



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
“DR. ALFREDO NICOLÁS USUBILLAGA DEL HIERRO”



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE  
*Thevetia peruviana* EN CEPAS GRAMPOSITIVAS Y GRAMNEGATIVAS**

(Trabajo presentado como requisito para optar al grado de licenciados en

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

**Autores:**

Fuentes Cáceres, Yaneth Teresa

Sulbarán Flores, Reinaldo José

**Tutor:**

Prof. Yndra Cordero de Rojas

Mérida, Julio de 2019

## DEDICATORIA

A Dios, la Virgen de la Consolación y el Divino Niño por darme la fortaleza, sabiduría y entendimiento necesario, para poder llegar hasta aquí y alcanzar la meta anhelada, porque en los instantes que más necesité nunca me desampararon. Gracias Dios Gracias!

A mis padres Edilia y Argilio, no tengo palabras para agradecerles todo lo que han hecho por mí, porque mis éxitos y logros también les pertenecen sin ustedes nada de esto hubiese sido posible, hoy puedo decir tanto sacrificio, trabajo y esfuerzo ha valido, gracias por ser mi apoyo incondicional y estar conmigo en todo momento. Los amo!

A mi novio Jesús, infinitas gracias por la espera, ayudarme, apoyarme, por ser mi compañía en este camino, por creer siempre en mí y en mis capacidades, por las risas en los momentos más difíciles, por seguir siempre junto a mí en las buenas y en las malas. Te amo!

A mis tíos pero en especial a mi tía Mery, por apoyarme siempre, por nunca dejarme sola a pesar de la distancia, porque cada momento que necesité siempre estuvo pendiente, por sus consejos, cada palabra de aliento recibido, y por nunca dudar, creer y confiar en mí, infinitas gracias.

A mis amigas Andrea, Karelis, Dilia y Vanessa, gracias por siempre estar, por la amistad incondicional, las alegrías y tristezas vividas juntas en este recorrido siempre enfocadas en un mismo logro, las quiero.

A mi compañero de tesis y amigo del alma Reinaldo, gracias por su paciencia, por entenderme y por el apoyo en todo momento, sé que no fue fácil, pero lo logramos. Gracias por todo Nano.

**Yaneth**

## DEDICATORIA

A Dios y la Virgen María, brindarme salud, sabiduría, entendimiento, fortaleza y paciencia, y ser los guías para culminar con entusiasmo este trabajo de investigación y concretar esta meta.

A mis padres Reinaldo y Sonia, por apoyarme siempre y creer en mí en cada paso que doy. Gracias por la motivación que me ofrecieron y la labor incansable que realizaron para el cumplimiento de mis metas. Los amo con el corazón mis viejos.

A mis hermanos Verónica y Leonardo, por acompañarme en este camino y no dejarme nunca sólo, brindarme su apoyo para descansar y por mantenerme enfocado en mí meta.

A mis primitos Leonela, Leonel y Leandro, por llenar mis días de alegría y siempre regalarme una sonrisa. Por ver en mí un ejemplo para sus vidas.

A mi hermanazo y amigo Daniel, por brindarme la confianza, su apoyo incondicional y regalarme consejos oportunos en todo momento, por confiar siempre en mí.

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

A mi segunda familia Yuraima y Carlos Iván, por siempre estar pendiente de la evolución de mi formación y por apoyarme en esta etapa.

A mi compañera de tesis y amiga incondicional Yaneth, por el apoyo intachable, por tenerme paciencia en este largo camino de formación académica. Gracias por la amistad Tere.

***Reinaldo José***

## AGRADECIMIENTOS

A la Ilustre Universidad de Los Andes y a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por acogernos en su espacio e impartir en nosotros valores humanos, académicos y profesionales de sus excelentes profesores para nuestra formación durante este largo y provechoso camino. Orgullosos de pertenecer a tan prestigiosa casa de estudios.

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

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

Al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” por su valioso servicio y compromiso promovido en pro del desarrollo de la Facultad y profesionalización de profesores y estudiantes, acompañado de excelentes investigadores; en especial al Prof. Luis Beltrán Rojas y todo su equipo de trabajo, la Dra. Rosa Aparicio y el Sr. Emilio Salazar por su desempeño y colaboración en nuestro trabajo.

A la Lcda. María Eugenia Nieves por facilitarnos las cepas necesarias para la aplicación y reproducción de resultados de nuestra investigación; así como también al Laboratorio de Actinomicetos y Patógenos del Suelo.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I. EL PROBLEMA	4
Planteamiento del Problema	4
Justificación de la Investigación	6
Objetivos de la Investigación	7
<i>Objetivo General</i>	7
<i>Objetivos Específicos</i>	7
Alcances y Limitaciones de la Investigación	7
<i>Alcances de la Investigación</i>	7
<i>Limitaciones de la Investigación</i>	8
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	9
Trabajos Previos	9
Antecedentes Históricos	11
Bases Teóricas	12
<i>Extractos Vegetales</i>	12
<i>Componentes de los Extractos Vegetales</i>	13
<i>Obtención de Extractos Vegetales</i>	19
<i>Las Bacterias</i>	21
<i>Actividad Antibacteriana</i>	24
<i>Resistencia Bacteriana</i>	27
<i>Los Antibióticos</i>	28
<i>Características de la Familia Apocynaceae</i>	31
<i>Género Thevetia</i>	32
<i>Thevetia peruviana</i>	33
Definición de Términos	36

Operacionalización de la Variables	37
Hipótesis	39
<b>CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO</b>	40
Tipo de Investigación	40
Diseño de Investigación	40
Población y Muestra	40
Instrumento de Recolección de Datos	41
Procedimiento o Metodología	41
<i>Recolección de la planta y preparación</i>	41
<i>Obtención del extracto</i>	41
<i>Tamizaje Fitoquímico</i>	43
<i>Determinación de la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar (Kirby – Bauer) en pozo modificado</i>	49
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	53
Resultados	53
Discusión	58
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	62
Conclusiones	62
Recomendaciones	63
<b>REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS</b>	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura química de la isoquinolina	14
<b>Figura 2.</b> Estructura química de la digitonina	15
<b>Figura 3.</b> Estructura química del ácido oleanólico	16
<b>Figura 4.</b> Estructura química de la galactoquina	16
<b>Figura 5.</b> Estructura química de un fenol	17
<b>Figura 6.</b> Estructura química de un germacranólido	17
<b>Figura 7.</b> Estructura química del peruvósido	18
<b>Figura 8.</b> Estructura química de una <i>p</i> -benzoquinona	18
<b>Figura 9.</b> Estructura química de una cumarina	19
<b>Figura 10.</b> Flores, hojas, tallo y fruto de <i>Thevetia peruviana</i>	34
<b>Figura 11.</b> Estructura química de glucósidos aislados en <i>Thevetia peruviana</i>	35
<b>Figura 12.</b> Pesado del material previamente molido	42
<b>Figura 13.</b> Filtrado obtenido de la maceración de las hojas de <i>Thevetia peruviana</i>	43
<b>Figura 14.</b> Concentración de los extractos en el rotavapor	43
<b>Figura 15.</b> Prueba antibacteriana resistente frente a los extractos de <i>Thevetia peruviana</i>	52

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Operacionalización de la variable dependiente	37
<b>Tabla 2.</b> Operacionalización de la variable independiente	38
<b>Tabla 3.</b> Reporte de resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de <i>Thevetia peruviana</i>	54
<b>Tabla 4.</b> Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos de <i>Thevetia peruviana</i>	55
<b>Tabla 5.</b> Evaluación de la actividad antibacteriana	58

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

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

	<b>Pág.</b>
<b>Esquema 1.</b> Procedimiento empleado para la identificación de los componentes de <i>Thevetia peruviana</i>	45
<b>Esquema 1.1.</b> pruebas químicas cualitativas para la determinación de los metabolitos secundarios de los extractos de <i>Thevetia peruviana</i>	46
<b>Esquema 2.</b> Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de <i>Thevetia peruviana</i> por el método de difusión de agar (Kirby – Bauer) en pozo modificado	50

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



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
LICENCIATURA EN BIOANÁLISIS  
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: PRODUCTOS NATURALES



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS DE  
*Thevetia peruviana* EN CEPAS GRAMPOSITIVAS Y GRAMNEGATIVAS**

Trabajo de Grado

**Autores:**

Fuentes Cáceres, Yaneth Teresa

C.I. V-25.211.672

Sulbarán Flores, Reinaldo José

C.I: V-24.584.855

**Tutor:** Prof. Yndra Cordero de Rojas

**RESUMEN**

La aplicación de compuestos naturales para el control de microorganismos ha aumentado de manera exponencial, entre esos compuestos tenemos los metabolitos secundarios obtenidos del estudio de extractos vegetales. El objetivo de esta investigación fue confirmar la relación existente entre la composición química de los extractos obtenidos de las hojas de *Thevetia peruviana*, perteneciente a la familia Apocynaceae, que crece en Lagunillas, Estado Mérida y la actividad antibacteriana frente a diversas cepas bacterianas Grampositivas y Gramnegativas ATCC. Los extractos fueron adquiridos mediante la maceración de las hojas con disolventes orgánicos como etanol y hexano, posteriormente su composición química fue analizada cualitativamente por medio del tamizaje fitoquímico, logrando la identificación de compuestos como alcaloides, triterpenos, esteroides, fenoles, glucósidos cardiotónicos y sesquiterpenlactonas. El ensayo de la actividad antibacteriana permitió conocer que los extractos de las hojas de *Thevetia peruviana* no fueron activos frente a las cepas ensayadas, evaluado con el método de difusión de agar (Kirby - Bauer) en pozo modificado. Se estableció que la ubicación geográfica y las condiciones climáticas donde fue recolectada la planta, influyeron en la concentración en la que se encuentran los metabolitos secundarios y por ende intervino de forma negativa en la actividad antibacteriana de los extractos.

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

## INTRODUCCIÓN

Una planta medicinal es cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos puedan servir de precursores para síntesis de nuevos fármacos (OMS, 2009).

El estudio y uso de plantas medicinales se ha dado desde tiempos prehistóricos hasta los tiempos actuales, debido al alto potencial biológico curativo que poseen para el tratamiento de diferentes afecciones; el hombre por ensayo y error ha utilizado los elementos que la naturaleza le brinda para curar sus enfermedades y las de sus animales, este conocimiento se ha transmitido de generación en generación y ha ido perfeccionándose con la experiencia (Hoogesteger, 1994).

A este respecto, la medicina ha utilizado una gran variedad de plantas medicinales para desarrollar medicamentos altamente efectivos contra diversas enfermedades, los cuales hubieran sido difíciles de encontrar sin los conocimientos que ofrece la medicina tradicional; todo esto con la ayuda de técnicas y procedimientos como lo es la caracterización fitoquímica de los compuestos vegetales (Albornoz, 1980).

Dentro de los compuestos producidos por las plantas con mayor relevancia médica por sus múltiples funciones (antibacteriana, antifúngica, antiviral, entre otras) se encuentran los extractos, los cuales son un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes como agua, etanol o éter, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (Ruíz y Susunaga, 2000).

Es por ello, que la fitoquímica se encarga de estudiar esos extractos, o aceites esenciales para determinar compuestos aislados, tales como: fenoles, alcaloides, flavonoides, quinonas, antraquinonas, saponinas, glucósidos cardiotónicos, esteroides y terpenos, entre otros; para

posteriormente mediante ensayos colocar a prueba las funciones que estos pudieran tener, como la actividad antibacteriana; ya que, en las últimas décadas se ha observado un incremento de mecanismos de resistencia por parte de las bacterias ante los diferentes agentes antibacterianos disponibles.

Dentro de esta perspectiva se deduce que la importancia de los productos naturales en medicina, se basa no solamente en los efectos farmacológicos o quimioterapéuticos que los extractos y aceites vegetales pudieran poseer, sino también en la posibilidad que representan para el desarrollo de nuevas drogas y la cura de diversas enfermedades (Roger, 2006). Cabe considerar que, gran variedad de especies que pertenecen a la familia Apocynaceae están formadas por extractos y aceites esenciales que presentan relevantes propiedades farmacológicas, por ello, en esta investigación se estudió la especie *Thevetia peruviana*; la cual es un arbusto originario de Sur América y prolifera en las regiones tropicales del mundo, es de crecimiento rápido, florece durante todo el año, produciendo frutos con semillas de tamaño apreciable; además de resistir condiciones ambientales adversas (García, 1975).

Se ha verificado que en esta planta se encuentran principios activos que podrían funcionar como alternativas terapéuticas futuras para el tratamiento de infecciones ocasionadas por bacterias resistentes. De allí la necesidad de determinar la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de *Thevetia peruviana* contra cepas Grampositivas y Gramnegativas, en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y el Laboratorio de Investigaciones en Bioquímica General de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde febrero de 2017 hasta junio de 2019. Mediante el empleo de diversas técnicas analíticas como: el tamizaje fitoquímico y el método de difusión en agar (Kirby – Bauer) en pozo modificado.

El siguiente trabajo de investigación ha sido estructurado en V capítulos. El Capítulo I, denominado El Problema, contiene los siguientes elementos: Planteamiento del Problema, Justificación, Objetivos, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II, llamado Marco Teórico abarca: Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Operacionalización del evento de estudio e Hipótesis. El Capítulo III, titulado Marco Metodológico comprende los siguientes puntos: Tipo y Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Instrumento de Recolección de Datos y Procedimientos de la Investigación. El Capítulo IV, denominado Resultados y Discusión. El Capítulo V, llamado Conclusiones y Recomendaciones.

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

## **CAPÍTULO I**

### **EL PROBLEMA**

#### **Planteamiento del Problema**

Casi 200 especies de bacterias son patógenas para el ser humano, es decir, causantes de enfermedades. El efecto patógeno varía mucho en función de las especies y depende tanto de la virulencia de la especie en particular como de las condiciones del organismo huésped (Debbia, Roveta, Schito, Gualco y Marchese, 2001).

En el último siglo, el tratamiento de las infecciones bacterianas ha cambiado radicalmente gracias a los antibióticos. Infortunadamente, el uso inapropiado de este importante recurso para la medicina moderna ha provocado la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, siendo este un problema de salud pública (OMS, 2014).

En esta perspectiva, el uso irracional de los antibióticos y la falta de conocimiento de los mecanismos de resistencia de las bacterias han llevado a una disminución acentuada de las opciones terapéuticas en los hospitales y en la comunidad. Debido a la falta de nuevos antibióticos capaces de vencer estos mecanismos de resistencia, el desarrollo de campañas educativas y protocolos encaminados a orientar el adecuado uso de antibióticos, es muy importante para preservar los pocos antibióticos con los que se cuentan (Tafur, Torres y Villegas, 2008).

De este modo, la resistencia a antimicrobianos puede presentarse mediante diversos mecanismos. Entre los cuales pueden ser intrínsecos o adaptativos. Los intrínsecos pueden capacitar a la bacteria para que produzca enzimas que destruyan al fármaco antibacteriano, expresar sistemas efflux de excreción que eviten que el fármaco alcance su blanco intracelular, modificar el sitio blanco del antimicrobiano o generar una vía metabólica alterna que evite la acción del fármaco. Entre los mecanismos adaptativos, encontramos las adaptaciones fenotípicas, sea por el estado metabólico de la bacteria, o por ser secundaria a su capacidad de producir biopelículas (Becerra, Plascencia, Luévanos, Domínguez y Hernández, 2009).

En consecuencia, el uso de los agentes antimicrobianos en la terapéutica de las enfermedades infecciosas, ha constituido un acontecimiento sin precedentes, porque la curación y control de las infecciones ha permitido modificar favorablemente el panorama de la morbilidad y mortalidad del adulto (Barclay, Begg y Chambers, 1992).

Atendiendo a estas consideraciones, las plantas medicinales sus extractos y aceites son ampliamente utilizados por los practicantes de la medicina tradicional para curar diversas enfermedades. La creciente adaptación de la medicina natural como una forma alternativa de atención de la salud y la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos a partir de plantas medicinales, ha tomado mucha importancia (Wen y cols., 2011).

Debe señalarse que plantas pertenecientes a la familia Apocynaceae la cual está conformada aproximadamente por 1.500 especies distribuidas en 180 géneros, han demostrado potente actividad antimicrobiana (Basille, Giordano y Castaldo, 1993); no obstante diferentes partes de la planta perteneciente a la especie *Thevetia peruviana*, tales como semillas, cortezas, frutas y hojas a pesar de presentar toxicidad se han utilizado en la medicina tradicional, atribuyéndole usos medicinales con propiedades antibacterianas (Aular, Peña, Pérez y Díaz, 2003).

Una vez descrita la situación actual del problema de estudio los autores formulan la siguiente pregunta de investigación: ¿Qué relación existe entre la composición de los extractos obtenidos de *Thevetia peruviana* y la actividad antibacteriana que presenta frente a diversas cepas Grampositivas y Gramnegativas?.

### **Justificación de la investigación**

Las plantas medicinales representan un valioso recurso para el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas, todo esto gracias a los principios activos que la conforman los cuales poseen un alto potencial farmacológico, por lo cual merecen un interés especial con respecto a la búsqueda de medicamentos y agentes antimicrobianos. Más del 25% de los medicamentos modernos proceden de plantas y menos del 2% de todas las especies de plantas han sido estudiadas con fines medicinales (Brown, 2010).

Por otra parte, el aumento de microorganismos resistentes a los agentes antimicrobianos es uno de los principales problemas al que se enfrenta la ciencia médica en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Por lo cual, la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos potentes con mecanismos de acción novedosos que actúen contra bacterias u hongos resistentes a los antibióticos disponibles en la actualidad, es de vital importancia (Kummerer, 2004).

Siendo así, el uso de los extractos provenientes de plantas medicinales una de las estrategias más relevantes para el control de enfermedades infecciosas, causadas por hongos y bacterias, debido a esto se hace necesario la evaluación de la composición química de los extractos obtenidos de *Thevetia peruviana* y la determinación de la actividad antibacteriana en cepas Grampositivas y Gramnegativas, con la finalidad de proporcionar una alternativa que sea capaz de instaurar el efecto antibacteriano.

## **Objetivos de la Investigación**

### ***Objetivo General***

Confirmar la relación que existe entre la composición química de los extractos obtenidos de *Thevetia peruviana* y la actividad antibacteriana frente a diversas cepas Grampositivas y Gramnegativas.

### ***Objetivos Específicos***

- Obtener los extractos de las hojas de *Thevetia peruviana* mediante maceración con los solventes hexano y etanol.
- Realizar la identificación de los metabolitos secundarios de los extractos obtenidos mediante pruebas químicas cualitativas.
- Determinar mediante el método de difusión en agar (Kirby – Bauer) en pozo modificado la presencia de actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de *Thevetia peruviana*, frente a diferentes cepas de bacterias Grampositivas y Gramnegativas.

## **Alcances y Limitaciones de la investigación**

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

El logro de esta investigación está relacionado con la susceptibilidad antibacteriana que poseen los extractos de *Thevetia peruviana* frente a cepas Grampositivas y Gramnegativas para instaurar estrategias terapéuticas que promuevan una alternativa en contra de los mecanismos de resistencia bacteriana.

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

Algunas de las limitaciones que se pueden presentar en esta investigación están relacionadas con la insuficiente información de trabajos previos que la respaldan con respecto a su actividad antibacteriana; ya que, frecuentemente se indaga sobre sus propiedades tóxicas.

Por otra parte, es importante señalar que la ubicación geográfica y las condiciones climáticas como altitud, temperatura y humedad donde se recolectó la planta pueden influir en el contenido de la composición química de la misma; por ende, cuando se realizan los ensayos de susceptibilidad antibacteriana pueden verse afectados.

Cabe destacar que, los constantes cortes de fluido eléctrico, paros escalonados del personal de la universidad, adquisición de los medios de cultivo para la preparación de las pruebas de la actividad antibacteriana y la falta de tinta; fueron limitantes que conllevaron a un progreso lento de la investigación.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Trabajos Previos

Neira, 2018, realizó una investigación titulada: Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* (Pers) Schum (Maichil) frente a cepas de *Enterococcus faecalis*. La metodología aplicada fue el tamizaje fitoquímico del extracto y método de difusión en disco o Kirby Bauer. El tamizaje arrojó la presencia de metabolitos como glucósidos cardiotónicos, alcaloides, triterpenos, esteroides y flavonoides. Los halos de inhibición presentaron un promedio de 9,55 mm y 10,75 mm correspondiente a las concentraciones 25 ppm y 50 ppm del extracto etanólico de las hojas de *T. peruviana* sobre *E. faecalis* demostrando de esta forma que posee efecto antibacteriano a ambas concentraciones, siendo mayor dicho efecto a la concentración de 50 ppm. Este trabajo de investigación guarda relación con el tema, ya que el autor realizó el tamizaje del extracto y demostró que a diferentes concentraciones hay presencia de actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de las hojas de *T. peruviana*.

Singh, Agrawal, Mishra, Uddin y Shukla, en el año 2016, realizaron un estudio titulado: Características de *Thevetia peruviana*, el objetivo primordial de la investigación fue evaluar los componentes fitoquímicos y la actividad antimicrobiana de *T. peruviana* para especies de bacterias de *Escherichia coli*, *Streptococcus lactis*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*

y *Proteus vulgaris*; y para especies de hongos de *Fusarium oxysporum*, *Alternaria helianthii*, *Curvularia lunata*, *Aspergillus niger* y *Penicillium* spp. El método utilizado fue el análisis fitoquímico de los extractos, estos indicaron que contenían terpenoides, fenoles, flavonoides, antraquinonas, y mediante la técnica de difusión en disco, los extractos (concentraciones de 12,2, 25 y 50 µg) obtuvieron resultados de actividad antibacteriana máxima contra *E. coli* con un halo de inhibición de 15,1 mm, las especies de hongos no presentaron actividad antifúngica. Esta investigación guarda relación con este tema, debido a que los autores determinaron la actividad antimicrobiana de los extractos de *T. peruviana*, basados en de los componentes fitoquímicos de la planta.

Pacheco, Taborda y Torres, en el año 2006, publicaron en la revista Intrópico un estudio denominado: Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de hojas, corteza y semillas de *Thevetia peruviana* (Person) Schum, el objetivo principal de la investigación fue realizar el estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de hojas, corteza y semillas de *T. peruviana* frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*. La prueba de caracterización química fue positiva para glucósidos cardiotónicos, flavonoides, triterpenoides y esteroides en las tres estructuras vegetales estudiadas. A partir de los extractos etéreos y etanólicos, se prepararon 8 diluciones (5, 10, 25, 50, 75, 100, 125, y 250 ppm), utilizando para ello agua y un tensoactivo, para el caso del extracto etanólico de semilla fue Tween 80 y para el resto de los extractos Tween 20. De las diluciones preparadas se agregó 1 mL al medio de cultivo en el cual se inoculó el hongo de estudio. La totalidad de los extractos en sus distintas concentraciones dieron resultados negativos en las pruebas de actividad antifúngica. Este trabajo guarda relación con el tema, puesto que los autores analizaron la composición fitoquímica de los extractos y a distintas concentraciones ensayaron la acción antifúngica; no se descarta que posean sensibilidad contra cepas de hongos menos resistentes.

## Antecedentes Históricos

El estudio para la identificación de los componentes de las plantas fue un proceso lento con el progreso de la fitoquímica en el año 1800. Los primeros investigadores en este campo no llegaron a apreciar la extrema complejidad de las materias con que se realizaban sus investigaciones y carecieron casi por completo de las técnicas necesarias para conseguir un proceso auténtico. El farmacéutico francés Nicolás Lémery (1645-1715) extendió el empleo de los procesos de extracción y utilizó alcohol como disolvente (Lizcano y Vergara, 2008).

En 1803 se aísla el primer alcaloide, la nicotina, y le siguieron muchos otros como morfina, estricnina y emetina. Fue entonces hasta mediado del siglo XX, el principal empeño en cuanto a la química de los productos naturales, siguió siendo el aislamiento y determinación de la estructura de una amplia gama de compuestos. A partir de entonces, la atención de los químicos respecto a los productos naturales derivados de la planta fue virando hacia la disolución de las rutas biosintéticas halladas en la planta (Lizcano y Vergara, 2008).

Las plantas con atributos medicinales fueron las primeras medicinas utilizadas en forma empírica para la cura de enfermedades que padecía el hombre (Marinoff, 2006).

Desde el siglo XVIII se han empleado sustancias químicas para el tratamiento de enfermedades infecciosas, Paul Ehrlich quien formuló los principios de toxicidad selectiva, reconoció las reacciones químicas específicas entre microorganismos y medicamento, la aparición de la resistencia a estos, y el papel de la terapéutica combinada para combatirlos. Posteriormente se descubrieron las sulfonamidas y se acrecentó el interés en sustancias antibacterianas de origen microbiano llamadas antibióticos, de allí surgió la penicilina, estreptomina, tetraciclina, cloranfenicol entre otras (Manrique y Mosquera, 1997).

Posteriormente en el siglo XIX se practican los primeros análisis químicos de esencias y otros principios activos de los vegetales, con la aplicación del microscopio y la química analítica. Pero en la actualidad existe un reconocimiento del empleo de fuentes naturales de medicamentos y en especial de la fitoterapia, justificado en muchos casos por razones económicas, y por la disminución de efectos tóxicos crónicos muy frecuentes en sustancias químicas puras (Marinoff, 2006).

Es por ello que La medicina tradicional es la suma total de conocimientos, técnicas y procedimientos basados en las teorías, las creencias y las experiencias indígenas de diferentes culturas, utilizados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, y la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales (OMS, 2009).

www.bdigitalula.ve

## **Bases Teóricas**

### ***Extractos Vegetales***

De las plantas se extrae un contenido biológico, que se define como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (Ruíz y Susunaga, 2000). A continuación, se presentan las características de los extractos (Barreto, 1997):

- Los extractos bien preparados son de color más o menos oscuros, cuando han sido preparados al vacío, son ligeramente más claros.

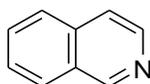
- Algunos son de color café amarillo, otros rojizos; los extractos provenientes de hojas son verdosos debido a la clorofila.
- Su aspecto debe ser liso, fino y homogéneo.
- Su olor y sabor son propiedades características de la materia prima que les dado su origen. Cuando son mal preparados, adquieren olor a caramelo o confitura poco conocida.
- La solubilidad de los extractos es variable y está en relación directa con el tipo de preparación al cual fueron sometidos.
- Los extractos acuosos son completamente solubles en agua y producen una solución transparente, algunas veces ligeramente turbia, ya que han sido preparados con mucha anterioridad.
- Los extractos alcohólicos son parcialmente solubles en agua y algunas veces son totalmente insolubles, especialmente los extractos que han sido preparados con alcohol fuerte tienen un excelente índice de disolución, en el mismo título alcoholimétrico del alcohol.
- Los extractos alcohólicos preparados con hojas, dan soluciones coloreadas de verde, puesto que la eliminación de la clorofila no puede ser total.

### ***Componentes de los Extractos Vegetales***

Por otra parte, de los extractos vegetales se aíslan principios activos que por lo general son alcaloides o heterósidos; estos merecen por lo tanto mayor atención. Otros grupos, como los glúcidos, grasas y proteínas, almidones y las gomas, se emplean en técnica farmacéutica, aunque carecen de señalada acción farmacológica (Torres, 2004). Algunos metabolitos secundarios se mencionan a continuación:

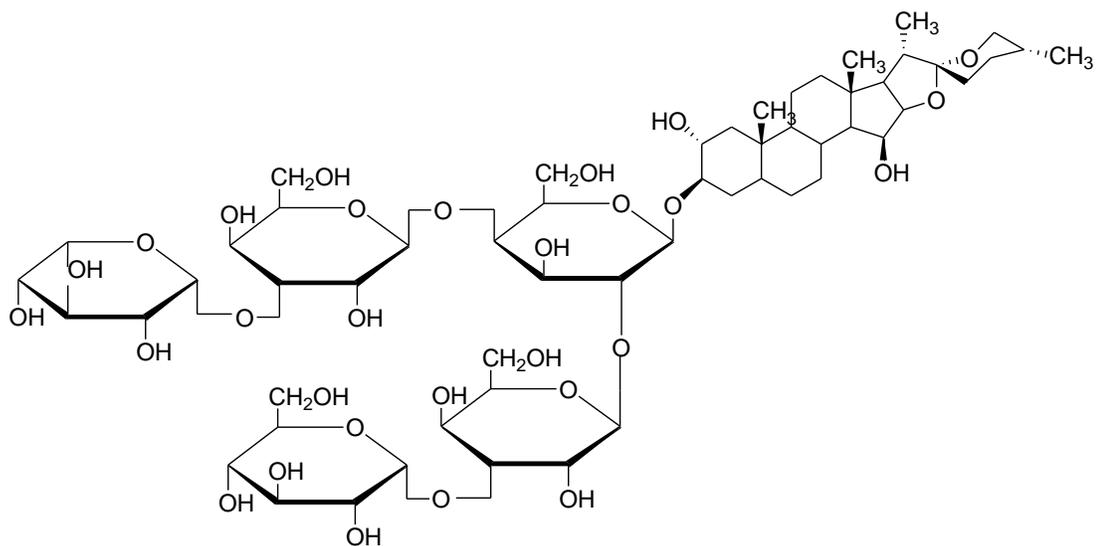
- **Alcaloides:** Constituyen un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas nitrogenadas, aunque estrictamente se considera que los alcaloides deben tener al menos un átomo de nitrógeno heterocíclico, el nitrógeno puede formar parte de una amina primaria ( $\text{RNH}_2$ ), de una amina secundaria ( $\text{R}_2\text{NH}$ ), de una amina terciaria ( $\text{R}_3\text{N}$ ) o de una amina cuaternaria (Rivas, Oranday y Verde, 2016). Por otro lado, estos presentan una diversidad estructural siendo la clasificación más destacada la de alcaloides isoquinolínicos, llamados así por poseer como base en su estructura la isoquinolina (Figura 1). Su síntesis comienza con el aminoácido tirosina, el cual sufre reacciones de metilación e hidroxilación, culminando en un derivado de la  $\beta$ -fenetilamina o en el anillo de tetrahydroisoquinolina, estado más común en el que se encuentra la isoquinolina, compuesto reportado con mayor actividad antibacteriana en gran medida por el núcleo de piridina (Peña, 2011).

www.bdigital.ula.ve  
**Figura 1.** Estructura química de la isoquinolina



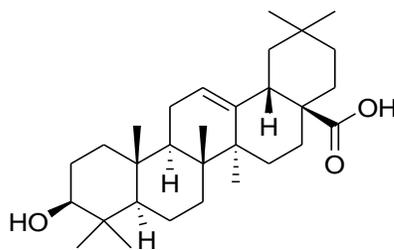
- **Saponinas:** Son los componentes principales de varios extractos de plantas, tienen actividad antiprotozoaria. Las saponinas se unen al colesterol y otros esteroides de la membrana celular de los protozoos causando su inestabilidad, lisis y muerte celular. Estructuralmente están constituidas principalmente por grupos hidroxilos y uniones de tipo éter y lactónicas; están compuestas por azúcares y sapogeninas (Figura 2). Al agitarse con agua producen espuma (Calsamiglia, Castillejos y Busquet, 2005).

**Figura 2.** Estructura química de la digitonina



- **Esteroides y Triterpenos:** Poseen un hidróxilo en el C<sub>3</sub> que les permite la unión con una o varias moléculas glucocídicas. Pueden establecerse dos grandes grupos dependiendo de su estructura química: triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos (Figura 3) y esteroides. Los compuestos esteroidales pueden interferir determinados procesos de síntesis vitales en la célula bacteriana y los triterpenos, por su parte, pueden actuar siguiendo diversos mecanismos en dependencia de su naturaleza química: los de naturaleza hidrocarbonada, por ejemplo, tienen generalmente acción depresora sobre la tensión superficial lo cual, cuando tiene lugar en el entorno de la célula bacteriana, altera la selectividad de la membrana citoplasmática para el intercambio de sustancias. Los triterpenos de naturaleza alcohólica pueden alterar la naturaleza coloidal del protoplasma de la célula provocando su muerte (Pelczar y Reid, 1992).

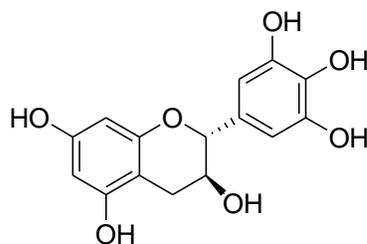
**Figura 3.** Estructura química del ácido oleanólico



- **Taninos:** Los taninos son productos de excreción de muchas plantas, involucrados en mecanismos de defensa de las mismas, contra organismos parásitos. Se encuentran más comúnmente en hojas, ramas y debajo de la corteza. Químicamente los taninos son polímeros de polifenoles, no nitrogenados, formados por la condensación de las catequinas (Figura 4), sustancias de alto peso molecular, solubles en agua y no en solventes orgánicos (Martinez, Valencia, Jimenez, Mesa y Galeano, 2008).

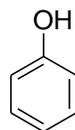
www.bdigital.ula.ve

**Figura 4.** Estructura química de la galactoquina (tanino condensado)



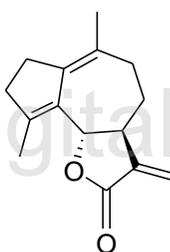
- **Fenoles:** Poseen características asépticas y citotóxicas; ya que aquellos que son clorados pueden atravesar las membranas celulares. Consisten en una estructura bencénica polisustituida (Figura 5); pirogalol, timol, eugenol, apiol, anetol; son los compuestos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido (Domingo y López, 2003).

**Figura 5.** Estructura química de un fenol



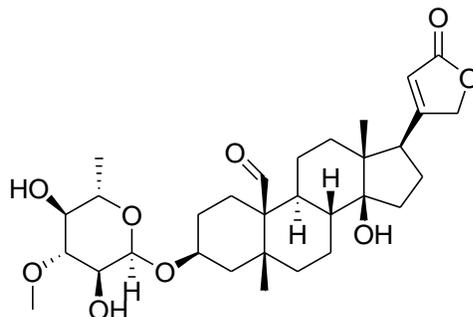
- **Sesquiterpenlactonas:** Son una clase de sesquiterpenoides (Terpenoides C15) con un anillo lactónico. Se clasifican comúnmente de acuerdo con el tipo de núcleo que posean con la terminación ólido que indica la existencia de un grupo funcional lactona (Figura 6). Inducen la apoptosis celular, por ende, tiene características antiinflamatorias y efecto citotóxico (Martínez, Valencia, Jiménez, Mesa y Galeano, 2008).

**Figura 6.** Estructura química del germacranólido



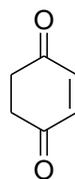
- **Glucósidos cardiotónicos:** Una aglicona cardiotónica, estructuralmente está constituida por el sistema anular esteroidal (ciclopentano perhidrofenantreno) con los grupos metilos C-18 y C-19, un grupo hidroxilo en el carbono 3 y un anillo lactónico  $\alpha$ - $\beta$  insaturado de cuatro carbonos unido al carbono 17 del núcleo esteroidal (Figura 7) (Martínez, Valencia, Jiménez, Mesa y Galeano, 2008).

**Figura 7.** Estructura química del peruvósido



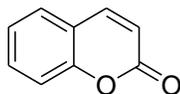
- **Quinonas:** Las quinonas son anillos aromáticos con dos funciones ceto (Figura 8). Son ubicuas en la naturaleza y causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando son dañadas. Poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio (Domingo y López, 2003).

**Figura 8.** Estructura química de la *p*-benzoquinona



- **Cumarinas:** Las cumarinas son un grupo muy amplio de principios activos fenólicos y tienen en común la estructura química de 1-benzopiran-2-ona (Figura 9). Se caracterizan porque presentan fluorescencia bajo la luz ultravioleta a 365 nm. Son inhibidoras de la geminación y altamente tóxicas para la célula (Martínez, Valencia, Jiménez, Mesa y Galeano, 2008).

**Figura 9.** Estructura química de una cumarina



## ***Obtención de Extractos Vegetales***

### ***Percolación o lixiviación***

Es un método de extracción donde el disolvente (generalmente alcohólico o mezcla hidroalcohólica) atraviesa el material vegetal pulverizada siempre en un solo sentido, alcanzando concentraciones crecientes de tal modo que el equilibrio entre el solvente dentro y fuera del marco nunca se alcance, por lo que el material vegetal impregnado siempre por nuevas proporciones de disolvente acaba por ceder todos sus componentes solubles de manera progresiva. Éste tipo de extracción se realiza en recipientes (percoladores) cilíndricos o cónicos que poseen dispositivos de carga y descarga, lográndose una extracción total de los principios activos (prácticamente se obtiene hasta el 95% de sustancias extraíbles); se debe tomar en cuenta que el tiempo en el que el material vegetal permanece en contacto con el disolvente y la relación existente entre la el material vegetal y el líquido extractivo (cantidad de disolvente), son dos factores decisivos dentro de la percolación (Carrión y García, 2010).

### ***Decocción o cocimiento***

Este procedimiento consiste en llevar a la mezcla de material vegetal más el disolvente a la temperatura de ebullición del agua, manteniendo esta temperatura durante un período variable que suele oscilar de 15 a 30 minutos (Carrión y García, 2010).

### ***Extracción por digestión***

Es una maceración realizada a una temperatura media que oscila alrededor de 50 y 60° C. Al aumentar progresivamente 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).

### ***Extracción por soxhlet***

Aparato de extracción semicontinua, pues en una de las fases el sustrato se agrega solo al principio, mientras que el solvente de extracción cumple un ciclo de extracción y purificación continua. La purificación se realiza en forma paralela por destilación del solvente, de manera que el sustrato siempre está en contacto con el solvente puro; se utiliza cuando es necesaria una extracción exhaustiva del material vegetal (Carrión y García, 2010).

### ***Extracción mediante Maceración***

El material vegetal previamente debe ser molido, picado y macerado; donde la maceración es una extracción que consiste en remojar dicho material debidamente fragmentado, en un disolvente permitiendo mayor área de contacto del sólido y el disolvente hasta que este penetre y disuelva las porciones solubles. El proceso ha de buscar que el sólido y el líquido estén en movimientos continuos mediante agitación, para lograr mejor eficiencia en la operación. Se realiza preferiblemente a temperatura y presión ambiente, se puede utilizar cualquier recipiente; en éste se coloca el sólido con el disolvente y se deja en reposo por un período de 72 horas. Para este método

los disolventes más utilizados son los hidrocarburos alifáticos (pentano, hexano), hidrocarburos aromáticos (benceno, tolueno) y menos frecuente los hidrocarburos halogenados. Al final del proceso se filtra el líquido obtenido, se exprime el residuo, y los solventes se recuperan por destilación y pueden ser reutilizados (Bruneton, 1991).

La composición química de los extractos puede establecerse cualitativamente mediante el tamizaje fitoquímico, el cual consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente en una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico (Bruneton, 2001).

### ***Las Bacterias***

www.bdigital.ula.ve

Son microorganismos procariotas unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplásmico, se reproducen por división asexual. Poseen membrana citoplasmática, citoplasma, ADN y ARN, ribosomas y pared celular. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja y existen dos formas básicas: una pared celular grampositiva y una pared celular gramnegativa. Su tamaño es variable entre 1 – 5  $\mu\text{m}$  (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

### ***Clasificación de las Bacterias***

Las bacterias se clasifican principalmente basándose en las características morfológicas, tintoriales, bioquímicas, fisiológicas y ecológicas. La clasificación de las bacterias se esquematiza de la siguiente manera (Ramírez y cols., 2010):

- **Según su morfología (forma):**
  - **Cocos:** Presentan forma esférica, pueden ser individuales o en pares (diplococos), en cadenas (Streptococos) y en racimos (Estafilococos).
  - **Bacilos:** Presentan forma de bastón con extremos redondos, cuadrados, fusiformes y curvos.
  - Cocobacilos.
  - **Espirilos:** Bacteria rígida con forma espiral.
  - **Espiroquetas:** Bacteria flexible con forma espiral.
  - Formas filamentosas.
  
- **Según sus requerimientos de oxígeno:**
  - **Bacterias aeróbicas:** Son aquellas que necesitan oxígeno para crecer, entre los aeróbicos tenemos: los aerobios obligados, requieren una tensión absoluta de oxígeno (en el aire el O<sub>2</sub> comprende un 21%); y los microaerófilos, requieren tensiones de oxígeno inferiores a la atmosférica (del 2 al 10% de O<sub>2</sub>), bajo la forma de CO<sub>2</sub>.
  - **Bacterias anaeróbicas:** Son aquellas que crecen en ausencia de O<sub>2</sub>. Existen tres categorías de anaerobios tenemos: los anaerobios obligados (o estrictos), el oxígeno les resulta tóxico; los anaerobios aerotolerantes, pueden crecer en presencia de O<sub>2</sub>, aun cuando no pueden utilizarlo, debido a que poseen enzimas detoxificadoras. Los anaeróbicos facultativos pueden realizar metabolismo energético aeróbico o anaeróbico, dependiendo al medio ambiente donde se encuentren.
  
- **Según la temperatura óptima de crecimiento:**
  - **Termófilas:** Crecen a una temperatura entre 25 y 80°C (50-60°C).
  - **Mesófilas:** Se desarrollan entre -5 y 30°C (10-20°C).

- **Según sus características tintoriales:** En 1884, el físico danés Hans Christian Gram desarrolló una tinción compuesta, sobre la base de esta coloración las bacterias se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- **Bacterias Grampositivas:** Son aquellas bacterias que poseen una pared celular gruesa que consta de varias capas y está formada principalmente por peptidoglicano que rodea la membrana citoplasmática, este es un elemento clave para la estructura, la replicación y supervivencia de la célula. Posee también otros componentes como los ácidos teicoicos y lipoteicoicos, y polisacáridos complejos. Los ácidos teicóicos son unos polímeros hidrosolubles de fosfato de poliol que están unidos al peptidoglicano mediante enlaces covalentes y son fundamentales para la viabilidad celular. Los ácidos lipoteicoicos poseen un ácido graso y se encuentran unidos a la membrana citoplasmática, estas moléculas son antígenos de superficie frecuentes que diferencian los serotipos bacterianos (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

Estas bacterias cuya pared celular de peptidoglicano es más densa, al ser deshidratadas cierran sus poros impidiendo la salida del complejo violeta de genciana-yodo (colorante primario), adquiriendo así un color púrpura que le atribuye su característica grampositiva (Ramírez y cols., 2010).

- **Bacterias Gramnegativas:** Son bacterias que poseen una capa de peptidoglicano delgada, una membrana externa que contiene fosfolípidos, proteínas, y lipopolisacáridos, los cuales están formados por tres regiones estructurales: el lípido A, región central del polisacárido, y antígeno O, el espacio periplásmico existente entre la membrana citoplasmática y la membrana externa contiene las proteínas de transporte, degradación, y síntesis de la pared celular. La membrana externa está unida a la membrana citoplasmática en unos

puntos de adhesión; asimismo está fija al peptidoglicano por enlaces de lipoproteínas (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

Estas bacterias cuya pared celular es rica en lípidos, al decolorar quedan poros en su pared que permiten la salida del complejo violeta de genciana-yodo y al adicionar la safranina (colorante de contraste) toman el colorante por lo que se observan color rosado, característica bacteriana gramnegativa (Ramírez y cols., 2010).

### ***Actividad Antibacteriana***

Es la capacidad que poseen los antibióticos de inhibir o propagar el crecimiento de determinadas bacterias en un medio de cultivo agarizado frente a un antibiótico específico, caracterizados por la sensibilidad o resistencia ante los mismos (Betés, Durán, Mestres y Nogués, 2008). Algunos métodos para la determinación de actividad antibacteriana se describen a continuación:

- ***Método de dilución en caldo o en agar:*** Se preparan tubos con la concentración definida de antibiótico y se le agrega a cada tubo una cantidad conocida del agar Müller-Hinton, este tubo se homogeniza y se vierte en una placa de Petri con lo que se logra una placa de agar Müller-Hinton con el antibiótico diluido a una concentración determinada (Reyes, Palou y López, 2013).

Generalmente se inicia a una concentración de 128 µg/mL y se hacen diluciones dobles hasta obtener el gradiente decreciente en la concentración de antibiótico (64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,06 µg de droga activa). La elección de la concentración en la que se inicia el gradiente, depende del antibiótico y del tipo de cepa a probar (Reyes, Palou y López, 2013).

Adicional a esto, se inocula una placa de Müller-Hinton sin antibiótico, que sirve como control positivo de crecimiento. La placa se incuba a 35°C por 18 a 24 horas y se revisa el crecimiento, siempre contra el control positivo. Si la cepa logra crecer en la superficie del medio de cultivo, se reporta como resistente a esa concentración del antibiótico. Si, por el contrario, no crece, se reporta como sensible a esa concentración de antibiótico (Reyes, Palou y López, 2013).

Preparar un gradiente de medios de cultivo con una concentración decreciente de antibiótico, hace que esta técnica sea muy engorrosa por lo que se utilizan sólo dos diluciones, una arriba del punto de quiebre del antibiótico y otra debajo de este valor. El punto de quiebre es un valor matemático, que expresa un punto o concentración arriba del cual la cepa se debe interpretar como resistente al antibiótico. Basándose en este criterio, al escogerse dos concentraciones, una abajo y otra arriba del punto de quiebre, si la cepa crece en las dos concentraciones es resistente, si crece sólo en la concentración bajo el punto de quiebre, la cepa es intermedia y sensible si no crece en ninguna (Reyes, Palou y López, 2013).

- **Método Epsilométrico (Etest):** Este método emplea una tira con una matriz plástica que tiene una concentración decreciente de un antibiótico determinado. El medio que se usa es agar sangre con sangre de caballo al 5% y con una base de Müller-Hinton o puede utilizarse agar HTM (Medio Test Haemophilus) o agar chocolate suplementado; se determina solamente la concentración mínima inhibitoria y ésta se encuentra en la interfase de la elipse. La lectura debe ser muy cuidadosa y puede hacerse con la ayuda de una lupa. Se recomienda que, si la interfase cae entre dos puntos, se elija la concentración más alta y también es muy importante la observación de pequeñas colonias presentes en las zonas

de bajo crecimiento, lo que puede indicar resistencia o bajos niveles de esta (Alippi, Reynaldi y López, 2013).

La técnica empleando las tiras de Etest es considerablemente más rápida y requiere una menor cantidad de medio de cultivo que la técnica de dilución en agar, por lo que puede adaptarse fácilmente al trabajo de laboratorio para el análisis de numerosas cepas bacterianas (Alippi, Reynaldi y López, 2013).

- **Método de difusión en agar (Kirby-Bauer):** Esta técnica fue estandarizada por Kirby y Bauer en 1966. Aunque es un método sencillo y fácil de realizar en los laboratorios de rutina, solo brinda información cualitativa o semicuantitativa sobre la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico determinado. Sin embargo, los resultados obtenidos son de gran valor clínico para iniciar, mantener o modificar una antibióticoterapia. El microorganismo de ensayo debe provenir de un cultivo puro y el inóculo bacteriano debe estar ajustado al patrón 0,5 de turbidez de McFarland; posteriormente se realiza el inóculo en un medio predeterminado para el microorganismo (Ramírez y cols., 2010).

El método Kirby - Bauer consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe el agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación a temperatura óptima, los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Ramírez y cols., 2010).

## ***Resistencia Bacteriana***

El consumo excesivo de antibióticos sin previa autorización médica, ha traído como consecuencia la resistencia de los gérmenes patógenos a esos antibióticos mejor conocida como resistencia bacteriana, creándose un problema mundial, y por tanto el empeoramiento de los síntomas de la enfermedad, que además crean serias dificultades para la eliminación de los gérmenes, sin hablar de los efectos secundarios que pueden provocar enfermedades adversas (Cruz, 2001).

Se entiende por resistencia, el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos. Existen diferentes tipos de resistencia entre ellos están:

- Natural o intrínseca: todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permiten tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico, la resistencia se trasmite de forma vertical de generación en generación.
- Adquirida: Constituye un problema en la clínica, se pone de manifiesto en los fracasos terapéuticos en un paciente infectado con cepas de un microorganismo en otros tiempos sensibles (Fernández, López, Ponce y Machado, 2003).

La aparición de la resistencia en una bacteria 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. La transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético movable como integrones y transposones; esto último no solo permite la transmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos (Fernández, López, Ponce y Machado, 2003).

## ***Mecanismos de Resistencia Bacteriana***

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antibióticos. El primero de ellos es por la posición de un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, una especie de bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que puede eliminar además muchos de estos agentes antibacterianos. El segundo, se realiza mediante la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entrada (porinas). La producción de enzimas inactivadoras de los antibióticos constituye el tercer mecanismo. Por último, algunos antibióticos ejercen su acción contra las bacterias uniéndose a una proteína esencial para la supervivencia de estas. La resistencia bacteriana se produce cuando el germen modifica la proteína diana, y cambia su función o produce enzimas distintas (Fernández, López, Ponce y Machado, 2003).

### ***Los Antibióticos***

Son sustancias derivadas de un organismo vivo, generalmente un microorganismo o una modificación química de la misma, que inhibe la reproducción, crecimiento, o incluso, destruye otros microorganismos y células anormales (Cruz, 2001). Los antibacterianos han facilitado el tratamiento de enfermedades que eran mortales hasta hace poco más de medio siglo. Ello ha contribuido enormemente al aumento de la esperanza de vida y a mejorar la calidad de la misma en la población de muchos países (Betés, Durán, Mestres y Nogués, 2008).

## **Clasificación de los Antibióticos**

De acuerdo a las investigaciones realizadas por distintos autores se han diseñado varios esquemas para la clasificación de los antibióticos, sin embargo, la más utilizada es la que los agrupa de acuerdo con su mecanismo de acción y estructura química:

**Inhibidores de la síntesis de la pared celular bacteriana:** las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemos, pertenecen a la familia de los  $\beta$ -lactámicos ya que la base de su estructura química es el anillo  $\beta$ -lactámico. Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos inhiben la síntesis de la pared bacteriana uniéndose a enzimas que actúan en la fase final de la síntesis del peptidoglucano inactivándolas, es decir inactivan a las proteínas ligadoras de las penicilinas (PBP), además, inducen un efecto autolítico, por lo tanto, su efecto es bactericida (Marín y Gudiol, 2003).

**Inhibidores de la función de la membrana citoplasmática:** los polipéptidos son antibióticos bactericidas altamente nefrotóxicos, por lo que están restringidos a uso tópico, es decir, para el tratamiento de infecciones cutáneas, oftálmicas y óticas, ya que no se absorben. En microbiología se utilizan principalmente para la identificación de algunos bacilos gramnegativos no fermentadores y para la elaboración de medios selectivos. Su estructura química está conformada por polipéptidos que se unen a los fosfolípidos de la membrana citoplasmática, alterando su permeabilidad y ocasionando su destrucción (Pigrau, 2003).

**Inhibidores de la síntesis de proteínas:** Este grupo de antibióticos actúa uniéndose a la unidad 30S ribosomal o a la unidad 50S ribosomal, inhibiendo la síntesis de proteínas (Mensa, García y Vila, 2003):

- Antibióticos que actúan en la unidad 30S ribosomal: aminoglucósidos y tetraciclinas.

- Antibióticos que actúan en la unidad 50S ribosomal: fenicoles, macrólidos, lincosaminas, estreptograminas, ketólidos, oxazolidinonas. En líneas generales, los antibióticos pertenecientes a estos grupos son bacteriostáticos excepto los aminoglucósidos y streptograminas que son bactericidas.

**Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos:** Se dividen en rifamicinas, quinolonas y sulfamidas:

- Las rifamicinas son un grupo de antibióticos de estructura compleja que inhiben la síntesis de ARN bacteriano mediante la inhibición de la enzima ARN polimerasa, su acción es bactericida.
- Las quinolonas son un grupo de antibióticos sintéticos que actúan sobre la replicación del ADN bacteriano inhibiendo la acción de la ADN girasa (Topoisomerasa II) y la Topoisomerasa IV, que se encargan del superenrollamiento de la molécula de ADN y separación de las cadenas de la doble hélice durante la replicación bacteriana. Su acción es bactericida.
- Las sulfamidas son un grupo de antibióticos con actividad contra bacterias y protozoarios. El trimetoprim, que tiene actividad contra bacterias, es un análogo del ácido dihidrofólico, compuesto esencial en la síntesis de aminoácidos y nucleótidos, inhibe competitivamente la enzima dihidrofolato reductasa, impidiendo así la síntesis de ADN y ARN. Su efecto es bactericida. Este grupo de antibióticos fueron los primeros quimioterápicos eficaces que se administraron por vía sistémica para prevenir y tratar infecciones en humanos. Las sulfonamidas son análogos del ácido para-aminobenzoico (PABA), compuesto necesario en la síntesis del ácido fólico, que actúan inhibiendo la enzima dihidropteroato sintetasa, enzima que incorpora el PABA en la síntesis del ácido fólico. Su efecto es bacteriostático (González y Saltigeral, 1992).

## **Características de la Familia Apocynaceae**

Pertenece al reino Plantae, es una familia de las dicotiledóneas que incluye árboles, arbustos, hierbas, o lianas. Las subfamilias de sus especies son por lo general especies grandes de árboles que se encuentran en la selva tropical, pero muchas son originarias de la zona templada (Salinas, 2010). Los bosques tropicales pluviales y pantanosos de la India y de la península Malaya, contienen árboles perennifolios desde muy pequeños hasta de gran talla. Las especies de *Plumeria* muy cultivadas, son originarias de América central. Los bosques de América del sur, África y Madagascar son ricos en lianas. Las adelfas (*Nerium*) son nativas de los biotopos húmedos de la región mediterránea templada (Ezcurra, 2005).

Comprende unos 180 géneros y 1500 especies distribuidas principalmente a través de los trópicos y subtropicos. Muchas especies son productoras de alcaloides tóxicos y medicinales, así como de látex utilizado en la industria, y muchas otras se cultivan con fines ornamentales por sus llamativas y fragantes flores. Se cultivan especies arborescentes de los géneros *Nerium*, *Acokanthera*, *Ochrosia*, *Plumeria*, *Rauvolfia* y *Thevetia* (Salinas, 2010).

## **Usos y Composición Química de la familia Apocynaceae**

La continua expansión de la familia ha sido acompañada por diversos cambios fitoquímicos que le han permitido desarrollar y explorar nuevos mecanismos defensivos (alcaloides, conductos laticíferos, olores, entre otros). Algunos géneros de *Thevetia* y *Nerium* contienen glucósidos cardiotónicos, utilizados en el tratamiento de enfermedades cardíacas, otros géneros como *Rauvolfia serpentina*, producen los alcaloides reserpina y rescinamina con propiedades hipotensoras y sedantes. Otros proporcionan un látex de importancia comercial que sirve para la obtención de caucho.

*Catharanthus roseus* ha adquirido relevancia pues de ella se obtienen más de 90 alcaloides; entre ellos la vincristina y la vinblastina que son drogas modernas para el tratamiento de la leucemia y cariocarcinomas (Ezcurra, 2005).

*Aspidosperma quebracho-blanco*, es un árbol usado como leña y madera de excelente calidad, dura y pesada utilizada para decoración de interiores y tallado; en la corteza de este árbol están contenidos seis alcaloides importantes la aspidospermina, quebrachamina, hipoquebrachina, aspidosamina y yohimbina, los cuatro primeros actúan sobre los centros motores y los restantes son venenosos como el curare. Muchas apocináceas son tóxicas y de ellas se utilizan los frutos y las flores para envenenar flechas o como ictiotóxicos por tribus indígenas de África, también se han utilizado como raticidas e insecticidas (Ezcurra, 2005).

### **Género *Thevetia***

Se ubica dentro de la familia Apocynaceae, comprende unos 50 géneros y 385 especies distribuidas principalmente a través de los trópicos y subtropicos del mundo. Incluye plantas anuales o perennes, principalmente hierbas erectas o trepadoras y con frecuencia, árboles y arbustos (Herrera y Rivera, 2013).

La mayoría de las especies están provistas de lactíferos constituidos por células individuales o ramificadas que producen látex lechoso, el cual contiene glucósidos y alcaloides, que pueden ser altamente tóxicos. Las hojas son simples y persistentes. Las flores son solitarias y se originan en la parte terminal de las ramas o en las axilas de las hojas. Los frutos son variados, generalmente son folículos, pero también se presentan drupas y bayas. Las semillas son aplanadas, ciliadas, aladas y cubiertas por un arilo o desnudas (Herrera y Rivera, 2013).

El látex de *Thevetia ahouai* y *Thevetia gaumeri* se emplea en medicina tradicional como tratamiento para padecimientos como: dolor de muelas, sordera, tumores, úlceras; el látex de *Thevetia peruviana*, se utiliza como lubricante (Herrera y Rivera, 2013).

### ***Thevetia peruviana***

#### **Clasificación Botánica:**

- Reino: Plantae.
- Phylum: Magnoliophyta.
- Clase: Magnoliopsida.
- Orden: Gentianales.
- Familia: Apocynaceae.
- Género: *Thevetia*.
- Especie: *T. peruviana* (Pers.) K. Schumann. (Ezcurra, 2005).

#### **Características de la especie *Thevetia peruviana***

El nombre científico, *Thevetia peruviana*, está formado por el nombre del género *Thevetia*, dedicado al botánico y misionero francés André Thévét (1502-1590), y el término latino peruviana, peruana, del Perú (López, 2001).

También conocida como campanilla de oro o covalonga, castañeto, catapés y cojones de fraile (Herrera, Bacad, Cristóbal, Tun y Ruíz, 2011). En Venezuela sus nombres comunes son muy variados, entre los que se destacan: manzanito, manzanita del diablo y codo de fraile (Salinas, 2010).

Es una planta perteneciente a la familia Apocynaceae, originaria del centro y sur de América. Se encuentra distribuida desde México a Perú; sin embargo, se considera una especie nativa de estos países. Es un árbol o arbusto pequeño de dos a seis metros de altura, con látex blanco en todas

las partes de la planta covalonga (Herrera, Bacad, Cristóbal, Tun y Ruíz, 2011).

Las hojas son de color verde, más oscuras en su cara superior, lineares lanceoladas. Las inflorescencias presentan pocas flores de coloración amarilla o anaranjada en forma de campana (Figura 10). Los frutos son transversalmente oblongos, generalmente más o menos triangulares, verdosos, amarillentos o purpúreos. En su interior se encuentra una nuez o almendra (Herrera, Bacad, Cristóbal, Tun y Ruíz, 2011).

**Figura 10.** Flores, hojas, tallo y fruto de *Thevetia peruviana*



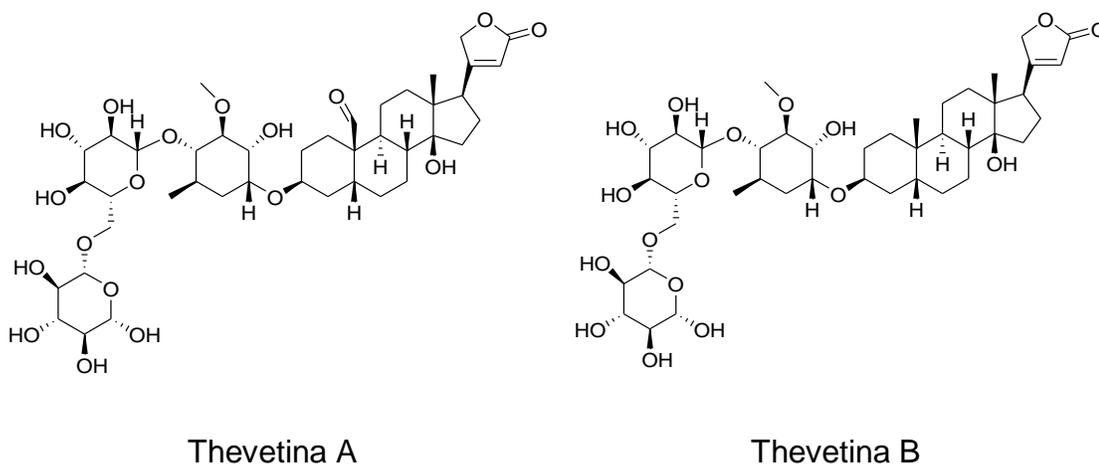
Fuente: Kumar, P., Atreya, A. y Kanchan, T., (2015).

### ***Composición Química de Thevetia peruviana***

Entre los cardenólidos identificados en *T. peruviana* se encuentran en orden decreciente de toxicidad, Peruvósido, Rubósido, Thevetina A, Nerifolina, Cerebrina y Thevetina B (Figura 11). Se encuentran distribuidos en toda la planta, pero no de manera homogénea: semillas 4,8%, hojas 0,070%, frutas 0,045% y en la savia 0,036%. Las semillas de *T. peruviana* contienen también ácido cianhídrico, en pequeñas proporciones, que puede provocar intoxicación en personas que la ingieren de manera constante y por

periodos prolongados. El mecanismo de acción de los cardenólidos es similar al de los digitálicos con inhibición de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (sodio/potasio) ATPasa (Torres, 2009).

**Figura 11.** Estructura química de glucósidos aislados en *T. peruviana*



Toda la planta es tóxica para el hombre; la inhalación, ingestión o contacto con las mucosas de la savia o extractos de la planta puede causar reacciones como: irritación de mucosas, náuseas, vómitos, salivación, dolor abdominal, diarreas, midriasis y síntomas cardiovasculares, bloqueo sinusal y aurículo-ventricular (Aular, Peña, Pérez y Díaz, 2003).

### ***Usos de Thevetia peruviana***

Se utiliza con fines ornamentales, aunque también se le atribuye usos medicinales con propiedades antibacterianas, sin embargo, su principal importancia radica en las propiedades del aceite que se obtiene de sus semillas, el cual se utiliza como lubricante, y recientemente como materia prima para la generación de biodiesel. Esta propiedad le confiere alta importancia como alternativa al uso de combustibles fósiles (Herrera, Bacad, Cristóbal, Tun y Ruíz, 2011).

## **Definición de Términos**

### ***Fitoquímica***

Es la rama de la botánica que se encarga del estudio de los constituyentes activos de los vegetales, que han sido obtenidos mediante un proceso de extracción, derivados de la concentración de los mismo, de sustancias complejas a sustancias más simples (Lizcano y Vergara, 2008).

### ***Extractos Vegetales***

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

### ***Metabolitos Secundarios***

Son una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que produce una planta y no parecen tener función directa con su crecimiento y desarrollo (Torres, 2004).

### ***Actividad Antimicrobiana***

Es la capacidad que poseen los antibióticos de inhibir o propagar el crecimiento de determinados organismos en un medio de agar frente a un antibiótico específico. Caracterizados por la sensibilidad o resistencia ante los mismos (Betés, Durán, Mestres y Nogués, 2008).

## Operacionalización de las Variables

Las variables son características o magnitudes que pueden sufrir cambios y son el objeto de análisis, medición, manipulación y control en esta investigación. En este trabajo las variables se operacionalizan para convertir los conceptos abstractos en empíricos con el fin de medirlos a través de un instrumento y una metodología pertinente. A continuación, se describen dos variables: La variable dependiente (Tabla 1) está relacionada con la actividad antibacteriana de los extractos de *T. peruviana* y la variable independiente (Tabla 2), está relacionada con la composición química de los extractos de las hojas de *T. peruviana*.

**Tabla 1.** Operacionalización de la variable dependiente

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición Conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana de los extractos de <i>Thevetia peruviana</i> .	Dependiente Cuantitativa	Es la capacidad que poseen los extractos de inhibir o propagar el crecimiento de determinadas bacterias en un medio de agar (Betés, Durán, Mestres y Nogués, 2008).
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
Método de difusión en agar (Kirby-Bauer) en pozo modificado.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sensibilidad.</li> <li>• Resistencia.</li> </ul>	Halo de inhibición (mm).

Fuente: Fuentes, Y. y Sulbarán, R., (2019).

**Tabla 2.** Operacionalización de la variable independiente

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química de los extractos de las hojas de <i>Thevetia peruviana</i> .	Independiente Cualitativa	Metabolito secundario o producto natural son una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que produce una planta y no parecen tener función directa con su crecimiento y desarrollo (Torres, 2004).
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
Pruebas químicas cualitativas también conocidas como Tamizaje fitoquímico.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alcaloides.</li> <li>• Esteroles y/o triterpenos.</li> <li>• Saponinas.</li> <li>• Compuestos fenólicos simples.</li> <li>• Taninos.</li> <li>• Flavonoides.</li> <li>• Quinonas y Antraquinonas.</li> <li>• Glicosidos cardiotónicos.</li> <li>• Cumarinas.</li> <li>• Sesquiterpenlactonas.</li> </ul>	<p>Alcaloides: la aparición de turbidez o precipitados.</p> <p>Esteroles y/o triterpenos: coloración azul o verde para esteroides; coloración es rosa, rojo, magenta o violeta para triterpenos.</p> <p>Formación de abundante espuma, para saponinas.</p> <p>Compuestos fenólicos: coloración de azul a negro.</p> <p>Un precipitado blanco indica presencia de taninos.</p> <p>Flavonoides: coloración naranja a rojo, para flavonas; si es rojo flavonoles y magenta flavononas.</p> <p>Antraquinonas y quinonas una coloración roja.</p> <p>Glucósidos cardiotónicos: coloración púrpura o violácea.</p> <p>Cumarinas: La presencia de fluorescencia azul-violeta.</p> <p>Las coloraciones roja, violeta o rosa para sesquiterpenlactonas.</p>

Fuente: Fuentes, Y. y Sulbarán, R., (2019).

## Hipótesis

Después de delimitar el problema de investigación y clasificar el estudio como una investigación confirmatoria, se propone la respuesta adelantada a la pregunta de investigación:

Si existe una relación causal entre la composición química de los extractos obtenidos de las hojas de *Thevetia peruviana* y la actividad antibacteriana, frente a cepas Grampositivas y Gramnegativas.

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

## **CAPÍTULO III**

### **MARCO METODOLOGICO**

#### **Tipo de Investigación**

El tipo de investigación es confirmatoria; ya que, se establecerá la relación causa - efecto entre la composición de los extractos obtenidos de las hojas de *Thevetia peruviana* y la actividad antibacteriana, frente a cepas Grampositivas y Gramnegativas.

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

#### ***Diseño de Investigación***

La presente investigación posee un diseño experimental, debido a que se sometieron los extractos obtenidos de las hojas de *Thevetia peruviana* a determinadas condiciones y de tal manera se observaron los efectos y reacciones que se produce en la determinación de actividad antibacteriana frente a diversas cepas Grampositivas y Gramnegativas.

#### **Población y Muestra**

La población está identificada por la planta *Thevetia peruviana*, ubicada en el jardín botánico Ing. Carlos Liscano de la Universidad de Los Andes, Lagunillas Estado Mérida. La muestra está representada por las hojas de la especie *Thevetia peruviana* perteneciente a la familia Apocynaceae.

## **Instrumento de Recolección de datos**

En este proyecto de investigación se empleó la observación estructurada; como técnica, la cual consiste en visualizar la presencia o ausencia de los diferentes fitocompuestos presentes en los extractos de la planta a través de reacciones químicas cualitativas. Además de describir, la sensibilidad o resistencia de los diferentes microorganismos en estudio mediante la medición de los halos de inhibición frente a las concentraciones de los extractos obtenidos de *T. peruviana*; descritos en las tablas de resultados 3 y 4 respectivamente.

## **Procedimiento o Metodología**

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

La planta se recolectó en el Jardín Botánico Ing. Carlos Liscano de la Universidad de Los Andes, Lagunillas Estado Mérida; la cual fue identificada botánicamente en el herbario M.E.R.F. "Dr. Luis Ruiz Terán" de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes, por el Ing. Forestal Juan Carmona.

### **Obtención del Extracto**

Las hojas fueron separadas del resto del material vegetal y colocadas en la estufa a 40°C y posteriormente se molieron. Para llevar a cabo el proceso de extracción de los componentes de la planta, se pesaron 100 g del pulverizado (Figura 12), y se empleó la maceración, durante 72 horas, que consistió en remojar el material debidamente molido, en disolventes como hexano y etanol. Transcurrido el tiempo de la maceración se filtró el líquido con papel de filtro para cada uno de los disolventes empleados (Figura 13),

donde a los líquidos filtrados se les denominó extracto etanólico y extracto hexanólico. Posteriormente cada uno de ellos se concentró en el rotavapor a presión reducida y temperatura controlada no mayor a 45°C (Figura 14). Finalmente, los extractos se colocaron en frascos color ámbar, y se llevaron a secar en la estufa a 40°C.

**Figura 12.** Pesado del material vegetal previamente molido



**Figura 13.** Filtrado obtenido de la maceración de las hojas de *T. peruviana*



**Figura 14.** Concentración de los extractos en el rotavapor



### ***Tamizaje Fitoquímico***

Una vez obtenidos los extractos secos se procedió a realizar el tamizaje fitoquímico (Esquema 1), que busca caracterizar de manera cualitativa los componentes y se evalúan de la siguiente manera:

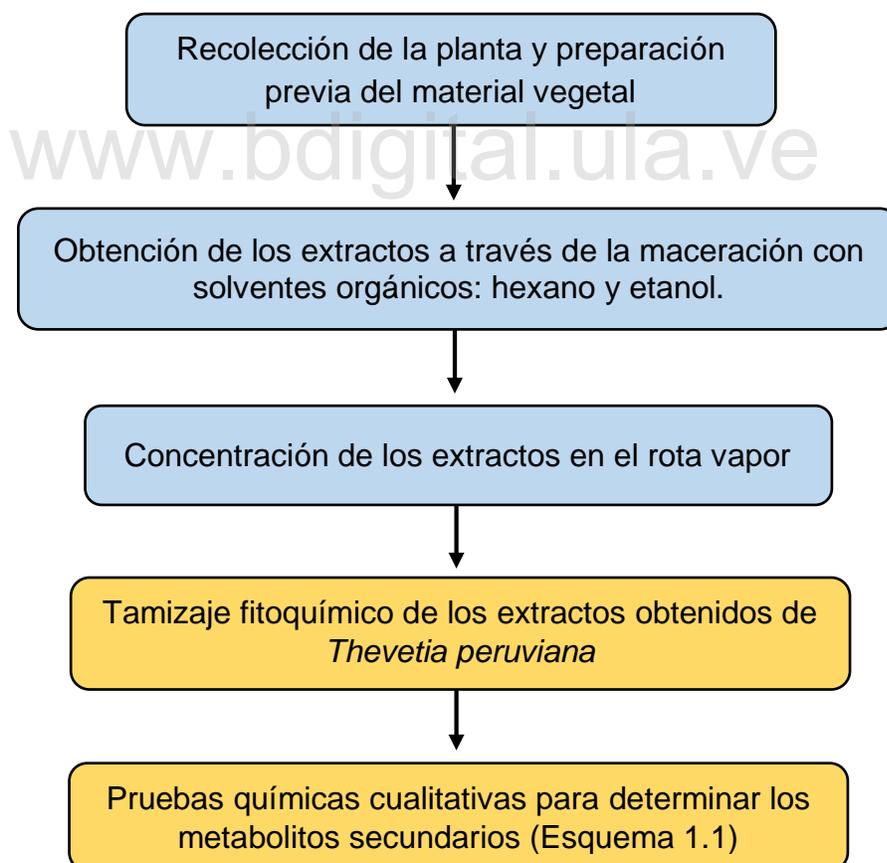
- **Alcaloides:** En tres tubos se disolvieron de 1-2 mg de la muestra del extracto etanólico en 5 mL de HCl para formar la sal de alcaloides con la adición de 2 a 3 gotas de sales de metales pesados como el ioduro de potasio (reactivo de Dragendorff), el ioduro de potasio y mercurio (reactivo de Mayer) y la sal del reactivo de Wagner, formándose precipitados color naranja; lo que permitió detectar la presencia de alcaloides básicos.
- **Esteroles y triterpenos:** Se realizó la prueba de Liebermann-Burchard. Se mezcló 1 mL de anhídrido acético más 1 mL de cloroformo y 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado con 1-2 mg de la muestra. La aparición de un color verde, se consideró como prueba positiva para esteroles la formación de un anillo verde.
- **Fenoles:** Prueba del  $\text{FeCl}_3$ : se disolvió la muestra (1-2 mg) en 1 mL de etanol añadiendo unas gotas de cloruro férrico al 5%, la coloración verde oscura o negra indicó la positividad de la prueba.

- **Flavonoides:** Prueba de Shinoda: se disolvieron 1-2 mg de la muestra en 1 mL de etanol y en otro tubo con 1 mL de hexano, a ambos tubos se agregaron unas gotas de HCl concentrado y virutas de magnesio; se interpretó como negativa la prueba; ya que, no hubo coloración roja intensa.
- **Quinonas y Antraquinonas:** Se disolvió la muestra (1-2 mg) en 1 mL de etanol y en otro tubo con 1 mL de hexano, y se agregaron unas gotas de hidróxido de amonio concentrado en ambos tubos, la ausencia de coloración roja indicó la negatividad de la prueba en los dos tubos.
- **Cumarinas:** Se disolvió la muestra (1-2 mg) en 1 mL de etanol y en otro tubo con 1 mL de hexano, se agregaron unas gotas de hidróxido de amonio concentrado a ambos tubos, se llevaron los tubos a la lámpara de luz ultravioleta (UV) a 365 nm, la ausencia de fluorescencia azul indicó la negatividad de la prueba.
- **Saponinas:** En un tubo de ensayo se colocó la muestra (1-2 mg) del extracto etanólico disuelta en 1 mL de agua y se agitó fuertemente. La ausencia de formación de espuma que debió permanecer por más de 15 minutos se consideró como negativa.
- **Glucósidos cardiotónicos y azúcares:** Prueba de Legal: 1-2 mg de la muestra se disolvieron en 2 o 3 gotas de piridina. Luego se añadió una gota de solución reciente al 5% de nitroprusiato de sodio en agua, 1-3 gotas de hidróxido de sodio 2N, se consideró positiva por la aparición de un color rojo intenso.  
Ensayo de Kedde: permitió reconocer en el extracto etanólico la presencia de glucósidos cardiotónicos. Una alícuota del extracto en etanol se mezcló con 1 mL de reactivo y se dejó reposar de 5 a 10 minutos. La positividad de la prueba se consideró con la presencia de una coloración violácea.
- **Sesquiterpenlactonas:** Prueba de Baljet: se prepararon dos soluciones. La solución A se le agregó 1 g de ácido pícrico y se disolvió en 2 mL de

etanol; para la solución B se añadieron 10 g de hidróxido de sodio y se disolvieron en 2 mL de agua. Para la prueba se colocaron 3 a 4 mg del reactivo, se consideró positiva la prueba con la formación de una coloración naranja a rojo.

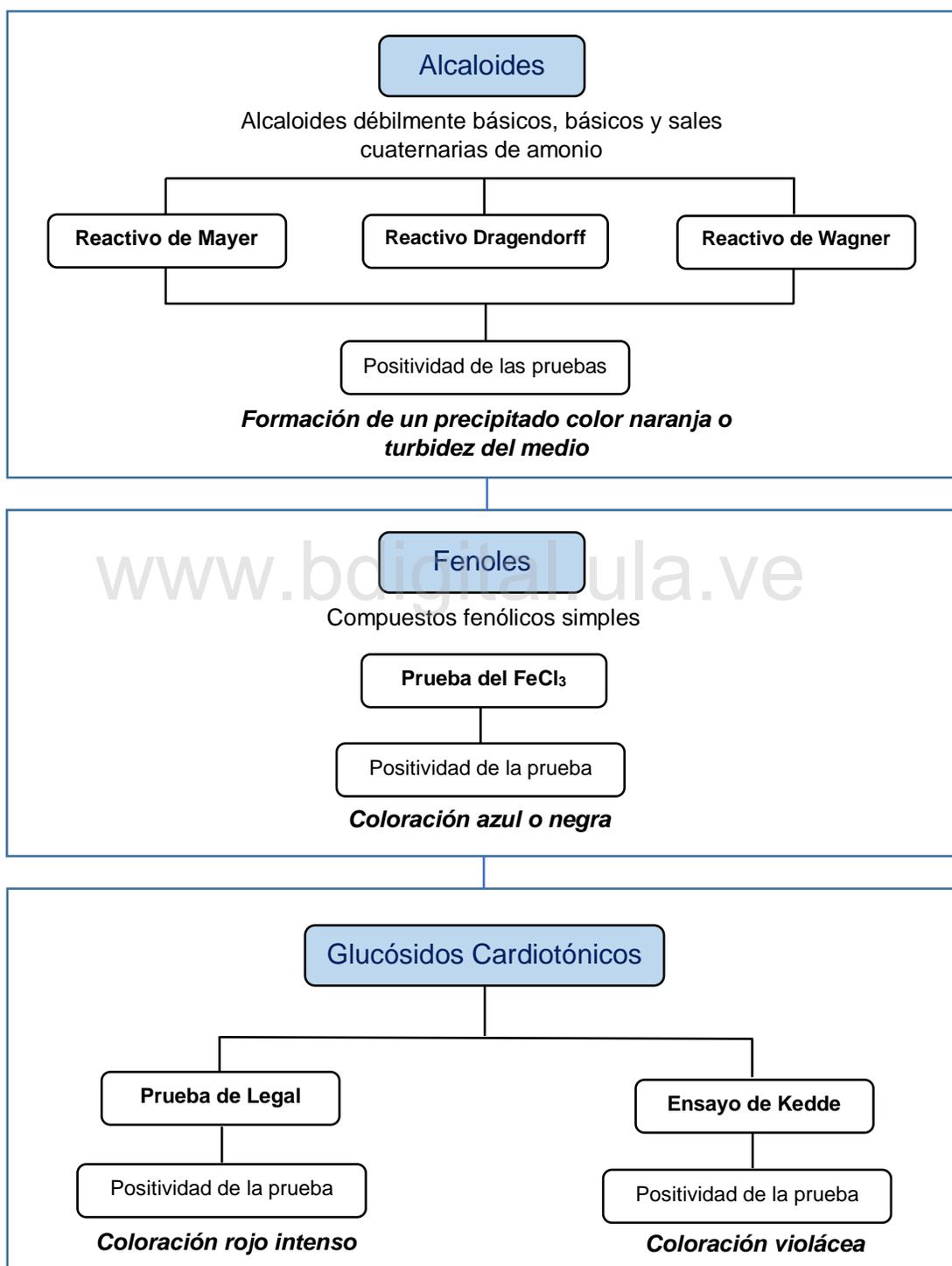
- **Taninos:** Ensayo de la gelatina: permitió reconocer la presencia de taninos en el extracto etanólico, se tomó 1-2 mg de la muestra y se disolvió en 2 mL de solución de gelatina. Se observó la ausencia del precipitado blanco que indica la negatividad de la prueba (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

**Esquema 1.** Procedimiento empleado para la identificación de los componentes de *T. peruviana*

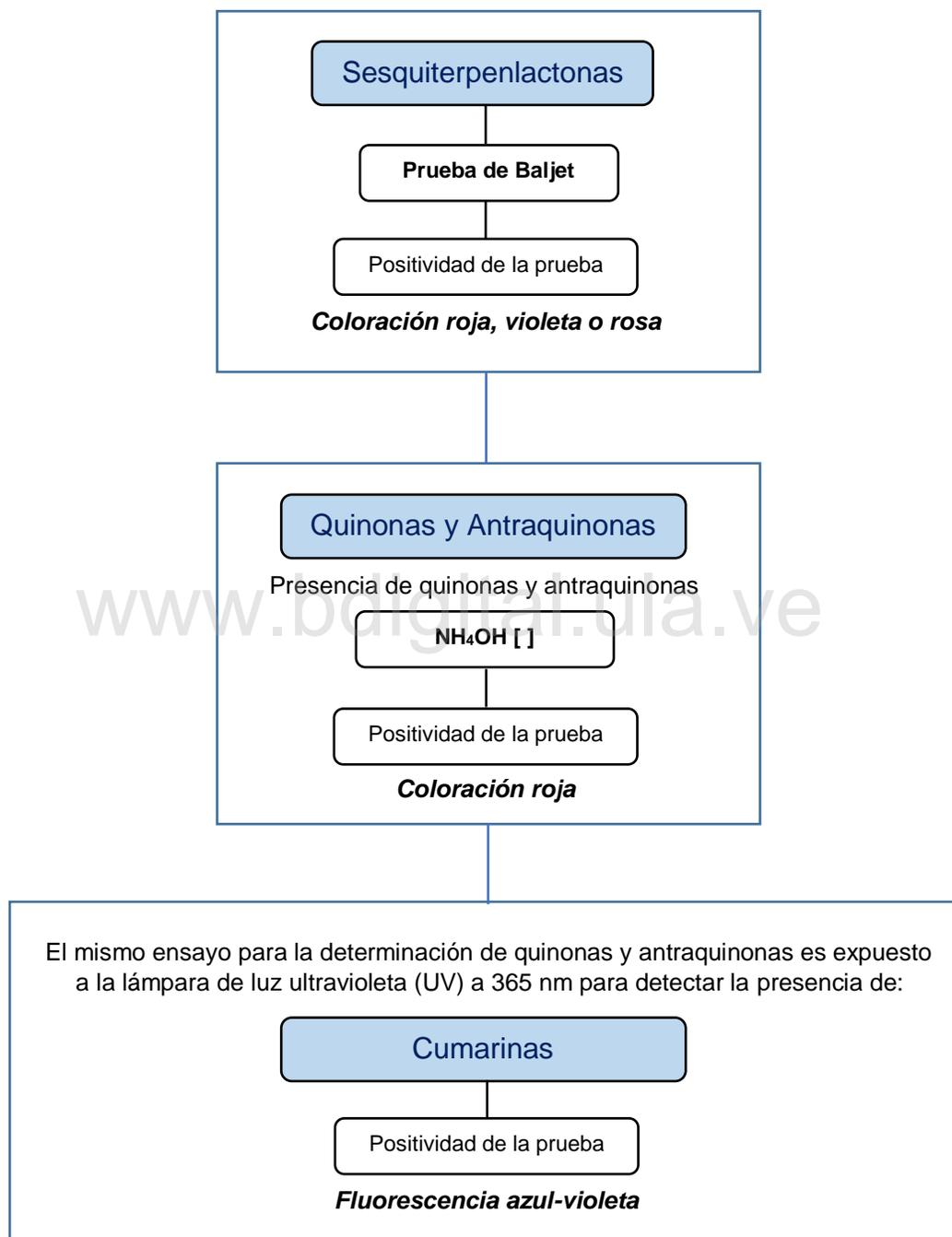


Fuente: Fuentes, Y. y Sulbarán, R. (2019).

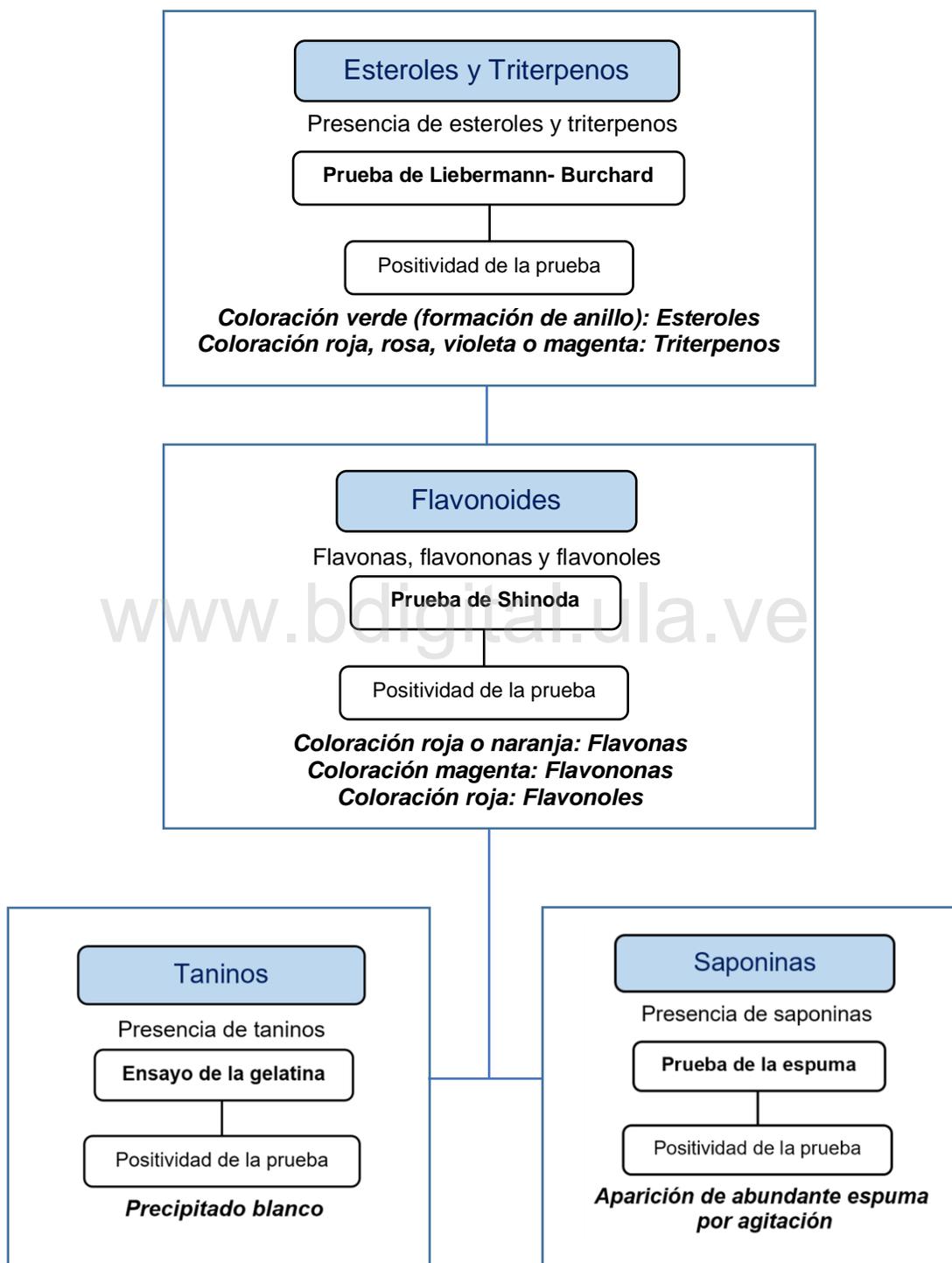
**Esquema 1.1.** Pruebas químicas cualitativas para determinar los metabolitos secundarios de los extractos de *T. peruviana*



**Esquema 1.1.** Pruebas químicas cualitativas para determinar los metabolitos secundarios de los extractos de *T. peruviana* (continuación)



**Esquema 1.1.** Pruebas químicas cualitativas para determinar los metabolitos secundarios de los extractos de *T. peruviana* (continuación)



Fuente: Fuentes, Y. y Sulbarán, R. (2019).

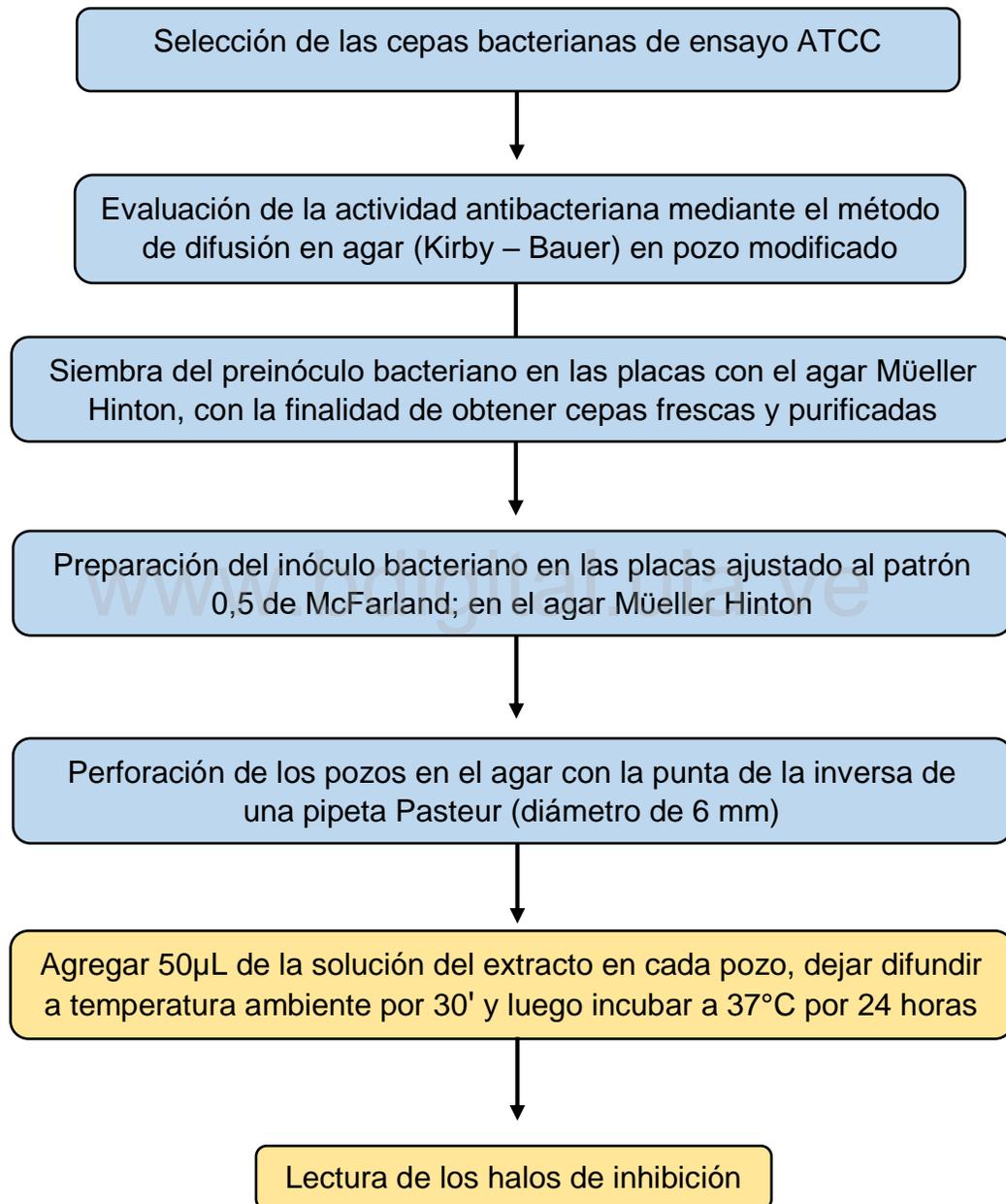
**Actividad antibacteriana por el método de difusión de agar  
(Kirby – Bauer) en pozo modificado**

El método de difusión en agar, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles (Barry, Amsterdam, Coyle, Gerlach y Thornsberry, 1979).

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer et al., (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos. El fundamento de esta determinación consiste en establecer, de forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos (National Committee for Clinical Laboratory, 1997).

El método se basó en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir la cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de la placa de agar con un medio de cultivo adecuado mezclado con el inóculo de la bacteria correspondiente y sobre el cual una vez solidificado se realizaron los pozos de forma equidistante con la inversa de una pipeta Pasteur estéril. A continuación, se procedió a su incubación a temperatura adecuada por 24 horas (Bata, Debiao y Saikia, 2006). Luego se midió el halo de inhibición y se compararon los efectos de las distintas sustancias sobre el microorganismo estudiado, con el antibiótico de control. La lectura de los resultados representa la actividad *in vitro* de la sustancia. El procedimiento de trabajo que se realizó en el laboratorio se presenta en el esquema 2.

**Esquema 2.** Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de *Thevetia peruviana* por el método de difusión de agar (Kirby – Bauer) en pozo modificado



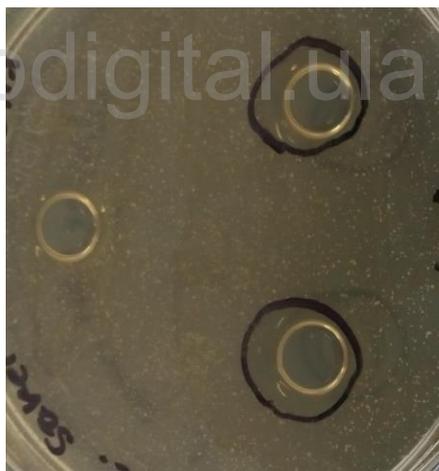
Fuente: Fuentes, Y. y Sulbarán, R. (2019).

- **Bacterias de ensayo:** Se seleccionaron cinco especies de las cuales dos fueron cepas bacterianas Grampositivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), y tres especies de cepas bacterianas Gramnegativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).
- **Preparación de los pre-inóculos bacterianos:** Las cepas a ensayar se incubaron en agar Müeller–Hinton a 37°C por 16 a 18 horas antes de hacer el ensayo microbiano, ya que es en ese tiempo donde 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). Una vez obtenidas las cepas bacterianas frescas y purificadas se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa en aro estéril, tomándose de ésta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en una solución de NaCl al 0,85% previamente estéril, hasta alcanzar la turbidez del patrón de McFarland N–0,5 equivalentes a  $1,6 \times 10^8$  UFC/mL.
- **Preparación de las placas:** A cada placa se le colocan 20 mL del agar Müeller–Hinton previamente preparado y esterilizado a una temperatura que no superior a los 40°C mezclado con 2 mL de la suspensión de esporas, posteriormente se deja solidificar a temperatura ambiente.
- **Determinación de la actividad antibacteriana por el método de difusión de agar (Kirby – Bauer) en pozo modificado:** Cada placa solidificada preparada con el medio e inóculo bacteriano se les procedió a realizar los pozos con la inversa de una pipeta Pasteur estéril quedando unos pozos de 6 mm, a cada pozo se le adicionan 50 µL de la muestra (extracto de las hojas de *Thevetia peruviana*) el control positivo representado por el antibiótico oxitetracilina de 5 mg/mL con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a evaluar; ya que, la oxitetracilina es un antibiótico de amplio espectro y puede ser usado como control positivo para bacterias Grampositivas y Gramnegativas, y el

control negativo representado por el Dimetil sulfóxido (DMSO) el cual utilizamos para disolver la muestra.

- **Preincubación e incubación:** Después de preparadas las placas con éstas, se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos para que las muestras difundieran (preincubación); y finalmente se incubaron a 37°C por 24 horas en atmósfera aeróbica.
- **Lectura de los halos de inhibición:** Finalizado el tiempo de incubación se procedió a medir con una regla milimetrada la zona clara alrededor del pozo de cada una de las placas que contenían las cepas bacterianas a estudiar, el control positivo y el control negativo (Figura 15).

**Figura 15.** Prueba antibacteriana resistente frente a los extractos de *Thevetia peruviana*



## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Resultados

Las hojas de *Thevetia peruviana* fueron sometidas a un proceso de maceración con dos solventes orgánicos; etanol y hexano, los cuales se llevaron al rotavapor para concentrar los extractos. A partir de esta técnica se obtuvieron 25 g de extracto etanólico y 45 g de extracto hexanólico. Los extractos presentaron un color verde intenso, olor característico y aspecto condensado.

Los extractos de las hojas de *Thevetia peruviana* fueron sometidos a las pruebas químicas preestablecidas para conocer el grupo de metabolitos secundarios contenidos en la muestra; tanto del extracto etanólico como del extracto hexanólico. Siendo de forma cualitativa la revelación de cada uno de los componentes por fenómenos químicos de reacción como: viraje de color principalmente, aparición de precipitados, turbidez del medio, producción de espuma por agitación y fluorescencia por exposición a la luz ultravioleta (UV). Estos fenómenos fueron los indicativos primordiales para la caracterización fitoquímica de las estructuras vegetales, señalados en las tablas 3 y 4:

**Tabla 3.** Reporte de resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Thevetia peruviana*

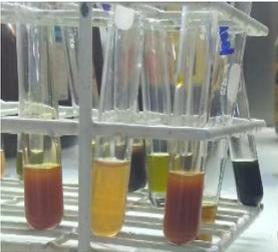
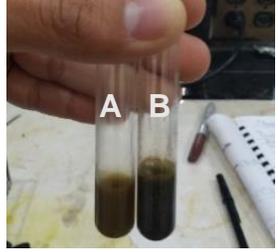
<b>Metabolito y Prueba</b>	<b>Extracto Hexanóico</b>	<b>Extracto Etanólico</b>
<b>Alcaloides</b>		
Reactivo de Mayer	ND	+
Reactivo de Wagner		+
Reactivo de Dragendorff		+
<b>Triterpenos / Esteroles</b>		
Liebermann-Burchard	+	+
<b>Compuestos Fenólicos</b>		
Prueba del FeCl <sub>3</sub>	ND	+
<b>Flavonoides</b>		
Prueba de Shinoda	-	-
<b>Quinonas / Antraquinonas</b>		
NH <sub>4</sub> OH []	-	-
<b>Cumarinas</b>		
Fluorescencia UV	-	-
<b>Saponinas</b>		
Espuma	ND	-
<b>Glucósidos cardiotónicos</b>		
Prueba de Legal	ND	+
Ensayo de Kedde		+
<b>Sesquiterpenlactonas</b>		
Prueba de Baljet	ND	+
<b>Taninos</b>		
Ensayo de la gelatina	ND	-

ND: No determinado

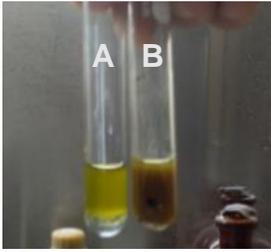
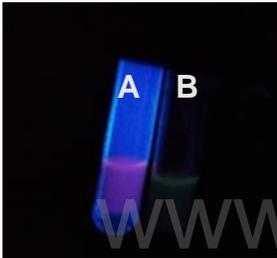
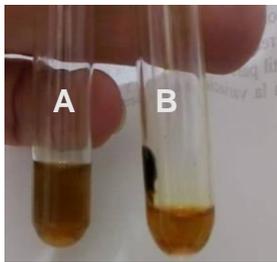
(-): Ausente

(+): Presente

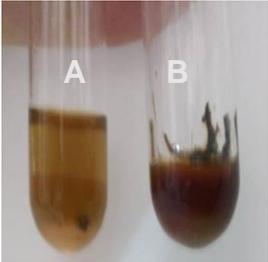
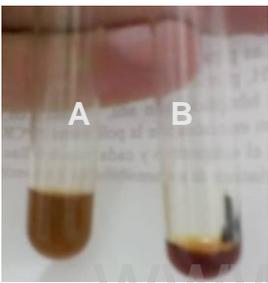
**Tabla 4.** Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Thevetia peruviana*

	<p><b>Prueba:</b> Reactivo de Dragendorff, reactivo de Mayer y reactivo de Wagner.</p> <p><b>Metabolitos determinados:</b> Alcaloides</p> <p><b>Reporte:</b> <b>Positivo</b></p> <p>Formación de precipitados color naranja.</p> <p>Tubos: solo extracto etanólico.</p>
	<p><b>Prueba:</b> Liebermann – Burchard</p> <p><b>Metabolitos determinados:</b> Esteroles</p> <p><b>Reporte:</b> <b>Positivo</b></p> <p>Formación de anillo verde.</p> <p>Tubo A: extracto hexanólico.</p> <p>Tubo B: extracto etanólico.</p>
	<p><b>Prueba:</b> Tricloruro Férrico (<math>\text{FeCl}_3</math>)</p> <p><b>Metabolitos determinados:</b> Fenoles</p> <p><b>Reporte:</b> <b>Positivo</b></p> <p>Formación de coloración verde oscura o negra.</p> <p>Tubo A: extracto hexanólico.</p> <p>Tubo B: extracto etanólico.</p>
	<p><b>Prueba:</b> Shinoda</p> <p><b>Metabolitos determinados:</b> Flavonoides</p> <p><b>Reporte:</b> <b>Negativo</b></p> <p>No hay presencia de color rojo intenso.</p> <p>Tubo A: extracto hexanólico.</p> <p>Tubo B: extracto etanólico.</p>

**Tabla 4.** Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Thevetia peruviana* (continuación)

	<p><b>Prueba:</b> <math>\text{NH}_4\text{OH}</math> []</p> <p><b>Metabolitos determinados:</b> Antraquinonas y Quinonas</p> <p><b>Reporte:</b> <b>Negativo</b></p> <p>No hay presencia de color rojo.</p> <p>Tubo A: extracto hexanóico.</p> <p>Tubo B: extracto etanólico.</p>
	<p><b>Prueba:</b> Fluorescencia UV</p> <p><b>Metabolitos determinados:</b> Cumarinas</p> <p><b>Reporte:</b> <b>Negativo</b></p> <p>No hay presencia de fluorescencia azul.</p> <p>Tubo A: extracto hexanóico.</p> <p>Tubo B: extracto etanólico.</p>
	<p><b>Prueba:</b> Espuma</p> <p><b>Metabolitos determinados:</b> Saponinas</p> <p><b>Reporte:</b> <b>Negativo</b></p> <p>No hay formación de espuma.</p> <p>Tubo: extracto etanólico.</p>
	<p><b>Prueba:</b> Legal</p> <p><b>Metabolitos determinados:</b> Glucósidos Cardiotónicos</p> <p><b>Reporte:</b> <b>Positivo</b></p> <p>Presencia de color rojo,</p> <p>Tubo A: extracto diluido en etanol.</p> <p>Tubo B: extracto puro.</p>

**Tabla 4.** Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Thevetia peruviana* (continuación)

	<p><b>Prueba:</b> Kedde</p> <p><b>Metabolitos determinados:</b> Glucósidos Cardiotónicos</p> <p><b>Reporte: Positivo</b></p> <p>Presencia de un color violáceo,  Tubo A: extracto diluido en etanol.  Tubo B: extracto puro.</p>
	<p><b>Prueba:</b> Reacción de Baljet</p> <p><b>Metabolitos determinados:</b> Sesquiterpenlactonas</p> <p><b>Reporte: Positivo</b></p> <p>Presencia de color naranja a rojo,  Tubo A: extracto diluido en etanol.  Tubo B: extracto puro.</p>
	<p><b>Prueba:</b> Ensayo de la Gelatina</p> <p><b>Metabolitos determinados:</b> Taninos</p> <p><b>Reporte: Negativo</b></p> <p>No hay formación de un precipitado blanco.  Tubo: extracto etanólico.</p>

### ***Evaluación de las Actividad Antibacteriana***

Se determinó a través del método de difusión en agar (Kirby-Bauer) en pozo modificado, tanto del extracto etanólico como del extracto hexanólico con concentraciones madre de 500 ppm de solución, las cuales no tuvieron acción antibacteriana sobre las cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* (Tabla 5).

**Tabla 5.** Evaluación de la actividad antibacteriana

Microorganismos de ensayo	Halos de inhibición en mm			
	Control positivo	Control negativo	Extracto etanólico	Extracto hexanólico
	Oxitetraciclina 5 mg/mL	DMSO	500 ppm	500 ppm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	12 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	11 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	11 mm	0 mm	0 mm	0 mm

### Discusión

En la presente investigación se obtuvieron por maceración los extractos de las hojas de *Thevetia peruviana*, los cuales por caracterización o tamizaje fitoquímico se evidenciaron componentes como alcaloides, triterpenos, esteroides, fenoles, glucósidos cardiotónicos y sesquiterpenlactonas. Al comparar el reporte de resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Thevetia peruviana* (Tabla 3) con los estudios anteriores, reflejó ser similar con respecto a los glucósidos cardiotónicos y otros compuestos de especies recolectadas en diferentes países.

En tal sentido, la porción esteroidal de los glucósidos cardiotónicos fue identificada con el reactivo de Lieberman-Burchard, por lo cual dio una coloración verde en esta prueba, asimismo, el anillo lactónico fue determinado con las pruebas de Legal, Baljet y Kedde. Por otra parte, en el extracto etanólico, a pesar de que se obtuvo un resultado positivo para alcaloides, se consideró como un falso positivo, debido a la presencia de lactonas en el extracto, las cuales producen interferencias con el ensayo de alcaloides produciendo un precipitado (Miranda y Cuéllar, 2012). De este modo, los resultados del análisis fitoquímico preliminar están acorde con la quimiotaxonomía de la familia a la que pertenece la especie estudiada (Apocynaceae), por cuanto reveló la presencia de glicósidos cardiotónicos y esteroides.

Tal es el caso del estudio realizado por Neira, (2018) en Cajamarca, Trujillo, Perú; el cual reportó componentes aislados de las hojas de *T. peruviana* como glucósidos cardiotónicos, alcaloides, triterpenos, esteroides y flavonoides, siendo este último un diferimiento con respecto al tamizaje realizado en esta investigación. Así mismo, Pacheco, Taborda y Torres, (2006) en la prueba de caracterización química reportaron como positivo para glucósidos cardiotónicos, flavonoides, triterpenoides y esteroides en las tres estructuras vegetales estudiadas, corteza, hojas y semillas. La planta fue recolectada en Barranquilla, Colombia.

En otro sentido, un estudio realizado por Amaringo, Hormaza, y Arias, (2011) en Medellín, Antioquia, en la región del Valle de Aburrá; reportaron la Thevetina B como el componente principal de las hojas de *Thevetia peruviana*. Con el extracto vegetal realizaron el tamizaje fitoquímico mediante las reacciones de Liebermann-Burchard, Keller Killiani y Kedde para determinar el núcleo esteroidal, desoxiazúcares y el anillo lactona respectivamente, característicos de glucósidos cardiotónicos. Las potenciales propiedades cardiotónicas descritas para este tipo de compuestos, lo convierten en una molécula de interés para el tratamiento de la insuficiencia

cardíaca congestiva. Su purificación fue alcanzada mediante cromatografía de columna, su identificación estructural a través de espectroscopia de RMN y cromatografía líquida de alta resolución acoplada a masas.

Con respecto a la actividad antibacteriana de los extractos de *Thevetia peruviana*, estos no presentaron en la prueba ningún tipo de inhibición frente a las cepas bacterianas de ensayo. Sin embargo, es importante señalar que los extractos fueron tratados con el protocolo de trabajo pertinente, así como las pruebas químicas necesarias para la cualificación de sus metabolitos. Los trabajos previos que respaldan la investigación, demuestran que la planta si tiene propiedades antibacterianas. Neira, (2018) mediante la técnica de difusión en disco Kirby Bauer, señaló que los halos de inhibición presentaron un promedio de 9,55 mm y 10,75 mm correspondiente a las concentraciones 25 ppm y 50 ppm del extracto etanólico de las hojas de *T. peruviana* sobre *E. faecalis* demostrando de esta forma que posee efecto antibacteriano a ambas concentraciones, siendo mayor dicho efecto a la concentración de 50 ppm.

Otra investigación realizada por Singh, Agrawal, Mishra, Uddin y Shukla, (2016), obtuvieron resultados de actividad antibacteriana máxima contra *E. coli* y casi nula frente a *Pseudomonas eruginosa*. En este mismo estudio los autores realizaron ensayos contra los hongos *Fusarium oxysporum*, *Alternaria helianthii*, *Curvularia lunata*, *Aspergillus niger* y *Penicillium spp*, los cuales no tuvieron ningún tipo de actividad. Así mismo, Pacheco y cols., (2006) estudiaron la actividad antifúngica de los extractos de *Thevetia peruviana* contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, microorganismo que tampoco obtuvo actividad. De esta forma se afirma que la planta no posee propiedades antifúngicas; así como, no existen estudios actuales que respalden la positividad de esta prueba.

En consecuencia, comparando los estudios anteriores con esta investigación, por lo menos los extractos de las hojas de *Thevetia peruviana*, debieron haber tenido actividad frente a las cepas de *E. coli*, *E. faecalis* y *P.*

*aeruginosa*. Por ello es necesario resaltar que debido a las condiciones climáticas y geográficas donde fue recolectada la planta, esta influye químicamente en su composición botánica y por ende los resultados obtenidos al momento de realizar la actividad antibacteriana.

Debe señalarse que, la planta recolectada en el jardín botánico Ing. Carlos Lizcano ubicada en Lagunillas, Estado Mérida se encuentra a una altitud de 800 m.s.n.m. a una temperatura que oscila entre los 18 a 24°C aproximadamente. Mientras que la especie de planta recolectada por Neira, (2018), en Cajamarca, Perú se encuentra ubicada a una altitud de 2.654 m.s.n.m. con una temperatura promedio anual de 19°C. y la especie vegetal recolectada por Pacheco y cols. (2006) en Barranquilla, Colombia a una altitud de 18 m.s.n.m. con una temperatura promedio anual de 27°C.

Con respecto a la técnica de difusión en agar (Kirby-Bauer) en pozo modificado; para la determinación de actividad antibacteriana, es más específica; ya que, esta permite confirmar un falso negativo cuando los extractos de la planta son retenidos cuando se aplica la técnica de difusión en disco; también la concentración de la solución madre empleada permitió una mayor superficie de contacto con el medio agararizado. Hecho que garantizó un buen desarrollo del estudio realizado y así constatar resultados verdaderos; sin embargo, se puede afirmar que, por las condiciones geográficas anteriormente descritas, los extractos obtenidos no tuvieron actividad alguna. También los componentes que cualitativamente fueron identificados pueden estar presentes en mínimas concentraciones y no fueron eficaces en el ensayo.

Cabe considerar por otra parte que, las investigaciones realizadas a la planta en la actualidad representan una contribución mayor con respecto a las propiedades tóxicas de la misma, así como de sus beneficios antioxidantes. Sin embargo, esta investigación profundizó el estudio en relación a la actividad antibacteriana; ya que, representa un punto de vital importancia para generar así aportes científicos novedosos para la sociedad.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

1. En el extracto de hexano y etanol obtenido de las hojas de *Thevetia peruviana* se determinó de forma cualitativa la presencia de alcaloides, triterpenos, esteroides, fenoles, glucósidos cardiotónicos y sesquiterpenlactonas y la ausencia de flavonoides, quinonas, antraquinonas, cumarinas, saponinas y taninos.
2. Los extractos obtenidos de las hojas de *Thevetia peruviana* no fueron activos frente a las cepas bacterianas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Klebsiella pneumoniae*, reportando que las 5 cepas son resistentes a los dos extractos estudiados.
3. Los resultados obtenidos en esta investigación representan un aporte científico con respecto al tamizaje fitoquímico de los extractos de las hojas de *Thevetia peruviana* constituyendo el primer reporte de los metabolitos secundarios *Thevetia peruviana* en Venezuela.
4. Se presume que la ubicación geográfica y las condiciones climáticas donde fue recolectada la planta, influyó en la concentración en la que se encuentran los metabolitos secundarios y por ende intervino de forma negativa en la actividad antibacteriana de los extractos.

## Recomendaciones

1. Aislar, identificar y cuantificar los metabolitos secundarios de los extractos de las hojas de *Thevetia peruviana* con el empleo de distintas técnicas como cromatografía, espectrofotometría de masas acoplada a cromatografía de gases, entre otras.
2. Evaluar si los metabolitos secundarios de los extractos de las hojas de *Thevetia peruviana* presentan actividad antibacteriana, antioxidante, tóxica y antifúngica de esta especie vegetal.

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

## REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Albornoz, A. (1980). Productos naturales sustancias y drogas extraídas de las plantas. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. pp. 203-224.
- Alippi, A., Reynaldi, F. y López, A. (2013). Evaluación del método epsilométrico E-test para la determinación de la sensibilidad a tetraciclina en *Paenibacillus larvae*. *Revista Argentina de Microbiología*, 45 (4): 257-261.
- Amaringo, F., Hormaza, A. y Arias, M. (2011). Thevetin B: glucósido cardiotónico predominante en *Thevetia peruviana*. *Scientia et Technica*, (49): 298-301.
- Anon, (2003). Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 1 (9): 1.
- Aular, Y., Peña, M., Pérez, J. y Díaz, M. (2003). Intoxicación por la administración de tabletas de *Thevetia peruviana* como tratamiento para bajar de peso: presentación de un caso, *Revista de Toxicología*, 20 (1): 221-223.
- Barclay, L., Begg, J. y Chambers, T. (1992). Adaptive resistance following single doses of gentamicin in a dynamic *in vitro* model. *Quimioterapia de Agentes Antimicrobianos*, (36): 1951-1957.
- Barreto, J. (1997). Efectos Antimicrobianos del diente de león (*Taxaxacum officinale*) y el gualanday (*Jacaranda obtusifolia*) sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* causantes de enfermedades de la piel (tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

- Barry, L., Amsterdam, D., Coyle, B., Gerlach, H. y Thornsberry, R. (1979). Simple Inoculum Standardizing System for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. *J. Clin. Microbiology.*, (10): 910-918.
- Basille, A., Giordano, S. y Castaldo, R. (1993). Antibiotic activity in *Thevetia neriifolia* and *Thevetia peruviana* (Apocynaceae). *Revista de la Asociación Americana de Farmacéutica.*, (27): 99-100.
- Bata M., Debiao L., Saikia A., (2006). Antibacterial activity of the crude extract of chinese Green Tea. *African Journal of Biotechnology*, 7 (19): 1571-1573.
- Becerra, G., Plascencia, A., Luévanos, A., Domínguez, M., y Hernández, I. (2009). Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29 (2): 70-76.
- Betés, M., Durán, M., Mestres, C. y Nogués, R. (2008). *Farmacología para Fisioterapeutas*. Madrid, España. Editorial Médica Panamericana.
- Brown, W. (2010). Medicinal plants. [Base de datos en línea]. Consultada el 26 de marzo de 2018 en: <http://www.missouribotanicalgarden.org/plant-science/plant-science/william-l-brown-center.aspx>.
- Bruneton J. (1991). *Elementos de la Fitoquímica y Farmacognosia*. Zaragoza, España. Acribia.
- Bruneton J. (2001). *Farmacognosia*, 2ª edición. Zaragoza, España: Acribia.
- Carrión, A. y García, C. (2010). Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia metódica (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Ecuador.
- Calsamiglia, S., Castillejos, L. y Busquet, M. (2005). Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno lechero (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Cruz, A. (2001). *Antibióticos Naturales*. México. Selector Actualidad Editorial.

- Debbia, A., Roveta, S., Schito, M., Gualco, L. y Marchese, A. (2001). Antibiotic persistence: The role of spontaneous DNA repair response. *Microbial Drug Resistance*, (7): 335-342.
- Domingo, D. y López, M. (2003). Plantas con actividad antimicrobiana. *Revista Especialidades en Quimioterapia*, 16 (4): 385-393.
- Ezcurra, C. (2005). Apocynaceae. *Catálogo de las Plantas Vasculares de la República Argentina II*, (74): 72.
- Fernández, F., López, J., Ponce, L., y Machado, C. (2003). Resistencia Bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32 (1): 41.
- García, A. (1975). *Flora medicinal de Colombia Botánica Médica*. Tomo II. Instituto de ciencias naturales, Universidad Nacional de Colombia. Imprenta Nacional. Bogotá.
- González, N. y Saltigeral, P. (1992). *Guía de antimicrobianos, antiparasitarios, antivirales y antimicóticos*. 3ra. Edición. México: Mc Grawhill Interamericana.
- Herrera, E., Bacad, I., Cristóbal, J., Tun, J. y Ruíz, E. (2011). Patogenicidad de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. y *Alternaria alternata* (Fries) Keissler en *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. y su Control *in vitro*. *Revista Fitosanidad*, 15 (4): 231-236.
- Herrera, P. y Rivera, L. (2013). Caracterización de *Thevetia* spp., especies forestales con potencial económico en Yucatán. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias*, (12): 7-16.
- Hoogesteger, C. (1994). *Uso de plantas medicinales*. México. Árbol Editorial.
- Kumar, P., Atreya, A. y Kanchan, T., (2015). *Thevetia peruviana*. [Base de datos en línea]. Consultada el 01 de noviembre de 2017 en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26456837>.
- Kummerer, K. (2004). Resistance in the environment. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (54): 311-314.
- Lizcano, A. y Vergara, J. (2008). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies

- vegetales *Valeriana pilosa*, *Esperomeles ferrugineas*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- López, G. (2001). *Los árboles y arbustos de la Península Ibérica e Islas Baleares*. Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Manrique, E. y Mosquera, O. (1997). Actividad antimicrobiana y caracterización química del aceite esencial de *Ulex europaeus* L. (Fabaceae) (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Marín, M. y Gudiol, F. (2003). Antibióticos  $\beta$ -lactámicos. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21 (1): 42-55.
- Marinoff, M. (2006). *Las Plantas Medicinales desde la Biblia a la actualidad*. Universidad Nacional del Noreste. Argentina.
- Martínez, A., Valencia, G., Jiménez, M., Mesa, M. y Galeano, E. (2008). *Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica*. Universidad de Antioquia. Antioquia, Colombia.
- Mensa, J., Garcia, E. y Vila, J. (2003). Macrólidos, cetolidos y estreptograminas. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21 (4): 200-208.
- Miranda, M. y Cuéllar, C. (2012). *Farmacognosia y productos naturales*. 2da Edición. Editorial Félix Varela. La Habana, Cuba.
- Murray, M., Rosenthal, S. y Pfaller, A. (2009). *Microbiología Médica*. 6ta. Edición. Editorial Elsevier.
- National Committee for Clinical Laboratory. (1997). Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. National Committee for Clinical Laboratory standards, Villanova , 17 (1): 12-16.
- Neira, J. (2018). Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* (Pers) Schum (Maichil) frente a cepas de *Enterococcus faecalis* (Tesis de pregrado). Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. Trujillo, Perú.

- OMS (2009). Medicina tradicional: definiciones. [Base de datos en línea]. Consultada el 01 de noviembre de 2017 en: <http://www.who.int/topics/traditional-medicine/definitions/es/>.
- OMS (2014). Resistencia a los antibióticos: Causas, consecuencias y formas de contenerla. [Base de datos en línea]. Consultada el 01 de noviembre de 2017 en: <https://www.greenfacts.org/es/resistencia-antibioticos/index.htm>.
- Pacheco, D., Taborda, M. y Torres, C. (2006). Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de hojas, cortezas y semillas de *Thevetia peruviana* (Persoon) Schum. *Revista Intrópico*, (3): 5-12.
- Pelczar, J. y Reid, R. (1992). *Microbiología*. La Habana, Cuba: Editorial Pueblo y Educación.
- Peña, D. (2011). Evaluación de la actividad antibacteriana de los alcaloides provenientes de las hojas de *Siparuna sessiliflora* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia.
- Pigrau, C. (2003). Oxazolidinonas y glucopeptidos. *Revista de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21 (3): 157-165.
- Ramírez, A., García, E., Longa, A., Sánchez, K., Nieves, M., Velasco, J., Araque, M. y Mosqueda, N. (2010). Manual práctico de bacteriología general. Mérida, Venezuela: Colección Textos Universitarios de la Universidad de Los Andes.
- Reyes, F., Palou, E. y López, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. Puebla, México: Temas Selectos.
- Rivas, M., Oranday, C. y Verde, S. (2016). *Investigación en Plantas de Importancia Clínica*. Nuevo León, México: Omnia Science.
- Roger, J. (2006). *Salud por las plantas medicinales*. Madrid, España: Safeliz, S.L.

- Ruiz, M. y Susunaga, C. (2000). Actividad antimicrobiana presente en partes aéreas de las especies *Bursera simaoruba* y *Bursera graveolens*, frente a microorganismos: *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma viride* y *Botrytis cinérea* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia.
- Salinas, P. (2010). Plantas Tóxicas en el Estado Mérida, Venezuela. Primera parte: Anacardiaceae, Apocynaceae y Asclepiadaceae. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes (MedULA) Mérida*, (1): 10-12.
- Singh, K., Agrawal, K., Mishra, V., Uddin, S. y Shukla, A. (2016). Características de *Thevetia peruviana*. *International Research Journal of Pharmacy*, 3 (4), 74-77.
- Tafur, J., Torres, A., y Villegas, V. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Revista de la Asociación Colombiana de Infectología*, 12 (3), 217-26.
- Torres, C. (2004). Investigación en la transformación secundaria de frutos, tubérculos, flores, hojas o tallos de especies pertenecientes a ecosistemas andinos. Jardín Botánico José Celestino. Bogotá, Colombia.
- Torres, N. (2009). Actualización sobre intoxicación con *Thevetia peruviana*, *Revista de Toxicología en Línea*. [Base de datos en línea]. Consultada el 30 de enero de 2017 en: [http://www.sertox.com.ar/img/item\\_full/19001.pdf](http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19001.pdf). pp. 10-16
- Wen, L., Haddad, M., Fernández, I., Espinoza, G., Ruiz, E., Neyra, E., Bustamante, B., Rojas, R. (2011). Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77 (3): 30-35.