externa está compuesta por lipopolisacáridos y un 10 % de peptidoglicano mientras la capa interna está formada por fosfolípidos, lipoproteínas (también llamadas mureinas y se encargan de unir la capa de fosfolípidos con el péptidoglicano), porinas permiten la difusión de solutos neutros y cargados con pesos moleculares menores a 600 Dalton (D) y otro grupo de proteínas, las cuales facilitan el transporte de moléculas mayores a 600 D, a través de la membrana externa. Debido a que la capa de peptidoglicano es delgada no es capaz de retener el colorante de allí su diferencia con las grampositivas (Volk, 1996).

Mecanismo de resistencia bacteriana

En la actualidad se ha obtenido un avance considerable en la comprensión de la respuesta de las bacterias a los bactericidas. La resistencia puede ser una propiedad natural de un organismo (intrínseca) o conseguida por mutación o adquisición de plásmidos (Cabrera y cols., 2007).

Mecanismos de resistencia natural

Las bacterias pueden presentar resistencia a antibióticos como resultado de mutaciones cromosomales o por intercambio de material genético mediante el transporte de genes de resistencia a través de varios mecanismos como: transducción, conjugación, transformación y transposición (Cabrera y cols., 2007).

Mecanismos de resistencia adquirida

Existen cuatro mecanismos de resistencia adquirida. Las bacterias pueden utilizar más de un mecanismo (Cabrera y cols., 2007):

- **Modificación enzimática o destrucción del antibiótico:** Es el mecanismo de resistencia que utilizan algunas bacterias contra medicamentos betalactámicos. El ejemplo más representativo son las betalactamasas, enzimas que inactivan el antibiótico al hidrolizar el anillo betalactámico de la molécula. Otra clase importante de antibióticos que son destruidos por enzimas, son los aminoglicósidos. Se sabe que hay tres tipos de modificaciones catalizadas por O-fosfotransferasas (OPH), O-adeniltransferasas (ANT) y N-acetiltransferasas (ACT) que inactivan estos medicamentos.
- **Impermeabilidad al antibiótico:** Existen diferencias en la composición de la envoltura celular de las bacterias y en especial en la cantidad del peptidoglicano junto con grandes proteínas de membrana externa llamadas porinas. Estas porinas varían en número y tamaño y funcionan como canales acuosos que generan una ruta hidrofílica a través de la estructura de la membrana hacia el espacio periplásmico. La resistencia se relaciona con la poca cantidad de moléculas de porina, las mutaciones que resultan por la alteración de la forma y el número de las ya existentes, influyen en la permeabilidad a los antibióticos, por lo cual se presentan diversos tipos de resistencia a través de la membrana.
- **Alteración o producción de nuevos sitios blanco:** Los cambios en el sitio blanco del antibiótico son uno de los mecanismos más importantes de resistencia a los antibióticos, pues evitan el efecto bactericida/bacteriostático que estimula la resistencia. Por ejemplo, el mecanismo más común de resistencia implica la modificación del sitio blanco en el ribosoma, efectos debidos a la mutación que afectan los sitios blancos (ADN girasa y topoisomerasa) del medicamento, alteración de las proteínas que unen penicilina y evita así la acción del antibiótico. Muchas clases de antibióticos, por ejemplo, betalactámicos, glicopéptidos y

quinolonas, pueden disminuir su eficacia debido a cambios o producción de nuevos sitios blanco.

- Presencia de bombas de eflujo que expulsan el antibiótico: El mecanismo de eflujo para múltiples agentes antimicrobianos contribuye a la resistencia intrínseca y adquirida contra tales agentes. El análisis del genoma de bacterias grampositivas y gramnegativas ha confirmado la amplia distribución de estos sistemas. Este modo de resistencia puede llegar a disminuir o inclusive suprimir la susceptibilidad a un amplio rango de antimicrobianos. El diseño de eflujo (bomba) es mediado por proteínas de transporte, que confieren resistencia a los componentes tóxicos.

Generalidades de los antibióticos

Los antibióticos se pueden definir como toda sustancia química derivada o producida por microorganismos que tienen la capacidad, a bajas concentraciones, de inhibir el desarrollo o disminuir otros microorganismos (Tortora, Funke y Case, 2007).

Clasificación y mecanismo de acción de los antibióticos

Atendiendo a su efecto antibacteriano, los antimicrobianos se han clasificado tradicionalmente en bactericidas (ejercen una acción letal para la bacteria) o bacteriostáticos (sólo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano). Cada grupo de antibióticos actúa preferentemente de una forma u otra, aunque un mismo antibiótico puede comportarse como bactericida o bacteriostático, dependiendo de la concentración que alcance en la diana, o de su afinidad por la diana de un determinado microorganismo. En general, son bactericidas los que actúan inhibiendo la síntesis de la pared, alterando la membrana citoplásmica o interfiriendo con algunos aspectos del

metabolismo del ADN, y bacteriostáticos los que inhiben la síntesis proteica, excepto los aminoglucósidos (Calvo y Martínez, 2009).

1. Inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana

La pared celular protege la integridad anatomofisiológica de la bacteria y soporta su gran presión osmótica interna. La ausencia de esta estructura condicionaría la destrucción del microorganismo, inducida por el elevado gradiente de osmolaridad que suele existir entre el medio y el citoplasma bacteriano. La síntesis de la pared celular se desarrolla en 3 etapas, sobre cada una de las cuales pueden actuar diferentes compuestos: la etapa citoplásmica, donde se sintetizan los precursores del peptidoglucano; el transporte a través de la membrana citoplásmica y la organización final de la estructura del peptidoglucano, que se desarrolla en la parte más externa de la pared. Este grupo de inhibidores son: β -Lactámicos, Penicilinas, combinación de β -Lactámico/inhibidor de β -Lactamasas, Cefalosporinas, Carbapenemos, Monobactámicos y Glucopéptidos (Calvo y Martínez, 2009).

2. Inhibidores de la función de la membrana citoplasmática

La membrana citoplasmática es vital para todas las células, ya que interviene activamente en los procesos de difusión y transporte activo, y de esta forma controla la composición del medio interno celular. Las sustancias que alteran esta estructura modifican la permeabilidad, y provocan la salida de iones potasio, elementos esenciales para la vida bacteriana, o la entrada de otros que a altas concentraciones alteran el metabolismo bacteriano normal. Los antibióticos que actúan en esta estructura son los polipéptidos (Calvo y Martínez, 2009).

3. Inhibidores de la síntesis de proteínas

La síntesis proteica es uno de los procesos más frecuentemente afectados por la acción de los antibacterianos, y su inhibición selectiva es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas. Los ribosomas bacterianos están formados por dos subunidades (30S y 50S), que contienen ARN ribosómico (ARNr 16S en la subunidad 30S, y ARNr 5S y ARNr 23S en la subunidad 50S) y diversas proteínas llamadas S (small o pequeña, en la subunidad 30S) o L (large o grande, en la subunidad 50S). En esta estructura diferentes componentes pueden ser lugares de unión para los antibacterianos. A este grupo pertenecen: Aminoglucósidos, Macrólidos y Tetraciclinas (Calvo y Martínez, 2009).

4. Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos

El genoma bacteriano contiene información para la síntesis de proteínas que se transmite a través del ARN mensajero producido a partir del molde de ADN (transcripción), y para la síntesis de ARN ribosómico que formará parte de los ribosomas bacterianos. La información del ADN debe duplicarse (replicación) cuando la bacteria se divide, para transmitir esta información a la descendencia. La replicación y la transcripción del ADN se realizan en varias fases con la participación de diferentes enzimas y sustratos, además del ADN molde, que constituyen dianas para la acción de diversos antibióticos. Dentro de este grupo incluimos las rifamicinas y las quinolonas que actúan en enzimas que participan en los procesos de transcripción y replicación, y los nitroimidazoles y nitrofuranos que actúan directamente sobre el ADN, dañándolo (Calvo y Martínez, 2009).

Actividad antibacteriana

Corresponde al efecto de ciertas sustancias químicas, empleadas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. El mismo se debe al ataque que estos ejercen a los microorganismos, ejecutándose de diferentes maneras: por inhibición de la síntesis de la pared celular, funciones de la membrana celular, traducción de material genético y de la síntesis de ácidos nucleicos (Tortora y cols., 2007).

Técnicas que se usan para determinar la actividad antimicrobiana

Método de difusión en agar

El método de difusión en agar se considera uno de los procedimientos más utilizados para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales sobre microorganismos aerobios. También es llamado como técnica de Kirby-Bauer, la cual se fundamenta en la inhibición del crecimiento del microorganismo *in vitro*, mediante la difusión del antimicrobiano en un medio de cultivo, generando una zona que se conoce como formación de halos de inhibición; zona en la que una concentración crítica del antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano. El diámetro del halo de inhibición del crecimiento expresa la sensibilidad o resistencia del microorganismo, este halo se mide en milímetros (Reyes, Palou, y López, 2014). A nivel metodológico, existen dos formas de realizar la difusión: impregnando un papel filtro con una solución de concentración conocida del extracto y colocándolo sobre la superficie del agar o perforando el agar, con un sacabocados, y vertiendo en el orificio una solución de concentración conocida del antimicrobiano a evaluar, conocido como método de difusión en pozo (Vilariño, 1988).

Método de dilución en caldo

La prueba de dilución y microdilución en caldo se basa en la exposición de los microorganismos a distintas concentraciones de los antimicrobianos, en diluciones seriadas, con el objetivo de observar su crecimiento y con base en este, definir la mínima concentración en la que no se observa turbidez (Vilariño, 1988). La prueba de dilución y microdilución seriada se realiza en tubos o placas de pocillos con medios líquidos, que contienen concentraciones seriadas crecientes extracto diluidas en caldo, inoculado con una concentración definida de células del microorganismo. Posterior a la incubación a temperatura y tiempo óptimo. La presencia de turbidez o sedimentación indican crecimiento visible del microorganismo (Reyes y cols., 2014).

Método de dilución en agar

Se fundamenta en inocular, en concentraciones conocidas, el microorganismo y el antimicrobiano a probar, en un medio sólido y no en caldo, con posterior incubación. La actividad antimicrobiana se detecta por la inhibición del crecimiento microbiano en toda la placa (Reyes y cols., 2014).

Definición Operacional de Términos

Metabolismo: Es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples (Ávalos y cols, 2009).

Tinción de Gram: La tinción o coloración de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología para la visualización de bacterias sobre todo en muestras clínicas. Debe su nombre al bacteriólogo danés Christian Gram, que desarrolló la

técnica en 1884. Se utiliza tanto para referirse a la morfología celular bacteriana como para realizar una aproximación a la diferenciación bacteriana, considerándose bacteria grampositiva aquella que se visualiza de color morada, mientras que las que se visualizan de color rosa, rojo o grosella se les conoce como bacterias gramnegativas (Araque y Pérez, 1999).

Corola: Verticilo interno de las flores que tienen perianto heteroclámideo, puede ser dialipétala o gamopétala. Presenta una textura más fina y colores más brillantes que el verticilo externo (cáliz) (Bruneton, 2001).

Inflorescencia: Forma de agruparse las flores en una planta, los principales tipos de inflorescencia son racimos, espiga, umbela, capítulo y cima (Bruneton, 2001).

Pedúnculo: Es una ramita que se prolonga de la hoja, flor o fruto (Bruneton, 2001).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): Se define como la concentración mínima de antibiótico en la cual no se observa desarrollo bacteriano tras su incubación (Betty, 1996).

Operacionalización de las Variables

Para operacionalizar el sistema de variables o el evento de estudio con el respectivo criterio de análisis, es necesario la definición conceptual y operacional de las mismas. En tal sentido, las variables se operacionalizan con la finalidad de identificar los elementos y datos empíricos que expresan su presencia (Hurtado, 2010). En las tablas 2 y 3, se muestran las variables que se asumirán en la presente investigación y los indicadores que las definen.

Tabla 2. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana presente en los extractos de los tallos de *Thevetia peruviana*

1.Variable	2. Tipo de variable	3. Definición Conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana de los extractos de los tallos de <i>Thevetia peruviana</i>	Dependiente Cuantitativa	Es la capacidad que poseen los extractos de inhibir o propagar el crecimiento de determinadas bacterias en un medio de agar (Betés, Durán, Mestres y Nogués, 2008).
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
La actividad antibacteriana se puede medir por: -Método de difusión en disco (Kirby - Bauer).	Cepas grampositivas: - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> Cepas gramnegativas: - <i>Escherichia coli</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Klebsiella pneumoniae</i> .	-Sensible -Resistente -Presencia o ausencia del halo de inhibición frente a cepas grampositivas y gramnegativas.

Fuente: Juárez, Quintero y Cordero (2023).

Tabla 3. Operacionalización de la variable independiente: Composición química de los extractos de los tallos de *Thevetia peruviana*.

1.Variable	2. Tipo de variable	3. Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química de los extractos de los tallos de <i>Thevetia peruviana</i>	Independiente Cualitativa Discreta	Metabolito secundario o producto natural que se usa como sinónimo, aquel que es propio de una especie, se le conoce también como producto químico y en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza (Marcano y Hasegawa, 2002).
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
- Pruebas químicas cualitativas también conocidas como tamizaje fitoquímico.	Para las pruebas químicas cualitativas puede haber presencia o ausencia de: - Alcaloides. - Esteroles y/o triterpenos. - Saponinas. - Compuestos fenólicos simples. - Taninos. - Flavonoides. - Quinonas y Antraquinonas. - Glicósidos cardiotónicos. - Cumarinas. - Sesquiterpenlactonas.	- Alcaloides: la aparición de turbidez o precipitados. - Esteroles y/o triterpenos: coloración azul o verde para esteroles; coloraciones rosa, rojo, magenta o violeta para triterpenos. - Saponinas: formación de abundante espuma. - Compuestos fenólicos: coloración de azul a negro. - Taninos: presencia de un precipitado blanco. - Flavonoides: coloración naranja a rojo, para flavonas; si es rojo flavonoles y magenta flavononas. - Antraquinonas y Quinonas: coloración roja. - Glicósidos cardiotónicos: coloración púrpura o violácea. - Cumarinas: la presencia de fluorescencia azul-violeta. - Sesquiterpenlactonas: las coloraciones roja, violeta o rosa

Fuente: Juárez, Quintero y Cordero (2023).

Hipótesis

Según estudios previos de la especie *Thevetia peruviana*, se ha reportado que presenta grupos constituyentes activos responsables del efecto antibacteriano, por lo cual es de esperar que los extractos de los tallos de *Thevetia peruviana* posean actividad antibacteriana frente a cepas grampositivas y gramnegativas.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

El tipo de investigación está relacionada con la interrogante de estudio, la cual enfatiza lo que se quiere saber. De esta manera se puede identificar el logro general de lo que se busca obtener durante el proceso de la investigación (Hurtado, 2010). Concretamente, esta investigación se asumió de tipo confirmatoria, ya que se pretendió conocer la relación entre la composición química de los tallos de *Thevetia peruviana* y la actividad antibacteriana.

Diseño de investigación

El diseño de investigación comprende las estrategias necesarias para recolectar los datos. Específicamente, se consideran estrategias relacionadas con el dónde, cuándo y la amplitud de la información que se recolectó (Hurtado, 2010). Con respecto al dónde, el diseño fué experimental. Asume un diseño experimental porque se trabajó con un grupo control, se manipuló la variable independiente para lograr efecto en la variable dependiente. Con respecto al cuándo o temporalidad, será contemporáneo y transeccional porque se estudió el evento en el presente y en un único momento en el tiempo. En relación a la amplitud, se considera unieventual debido a que se analizó una variable dependiente y una variable independiente.

Población y muestra

Unidad de Investigación

Según Hurtado (2010), la población es el conjunto de seres que poseen características o eventos de interés, enmarcados dentro de criterios de inclusión, que según su extensión, puede ser finita o infinita, requiriéndose la selección de una muestra. La población de la presente investigación se presenta infinita. La cual corresponde a la especie *Thevetia peruviana*.

Selección del tamaño de la muestra

La muestra es un subconjunto representativo de un universo o población (Arias, 2006). Además, existe la muestra de tipo no probabilística, cuya selección no depende de que todas las partes tengan la misma probabilidad de ser elegidas, sino queda a consideración del investigador (Hernández y cols., 2010). Por lo tanto, para la muestra de esta investigación se recolectaron los tallos de la especie *Thevetia peruviana*.

Sistema de variables

Según Arias (2006), un sistema de variables consiste en una serie de características por estudiar, definidas de manera operacional, es decir, en función de sus indicadores. A su vez, se considera que una variable es una cualidad susceptible de experimentar cambios y permiten verificar el fenómeno de estudio en la unidad de investigación. De acuerdo a esto, las variables que se presentan en esta investigación serán:

Variable Dependiente: Actividad antibacteriana de los extractos de los tallos de *Thevetia peruviana*.

Variable Independiente: Composición química de los extractos de los tallos de *Thevetia peruviana*.

Instrumento de recolección de datos

Las técnicas en una investigación, implican el conjunto de procedimientos para el aprovechamiento de los elementos que rodean los fenómenos sobre los cuales se investiga. Las técnicas representan los medios, a través de los cuales el investigador recolecta, organiza y trasmite el conjunto de datos (Balestrini, 2006). Para recopilar la información del interés sobre las variables, se consideró pertinente aplicar la técnica de observación directa, definida como aquella que permite la percepción de hechos o fenómenos de interés en la investigación, valiéndose de instrumentos para tales fines (Tamayo y Tamayo, 2004). En tal sentido, la técnica de observación se relacionó con la visualización de un halo de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de los discos impregnados de los extractos de tallo de *Thevetia peruviana*, sembrados en placas de agar previamente inoculadas con cepas bacterianas de referencia internacional. Para el instrumento de recolección de los datos se elaboraron unas tablas de resultados y listas de cotejo, las cuales son una herramienta que indica la presencia o no de un aspecto o conducta que será visualizada (Arias, 2006).

Procedimiento de la investigación

Recolección y tratamiento de la Especie

La especie se recolectó en el Jardín Botánico Ing. Carlos Liscano de la Universidad de los Andes, Lagunillas estado Mérida. La cual se identificó botánicamente en el herbario M.E.R.F “Dr. Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes por el profesor Pablo Meléndez.

Obtención de los Extractos

Los tallos fueron separados del resto del material vegetal y se colocaron en la estufa a 40°C, una vez secos se procedió con la molienda. Para llevar a cabo el proceso de extracción de los componentes de la especie, se pesaron 100 g del pulverizado, se realizó mediante la técnica de digestión en caliente o reflujo, en disolventes como hexano y etanol. Una vez pasado el tiempo, cada uno de ellos se concentró en el rotavapor para eliminar los solventes a una temperatura aproximada de 50°C. Finalmente, los extractos se colocaron en frascos color ámbar, y se llevaron a secar en la estufa a 40°C.

Tamizaje fitoquímico de los extractos

Los extractos hexanólicos y etanólicos obtenidos, se realizó a través de los ensayos correspondientes según los protocolos descritos por Marcano y Hasegawa (2002), con el fin de determinar de forma cualitativa los grupos de metabolitos secundarios, realizando el siguiente panel de ensayos:

Alcaloides

Ensayo de Dragendorff - Wagner - Mayer: Se tomó una porción de cada uno de los extractos en 3 tubos de ensayo por separado y se agregaron 5 mL de HCl al 10 % a cada tubo, se mezcló y se llevó a baño de María por 10 minutos, se procedió a filtrar y a cada uno de los filtrados se les añadió 2 – 3 gotas de sales de metales pesados para realizar el ensayo con los reactivos de Dragendorff, Wagner y Mayer. Posteriormente se formó levemente un precipitado de color naranja, lo que permitió detectar la presencia de alcaloides básicos.

Triterpenos y esteroides

Ensayo de Liberman - Burchard: Se disolvieron cuatro fracciones de los extractos en 0,5 mL de diclorometano anhidro. Se añadieron 0,5 mL de anhídrido acético a cada uno. Luego se le adicionaron cuidadosamente por las paredes del tubo unas gotas de ácido sulfúrico concentrado. La reacción fué positiva tanto para esteroides por la formación de un anillo verde botella, como para triterpenos por la formación de una coloración rojo.

Flavonoides

Ensayo de Shinoda: Se tomó 1 mL de solución de cada extracto por separado. Se añadieron algunas virutas de Mg, se sujetó el tubo con una pinza, y se añadieron cuidadosamente por la pared del tubo unas gotas de HCl concentrado. Al no haber una coloración roja intensa, se interpretó la prueba como negativa.

Prueba alcalina con NaOH: Las soluciones de los extractos acuosos se trataron con 1 mL de una solución de hidróxido de sodio al 10 %, el extracto de hexano no presentó cambio de coloración por lo tanto fue negativa la prueba, mientras que para el extracto de etanol si hubo una coloración amarilla, lo que demuestra la presencia de flavonoides.

Compuestos Fenólicos

Prueba con FeCl₃: Se añadió 1 mL de solución alcohólica al extracto de etanol, añadiendo unas gotas de solución acuosa de cloruro férrico al 10 %. Lo que dió como resultado la formación de una coloración verde oscuro indicando la presencia de fenoles.

Saponinas

Ensayo de la espuma: Se colocó en un tubo una pequeña cantidad de extracto de etanol y se le adicionó 1 mL de agua. Se agitó vigorosamente durante un minuto. Al no observarse la prevalencia de la espuma durante más de 5 minutos, indicó la negatividad de la prueba.

Quinonas

Prueba del H_2SO_4 : En una cápsula de porcelana se colocaron una porción de cada extracto y se les adicionó una gota de ácido sulfúrico concentrado a cada uno de ellos. La formación de una coloración roja, indicó la presencia de quinonas.

Antraquinonas

Prueba del NH_4OH : A los extractos previamente disueltos se les agregó 3 gotas de hidróxido de amonio concentrado. La ausencia de la coloración roja, indicó la negatividad de esta prueba.

Cumarinas

Prueba luz UV: Se disolvieron los extractos en su propio solvente (0,5 mL). Se les adicionó 2 gotas de Hidróxido de Amonio concentrado. Al no presentar fluorescencia azul-violeta bajo luz UV, se consideró negativa.

Determinación de la Actividad Antibacteriana

La actividad antibacteriana se realizó bajo tutoría de las Profesoras Yndra Cordero e Ysbelia Obregón y el auxiliar de laboratorio Emilio Salazar en el laboratorio de actinomicetos del IIFFB. El método utilizado durante este procedimiento fue el de difusión en agar con discos según Kirby-Bauer, utilizando cepas grampositivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) y cepas gramnegativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Preparación del inóculo bacteriano

Los cultivos bacterianos de las cepas ATCC, fueron sembrados en caldo de Müeller-Hinton, e incubados a 37 °C durante 16 horas, ya que es en ese tiempo donde las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanza su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano. Para la reactivación de las cepas se sembraron por estría en placas de agar Müeller-Hinton con el fin de obtener colonias aisladas de las cuales se tomó una pequeña cantidad de colonias con asa en aro para ser suspendidas en una solución de cloruro de sodio al 0,85 % estéril, seguidamente el inóculo bacteriano se ajustó con solución salina fisiológica al patrón de turbidez de Mac Farland N° 0,5 (10^{6-8} UFC/mL).

Preparación de las placas e inoculación

A cada placa se les colocó 20 mL del agar Müeller-Hinton previamente preparado y esterilizado. Posteriormente se dejaron solidificar a temperatura ambiente para su uso. Una vez preparadas las placas cada inóculo se sembró con un hisopo estéril sobre la superficie del agar girando sucesivamente dicha placa en ángulos de 90°.

Preparación y colocación de discos

Se impregnaron discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro con las concentraciones a estudiar. Una vez que las placas se inocularon debidamente, sobre su superficie se colocaron en forma equidistante los discos, impregnados con 10 µL de una solución del extracto de etanol a 10.000 ppm. Se usaron como controles positivos, para *Staphylococcus aureus*, el antibiótico comercial Eritromicina de 15 µg, para *Enterococcus faecalis*, Ampicilina de 10 µg y para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, Piperacilina de 100 µg, con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a evaluar y como control negativo el Dimetilsulfóxido (DMSO), el cual se utilizó para disolver la muestra.

Preincubación e incubación

Las placas de Agar Müller-Hinton se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos para permitir la difusión de los extractos en estudio y posteriormente se incubaron durante 24 horas en aerobiosis a 37 °C.

Lectura de las pruebas

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a examinar cada una de las placas, en las cuales se consideró como positivo la presencia de un halo de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor del disco; por el contrario, la ausencia de este halo se interpretó como negativo.

Diseño de Análisis

Según Hernández y cols., (2010), existen tres tipos de enfoques de Investigación: cualitativo, cuantitativo y mixto. En una investigación del tipo y diseño de la presente, para el análisis de los datos obtenidos, será necesario la aplicación de un enfoque cualitativo según las características observadas durante el desarrollo de las pruebas ejecutadas, mediante criterios de comparación y discriminación estructurada de acuerdo a los fundamentos establecidos para cada una de los ensayos a realizar. Además, como en este enfoque se pretende medir, los fenómenos estudiados deben poder observarse. Por lo tanto, el análisis de los resultados de esta investigación, también se enfocó a través de un modelo cuantitativo, debido a que se identificaron metabolitos secundarios mediante el seguimiento de protocolos estandarizados y la observación y medición de halos de inhibición por efecto de la actividad antibacteriana de los tallos de *Thevetia peruviana*.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Las tallos de *Thevetia peruviana* se sometieron a un proceso de digestión en caliente con dos solventes orgánicos: hexano y etanol, los cuales se llevaron al rotavapor para concentrar los extractos. A partir de esta técnica se obtuvieron 1,47 g de hexano y 3,40 g de etanol (Tabla 4). Los extractos presentaron un color verde intenso, olor característico y aspecto condensado.

Tabla 4. Pesos de los extractos y sus rendimientos.

Parte de la planta	Peso	Peso del extracto	Rendimiento del extracto
Tallos molidos	100 g	Hexano: 1,47 g	1,69 %
		Etanol: 3,40 g	4,34 %

Los extractos de los tallos de *Thevetia peruviana* fueron sometidos a las pruebas químicas preestablecidas para conocer el grupo de metabolitos secundarios contenidos en la muestra; tanto del hexano como del extracto de etanol. 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 la caracterización fitoquímica de las estructuras vegetales, señalados en las tablas 5 y 6.

Tabla 5. Reporte de resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Thevetia peruviana*.

Metabolitos y Pruebas	Extracto de Hexano	Extracto de Etanol
Alcaloides		
Reactivo de Mayer	ND	-
Reactivo de Wagner		-
Reactivo de Dragendorff		+
Triterpenos / Esteroles		
Liebermann-Burchard	+	+
Compuestos Fenólicos		
Prueba del FeCl ₃	ND	+
Flavonoides		
Prueba de Shinoda	-	-
Prueba de NaOH 10%	-	+
Quinonas cápsulas		
H ₂ SO ₄ []	+	+
Antraquinonas NH₄OH []	-	-
Cumarinas NH₄OH []		
Fluorescencia UV	-	-
Saponinas		
Espuma	ND	-
Glicósidos cardiotónicos		
Keller-Kilani	ND	+
Sesquiterpenlactonas	-	+

Fuente: Juárez, Quintero y Cordero, 2023.

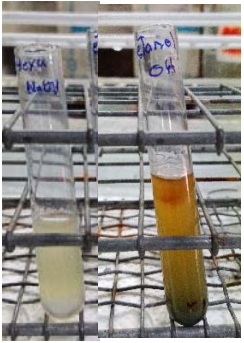
Leyenda: ND: No determinado, (-) Ausente, (+) Presente.

Tabla 6. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Thevetia peruviana*.

			
<u>Prueba:</u> Reactivo de Dragendorff, reactivo de Mayer y reactivo de Wagner. <u>Metabolitos determinados:</u> Alcaloides <u>Reporte: Positivo</u> Formación de precipitados color naranja. <u>Tubos:</u> extracto de etanol.	<u>Prueba:</u> Liebermann – Burchard <u>Metabolitos determinados:</u> Esteroles y Triterpenos <u>Reporte: Positivo</u> Formación de anillo verde. Coloración roja. <u>Tubo A:</u> extracto de hexano <u>Tubo B:</u> extracto de etanol.	<u>Prueba:</u> Compuestos Fenólicos (FeCl₃) <u>Metabolitos determinados:</u> Fenoles <u>Reporte: Positivo</u> Formación de coloración verde oscura o negra. <u>Tubo A:</u> control positivo <u>Tubo B:</u> extracto de etanol.	<u>Prueba:</u> Shinoda <u>Metabolitos determinados:</u> Flavonoides <u>Reporte:</u> Negativo No hay presencia de color rojo intenso. <u>Tubo A:</u> extracto de hexano <u>Tubo B:</u> extracto de etanol.

Fuente: Juárez, Quintero y Cordero (2023).

Tabla 6. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Thevetia peruviana* (Continuación)

			
<u>Prueba:</u> Hidróxido de Sodio al 10 % <u>Metabolitos determinados:</u> Flavonoides <u>Reporte:</u> Extracto de etanol positivo. Tubo A: extracto de hexano Tubo B: extracto de etano.	<u>Prueba:</u> NH_4OH [] <u>Metabolitos determinados:</u> Antraquinonas <u>Reporte:</u> Negativo No hay presencia de color rojo. Tubo A: extracto de hexano Tubo B: extracto de etanol	<u>Prueba:</u> Quinonas en Cápsulas. <u>Metabolitos determinados:</u> Quinonas <u>Reporte:</u> Positivo Presencia de color rojo.	<u>Prueba:</u> Fluorescencia UV <u>Metabolitos determinados:</u> Cumarinas <u>Reporte:</u> Negativo No hay presencia de fluorescencia azul. Tubo A: control positivo.

Fuente: Juárez, Quintero y Cordero (2023).

Tabla 6. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos de los tallos de *Thevetia peruviana* (Continuación)

		
<u>Prueba:</u> Espuma <u>Metabolitos</u> <u>determinados:</u> Saponinas <u>Reporte:</u> Negativo No hay formación de espuma. Tubo A: control positivo Tubo B: extracto de etanol.	<u>Prueba:</u> Keller-Kilani <u>Metabolitos</u> <u>determinados:</u> Glicósidos Cardiotónicos <u>Reporte:</u> Positivo Anillo marrón Tubo A: extracto de etanol diluido en agua Tubo B: extracto de etanol.	<u>Prueba:</u> Reacción de Baljet <u>Metabolitos determinados:</u> Sesquiterpenlactonas <u>Reporte:</u> Positivo Presencia de color naranja a rojo. Tubo A: extracto diluido en etanol. Tubo B: extracto puro.

Fuente: Juárez, Quintero y Cordero (2023).

Evaluación de la Actividad Antibacteriana

Se determinó a través del método de difusión en agar (Kirby-Bauer) en disco, en el extracto de etanol, con concentraciones madres de 10.000 ppm de solución, las cuales tuvieron una actividad antibacteriana sobre las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (Tabla 7).

Tabla 7. Evaluación de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de los tallos *Thevetia peruviana*.

Microorganismos de ensayo	Halos de inhibición en mm		
	Control positivo	Control negativo	Extracto de etanol
		DMSO	10.000 ppm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Eritromicina 15 µg 35 mm	0 mm	7 mm
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Ampicilina 10 µg 20mm	0 mm	8 mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Piperacilina 100 µg 22 mm	0 mm	7mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	Piperacilina 100 µg 22 mm	0 mm	7 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	Piperacilina 100 µg 22 mm	0 mm	11 mm

Fuente: Juárez, Quintero y Cordero, 2023

Discusiones

En la presente investigación se obtuvieron por digestión en caliente los extractos de los tallos de *Thevetia peruviana*, los cuales por tamizaje fitoquímico se evidenciaron componentes como alcaloides, triterpenos, esteroides, compuestos fenólicos, quinonas, glicósidos cardiotónicos y sesquiterpenlactonas. Al comparar el reporte de resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de los tallos de *Thevetia peruviana* (Tabla 5) con los estudios anteriores, reflejó ser similar con respecto a los glicósidos cardiotónicos y otros compuestos de especies recolectadas en diferentes países.

En el estudio realizado por Al-Rajhi y cols., (2022). Se reportaron flavonoides, como la rutina, quercetina, naringina y hesperidina, los cuales fueron identificados por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), además de una actividad antimicrobiana realizada por difusión en disco (Kirby-Bauer), la concentración utilizada para ambas bacterias fue de 100 µL. En el que se registró que el microorganismo más sensible al látex de *Thevetia peruviana* fue *Escherichia coli*, obteniendo un halo de 30 mm, mientras que la bacteria que tuvo menor zona de inhibición fue *Pseudomonas aeruginosa*, con un halo de 23 mm. En cuanto al tamizaje realizado en esta investigación también se evidenció la presencia de flavonoides, además de alcaloides, triterpenos, esteroides, entre otros, mediante pruebas cualitativas. Demostrando que el extracto de etanol de los tallos de *T. peruviana* tiene actividad antibacteriana frente a *E. coli*, con una concentración de 10.000 ppm, presentando un halo de inhibición de 7 mm. Por lo tanto ambos estudios realizados demuestran la presencia de metabolitos secundarios y de actividad antibacteriana en ambas partes de la planta, de la misma especie.

Con respecto a la investigación hecha por Deshmukh y cols., (2019). Obtuvieron a partir de extractos crudos de las flores y los frutos, empleando el método de soxhlet, utilizando como solventes agua y etanol, la actividad antibacteriana en cepas

grampositivas (*Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*) y cepas gramnegativas (*Escherichia coli*), ensayado *in vitro* por el método de difusión en pozo modificado. Ambos extractos, presentaron su máxima actividad antibacteriana contra *E. coli*. En las flores, presentó un halo de inhibición de 16 mm para el solvente acuoso y 17 mm para el etanol. En los frutos, un halo para el solvente acuoso de 13 mm y para el etanol de 15 mm. Asimismo, en el presente trabajo, hubo actividad antibacteriana, aunque se determinó por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), presentando halos de inhibición para *E. coli* de 7 mm y para *S. aureus* de 7 mm, utilizando etanol como solvente y empleando el método de digestión en caliente para la obtención de los extractos de los tallos de *Thevetia peruviana*, demostrando las propiedades antibacterianas de la especie.

Por otro lado, un estudio realizado por Adeyemi y cols., (2019). Reportaron la presencia de alcaloides, flavonoides, terpenoides y taninos en las raíces de *Thevetia peruviana*, además de presentar un rendimiento del 10 % de actividad antibacteriana, en el que emplearon el método de dilución en caldo, con series de dilución con concentraciones entre (50 – 300 mg/mL) de las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los halos de inhibición obtenidos fueron de (11,50 mm), (7 mm) y (13 mm) respectivamente. Lo que refuerza en nuestra investigación una vez más la presencia de los metabolitos secundarios como alcaloides y terpenoides en los tallos de *T. peruviana* y la actividad antibacteriana frente a las cepas ensayadas presentando un halo de inhibición para *S. aureus* de 7 mm, *E. coli* de 7 mm y *P. aeruginosa* de 7 mm. Con un rendimiento en el extracto de etanol de un 74,92 %.

El extracto de etanol de los tallos de *Thevetia peruviana*, presentó inhibición frente a las cepas bacterianas de ensayo. Dichos trabajos previos respaldan la investigación demostrando así que la especie tiene propiedades antibacterianas.

En otro orden, la técnica utilizada para la determinación de la actividad antibacteriana, difusión en disco (Kirby-Bauer), en la que se apreció poca difusión

en el agar en todos los ensayos bacterianos, puede ser debido a que los metabolitos secundarios al ser retenidos en el papel de filtro no permiten difundir, dependiendo de sus polaridades en el agar cuando se aplica la técnica, asimismo la concentración de la solución madre empleada permitió mayor superficie de contacto con el medio agarizado. Por lo que se avaló un buen desarrollo del estudio realizado y la certificación de resultados veraces.

Cabe destacar que, por otra parte, las investigaciones que se realizaron de la especie actualmente, representan una contribución por ser la primera investigación realizada con respecto a los tallos de *Thevetia peruviana* en Venezuela, así mismo por las propiedades tóxicas y sus beneficios. No obstante, en esta investigación se indagó el estudio en relación a la actividad antibacteriana, ya que, al poseer metabolitos secundarios como los alcaloides, quinonas, fenoles, glicósidos cardiotónicos, flavonoides y sesquiterpenlactonas, son eficaces antibacterianos de gran importancia para generar de esta forma aportes científicos. Atribuyendo en gran parte el efecto antibacteriano a los flavonoides, ya que la actividad antimicrobiana de los flavonoides se debe en gran medida a la capacidad de estos compuestos para penetrar la membrana celular de las bacterias (Davidson & Naidu, 2000). Daño de membrana y cambios en el pH intercelular, potencial de membrana y síntesis de trifosfato de adenosina (Sanchez, García, & Heredia, 2010).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. En los extractos de hexano y etanol obtenidos de los tallos de *Thevetia peruviana*, se determinó cualitativamente la presencia de alcaloides, triterpenos, esteroides, compuestos fenólicos, quinonas, glicósidos cardiotónicos y sesquiterpenlactonas.
2. El extracto de etanol que se obtuvo de los tallos de *T. peruviana* presentaron actividad antibacteriana frente a las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, reportando que las 5 cepas son sensibles al extracto estudiado.
3. Los resultados alcanzados en este trabajo de investigación representan un aporte científico en cuanto al tamizaje fitoquímico y la actividad antibacteriana de los extractos de los tallos de *T. peruviana*.
4. Este trabajo de investigación es el primer reporte de la actividad antibacteriana en los extractos de los tallos de la especie en Venezuela.

Recomendaciones

1. Cuantificar e identificar los metabolitos secundarios de los extractos de los tallos de *Thevetia peruviana*, empleando otras técnicas como cromatografía de gases / espectrometría de masas (CG / EM), entre otras.
2. Realizar investigaciones sobre los metabolitos involucrados en la actividad antibacteriana, determinando su mecanismo de acción.
3. Continuar con los estudios acerca de los metabolitos secundarios presentes en otras partes de la planta como las hojas, raíces, frutos, semillas y flores.
4. Evaluar si los metabolitos secundarios de los extractos de los tallos de *T. peruviana* presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria, antifúngica y tóxica.
5. Incentivar el uso de las plantas medicinales como *T. peruviana*, por sus propiedades terapéuticas bajo estándares establecidos de seguridad y calidad de las plantas.

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Aguilar, C. y Maycotte, Z. (2013). Intoxicación por *Thevetia peruviana* (hueso o codo de fraile). Presentación de un caso. *Revista de la Asociación Mexicana de Medicina Crítica y Terapia Intensiva*; 27(4):245-248
- Al-Rajhi A., Yahya R., Abdelghany T., Fareid M., Mohamed A., Amin B. y Masrahi A. (2022). Anticancer, Anticoagulant, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Thevetia peruviana* Latex with Molecular Docking of Antimicrobial and Anticancer Activities.
- Adeyemi, Ogunsola, Chijindu, Afonja, Odebisi-Omokanye, Ahmed, Krishnamurthy. (2019). In-vitro Antibacterial activity of methanolic extract of *Perquetina nigrescens* (Afzel.) Bullock. leaves and *Thevetia peruviana* (Pers) Schums. Roots. (Revista científica) Nigeria.
- Amaringo, F., Hormaza, A. y Arias, M. (2011). Thevetin B: glicósido cardiotónico predominante en *Thevetia peruviana*. *Scientia et Technica*; 16(49): 298-303.
- Arias, F. (2006). *El Proyecto de Investigación: Introducción a la Metodología Científica*. Caracas-Venezuela, Editorial Episteme.
- Arias, J., Ortega, I., Peñuela, M. y Arias, M. (2018). Antimicrobial activity of callus and cell suspension cultures extracts of *Thevetia peruviana*. *Revista de la Facultad de Ciencia*. 8(1): 45–56.
- Araque, M., Araujo, E., Longa, A., Nieves, B., Ramírez, A., Sánchez, K. y Velazco, E. (1999). *Manual práctico de bacteriología*. Mérida-Venezuela: Publicaciones CODEPRE.
- Ávalos, A y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. *Reduca: Serie Fisiología Vegetal*, 2 (3): 119-145.
- Balestrini, M. (2006). *Como se elabora un Proyecto de Investigación*. Venezuela: Editorial BL. Consultores Asociados.

- Betés, M., Durán, M., Mestres, C. y Nogués, R. (2008). *Farmacología para Fisioterapeutas*. Madrid, España. Editorial Médica Panamericana.
- Betty San Martín, N. (1996). Conceptos generalidades en la selección de un antibiótico o sulfá en la terapia de salmónidos. *TecnoVet*, 2 (2).
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales. Zaragoza: Acribia. 1100
- Bulugahapitiya, V. (2013). Plants based natural products extraction, isolation and phytochemical screening methods (1ra. Ed.). Matara, Sri Lanka: Indika Graphics.
- Cabrera, C., Gómez, R. y Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*, 38(2): 149-158.
- Calvo, J. y Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*; 27(1): 44-52.
- Castillo, A., Pascual, Y., Cunhanune, N., Lorente, C., Cañete, F. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas y semillas de *Morinda citrifolia* L. (noni). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*; 19(1): 374-382.
- Cheers, G., Burnie, G., van Schaik, T. y Leegsma, G. (2006). Botánica. Guía ilustrada de plantas. Barcelona: Konemann
- Contreras, C. (2019). Estudio fitoquímico y determinación de la actividad biológica de los extractos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L. (Solanaceae). (Trabajo de Grado). Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida- Venezuela.
- Deshmukh AS, Dighe PR, Shelke SJ. Estimation of Antibacterial activity of Crude Extracts of *Thevetia peruviana*. *Int J Microbiol Curr Res*. 2019; 1(1): 23-25. doi: 10.18689/ijmr-1000104.

- Egwaikhide, P., Okeniyi, S., y Gimba, C. (2009). Screening For Anti-microbial Activity and Phytochemical Constituents Of some Nigerian Medicinal Plants. *Journal of Medicinal Plants*, 3 (12), 1088-1091.
- Frisancho, O, (2012). Concepción mágico – religiosa de la medicina en la América prehispánica.
- Frohne, D y Pfander, HJ. (1983). Ed. Atlas de colores de Plantas venenosas, Alemania, Wolfe Publishing Ltd., 47.
- González, A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas (Tesis de Grado). Universidad Nacional de Colombia. Colombia.
- González, J., Maguina, C., González, F (2019). Resistence to antibacterial agents: A serious problem. *Acta méd. Peru*. Vol. 36: 145-151.
- Hassan, M., Saha, A., Khan, S., Islam, A., Mahabub-Uz-Zaman, M. y Ahmed, S. (2011). Studies on the antidiarrhoeal, antimicrobial and cytotoxic activities of ethanol-extracted leaves of yellow oleander (*Thevetia peruviana*). *Open Veterinary Journal*, Vol. 1: 28-31.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, P. (2010). *Metodología de la Investigación*. México: Editorial Mc Graw Hill.
- Herrera, E., Bacab, I., Alejo, J., Tun, J y Ruíz, E. (2011). Patogenicidad de *Fusarium solani* (mart.) sacc. y *Alternaria alternata* (fries) keissler en *Thevetia peruviana* (pers.) k. schum. Y su control *in vitro*. *Fitosanidad*, vol. 15, núm. 4, pp. 231-236. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal La Habana, Cuba.
- Hurtado, J. (2010). *El proyecto de Investigación. Compresión holística de la metodología y la investigación*. Caracas: FEDUPEL
- Juárez, V., Alvarado, L. y Villaseñor, J. (2007). La familia Apocynaceae sensu lato en México: diversidad y distribución. *Revista Mexicana de Biodiversidad*; 78 (2): 23-31.

- Kareru, P., Keriko, J., Kenji, G., Gachanja, A. (2010). Propiedades antitermitas y antimicrobianas de la pintura a base de extracto de aceite de *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum. African Journal of Pharmacy and Pharmacology; 5(3): 76-89.
- Kumar, P., Joshi, S., Sati, S. y Rai, D. (2016). A Comparative Evaluation of Phytochemical and Antibacterial Properties of *Ricinus communis* linn and *Thevetia peruviana* schum. Of Kumaun Himalaya. Mintage Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences; 82: 37-42.
- Malaret, A. (1970). Lexicón de Fauna y Flora. Madrid: Comisión Permanente de la Asociación de Academias de la Lengua Española. pp. 569.
- Marcano, D. y Hasegawa, H. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Caracas, Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.
- Martínez, A., Valencia, G., Jiménez, M., Mesa, M. y Galeano, E. (2008). Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica. Universidad de Antioquia. Antioquia, Colombia.
- Méndez, R. (2008). Cultivos Orgánicos (Su control biológico en plantas medicinales y aromáticas). Bogotá-Colombia: Ediciones ECOE.
- MHNT: Museo de Historia Natural de Toulouse. (2007). *Thevetia peruviana*. *Journal Botanic.*; 27:24-32
- Murray, P. (2006). Microbiología Médica. Editorial Elsevier Mosby.
- Neira, J. (2018). Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* (Pers) Schum (Maichil) frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. (Tesis de Grado). Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Católica Los Angeles de Chimbote. Perú.
- Omino, E. y Kokwaro, J. (1993). Ethnobotany of Apocynaceae species in Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 40: 167–80.
- OMS (2004). Quality control methods for medicinal plants. Geneva, World Health Organization.

- Pacheco, D., Toborda, M. y De la Rosa C. (2006). Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de hojas, cortezas y semillas de *Thevetia peruviana* (Persoon) Schum. Rev Intropica; 3(1): 5-12
- Prieto, J. (1993). Guía de Plantas de Jardín. Madrid: Pirámide.
- Ramos, J. (2018). Evaluación de la actividad anticáncer de *Thevetia peruviana*. (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Ramos, J., De la Torre, S. y Avilé, H. (2014). Apocynaceae. Una familia de plantas tóxicas. Conoce tu flora; 5: 9-13.
- Ravindra, F. y Deepthi, W. (1989). *Thevetia peruviana* (1990). IPCS. INCHEM HOME.
- Reyes, F., Palou, E., y López, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos, 8(1); 68-78.
- Ringuelet, J., Viña, S. (2013). Productos Naturales Vegetales. Argentina. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP).
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Ureña, D., Quesada, C y Rodríguez, C (2016). Bacteriología general principios y prácticas de laboratorio.
- Ruiz, M. y Susunaga C. (2000). Actividad antimicrobiana presente en partes aéreas de las especies *Bursera simaoruba* y *Bursera graveolens* (BURSERACEAS), frente a microorganismos como: *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride* y *Botrytis cinerea*. Facultad de Ciencias, Dpto de Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de pregrado. Bogotá, DC. Pág 40.
- Salinas. (2010). Plantas tóxicas en el estado Mérida. Primera Parte. Postgrado. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela.

- Sánchez, L. y Alvarenga, S. (2014). Callogénesis y establecimiento del cultivo de células en suspensión de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. (uña de gato). *Tecnología en Marcha*; 28 (1): 105-120.
- Siyanbola, T., Sasidhar, K., Anjaneyulu, B. (2013). Recubrimientos híbridos de ZnO modificados con poli (éster amida uretano) antimicrobianos y anticorrosivos a partir de aceite de semilla de *Thevetia peruviana*. 48: 8215.
- Tamayo, M. y Tamayo, M. (2004). El proceso de la investigación científica. México: Limusa
- Toiu, A., Vlase, L., Vodnar, D., Gheldiu, A., y Oniga, I. (2019). Solidago graminifolia L., Salisb. (Asteraceae) as a Valuable Source of Bioactive Polyphenols: HPLC Profile, In Vitro Antioxidant and Antimicrobial Potential. *Molecules*; 24: 2666. doi: 10.3390/molecules24142666. Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/molecules.24142666>.
- Torres, N. (2003). Actualización sobre intoxicación con *Thevetia peruviana*. *Retel*; 1: 1-19.
- Tortora, G., Funke, B., y Case, C. (2007). Introducción a la Microbiología. México: Editorial Médica Panamericana.
- TRAMIL (2014). Farmacopea Vegetal Caribeña. República Dominicana: Jardín Botánico Nacional. 436
- Venancio, C., Pérez, C e Ibarra, E (2021). Cumarinas: metabolitos secundarios de amplia actividad en plantas. (En Línea). Disponible en: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1311-cumarinas-metabolitos-secundarios-de-amplia-actividad-en-plantas>.
- Virender, S., Munish, J., Jyoti, G. y Pawan, K. (2017). Antibacterial Activity of Medicinal Plants Against Extended Spectrum beta lactamase producing

- bacteria causing urinary tractInfection. *Journal drug research and technology*; 2 (3): 263-267.
- Villarreal, W. (2015). Análisis fitoquímico preliminar de *Clethra fimbriata kunth* (*Clethraceae*) a partir de extractos etanólicos de hojas y tallos. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Vilariño, R. (1988). Prontuario Microbiológico. Madrid-España: Disinlimed.
- Volk, W. (1996). Microbiología básica. México: Harla, S.A.
- Watt, JM y Breyer Brandwijk, MG. (1962). Edición El Medicinal y Plantas venenosas del sur y este de África. Edimburgo y Londres, E & S Livingstone Ltd, 107-109.
- Websters (1971). Apocinacea. *Third New International Dictionary*; 1: 100-101.

www.bdigital.ula.ve