



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



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE
LAS HOJAS DEL *Acnistus arborescens* EN CEPAS DE
REFERENCIA INTERNACIONAL**

www.bdigital.ula.ve

Trabajo presentado ante la Ilustre Universidad de Los Andes para optar al
Título de Licenciada en Bioanálisis

Autor(a):

Yesnaie Rivas

C.I: V- 23.724.448

Tutor(a):

Prof. Ysbelia M. Obregón D.

Co-tutor(a):

Prof. Yndra Cordero

Mérida, Mayo de 2023

DEDICATORIA

A Dios y a la Santísima Virgen del Carmen por ser mis guías en los momentos difíciles, por ayudarme y protegerme siempre; por darme fuerza y sabiduría para poder alcanzar esta meta.

A mis padres, Matilde Zambrano y Carlos Rivas, por darme la oportunidad de formarme académicamente, por el apoyo, amor y palabras de aliento durante todo este largo camino.

A mis hermanos, Jenny, Yaime y Jolimar por creer en mí y ser mi apoyo incondicional siempre.

A mi novio, Carlos Pérez, por el amor y apoyo brindado en todo momento.

A mis abuelitos y tía Marta que desde el cielo me cuidan y sé que estarían muy orgullosos de ver hasta el punto que he llegado.

Yesnaie Rivas

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen Santísima, por acompañarme durante todo este camino, por ayudarme siempre que necesité, su amor hacia mí es grande e infinito y agradezco tanto ello.

A mis padres, personas humildes y trabajadoras, por su sacrificio para darme la oportunidad de tener la mejor educación, por sus palabras y consejos, por los valores que inculcaron en mí y de los cuales me siento tan orgullosa, gracias por darme ánimos cuando sentía que no podía más, nunca me cansaré de agradecerles todo lo que han hecho, LOS AMO.

A mis hermanos, a quienes amo con el alma y agradezco tanto su apoyo desde el inicio de la carrera, gracias por sentirse tan orgullosos de mí.

A mi familia, los que de una u otra forma me brindaron su apoyo y me dieron ánimos para culminar este proyecto.

A mi novio, quien siempre me ha brindado su amor, comprensión y apoyo incondicional, gracias por las veces que te quedaste conmigo hasta el final.

A mi amiga, Mailyn Barrios, con quien inicié la carrera y el trabajo de investigación, este logro también es tuyo; sé que Dios te permitirá a ti también alcanzar la meta; nos separa la distancia, sin embargo, el cariño es el mismo. Te quiero amiga.

A mi tutora, Profesora Ysbelia Obregón, por su paciencia, dedicación, entrega y apoyo durante el desarrollo del trabajo, Dios pone en nuestras vidas seres maravillosos, y usted es uno de esos, gracias por tanto.

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, a cada uno de sus miembros, quienes me brindaron su apoyo siempre, en

especial las profesoras Yndra Cordero, Alida Pérez y Rosa Aparicio, así como también al Profesor Luis Rojas†, que desde el cielo interviene en cada uno de los trabajos allí realizados; de la misma manera, al Técnico Medio Emilio Salazar por su apoyo en el laboratorio durante la preparación de los extractos.

A mis compañeros de estudio, gracias por cada momento compartido de alegrías, tristezas, traspasos, enojos y demás, especialmente a Grecia Pérez, Yasmily Arellano y Eliana Morales.

A la ilustre Universidad de Los Andes, por darme la oportunidad de formarme en sus espacios y adquirir los conocimientos necesarios para optar al título de Licenciada en Bioanálisis.

www.bdigital.ula.ve

Yesnaie Rivas

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
VEREDICTO.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	3
Planteamiento del problema.....	3
Justificación e Importancia de la Investigación.....	5
Objetivos de la Investigación.....	6
Objetivo General.....	6
Objetivos Específicos.....	6
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	8
Trabajos Previos.....	8
Antecedentes Históricos o Epistemológicos.....	10
Bases Teóricas.....	12
Familia <i>Solanaceae</i>	12
Aspectos botánicos.....	12
Distribución geográfica.....	12
Clasificación taxonómica.....	14
Metabolitos secundarios aislados.....	14
Usos etnobotánicos.....	15
Actividades farmacológicas.....	16

Género <i>Acnistus</i>	18
Aspectos botánicos.....	18
Distribución geográfica.....	18
Clasificación taxonómica.....	18
Metabolitos secundarios aislados.....	19
Usos etnobotánicos.....	19
Actividades farmacológicas.....	19
Especie <i>Acnistus arborescens</i>	20
Aspectos botánicos.....	20
Distribución geográfica.....	21
Clasificación taxonómica.....	21
Metabolitos secundarios aislados.....	21
Usos etnobotánicos.....	22
Actividades farmacológicas.....	22
Productos Naturales.....	23
Clasificación de los Productos Naturales.....	23
Rutas Biosintéticas.....	27
Extractos Vegetales.....	27
Métodos de Obtención.....	27
Tamizaje Fitoquímico.....	29
Pruebas Químicas.....	30
Bacterias.....	32
Clasificación de las Bacterias.....	32
Mecanismos de resistencia.....	34
Características de las bacterias a usar durante el estudio.....	35
Antibióticos.....	37
Clasificación de los Antibióticos.....	37
Actividad Antibacteriana.....	39

Técnicas para determinar actividad antibacteriana.....	39
Definición Operacional de Términos.....	40
Operacionalización de las Variables.....	42
Hipótesis.....	45
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO.....	46
Tipo de Investigación.....	46
Diseño de la Investigación.....	46
Población y Muestra.....	47
Unidad de Investigación.....	47
Selección del tamaño de la muestra.....	47
Sistema de Variables.....	47
Instrumento de Recolección de Datos.....	47
Procedimientos de la Investigación.....	48
Recolección del Material Vegetal.....	48
Obtención de los extractos.....	49
Tamizaje fitoquímico.....	50
Determinación de la actividad antibacteriana.....	52
Diseño de Análisis.....	57
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	58
Resultados.....	58
Análisis fitoquímico preliminar.....	58
Evaluación de la actividad antibacteriana.....	63
Discusiones.....	66
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	69
Conclusiones.....	69
Recomendaciones.....	70
BIBLIOHEMEROGRAFÍA.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº		Pág.
1	Distribución de la familia Solanaceae.....	14
2	Algunos metabolitos aislados de la familia Solanaceae.....	15
3	Planta de <i>Acnistus arborescens</i>	20
4	Estructura química de la Acnistina A.....	22
5	Estructura química de un hemiterpeno.....	24
6	Estructura química del fenol.....	25
7	Estructura química de isoquercitina.....	26
8	Estructura química de la cafeína.....	26
9	Pared celular de Bacterias grampositivas.....	33
10	Pared celular de Bacterias gramnegativas.....	34
11	Identificación botánica del <i>Acnistus arborescens</i>	48
12	Equipo de extracción por reflujo.....	49
13	Concentración del extracto en el rotavapor.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Nº		Pág.
1	Taxonomía de la familia Solanaceae.....	14
2	Taxonomía del género <i>Acnistus</i>	19
3	Taxonomía de la especie <i>Acnistus arborescens</i>	21
4	Operacionalización de la variable dependiente actividad antibacteriana de los extractos de <i>Acnistus arborescens</i>	43
5	Operacionalización de la variable independiente composición química de los extractos del <i>Acnistus arborescens</i>	44
6	Pruebas preliminares para realizar el tamizaje fitoquímico.....	51
7	Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).....	53
8	Halos de inhibición de los controles positivos usados como referencia en las cepas bacterianas.....	54
9	Descripción del peso de los extractos y su rendimiento porcentual.....	58
10	Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos obtenidos de las hojas de <i>Acnistus arborescens</i>	59
11	Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de <i>Acnistus arborescens</i>	60
12	Resultados obtenidos de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de <i>Acnistus arborescens</i>	63
13	Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de <i>Acnistus arborescens</i>	64



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



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LAS
HOJAS DEL *Acnistus arborescens* EN CEPAS DE REFERENCIA
INTERNACIONAL

Autor(a):

Yesnaie Rivas

Tutor(a):

Prof. Ysbelia M. Obregón D.

Co-tutor(a):

Prof. Yndra Cordero

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de las hojas de *Acnistus arborescens* en cepas de referencia internacional. La planta fue recolectada en el Jardín de Plantas Medicinales Doctor Luis Ruíz Terán, ubicado en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, su identificación botánica se realizó en el herbario MERF; en el laboratorio del Instituto de Investigación de la misma Facultad, las hojas secas y molidas fueron sometidas a reflujo en caliente con hexano y etanol con el fin de separar los metabolitos secundarios en dos grupos: polares y apolares. Partiendo de los extractos obtenidos, se realizaron pruebas de identificación por medio del tamizaje fitoquímico, logrando la identificación de compuestos como: alcaloides, triterpenos, esteroides, y flavonoides. Y por último, se comprobó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas, utilizando el método de difusión en disco (Kirby Bauer), a una concentración de 10 mg/mL ó 10.000 ppm; donde se demostró que los extractos fueron activos y mostraron halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* (8 mm) *Enterococcus faecalis* (8 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (7 mm) y *Klebsiella pneumoniae* (8 mm); por su parte en *Escherichia coli* fue indeterminado pues la bacteria no mostró crecimiento.

Palabras claves: *Acnistus arborescens*, composición química, actividad antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

A través de los años las plantas han constituido la base de los sistemas de medicina tradicional, que han permitido mantener la salud y la calidad de vida del hombre (Prieto, Garrido, González y Molina, 2004). La medicina herbaria ha sido utilizada desde tiempos remotos para curar o aliviar los padecimientos, puesto que las plantas contienen compuestos químicos que se dan por sí solos en la naturaleza y que tienen una fuerte actividad biológica (Pascual, Pérez, Morales, Castellanos y González, 2014).

Las plantas cumplen un importante papel para el buen funcionamiento del planeta tierra, sin ellas el resto de los seres vivos no podrían sobrevivir, además el ser humano con el pasar de los años aprendió a seleccionarlas y cultivarlas para su uso y provecho, es por ello, que la mayor parte de los medicamentos que utilizamos en la actualidad proceden de las mismas. Hoy en día, los compuestos biológicamente activos de las plantas se extraen de las mismas a través de métodos y técnicas, teniendo que existe un gran número de especies vegetales que son sometidas a diversos procesos, dando lugar a una enorme variedad de productos (Fernández, Bellet y García, 2012).

En las últimas décadas se han realizado innumerables estudios sobre sustancias con actividad antibacteriana provenientes de plantas superiores, con la finalidad de encontrar alternativas terapéuticas efectivas contra las infecciones producidas por microorganismos resistentes a los antibióticos. La acción antimicrobiana de los extractos vegetales y productos naturales ha revelado el potencial que estas poseen, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales medicinales, con una base científica (Ramírez y Díaz, 2007).

Es por ello, que la necesidad que llevó a realizar la investigación se basó en el hecho de la observación cada vez más, de la gran resistencia presentada a fármacos por parte de microorganismos, como lo es el caso de la resistencia a los antibióticos por bacterias.

Por lo tanto, la investigación plantea como objetivo general: confirmar la actividad antibacteriana y la composición química de las hojas del *Acnistus arborescens* en cepas de referencia internacional.

La investigación se encuentra sistematizada por la Asociación Psicológica Americana (APA) estando estructurada por cinco capítulos. El capítulo I: El Problema, que consta de: Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones. El capítulo II: titulado Marco Teórico, estará formado por: los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las Variables y Las Hipótesis. El capítulo III: titulado Marco Metodológico contempla: Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Unidad de Investigación, Selección del Tamaño de la Muestra, Sistema de Variables, Instrumento de Recolección de Datos, Procedimiento de la Investigación y Diseño de Análisis. El capítulo IV está titulado y conformado por Resultados y Discusiones y el capítulo V denominado y compuesto por, Conclusiones y Recomendaciones.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

En los últimos años se ha observado una importante resistencia a los fármacos por parte de gran cantidad de microorganismos, motivo por el cual se realiza una serie de seguimientos a estudios sobre la actividad antibacteriana, que se conoce como la capacidad o propiedad que posee un agente, bien sea un compuesto químico, natural o sintético, de eliminar o inhibir el crecimiento de bacterias (Usano, Palá y Díaz, 2014).

La resistencia a los antibióticos es considerada entre una de las principales amenazas de salud pública a la que se enfrenta la población, y ésta surge cuando las bacterias dejan de responder a los medicamentos, haciendo difícil el tratamiento de las infecciones y aumentando el riesgo de propagación de enfermedades; muchos medicamentos disponibles actualmente se vuelven ineficaces debido a la aparición de patógenos oportunistas multirresistentes, originando una alta morbilidad y mortalidad, además de los altos costos por estancias hospitalarias y complicaciones (Organización Mundial de la Salud, 2021).

Cabe destacar, que las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos desarrollando mecanismos que impiden que el antibiótico ejerza su mecanismo de acción, dentro de los cuales existentes tres principalmente; alteración en las barreras de permeabilidad, inactivación del antibiótico, y alteración del sitio blanco (Pérez y Robles, 2013).

El uso de las plantas como tratamiento para la cura de enfermedades es muy antiguo, siendo muy utilizado actualmente. Estudios han demostrado

que las plantas producen metabolitos activos, que presentan actividades antibacterianas, antihelmínticas, antifúngicas, antivirales, antiinflamatorias, entre otras, que han permitido el desarrollo de nuevos fármacos, es por ello, que los productos naturales han adquirido nuevas perspectivas en la búsqueda de compuesto antimicrobianos (Poffo, Siebert, Tenfen, Mendes, Alberton y Guedes, 2020).

Entre el grupo de plantas con gran utilidad para el hombre se encuentra la Familia *Solanaceae*, de amplia distribución en el mundo. Algunos de los miembros de esta familia son utilizados en la industria farmacéutica, además de los usos medicinales, ornamentales y alimenticios donde los frutos de muchas de sus especies son comestibles (Cuevas, 2018).

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

¿Cuál es la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de las hojas del *Acnistus arborescens* en cepas de referencia internacional?

Justificación e Importancia de la Investigación

Las plantas se utilizan desde tiempos remotos como fitofármacos, siendo utilizadas por sus bajos costos y reducidos índices de toxicidad en comparación con los productos de síntesis; éstas constituyen una fuente de metabolitos secundarios, los que le otorgan sus propiedades terapéuticas características, las cuales son de gran importancia para el control de muchas enfermedades (Gallegos, 2016).

En la actualidad son muchas las investigaciones que se realizan en búsqueda de nuevos compuestos con actividades biológicas a partir de fuentes naturales, como los estudios que evalúan la actividad antibacteriana en extractos y aceites esenciales de plantas medicinales, dado la sencillez y reproductividad de las mismas; esto motivado a encontrar nuevas alternativas terapéuticas a los tratamientos con antibióticos conocidos, debido a la alta tasa de patógenos resistentes en el mundo (Hernández y Rodríguez, 2001).

Por otra parte, las posibilidades terapéuticas se ven afectadas por falta de nuevos medicamentos que actúen frente a diversos patógenos, y a pesar de la disponibilidad de fármacos para el tratamiento de estas infecciones, se presentan otros problemas como la restricción en el espectro de acción, costos y efectos adversos en el paciente como hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, fototoxicidad, además, en las poblaciones rurales el acceso a los fármacos es restringido por múltiples razones, por lo que siempre optan por la medicina herbaria que está a su alcance (Torres, León, y Tomas, 2017).

Esto genera nuevos intereses en la búsqueda de posibles soluciones a este problema, motivo por el cual es cada vez más relevante el uso de productos naturales como las plantas, a fin de encontrar en sus moléculas orgánicas dicha solución (Stella y Marín, 2009).

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de las hojas del *Acnistus arborescens* en cepas de referencia internacional.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos de las hojas del *A. arborescens* por la técnica de reflujo en caliente usando hexano y etanol como solventes orgánicos.
- Analizar la composición química de los extractos de las hojas del *A. arborescens* mediante tamizaje fitoquímico.
- Evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico del *A. arborescens* en cepas de referencia internacional, por medio de la prueba de difusión en agar con discos empleando el método de Kirby-Bauer.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

El estudio permitió confirmar la relación existente entre la actividad antibacteriana y la composición química de las hojas del *Acnistus arborescens* en cepas de referencia internacional. Aportando nuevos conocimientos relacionados a los compuestos biológicamente activos que se aislaron de la misma, incluyendo la actividad antibacteriana que manifestó de acuerdo a los halos de inhibición, al realizar la prueba de difusión en agar con discos por medio del método de Kirby-Bauer, puesto que es el primer reporte de ello en Venezuela.

Limitaciones de la Investigación

Las limitaciones que se presentaron durante el desarrollo de la investigación estuvieron dadas por la falla en cuanto a la disponibilidad del servicio de agua al momento de realizar el extracto vegetal, además, al instante de recolectar la planta se observó la falta de material vegetal ya que en el lugar recolectado (Jardín de plantas “Doctor Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis) no se presentaba la cantidad suficiente del *Acnistus arborescens* y se tuvo que esperar un tiempo determinado para el crecimiento de la misma. Vale destacar la falta del servicio eléctrico e internet para redactar e investigar información relevante del trabajo.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Cano y Saucedo (2023), realizaron un trabajo titulado “Actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del extracto metanólico de hojas de “Pájaro bobo” *Tessaria integrifolia* y “Chamico” *Datura stramonium* de interés acuícola”. El objetivo de dicha investigación fue evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de hojas de *Tessaria integrifolia* y *Datura stramonium*. La actividad antibacteriana se determinó mediante el Método de Kirby – Bauer, en una cámara de flujo laminar, se emplearon los cultivos de *Vibrio* spp, *Edwardsiella* spp, *Aeromonas* spp y *Pseudomonas* spp, las cuales se sembraron en placas con agar Mueller Hinton; para los grupos controles se utilizó discos con antibiótico comercial, tetraciclina como control positivo y discos de papel filtro cargado del solvente como control negativo; la concentración mínima inhibitoria se evaluó a los extractos que evidenciaron inhibición frente a las bacterias utilizadas, se realizó por el método de dilución seriadas en medio líquido usando caldo BHI. Obtuvieron como resultados que la más alta actividad antibacteriana observada frente a *Vibrio* spp. fue con el extracto metanólico de *D. stramonium* a la concentración de 50 mg/mL obteniéndose un halo de inhibición de 18 mm, la concentración mínima inhibitoria fue 70 mg/mL. Llegaron a la conclusión que el extracto metanólico de *D. stramonium* generó mayor halo de inhibición con 18 mm frente a *Vibrio* spp, y el extracto metanólico podría ser empleado con fines terapéuticos para caso de vibriosis en organismos acuáticos.

Vilchez, Olortegui y Alvia (2023), publicaron en la Revista Cubana de Medicina Militar una investigación titulada como: “Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Solanum sessiliflorum* Dunal (cocona) sobre *Streptococcus mutans*”. Tuvo como objetivo evaluar el efecto antibacteriano del extracto de *Solanum sessiliflorum* Dunal sobre *Streptococcus mutans*. El extracto hidroalcohólico se obtuvo mediante el método de maceración en 1500 mL de etanol al 70 % con 550 g del pulverizado; la detección de metabolitos secundarios se ejecutó mediante el análisis fitoquímico preliminar por técnicas químicas de precipitación y coloración, se utilizó el método de difusión con discos descrita por Kirby – Bauer, la cepa empleada fue *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Obtuvieron como resultados que en el ensayo fitoquímico se detectaron compuestos fenólicos, antocianinas, quinonas y glicósidos cardiotónicos. Se comprobó el efecto antibacteriano del grupo VI (*Solanum sessiliflorum* Dunal al 75 %) con $19,831 \pm 0,0553$ mm (99,37 %), comparable con el de clorhexidina al 0,12 % sobre *Streptococcus mutans*. Y concluyeron que las especies vegetales como *Solanum sessiliflorum* Dunal son una alternativa interesante porque podrían aumentar la eficacia de los tratamientos terapéuticos convencionales.

El trabajo realizado por García, Laos, Vega, Bendejú, Yarasca, Guillermo y Surco (2020), titulado como: Actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto etanólico de las partes aéreas de *Solanum radicans* L.F. “huallpachaqui”. Su objetivo fue determinar la actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto etanólico de *Solanum radicans*. El extracto se llevó a sequedad, se fraccionó y determinó la presencia de metabolitos secundarios por reacciones de precipitación y/o coloración; se efectuó la caracterización del extracto mediante determinación de pH, sólidos totales, sólidos solubles, cenizas, color y aspecto; la actividad antioxidante fue evaluada por el método de inhibición del radical 2,2-difenil1-picrilhidrazil (DPPH) y el método del Poder Antioxidante de Reducción Férrica (FRAP); la

actividad antimicrobiana se probó en cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis*. Los resultados demostraron la presencia de metabolitos secundarios como: flavonoides, grupos fenólicos libres, alcaloides, catequinas, triterpenos y/o esteroides. La actividad antioxidante por el método DPPH obtuvo un IC₅₀ de 2,77 mg/mL de extracto y por el método FRAP obtuvo un TEAC de 6,59 mg/mL de extracto, además se aprecia que el extracto etanólico al 50 % presentó una gran actividad antibacteriana contra *S. aureus* mostrando una zona de inhibición de 15 mm y una menor actividad sobre *P. aeruginosa* con 12 mm, sin embargo, no mostró actividad frente a *E. coli* y *P. mirabilis*. El control positivo (Ciprofloxacino 5 ug/mL) mostró una zona de inhibición que varió de 20 a 24 mm contra las bacterias ensayadas. Concluyeron que el extracto etanólico al 50 % presenta actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *P. aeruginosa* con un halo de inhibición ligeramente superior al 50 % del control positivo.

Antecedentes Históricos o Epistemológicos

Los extractos vegetales han sido utilizados desde la prehistoria por los hindúes, chinos, griegos y romanos con fines pesticidas e insecticidas. Considerando que estos se caracterizan por la presencia de determinados metabolitos secundarios que forman parte de las tácticas defensivas de las plantas y pueden ser agrupados en compuestos nitrogenados, fenólicos y terpenoides, estos compuestos proveen importantes características a los extractos como son antivirales, antimicrobianos, repelentes, entre otros (Kagale, Marimuthu, Thayumanavan, Nandakuman, y Samiyappan, 2004; Philogene, Regnault y Vincent, 2004).

Cabe destacar que la fitoterapia o terapéutica con plantas, se define como la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico; desde la antigüedad ésta ha sido un medio fundamental para el hombre en el manejo de enfermedades, y es empleada por miles de personas en el mundo entero. La necesidad del hombre por curar sus enfermedades lo ha dirigido a las plantas y a su capacidad curativa; práctica que se ha mantenido a lo largo de los siglos (Ramírez, Isaza y Pérez, 2013).

Por otra parte, las plantas se han utilizado como materia prima para la elaboración de preparaciones tradicionales (infusiones o jugos), usadas para controlar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas, resolver problemas de resistencia de los microorganismos y los efectos colaterales de algunos antibacterianos sintéticos, además las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80 % de la población mundial utiliza la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales se basan en el uso de extractos de plantas o sus principios activos. Últimamente se han incrementado los estudios para evaluar la actividad antibacteriana de las plantas debido a que han mostrado ser eficaces cuando los antibióticos convencionales fallan (Centurión, Espinosa, Mayo, Frías y Velázquez, 2013).

Desde el punto de vista farmacológico, la familia Solanaceae posee gran importancia, ya que desde la antigüedad existen referencias acerca de su uso en la medicina popular. Tal es el caso de *Datura*, que tiene propiedades alucinógenas y anticolinérgicas. *Solanum*, propiedades antimaláricas. *Nicotiana glauca*, utilizada para el tratamiento de hemorroides (Benítez, 1974). Algunas especies de *Withania* han demostrado actividad antitumoral, citotóxica, antiinflamatoria y antifúngica. En el caso de *Acnistus* ha sido

usado en el tratamiento de tumores, además de tener un efecto inmunosupresor (Kupchan, Andreson, Bollinger, Doskotch, Smith, Renauld, Schnoes, Burlingame y Smith, 1969; Luis, Echeverri, García y Rojas, 1994).

Bases Teóricas

Familia Solanaceae

Aspectos botánicos

La familia se encuentra asignada al orden Solanales, junto con Convolvulaceae, Hydroleaceae, Montiniaceae y Sphenocleaceae (Eckart, 2008). Las Solanaceae incluyen árboles, arbustos, lianas y plantas herbáceas a veces epífitas o provistas de espinas, con hojas simples y alternas, enteras o más o menos divididas; las flores pueden ser solitarias o aparecen reunidas en inflorescencias, son hermafroditas y pentámeras, presentan un cáliz con 4 ó 5 sépalos soldados en la base y una corola integrada por 4 ó 5 pétalos de morfología variable (Izco, Barreno, Brugués, Costa, Devesa, Fernández, Gallardo, Llimona, Prada, Talavera y Valdéz, 2004). Además, presentan estambres tanto como los lóbulos de la corola y alternan con ellos epipétalos; ovario súpero, generalmente bilocular, óvulos frecuentemente numerosos, estigma pequeño y cuyo fruto es una baya (Aristeguieta, 1973).

Distribución geográfica

Solanaceae contiene aproximadamente 147 géneros y 2930 especies a nivel mundial (Izco y cols., 2004). Su distribución geográfica es cosmopolita (Figura 1), se encuentran representantes en todos los continentes, con mayor diversidad en las regiones tropicales y subtropicales, ausentes únicamente en las regiones árticas (Dupin, Marzke, Särkinen, Knapp, Olmstead, Bohs, y Smith, 2017). Aunque la mayoría de los especialistas en

la familia opinan que su centro de origen se ubica en América del Sur (Long, 2001), algunos de sus géneros se desarrollaron ampliamente en otros países, de manera que actualmente se mencionan varios centros de diversificación, entre ellos Australia, los Himalaya y México (Sierra, Siqueiros, Flores, Moreno y Arrendo, 2015).

En África se encuentran algunas especies de los géneros *Discopodium*, *Triguera*, *Solanum* y *Lycium*. Australia presenta una gran riqueza en especies de esta familia siendo los géneros *Datura*, *Nicotiana* y *Solanum* los más ricos en especies (D'arcy, 1976). En el continente americano, en Norteamérica, encontramos géneros como *Solanum*, *Quincula*, *Oryctes*, *Datura*, entre otros. En Sudamérica existen 60 géneros 32 de los cuales son endémicos entre los cuales están *Nicandra*, *Dunalia*, *Solanum*, *Physalis*, entre otros (Hunziker, 1976).

Ahora bien, esta familia se encuentra muy bien representada en la flora venezolana, estando constituidas por trepadoras, hierbas y arbustos sólo los géneros *Acnistus*, *Cestrum*, *Cyphomandra* y *Solanum*, que tienen algunos representantes arbóreos (Aristeguieta, 1973). El género *Cestrum*, tiene unas 22 especies ampliamente distribuidas en el país. El género *Cyphomandra*, cuenta con 6 especies, existentes en Guayana y selvas nubladas y húmedas del norte y occidente del país. Y el género *Solanum* *tourn*, formado por numerosas especies generosamente distribuidas en el país (Aristeguieta, 1973).

Figura 1. Distribución de la familia Solanaceae



Tomado y modificado de:

(https://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/solanaceae.html)

Clasificación taxonómica

Taxonómicamente la familia se clasifica de la siguiente manera (Tabla 1):

www.bdigital.ula.ve

Tabla 1. Taxonomía de la familia Solanaceae

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae

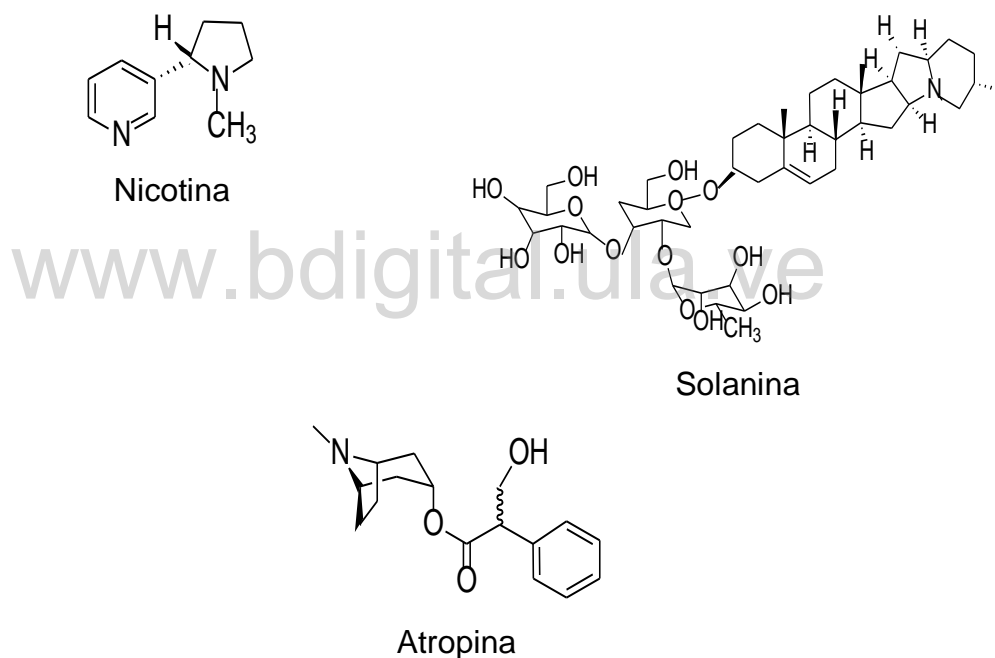
Tomado y modificado de tropicos.org

Metabolitos secundarios aislados

Cuenta con la presencia de alcaloides como la atropina y su isómero la hiosciamina, la escopolamina y solasodina éstos se encuentran presentes en raíces, tallos, hojas, frutos y semillas, aunque su distribución no es la misma en todos los vegetales (Font, 1962). Sin embargo, como parte de la familia Solanaceae se encuentra el género *Nicotiana*, el cual tiene derivados de la

piridina (nicotina); en el *Solanum* hay glicosidos esteroalcoloides (solanina) y en las *Daturas*, *Atropa* y *Socopolia* derivados del tropano como la atropina (Figura 2) (Domínguez, 1979). Cabe destacar además la presencia de withanólidos restringida a la subfamilia Solanoideae (Misico, Nicotra, Oberti, Barboza, Gil y Burton, 2011).

Figura 2. Algunos metabolitos aislados de la familia Solanaceae



Tomado y modificado de Domínguez, 1979

Usos etnobotánicos

Muchas especies de esta familia constituyen la base de alimentación humana a nivel mundial, entre ellas se encuentran: La "papa" (*Solanum tuberosum* L.), el "tomate" (*Solanum lycopersicum* L.), la "berenjena" (*Solanum melongena* L.) y diversas especies de *Capsicum* que agrupan a los

“ajíes”. (Novara, Barboza, Bernardello, Cocucci y Matesevach, 2012). Medicinales o tóxicos están: *Atropa belladonna* L. (Belladona), *Datura stramonium* L. (Toloache), *Nicotiana tabacum* L. (Tabaco), *Brugmansia* spp. (Floripondio), *Hyoscyamus* spp. (Beleño); y ornamentales, en los cuales se reportan más de 30 géneros entre los que destacan *Brunfelsia* spp (Galán de noche), *Cestrum* spp (huele de noche), *Petunia* spp (Petunia), *Physalis* spp (Alquequenje), *Solandra* spp (Copa de oro), *Solanum* spp (Dulcamara), entre otros (Cuevas, 2018).

Actividades farmacológicas

La familia Solanaceae, posee gran importancia debido a que existen numerosas referencias acerca de su utilización en la medicina tradicional (Grasourdy, 1864; Hartwell, 1971). Dentro de estas actividades se encuentran:

- ❖ **Analgésicas:** como el *Cestrum dumetorum* (Orcajuda) y *Cestrum nocturnum* (Orcajuda negra) son utilizados para el tratamiento del dolor de cuerpo y bronquitis (Alonso y Maldonado, 2012); los extractos de la *Datura stramonium* (Toloache), son utilizados como anestésicos en varios problemas dentales (Rosas, 2012).
- ❖ **Antineoplásicas:** como *Capsicum annuum* (chile verde poblano), el cual ha demostrado poseer propiedades anticancerígenas (Ramírez, Guzmán, Espinosa y Murillo, 2001); *Physalis philadelphica* Lam. (tomatillo), el cual posee propiedades quimiopreventivas contra el cáncer (Choi, Murillo, Su, Pezzuto, Kinghorn, y Mehta, 2006); *Solanum pinnatisectum* posee propiedades que inhiben la proliferación de las células de cáncer de hígado y cáncer de colon (Wang, Chen, He, Mir, Su, y Yang, 2011).

- ❖ **Hipoglucemiantes:** como *Margaranthus solanaceus*, es utilizada para el tratamiento de diabetes y bilis, para ello se usan las hojas con las que se elabora un té que se toma en ayunas (Canales, 2005).
- ❖ **Antibacterianas:** como el uso de *Datura stramonium* (Toloache), para el tratamiento de la gingivitis, la caries y la periodontitis, enfermedades bucales ocasionadas por bacterias, que residen en la cavidad bucal, especialmente el *Streptococcus mutans* (Rosas, 2012); también *Margaranthus solanaceus* comúnmente conocida como Totomache y la *Solanum rostratum* Dunal o Diente de perro, las cuales son utilizadas para curar la diarrea (Hernández, 2003).
- ❖ **Antifúngicas:** se ha utilizado *Solanum chrysotrichum* para tratar hongos asociados con enfermedades cutáneas, ya que en sus extractos se ha encontrado actividad frente a dermatofitos (hongos filamentosos y levaduras), se ha observado que esta planta presenta el mismo efecto antimicótico que el ketoconazol pero en menores porcentajes de erradicación micológica (Herrera y Jiménez, 2009); otra especie evaluada es *Capsicum chinese*, en la cual se ha reportado la presencia de péptidos antimicrobianos que presentan alta actividad antifúngica contra *Candida albicans* (Anaya, López, Baizabal, Cano y Ochoa, 2006).
- ❖ **Antiparasitarias:** como lo es el caso de *Solanum nudum* que muestra efecto antiparasitario contra *Plasmodium falciparum*, agente causal de la malaria (López y Segura, 2008); así mismo, *Solanum lycocarpum* en la cual están presentes alcaloides con actividad en contra de la esquistosomiasis, enfermedad parasitaria causada por helmintos (Miranda, Magalhaes, Tioissis, Kuehn, Rodríguez, McChesney y Bastos, 2012).

Del mismo modo, *Solanum mammosum* es una fuente principal de Solasodina, un alcaloide conocido por sus efectos diuréticos,

anticancerígenos, antifúngicos, cardiotónicos, antiespermatogénicos, antiandrogénicos, inmunomoduladores y antipiréticos en el sistema nervioso central (Patel y Singh, 2013).

Género *Acnistus*

Aspectos botánicos

Árboles o arbustos pequeños, pubescencia de tricomas simples y/o ramificados; corteza suberosa, braquiblastos a menudo presentes; hojas simples, elípticas a lanceoladas, de margen entero; inflorescencias dispuestas en fascículos agregados axilares, pedicelos alargados; flores actinomorfas, pentámeras; cáliz campanulado, 5-lobulado; corola simpétala tubular, por lo general blanca, 5-lobulada, lóbulos de prefloración valvada; estambres 5, filamentos capilares, insertos en el tubo de la corola, anteras puntiagudas en el ápice, de dehiscencia longitudinal; ovario bilocular, óvulos numerosos, estigma bilobado o capitado, erecto; fruto en forma de baya anaranjada o amarilla; semillas numerosas, comprimidas, embrión enrollado (Martínez, Montero, Dean, Bye, Cavazos, Medina, y Rzedowski, 2020).

Distribución geográfica

Cerca de 40 especies distribuidas desde México hasta la Patagonia; en Venezuela se encuentra en los estados Sucre y Mérida (Aristeguieta, 1973). La delimitación de *Acnistus* ha variado a lo largo de los tiempos. En la actualidad se le acepta como género monotípico de distribución neotropical (Martínez y cols., 2020).

Clasificación taxonómica

Se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera (Tabla 2):

Tabla 2. Taxonomía del género *Acnistus*

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Género:	<i>Acnistus</i>

Tomado y modificado de trópicos.org

Metabolitos secundarios aislados

Se han aislado del género *Acnistus* metabolitos secundarios como: alcaloides, taninos, esteroides; además de withanólidos (Rondón, Moncayo, Cornejo, Santos, Villalta, Siguencia y Duche, 2018).

Usos etnobotánicos

De este género es utilizado los troncos para leña y cercas y las ramas para colocar orquídeas. Además, se cultiva para sombra del café. En Costa Rica, se hace referencia a la especie *arborescens* donde el zumo de los tallos, así como las hojas, se usan externamente contra las almorranas (hemorroides). Las hojas en remojo se han utilizado contra la caspa. Los frutos hervidos se han empleado para las inflamaciones de la garganta (Fernández, 2009).

Actividades farmacológicas

El *Acnistus* ha sido utilizado en el tratamiento de tumores, además de tener un efecto inmunosupresor (Kupchan y cols., 1969; Luis y cols., 1994).

Especie *Acnistus arborescens*

Aspectos botánicos

Se trata de arbustos o árboles pequeños, que pueden medir hasta 8 m de alto (Figura 3) con una corteza suberosa. Sus hojas son solitarias, simples, elípticas o lanceoladas de 7-20 cm de largo y de 3-8 cm de ancho; con un ápice agudo, base cuneada o atenuadas, enteras. Sus inflorescencias son numerosas de fascículos agregados a lo largo de 5–25 cm del tallo leñoso, con muchas flores en brotes cortos de 1-5 mm de largo. Las flores son fragantes, actinomorfas, con cáliz campanulado o cupuliforme de 2-4 mm de largo. Sus frutos son en forma de baya, de 5-6 mm de largo, jugosa, de color anaranjado o amarillo. Posee semillas numerosas, discoides, de 1,5-2 mm de ancho (Stevens, Ulloa, Pool y Montiel, 2001).

Figura 3. Planta de *Acnistus arborescens*



Fuente: Rivas y Obregón, 2023

Distribución geográfica

Se encuentra distribuido en América Central, las Antillas y norte de América del Sur. En Venezuela en la Cordillera de Mérida y en la Cordillera de la Costa, entre unos 1500 y 2500 metros sobre el nivel del mar (Schnee, Leal y Benítez, 2010).

Clasificación taxonómica

Taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera (Tabla 3):

Tabla 3. Taxonomía de la especie *Acnistus arborescens*

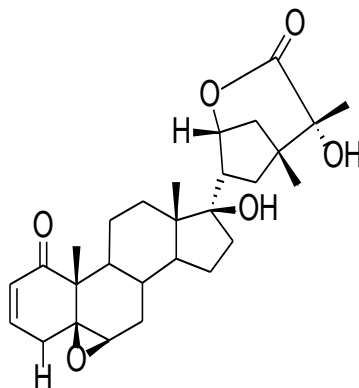
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Género:	<i>Acnistus</i>
Especie:	<i>arborescens</i>

Tomado y modificado de trópicos.org

Metabolitos secundarios aislados

Estudios cromatográficos muestran que los principales metabolitos secundarios encontrados son: esteroides, terpenos, flavonoides, y withanólidos (Morantes, Páez, Cordero, Rincón y Aristizábal, 2006); de estos últimos, fueron los primeros en ser aislados las acnistinas A (Figura 4) y E (Usubillaga, De Castellano, Khouri, Zabel y Watson, 1980). Además, presentan alcaloides y taninos (Rondón y cols., 2018).

Figura 4. Estructura química de la Acnistina A



Tomado y modificado de Usubillaga y cols., 1980

Usos etnobotánicos

Los principales usos etnobotánicos de esta planta son: tratamiento de contusiones y torceduras o esguinces, afecciones del hígado y bazo y tratamiento de crecimientos cancerosos (Morantes y cols., 2006). Las ramas y tronco presentan crecimiento de corcho en la corteza, por lo que se emplean para el crecimiento de orquídeas. Las flores son polinizadas por colibríes y abejas dado que les brindan néctar para su alimentación; y sus frutos maduros son comestibles y constituyen una fuente de alimento para los pájaros (Mongue y Loria, 2023).

Actividades farmacológicas

Los withanólidos reportados en esta especie presentan actividad citotóxica sobre diferentes líneas celulares tumorales (Rondón y cols., 2018). En estudios realizados donde se aislaron withanólidos se reportaron actividades citotóxicas (Morantes y cols., 2006; Minguzzi, Barata, Shin, Jonas, Chai, Park, Pezzuto, Cordell, 2002; Roumy, Biabiany, Hennebelle, Aliouat, Pottier, Joseph, Joha, Quesnel, Alkhatib, Sahpaz y Bailleul, 2010). Actividad antifúngica contra *Pneumocystis carinii* (Roumy y cols., 2010), y

actividades anti trypanosoma, leishmanicida y antibacteriana (Misico y cols., 2011).

Productos Naturales

Se conoce como producto natural vegetal a toda la diversidad de compuestos que el hombre extrae de un vegetal, con la finalidad de aprovechar y darle alguna utilización; representan moléculas con variadas estructuras, diferentes propiedades de solubilidad y distintos orígenes biosintéticos (Ringuelet y Viña, 2013). Estos compuestos son el resultado de la actividad metabólica y es por ello que se denominan metabolitos; los mismos pueden dividirse en dos tipos principales: primarios y secundarios (Ramos, 2016).

Los metabolitos primarios son los más abundantes y su nombre se debe a que forman parte de la base fundamental de los procesos vitales, ya que intervienen en la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas. Por el contrario, los metabolitos secundarios se dan de manera restringida, generalmente en pequeñas cantidades a diferencia de los primarios (Ramos, 2016). Los mismos tienen funciones ecológicas específicas como, atrayentes o repelentes de animales, algunos forman parte de los pigmentos que proporcionan el color a las flores y frutos, otros tienen un papel esencial en la reproducción, atrayendo a insectos polinizadores o animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento (Ávalos y Pérez, 2009).

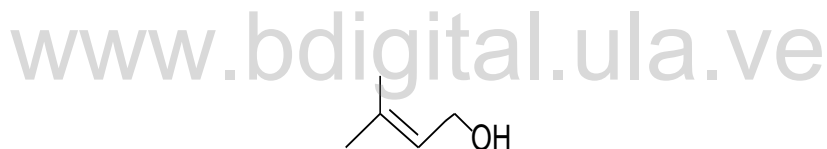
Clasificación de los Productos Naturales

Se clasifican en cuatro grandes grupos terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides:

❖ Terpenos

Están formados por la unión de un número entero de unidades de isopreno (C₅) (Figura 5), según ese número se clasifican en monoterpenos (2 unidades de isopreno = C₁₀), sesquiterpenos (3 unidades de isopreno = C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀), carotenos (C₄₀), politerpenos (C_n) (Bruneton, 2001). Éstos son insolubles en agua y se sintetizan a partir de metabolitos primarios. Los terpenos incluyen, hormonas, que contienen diterpenos como la giberelinas y ácido abscísico; pigmentos carotenoides como carotenos y xantofilas; esteroides que contienen triterpenos como el ergosterol, sitosterol, colesterol; derivados de los esteroides conocidos como glicósidos cardíacos (Ávalos y Pérez, 2009).

Figura 5. Estructura química de un hemiterpeno

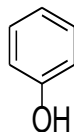


Tomado y modificado de Bruneton, 2001.

❖ Compuestos fenólicos

También llamados polifenoles o fenilpropanoides; son productos secundarios que contienen un grupo fenol, es decir, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Figura 6). Comprenden desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos, que son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturalizándolas. Y también se encuentran pigmentos flavonoides que contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos (Ávalos y Pérez, 2009).

Figura 6. Estructura química del fenol

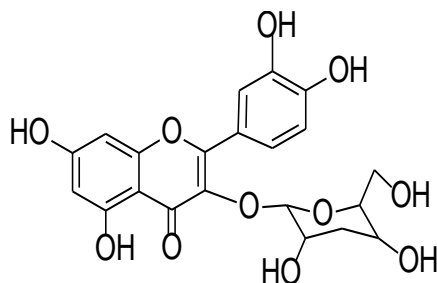


Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009

❖ **Glicósidos**

Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo (Figura 7). Existen tres grupos de interés: saponinas, son triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura; se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar, en cuyo caso se denominan sapogeninas. Los glicósidos cardiotónicos, semejantes a las saponinas esteroideas, tienen también propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Y por último los glicósidos cianogénicos, que son compuestos nitrogenados, no tóxicos por sí mismos, pero se degradan cuando las plantas son aplastadas liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno. Una cuarta familia, los glucosinolatos, se degradan y desprenden sustancias volátiles responsables del aroma, el olor y el gusto de condimentos (Ávalos y Pérez, 2009).

Figura 7. Estructura química de isoquercitina

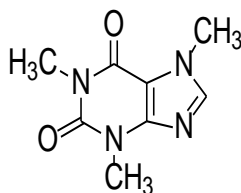


Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009

❖ Alcaloides

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 (Figura 8) aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina (Ávalos y Pérez, 2009). En los vegetales, estos se encuentran formando combinaciones solubles al estado de sales como citratos, maleatos, tartratos, isobutiratos, benzoatos, entre otros; o sales más específicas como meconatos, quinatos, aconitatos, entre otros. Estos se localizan en tejidos periféricos como tegumentos de la semilla, capas externas de cortezas, tallos y raíces, epidermis y capas subepidérmicas de las hojas (Bruneton, 2001).

Figura 8. Estructura química de la cafeína



Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009

Rutas biosintéticas

El metabolismo primario proporciona un gran número de moléculas simples, como el ácido shiquímico, el acetato y los aminoácidos, los cuales constituyen el punto de partida para las rutas biosintéticas del metabolismo secundario. Se conocen tres grandes vías o rutas que permiten la biosíntesis de los diferentes tipos de productos naturales (García, 2004).

- ❖ Ruta del ácido shikimico: a partir de él se forman los aminoácidos y desde ellos los otros compuestos aromáticos más complejos (fenilpropanoides, flavonoides, alcaloides)
- ❖ Ruta del ácido mevalónico: a partir de él se forman unidades de prenilo que tras uniones sucesivas conducen a isoprenoides (terpenoides, esteroides, carotenoides).
- ❖ Ruta del acetato-malonato: a partir del malonato y acetato se forman los policétidos (acetogeninas) y ácidos grasos (Marcano y Hasegawa, 2002).

Extractos vegetales

Los extractos son preparados concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia. Derivados de material vegetal desecado, que se obtienen al evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal. Según su consistencia y concentración de principio activo se clasifican en fluidos, secos y blandos (Carrión y García, 2010).

Métodos de obtención

Para la obtención de los extractos se utiliza la extracción de sustancias a partir de material sólido o líquido, que consiste en una técnica basada en el uso de disolventes contiguo con la aplicación de calor y agitación para favorecer la solución de los compuestos de interés en el disolvente; dicha

técnica es sencilla y económica de realizar ya que nos permite la obtención de los extractos naturales y sus metabolitos secundarios (Vázquez, 2015)

El constituyente más importante para realizar una extracción es la selección del disolvente ideal, es decir, un disolvente en el que los compuestos de interés tengan alta solubilidad, los disolventes adecuados son fracciones derivadas del petróleo tales como: el hexano, éter de petróleo u otros disolventes orgánicos como el diclorometano (Vázquez, 2015).

Dentro de estos métodos encontramos:

- ❖ **Maceración:** es una extracción sólido- líquido donde el material vegetal a extraer contiene compuestos solubles en el líquido de extracción. El material vegetal se corta en pequeños trozos, fresco o seco y se coloca en recipientes adecuados, añadiendo el solvente seleccionado por polaridad: hexano, cloroformo y finalmente metanol, en reposo o en un equipo de agitación continua a temperatura ambiente durante 5 días cada extracción (Star, González y Morales, 2016).
- ❖ **Lixiviación:** en este método se produce el desplazamiento de sustancias solubles por medio de un disolvente líquido. El material vegetal fresco se coloca en un recipiente a temperatura ambiente durante 3 días, con acetona o algún otro solvente, después de este tiempo se decanta y se evapora la acetona en un rotavapor (Star y cols., 2016).
- ❖ **Digestión:** consiste en una maceración realizada a una temperatura suave que oscila alrededor de los 50 o 60 °C. Al aumentar medianamente la temperatura se consigue un mayor rendimiento de la extracción, puesto que disminuye la viscosidad del solvente lo que

hace que éste pueda ingresar más rápidamente al interior de las células y así extraer los principios activos (Carrión y García, 2010).

- ❖ **Infusión:** proceso en el cual se somete a las partes tiernas de las plantas (flores, hojas) con agua caliente, pero sin someterlas a ebullición; el agua se vierte sobre éstas manteniendo bien cerrado el recipiente durante 30 minutos (Albornoz, 1980).
- ❖ **Decocción:** en esta el material crudo (corteza, raíces o tallos relativamente duros) se someten a ebullición con agua, habiéndose colocado previamente en un recipiente apropiado para impedir que este se derrame (Albornoz, 1980).

Tamizaje Fitoquímico

Es una técnica que se utiliza para determinar metabolitos secundarios de manera cualitativa, presentes en especies vegetales; se basa en la realización de reacciones químicas con diferentes reactivos, donde la aparición de un determinado color o precipitado coloreado o no, es muestra de la presencia de un determinado metabolito. Sin embargo, esto no brinda un criterio absoluto y confirmativo de la presencia de estos compuestos, puesto que se pueden producir numerosas interferencias producto de la presencia en el medio de otras sustancias capaces de reaccionar en forma similar, provocando reacciones falsas positivas (Martínez, Hung, Hernández y Audivert, 2006).

Pruebas químicas

- ❖ **Reconocimiento de alcaloides:** se fundamenta en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos) de combinarse con el yodo y metales pesados formando precipitados con reactivos como el mercuriyoduro de potasio (Mayer) y yoduro de bismuto (Dragendorff) (Coy, Parra y Cuca, 2014).

- ❖ **Reacción de precipitación con reactivo de Mayer:** Este reactivo precipita la mayoría de los alcaloides en medio ácido favoreciendo la formación de precipitados cristalinos de color blanco. Cuando el yoduro de potasio reacciona con el cloruro de mercurio forma un precipitado rojo de yoduro de mercurio, el cual es soluble en exceso de iones de yoduro dando la formación de un anión complejo incoloro (Coy y cols., 2014).

- ❖ **Reacción de precipitación con reactivo de Dragendorff:** Este reactivo contiene yoduro de bismuto potasio, donde al reaccionar $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ con HCl y con yoduro de potasio, forma complejos de color naranja (Coy y cols., 2014).

- ❖ **Reconocimiento de saponinas:** la prueba utilizada para su detección es la formación de espuma, que consiste en agitar vigorosamente la solución acuosa obtenida de la muestra en un tubo de ensayo y observar la espuma formada, ésta debe ser estable por lo menos 30 minutos (Carvajal, Hata, Sierra y Rueda, 2009). Al ser un grupo de glicósidos se disuelven en agua caliente disminuyendo la tensión superficial de ésta, por lo tanto, al sacudir o agitar la muestra se forma una espuma abundante y relativamente estable (Domínguez, 1979).

- ❖ **Reconocimiento de flavonoides:** la identificación de estos metabolitos se realiza por medio de la prueba de Shinoda (Zn/HCl), la cual se fundamenta en que, al poner en contacto ácido clorhídrico con magnesio metálico se genera hidrógeno, el cual reduce al flavonoide desarrollando coloraciones que van del rojo anaranjado al violeta (Delporte, 2010).
- ❖ **Reconocimiento de taninos y fenoles:** en el caso de taninos los métodos de detección se basan en la propiedad que tienen para precipitar proteínas, haciéndose la reacción más sensible por la salificación del complejo proteína-tanino; la prueba utilizada para ellos es la precipitación de proteínas con gelatina-sal (NaCl), formándose un precipitado. La prueba de cloruro férrico es la más utilizada para fenoles. Si hay desarrollo de una coloración rojo vino será un compuesto fenólico en general, ahora si se forma un precipitado azul oscuro, verde o azul-verdoso, se debe a la reacción entre el cloruro férrico y los grupos fenólicos del tanino (Albornoz, 1980; Orantes 2008)
- ❖ **Reconocimiento de triterpenos:** la prueba utilizada para su identificación es la de Liebermann-Burchard que consiste en una reacción donde el esteroide se oxida por la presencia del ácido sulfúrico que forma una molécula que contiene un doble enlace adicional. En la etapa inicial ocurre la protonación del grupo OH del esteroide habiendo perdida de agua y obtención del ion carbonio 3,5 colestadieno (Orantes 2008; Ardila, 2014).

Bacterias

Las bacterias son microorganismos procariontes, es decir, microorganismos unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi, ni retículo endoplásmico, que se reproducen por división asexual, la pared celular que las rodea es compleja y existen dos formas básicas: una pared celular grampositiva con una gruesa capa de peptidoglicano y una pared celular gramnegativa con una delgada capa de peptidoglicano, así como una membrana externa. Uno de los métodos más utilizados para la identificación y diferenciación de las bacterias es la tinción de Gram, que las divide en dos grupos (Tortora, Funke y Case, 2007).

Clasificación de las Bacterias

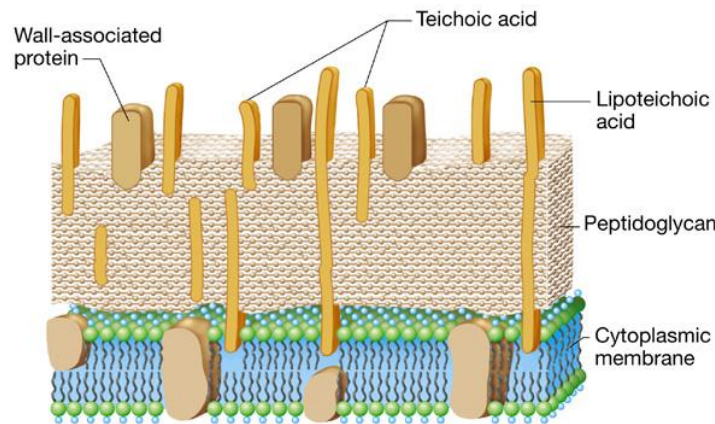
La pared celular bacteriana está compuesta por una red macromolecular llamada peptidoglicano conocido también como mureína, que puede ser una estructura solitaria o estar combinada con otras sustancias; dependiendo del número de capas que formen la pared celular de la bacteria y del color que tomen con la tinción de Gram éstas se clasifican en dos grupos (Tortora y cols., 2007)

❖ Bacterias grampositivas

Su pared celular está compuesta por varias capas de peptidoglicano que forman una estructura gruesa y rígida, contiene ácidos teicoicos compuestos principalmente por alcohol y fosfato, entre ellos se encuentran el ácido lipoteicoico que abarca toda la capa de peptidoglicano y está unido a la membrana plasmática (Figura 9) y el ácido teicoico mural unido a la capa de peptidoglicano, estos ácidos contribuyen al desarrollo celular, ya que previenen la ruptura de la pared celular y reducen el riesgo de lisis. Con la

tinción de Gram éstas conservan el color violeta oscuro después de haberles agregado el alcohol para decolorarlas (Tortora y cols., 2007).

Figura 9. Pared celular de Bacterias grampositivas

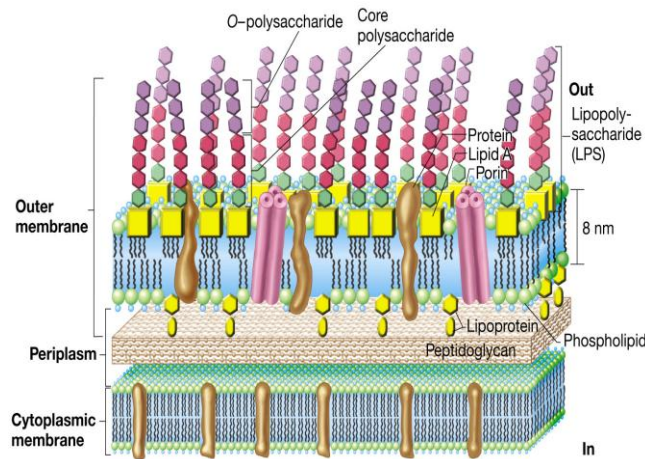


Tomado y modificado de Tortora y cols., 2007

❖ Bacterias gramnegativas

La pared celular de estas bacterias está compuesta por una capa o por pocas capas de peptidoglicano y una membrana externa, compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos (Figura 10); su pared no contiene ácidos teicoicos y el hecho de que tenga poca cantidad de peptidoglicano incrementa la susceptibilidad a la ruptura mecánica. Luego de agregar el alcohol en la tinción de Gram éstas no retienen el color violeta oscuro, por lo que se tiñen con un colorante de contraste, adquiriendo un color rosado (Tortora y cols., 2007).

Figura 10. Pared celular de Bacterias gramnegativas



Tomado y modificado de Tortora y cols., 2007

Mecanismos de Resistencia

Se trata de mecanismos mediante los cuales la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos. La resistencia se produce a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de cromosoma) y por la transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias (Cordiés, Machado y Hamilton, 1998).

Dentro de los mecanismos de resistencia encontramos:

- ❖ Inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química: es un proceso molecular caracterizado por la producción de enzimas que van a llevar a cabo esta función, las más conocidas, son las beta-lactamasas que se caracterizan por hidrolizar el núcleo beta-lactámico rompiendo el enlace amida (Pérez y Robles, 2013).
- ❖ Alteración del sitio blanco del antibiótico: consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana como la pared

celular, la membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales, entre otras (Pérez y Robles, 2013).

- ❖ Alteración en las barreras de permeabilidad: este mecanismo se debe a los cambios que se dan en los receptores bacterianos específicos para los antimicrobianos o por alteraciones estructurales en los componentes de envoltura de la célula bacteriana (membrana o pared celular) (Pérez y Robles, 2013).
- ❖ Bombas de eflujo: en la membrana celular se encuentran las llamadas bombas de eflujo que llevan a cabo la internalización y expulsión de los antimicrobianos. Una amplia variedad de bombas provee resistencia tanto en bacterias grampositivas como en gramnegativas (Pérez y Robles, 2013).

Características de las bacterias a usar durante el estudio

Para realizar el estudio, se utilizaron bacterias grampositivas como: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*; del mismo modo bacterias gramnegativas como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

❖ *Staphylococcus aureus*

Son cocos grampositivos, dispuestos en forma aislada, en pares o en forma similar a racimos de uvas irregulares, no son formadores de esporas, anaeróbicos facultativos, catalasa variable por lo común positivos temperatura óptima de crecimiento: 30-37 °C; sensibles a la lisis por la lisostafina, pero resistentes a la lisozima; algunos contienen pigmentos carotenoides de color naranja o amarillo (MacFaddin, 2004; Singleton, 2004).

❖ ***Enterococcus faecalis***

Son cocos grampositivos en pares, cadenas cortas o en formas aisladas en medios líquidos, no formadores de esporas, anaeróbicos facultativos, catalasa negativos, movilidad variable, escasos flagelos, temperatura óptima de crecimiento: 37 °C; sin embargo, crecen en caldo a 10 °C y 45 °C a pH 9,6, todos insolubles en bilis (MacFaddin, 2004).

❖ ***Klebsiella pneumoniae***

Son bacilos gramnegativos, que forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*; células aisladas, pareja, cadenas cortas, encapsulado, inmóvil; se encuentran en tierra, agua y como parásitos patógenos del hombre y animales (Singleton, 2004).

❖ ***Pseudomonas aeruginosa***

Son bacilos gramnegativos, rectos o ligeramente curvos, no helicoidales, no formadores de esporas, son aerobios, catalasa positivos, presentan movilidad variable debido a flagelos polares y rara vez inmóviles, lipasa positivo sólo *P. aeruginosa*; la temperatura optima de crecimiento: 30-37 °C (MacFaddin, 2004).

❖ ***Escherichia coli***

Son bacilos gramnegativos, que forma parte de la familia *Enterobacteriaceae*, cuyas células se presentan aisladas o en parejas, frecuentemente móviles (flagelo peritricomal), temperatura óptima: 37 °C; se caracteriza por la capacidad de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas; se encuentra en el intestino del hombre y de los animales (Singleton, 2004; Pascual y Calderón, 2000).

Antibióticos

Se define como antibióticos, aquellos metabolitos secundarios producidos por ciertos microorganismos que son capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos o aún de destruirlos. Para que un antibiótico sea ideal debe presentar ciertas características dentro de las cuales se encuentran: solubilidad en agua, no debe ser tóxico, ser activo en el medio común de las enfermedades infecciosas, debe tener amplio espectro antibacterial, ser activo a pH neutro, no ser proteico y no debe inducir resistencia en los microorganismos infecciosos (Barrios, 1988).

Clasificación de los Antibióticos

Éstos se clasifican de acuerdo a diferentes criterios, según el organismo que lo produce, estructura química, mecanismo de acción y espectro de actuación (Barrios, 1988).

❖ Según el organismo que lo produce:

- ❖ Bacterianos: cuando son producidos por bacterias como la Colimicina y Gramicidina.
- ❖ Micóticos: producidos por hongos como la Penicilina.
- ❖ Antimicóticos: producidos por antinomicetales como la Eritromicina y Cloranfenicol.

❖ Según su estructura química:

- ❖ Polipéptidos
- ❖ Aminoglucósidos
- ❖ Tetraciclinas
- ❖ Cloranfenicol
- ❖ Macrólidos

- ❖ Lincomicina
- ❖ Penicilinas
- ❖ Cefalosporinas
- ❖ Rifampicinas
- ❖ Sulfonamidas
- ❖ Cicloserina
- ❖ Vancomicina
- ❖ Novobiocina

❖ **Según el espectro de acción:**

- ❖ De amplio espectro: cuando tienen actividad contra una amplia gama de bacterias, tanto grampositivas como gramnegativas.
- ❖ De pequeño espectro: cuando tienen acción sobre un grupo reducido de microorganismos, algunas veces una sola especie bacteriana.

❖ **Según el mecanismo de acción:**

- ❖ Inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana: este mecanismo actúa inhibiendo la síntesis del peptidoglicano, compuesto fundamental para la integridad de la pared celular bacteriana. Son efectivos cuando la bacteria se encuentra en división y se está sintetizando la pared celular (Barrios, 1988). Estos antibióticos son llamados Betalactámicos, ya que comparten una estructura común de anillo beta lactámico. Generalmente actúan como fármacos bactericidas (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).
- ❖ Inhibidores de la síntesis proteica: estos antibióticos afectan las etapas fundamentales en el proceso de síntesis proteica como: la transcripción del mensaje genético del ADN para formar el ARN mensajero o la traducción de dicho mensaje y formación de la cadena

polipeptídica, llevada a cabo en los ribosomas, en la cual intervienen las subunidades 30S y 50S del ribosoma. (Barrios, 1988).

- ❖ Antibióticos que bloquean la síntesis de ácidos nucleicos: los antibióticos que afectan la función y replicación del ADN son agentes antimicrobianos muy eficaces. Sin embargo, su uso es limitado puesto que alteran el ADN de las células eucariotas, lo cual se traduce en daños severos al organismo. Estos pueden interactuar con las bandas de ADN impidiendo su replicación o con las enzimas que intervienen en este proceso. (Barrios, 1988).
- ❖ Antibióticos que alteran la permeabilidad de la membrana: como es una estructura esencial para la célula bacteriana, los antibióticos que la lesionan ocasionan su muerte por pérdida de sustancias nutritivas o acumulación de productos tóxicos. (Barrios, 1988).

Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana, se conoce como la capacidad o propiedad que posee un agente, bien sea un compuesto químico, natural o sintético, de inducir la muerte o inhibir el crecimiento de bacterias (Usano y cols., 2014).

Técnicas para determinar actividad antibacteriana

- ❖ **Método de difusión en agar:** cuando se colocan discos impregnados de antibióticos en un agar en donde previamente se ha inoculado la bacteria objeto de prueba, el disco capta humedad y el antibiótico difunde radialmente hacia afuera a través del agar, produciendo un gradiente de concentración del antibiótico. A medida que aumenta la distancia desde el disco, disminuye la concentración del antibiótico, y

sólo los patógenos más sensibles resultan dañados. Si el agente inhibe el crecimiento bacteriano, en torno al disco se forma un anillo claro. Cuanto más ancha es la zona que rodea al disco, más sensible es el patógeno (Prescott, Harley y Klein, 2004).

- ❖ **Método de dilución en caldo:** se emplea para determinar Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). En esta se preparan una serie de tubos de caldo de cultivo (caldo Mueller-Hinton) que contienen concentraciones de antibióticos entre 0,1 y 128 µg/mL y se inocula con cantidades estándar del microorganismo objeto de la prueba. La concentración mínima de antibiótico a la que no se produce crecimiento tras 16 a 20 horas de incubación será la CMI (Prescott y cols., 2004).

www.bdigital.ula.ve

Definición Operacional de Términos

Agar

Es un polisacárido complejo proveniente de un alga marina que se utiliza como agente para producir la solidificación en los medios de cultivo (Tortora y cols., 2007).

Cepas

Las cepas son células genéticamente diferentes dentro de un clon, es decir una población de células derivadas de una única célula parental, que en algunos casos en los cultivos puros de la misma especie no son idénticos en todos los aspectos; estas suelen identificarse por números, letras, o nombres que siguen al epíteto específico (Tortora y cols., 2007).

Concentración Mínima inhibitoria (CMI)

Se define como la menor concentración del antibiótico que evita el crecimiento bacteriano visible (Tortora y cols., 2007).

Etnobotánica

Se puede definir como el estudio de las interrelaciones entre los grupos humanos y las plantas; ésta abarca muchas áreas, incluyendo: botánica, química, medicina, farmacología, toxicología, nutrición, agronomía, ecología, sociología, antropología, lingüística, historia y arqueología, entre otras; lo cual permite un amplio rango de enfoques y aplicaciones (Bermúdez, Oliveira y Velázquez, 2005).

Fitofármacos

Se definen como compuestos cuya sustancia activa contiene el extracto de una determinada planta e igualan el nivel de los fármacos de síntesis (Azuelo, Jaramillo, San Martín y D'Armas, 2016).

Principios Activos

Son sustancias que se encuentran en distintas partes de las plantas, que alteran o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal. Estos se clasifican según su estructura química en dos grupos, uno proveniente del metabolismo primario y el otro derivado del metabolismo secundario (Bruneton, 2001).

Disolvente

Son compuestos orgánicos volátiles que se utilizan solos o en combinación con otros agentes, para disolver materias primas, productos o materiales residuales, para modificar la viscosidad, como agente tensoactivo, como conservante o como portador de otras sustancias (Garzón, 2004).

Precipitado

Es el sólido que se produce en una disolución por efecto de cristalización o de una reacción química (Garzón, 2004).

Operacionalización de las Variables

Las variables son conceptos abstractos que se operacionalizan para transformarlos en empíricos (Pérez, 2009). Por esta razón, se operacionalizó la variable dependiente, actividad antibacteriana y la variable independiente, composición química de los extractos de las hojas del *Acnistus arborescens* (Tabla 4 y 5)

Tabla 4. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana de los extractos de *Acnistus arborescens*.

Variable	Tipo de Variable	Definición conceptual
Actividad antibacteriana de los extractos de <i>Acnistus arborescens</i>	Dependiente Cuantitativa	Es la propiedad de ciertas sustancias que forman un compuesto, o que se hallan en unas muestras capaces de eliminar agentes bacterianos o la inhibición de su crecimiento sin incurrir en el daño del objeto, ambiente u organismo que las porta. (Romero, 2007)
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
La actividad antibacteriana se puede medir por medio del método de difusión en agar con disco (Kirby-Bauer) (Prescott y cols., 2004).	<ul style="list-style-type: none"> -<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 -<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 -<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 -<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 -<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357 	<ul style="list-style-type: none"> -Sensible -Resistente -Presencia o ausencia del halo de inhibición frente a cepas grampositivas y gramnegativas.

Fuente: Rivas y Obregón, 2023

Tabla 5. Operacionalización de la variable independiente: Composición química de los extractos del *Acnistus arborescens*.

Variable	Tipo de Variable	Definición conceptual
Composición química de los extractos del <i>Acnistus arborescens</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).
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Tamizaje fitoquímico.	Alcaloides: reactivo de Wagner, Mayer y Dragendorff	Aparición de turbidez o precipitado.
	Saponinas: formación de espuma	Formación de abundante espuma.
	Taninos: prueba con gelatina- sal (NaCl)	Presencia de precipitado blanco.
	Flavonoides: prueba de Shinoda	Coloración naranja a rojo para flavonas; rojo para flavonoles y magenta para flavononas.
	Fenoles: prueba de cloruro férrico	Coloración de azul a negro
	Triterpenos: prueba de Liebermann-Burchard	Coloración azul o verde para esteroides; coloración rosa, rojo, magenta o violeta para triterpenos.
	Glicósidos cardiotónicos	Coloración púrpura o violácea.
	Cumarinas	Fluorescencia azul- violeta
	Quinonas y Antraquinonas	Coloración roja
	Sesquiterpenlactonas	Coloraciones roja, violeta o rosa

Fuente: Rivas y Obregón, 2023

Hipótesis

Estudios anteriores han confirmado la presencia de metabolitos secundarios en el *Acnistus arborescens* que poseen diversas actividades biológicas, por lo cual, es de esperar que los extractos del *Acnistus arborescens* en estudio, presenten actividad antibacteriana frente a cepas de referencia internacional grampositivas y gramnegativas.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

La investigación confirmatoria involucra una explicación previa o una serie de hipótesis, las cuales se desean confirmar, ya que manifiestan una relación causa-efecto (Hurtado, 2015). En este caso, la investigación es de tipo confirmatoria, ya que se quiso confirmar la relación que existe entre la composición química y la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de *Acnistus arborescens* frente a cepas bacterianas de referencia internacional.

Diseño de la Investigación

El diseño de la investigación es experimental, de campo, laboratorio, contemporáneo, transversal y bivariable. Debido a que las hojas de la planta de *Acnistus arborescens* se recolectaron en el Jardín Botánico de Plantas Medicinales Doctor Luis Ruíz Terán, ubicado en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis; las mismas fueron llevadas al laboratorio del Instituto de Investigación “Alfredo Nicolás Usubillaga del hierro” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, empleando la técnica de extracción de reflujo en caliente para la obtención del extracto vegetal. Además, el diseño es contemporáneo, transversal y bivariable, ya que los datos se obtuvieron en el presente y en un solo momento e incluye dos tipos de variables (Hurtado, 2015).

Población y Muestra

Unidad de Investigación

La unidad de investigación estuvo representada por la especie de *Acnistus arborescens*, situada en el estado Mérida, Municipio Libertador, específicamente en el Jardín Botánico de Plantas Medicinales Doctor Luis Ruíz Terán, ubicado en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Selección del Tamaño de la Muestra

La “n” muestral no probabilística estuvo representada por 700 gramos de hojas de la especie *Acnistus arborescens*.

www.bdigital.ula.ve

Sistema de Variables

Debido a que la investigación es de tipo confirmatoria las variables existentes se encuentran sistematizadas en dependiente e independiente, fundamentándolo en el marco teórico y la hipótesis planteada. La variable dependiente es la actividad antibacteriana y la variable independiente es la composición química de los extractos del *Acnistus arborescens*.

Instrumento de Recolección de Datos

Los instrumentos representan la herramienta con la cual se va a recoger, filtrar y codificar la información, es decir, el con qué (Hurtado, 2015). La investigación realizó una observación directa para identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto vegetal del *Acnistus arborescens* de


acuerdo a las pruebas preliminares, por medio de reacciones químicas cualitativas; además se registró el comportamiento que presentan las bacterias conocidas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* frente a la composición química de los extractos de la especie en estudio. Considerando que los datos de ambas variables fueron agrupados en base a tablas e imágenes ejemplificando lo expuesto.

Procedimientos de la Investigación

1. Recolección del material vegetal

Se recolectaron las hojas de la planta de *Acnistus arborescens* en el Jardín Botánico de Plantas Medicinales Doctor Luis Ruíz Terán de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la misma manera, se llevó una muestra testigo al herbario MERF para su identificación botánica y fue almacenada bajo el N° de Vaucher 01 (Figura 11).

Figura 11. Identificación botánica de *Acnistus arborescens*

	Fecha	Colectores	Número
	17-06-2019	Y. Rivas	01
DET. P. Meléndez			
<p><i>Acnistus arborescens</i> Schdtl. SOLANACEAE</p> <p>Arbolito de 3-4 metros de altura. Frutos con bayas verde claro.</p> <p>LOCALIDAD: Mérida, Mpio. Libertador, Jardín Plantas Medicinales Facultad Farmacia-Bioanálisis.</p> <p>Altitud ~ 1550 msnm.</p>			

Fuente: Rivas y Obregón, 2023

2. Obtención de los extractos

Las hojas recolectadas de *Acnistus arborescens* fueron llevadas a la estufa, donde se secaron a 40 °C, luego, se procedió a realizar una molienda o triturado de las mismas, haciendo uso de una balanza analítica se conoció la cantidad del material molido que fue 200 gramos. Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de extracción mediante la técnica de reflujo en caliente a una temperatura de 40 °C (Figura 12). Cabe destacar que luego que ocurre el proceso de ebullición del material vegetal junto con el solvente, se cuenta una hora después de caer la primera gota, el primer extracto obtenido se mezcla con 600 mL de hexano siendo este un solvente apolar y el segundo extracto, se realizó con 600 mL de etanol conocido como un solvente apolar.

La técnica de reflujo en caliente, es similar a la extracción por digestión, ya que es una forma de maceración donde se aplica calor moderado a una temperatura inicial de 50 °C y luego que el material macerado pasa por un proceso de ebullición se disminuye la temperatura a 40 °C, lo que permite aumentar el poder del disolvente y por tanto el solvente pueda emplearse continuamente de reciclaje, a él se adaptará un condensador al balón aforado donde se efectuará el reflujo (Albornoz, 1980).

Figura 12. Equipo de extracción por reflujo



Fuente: Rivas y Obregón, 2023

La idea de esta técnica es que el solvente se pueda usar continuamente por reciclaje, además, de acuerdo al solvente utilizado podrá caracterizar los metabolitos secundarios de la planta, unos afines al solvente apolar y otros afines al solvente polar (Escudero, 1999).

Finalmente, luego del proceso de extracción, se dejan enfriar los solventes utilizados junto con el extracto obtenido, y se procedió a filtrar cada uno por separado utilizando para ello papel filtro, para posteriormente llevar a cabo la concentración en el rotavapor (Figura 13) a presión reducida y temperatura controlada no mayor a 45 °C. Los extractos se colocaron en frascos de color ámbar y se llevaron a secar a la estufa.

Figura 13. Concentración del extracto en el rotavapor



Fuente: Rivas y Obregón, 2023

3. Tamizaje fitoquímico

Se procedió a realizar el tamizaje fitoquímico o pruebas preliminares para caracterizar compuestos biológicamente activos contenidos en las plantas (Marcano y Hasegawa, 2002) las cuales constan de las siguientes pruebas agrupadas en la siguiente Tabla 6.

Tabla 6. Pruebas preliminares para realizar el tamizaje fitoquímico

Metabolitos secundarios	Pruebas químicas de laboratorio
Alcaloides	<p>Se tomó una porción del extracto etanólico y se adicionó 5 ml de ácido clorhídrico (HCl) al 10 %, se calentó en baño de María por 10 min, se dejó enfriar y se filtró, para luego tomar una alícuota del filtrado para cada ensayo a analizar con el reactivo de:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dragendorff: ocurre la aparición de un color naranja-rojizo. - Wagner: los alcaloides van a precipitar con un color marrón. - Mayer: los alcaloides son detectados por la formación de un precipitado de color blanco.
Saponinas	Tomar una porción del extracto y agregar a un tubo de ensayo, disolver agregando agua y agitar vigorosamente. Se manifiesta por la formación de una espuma persistente
Fenoles	Se disolvió la muestra (1-2 mg) en 1 mL de etanol añadiendo unas gotas de cloruro férrico al 5 %. Una coloración verde oscura o negra indica la positividad.
Taninos	Se tomó 1-2 mg de la muestra y se disolvió en 2 mL de solución de gelatina al 1 %. Si se observa la presencia del precipitado blanco indica la positividad de la prueba.
Flavonoides	<p><u>Reacción de shinoda:</u> para ello se mezclaron virutas de Magnesio, HCl concentrado y el extracto de la planta. Una coloración naranja a rojo para flavonas; rojo para flavonoles y magenta para flavononas.</p> <p><u>Hidróxido de sodio al 10 %:</u> Se adicionan 0,5 mL de NaOH si se forma una coloración de amarillo a rojo indica la presencia de xantonas y flavonas, de café a naranja flavonoles; de purpura a rojizo chalconas y azul de antocianidas</p>
Esteroles y triterpenos	Se realizó mediante la prueba de Liebermann Burchard. Se disolvió una porción del extracto con diclorometano, se mezcló con 0,5 mL de anhídrido acético y se adicionó cuidadosamente por la pared del tubo, dos gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se observó los cambios de coloración, azul o verde para esteroles; coloración rosa, rojo, magenta o violeta para triterpenos.

**Tabla 6. Pruebas preliminares para realizar el tamizaje fitoquímico
(Continuación)**

Cumarinas	Se disolvió la muestra en 1 mL de etanol, se agregaron unas gotas de hidróxido de amonio concentrado, luego se llevó el tubo a la lámpara de luz ultravioleta (UV) a 365 nm, debe observarse fluorescencia azul-violeta.
Quinonas y Antraquinonas	Se colocaron 5 mL del extracto hexano y etanólico en una capsula de porcelana y se concentró a sequedad, posteriormente se dividió el extracto en 2 porciones. Se agregó 1 gota de hidróxido de amonio concentrado a una parte del extracto y 1 gota de ácido sulfúrico concentrado a otra porción de los extractos, una coloración roja indica positividad.
sesquiterpenlactonas	En una cápsula de porcelana o tubo de ensayo disolver una porción del extracto en etanol o diclorometano, luego adicionar una gota de hidróxido de potasio 2 N en metanol. Calentar la mezcla a ebullición de 1 a 2 minutos, enfriar y llevar a pH de 1 con ácido clorhídrico 0,5 N. adicionar una gota de cloruro férrico 1 %. Las coloraciones roja, violeta o rosa indican que la prueba es positiva.

Tomado y modificado de: Marcano y Hasegawa, 2002

4. Determinación de la actividad antibacteriana

Se realizó por medio del método de difusión en agar con disco (Kirby-Bauer). Cabe destacar que este método permite ahorrar tiempo y medios de cultivo cuando se está estudiando un patógeno aerobio de crecimiento rápido o facultativo, tal es el caso de *Staphylococcus* o *Pseudomonas* (Prescott y cols., 2004). La misma se llevó a cabo en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA), bajo la asesoría de las Profesoras Yndra Cordero e Ysbelia Obregón.

Bacterias estudiadas

Para el estudio se seleccionaron cinco cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC); de las cuales dos de ellas fueron cepas bacterianas grampositivas y tres especies bacterianas gramnegativas; las mismas fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes a cargo de la Licenciada María Eugenia Nieves (Tabla 7). Además, se tomó como controles positivos los discos de antibióticos comerciales eritromicina, ampicilina y piperacilina, con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar (Tabla 8).

Tabla 7. Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC)

Bacterias grampositivas (ATCC)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
Bacterias gramnegativas (ATCC)	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 23357

Fuente: Rivas y Obregón, 2023

Tabla 8. Halos de inhibición de los controles positivos usados como referencia en las cepas bacterianas

Cepas Bacterianas ATCC	Halos de Inhibición en mm					
	E (15 µg)		AMP (10 µg)		PIP (100 µg)	
	CLSI	CE	CLSI	CE	CLSI	CE
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	≥ 23	32	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	≥ 17	32	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	≥ 21	27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	≥ 22	27
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	-	-	-	-	≥ 21	27

Leyenda: Lectura de los halos de la inhibición de los antibióticos realizados en el laboratorio frente a cepas ATCC: Eritromicina **(E)**, Ampicilina **(AMP)**, Piperacilina **(PIP)**, Milímetros **(mm)**, Lectura de los halos de inhibición recomendados por el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínicos **(CLSI)**, Halos de Cepas ensayadas obtenidos **(CE)**.

Fuente: Rivas y Obregón, 2023

Preparación de las Muestras

El extracto de etanol de las hojas de *Acnistus arborescens* fue evaluado inicialmente en concentraciones de 10.000 ppm.

Preparación de Placas

Las placas de Petri se prepararon colocando aproximadamente 18 mL de Agar Müller Hinton (Merck ®) estéril, dejándose solidificar a temperatura ambiente.

Preparación de Pre-inóculos Bacterianos

Las cepas a ensayar se incubaron en agar Müller Hinton a 37 °C por 16 a 18 horas antes de hacer el ensayo microbiano, ya que en ese tiempo las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano (Anon, 2003).

Preparación de los Inóculos Bacterianos

Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas, se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa estéril, tomándose una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en tubos 13x100 previamente estéril que contenían 5 mL de una solución de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0,9 % hasta que alcanzó una turbidez equivalente al patrón de Mac Farlán (10^{6-8} UFC/mL) (Anon, 2003).

Inoculación de las Placas

Una vez preparadas las placas, se inocularon en forma homogénea en la superficie de cada una de ellas con cada uno de los inóculos bacterianos en solución de NaCl al 0,9% utilizando para ello un hisopo de algodón estéril.

Preparación de los Discos

Se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los cuales se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), durante toda una noche.

Colocación de los Discos Impregnados

En las placas de Petri con Agar Müeller Hinton previamente inoculados con cada cepa en estudio, se colocaron los discos impregnados con 10 microlitros (μL) a una concentración de 10 000 ppm de los extractos a ensayar, además de los discos de antibióticos comerciales como control positivo con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar y como control negativo discos impregnados con 10 μL del solvente dimetil sulfóxido (DMSO); usando una pinza metálica previamente esterilizada.

Pre-incubación e Incubación de las Placas

Después de haber colocado los discos en las placas con Agar Müeller Hinton previamente inoculadas, estas se dejaron en la nevera a temperatura de 4 °C aproximadamente durante 30 min (pre-incubación), con la finalidad de que los discos impregnados con sus diferentes muestras difundieran a través del Agar, para luego llevar las placas a la estufa durante 24 h a temperatura de 37 °C en posición invertida en atmósfera aeróbica (incubación).

Lectura de las Placas

Luego de ser incubadas cada una de las placas por un lapso de tiempo de 24 horas estas fueron revisadas para realizar la lectura de las mismas con una regla milimétrica. Donde se consideró un resultado positivo o sensible (presencia de actividad antibacteriana) cuando se observó un halo de inhibición alrededor del disco, y se tomó como resultado negativo o resistente

(sin actividad antibacteriana) la ausencia de dicho halo. El diámetro de la zona de inhibición producto de la actividad antibacteriana de las muestras en estudio se expresó en milímetros (mm) (Anon, 2003).

Diseño de Análisis

La investigación cuantitativa requiere el uso de instrumentos de medición y comparación que proporcionan datos cuyo estudio necesita la aplicación de modelos matemáticos y estadísticos. Mientras que el enfoque cualitativo no se basa en mediciones ni expresiones numéricas, sino en características de la unidad de investigación (Palella y Martins, 2012). Esta investigación presentó un enfoque cualitativo y cuantitativo; ya que se determinó la actividad antibacteriana mediante la medición de halos de inhibición, al expresar numéricamente los resultados. Sin embargo, no se utilizaron métodos estadísticos, estos datos obtenidos en las pruebas preliminares fueron recopilados de maneras cualitativas y expresadas a través de tablas, por medio del tamizaje fitoquímico y sus diferentes pruebas.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Las hojas de *Acnistus arborescens* fueron sometidas a un proceso de extracción mediante la técnica de reflujo en caliente con dos solventes orgánicos: hexano y etanol cada uno por separado, obteniéndose dos extractos con su debido peso y rendimiento (Tabla 9).

Tabla 9. Descripción del peso de los extractos y su rendimiento porcentual.

Parte de la planta	Peso	Peso del extracto	Rendimiento del extracto
Hojas	200 g	Hexano: 0,87 g	0,435 %
		Etanol: 0,25 g	0,125 %

Elaborado por Rivas y Obregón, 2023

Análisis fitoquímico preliminar

Los extractos obtenidos del *Acnistus arborescens* fueron sometidos a pruebas químicas preestablecidas para conocer los metabolitos secundarios presentes en los mismos, esto por medio del tamizaje fitoquímico, empleando técnicas simples, rápidas y selectivas, como: viraje de color, precipitados, turbidez del medio, producción de espuma y fluorescencia por exposición a la luz ultravioleta (UV); tal como se puede evidenciar en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos obtenidos de las hojas de *Acnistus arborescens*.

Pruebas químicas	Extracto hexano	Extracto etanol
Alcaloides: Dragendorff Wagner Mayer	 + - -	 + - -
Triterpenos/ esteroides Liebermann - Burchard	 + Verde Esteroides	 + Rojo Triterpenos
Compuestos fenólicos FeCl₃	 ND	 -
Saponinas Espuma	 ND	 -
Taninos Gelatina	 ND	 -
Flavonoides Shinoda NaOH 10%	 - -	 - + (ligero naranja)
Cumarinas NH ₄ OH []	 -	 -
Antraquinonas NH ₄ OH []	 -	 -
Quinonas H ₂ SO ₄ []	 -	 -
Lactonas sesquiterpénicas	 -	 -
Glicósidos cardiotónicos	 -	 -

Leyenda: (-) Negativo, (+) Positivo, (ND) No Determinado

Elaborado por Rivas y Obregón, 2023

Tabla 11. Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de *Acnistus arborescens*.

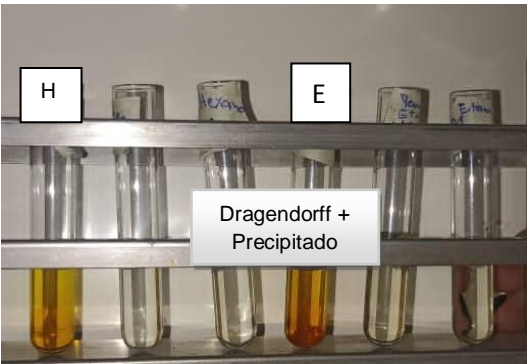
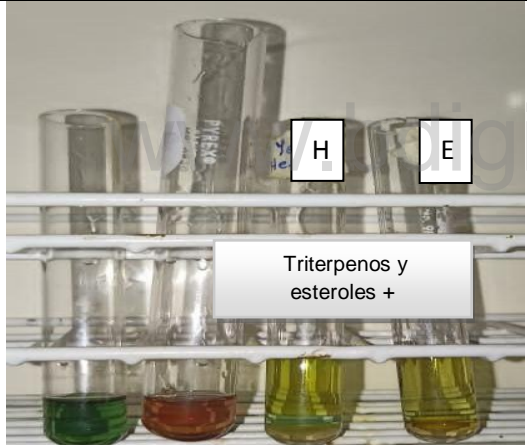
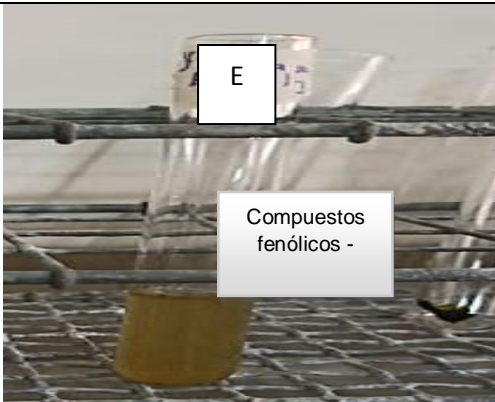
Prueba	Reporte
	<p>Prueba: Reactivos de Dragendorff, Wagner y Mayer.</p> <p>Metabolito determinado: Alcaloides</p> <p>Reporte: Positivo para Dragendorff, formación de precipitados, Wagner y Mayer negativos</p> <p>Tubos: extracto de etanol (E) y hexano (H).</p>
	<p>Prueba: Liebermann – Burchard</p> <p>Metabolito determinado: Triterpenos y esteroides.</p> <p>Reporte: Positivo, viraje de color verde para esteroides en el extracto de hexano y viraje rojo para triterpenos solo en el extracto de etanol.</p> <p>Tubos: extractos de hexano (H) y etanol (E).</p>
	<p>Prueba: Tricloruro férrico (FeCl_3)</p> <p>Metabolito determinado: Compuestos fenólicos.</p> <p>Reporte: Negativo para compuestos fenólicos.</p> <p>Tubo: extracto de etanol (E).</p>

Tabla 11. Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de *Acnistus arborescens* (Continuación)

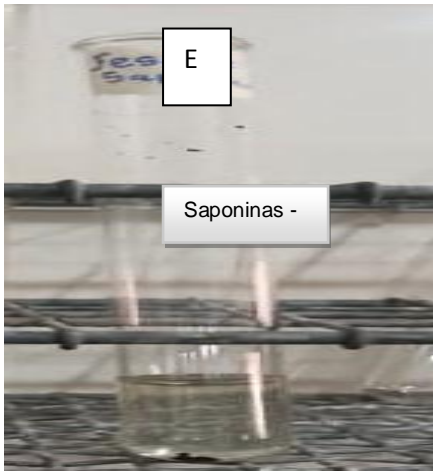
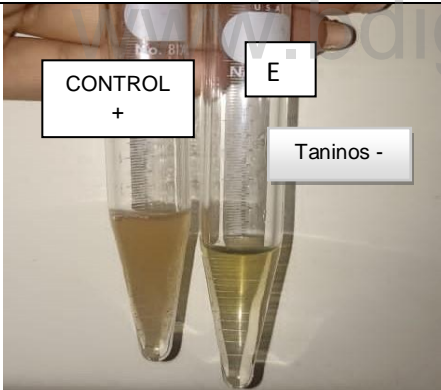
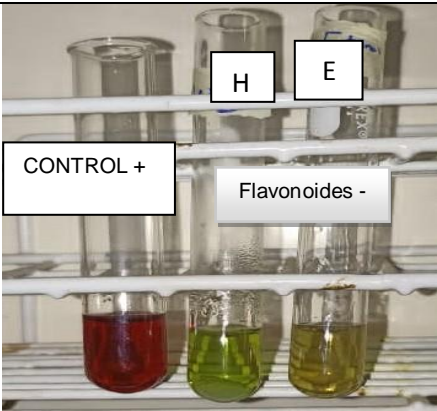
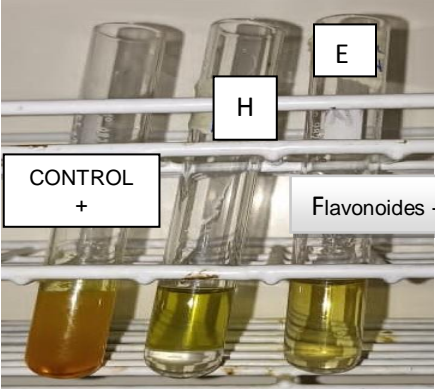
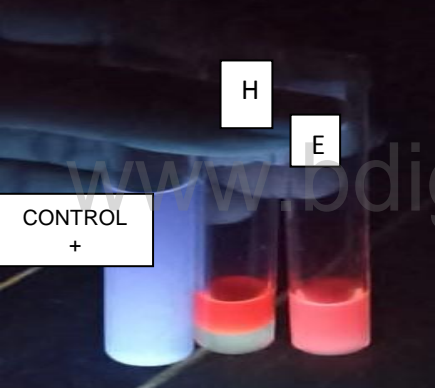
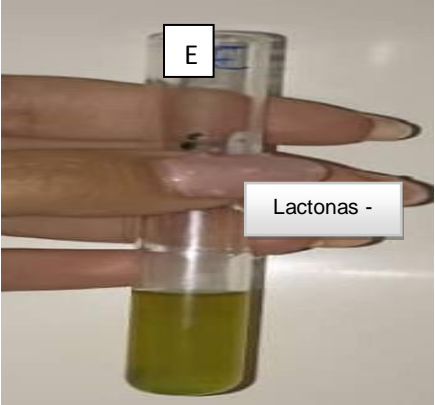
Prueba	Reporte
	<p>Prueba: Espuma</p> <p>Metabolito determinado: Saponinas</p> <p>Reporte: Negativo</p> <p>Tubo: extracto de etanol (E).</p>
	<p>Prueba: Gelatina</p> <p>Metabolito determinado: Taninos</p> <p>Reporte: Negativo</p> <p>Tubo: extracto de etanol (E).</p>
	<p>Prueba: Shinoda</p> <p>Metabolito determinado: Flavonoides</p> <p>Reporte: Negativo</p> <p>Tubos: extractos de etanol (E) y hexano (H).</p>

Tabla 11. Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de *Acnistus arborescens* (Continuación)

Prueba	Reporte
	<p>Prueba: NaOH</p> <p>Metabolito determinado: Flavonoides</p> <p>Reporte: negativo en extracto de hexano y positivo en extracto de etanol, ligero color naranja.</p> <p>Tubos: extractos de etanol (E) y hexano (H).</p>
	<p>Prueba: Fluorescencia UV</p> <p>Metabolito determinado: Cumarinas</p> <p>Reporte: Negativo, no hay presencia de fluorescencia azul.</p> <p>Tubos: extractos de hexano (H) y etanol (E).</p>
	<p>Prueba: Sesquiterpenlactonas</p> <p>Metabolito determinado: Lactonas sesquiterpenicas</p> <p>Reporte: Negativo</p> <p>Tubos: extractos de hexano (H) y etanol (E).</p>

Elaborado por Rivas y Obregón, 2023

Evaluación de la actividad antibacteriana

Se realizó a través del método de difusión en agar con disco (Kirby-Bauer), en el extracto etanólico de las hojas, a una concentración de 10 mg/mL o 10.000 ppm, frente a dos especies grampositivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), y tres especies gramnegativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Los resultados se observan en la tabla 12.

Tabla 12. Resultados obtenidos de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Acnistus arborescens*

Microorganismos	Extracto Etanólico mm	Halos de inhibición (mm)			DMSO C (-)
		Antibióticos de referencia			
		E	AMP	PIP	
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	8	32	-	-	0
<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	8	-	32	-	0
<i>E.coli</i> (ATCC 25922)	ND	-	-	27	0
<i>K.pneumoniae</i> (ATCC 23357)	8	-	-	27	0
<i>P.aeruginosa</i> (ATCC 27853)	7	-	-	27	0

Leyenda: mm: Milímetros. DMSO: dimetil sulfoxido, (C-): Control negativo, ND: no determinado

Elaborado por Rivas y Obregón, 2023

Tabla 13. Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Acnistus arborescens*


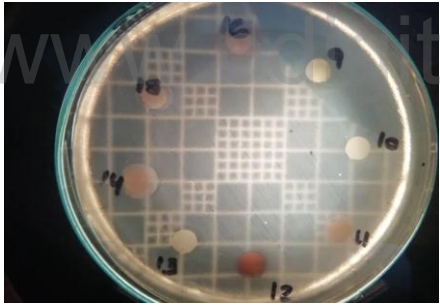
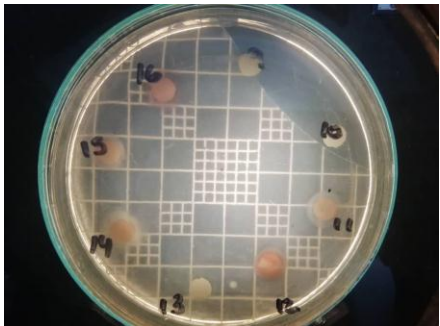
Prueba	Reporte
	<p>Prueba: Kirby- Bauer</p> <p>Especie en estudio: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p> <p>Disco nro. 9</p>
	<p>Prueba: Kirby- Bauer</p> <p>Especie en estudio: <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212</p> <p>Disco nro. 9</p>
	<p>Prueba: Kirby- Bauer</p> <p>Especie en estudio: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p> <p>Disco nro. 9</p>

Tabla 13. Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Acnistus arborescens* (Continuación)

Prueba	Reporte
	<p>Prueba: Kirby- Bauer</p> <p>Especie en estudio: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357</p> <p>Disco nro. 9</p>
	<p>Prueba: Kirby- Bauer</p> <p>Especie en estudio: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.</p> <p>Disco nro. 9</p>

Elaborado por Rivas y Obregón, 2023

Discusiones

En la presente investigación se obtuvieron los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Acnistus arborescens* por medio de la técnica de reflujo en caliente, a los mismos se les realizaron pruebas químicas cualitativas que permitieron la determinación de metabolitos secundarios como: alcaloides en ambos extractos, triterpenos y flavonoides en el de etanol y esteroides, en el de hexano. Así mismo, se demostró que no hubo presencia de compuestos fenólicos, saponinas, taninos, cumarinas, quinonas y antraquinonas, lactonas sesquiterpénicas, ni glicósidos cardiotónicos. Por otra parte, se evaluó la actividad antibacteriana al extracto de etanol; cabe resaltar, que, al comparar los resultados obtenidos con estudios anteriores respecto al tamizaje fitoquímico de la especie recolectada en otros países, se observó una composición química similar.

El estudio realizado por Rondón y cols., 2018 demostró que el extracto etanólico de las hojas de *Acnistus arborescens* tiene mayor contenido de alcaloides y taninos, y esteroides en menor proporción, relacionando esta investigación con la nuestra, pues se identificó la presencia de algunos de estos metabolitos como alcaloides y esteroides, del mismo modo, se evaluó la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en disco contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Vibrio parahaemolyticus*, a una concentración de 200 ppm, sin embargo, resultó inactivo frente a las cepas bacterianas ensayadas.

Por otra parte, el análisis fitoquímico de fracciones aisladas del extracto etanólico total de las hojas de *Acnistus arborescens*, realizado por Morantes y cols., 2006, en Colombia, permitió determinar la presencia de esteroides y triterpenos en todas las fracciones, withanólidos en la fracción en diclorometano, ésteres y ácidos grasos en la fracción hexánica y flavonoides en la fracción butanólica, estos últimos no descritos antes para esta especie.

Por tal motivo, guarda relación con la investigación presente, pues se identificaron triterpenos, esteroides y flavonoides.

Por su parte, Gracia, Correa y Rojas, 1995 en un estudio fitoquímico preliminar, demostraron la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, esteroides y triterpenos en extractos etanólicos de las hojas, flores y tallos de *Acnistus arborescens*. Así mismo, en este estudio se evaluó la actividad antibacteriana, mediante el método de dilución en agar, empleando como medio Agar Peptona Caseína. Se consideraron activas si inhibieron totalmente el crecimiento o si hubo reducción notable del crecimiento, mostrando la especie en estudio buena actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterococcus faecalis* y *Shigella sonnei*. Por lo cual coincide con la investigación presente, ya que se identificaron alcaloides, flavonoides, triterpenos y esteroides. Además, la actividad antibacteriana concuerda con el resultado de esta investigación, ya que el extracto etanólico demostró tener efecto inhibitorio frente a *S. aureus* y *E. faecalis*.

Se debe tomar en cuenta, que aun cuando no se cuenta con suficientes trabajos sobre la actividad antibacteriana y composición química de la especie en estudio, cabe mencionar que la familia Solanaceae, exhibe un amplio espectro de entidades químicas con diferentes actividades biológicas, importantes desde el punto de vista, económico, agrícola y farmacéutico, tal es el caso del género *Solanum* uno de los más grandes de esta familia; este género presenta gran riqueza y diversidad de propiedades farmacológicas, como actividad citotóxica, anticancerígena, antiinflamatoria, antimicrobiana y antioxidante. Es por ello, que Soto, 2014, en un estudio realizado sobre la actividad antinociceptiva y antibacteriana de los alcaloides de las hojas de dos especies del género *Solanum* (*Solanum multifidum* Lam., y *Lycianthes lycioides* (L.) Hass); empleó la técnica de difusión en agar con discos impregnados, basada en el método de Kirby- Bauer para la determinación de la actividad antibacteriana, a concentraciones de 2 mg/mL y 4 mg/mL; se

demostró la presencia de alcaloides en ambos, presentando actividad antinociceptiva y antibacteriana, frente a las tres cepas ensayadas *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa*.

En otro estudio realizado por García y cols., 2020, sobre el extracto etanólico de las partes aéreas de *Solanum radicans* L. F, se identificó la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, grupos fenólicos, alcaloides, catequinas, triterpenos y esteroides, así mismo, dicha especie demostró actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* mostrando un halo de inhibición de 15 mm y *Pseudomonas aeruginosa*, de 12 mm mediante el método de difusión en agar, concluyendo que existe una fuerte correlación entre la presencia de metabolitos secundarios y la actividad antibacteriana.

Por otra parte, Valderrama y Galeano, 2020, realizaron un estudio sobre actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos metanólicos de hojas de plantas del género *Solanum*, utilizando el método de difusión en agar, a una concentración de 20 mg/mL; donde quedó demostrado, el contenido de alcaloides y flavonoides totales presentes, siendo los extractos de *Solanum mammosum* y *Solanum barbeyanum* los que mostraron actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, con halos de inhibición de 2 mm, concluyendo que el extracto de *S. mammosum* es una fuente principal de compuestos bioactivos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- ❖ En los extractos de hexano y etanol, obtenidos de las hojas de *Acnistus arborescens*, se identificaron mediante el tamizaje fitoquímico, metabolitos secundarios como alcaloides, en ambos extractos, triterpenos y flavonoides en el de etanol y esteroides en el de hexano.
- ❖ En ambos extractos, se demostró la ausencia de cumarinas, quinonas, antraquinonas y lactonas sesquiterpénicas.
- ❖ El extracto etanólico presentó actividad antibacteriana contra las cepas en estudio, *Staphylococcus aureus* (8 mm) *Enterococcus faecalis* (8 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (7 mm) y *Klebsiella pneumoniae* (8 mm) a una concentración de 10 mg/mL.
- ❖ El extracto etanólico de las hojas de *Acnistus arborescens* fue indeterminado contra *Escherichia coli*, pues la bacteria no mostró crecimiento.

Recomendaciones

- ❖ Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de *Acnistus arborescens* frente a otras cepas patógenas
- ❖ Realizar estudios antimicrobianos frente a otros microorganismos como hongos y parásitos.
- ❖ Analizar otras partes de la planta, para conocer si presentan alguna otra actividad biológica.

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Albornoz, A. (1980). *Productos naturales: estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Caracas: Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela.
- Alonso, A. y Maldonado, J. (2012). Medical Plants used in the Huasteca Potosina, México. *Journal of Ethnopharmacology*. 143: 292-298.
- Anaya, J., López, J., Baizabal, V., Cano, H. y Ochoa, A. (2006). Fungicidal and cytotoxic activity of a *Capsicum chinense* defensin expressed by endothelial cells. *Biotechnol Lett*. 28: 1101- 1108
- Anon, A. (2003). Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9, (1).
- Ardila, D. (2014). *Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos etanólicos de las plantas Annona muricata, Annona cherimola y Physalis peruviana en la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de seno*. (Tesis de maestría). Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Bogotá.
- Aristeguieta, L. (1973). *Familias y géneros de los árboles de Venezuela*. Caracas, Venezuela: Edición Especial del Instituto Botánico.
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología*. 2 (3), 119-145.
- Azuero, A., Jaramillo, C., San Martín, D. y D'Armas, H. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. *Revista Ciencia UNEMI*, 9, (20) 11 - 18
- Barrios, A. (1988). *Bacteriología y Virología Básica*, Venezuela: Editorial Venezolana C.A.

- Benítez, C. (1974). Los géneros de las *Solanáceas* de Venezuela. *Revista de la facultad de agronomía*, 7 (3): 25-108.
- Bermúdez, A., Oliveira, M., y Velázquez, D. (2005). La Investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *INCI*, 30 (8), 453-459.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S. A.
- Cano, W. y Saucedo, M. (2023). Actividad antibacteriana de diferentes concentraciones del extracto metanólico de hojas de “pájaro bobo” *Tessaria integrifolia* y “chamico” *Datura stramonium* de interés acuícola (tesis de maestría). Universidad Nacional del Santa Facultad Ciencias, Nuevo Chimbote – Perú.
- Canales, M. (2005). Informant consensus factor and antibacterial activity of the medicinal plants used by the people of San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 429-439
- Carvajal, L., Hata Y., Sierra, N. y Rueda D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana Krukoff*). *Colombia forestal*, 12(1), 161-170
- Carrión, A. y García, C. (2010). *Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica*. (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Químicas Escuela de bioquímica y farmacia. Cuenca- Ecuador.
- Centurión, D., Espinosa, J., Mayo A., Frías A. y Velázquez J. (2013). Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos hexánicos

de las inflorescencias de palmas comestibles de la Sierra de Tabasco, México. *Polibotánica*, (35), 133-142.

Coy, C., Parra, J. y Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (Rutaceae). *Revista elementos*. 4 (1) 31-39

Cordiés, J., Machado, A. y Hamilton, L. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica*, 8 (1):13-27.

Choi, J., Murillo, G., Su, B., Pezzuto, J., Kinghorn, A., y Mehta, R. (2006). Ixocarpalactone A isolated from the Mexican tomatillo shows potent antiproliferative and apoptotic activity in colon cancer cells. *FEBS J*. 273(24): 5714- 23

Cuevas, L. (2018). Taxonomía de la familia Solanaceae en el municipio de Coacoatzintla, Veracruz, México. (Tesis de maestría). Universidad Veracruzana, Veracruz, México.

D'arcy, W. (1976). The classification of the *Solanaceae*. In Hawkes j, (ed). The biology and taxonomy of the *Solanaceae*. Linnean society symposium serie N° 7. New York: academic press. 3-47

Delporte, C. (2010). *Farmacognosia, Trabajos prácticos*. Departamento de farmacología y toxicología. Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas. Universidad de Chile, 31.

Domínguez, X. (1979). *Métodos de investigación fitoquímica*. México. Editorial Limusa.

- Dupin, J., Marzke, N., Särkinen, T., Knapp, S., Olmstead, R., Bohs, L. y Smith, S. (2017). Bayesian estimation of the global biogeographical history of the Solanaceae. *Journal of biogeography* 44:887-889.
- Eckart, E. (2008). Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary metabolites. Springer-Verlag, Berlín
- Escudero, M. (1999). *Las plantas de extractos bases para un plan de desarrollo del sector*. España. Edición Mundi Prensa.
- Fernández, C. (2009). *Plantas comestibles de Centroamérica*. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica: Editorial INBio.
- Fernández, I., Bellet, M., y García, E. (2012). *Para que sirven las plantas*. Madrid. Edición Real Jardín Botánico. pp. (4-9).
- Font, P. (1962). *Plantas Medicinales*. Barcelona, España: Labor. S.A.
- Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de la Facultad de Medicina*, 77 (4), 327-332.
- García, J., Laos, D., Vega, N., Bendezú, M., Yarasca, P., Guillermo, J., y Surco, F. (2020). Actividad antioxidante y antimicrobiana del extracto etanólico de las partes aéreas de *Solanum radicans* L.F. "huallpachaqui". *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 86 (1), 5-12.
- García, D. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Revista: Pastos y forrajes*. 27 (1) 3-4
- Garzón, H. (2004). *Master educativo*. Colombia. Grupo Editorial Edicol Ltda.
- Grasourdy, R. (1864). *El Médico Botánico Criollo*. París: Braquet.

- Gracia, C., Correa, E. y Rojas, N. (1995). Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antimicrobiana de algunas plantas superiores colombianas. *Revista colombiana de ciencias químico-farmacéuticas*. 23 (1) 42-48
- Hartwell, J. (1971). Plants Used Against Cancer. *Lloydia*, 34: 204-255
- Hernández, L. y Rodríguez, M. (2001). Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 6 (2), 44-47.
- Hernández, T. (2003). Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology*. 88: 181 188
- Herrera, A. y Jiménez, E. (2009). Exploratory study on the clinical and mycological effectiveness of a herbal medicinal product from *Solanum chrysotrichum* in patients with *Candida* yeast associated vaginal infection. *Planta Med*. 75(5): 466-71.
- Hunziker, A. (1976). South American Solanaceae: a Sinoptic Survey. In: Hawkes, J. (ed): the biology and Taxonomy of the Solanaceae. Linnean Society Symposium serie Nº 7. New York: Academic Press. pp. 49-85
- Hurtado, J. (2015). *El proyecto de investigación*. Comprensión holística de la metodología y la investigación. Caracas Venezuela. Ediciones Quirón.
- Izco, J., Barreno, E., Brugués, M., Costa, M., Devesa, J., Fernández, F., Gallardo, T., Llimona, X., Prada, C., Talavera, S. y Valdéz, B. (2004). *Botánica*. Madrid, España: McGraw- Hill Interamericana.

- Kagale, S., Marimuthu, T., Thayumanavan, B., Nandakuman, R. y Samiyappan, R. (2004). Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65 (2):91-100.
- Kupchan, S., Andreson, W., Bollinger, P., Doskotch, R., Smith, R., Renauld, J., Schnoes, H., Burlingame, A. y Smith, D. (1969). Tumor inhibitors. XXXIX. Active principles of *Acnistus arborecens*. Isolation and Structural and Spectral Studies of Whithacnistin. *The Journal of Organic Chemistry*. 34 (12), 3858- 3866.
- Long, J. (2001). Una semblanza de las Solanaceae. *Etnobiología* 1:18-24.
- López, M. y Segura, C. (2008). Nuevas vías de permeabilidad y regulación del pH intracelular como posible blanco terapéutico en *Plasmodium falciparum*. *Acta biológica. Colombiana*. 3: 3-22.
- Luis, J., Echeverri, F., García, F. y Rojas, M. (1994). The Structure of Acnistin B and the Immunosuppressive Effects of Acnistins A, B, and E. *Planta Medica*, 60:348-350
- MacFaddin, J. (2004). *Pruebas bioquímicas para la identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Buenos Aires, Bogotá, Caracas, Madrid, México, Sao Paulo. Editorial Médica Panamericana.
- Marcano, D y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Segunda edición, Editorial Universidad Central de Venezuela consejo de desarrollo científico y humanístico.
- Martínez, M., Montero, J., Dean, E., Bye, R., Cavazos, M., Medina, J. y Rzedowski, J. (2020). Flora del Bajío y de regiones adyacentes

Familia Solanaceae | Géneros *Acnistus-Witheringia*. Pátzcuaro, Michoacán, México: Instituto de Ecología A.C.

Martínez, B., Hung, B., Hernández, E. y Audivert, Y. (2006). Caracterización físico-química del extracto acuoso de *Zuelania sp.* *Revista Cubana de Química*. 18 (1), 258-268

Minguzzi, S., Barata, L., Shin, Y., Jonas, P., Chai, H., Park, E., Pezzuto, J., Cordell, G. (2002). Cytotoxic withanolides from *Acnistus arborescens*. *Phytochemistry*, New York, 59 (6), 635-641

Miranda, M., Magalhaes, L., Tiossis, R., Kuehn, C., Rodríguez, V., McChesney, J. y Bastos, J. (2012). Evaluation of the schistosomicidal activity of the steroidal alkaloids from *Solanum lycocarpum* fruits. *Parasitology research*. 1: 257-62.

Misico, R., Nicotra, V., Oberti, J., Barboza, G., Gil, R. y Burton, G. (2011). Withanolides and related steroids. Chapter: progress in the chemistry of organic natural products. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe*, Vienna, 94 (1), 127-229

Mongue, J. y Loria, M. (2023). Guía ilustrativa del güitite (*Acnistus arborescens*). doi: 10.13140/RG.2.2.35372.13444

Morantes, S., Páez, A., Cordero, C., Rincón, J. y Aristizábal, F. (2006). Actividad citotóxica y análisis fitoquímico de fracciones aisladas del extracto etanólico total de *Acnistus arborescens*. *Revista: Acta farmacéutica Bonaerense* 25 (4): 491-6.

Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2009). *Microbiología Médica*. Sexta edición. España. Elsevier.

Novara, L., Barboza, G., Bernardello, G., Cocucci, A. y Matesevach, M. (2012). Solanaceae A .L .Juss. *Aportes botánicos de salta - ser. Flora*, 10 (3), 327-506

Organización Mundial de la Salud. (2021). Resistencia a los antimicrobianos. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Orantes, E. (2008). *Tamizaje fitoquímico de la especie vegetal gautemalteca Quararibea yunckeri Standley Subsp. Izabalensis W.S.Alverson ex Veliz* (Bombacaceae). (Tesis de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala.

Palella, S. y Martins, F. (2012). La metodología o el marco metodológico. Caracas: FEDUPEL.

Pascual, M. y Calderón, V. (2000). *Microbiología Alimentaria*. España. Ediciones Díaz de Santos S.A.

Pascual, D., Pérez, Y., Morales, I., Castellanos, I., y González, E. (2014). Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. *MEDISAN*, 18 (10), 1467-1474.

Patel, K. y Singh, R. (2013). Importancia medicinal, actividades farmacológicas y aspectos analíticos de la solasodina: un informe conciso de la literatura científica actual. *Revista de enfermedad aguda*, 2 (2): 92-98

Pérez, H. y Robles A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*, 4 (3), 186-191

- Pérez, A. (2009). *Marco metodológico para diseños de campo y proyecto factible*. Caracas Venezuela: FEDUPEL
- Prescott, L., Harley, J. y Klein, D. (2004). *Microbiología*. España. MC Graw-Hill.
- Philogene, B., Regnault, C. y Vincent, C. (2004). Productos fitosanitarios insecticidas de origen vegetal: promesas de ayer y de hoy. En: *Biopesticidas de Origen Vegetal*. Ediciones Mundi Prensa, Madrid.
- Poffo, F., Siebert, D., Tenfen, A., Mendes, M., Alberton, M. y Guedes, A. (2020). Evaluación de la actividad antibacteriana de plantas medicinales de uso popular: *Alternanthera brasiliana* (Alternantera), *Plantago major* (Llantén), *Arctostaphylos uva-ursi* (Uva-ursi) y *Phyllanthus niruri* (Chancapiedra). *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 11, e202000127.
- Prieto, S., Garrido, G., González, J., y Molina, J. (2004). Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 35 (1) ,19-36.
- Ramírez, L. y Díaz, H. (2007). Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del Ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). *Scientia et technica*, 13 (33), 397-400
- Ramírez, A., Isaza, G., y Pérez, J. (2013). Especies vegetales investigadas por sus propiedades antimicrobianas, inmunomoduladoras e hipoglicemiantes en el departamento de Caldas (Colombia, Sudamérica). *Biosalud*, 12 (1), 59–82.
- Ramírez, P., Guzmán, J., Espinosa, J. y Murillo, S. (2001). Antimutagenic effect of one variety of green pepper (*Capsicum* spp.) and its possible interference with the nitrosation process. *Mutat. Res.* 496(1-2): 39-45.

- Ramos, A. (2016). Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de “*Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst” de la zona de Yucay (Cusco). (Tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú.
- Ringuelet, J. y Viña, S. (2013). *Productos Naturales Vegetales*. Buenos Aires, Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de la Plata.
- Romero, R. (2007). Microbiología y parasitología humana (3a. Ed) Caracas. Venezuela: Medica Panamericana.
- Rondón, M., Moncayo, S., Cornejo, X., Santos, J., Villalta, D., Siguencia, R. y Duche, J. (2018). Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. *Journal of King Saud University – Science*, 30 (4) 500-505
- Rosas, Y. (2012). Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *Journal of Ethnopharmacology*. 141: 860- 865
- Roumy, V., Biabiany, M., Hennebelle, T., Aliouat, E., Pottier, M., Joseph, H., Joha, S., Quesnel, B., Alkhatib, R., Sahpaz, S. y Bailleul, F. (2010). Antifungal and cytotoxic activity of withanolides from *Acnistus arborescens*. *Journal of Natural Products, Cincinnati*, 73 (7), 1313-1317
- Singleton, P. (2004). *Bacterias en biología, biotecnología y medicina*. Zaragoza (España). Editorial Acribia, S.A.

- Schnee, L., Leal, F. y Benítez, C. (2010). *El manual de plantas comunes de Venezuela*. Maracay Venezuela: Ediciones de la Facultad de Agronomía.
- Sierra, J., Siqueiros, M., Flores, E., Moreno, O. y Arrendo, J. (2015). Riqueza y distribución de la familia Solanaceae en el estado de Aguascalientes, México. *Botanical Sciences*, 93 (1): 97-117.
- Star, M., González, S. y Morales, C. (2016). Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España 1-40.
- Stella, L. y Marín, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*. 15 (42) 263-264.
- Stevens, W., Ulloa, C., Pool, A. y Montiel, O. (2001). *Flora de Nicaragua* Missouri Botanical Garden Press.
- Soto, R. (2014). Actividad antinociceptiva y antibacteriana de los alcaloides totales de dos especies de la familia Solanaceae. *Revista cubana de plantas medicinales*. 19 (1), 361-373
- Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Buenos Aires, Bogotá, Caracas, Madrid, México, Porto Alegre. Medica Panamericana.
- Torres, J., León, J., y Tomas, G. (2017). Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayán” frente a patógenos de origen clínico. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 37 (1), 10-16.

- Usano, J., Palá, J., y Díaz, S. (2014). Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *Reduca Biología*. 7 (2), 60-70.
- Usubillaga, A., De Castellano, G., Khouri, N., Zabel, V. y Watson, W. (1980). Acnistins, a New Class of Steroid Lactones from *Acnistus ramiflorum* Miers, X-Ray Structure of Acnistin E. J Chem Soc, Chem Commun: 854
- Vázquez, E. (2015). *Actividades biológicas de extractos de plantas y de sus combinaciones*. (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid Facultad de Ciencias. Madrid.
- Valderrama J. y Galeano P. (2020). Actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos metanólicos de hojas de plantas del genero Solanum. *Información tecnológica*, 31 (5),
- Vílchez, H., Olortegui, A., y Alvia, C. (2023). Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Solanum sessiliflorum* Dunal (cocona) sobre Streptococcus mutans. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 52 (1), e02302340.
- Wang, Q., Chen, Q., He, M., Mir, P., Su, J., y Yang, Q. (2011). Inhibitory effect of antioxidant extracts from various potatoes on the proliferation of human colon and liver cancer cells. *Nutr. Cancer*. 63(7): 1044-52.