



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE LA FACULTAD DE
FARMACIA Y BIOANÁLISIS

“Dr., Alfredo Nicolás Usubillaga Del Hierro”

**ESTUDIO BIOLÓGICO DEL *Himatanthus attenuatus* RECOLECTADA EN
EL ESTADO AMAZONAS – VENEZUELA**

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

Autor: Soleil Odalys Largo Suarez

Tutor: Prof. Luís B. Rojas F.

MÉRIDA, OCTUBRE 2

Dedicatoria

Esta tesis se lo dedico primeramente a DIOS, la Virgen del Carmen y a todos mis Santos, por haberme dado lo más valioso: la alegría de vivir, guiarme todos los días, por su bondad y su amor, gracias a la fe, me ayudaron a no rendirme y cumplir con éxito esta meta, por haberme mostrado una naturaleza sabia que lo podemos encontrar en las plantas.

A mis padres, SANDRA SUAREZ y JOSÉ LARGO, por su apoyo inagotable amor y cariño, por sus consejos y sabias palabras que hoy me llenan de orgullo, fortaleza y por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien. ¡Esto también es su logro! Los amo.

A mis hermanos RICARDO LARGO Y JOSÉ G. LARGO, con los cuales he compartido toda mi vida y han sido mi fuente de inspiración para lograr esta gran meta, espero sea de gran ejemplo. Los amo.

A mi abuelo LEBRANDO SUAREZ, a mi abuela HIGINIA MIRABAL y mi tía MARELIS LARGO, que me cuidan desde el cielo por sus consejos y amor incondicional.

A toda mi familia que de alguna u otra manera han contribuido en mi formación, a mis amistades que estuvieron conmigo en este maravilloso y largo recorrido.

A ROBERTH ALAMO, por apoyarme y estar conmigo en los buenos y malos momentos de mi vida y mi carrera profesional, por ser mi motor para seguir adelante, por tu paciencia y amor incondicional. Te amo.

A mis profesores por sus enseñanzas muy valiosas que compartieron conmigo en esta etapa de preparación como profesional.

A la Universidad de Los Andes (ULA), por brindarme la oportunidad de prepararme como profesional.

A todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este logro.

Soleil Largo

Agradecimiento

Agradezco a la UNIVERSIDAD DE LOS ANDES por haberme aceptado a ser parte de ella y abrirme su puerta del saber, para poder desarrollar capacidades y conocimientos científicos y formarme profesionalmente con valores para enfrentar nuevos retos; así mismo a todos mis profesores que formaron parte de mi vida estudiantil por compartir sus conocimientos y experiencias.

A mi asesor de tesis M.Sc. PhD. LUIS ROJAS por su dedicación, orientación y compromiso, por compartir su experiencia para desarrollar y culminar el presente trabajo de tesis.

A la M.Sc PhD MARIA WALTIERI, quien me guio con su experiencia y me dio las pautas necesarias para iniciar con un proyecto que hoy en día se convirtió en mi trabajo de grado

A todos los facilitadores, guías, profesores y orientadores que se entregaron a la digna misión de formarme como profesional en especial a la Dra. Rosa Aparicio, Dra. Ysbelia Obregón y Dra. Yndra Cordero de Rojas adscrito del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (IIFFB), “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”

Soleil Largo

Índice General

	Pp.
Índice de Esquemas	viii
Índice de Tablas	ix
Índice de Figuras	x
Resumen	xi
Introducción	1
Capítulo I. El Problema	5
Planteamiento del problema.....	6
Justificación e importancia de la investigación.....	7
Objetivos de la investigación.....	8
<i>Objetivo general</i>	8
<i>Objetivos específicos</i>	8
Alcances y limitaciones de la investigación.....	9
Alcances de la Investigación.....	9
Limitaciones de la Investigación.....	9
Capítulo II. Marco Teórico	10
Trabajos Previos.....	10
Antecedentes históricos o epistemológicos.....	12
Bases teóricas.....	13
Familia Apocynacea.....	13
Usos de algunos géneros de la planta Apocynaceae.....	13
Características botánicas de la familia Apocynaceae.....	14
Componentes químicos de la familia Apocynaceae.....	15
Actividad biológica de algunos géneros y especies de la familia Apocynaceae.....	15
Clasificación taxonómica de <i>Himatanthus attenuatus</i>	16

Componentes químicos presentes en los extractos de <i>Himatanthus</i>	20
Extractos.....	21
Obtención de los extractos.....	21
Concentración de los extractos.....	22
Técnicas para la obtención de extractos vegetales.....	24
Extractos botánicos para fines farmacéuticos.....	25
Materia prima vegetal para fines farmacéuticos.....	25
Beneficio de los extractos.....	27
Desventajas de los extractos.....	28
La medicina tradicional.....	28
Naturaleza y cultura en el Estado Amazonas, Venezuela.....	28
Análisis de identificación de los extractos.....	29
Separación e identificación.....	29
Análisis cromatográfico.....	29
Tamizaje o screening fitoquímico.....	31
Bacterias.....	34
Bacterias grampositivas.....	40
Bacterias gramnegativas.....	40
Antibióticos.....	43
Resistencia bacteriana.....	51
Métodos para la determinación de la actividad antibacteriana.....	52
Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	53
Definición Operacional de Términos.....	55
Operacionalización de las variables.....	56
Hipótesis.....	59
Capítulo III. Marco Metodológico.....	60
Tipo de Investigación.....	60
Diseño de la investigación.....	60

Unidad de Investigación.....	61
Selección del Tamaño de la Muestra.....	61
Sistema de variables.....	61
Instrumento de recolección de datos.....	61
Procedimientos de la investigación.....	61
Identificación de los compuestos químicos de los extractos de corteza externa e interna del <i>Himatanthus attenuatus</i>	63
Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de la corteza externa e interna del <i>Himatanthus attenuatus</i>	65
Análisis de la actividad antibacteriana.....	62
Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	65
Diseño de Análisis.....	68
Capítulo IV. Resultados y Discusiones	71
Análisis fitoquímico de la especie vegetal de <i>Himatanthus attenuatus</i>	72
Evaluación de la actividad antibacteriana.....	73
Capítulo V. Conclusiones y Recomendaciones	75
Conclusiones.....	75
Recomendaciones.....	76
BIBLIOHEMEROGRAFIAS	77
ANEXOS	88
Anexo A: Obtención de los extractos de <i>Himatanthus attenuatus</i>	89
Anexo B: Resultados del tamizaje Fitoquímico de los extractos de <i>Himatanthus attenuatus</i>	90
Anexo C: Halos de inhibición del extracto de hexano obtenido de las cortezas externas e internas del <i>Himatanthus attenuatus</i> frente a las cepas ensayadas.....	92

Índice de Esquemas

Esquema	Pp.
1. Procedimiento para la obtención de los extractos hexano y etanol de las cortezas externas e internas de <i>Himatanthus attenuatus</i>	69
2. Procedimiento experimental para el tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de los extractos de hexano y etanol de la corteza externa e interna de <i>Himatanthus attenuatus</i>	70

www.bdigital.ula.ve

Índice de Tablas

Tabla	Pp.
1. Algunas plantas de la familia Apocynaceae que presentan actividad biológica...	16
2. Clasificación taxonómica de <i>Himatanthus attenuatus</i>	20
3. Condiciones de Cosecha.....	25
4. Clasificación taxonómica de <i>Staphylococcus aureus</i>	38
5. Clasificación taxonómica de <i>Enterococcus faecalis</i>	39
6. Clasificación taxonómica de <i>Escherichia coli</i>	40
7. Clasificación taxonómica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
8. Clasificación taxonómica de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	42
9. Enfermedades causadas por las cepas bacterianas utilizadas en este estudio.....	42
10. Clasificación de los antibióticos penicilinas y cefalosporinas.....	45
11. Antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas.....	47
12. Operacionalización de la variable dependiente actividad antibacteriana de los extractos de la corteza de <i>Himatanthus attenuatus</i>	57
13. Operacionalización de la variable independiente composición química de los extractos de la corteza de <i>Himatanthus attenuatus</i>	58
14. Halos de inhibición de los controles positivos para las cepas de referencia internacional.....	66
15. Resultados del análisis fitoquímico de la especie vegetal de <i>Himatanthus attenuatus</i>	72
16. Resultados de la actividad antibacteriana de la especie vegetal de <i>Himatanthus attenuatus</i> .	74

Índice de Figuras

Figura	Pp.
1. Estructura química de la quinina	15
2. Estructura química del Iridano.....	15
3. Estructura química del ácido ursólico.....	15
4. Tallo de <i>Himatanthus attenuatus</i>	18
5. Hojas de <i>Himatanthus attenuatus</i>	18
6. Flores de <i>Himatanthus attenuatus</i>	19
7. Proceso de obtención de extractos a partir de plantas medicinales.....	19
8. Estructura de la célula bacteriana.....	24
9. Estructura de la pared celular de las Bacterias grampositivas y gramnegativas	35
10. Sitio de acción de los antibióticos sobre la célula bacteriana.....	38
11. Cromatografía en Capa Fina (CCF).....	49
12. Revelado de las placas.....	64



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“Dr. Alfredo Nicolas Usubillaga Del Hierro”



ESTUDIO BIOLÓGICO DEL *Himatanthus attenuatus* RECOLECTADA EN EL ESTADO AMAZONAS - VENEZUELA

**Autor: Soleil Odalys
Largo Suarez
Tutor: Prof. Luis B.
Rojas F.**

Resumen

Con el fin de ahondar con el conocimiento de la flora venezolana, particularmente aquella presente en la región sur del país, se eligió la especie *Himatanthus attenuatus* para profundizar en su composición química y así establecer una potencial utilidad medicinal o industrial. *Himatanthus attenuatus* (Apocynaceae), es un árbol, originario del Centro Sur de América tropical. Se distribuye por Panamá, Guayana Francesa, Guyana, Venezuela, Bolivia, Colombia, Ecuador, Brasil y Perú. El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antibacteriana de los extractos hexano y etanol de las cortezas vegetal externa e interna del *Himatanthus attenuatus*, recolectada en el Estado Amazonas-Venezuela, frente a bacterias ATCC en el Laboratorio de Productos Naturales y Actinomicetos del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de la Universidad de Los Andes. Esta investigación fue exploratoria, con un diseño experimental-transversal. Los metabolitos secundarios se identificaron a través de pruebas químicas preliminares y Cromatografía de Capa Fina (CCF). Se empleó el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Los resultados obtenidos de los extractos revelaron la presencia de triterpenos y alcaloides. El ensayo de la actividad antibacteriana permitió conocer que los extractos de *Himatanthus atenuathus* no fueron activos frente a las cepas ensayadas. Se concluye que debido a las condiciones climáticas donde se recolectada dicha especie influyó la concentración de los metabolitos secundarios y por ende intervino de forma negativa en la actividad antibacteriana de dichos extractos.

Palabras clave: *Himatanthus attenuatus*, alcaloides, triterpenos, actividad antibacteriana.

Introducción

Desde los tiempos más remotos, las sociedades humanas han recurrido a los productos naturales como fuente de medicamentos y agentes terapéuticos, dado que poseen la propiedad de producir principios activos, los cuales propician cambios en el funcionamiento del organismo para aliviar síntomas de malestar y establecer el equilibrio (Calixto, 2005). En el ámbito científico, los productos naturales han sido utilizados arduamente en la búsqueda de nuevos fármacos que reduzcan, inhiban y en muchos casos destruyan los principios patológicos de numerosas enfermedades (Loaces, Rodríguez y Cabrera, 2003).

Los microorganismos son causantes de muchas enfermedades infecciosas, entre las cuales se encuentran, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, que causan enfermedades gastrointestinales, los causantes de infecciones en heridas y piel como *Staphylococcus aureus* y especies de *Streptococcus* causantes de infecciones respiratorias (Loaces y col, 2003).

Los productos naturales originados de las plantas pueden ser considerados como una fuente incalculable de nuevos compuestos químicos de uso potencial en la medicina (Compagnone, Suárez, Castillo, Delle, y Ferrari, 1999). Tales como los extractos de plantas y/o sus compuestos puros proveen oportunidades ilimitadas para el desarrollo de nuevas drogas que puedan ser utilizadas para el control microbiano. A este respecto, el desarrollo de farmacéuticos comienza con la identificación de los principios activos, para después utilizando diversos ensayos biológicos obtener información sobre la capacidad antimicrobiana del compuesto de interés, ya sea obteniendo la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) (Ncube, Afolayan y Okoh, 2008).

Para determinar su correcta evaluación existen pruebas estandarizadas que se llevan a cabo con el fin de valorar su actividad, en especial la antimicrobiana, a través de diferentes métodos *in vitro* principalmente desarrollados en el laboratorio y así

establecer a qué microorganismos son sensibles o muestran una resistencia ya sean a bacterias, hongos y protozoos (Ramírez y Marín, 2009); además se deben considerar diversos ensayos de toxicidad, para asegurar su consumo (Cos, Vlietinck, Berghe y Maes, 2005).

Se ha reportado que los extractos de muchas plantas pertenecientes a la familia Apocynaceae son usadas en la medicina tradicional. La familia comprende aproximadamente 200 géneros y 2.000 especies. Entre los géneros se encuentran; *Carpodinus*, *Landolphia*, *Hancornia*, *Funtumia* y *Mascarenhasia* fueron una fuente secundaria de caucho, así mismo el género *Himatanthus* para algunas enfermedades cancerígenas (Watson y Dallwitz, 1994).

La familia Apocynaceae comprende aproximadamente, distribuidas por las regiones tropicales y subtropicales del planeta. Son plantas de hábito variado, hierbas, subarborescentes, árboles y trepadoras encontradas en la flora brasileña y, particularmente, en Río de Janeiro. (Watson y Dallwitz, 1994).

El género *Himatanthus*, único en América del Sur y pertenece a la familia de las Apocynaceae se destaca por incluir especies utilizadas comúnmente como plantas medicinales y tienen amplia variedad de compuestos farmacológicamente activos, incluyendo alcaloides del indol, iridoides y ésteres triterpénicos (Di Stasi y Hiruma, 2002). Los alcaloides indólicos representantes del género presentan diversas actividades farmacológicas, entre ellas la antimicrobiana (Silva, Rao, Pinto, Cordero, Tamborini y Bolzani, 1998); antitumoral (Wood, Lee, Vaisberg y Kingston, 2001), antiprotozoario (Wood y col, 2001). Por ejemplo, en el caso de las mujeres). La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha estimado que más de 80 % de la población mundial, especialmente en comunidades indígenas y rurales, recurre a la medicina tradicional para atender sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales involucran el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Akerle, 1993; Farnsworth, Akerle, Bingle, Soejarto y Guo, 1985); Kala, 2000; Tabuti, Dhillon y Lyea, 2003; Katewa, Chaudhry y Jain, 2004).

En Venezuela, la información referida a la disponibilidad y empleo de las plantas medicinales expedidas en los mercados populares, no se encuentra formalizada en su totalidad (Amaya y Casale, 2000; Cumana, 2002; Bermúdez y Velásquez, 2005). Se han desarrollado estudios sobre la etnobotánica en diferentes zonas de Venezuela, pero no se han abarcado las distintas regiones del país. En el año 2000, se inició el proceso de formalización del mercado de plantas medicinales, por parte del sector público y privado (Red Venezolana de Biocomercio), mediante la agrupación de los sectores involucrados y la unión productiva, haciendo estudios afines al área y a través de la realización de convenios con el propósito de impulsar el desarrollo y uso sustentable de estos recursos naturales. Incluso, se considera las plantas medicinales como un rubro de posibilidades económicas en el país (Castillo, 1998; Narváez, Stauffer y Gertsch, 2000)

Además, se debe considerar el hecho de que la existencia de este tipo de conocimiento local depende principalmente de su transmisión verbal de una generación a otra (Sherstha, 2003). Por lo tanto, en la actualidad, resulta urgente dirigir esfuerzos para el rescate y conservación de la medicina tradicional, así como inventariar el uso tradicional de las plantas con valor terapéutico, especialmente en países tropicales como Venezuela, donde la información etnobotánica relacionada con plantas medicinales es deficiente, y donde aproximadamente unas mil especies corren el peligro de desaparecer como fuente de medicamentos, por falta de transmisión del conocimiento del uso ancestral (Vele, Milano, Fernández, Williams y Michelangeli, 1999).

Sin embargo, los extractos de las plantas medicinales se utilizan por el hombre desde la antigüedad para la cura de múltiples dolencias. Se obtienen mediante la separación de porciones biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, con el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado (Akerele, 1988; Calixto, 2005).

La justificación de esta investigación estuvo representada por el uso de plantas como alternativa terapéutica para tratar enfermedades, los metabolitos secundarios

como responsables del efecto terapéutico. Así como la identificación preliminar de los metabolitos secundarios, el fundamento teórico acerca de la obtención de extractos vegetales, el cual le da consistencia lógica al evento de estudio de esta investigación: evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos (hexano y etanol) de la corteza externa e interna del *Himatanthus attenuatus*.

El objetivo trazado en esta investigación fue evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de hexano y etanol de la corteza vegetal, conocida como amapola sabanera (*Himatanthus attenuatus*), frente a bacterias ATCC. De esta manera realizar aportes en cuanto a las potencialidades de uso de la especie como agente antibacteriano.

Este informe final de la Tesis de Grado ha sido estructurado en cinco Capítulos: El Capítulo I, denominado El Problema, contiene los siguientes elementos: Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia de la Investigación, Objetivos de la Investigación así como los Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II titulado Marco Teórico, que abarca: los Trabajos Previos, los Antecedentes Históricos o Epistemológicos, las Bases Teóricas, la Definición Operacional de Términos, la Operacionalización de las Variables y la Hipótesis. El Capítulo III, llamado Marco Metodológico que comprende los siguientes puntos: Tipo de Investigación, Diseño de Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, los Instrumentos de Recolección de Datos, los Procedimientos de la Investigación y el Diseño de análisis. El Capítulo IV, denominado Resultados y Discusión y finalmente el Capítulo V, titulado: Conclusiones y Recomendaciones.

El estudio se realizó con la finalidad de evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de hexano y etanol de la corteza vegetal externa e interna del *Himatanthus attenuatus* recolectada en el estado Amazonas – Venezuela, frente a bacterias ATCC, en los Laboratorios de Productos Naturales y Actinomicetos del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (IIFFB), Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de la Universidad de Los Andes.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Cetrángolo, Bertranou, Casanova y Casalí (2013), contempla que en la actualidad, el sistema de salud de nuestro país se caracteriza por ser muy deficiente, con una amplia limitación de cobertura de las demandas de la comunidad y zonas rurales más alejadas del estado venezolano específicamente en la población de San Fernando de Atabapo Estado Amazonas, cabe mencionar también la falta de centros de salud en estos lugares alejados, asimismo el cuidado de la salud de la población en general se agravan cada vez más, ya que estas comunidades no cuentan con recursos necesarios, y a la vez la dotación de medicamentos es insuficiente, de modo que se convierte en un problema de salud pública.

Según el Seguro Social de Salud (Essalud, 2013), actualmente se destaca la importancia de una adecuada nutrición, ya que forma parte de uno de los ejes principales para prevenir distintas patologías o enfermedades. De acuerdo a muchos estudios e investigaciones afirman que una mala alimentación se relaciona directamente con el desarrollo de múltiples patologías, provocando cada vez un alto porcentaje de morbilidad y mortalidad.

Madigan, Martinko y Parker (2004), consideran que las bacterias son microorganismos con alto grado de patogenicidad; ya que es un agente patógeno causante de innumerables infecciones y enfermedades en todo el ámbito; tanto en la comunidad como a nivel hospitalario; convirtiéndose así cada vez más en un problema de salud pública, ya que si las infecciones no son tratadas a tiempo; las cuales agravan el estado patológico inicial, y en algunos casos tratamientos incompletos, como consecuencia se produce resistencia bacteriana.

Se ha demostrado que algunos extractos poseen actividad antibacteriana, antifúngica (Bischof, 1995) y propiedades antioxidantes (Ramírez, García, Longa, Sánchez, Nieves, Velasco, Araque, y Mosqueda 2006). Los constituyentes químicos de los extractos presentan una amplia variedad de estructuras; un gran porcentaje contiene alcoholes o éteres, otros son cetonas o aldehídos (Seyhan, 2000).

La acción antimicrobiana de los componentes de los extractos vegetales se debe al carácter lipofílico de su esqueleto de hidrocarburos y principalmente al carácter hidrofílico de sus grupos funcionales. La actividad de los extractos en orden decreciente va desde los fenoles > aldehídos > cetonas > alcoholes > éteres > hidrocarburos (Kalemba y Kunicka, 2003). Los extractos de las plantas son muy populares en algunos países, las drogas son usadas para el tratamiento de diversos padecimientos como la hiperplasia prostática benigna sintomática (HPB) y las infecciones de las vías urinarias y gastrointestinales (Fangio , Lurlina y Fritz 2007). Los productos naturales obtenidos de plantas han asumido un papel importante en la acción microbicida, los metabolitos secundarios de las plantas han presentado efectos antimicrobianos y algunos de estos han tenido una relevante importancia en tratamientos terapéuticos contra un gran número de enfermedades (Fangio y col, 2007). Comprobándose que si es posible la utilización de especie vegetal como alternativa natural.

Considerando lo anterior expuesto y debido a la gran diversidad de plantas tradicionales y ancestrales del estado Amazonas utilizadas por las etnias en zonas rurales como tratamientos primarios en la atención médica contra enfermedades, sirvió como base para proponer las siguientes preguntas de investigación:

¿Cuál es la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos (hexano y etanol) de las cortezas externas e internas *del Himatanthus attenuatus*, en cepas de referencia internacional en el Laboratorio de Productos Naturales y Actinomicetos del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, durante el periodo de junio de 2017 hasta mayo de 2018?

Justificación e Importancia de la Investigación

Las enfermedades pueden ser causadas por diferentes microorganismos, en los cuales se encuentran las bacterias y los hongos. La mayoría de las bacterias no hacen daño, menos del uno por ciento (1 %) de ellas causa enfermedades; la interacción entre la microbiota habitual y el ser humano es beneficiosa pero también pueden surgir cambios dentro del cuerpo causando diferentes enfermedades, entre los ejemplos de bacterias que causan malestar se incluyen *E. Coli*, *Klebsiella spp*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* (Silvera, 2018).

Por lo tanto, el obtener los extractos de las plantas y estudiar sus compuestos activos, permite conocer aún más los recursos naturales con que se cuenta y así darles un mejor aprovechamiento; proporcionándoles un mayor valor agregado al comercializarlas como productos puros o extractos. Los compuestos activos son aislados como extractos crudos o aceites esenciales de plantas. Una vez extraídos y purificados, pueden usarse como tal, o con la ayuda de la química sintética, utilizarlos como precursores de fármacos, además, se debe aprovechar todos esos conocimientos y métodos tradicionales que se han venido desarrollando a través del tiempo, que por cuestiones culturales poco a poco han ido desapareciendo; para encaminar así al estado Amazonas con un alto potencial al avance y al progreso (Terranova y cols, 2014).

Por lo antes expuesto resulta de gran importancia las investigaciones a la especie *Himatanthus attenuatus* (amapola sabanera), con estudios dirigidos a la obtención de sustancias que contribuyan a la lucha en contra de algunas enfermedades causadas por microorganismos, ya que la bacterias es un problema social que limita mucho en el desarrollo de sus actividades de las personas, las plantas medicinales son valiosas como recursos para tratar muchas enfermedades, por lo cual merecen un interés especial y con esto contribuir a la sociedad y al país para su uso adecuado.

Esta investigación tiene como finalidad, Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de hexano y etanol de la corteza vegetal externa e interna del

Himatanthus attenuatus recolectada en el Estado Amazonas – Venezuela, frente a bacterias ATCC.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la actividad antibacteriana de los extractos de hexano y etanol de la corteza vegetal externa e interna del *Himatanthus attenuatus* recolectada en el Estado Amazonas – Venezuela frente a bacterias ATCC.

Objetivos Específicos

1. Obtener los extractos de hexano y etanol de la corteza externa e interna del *Himatanthus attenuatus*, mediante la técnica de extracción por reflujo.
2. Realizar la identificación de los metabolitos secundarios de los extractos (hexano y etanol) de la corteza externa e interna de la especie vegetal *Himatanthus attenuatus* por medio del tamizaje fitoquímico y la cromatografía de capa fina (CCF).
3. Verificar la actividad antibacteriana de los extractos (hexano y etanol) de la corteza externa e interna del *Himatanthus attenuatus*., por el método de agar (Kirby – Bauer) en pozo modificado frente a cepas de bacterias grampositivas y gramnegativas (ATCC).

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la investigación

Los alcances de esta investigación se relacionarán con la profundidad del conocimiento que los investigadores pretenden obtener. En tal sentido: Pues, se consideró la posible actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de la corteza externa e interna del *Himatanthus attenuatus*, frente a cepas de referencia internacional. Por tal motivo, durante la investigación se analizaron las propiedades fitoquímicas de los extractos de la planta y se estudió su actividad antibacteriana.

Limitaciones de la investigación

Al respecto, en la presente investigación se encontraron limitaciones relacionadas con la crisis situacional del país. Específicamente, el alto costo de los reactivos como; agar, antibióticos, falta de internet, luz, transporte, etc. Además, desde el punto de vista teórico existen pocos trabajos previos sobre la actividad antibacteriana de la especie en estudio.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Xenonfonte de Almeida, Brito Monteiro, Martins da Costa y Socorro de Barros (2017) de la Revista Brasileira de Farmacognosia cuyo trabajo de investigación titulado “*Himatanthus drasticus*: una revisión química y farmacológica de esta especie medicinal, comúnmente encontrada en la región noreste de Brasil”. Para compilar el uso empírico, así como los aspectos químicos, farmacológicos y biológicos de *H. drasticus*, donde se trabajó el potencial terapéutico de la "leche de janaguba" (una mezcla de látex con agua) se hizo ampliamente conocido para el tratamiento de neoplasias, principalmente tipos de cáncer de pulmón y linfático, en la década de 1970. La literatura disponible presenta trabajos relacionados con los antiinflamatorios, antinociceptivos, propiedades antitumorales y gastroprotectoras del látex de la corteza y las hojas de *H. drasticus*. Además, esta revisión presenta como resultados que dichas muestras son ricas en triterpenos, intentando aclarar sus mecanismos de acción a nivel molecular. Las actividades antinociceptivas y antiinflamatorias de *H. drasticus* probablemente están asociadas con inhibiciones de mediadores inflamatorios, como TNF-alfa, iNOS, COX-2 y NF-kB. Lo más importante, es que también inhibió la actividad HDAC, y los compuestos con esta actividad se han considerado agentes terapéuticos con actividad antitumoral. En conclusión, aunque la literatura muestra varios trabajos sobre especies del género *Himatanthus*, incluido *H. drasticus*, que trata con algunos compuestos bioactivos como triterpenos.

Soares, Cavalcante, Rodríguez Romero y Bandeira (2016). Publicaron un Artículo sobre *Himatanthus* Willd. ex Schult. (Apocynaceae) en esta revisión, se centran en los usos de la medicina popular, los efectos biológicos y la fitoquímica del género *Himatanthus* Willd. ex Schult., Con el fin de proporcionar una base para varias áreas de investigación diferentes, como los campos botánico, farmacéutico, médico y químico. El género *Himatanthus* Wild. ex Schult. (Apocynaceae) incluye alrededor de 13 especies y cinco subespecies ampliamente distribuidas en América del Sur, especialmente Brasil. Los informes fitoquímicos sobre este género han revelado principalmente triterpenos e iridoides. Las plantas se usan tradicionalmente como agentes antihelmínticos, antitumorales y antiinflamatorios. Las partes más utilizadas de la planta son su corteza, hojas y látex. Esta revisión enfatiza los componentes fitoquímicos y las propiedades medicinales, que pueden ayudar en futuras investigaciones. La investigación se realizó con datos obtenidos de libros sobre plantas medicinales, tesis, disertaciones y artículos en revistas arbitradas. De las 13 especies de *Himatanthus*, cuatro no tenían ningún registro de investigación sobre su composición química y propiedades medicinales: *H. attenuatus*, *H. semilunatus*, *H. speciosus* y *H. tarapotensis*.

Flores y Fani (2015), tesis para optar título profesional de químico farmacéutico realizaron un estudio sobre “Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico del Bellaco Caspi (*Himatanthus sucuuba*) y la Congona (*Peperomia galioides*)”, Lima-Perú, donde se determinó *in vitro* la actividad antibacteriana de la corteza de *Himatanthus sucuuba*, una especie nativa de la Amazonia peruana y hojastallos del *Peperomia galioides* proveniente de Huaraz. Sobre una cepa clínica de *Staphylococcus aureus* del Hospital Essalud Angamos. Se preparó los extractos hidroalcohólicos al 25, 50, 75 y 100 % p/v; y para evaluar la actividad se utilizó el método por difusión en discos Kirby-Bauer. Los resultados demostraron que los extractos hidroalcohólicos de las muestras tienen acción antibacteriana frente a la cepa en estudio, se obtuvo halos de inhibición de crecimiento bacteriano con una mejor actividad al 100 % de concentración y la comparación de los halos de ambos

extractos, el que presento mayor diámetro fue el del *Himatanthus succuba*, dicha actividad probablemente se deba a la presencia de alcaloides en el extracto alcohólico de la corteza.

Barquero (2007), refiere que esta práctica está asociada al empirismo en muchos casos faltan estudios químicos, clínicos y epidemiológicos que confirmen de forma irrefutable los efectos fisiológicos de las plantas y los principios activos responsables. No hay que olvidar que el 25 % de los fármacos existentes se obtienen de extractos vegetales, o bien se han sintetizados a partir de sustancias halladas en la investigación fitoquímica. Se observó que no existe una patente hasta ahora con la especie de esta planta, solo hay estudio de caracterización anatómica y estudio ecológico y bioquímico de *Himatanthus attenuatus* (amapola sabanera).

Este estudio será útil para el desarrollo moderno de drogas y servir al propósito de desarrollar una curación y tratamiento de enfermedades y para probar clínica de seguridad, fiabilidad y eficacia. Esta planta puede utilizarse como una fuente barata de productos terapéuticos activos. Respecto a *Himatanthus attenuatus* (amapola sabanera), aún no se reportan estudios en diversas actividades biológicas y/o farmacológicas, solo se evidencian estudios realizados en *Himatanthus succuba*, especie vegetal perteneciente a la familia Apocynaceae.

Antecedentes Históricos e Epistemológicos

López y col, (2007) afirman que el hombre ha utilizado las plantas durante los últimos 5000 años. Los egipcios escribieron sobre las hierbas en el 2000 aC., y las primeras fechas de los herbarios chinos se remontan 1000 años más. En el bajo imperio Romano, las hierbas y las especias fueron tan valorados que se utilizaron como moneda. En la biblia se dice que el anís, el comino y la menta eran pagos del impuesto aceptables durante el primer siglo de nuestra era. Plinio el viejo menciona las hierbas como parte del conocimiento humano. En la época medieval el conocimiento de las hierbas era tan importante para la salud y la felicidad que se guardó celosamente en los monasterios (“Herbals manuscrito”). Del conocimiento de

la medicina tradicional la ciencia moderna encontrado las pistas para el descubrimiento de innumerables productos farmacológicamente importantes.

Bases Teóricas

Familia Apocynaceae

La familia Apocynaceae (cuyo nombre deriva de la palabra anglosajona “baue” que significa veneno) son especies ricas en alcaloides y muchas de ellas son tóxicas; agrupa 250 a 550 géneros y entre 3700 a 5100 especies. Dentro de esta familia algunos géneros de importancia alcaloidal son: *Ambelania*, *Allamanda*, *Aspidosperma*, *Condylocarpon*, *Couma*, *Forsteronia*, *Himatanthus*, *Lacmellea*, *Laxoplumeria*, *Macoubea*, *Malouetia*, *Mandevilla*, *Odontadenia*, *Parahancornia*, *Prestonia* y *Rauwolfia* (Vásquez, 1999).

Usos de algunos géneros de la familia Apocynaceae

Algunas plantas de esta familia tuvieron una importancia económica en el pasado.

Los géneros *Carpodinus*, *Landolphia*, *Hancornia*, *Funtumia* y *Mascarenhasia* fueron una fuente secundaria de caucho. El jugo lechoso de *Pachypodium spp.*, ha sido usado como veneno para impregnar las puntas de las flechas por los Bosquimanos (Watson y Dallwitz, 1994).

Los géneros siguientes son plantas ornamentales:

- *Amsonia* (estrella azul),
- *Nerium* (adelfa), *Vinca* (pervinca),
- *Carissa* (ciruela de Natal, una fruta comestible),
- *Allamanda* (trompeta dorada),
- *Plumeria* (frangipani),
- *Thevetia* (nuez afortunada),
- *Mandevilla* (flor de la sabana) (Watson y Dallwitz, 1994).

Características botánicas de la familia Apocynaceae

La familia Apocynaceae presenta características botánicas específicas; son árboles, arbustos o lianas (hiervas) con látex blanco (claro o coloreado) en todos los órganos.

- *Hojas* simples, opuestas o verticiladas (alternas), enteras, con pecíolos a veces glandulares, sin (con) estípulas.
- Flores en cimas dicasiales, racemosas, tirsoideas ópaniculadas, terminales o axilares, actinomorfas, bisexuales, hipóginas o períginas (epínas), bracteadas; cáliz gamosépalo, usualmente con glándulas adentro (Codd, 1963; Ezcurra, 1981 y Bergen, 1996), lobulado, lóbulos imbricados; corola gamopétala, frecuentemente con corona de escamas o pelos en la cara adaxial, lobulado, lóbulos contornos; estambres, filamentos usualmente unidos a la corola, anteras libres ò usualmente conniventes alrededor del estigma, con dehiscencia longitudinal; disco presente, frecuentemente lobulado ovario súpero (seminífero), carpelos , unidos (sincárpico) o libres (apocárpico), aunque usualmente unidos por el estilo, óvulos pocos a numerosos, estilo simple, estigma usualmente simple (Bergen, 1996).
- Fruto bayo, drupa, cápsula ó de 1-2 folículos secos o coriáceos (leñosos).
- Semillas usualmente gomosas, a veces ariladas, aladas, o ciliadas (Fahn, 1979).

Componentes químicos encontrados en la familia Apocynaceae

Esta familia tiene las siguientes características fitoquímicas: presentan en la mayoría de las veces alcaloides carbonílicos y otros alcaloides indólicos (Figura 1). Se han detectado iridoides (Figura 2) en algunos géneros (*Plumeria*, *Rauwolfia* y *Allamanda*) También presentan proantocianidinas, cianidina y delfinidina. Pueden presentar kaempferol y/o quercetina. Se ha encontrado ácido ursólico (Figura 3). Los

azúcares son transportados como sacarosa o como oligosacáridos (Watson y Dallwitz., 1994).

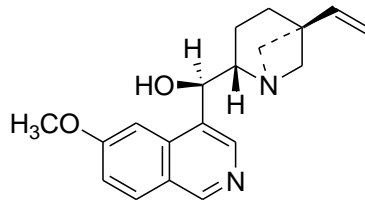


Figura 1. Estructura química de la quinina

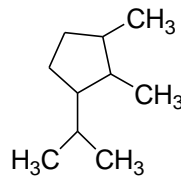


Figura 2. Estructura química del Iridano

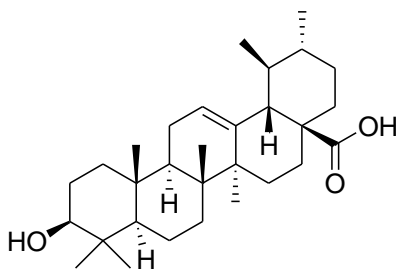


Figura 3. Estructura química del ácido ursólico

Actividad biológica de algunos géneros y especies de la familia Apocynaceae

Algunas plantas de esta familia presentan diversas actividades biológicas o farmacológicas, encontrándose entre estas actividades frente a diferentes agentes biológicos como hongos y bacterias, tal como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Algunas especies de la familia Apocynaceae que presentan actividad biológica.

Especie	Actividad biológica
<i>Mandevilla veraguasensis</i>	Actividad antimicrobiana del extracto en acetato de etilo (<i>S. aureus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. faecalis</i>) y el aislamiento e identificación de dos flavonoles, posiblemente responsables de dicha actividad (Cushinie y Lamb, 2005).
<i>Thevetia peruviana</i> (Persoon)	Actividad antifúngica a partir de los extractos etéreos y etanólicos de semillas, hojas y corteza (<i>Mycosphaerella fijiensis</i>) (Pacheco y col, 2006).
<i>Aspidosperma</i> spp.	Actividad mutagénica en cepas de <i>Salmonella typhimurium</i> , en cultivos de células de mama y de pulmón, efecto inhibitor de la monoaminooxidasa (IMAO) y sobre el crecimiento y mitosis de fibroblastos cardíacos (Nunes y col. 1992).
<i>Aspidosperma megalocarpon</i>	Actividad antimalárica contra <i>P. falciparum</i> ; además los alcaloides aspidospermano y derivados y el esqueleto de vindifformine-tabersonine podrían representar agentes potenciales de la reversión de la resistencia a la cloroquina (Mitaine y col, 1998).

Elaborado por Largo, 2019.

Características del género y especie utilizada en este estudio

El género *Himatanthus* (fanerógamas), es originario del centro y sur de América tropical. Se distribuyen por Panamá, Guayana Francesa, Guyana, Surinam,

Venezuela, Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Brasil (Davidse, Sousa, Knapp y Cabrera, 2009). Comprende 16 especies descritas y de estas, solo 13 aceptadas (Forzza, 2010).

Son arbustos o árboles que alcanzan un tamaño de hasta 35 m de altura, con látex espeso blanco (Figura 4) (Plumel, 1991). La raíz es de color blanco, fibrosa, muy larga, conformando un sistema radicular con una raíz primaria y una secundaria, de consistencia dura (Plumel, 1991). Los tallos jóvenes teretes, ligeramente gruesos con cicatrices foliares prominentes (Figura 5). Las hojas son alternas, glabras o pelosas, submembranáceas a coriáceas; márgenes enteros y con frecuencia revolutos; nervaduras secundarias unidas cerca del margen en una serie de rizos o curvas. Inflorescencias terminales (oseudolaterales a causa del crecimiento continuo), cimosas, usualmente multifloras; pedúnculos generalmente alargados, alternadamente ramificados dentro de las inflorescencias con los segmentos presentando una apariencia articulada; brácteas; grandes y vistosas (Figura 6) (Forzza, 2010).

Las flores cortamente pediceladas; cáliz rudimentario, persistente, los lobos 1-5, ovados, basalmente carentes de glándulas en el interior; corola hipocraterimorfa, relativamente grande, blanca con una textura cerosa, los lobos sinistrorsamente convolutos en el botón, reflexos en la anthesis, el tubo dilatado cerca de la base por encima del cáliz en la inserción de los estambres; estambres insertados cerca de la base del tubo de la corola, las anteras lanceoladas, subsésiles, basalmente sagitadas, apicalmente agudas; ovario apocárpico, glabro, el ápice redondeado, el estilo terete con cabezuelas estigmáticas fusiformes ligeramente engrosadas. Frutos consistentes de un par de folículos gemelos (o un solo folículo por aborto de un carpelo) coriáceos parecidos a bananas con una superficie lisa o verrugosa; semillas con un ala excéntrica (Figura 7) (Plumel, 1991).

La especie *Himatanthus attenuatus* es conocida comúnmente como amapola sabanera en la población de San Fernando de Atabapo, Estado Amazonas, que crece silvestremente y es conocido por los indígenas desde tiempos muy remotos, utilizada

para tratar algunas enfermedades como la hemorroide. En la tabla 2 se muestra la clasificación taxonómica del *Himatanthus attenuatus*.



Figura 4. Árbol de Himatanthus attenuatus.

Fotografía tomada por Soleil Largo, Mayo del 2015.



Figura 5. Tallo de Himatanthus attenuatus.

Fotografía tomada por Soleil Largo, Mayo del 2015.



Figura 6. Hojas de *Himatanthus attenuatus*.

Fotografía tomada por Soleil Largo, Mayo del 2015.

www.bdigital.ula.ve



Figura 7. Flores de *Himatanthus attenuatus*.

Fotografía tomada por Soleil Largo, Mayo del 2015.

Clasificación taxonómica de *Himatanthus attenuatus*

Nombre común: *Amapola sabanera*.

Tabla 2. Clasificación taxonómica

Reino	Orden	Familia	Género	Especie
Plantae	Gentianales	Apocynaceae	<i>Himatanthus</i>	<i>attenuatus</i>

Tomado y modificado de Plumel, 1991.

Componentes químicos presentes en los extractos de *Himatanthus*

- **Flavonoides:** se encuentran en el subextractos *H. drasticus* (frangipani) tienen características químicas y biosintéticas (Dewick, 2002).
- **Alcaloides:** encontrados en los extractos de *H. succuba* se localizan en tejidos periféricos como raíces, cortezas, hojas y tegumentos de semillas, se encuentran en estado libre, glicosidados, 16, 17 solubles como sales (citratos, malatos, tartratos, meconatos, isobutiratos y benzoatos) o en combinación con taninos (Dewick, 2002).
- **Alcaloides indól-monoterpenicos:** comprende un grupo amplio de compuestos de gran diversidad estructural y sólo de algunos de ellos se conoce su efecto fisiológico; son los alcaloides monoterpénicos o indolterpénicos (AMIs) los más importantes y los más extensamente estudiados; estos derivan biogénicamente de un único precursor, formado por condensación aldólica del aminoácido triptófano con el monoterpene secologanina, estos compuestos fueron hallados en la mayoría de la especie de *Himatanthus* (Dewick, 2002).
- **Terpeno Bioactivo Plumericina:** López (2012), afirma que los terpenos o isoprenoides se conoce a un conjunto de sustancias que conforman uno de los grupos de fitoquímico más difundido. Estos compuestos tienen un origen biosintético común y, aunque con estructuras químicas muy

distintas, todos ellos proceden de la condensación del isopreno (2-metil-1,3-buta-dieno), un hidrocarburo de 5 átomos de carbono. Los terpenos se encuentran principalmente en los alimentos de color verde, en productos derivados de la soja y en los cereales (López, 2012).

Extractos

Un extracto es un tipo de maceración, en la que el líquido solvente es una mezcla de alcohol etílico y agua, que disuelve las sustancias activas contenidas en una planta medicinal. En otras palabras, es "el poder de una planta medicinal" transformado en "Medicamento" (Pharmacopea, 2007).

Obtención de los extractos

Las plantas poseen una variedad de mezclas de compuestos bioactivos, tales como lípidos, grasas, fitoquímicos, fragancias, pigmentos y sabores que son ampliamente utilizados en la agroindustria alimentaria y no alimentaria, en la industria farmacéutica y en la industria cosmética. Para separar estos compuestos, de la fase sólida, esta se pone en contacto con una fase líquida, ambas fases entran en contacto íntimo y el (los) soluto(s) se difunde(n) desde el sólido a la fase líquida, lo que permite una separación de los componentes de su estructura natural original. Este proceso se conoce como lixiviación y para realizarlo existen varios métodos. Un proceso importante es la lixiviación de azúcar de las remolachas con agua caliente. Otros procesos muy utilizados consisten en la extracción de aceites vegetales, en los cuales se emplean disolventes orgánicos como hexano, acetona y éter (Bisset, 1994).

En los últimos tiempos, se han desarrollado varias técnicas nuevas para la extracción de solutos de matrices sólidas, entre ellas, se tiene: la extracción asistida con ultrasonido (Vinatoru, 2001), la extracción asistida con microondas, la extracción con solvente acelerado (Kaufmann y Christen, 2002; Smith, 2002) y la extracción con fluidos supercríticos (Rozzi y Singh, 2002; Brunner, 2005), con el objeto de acortar el tiempo de extracción, disminuir el consumo de solvente, aumentar el rendimiento de extracción y mejorar la calidad de extracto. Es importante establecer los parámetros

de extracción para lograr la estandarización del proceso, esto garantizará la calidad, rendimiento, seguridad y eficacia del producto, por ejemplo (Carmona, López, González y Muñoz, 2006; Álvarez, González, Urquiola, García y Monteagudo, 2007).

Concentración de extractos

Toda vez que se ha realizado la etapa de extracción y separación, se procede a eliminar parte del solvente de extracción para aumentar el contenido de sólidos en el extracto. Este proceso se realiza a presión reducida con lo que se disminuye la temperatura de calentamiento necesaria para la salida del solvente, el rota evaporador es una buena alternativa para trabajos en el laboratorio y es ampliamente usado mientras que sistemas análogos se utilizan a escala industrial (evaporadores, condensadores). También pueden utilizarse métodos de precipitación del principio activo, combinados con etapas de filtración, extracción líquido-líquido, entre otras (López, Muñoz, Carmona, Torres y González, 2006).

Técnicas para la obtención de extractos vegetales

Entre las técnicas de extracción se encuentran (Valcárcel y Gomez, 1988):

Mecánicas:

- Por expresión: la planta o sus partes se exprimen usando una prensa hidráulica hasta obtener su jugo, es un método utilizado para obtener los zumos de cítricos, aceites y otros.
- Por incisiones: se aplica con el fin de obtener exudados del material vegetal, pueden ser gomas, resinas, mieles y otros productos que se producen en gran cantidad al realizarse incisiones o cortes de plantas vivas. Pueden también clavarse tubos en la corteza, por donde fluyan las sustancias.

Destilación:

- Por arrastre de vapor: es el proceso de extracción mediante el cual se obtienen aceites esenciales, los cuales son productos grasos compuestos por un número muy grande de compuestos químicos muy volátiles de estructura y composición muy compleja la mayoría son terpenos de bajo peso molecular.

Con disolventes (extracción discontinua):

- *Maceración:* la planta seca y molida se pone en contacto con el disolvente a temperatura ambiente, dejando la mezcla en reposo de 3 a 10 días. Pasado el tiempo de maceración, se decanta el extracto y se elimina el residuo vegetal. Se recomienda hacer una segunda extracción.
- *Infusión:* se vierte el disolvente (agua) hirviendo sobre la planta colocada en un recipiente de cierre bien ajustado, a fin de evitar la pérdida de los principios activos y se deja en reposo de 5 a 15 minutos.
- *Decocción o cocimiento:* consiste en introducir la planta en el disolvente y dejarla hervir durante 5 a 20 minutos, a temperatura superior a la del punto de ebullición, en un recipiente cerrado para evitarla evaporación.

Con disolventes (extracción continua):

- *Percolación:* el material vegetal se coloca en una columna y está en contacto permanente con el disolvente que gotea por la parte inferior arrastrando los principios. Constantemente es necesario agregar disolvente puro en la parte superior de la columna, para compensar la cantidad de disolvente que sale por la parte inferior.
- *Extracción con Soxhlet:* el material vegetal seco es sometido a una extracción continua. El aparato (Soxhlet) asegura en todo momento la provisión de disolvente puro, que pasa por el material arrastrando los principios activos. El extracto obtenido suele concentrarse eliminando total o parcialmente el disolvente.

Extractos botánicos para fines farmacéuticos

Los extractos de plantas medicinales se utilizan por el hombre desde la antigüedad para la cura de múltiples dolencias. Se obtienen mediante la separación de porciones biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, con el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado (Polanco, 2003).

Para la industria farmacéutica las plantas medicinales son una fuente de nuevas moléculas con efectos farmacológicos, que son utilizables directamente y que permiten obtener productos farmacéuticos con menores efectos secundarios y satisfacer las necesidades crecientes del uso de productos naturales (Polanco, 2003). La Figura 5 muestra algunas de las etapas generales para la obtención de extractos vegetales.

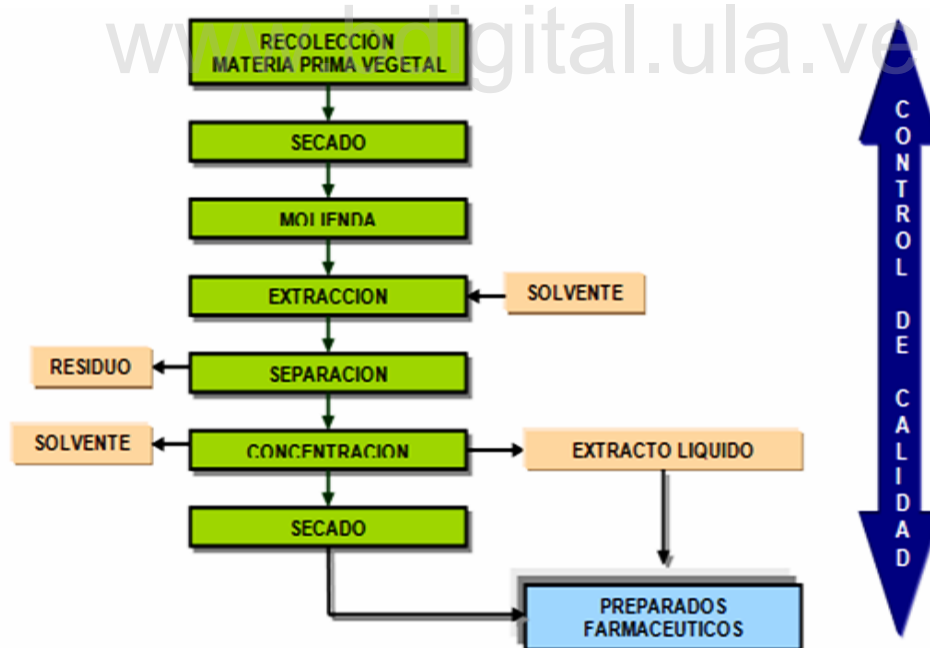


Figura 8. Proceso de obtención de extractos a partir de plantas medicinales.

Tomado y modificado de Polanco (2003).

Materia prima vegetal para la obtención de extractos

Según Chife (2005), uno de los aspectos más importantes en la producción de extractos medicinales es garantizar altos rendimientos del material vegetal y elevado contenido de principios activos, lo que depende entre otros aspectos de:

1. Elección adecuada del material vegetal (por su empleo tradicional o validación científica de su uso).
2. Factores pre-cosecha: disponibilidad de la especie, factibilidad del cultivo, lugar y época de cultivo e identificación botánica.
3. Factores post-cosecha: selección, secado, molienda y almacenaje.

Las condiciones de cosecha y procesamiento influyen en la cantidad final de metabolitos recuperables del tejido de las plantas. Se debe conocer la parte de la planta a cosechar, la época y la forma de corte (Chife, 2005), ejemplifica sobre la época óptima de cosecha la que varía con el órgano vegetal, tal y como se muestra en la Tabla 3.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 3. *Condiciones de Cosecha*

Parte de la planta	Época de cosecha
Hojas	Fase más activa de la fotosíntesis
Frutos	Cuando están totalmente desarrollados
Flores	Estado de botón floral
Raíces	Cuando están bien desarrolladas
Cortezas	En primavera, evitando periodos de lluvias intensas

Tomado y modificado de Chife (2005).

Del manejo post-cosecha dependerá en gran medida que el material mantenga y conserve las características físicas, químicas, organolépticas y farmacológicas. El material fresco debe ser inmediatamente bien manipulado de forma que no se

deteriore, desechando partes manchadas o enfermas de la planta, así como realizar el lavado con agua corriente de ser necesario (Chife, 2005).

Por regla general se recomienda secar el material vegetal antes de la molienda lo que evita el riesgo de contaminación por hongos. En la evaluación del rendimiento del proceso de extracción, se concluyó que la molienda del material después del secado permitió obtener un tamaño de partículas más pequeño y homogéneo, lo que favoreció la unión de las células con el solvente al existir mayor superficie de contacto entre éste y material vegetal (Rivero y col, 2002).

Diferencias principales entre los extractos y los otros preparados de plantas medicinales

Los procesos más popularmente conocidos para transformar una planta medicinal en Medicina para el hombre son la infusión y la decocción. En estos procesos, se usa el agua hirviendo como líquido para extraer las sustancias activas de dentro de los tejidos vegetales. El agua en ebullición, en contacto con la planta fresca o seca, hace que las células vegetales estallen vertiendo su contenido de sustancias activas. Los preparados como estos se denominan técnicamente "Extractos acuosos" y su ventaja principal es que son fáciles y rápidos de preparar en la casa. Sin embargo, los extractos acuosos deben ser usados en el momento, o dentro de un periodo reducido de tiempo, ya que no son estables (Pharmacopea, 2007).

La degradación bioquímica y la contaminación microbiana hacen que rápidamente estos preparados ya no sean aptos para el consumo humano o que pierdan sus propiedades curativas. Otra limitación importante de los extractos acuosos tales como las infusiones y decocciones es que algunas sustancias activas vegetales son sensibles a las altas temperaturas y entonces pierden sus propiedades cuando son sometidas al agua en ebullición. Por ejemplo, la vitamina C, una sustancia antioxidante contenida en muchas plantas medicinales y alimentarias, es extremadamente sensible a la temperatura. Por esta razón, si se pretende aprovechar

las propiedades de la vitamina C, se recomienda no cocinar ni calentar estas plantas antes de consumirlas (Pharmacopea, 2007).

Beneficios de los extractos

Esta limitación en la estabilidad de los extractos acuosos es subsanada mediante el empleo de otras sustancias disolventes tales como el alcohol etílico. Se ha observado que con mezclas de alcohol etílico y agua se obtienen extractos que conservan sus propiedades medicinales durante largo tiempo (Extractos alcohólicos). Esto es debido a que, en presencia de concentraciones elevadas de alcohol etílico, todos los procesos degradativos y microbiológicos se detienen, otorgándole a estas preparaciones una gran estabilidad. Los extractos alcohólicos son también conocidos como Tinturas o Tinturas Madres (TM). En Medicina Homeopática las TM son usadas como los extractos originales a partir de los que se preparan las diluciones homeopáticas. Sin embargo, la historia de los extractos comienza mucho antes de la creación de la Homeopatía. Ya a comienzos del siglo XVI, el célebre médico Paracelso experimentaba tratando de extraer con diferentes disolventes lo que él llamaba el "principio activo" o "fuerza" de las plantas (Pharmacopea, 2007).

En la actualidad, en diferentes ámbitos, principalmente en las grandes ciudades se está popularizando la utilización de plantas medicinales secas y pulverizadas en forma de capsulas. Debido a que las plantas son secas, estas formulaciones son estables; sin embargo, dado que no ha mediado ningún proceso extractivo, los principios activos se encuentran aún dentro de las células vegetales. Esto significa que nuestro aparato digestivo es quien debe "macerar" la planta para transformarla en una medicina aprovechable por nuestro cuerpo. En el caso de los extractos, la planta ya ha sido transformada en fitomedicamento mediante un cuidadoso y controlado proceso. De esta forma, en el extracto, todo el potencial curativo de las plantas se encuentra disuelto y disponible para ser aprovechado rápidamente por nuestro organismo (Pharmacopea, 2007).

Desventajas de los extractos.

La presencia de alcohol etílico en los extractos trae consigo aparejada una limitación que es preciso remarcar. Dado que la función de eliminación del alcohol del organismo es cumplida por el hígado, los extractos no deben ser administrados en casos de insuficiencia hepática o hepatitis. No debe administrarse tampoco a las mujeres gestantes o en período de lactancia ni a niños menores de un año. Sin embargo, las cantidades de alcohol etílico administrada en una dosis normal (20 gotas, tres veces al día) de un extracto son relativamente bajas. Por ejemplo, 20 gotas de un extracto con un contenido de alcohol 75 % equivale a la cantidad de alcohol en una cucharada pequeña de vino (Pharmacopea, 2007).

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, sean o no explicables, utilizados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales. En algunos países se utilizan indistintamente los términos medicina complementaria/alternativa/no convencional y medicina tradicional (Nalvarte y col, 1999).

Naturaleza y cultura en el Estado Amazonas, Venezuela

Estudiar la biodiversidad y la salud de las poblaciones indígenas del Estado Amazonas, significa identificar los nexos entre la naturaleza y la cultura. Por una parte, está el elemento vital y reproductivo de la naturaleza caracterizado por la variedad y variabilidad de los ecosistemas, las especies, los microorganismos y los genes, y por otra, la salud y la enfermedad de un sector poblacional, heredero de una milenaria cultura. No se trata, desde luego, de identificar una relación entre dos elementos opuestos, naturaleza y cultura, sino de establecer las bases mediante las

cuales naturaleza y cultura conforman una unidad, tal como lo entienden los pueblos indígenas de Amazonas (Furtado, 1993).

En este caso, sobre la historia de la naturaleza, se ha situado la historia humana, que se ha servido de aquella para conservar y recrear una cultura cada vez más avanzada y eficiente. La historia humana no sólo ha significado ocupación del medio, aprovechamiento, sino transformación, pero no transformación en el sentido físico solamente, sino cambio cualitativo de la naturaleza, ya que el ser humano ha sido capaz de identificarla, denominarla, clasificarla, volverla inteligible a través de la observación y la reflexión. El manejo simbólico de la naturaleza es una conquista de la historia intelectual de la humanidad y los símbolos impuestos son naturaleza misma (Furtado, 1993).

Análisis de identificación de los extractos

Separación e identificación

Cuando se desea conocer la composición de una sustancia orgánica, se deben tener en cuenta tres aspectos básicos: La obtención de una muestra representativa de la muestra, La separación o aislamiento de cada una de las sustancias componentes de la mezcla y finalmente el análisis e identificación de cada uno de los componentes de dicha muestra. El conocimiento sobre los métodos de aislamiento y purificación de un compuesto, es importante por las siguientes razones: poder determinar su estructura, en los procesos de síntesis y seguimiento de las reacciones. Estos métodos se basan en las diferencias existentes entre las propiedades físicas de los componentes de una mezcla como; punto de ebullición, densidad, presión de vapor, solubilidad, entre otros (López y col, 2007).

Existen muchas técnicas disponibles para la separación y purificación de los principios activos que están relacionadas con la cromatografía, siendo este un método de separación física en el que componentes a separar se distribuyen en dos fases, una estacionaria y otra móvil. La fase estacionaria puede estar empacada en la columna, distribuida como una película o capa delgada. Mientras que la fase móvil puede ser

gaseosa o líquida (Gennaro, 2003). Esto permite separar una mezcla en sus componentes de acuerdo a sus diferentes distribuciones en un sistema de dos fases (Marcano y Hasegawa, 2002).

La fase móvil puede ser un líquido o un gas, mientras que la fase estacionaria puede ser un sólido o líquido. Entre las cromatografías se encuentran (López y col, 2007).

Análisis cromatográfico

Cromatografía de adsorción

La fase estacionaria es un sólido sobre el que se adsorben los componentes de la muestra.

- Cromatografía líquido - Sólido CLS (fase móvil líquido).
- Cromatografía Gas – Sólido CGS (fase móvil gas)
- Cromatografía en Capa Fina (fase estacionaria sólida en forma plana y la móvil líquida).
- Cromatografía líquido - Sólido CLS (fase móvil líquido).
- Cromatografía Gas – Sólido CGS (fase móvil gas)
- Cromatografía de reparto: la fase estacionaria es un líquido sostenido por un sólido inerte.
- Cromatografía Líquido – Líquido CLL (fase móvil líquido).
- Cromatografía Gas – Líquido CGL (fase móvil un gas).
- Cromatografía en papel (fase estacionaria es una capa de agua adsorbida sobre una hoja de papel).

Cromatografía de intercambio iónico

La fase estacionaria es una resina de intercambio iónico y la separación se produce por la unión de los iones a la fase estacionaria.

Cromatografía de exclusión molecular

La fase estacionaria es parecida a un tamiz y la separación se produce en función del tamaño de las moléculas. Teniendo en cuenta la forma de la fase estacionaria:

- Cromatografía en columna.
- Cromatografía plana (Cromatografía en capa fina y papel).

Desde hace algunos años las diferentes técnicas de separación y aislamiento de los componentes de las plantas han pasado a un primer plano como métodos de aplicación general más útiles en el estudio de sustancias orgánicas e inorgánicas (Bruneton, 2001).

Tamizaje o screening fitoquímico de los extractos

Es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación (Lock, 1994).

Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente en una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico. La presencia de alcaloides en el tamizaje fitoquímico, es bastante probable que la acción farmacológica se deba a la fracción alcaloidal. De la misma manera, el hecho de evidenciarse acción antiinflamatoria en el tamizaje farmacológico y la presencia de flavonoides en el tamizaje fitoquímico, puede dar lugar a procesos de aislamiento y sometimiento a pruebas más específicas de estos compuestos (Villar, 2014). Efectos catárticos pueden ser asociados a las antraquinonas.

La presencia de glicósidos cianogénicos durante la marcha fitoquímica puede dar lugar a la descartación de la planta por su alta toxicidad. La confirmación de la

actividad farmacológica o antimicrobiana justifica la continuación de los estudios. El screening fitoquímico proporciona datos preliminares sobre los constituyentes químicos de la planta que, junto con los resultados del tamizaje farmacológico, pueden orientar la continuación de los estudios (Lock, 1994).

Estudio de Alcaloides

Estas pruebas se fundamentan en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados formando precipitados. Estas reacciones se basan en los siguientes comportamientos: el yoduro potásico cuando reacciona con cloruro mercuríco, forma un precipitado rojo de yoduro mercuríco; soluble en exceso de iones de yoduro con formación de un complejo de anión complejo incoloro. La solución alcalina de este complejo sirve para descubrir indicios de amoníaco. En esta reacción se forma el compuesto de color pardo oxiyoduro mercuriamoníaco, que es soluble en exceso de complejo generando intenso color amarillo. Los alcaloides por su carácter nitrogenado pueden comportarse de forma similar al amoníaco, ante estos reactivos; muchos alcaloides presentes en el material vegetal forman con el bismuto, yoduros dobles insolubles (Coy, Parra y Cuca, 2014).

Estudio de compuestos fenólicos y Taninos

La prueba de cloruro férrico es un ensayo colorimétrico utilizado para determinar la presencia de fenoles en el material vegetal. Se usa una disolución al 1% de cloruro de hierro (III) que ha sido neutralizada con hidróxido sódico hasta que forme un leve precipitado de $\text{FeO}(\text{OH})$. La sustancia orgánica se disuelve en agua, metanol o etanol, luego se añade la solución neutra de cloruro: se forma un complejo coloreado transitorio o permanente (normalmente púrpura, verde o azul) indica la presencia de un fenol o enol. Esta prueba permite determinar tanto fenoles como taninos. El desarrollo de una coloración rojo-vino, indica la presencia de compuestos fenólicos en general, el desarrollo de una coloración verde intensa, muestra la

presencia de taninos del tipo pirocatecólicos. El desarrollo de una coloración azul, sugiere taninos del tipo pirogalol, derivados del ácido gálico (Carvajal, Waliszewski, Barradas, Orta, Haywards, Nolasco y Angulo, 2009).

Estudio de Flavonoides

Para su detección se emplea principalmente la reacción de la cianidina, también conocida como reacción de Shinoda. Para ello se coloca la muestra a estudiar en un tubo de ensayo con 0,5 gramos de magnesio en polvo, seguidamente se adiciona HCl concentrado, gota a gota, hasta el desprendimiento de hidrogeno. Si se observa la aparición de coloración rojiza, violeta o naranja, se considera positivo para compuestos con el núcleo de la α -benzopirona (flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, isoflavonoides, y xantonas). También existen otro tipo de flavonoides denominados leucoantocianidas, los cuales por cambios en el pH se tornan incoloras e intensamente coloreadas de rojo (Carvajal y col, 2009).

Estudios de Esteroles y Terpenos

La demostración de la presencia de esteroles (colesterol) se hace por medio de la reacción de Liebermann-Burchard, que es específica para esteroles con insaturación en los anillos A, B o C. Las reacciones de color de los esteroles se deben a una deshidratación preliminar para formar dienos. La formación de una coloración azul o verde en la interfase indica la presencia de esteroles, si la coloración es rosa, rojo, magenta o violeta habrá presencia de triterpenos (Marcano y Hasegawa, 2002).

Estudio de antraquinonas

Las quinonas son diacetonas cíclicas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles, siendo reversible esta reacción. Las quinonas derivan su nombre del miembro más simple de la serie: *p*-enzoquinona obtenida en 1838 por Woskresensky, como producto de oxidación del ácido químico. Las quinonas, por el

sistema aromático quedan al reducirse se pueden clasificar en Benzoquinonas, Naftoquinonas, Antraquinonas (las más numerosas) y fenantroquinonas (Martínez, Valencia, Jiménez, Mesa, y Galeano, 2008). Para la detección de este tipo de metabolitos secundarios se adiciona hidróxido de amonio al 2 %. En caso de presencia de nafto o antraquinonas, al dejar separar las fases: la capa alcalina (inferior) toma una coloración que va del rosado al rojo intenso, dependiendo de la concentración de estos compuestos en la muestra (Marcano y Hasegawa, 2002).

Estudio de Saponinas

Las saponinas son glicósidos cuya aglicona consiste en un núcleo esteroidal o triterpénico; esta característica estructural les confiere un carácter anfótero que les permite actuar como tenso activos. Aprovechando esta propiedad, la prueba más empleada en la detección de saponinas es la prueba de formación de espuma; consiste en agitar vigorosamente la solución acuosa, obtenida de la muestra, en un tubo de ensayo y observar la espuma formada. Esta debe ser estable por lo menos 30 minutos para poder establecer la presencia de saponinas (Marcano y Hasegawa, 2002).

Bacterias

Son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de algunos micrómetros de largo (entre 0,5 y 5 μm , por lo general) y diversas formas incluyendo esferas, barras y hélices. Las bacterias son procariotas y, por lo tanto, a diferencia de las células eucariotas de los animales y las plantas no tienen núcleo ni orgánulos internos ver Figura 7 (Fredrickson, Zachara y Balkwill, 2004).

Las bacterias presentan una amplia variedad de tamaños y formas. La mayoría presentan un tamaño diez veces menor que el de las células eucariotas, es decir, entre 0,5 y 5 μm . Sin embargo, algunas especies como *Thiomargarita namibiensis* *Epulopiscium fishelsoni* llegan a alcanzar los 0,5 mm, lo cual las hace visibles al ojo desnudo. En el otro extremo se encuentran bacterias más pequeñas conocidas, entre las que cabe destacar las pertenecientes al género *Mycoplasma*, las cuales llegan a

medir solo 0,3 μm , es decir, tan pequeñas como los virus más grandes (Robertson, Gomersall y Gill, 1975).

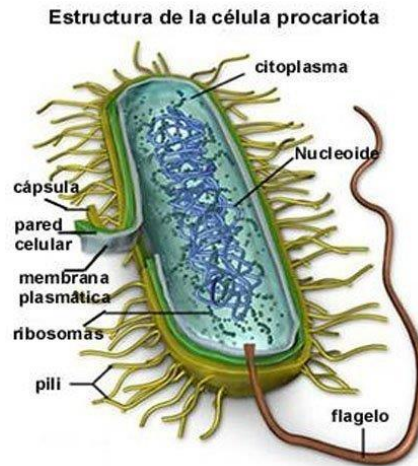


Figura 9. Estructura de la célula bacteriana.

Tomado y modificado de Barrientos y López (1998).

La forma de las bacterias es muy variada y, a menudo, una misma especie adopta distintos tipos morfológicos, lo que se conoce como pleomorfismo. De todas formas, podemos distinguir tres tipos fundamentales de bacterias: (Cabeen y Jacobs, 2005).

Coco (del griego kókkos, grano): de forma esférica.

Diplococo: cocos en grupos de dos.

Tetracoco: cocos en grupos de cuatro.

Streptococo: cocos en cadenas.

Estafilococo: cocos en agrupaciones irregulares o en racimo.

Bacilo (del latín baculus, varilla): en forma de bastoncillo.

Formas helicoidales:

Vibrio: ligeramente curvados y en forma de coma, judía o cacahuete.

Espirilo: en forma helicoidal rígida o en forma de tirabuzón.

Espiroqueta: en forma de tirabuzón (helicoidal flexible).

Algunas especies presentan incluso formas tetraédricas o cúbicas. Esta amplia variedad de formas es determinada en última instancia por la composición de la pared celular y el citoesqueleto, siendo de vital importancia, ya que puede influir en la capacidad de la bacteria para adquirir nutrientes, unirse a superficies o moverse en presencia de estímulos (Cabeen y Jacobs, 2005; Younk, 2006).

Las bacterias pueden clasificarse con base en diferentes criterios, como estructura celular, metabolismo o con base en diferencias en determinados componentes como ADN, ácidos grasos, pigmentos, antígenos o quinonas (Thomson y Bertram, 2001).

Sin embargo, aunque estos criterios permitían la identificación y clasificación de cepas bacterianas, aún no quedaba claro si estas diferencias representaban variaciones entre especies diferentes o entre distintas cepas de la misma especie. Esta incertidumbre se debía a la ausencia de estructuras distintivas en la mayoría de las bacterias y a la existencia de la transferencia horizontal de genes entre especies diferentes, (Boucher, Douady, Papke, Walsh, Boudreau, Nesbo, Case y Doolittle, 2003), la cual da lugar a que bacterias muy relacionadas puedan llegar a presentar morfologías y metabolismos muy diferentes. Por ello, y con el fin de superar esta incertidumbre, la clasificación bacteriana actual se centra en el uso de técnicas moleculares modernas (filogenia molecular), tales como la determinación del contenido de guanina/citosina, la hibridación genoma-genoma o la secuenciación de ADN ribosómico, el cual no se ve involucrado en la transferencia horizontal (Olsen, Woese Y Overbeek, 1994).

La identificación de bacterias en el laboratorio es particularmente relevante en medicina, donde la determinación de la especie causante de una infección es crucial a la hora de aplicar un correcto tratamiento. Por ello, la necesidad de identificar a los patógenos humanos ha dado lugar a un potente desarrollo de técnicas para la identificación de bacterias (Gram, 1884).

La técnica de tinción de membranas de bacterias de Gram, desarrollada por Hans Christian Gram en 1884, ha supuesto un antes y un después en el campo de la

medicina, y consiste en teñir con tintes específicos diversas muestras de bacterias en un portaobjetos para saber si se han teñido o no con dicho tinte (Ryan y Ray, 2004).

Una vez se han adicionado los tintes específicos en las muestras, y se ha lavado la muestra pasados unos minutos para evitar confusiones, hay que limpiarlas con unas gotas de alcohol étílico. La función del alcohol es la de eliminar el tinte de las bacterias, y es aquí donde se reconocen las bacterias que se han tomado: si la bacteria conserva el tinte, es una grampositivas las cuales poseen una pared más gruesa constituida por varias decenas de capas de diversos componentes proteicos; en el caso de que el tinte no se mantenga, la bacteria es una gramnegativa, la cual posee una pared de una composición diferente. La función biológica que posee esta técnica es la de fabricar antibióticos específicos para esas bacterias (Madigan y col, 2004).

Diferencias gram (+) y gram (-).

El bacteriólogo danés Hans Christian Joachim Gramen 1844, desarrolló una técnica de coloración diferencial empleada en la microbiología para la observación de bacterias y la denominó Tinción Gram, cuya reacción es diferente según el microorganismo pues las bacterias consideradas Gram positivas se tiñen de color violeta y las bacterias Gram negativas de color rosa. Los fundamentos de diferenciación entre bacterias grampositivas y gramnegativas (Figura 8) está en la estructura de la pared celular, ya que ésta en las bacterias Gram positivas tiene una gruesa capa de peptidoglicano, dos tipos de ácidos teicoicos: el ácido lipoteicoico (ubicado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática) y el ácido teicoico (que se halla en la superficie, anclado solamente en el peptidoglicano), a diferencia de las bacterias Gram negativas, en las que la pared celular es delgada, y está unida, mediante lipoproteínas, a otra membrana plasmática externa, dicha membrana es soluble en solventes orgánicos y la capa de peptidoglucano es muy delgada y no retiene el complejo de cristal violeta, y por lo tanto no es posible su tinción azul violácea (Guedea, 2014).

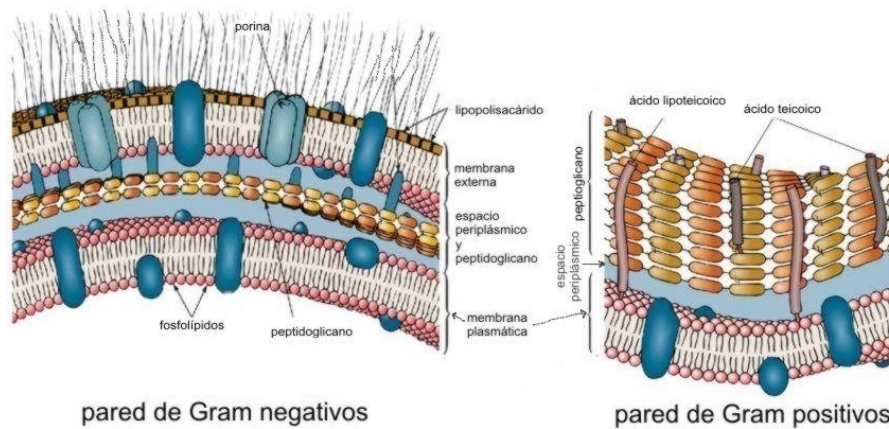


Figura 10. Estructura de la pared celular de las Bacterias grampositivas y gramnegativas.

Tomado y modificado de Prescott, Harley y Klein , 1999.

Características de las bacterias usadas en el estudio

Bacterias grampositivas

Dentro de los microorganismos grampositivos usados en el presente estudio solo hablaremos de las especies: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*. Ver tabla 4.

- *Staphylococcus aureus*

Tabla 4. Clasificación taxonómica de *Staphylococcus aureus*

Reino	Clase	Familia	Género	Especie
Bacteria	Bacilli	Staphylococcacea	<i>Staphylococcus</i>	<i>Aureus</i>

Tomado y modificado de García y col, 2014.

El género *Staphylococcus* contiene al menos 30 especies, las de importancia clínica son; *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus*

saprophyticus. Son células esféricas grampositivas que se disponen en racimos irregulares parecidas a racimos de uva, inmóviles, aerobios facultativos, catalasa positiva que miden de 0,5 a 1,5 micras de diámetro y fermentan carbohidratos. *Staphylococcus aureus* se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente, por lo que afecta a todas las especies de mamíferos, siendo frecuente la transmisión entre humanos y animales y viceversa (Manzo y col, 2014 Es la única especie de los estafilococos que produce la enzima coagulasa y es capaz de crecer con mucha rapidez sobre distintos medios de cultivo, incluyendo medios con altas concentraciones de NaCl (7,5 %) (García y col, 2014).

Staphylococcus aureus se encuentra formando parte de la flora normal de la piel y fosas nasales de las personas sanas. Causa gran variedad de infecciones cuyos signos y síntomas varían según la localización de la misma, la manifestación clásica es el absceso localizado. Sin embargo, dependiendo de la severidad de la afección suele generalizarse provocando infección sistémica. Algunas cepas de *S. aureus* productoras de toxinas provocan enfermedades como; fiebre escarlatina, síndrome de piel escaldada y síndrome de choque tóxico (Bonilla y Airteaga, 2005).

- *Enterococcus faecalis* (Tabla 5).

Tabla 5. Clasificación taxonómica de *Enterococcus faecalis*

Reino	Clase	Familia	Género	Especie
Bacteria	Bacilli	Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	<i>faecalis</i>

Tomado y modificado de Porte, Herre, Prat y Chanqueo, 2007.

El género *Enterococcus* también son microorganismos grampositivos que se disponen en cadenas cortas, de las cuales han sido descritas hasta al menos 29 especies (Porte y col, 2007). Los enterococos forman parte de la flora normal del tracto gastrointestinal humano y del tracto genital de la mujer. Sin embargo, pueden

ser encontrados en; suelo, comida, plantas, agua, animales, pájaros e insectos (Porte y col, 2007).

En los humanos, las especies más frecuentes son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* pues constituyen, entre ambos el 90 % de los aislados en el laboratorio clínico (Pérez, Martínez, y Zhurbenko, 2010). *E. faecalis* es el más abundante en el tracto gastrointestinal de los humanos, es una bacteria inmóvil, anaerobia facultativa, catalasa negativa y fermenta la glucosa. Puede crecer en caldo con 6,5 % de NaCl e hidrolizar la esculina en presencia de sales biliares (Porte y col, 2007).

E. faecalis, tiene poco potencial patogénico en el hospedador normal; aunque, en ancianos y pacientes inmunocomprometidos, este microorganismo se comporta como patógeno oportunista. Las infecciones ocurren cuando las defensas del individuo descienden por una enfermedad y por el uso de dispositivos invasivos. La mayor parte de las infecciones son originadas por una fuente endógena, es decir, el enterococo proviene de la flora bacteriana de la persona misma. Entre las enfermedades que producen se puede destacar; la bacteriemia y endocarditis (Pérez y col, 2010).

Bacterias gramnegativas

Existe una amplia variedad de microorganismos gramnegativos, pero en esta investigación solo nos enfocamos en los géneros *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

- *Escherichia coli*. (Tabla 6).

Tabla 6. Clasificación taxonómica de *Escherichia coli*

Reino	Clase	Familia	Género	Especie
Bacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>

Tomado y modificado de Rodríguez, 2002.

El género *Escherichia coli* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo Gramnegativo, anaerobio facultativo que mide 0,5 micras de ancho por 3 micras de largo, no forman esporas, son móviles por la presencia de los flagelos peritricos. Además, son catalasa positiva, oxidasa negativa, reduce los nitratos a nitritos y fermenta la glucosa con producción de gas (Rodríguez, 2002). Este género forma parte de la flora normal del intestino humano, donde no causa problemas y es necesaria para el funcionamiento correcto del proceso digestivo. Sin embargo, *Escherichia coli* posee estructuras antigénicas complejas que producen diferentes toxinas y factores de virulencia, provocando infecciones intestinales y extraintestinales como: infecciones del aparato excretor, vías urinarias, meningitis, septicemia entre otros (Vidal, 2003).

- *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 7).

Tabla 7. Clasificación taxonómica de *Pseudomonas aeruginosa*

Reino	Clase	Familia	Género	Especie
Bacteria	Gammaproteobacteria	Pseudomonadaceae	<i>Pseudomonas</i>	<i>Aeruginosa</i>

Tomado y modificado de Ochoa y col, 2013.

Pseudomonas aeruginosa pertenece a la familia Pseudomonadaceae, son bacilos o diplococos gramnegativos, aerobios no esporulados y no fermentadores de carbohidratos. Sus requerimientos nutricionales no son exigentes, por lo que puede crecer en casi todos los medios de cultivo y al igual que *Escherichia coli* reduce los nitratos a nitritos. En los medios de cultivo se observan colonias lisas, grandes y brillantes, produce pigmentos y tiene olor característico a fruta (Ochoa y col, 2013). Es un patógeno oportunista en inmunocomprometidos produciendo graves infecciones en vías respiratorias, vías urinarias, tejidos y septicemia (Lloria, 2009).

- *Klebsiella pneumoniae* (Tabla 8).

Tabla 8. Clasificación taxonómica de *Klebsiella pneumoniae*

Reino	Clase	Familia	Género	Especie
Bacteria	Gammaproteobacteria	Enterobacteriaceae	<i>Klebsiella</i>	<i>Pneumoniae</i>

Tomado y modificado de Garrity, 2004.

Klebsiella pneumoniae es un bacilo Gramnegativo, anaerobio facultativo que carece de flagelo por lo que es inmóvil. Se encuentra en el aparato respiratorio y en las heces de casi el 5 % de las personas sanas. Es la especie con mayor relevancia clínica dentro del género *Klebsiella*, ya que desempeña un papel importante como causa de infecciones oportunistas. Causa alrededor del 1 % de las neumonías bacterianas y puede causar condensación hemorrágica extensa del pulmón. En algunas ocasiones produce infección del tracto urinario y bacteriemia a partir de lesiones focales en pacientes inmunosuprimidos. Siendo las complicaciones más frecuentes el absceso pulmonar y el empiema (Garrity, 2004).

En la Tabla 9 se mencionan algunas de las enfermedades causadas por las cepas en estudio, clasificadas de acuerdo según la diferenciación de la pared bacteriana.

Tabla 9. Enfermedades causadas por las cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

Microorganismos Grampositivos		Microorganismos Gramnegativos	
<i>Staphylococcus aureus:</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Infecciones de piel • Síndrome de piel escaldada • Síndrome de shock tóxico • Icteremias • Endocarditis • Infecciones urinarias • Osteomielitis • Infección pulmonar • Intoxicación alimentaria 	<i>Escherichia coli:</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Infecciones gastrointestinales • Infecciones del tracto urinario • Meningitis neonatal

Continuación de Tabla 9. *Enfermedades causadas por las cepas bacterianas utilizadas en este estudio.*

<i>Enterococcus faecalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Infecciones del tracto urinario. • Bacteriemia. • Infecciones intra-abdominales. • Endocarditis. 	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Neumonía • Infecciones del tracto urinario • Espondilitis anquilosante • Septicemia • Infecciones suaves del cuerpo en los seres humanos.
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Otitis externa. • Infección de heridas (foliculitis). • Endocarditis. • Neumonía. • Gastroenteritis. • Septicemia.

Tomado y modificado de Koneman, Allen, Janda, Schreckenberger y Win, 2001.

Las bacterias poseen unas series de genes asociados a elementos genéticos transferibles que les proporciona la capacidad de desarrollar resistencia a los fármacos; el uso de los antibióticos en la práctica clínica ha hecho que se seleccionen las bacterias resistentes desistiendo de las que no lo son, resultando cepas bacterianas multi-resistentes (Fredrickson y col, 2004).

Antibióticos

Es una sustancia química producida por un ser vivo o derivado sintético, que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente son fármacos usados en el tratamiento de infecciones por bacterias, de ahí que se les conozca como antibacterianos. Los antibióticos se utilizan en medicina humana, animal y horticultura para tratar infecciones provocadas por gérmenes (Strohl, 1997).

Los antibióticos generalmente ayudan a las defensas de un individuo hasta que las respuestas locales sean suficientes para controlar la infección (Townsend, 2005). Un antibiótico es bacteriostático si impide el crecimiento de los gérmenes, y

bactericida si los destruye, pudiendo generar también ambos efectos, según los casos (Strohl, 1997).

El objetivo del tratamiento con antibióticos es conseguir la erradicación del microorganismo patógeno. Para ello es necesario seguir una posología que consiga que en el foco de la infección se alcance una concentración del medicamento superior a la mínima concentración capaz de inhibir al microorganismo (Wainwright y Swan, 1986), durante el tiempo suficiente. La automedicación con antibióticos supone un serio problema de salud pública, pues la inadecuada elección del antibiótico y, especialmente, una incorrecta posología, puede generar poblaciones de bacterias resistentes a dicho antibiótico. Por otro lado, los antibióticos y antimicrobianos son totalmente inefectivos en las enfermedades virales, por lo que su uso debe evitarse en estos casos (Van, 2006).

Puede clasificarse según su mecanismo de acción, por lo que hoy en día encontramos una gran variedad de antibióticos. Considerando lo anterior, encontramos aquellos que inhiben la síntesis de la pared celular, proteínas, ácidos nucleicos, actividad enzimática y los que alteran la integridad de la membrana (Chambers, 2003).

Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular

Actúan a distintos niveles de la biosíntesis del peptidoglucano, capa esencial para la supervivencia de las bacterias, y el daño se produce por la pérdida de la rigidez de la célula bacteriana que puede causarle la muerte; por lo tanto, son considerados como agentes bactericidas. La síntesis del peptidoglucano se lleva a cabo en tres etapas y los distintos antimicrobianos pueden afectar cada una de ellas. Los representantes de este grupo son las penicilinas y cefalosporinas ver Tabla 10 (Chambers, 2003).

Tabla 10. *Clasificación de los antibióticos penicilinas y cefalosporinas.*

Antibióticos de familia de penicilinas	Antibióticos de familia de cefalosporinas
Penicilinas Naturales — Penicilina G (bencil) — Penicilina G procaína — Penicilina G benzatina	Primera generación (espectro estrecho) — Cefadroxilo — Cefazolina — Cefalexina — Cefaloridina — Cefalotina — Cefapirina — Cefadrina — Cefminox
Antibióticos de familia de penicilinas Penicilinas orales — Penicilina V — Fenitcilina — Propicilina	Antibióticos de familia de cefalosporinas Segunda generación (espectro aumentado) — Cefaclor — Cefamandol — Defonicid — Ceforanide — Cefuroxima — Loracarbef — Cefotetan — Cefoxitin — Cefprozil — Cefonicida
Semisintéticas • Resistentes a penicilinas — Meticilina — Nafcilina — Cloxacilina — Dicloxacilina — Oxacilina — Flucloxacilina	Tercera generación (amplio espectro) — Cefdinir — Cefixime — Cefoperazona — Cefotaxima — Ceftazidima — Ceftriaxona — Cefpodoxima — Cefditoren pivoxilo — Cefitibuteno — Tazicef — Cefpiramida — Cefsulodin
Amplio espectro	Cuarta generación (espectro mejorado)

www.bdigital.ula.ve

Continuación de Tabla 10. *Clasificación de los antibióticos penicilinas y cefalosporinas.*

— Ampicilina	— Cefepime
— Amoxicilina	— Cefetecol
— Bacampicilina	— Cefquinone
— Pivampicilina	— Flomoxef
— Carbenicilina	— Cefoselis
— Ticarcilina	— Cefozopran
— Azlocilina	— Cefpirome
— Mezlocilina	— Ceflaprenam
— Piperacilina	
— Apalcilina	
Antibióticos de familia de penicilinas	Antibióticos de familia de cefalosporinas
Aminopenicilinas	
— Hetacilina	
— Espicilina	
— Metampicilina	
— Talampicilina	
— Ciclacilina	
Amidinopenicilinas	
— Mecilinam y	
— Pivmecilinam	

Tomado y modificado de Chambers, 2003.

Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas

Los ribosomas 70S bacterianos están constituidos por dos subunidades designadas como subunidad 30S y subunidad 50S. Estas subunidades constituyen el sitio de acción de agentes antimicrobianos, localizándose en ellas proteínas específicas a las cuales se unen las drogas. Los Aminoglucósidos (Estreptomina, Neomicina, Kanamicina, Amikacina, Tobramicina, Gentamicina, Espectinomicina, Paromomicina), son azúcares complejos obtenidos de varias especies de *Streptomyces* e interfieren con la función ribosomal bacteriana, específicamente con la subunidad 30S. La Espectinomicina se une a proteínas diferentes del ribosoma, no es bactericida y se usa ampliamente en el tratamiento de la gonorrea (Chambers, 2003).

Las tetraciclinas actúan también en la subunidad ribosomal 30S inhibiendo la unión del aminoacil ARNt al ribosoma, sólo que esta unión no es definitiva sino temporal, por lo cual ejerce sólo un efecto bacteriostático. El uso de las tetraciclinas es amplio en la terapéutica de infecciones causadas por bacterias de los géneros *Chlamydia* y *Mycoplasma* (Chambers, 2003).

La paromomicina se une también a la subunidad ribosomal 30S y causa bloqueo del ARNt con la consecuente liberación de cadenas incompletas (Chambers, 2003).

Tres clases importantes de drogas actúan en la subunidad ribosomal 50S: cloranfenicol, macrólidos y lincinoides (Lincomicina y Clindamicina). El Cloranfenicol es un agente bacteriostático que actúa contra organismos grampositivos y gramnegativos inhibiendo la formación de uniones peptídicas al bloquear la enzima peptidiltransferasa. Los macrólidos (Eritromicina y Oleandomicina), son compuestos con grandes anillos de lactona y al unirse a la subunidad 50S interfieren con la actividad de la peptidiltransferasa, con la translocación o con ambas funciones. El más importante es la Eritromicina que actúa sobre bacterias Grampositivas y algunas gramnegativas como *Haemophilus*, *Chlamydia* y *Legionella*, inhibe la formación de cadenas nuevas del péptido y es bacteriostático ver tabla 11 (Chambers, 2003).

Tabla 11. *Antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas.*

Inhiben la subunidad ribosomal 30S			Inhiben la subunidad ribosomal 50S	
Familia	de	— Estreptomicina	Familia de	— Eritromicina
Aminoglucósidos		— Gentamicina	Macrólidos	— Oleandomicina
		— Sisomicina		— Espiramicina
		— Netilmicina		— Josamicina
		— Neomicina		— Claritromicina
		— Kanamicina		— Diritromicina
		— Tobramicina		— Azitromicina

Continuación de Tabla 11. *Antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas.*

	— Paromomicina		— Roxitromicina
	— Amikacina		— Tilosina
	— Dibekacina		— Miocamicina
	— Isepamicina		
	—		
	Espectinomicina		
Otro antibiótico de diferente familia que inhibe la subunidad 30S	— Tetraciclinas	Antibióticos de otras familias que inhiben la subunidad 50S	— Lincomicina — Clindamicina — Cloranfenicol

Topmado y modificado de Chambers, 2003.

Antibióticos que inhiben la síntesis de ARN

- Rifampicina: Se une a la ARN polimerasa bloqueando la síntesis del ARNm (Chambers, 2003).

Antibióticos que inhiben la síntesis de ADN.

- Quinolonas: Inhiben la ADN girasa (Chambers, 2003).

Antibióticos que inhiben la actividad enzimática.

- Sulfonamidas y Trimetroprim: interviene en el metabolismo del ácido fólico, que es un precursor de la síntesis de purinas, pirimidinas y aminoácidos. Se bloquea la síntesis de ácidos nucleicos y la pared celular. Así mismo, las sulfonamidas inhiben la enzima dihidropteroato y el Trimetroprim inhibe la enzima dihidrofolatoreductasa (Chambers, 2003).

Antibióticos que alteran la integridad de la membrana

Numerosos agentes catiónicos y aniónicos pueden causar la desorganización de la membrana. Dentro de los antibióticos que actúan a este nivel, está la Polimixina

B y la Colistina (Polimixina E), inhibidores de bacterias gramnegativas que tienen lípidos de carga negativa en su superficie. Su acción es desorganizar la permeabilidad de la membrana ocasionando la salida de cationes de la célula bacteriana (Chambers, 2003).

Las Polimixinas no son de uso sistémico, pues pueden unirse a varios ligandos de células del tejido corporal y son tóxicas para aparato renal y sistema nervioso. Otro antibiótico que actúa en la membrana es la gramicidina, la cual produce desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y la formación de poros por donde puede haber pérdida del contenido citoplasmático de la bacteria (Chambers, 2003).

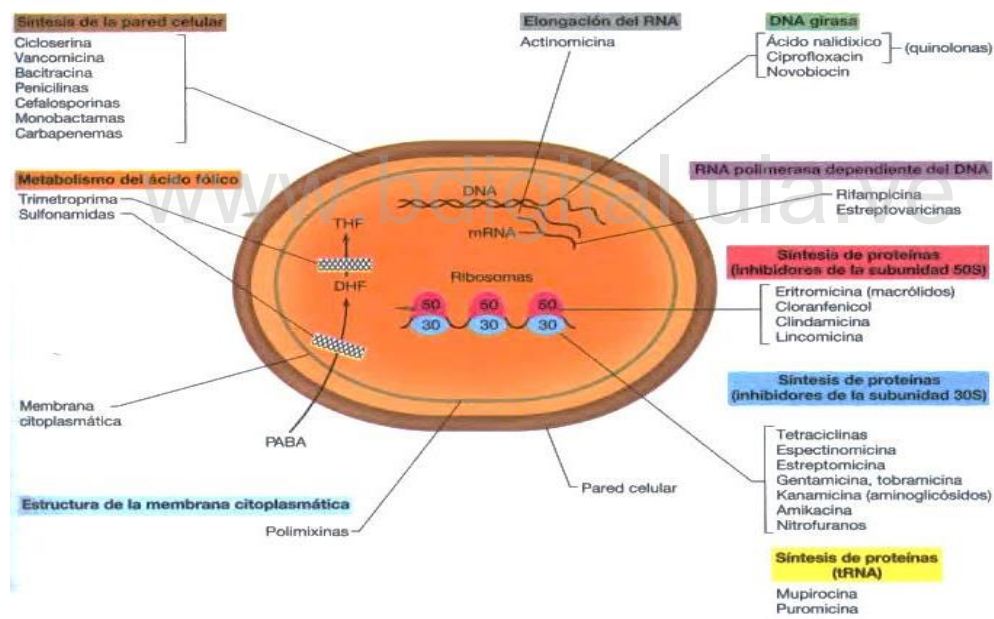


Figura 11. Sitio de acción de los antibióticos sobre la célula bacteriana.

Tomado y modificado de Chambers (2003).

Susceptibilidad de los microorganismos a agentes químicos y térmicos biológicos para la determinación de su efectividad

Como no puede predecirse la susceptibilidad de las bacterias y hongos a los agentes microbianos es necesario estudiar la sensibilidad individual de cada cepa a estas drogas, pudiéndose elegir entonces el agente apropiado (el más activo contra patógenos, el menos toxico para el huésped, con las características farmacológicas apropiadas y el más económico), que proporcione mayores posibilidades de una evolución favorable en el paciente. (Araque, 1995).

Los compuestos pueden actuar como agentes bactericidas o bacteriostáticos, la cual se define de la manera siguiente:

- **Bactericidas:** sustancia antimicrobiana que tiene la propiedad de destruir, lisis o matar las bacterias. Es un proceso irreversible (Revista MedULA, 2016).
- **Bacteriostáticos:** sustancia antimicrobiana que tiene la capacidad de inhibir la multiplicación bacteriana, proceso que se reanuda al eliminarse la droga que actúa sobre el microorganismo (Revista MedULA, 2016).

Resistencia bacteriana

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas. La resistencia a los antibióticos se produce cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos fármacos. Son las bacterias, y no los seres humanos ni los animales, las que se vuelven resistentes a los antibióticos. Estas bacterias farmacorresistentes pueden causar infecciones en el ser humano y en los animales y esas infecciones son más difíciles de tratar que las no resistentes. La resistencia a los antibióticos hace que se incrementen los costos médicos, que se prolonguen las estancias hospitalarias y que aumente la mortalidad (Pastor, 2006).

Es necesario que se cambie urgentemente la forma de prescribir y utilizar los antibióticos. Aunque se desarrollen nuevos medicamentos, si no se modifican los

comportamientos actuales, la resistencia a los antibióticos seguirá representando una grave amenaza. Los cambios de comportamiento también deben incluir medidas destinadas a reducir la propagación de las infecciones, a través de la vacunación, el lavado de las manos, la seguridad de las relaciones sexuales y una buena higiene alimentaria (Pastor, 2006). Existen mecanismos de resistencia bacteriana entre las cuales se encuentran:

1. Resistencia natural. Es un carácter constante de todas las cepas de una misma especie bacteriana. Ejemplos: Resistencia natural del *Proteus mirabilis* a las tetraciclinas y a la colistina. Resistencia natural a la *Klebsiella pneumoniae* las penicilinas (ampicilina, amoxicilina) (Prescott, Harley y Klein, 1999).
2. Resistencia adquirida. Característica propia de ciertas cepas, dentro de una especie bacteriana naturalmente sensible, cuyo patrimonio genético ha sido modificado por mutación o adquisición de genes. Este tipo de resistencia está comprendida por dos mecanismos, mecanismo genético y bioquímico (Prescott y col, 1999).

Mecanismo genético. El mecanismo genético puede ser:

- La mutación de un gen implicado en el modo de acción de un antibiótico.
- La adquisición de genes de resistencia transferidos a partir de una cepa perteneciente a una especie idéntica o diferente.

Mecanismo bioquímico. El mecanismo bioquímico puede ser:

- Una producción de enzimas por la bacteria, que inactivan el antibiótico.
- Una modificación del blanco del antibiótico.
- Una impermeabilidad de la pared bacteriana por modificación o disminución cuantitativa de las porinas.
- Un mecanismo de efusión: expulsión de la molécula por un transporte activo.

3. Resistencia cruzada. Es cuando se debe a un mismo mecanismo de resistencia. En general, afecta a varios antibióticos dentro de una misma familia (ejemplo: la resistencia a la Oxacilina en los *Staphylococcus* cruza con todos los β -lactámicos.) (Prescott y col, 1999).

Métodos para determinar la actividad antibacteriana

Ni los mecanismos de acción ni los métodos para determinar la actividad antimicrobiana que tienen los extractos se han definido del todo. En consecuencia, existen diferentes métodos que son los más utilizados, según Kalemba y Kunicka (2003), incluyen:

- Método de difusión del disco en agar (prueba de Kirby-Bauer)
- Método de dilución en caldo o agar (Concentración Inhibitoria Mínima (CIM))
- Método de la cinta o epsilometro Etest® (AB BIODISK).

Prueba de difusión del disco en agar (Kirby-Bauer)

Es un método muy sencillo y el más utilizado para determinar la actividad antimicrobiana contra microorganismos aeróbicos, y es fácil de usar en los laboratorios de rutina, la cual brinda información solamente cualitativa sobre la sensibilidad de un microorganismo o un agente antibacteriano determinado, orientado al tratamiento (Kalemba y Kunicka, 2003). Es la técnica más desarrollada de valoración de la actividad antimicrobiana, es un método muy fiable y preciso (Aguilar, 2007).

El principio de la difusión del antibiótico en agar radica sobre la superficie de una placa de agar Müller-Hinton (medio de cultivo rico, diseñado especialmente para hacer ensayos de sensibilidad) se inocula una cantidad estandarizada de bacterias, sembrándolas de forma uniforme para obtener después de la inoculación un "césped" bacteriano. A continuación, se colocan discos de papel de filtro impregnados con

concentraciones conocidas de los diferentes antibióticos. La elección de los antibióticos a probar depende del germen y del foco de infección. El antibiótico difundirá desde el papel filtro al agar de forma radial. Se incuba la placa durante 18-24 horas a 37 °C (respetar este parámetro, porque temperaturas menores pueden disminuir la velocidad del crecimiento del germen y la difusión del antibiótico, dando halos irregulares difíciles de medir), y luego se miden los halos de inhibición de desarrollo, interpretándose de acuerdo a tablas confeccionadas previamente. Los resultados se expresan como: Sensible (S), Intermedio o Moderadamente sensible (I) y Resistente (R) (Koneman y col, 2001).

Método de dilución en caldo o en agar

Las técnicas de dilución en caldo o agar, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad "*in vitro*" de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico (ATB) en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada uno de los tubos o placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar "overnight" a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. El resultado final depende significativamente de la metodología empleada. Por ello, para obtener valores reproducibles intra e interlaboratorios, cada detalle técnico debe ser cuidadosamente controlado (Brooks y col, 2005).

Método de las Tiras de Epsilon

Es un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana, sencillo y se correlaciona bien con el método de dilución en caldo. Consiste en una tira de plástico no poroso que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano. Se inocula la placa de agar con el microorganismo y la tira de Etest se coloca sobre su superficie produciéndose la difusión del antibiótico desde el

soporte hasta el agar. Tras la incubación se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica (Wayne, 1999).

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. La concentración mínima inhibitoria es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobiano (Andrews, 2001).

Las concentraciones inhibitoria mínimas pueden ser determinadas mediante métodos de microdilución en caldo, normalmente siguiendo las directrices de centros de referencia tales como el CLSI (Clinical Laboratory Institute Standards), BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) o EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Existen otro método basado en la difusión en agar: las tiras de Etest, consiste en unas tiras de plástico inerte que incorporan un gradiente de concentración de antimicrobiano. Cuando se depositan sobre las placas de agar inoculadas, el antimicrobiano difunde en el medio, y tras la incubación, se determina la CIM en el punto de intersección de la elipse de inhibición del crecimiento (Andrews, 2001).

Definición Operacional de Términos

Actividad antimicrobiana: es una sustancia que elimina o inhibe el crecimiento de microorganismos, tales como bacterias, hongos o parásitos. Basado en ello, los siguientes pueden referirse a agentes microbianos (Galbis y Antonio, 2000).

Actividad biológica: la actividad farmacológica o actividad biológica son los efectos benéficos o adversos de una droga sobre la materia viva (Galbis y Antonio, 2004).

Antibióticos: Sustancia que tiene la capacidad de eliminar o de interrumpir el crecimiento y la proliferación de diversos microorganismos patógenos. Esto se debe a que los antibióticos pueden actuar como bactericidas o desarrollar una acción bacteriostática (Robertson y col, 1975).

Cromatografía: Es un método físico de separación para la caracterización de mezclas complejas, la cual tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia; es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. Diferencias sutiles en el coeficiente de partición de los compuestos dan como resultado una retención diferencial sobre la fase estacionaria y, por tanto, una separación efectiva en función de los tiempos de retención de cada componente de la mezcla (Bruneton, 2001).

Etnobotánica: Estudios de las bases biológicas, ecológicas y culturales de las interacciones y relaciones entre las plantas y el hombre a lo largo del tiempo de evolución y del espacio socio geográfico (Akerle, 1993).

Extractos: mezcla de compuestos secundarios obtenidos después de obtener tejidos vegetales orgánicos o inorgánicos en diferentes condiciones (Bisset, 1994).

Inóculo: Es una porción de la población de microorganismos (Ramírez y col, 2006).

Metabolitos Secundarios: son compuestos químicos sintetizados por las plantas que no cumplen funciones esenciales en ella, no son indispensables, pues no intervienen en el metabolismo primario de las plantas (Escudero, 2012).

Principio activo: Principio activo responsable de la actividad farmacológica y del uso terapéutico de una droga (Campos y Vásquez, 2009).

Susceptibilidad antimicrobiana: Es la prueba microbiológica que se realiza para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de una bacteria a un grupo de antibióticos. Las técnicas de antibiograma son las utilizadas en el laboratorio de microbiología para estudiar la actividad de los antimicrobianos frente a los microorganismos responsables de las infecciones (Robertson y col. 1975).

Operacionalización de las Variables

La variable dependiente: es la actividad antibacteriana de los extractos de las cortezas externa e interna del *Himatanthus attenuatus* y la variable independiente: está representada por la composición química de los extractos de hexano y etanol de las cortezas *Himatanthus attenuatus*., estas fueron operacionalizadas utilizando varios criterios. Específicamente, se categorizo el tipo de variable y se definió conceptual y operacionalmente. Estos aspectos fueron importantes para conocer las dimensiones de la variable y, a la vez, referir cómo se mide (ver Tablas 12 y 13).

Tabla 12

Operacionalización de la Variable Dependiente actividad antibacteriana de los extractos de las cortezas externas e internas de Himatanthus attenuatus

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores
Actividad antibacteriana de los extractos de los hexano y etanol de las cortezas externas e internas de <i>Himatanthus attenuatus</i> .	Dependiente	Es la capacidad de bloquear los ataques de microorganismos interfiriendo en su acción (Domingo y Brea, 2003).	La actividad antibacteriana de se puede medir a través del Método de difusión en agar (Kirby-Bauer).	Cepas grampositivas: <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> . Cepas gramnegativas: <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sensible Sensibilidad intermedia Resistente Presencia o ausencia del halo de inhibición

(Largo y Rojas, 2019).

Tabla 13

Operacionalización de la Variable Independiente composición química de los extractos de hexano y etanol de las cortezas de Himatanthus attenuatus.

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores
Composición química de los extractos de hexano etanol de las cortezas de <i>Himatanthus attenuatus</i> .	Independiente Cualitativa	Sustancias (metabolitos secundarios) presentes en los extractos y en que proporciones se encuentran (Gutiérrez y col, 2002).	Tamizaje fitoquímico: permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés (Lock, 1994).	Presencia o Ausencia de triterpenos, ácidos fenólicos, taninos, alcaloides, cumarinas y saponinas.	Se observan precipitados y cambios de color para triterpenos, ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides, cumarinas y saponinas.

Largo y Rojas, 2019

Hipótesis

Estudios previos demuestran que especies de la familia Apocynaceae también producen metabolitos secundarios como flavonoides, triterpenos y esteroides biológicamente activos. En este sentido, es de esperar que los extractos obtenidos de las cortezas de la especie *Himatanthus attenuatus*, posean actividad antibacteriana en cepas de ATCC.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Esta investigación fue confirmatoria, puesto que se confirmó que existe relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos (hexano y etanol) de las cortezas externas e internas del *Himatanthus attenuatus* en cepas de ATCC.

Diseño de la investigación

Es de tipo Exploratoria, consiste en someter la especie vegetal a determinadas condiciones, estímulos o tratamiento (variable independiente), para observar los efectos o reacciones que en ella se producen (variable dependiente). Hurtado (2008), asegura que la investigación exploratoria tiene como objetivo esencial familiarizarnos con un tópico desconocido o poco estudiado o novedoso. Por tanto, es exploratoria, ya que se han llevado a cabo pocos estudios referentes a la composición química de los extractos de *Himatanthus attenuatus* y no se ha estudiado su acción contra enfermedades infecciosas. No se ha llevado a cabo estudios sobre su actividad antibacteriana. La investigación presenta un diseño de tipo experimental-transversal. Según, Hernández y col, (2010), es experimental, pues el desarrollo de los eventos se logrará en base a ensayos experimentales propiamente dichos. Por otro lado, el diseño transversal, es aquel en el cual la muestra es recolectada en un mismo periodo de tiempo.

Población y muestra

Unidad de Investigación: conformada por la especie en estudio *Himatanthus attenuatus*

Selección del tamaño de la muestra: está representada por las cortezas externas e internas de *Himatanthus attenuatus*. Se recolectaron 300 gramos en total de corteza de la especie vegetal, en la cual fueron separados en 195 g para la corteza externa y 105 g para la corteza interna. La determinación botánica la realizó el Ingeniero Pablo Méndez, adscrito al herbario MERF (Mérida Farmacia) de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Sistema de variables

Las variables relacionadas con el propósito de la investigación fueron:

- Variable Independiente (VI): composición química de los extractos de las cortezas la especie de *Himatanthus attenuatus*.
- Variable Dependiente (VD): actividad antibacteriana de los extractos de las cortezas la especie de *Himatanthus attenuatus*.

Instrumento de recolección de datos

En esta investigación se empleo la observación como técnica, la cual consiste en visualizar la presencia o ausencia de los diferentes metabolitos secundarios presentes en los extractos de la planta a través del tamizaje fitoquímico. Además de describir la sensibilidad o resistencia de los diferentes microorganismos estudiados mediante la medición de los halos de inhibición de los extractos obtenidos de las cortezas de la especie *H. attenuatus*; descritos en las tablas de los resultados 15 y 16 respectivamente.

Procedimientos de la investigación

1. Recolección del material vegetal. Las hojas y corteza del *Himatanthus attenuatus* (Benth.) Wood, se recolectaron en la población de San Fernando de Atabapo,

estado Amazonas, Venezuela. La muestra fue identificada y depositada bajo un voucher N° SL-001 en el Herbario MERF Dr. Luis Terán, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

2. Extracción del extracto vegetal. Para la preparación de los extractos de la especie de *Himatanthus attenuatus*., se pesaron 195 g para la corteza externa y 105g para la corteza interna previamente secas y pulverizadas, fueron sometidas a un proceso de extracción por reflujo con hexano y etanol, que es una técnica experimental del laboratorio para el calentamiento de reacciones que transcurren a temperatura superiores al ambiente y en las que conviene mantener un volumen de reacción constante (Domínguez y Domínguez, 1990). Posteriormente el solvente se llevó a concentrar en un rota vapor a presión reducida, obteniéndose los extractos concentrados (Esquema 1).
3. Tamizaje fitoquímico. Para la determinación de los metabolitos secundarios presentes en cada extracto, mediante las pruebas fitoquímicas se procedió a la evaporación de los solventes. Entre las pruebas químicas cualitativas efectuadas se encuentran:
 - Ensayo Dragendorff, Wagner y Mayer (alcaloides): Se pesa una porción del extracto etanólico y se le adicionaron 10 mL de HCl 10 %, se colocaron en baño de maría hasta ebullición por 30 minutos. Se filtró y el filtrado se distribuyó en 3 tubos de ensayo. Se adicionó a cada tubo gotas del reactivo correspondiente (Dragendorff, Wagner y Mayer). La aparición de turbidez y un precipitado indica la positividad de la prueba.
 - Reacción de Cloruro Férrico (FeCl_3): se tomó una alícuota de los extractos y se le adicionó 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica. La presencia de una coloración rojo vino evidencia la presencia de compuestos fenólicos en general. El desarrollo de una coloración verde intensa indica la presencia de taninos pirocatecólicos. Si se torna a un color azul indica la presencia de taninos pirogalotánicos.

- Reacción de Shinoda: se tomó una porción del extracto diluido y se le adicionó 1 mL de etanol absoluto, 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado y virutas de magnesio. La formación de una coloración roja indica la presencia de auronas o chalconas. Si al agregar magnesio se forma una coloración naranja a roja indica la presencia de flavonas, si es rojo flavonoles y si es magenta flavononas.
- Reacción de Liebermann-Burchard: se tomó 2 mL del extracto líquido diluido, posteriormente se añadió 1 mL de anhídrido acético 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado, se dejó reposar durante 5 minutos. La formación en la interfase de un color azul o verde indica la presencia de esteroides. La formación en la interface de un color rosa, rojo, magenta o violeta indica la presencia de triterpenoides.
- Prueba de la Espuma: se colocó 10 gotas del extracto en un tubo de ensayo y se adicionó 1 mL de agua destilada, se agitó vigorosamente. La positividad de la prueba se evidencia por la presencia de espuma.
- Prueba de Hidróxido de Amonio (NH_4OH): a una pequeña porción del extracto se le adicionó una gota de hidróxido de amonio concentrado. La presencia de una coloración roja que aparece en los dos primeros minutos indica antraquinonas.

Identificación de los compuestos químicos de los extractos.

Cromatografía en Capa Fina (CCF)

El análisis por Cromatografía en Capa Fina (CCF), se realizó mediante una fase estacionaria que consiste en una capa delgada de un adsorbente como el gel de sílice (SiO_2), depositada sobre una lámina de aluminio o de plástico.

1. Procedimiento. Una placa de CCF es una lámina de metal o plástico recubierta con una capa delgada de un sólido adsorbente (gel de sílice). Se depositó una pequeña cantidad de extracto de la especie vegetal *Himatanthus attenuatus*. Entonces, la placa se introdujo en una cubeta cromatográfica, de forma que sólo la parte inferior de la placa queda sumergida en el líquido. Este líquido o eluyente (hexano/ acetato) es la

fase móvil y asciende por la placa de CCF por capilaridad. A medida que el eluyente pasa por el lugar donde está la mancha de la mezcla problema se establece un equilibrio entre las moléculas de cada uno de los componentes en la mezcla que son adsorbidas y las que se encuentran en disolución. En principio, los componentes se diferenciarán en solubilidad y en la fuerza de su adsorción, de forma que unos componentes se desplazarán más que otros. Cuando el eluyente llega a la parte superior de la placa, esta se saca de la cubeta, se seca, y los componentes separados de la mezcla se visualizan (Figura 9).

2. Visualización de las manchas. Si los compuestos son coloreados se pueden observar las manchas a simple vista. Si no es así, hay varios métodos para visualizar las manchas correspondientes a cada componente de la mezcla. Se utilizó luz ultravioleta (UV254) para observar la placa, colocando un solvente revelador como solución de Vainillina 1% en etanol.

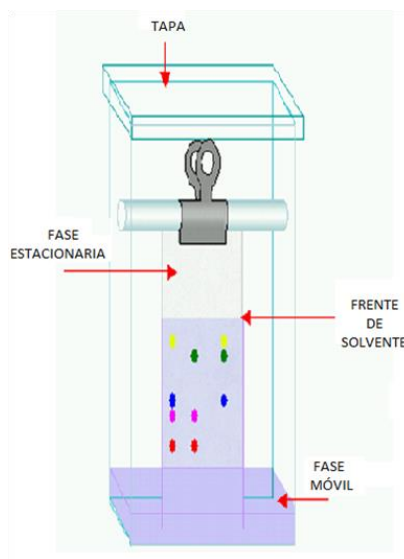


Figura 12. Cromatografía en Capa Fina (CCF)

1. Revelado de las placas. El indicador absorbe la luz y emite luz visible. La presencia de un compuesto activo en UV evita que el indicador absorba la luz en la zona en la que se encuentra el producto y el resultado es la visualización de una mancha en la placa que indica la presencia de un compuesto (Figura 10).

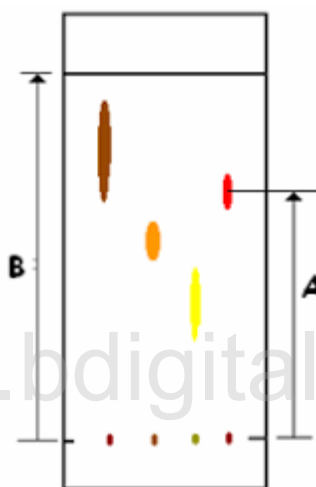


Figura 10. Revelado de las placas.

Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de *Himatanthus attenuatus*.

La actividad antibacteriana fue evaluada en el laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigaciones, ubicado en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de la Doctora Yndra Cordero de Rojas y la Doctora Ysbelia Obregón.

- Evaluación de la actividad antibacteriana. A partir de los extractos (hexano y etanol), se prepararon las siguientes diluciones: 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 y 15,62 ppm. Todos los extractos fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO) para obtener concentraciones de 1000 ppm. La

evaluación de la actividad antibacteriana se realizó mediante el método de difusión del disco en agar, para cual se seleccionaron 5 microorganismos; 2 especies de bacterias Grampositivas y 3 especies de bacterias Gramnegativas de referencia internacional pertenecientes a la colección de cultivos Tipo Americano (ATCC). Estas fueron obtenidas del Cepario del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, a cargo de la Lic. María E. Nieves.

- Para el presente ensayo se tomaron en cuenta los controles positivos (Ampicilina®, Eritromicina® y Piperacilina®), según lo establecido por el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos (CLSI) para cada especie bacteriana. En la tabla 14 se observan los halos de inhibición obtenidos con los antibióticos controles para las cepas de referencia, los cuales mostraron ser resistentes según el punto de corte recomendado por el CLSI.

Tabla 14. Halos de inhibición de los controles positivos para las cepas de referencia internacional.

	Ampicilina	Eritomicina	Piperacilina
Cepas Bacteriana	Referencial	Referencial	Referencia
<i>S. aureus</i> ATCC. 259232		≥ 23 mm	
<i>E. faecalis</i> ATCC. 29219	≥ 17 mm		
<i>E. coli</i> ATCC 25922			≥ 21 mm
<i>k. pneumoniae</i> ATCC. 23357			≥ 21 mm
<i>P. aeruginosa</i> ATCC. 27853			≥ 21 mm

- Preparación de las placas. A cada placa se le colocó aproximadamente 15 mL del agar Müeller-Hinton previamente preparado y esterilizado, se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial, bajo la

supervisión de la Dra. Yndra Cordero de Rojas, posteriormente se dejó solidificando a temperatura ambiente.

- Preparación de los discos impregnados. Los discos de papel filtro se cortaron a un diámetro de 6 mm, se organizaron en placas de Petri de vidrio y se esterilizaron con luz ultravioleta (UV) 24 horas antes del ensayo. Posteriormente, se le adicionaron 10 μ L de los diferentes extractos de *Himatanthus attenuatus*.
- Preparación de los inóculos bacterianos. Para la preparación de los inóculos bacterianos las cepas frescas fueron purificadas en medio de cultivo nutritivo, con un tiempo de incubación de 16 a 18 horas, de estas se tomó una pequeña cantidad de colonias con un asa en aro y se suspendieron en una solución de cloruro de sodio al 0,85 % estéril, ajustando el inóculo hasta una concentración bacteriana equivalente a 0,5 en la escala de Mac Farland (10^{6-8} UFC/mL).
- Inoculación de las placas. Una vez preparadas las placas se inocularon con un hisopo de algodón estéril, debidamente humedecido con los inóculos bacterianos en forma homogénea; girando sucesivamente dicha placa en ángulos de 90°.

Análisis de la actividad antibacteriana.

Se empleó el método de difusión del disco en agar (prueba de Kirby-Bauer), por lo que el inóculo bacteriano fue diseminado con un hisopo sobre la superficie de una placa con Müeller-Hinton. Posteriormente, se colocaron los discos de papel filtro impregnado con los diferentes extractos, además se colocó el control negativo (DMSO) y los estándares de antibióticos de referencia como control positivo. Piperacilina® para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*; Eritromicina® para *Staphylococcus aureus* y Ampicilina ® para *Enterococcus faecalis*. Las pruebas fueron realizadas por duplicado.

Las placas inoculadas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a realizar la lectura con regla milimetrada, midiendo la zona clara alrededor de los discos de papel filtro impregnados con los diferentes extractos. Se interpretó un resultado como negativo o resistente (sin actividad antibacteriana) cuando no se observó un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco. Los halos de inhibición alrededor de los discos fueron interpretados en mm.

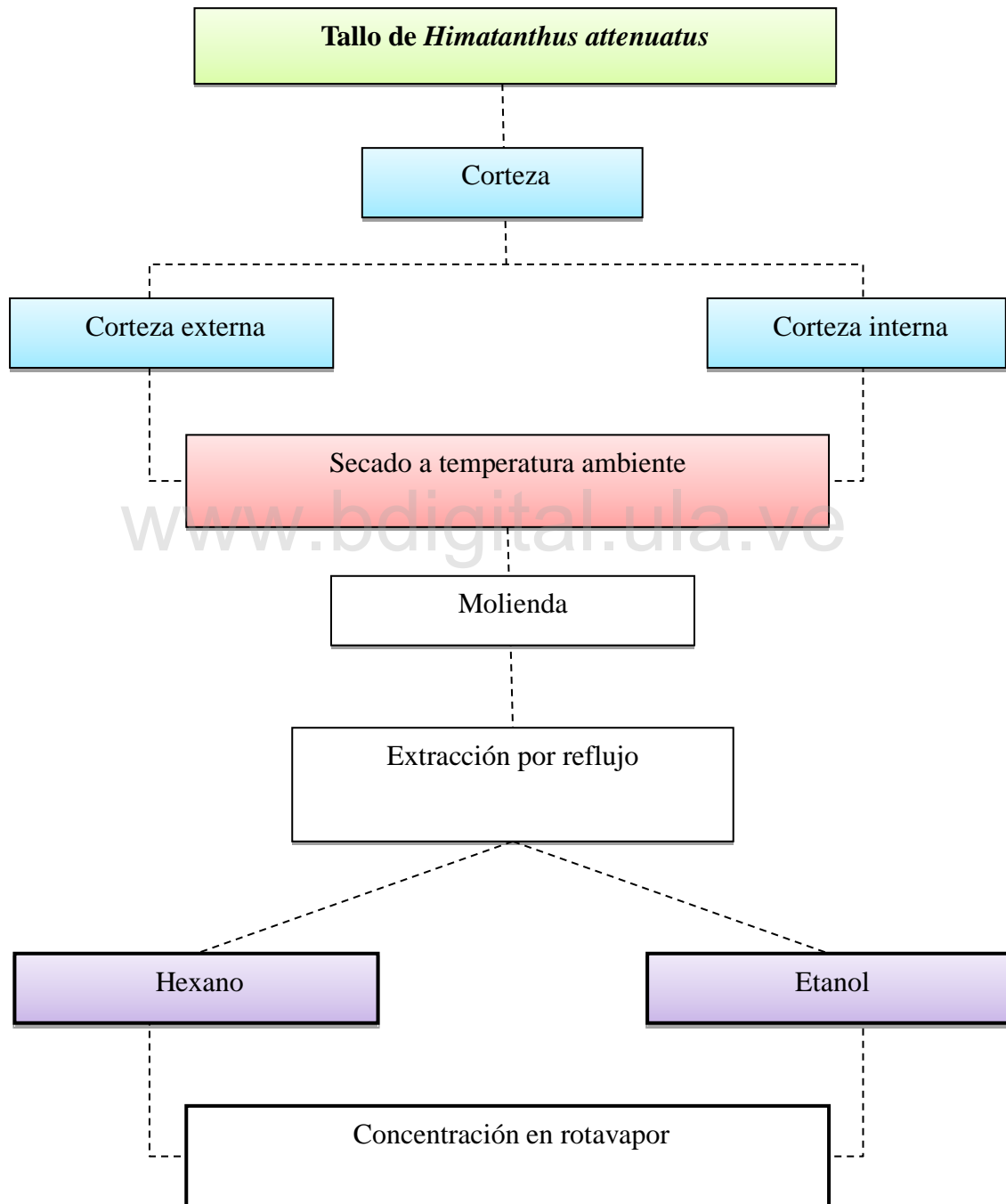
Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Se determinó la CIM que corresponde a la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo. Este procedimiento se llevó a cabo realizando diluciones de los extractos con dimetilsulfóxido (DMSO), utilizando el mismo método de difusión del disco en agar. Las diluciones seriadas fueron: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 y 15,62 ppm.

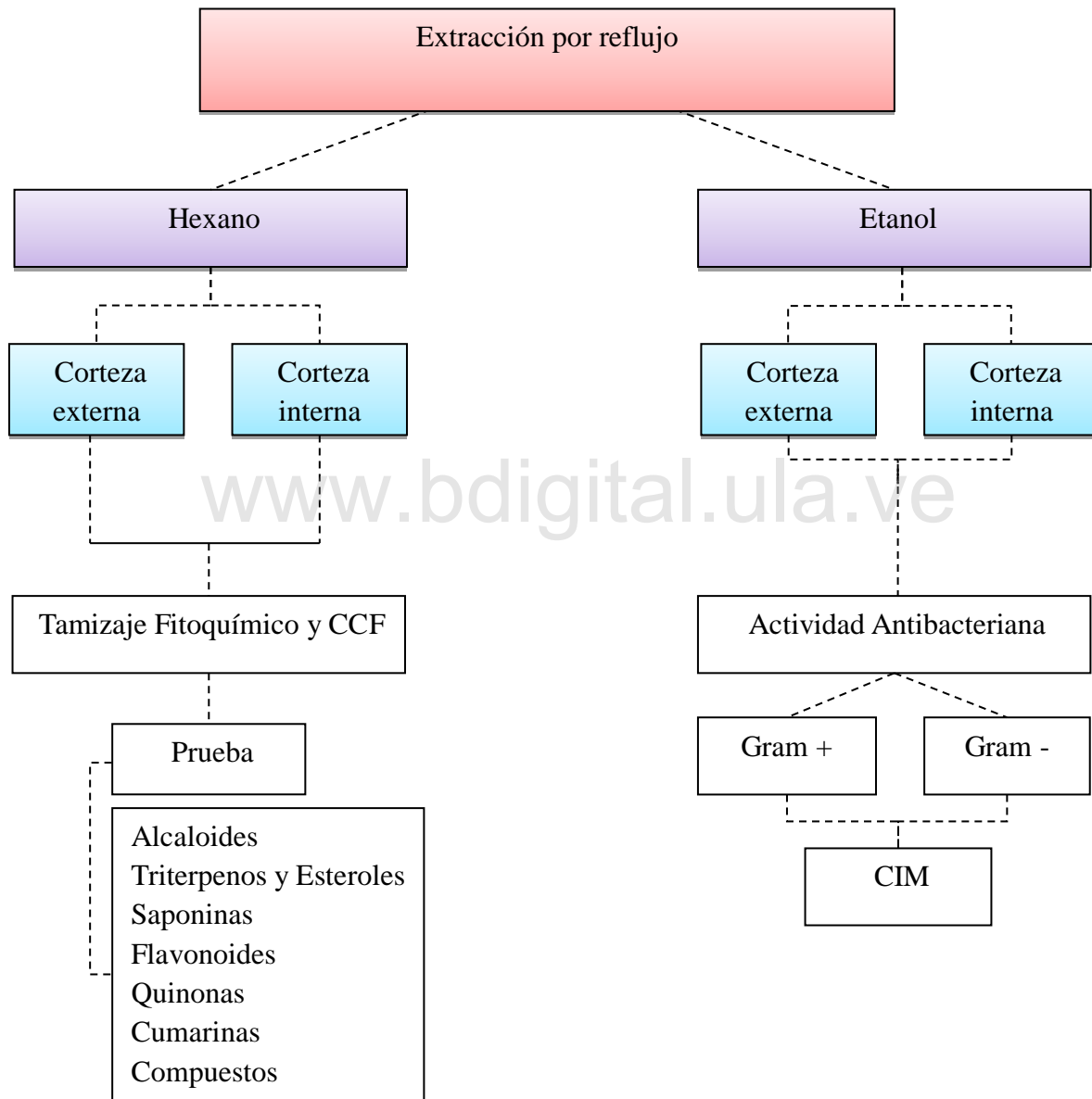
Diseño de Análisis

En esta investigación los datos fueron analizados a través de un proceso cualitativo, específicamente fueron analizados según un diseño de bi-variables.

Esquema 1. Procedimiento para la obtención de los extractos de hexano y etanol de las cortezas externas e internas de *Himatanthus attenuatus*.



Esquema 2. Procedimiento experimental para el tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de los extractos de hexano y etanol de las cortezas externas e internas de *Himatanthus attenuatus*.



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Himatanthus attenuatus., es una especie vegetal recolectada en la población de San Fernando de Atabapo, Edo. Amazonas, fue sometido a procesos de extracción con la finalidad de obtener los extractos de hexano y etanol.

Los extractos de *Himatanthus attenuatus.*, se obtuvieron a partir de la corteza externa e interna de la especie vegetal pulverizadas, las cuales se sometieron a un proceso de extracción por reflujo empleando hexano y etanol. Sin embargo, para el Análisis fitoquímico para la CCF, la evaluación de la actividad antibacteriana solo se trabajó con los extractos de etanol (Corteza externa e interna), Pues fueron los únicos extractos que se lograron disolvieron en acetona y DMSO, para el procedimiento de CCF y la actividad antibacteriana respectivamente. Los porcentajes de rendimiento de extractos obtenidos fueron: 6,37 % para el extracto de hexano (corteza externa), 12,18 % del extracto de hexano (corteza interna), 11,72 % del extracto de etanol (corteza externa) y 12,21 % (corteza interna). Posteriormente los extractos se sometieron al tamizaje o screening fitoquímico preliminar, para detectar la presencia de metabolitos secundarios. Los resultados de las pruebas químicas realizadas se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Resultados del análisis fitoquímico de la especie vegetal de *Himatanthus attenuatus*.

Grupo del compuesto	Ensayos	Interpretación	EHCE	EHCI	EECE	EECI
Alcaloides	Dragendorff	Presencia de precipitado anaranjado	ND	ND	+	+
	Mayer	Presencia de precipitado blanco	ND	ND	+	+
	Wagner	Presencia de Precipitado marrón	ND	ND	+	+
Triterpenos	Lieberman	Presencia de color rojo	-	-	+	+
		Presencia de color intenso	-	-	-	-
Saponinas	H ₂ O Destilada + Agitación	Formación de espuma	-	-	-	-
Flavonoides	Shinoda	coloración roja	-	-	-	-
Quinonas	Hidróxido de Amonio	de Coloración violeta	-	-	-	-
Cumarinas	Hidróxido de Sodio Al 10%	Coloración amarillo intenso	-	-	-	-
Compuestos Fenólicos	Tricloruro Férrico	Coloración verde	-	-	-	-

(+) POSITIVA (-) NEGATIVA (ND) NO SE DETERMINO **EHCE** (Extracto de Hexano, Corteza Externa). **EHCI** (Extracto de Hexano, Corteza Interna). **EECE** (Extracto de Etanol, Corteza Externa) **EECI** (Extracto de Etanol, Corteza Interna)

En el screening fitoquímico realizado no se detectaron taninos, flavonoides, cumarinas, quinonas, saponinas, ni compuestos fenólicos, pues no se observó un cambio de color de los extractos al someterlos a las pruebas químicas respectivas mencionadas anteriormente. Solo se encontró la presencia de alcaloides en los cuatro extractos estudiados, que se evidenció mediante la presencia de diversos precipitados y la presencia de triterpenos en los extractos de etanol en corteza externa e interna de la especie vegetal ya estudiada. Así mismo, estos resultados coinciden con los de Flores y Fani (2015); quienes demuestran cualitativamente la presencia de alcaloides y triterpenos en el extracto etanólico de las cortezas externa e interna del *Himatanthus attenuatus*.

Evaluación de la actividad antibacteriana

El ensayo con los extractos obtenidos de la especie *Himatanthus attenuatus*, mediante el método de difusión del disco en agar, no mostró actividad antibacteriana frente a las cepas ATCC estudiadas. Debido a la zona geográfica o a las condiciones climáticas donde se recolectaron dicha especie ya que influyó a la concentración en la que se encuentran los metabolitos secundarios por ende intervino de forma negativa en la actividad antibacteriana de los extractos

Los resultados de este estudio (Tabla 16), revelan que los extractos provenientes de las cortezas externa e interna del *Himatanthus attenuatus* no presentan actividad antibacteriana sobre las cepas ensayadas. Estos resultados son consistentes con los reportados por Flores y Fani (2015), en los que demostraron que los extractos de hexano no presentaron actividad frente a microorganismos grampositivos. Además, solo indicaron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* en extracto etanólico, resultados contrarios a los obtenidos en este estudio.

Tabla 16. Resultados de la actividad antibacteriana de la especie vegetal de *Himatanthus attenuatus*.

Cepas Bacteriana	Extractos de <i>H. attenuatus</i>			
	EHCE	EHCI	EECE	EECI
<i>S. aureus</i> ATCC. 259232	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>E. faecalis</i> ATCC. 29219	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>k. pneumoniae</i> ATCC. 23357	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm
<i>P. aeruginosa</i> ATCC. 27853	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

EHCE (Extracto de Hexano, Corteza Externa). **EHCI** (Extracto de Hexano, Corteza Interna). **EECE** (Extracto de Etanol, Corteza Externa) **EECI** (Extracto de Etanol, Corteza Interna)

Discusión

Al comparar los resultados del estudio fitoquímico y el análisis por CCF, se puede presumir que la negatividad de la actividad antibacteriana en los extractos de la corteza del *Himatanthus attenuatus*, es debido a la baja concentración de compuestos químicos encontrados en los ensayos realizados.

Entonces se considera que el hecho de que las bacterias Gramnegativas sean resistentes a los compuestos antibacterianos de los extractos de la corteza externa e interna del *Himatanthus attenuatus* puede deberse, a las diferencias estructuras de las bacterias; la pared celular de las Gramnegativas es más delgada y tiene una membrana externa con un alto porcentaje de lípidos. Lo cual supone que los principios activos de naturaleza lipídica, no sean capaces de atravesar la pared celular rápidamente para que produzcan su acción.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Considerando la interpretación de los resultados obtenidos en esta investigación, el autor menciona las siguientes conclusiones:

- En los extractos de hexano y etanol obtenidos de las cortezas de *Himatanthus attenuatus*, se determinó de forma cualitativa la presencia de alcaloides y triterpenos, y la ausencia de flavonoides, quinonas, cumarinas, saponinas, esteroides y compuestos fenólicos.
- Los extractos analizados no presentaron actividad antibacteriana contra bacterias gramnegativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*) y grampositivas (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*).
- El estudio realizado sugiere que los metabolitos secundarios identificados de las cortezas externas e internas con hexano y etanol de la especie *Himatanthus attenuatus*, no juegan un rol significativo en la acción inhibitoria contra estas cepas bacterianas.

Recomendaciones

- Determinar el efecto antibacteriano de estos extractos de *Himatanthus attenuatus* frente a otros microorganismos, en especial contra bacterias nosocomiales.
- Investigar la actividad antimicótica de estos extractos, para confirmar, si los metabolitos secundarios identificados inhiben el crecimiento en hongos.
- Realizar estudios sobre los rendimientos y las concentraciones de los metabolitos secundarios identificados en el presente estudio, con la finalidad de saber si pueden o no ser aprovechados por la industria farmacéutica.
- Realizar extracción con otros solventes orgánicos que puedan generar otro tipo de compuestos, con la finalidad de comprobar si poseen actividad antimicrobiana en las cepas estudiadas y en otros microorganismos.

BIBLIOHEMOGRAFIAS

- Aguilar, A. (2007). *Preparación de dos formas farmacéuticas con propiedades antimicrobianas a partir de extractos de Romero (Rosmarinus officinalis), Tila (Ternstroemia pringlei) y Gordolobo (Verbascum thapsus)*.
- Akerele, O. (1988). *Medicinal Plants and Primary Health care: An Agenda for Action*. *Fitoterapia* 5: 355-363.
- Akerele, O. (1993) Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro Mundial de la Salud*, (14), 390-395.
- Álvarez, A., González, J., Urquiola, A., García, M. y Monteagudo, R. (2007). Influencia del método de secado y el tiempo de almacenamiento en estante de las hojas de *E. minutifolium* Griseb sobre la actividad citotóxica y antiherpética tipo 1. *Rev Cub de Química*; 19(1), 33-35.
- Amaral, A., Ferreira, J., Pinheiro, M. y Silva, J. (2007). Monograph of *Himatanthus sucuuba*, a plant of Amazonian folk medicine. *Pharmacognosy Reviews* 1: 305-313.
- Amaya, E. y Casale, I. (2000). *Plantas medicinales de venta en el mercado de Petare*. Libro de resúmenes del XIV Congreso Venezolano de Botánica. Caracas, Venezuela: Instituto Pedagógico de Caracas.
- Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48, 5(16); 114-203.
- Araque, M. (1995). *Uso correcto de los agentes antimicrobianos en las pruebas de susceptibilidad*. Mérida, Venezuela: ULA.
- Artículo en Revista Brasileira de Farmacognosia. 27(6). Noviembre de 2017. DOI:10.1016/j.bjp.2017.10.1002.
- Barquero, A. (2007) “Desarrollo Endógeno, Teorías y políticas de desarrollo territorial”, *Investigaciones Regionales*, Núm. 11. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=28901109>.
- Barrientos, A. y López, L. (1998). *Historia y genética del aguacate*.

- Bergen, M. (1996). Revision of *Catharanthus* G. Don. Series of Revisions of Apocynaceae XLI. *Agric. Univ. Wageningen Pap.* 96: 9-46.
- Bermúdez, A. y Velásquez, D. (2005). Etnobotánica médica de una comunidad campesina del estado Trujillo: Un estudio preliminar usando técnicas cuantitativas. *Rev. Fac. Farm. ULA*, 44: 2-6.
- Bisset, N. (1994). *Herbal drud and phytopharmaceuticals*. A handbook for practice on a scientist basis. Medpharm Scientific Publishers, Stuttgart, U. K.
- Bonilla, R. y Airteaga, M. (2005). Infecciones estafilococicas. *Revista de la Sociedad Bolivariana de Pediatría*; 44(3): 438-443.
- Boucher, Y., Douady, C., Papke, R., Walsh, D., Boudreau, M., Nesbo, C., Case, R. & Doolittle, W. (2003). *Lateral gene transfer and the origins of prokaryotic groups*.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia fitoquímica. Plantas medicinales* (2da ed.). España: Acribia editorial.
- Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67(1): 21-33.
- Cabeen, M. y Jacobs, C. (2005). Bacterial cell shape. *Nat Rev Microbiol* 3(8): 601-10.
- Calixto, J. (2005). 25 years of research on medicinal plants in Latin America. *J. Ethnopharmacol* (1), 131-134.
- Campos, P. y Vázquez, S. (2009). *Generalidades del principio activo* (1ra ed.). Barcelona, España: Universidad de Barcelona.
- Carmona, R., López, O., González, M. y Muñoz, A. (2006). Optimización del proceso de obtención del extracto acuoso de *C.officinalis*. *Rev. Cub. Plant Med.* (11), 3-4.
- Carvajal, O., Waliszewski, S., Barradas, D., Orta, Z., Haywards, P., Nolasco, C. y Angulo, O. (2009). The consumption of *Hibiscus sabdariffa* dried Calix ethanolic extract reduced lipid profile in rast. *Plants Foods for Human Nutrition*, 60(4), 153-159.

- Castillo, A. (1998). *Estudios florísticos, dendrológicos y etnobotánicos de ecosistemas boscosos venezolanos*. Memoria del Instituto de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela.
- Cetrángolo, O., Bertranou, F., Casanova, L. y Casalí, P. (2013). *El sistema de salud del Perú: situación actual y estrategias para orientar la extensión de la cobertura contributiva*. Lima, Perú: Oficina Internacional del Trabajo.
- Chambers, H. (2003). *Antimicrobianos, consideraciones generales. Vol II. Las bases farmacológicas de la terapéutica* (10ma ed.). México: McGraw-Hill.
- Chife, C. (2005). Garantía y control de calidad de materias primas vegetales para fines farmacéuticos. *Rev. Lab. Ciencia*, 4:(6), 24-26.
- Codd, L. (1963). *Apocynaceae*, pp. 244-296, en L. E. Codd y H. B. Rycroft. *Flora of Southern Africa*. Vol. 26. Pretoria: Dept. Agric. Techn. Serv. Republ. S. Africa.
- Compagnone, R., Suárez, A., Castillo, A., Delle, F. y Ferrari F. (1999). Estudio fitoquímico de algunas plantas de posible uso en la medicina tradicional venezolana. *Mem. Inst. Biol. Exp.*, 2:187-190.
- Coy, C., Parra, J. y Cuca, E. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (Rutaceae). *Revista Elementos*, 4(1): 31-39.
- Cumana, L. (2002). Etnobotánica de plantas cultivadas en la Península de Araya, estado Sucre, Venezuela. *Biomedicina Saber. (Venezuela)*, 14:105-112.
- Cushnie, T., Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoides". *Int. J. Antimicrob. Agents*, 26, 343-356
- Dewick, P. (2002). *Medicinal natural products. A biosynthetic approach*. England. *John Wiley & Sons LTD*, 5(15):215-217.
- Davidse, G., Sousa, M., Knapp, S. y Cabrera, C. (2009). Cucurbitaceae a Polemoniaceae. *Fl. Mesoamer*; 4(1): 1-855.

- Di Stasi, L. y Hiruma, C. (2002). *Plantas medicinais na Amazônia e Mata Atlântica* (2da ed.). São Paulo, Brasil: UNESP.
- Domingo, D. y Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4): 385-393.
- Ezcurra, C. (1981). Revisión de las Apocináceas de la Argentina. *Darwiniana*; 23(1):367-474.
- Farnsworth, R.; Akerele, O., Bingle, S.; Soejarto, D. y Guo, Z. (1985). Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*; 63(1), 965-981.
- Fahn, A. (1979). *Secretory tissues in plants*. London, England: Academic Press Inc.
- Fangio, M., Lurlina, M. y Fritz, R. (2007). Actividad antimicrobiana de mieles del Sudeste de la Provincia de Buenos Aires. *Revista Argentina de Microbiología*, 39(2): 1-120.
- Flores, Z. y Fani, D. (2015). *Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico del bellaco caspi (*Himatantus sucuuba*) y la congona (*Peperomia galioides*)* (Tesis de pregrado). Universidad Cesar Vallejo. Lima, Perú.
- Forzza, R. (2010). *Lista de espécies flora do Brasil*. Rio de Janeiro, Brasil. Recuperado de: <https://dipeq.jbrj.gov.br/conservacao/lista-da-flora-do-brasil-reflora/>
- Fredrickson, J., Zachara, J. & Balkwill, D. (2004). Geomicrobiology of high-level nuclear waste-contaminated vadose sediments at the hanford site, Washington state. *Appl Environ Microbiol*; 70(7): 4230-41.
- Furtado, C. (1993). *Estancamiento y subdesarrollo en América Latina* (2nd. Ed.). Argentina: Editorial Universitaria de Buenos Aires.
- García, E., González, R. y Schettino, M. (2014). Características generales de *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1): 28-48.
- Galbis, J. y Antonio, P. (2000). *Panorama actual de la química farmacéutica* (1ra ed.). Sevilla, España: Universidad de Sevilla.

- Garrity, G. (2004). *Bergey's manual of systemati, bacteriology* (2da ed.). Editorial Sciences.
- Gram, H. (1884). Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt-und Trockenpräparaten. *Fortschr. Med*; 2: 185-189.
- Guedea Fernández G. Tinción de Gram. URL disponible en: <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EElpZEVkykPMncqcmd.php> Accedido en fecha 10 de septiembre de 2014.
- Hernández, S., Fernández, C. y Baptista, P. (2010). *Metodología de la investigación* (4ta ed.). México: Mc Graw-Hill.
- Hurtado, J. (2008). *Metodología de la Investigación Holística* (2da ed.). Caracas, Venezuela: Ediciones Quirón Sypal.
- Kala, P. (2000) Status and conservation of rare and endangered medicinal plants in the Indian trans Himalayan. *Biol. Conservation* (93), 371-379.
- Kalemba, D. y Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Cur Med Chem.*; 10 (10): 813-829.
- Katewa, S., Chaudhry. L. y Jain A. (2004). Folk herbal medicines from tribal area of Rajasthan India. *J. of Etnopharm*; 92: 41-46.
- Kaufmann, B. y Christen, P. (2002). Recent extraction techniques for natural products: Microwave assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochemical Analysis*; 13(2): 105-113.
- Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schreckenberger, P. & Win, W. (2001). *Diagnóstico Microbiológico* (5ta ed.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Loaces, D., Rodríguez, I. y Cabrera, G. (2003). Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. *Rev Cubana Plant Med*, 8(3):129-176.
- Lock, O.(1994) *Investigación Fitoquímica: Métodos en el Estudio de los Productos Naturales*. Lima, Perú: Fondo Editorial de la Universidad Católica del Perú.

- López, O., Muñoz, A.; Carmona, R., Torres, L. y González, M. (2006). Influencia del uso de aditivos sobre el rendimiento del proceso de secado por aspersión del extracto acuoso de *C. officinalis* L. *Rev. Cub. Plant Med.*; 11(1).
- López, O., Muñoz, A., Carmona, R., Torres, L., González, M., Varela, A., García, J. y Suárez, E. (2007). Obtención y escalado del extracto seco de *C. Officinalis* L. *Rev Cub de Química*; 19(1): 71-73.
- López, C. (2012). *Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud*. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid. Recuperado de <http://revista.nutricion.org/pdf/propiedades.pdf>.
- LLoria, M. (2009). *Infecciones por Pseudomonas aeruginosa. Manejo de infecciones por organismos multirresistentes*. Comité de Infectología Crítica.
- Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J. (2004). *Brock Biology of Microorganisms* (10th ed.). Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 0-13-066271-2.
- Manzo, G., Flores, H. y Soto, Y. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomedica*, 25(3): 129-143.
- Marcano, D. y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica* (2nd ed.). Caracas, Venezuela: Editor Universidad Central de Venezuela.
- Martínez, A., Valencia, G., Jiménez, N., Mesa, M. y Galeano, E. (2008). *Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Mitaine, A., Weniger, B., Sauvain, M., Lucumi, F., Argon, R. & Zeches, M. (1998). Indole alkaloids from the trunk of *Aspidosperma megalocarpon*. *Planta médica*; 64(5): 487.
- Nalvarte, A., Jong, W. & Domínguez, G. (1999). Plantas amazónicas de uso comercial: Diagnostico de un sector económico con un potencial de realización. *Soc. Sci. Med.*; 12:45-57.
- Narváez, A., F. Stauffer y J. Gertsch. 2000. Contribucion al estudio de la Etnobotanica de las palmas del Edo. Amazonas. *Scientia Guianae* 10: 27-34.

- Ncube, N., Afolayan, O. y Okoh, A. (2008). Técnicas de evaluación de propiedades antimicrobianas de compuestos naturales de origen vegetal: métodos actuales y tendencias futuras. *African Journal of Biotechnology*; 7: 1797-1806.
- Nunes, D., Koike, L. y Taveira, J. (1992). Reis FAM. *Phytochemistry*; 31(5): 25-37.
- Ochoa, S., Montiel, F., Escalona, G., Córdova, A., Dávila, L., Martínez, B., Tapia, Y., Giano, S., Eslava, G., Castro, R. y Cortez, J. (2013). Características de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociados con la formación de biopelículas. *Bol Med Hosp Infant Mex*; 70(2): 138-150.
- Olsen, G., Woese, C. & Overbeek, R. (1994). The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J Bacteriol*; 176(1): 1-6.
- Oliveira, L. (2007). *RB terpenos y terpenoides*. Recuperado de: [www.geocities.com.br/plantas tóxicos](http://www.geocities.com.br/plantas_toxicos).
- Organización Mundial de la Salud.(2002). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Organización Mundial de la Salud, Ginebra. 67 p.
- Pacheco, L., Dency, J., Taborda, M., Manuel, E., De La Rosa, T., Catalino, G. (2006). *Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de hojas, cortezas y semillas de Thevetia peruviana* (Persoon) Schum. *Intropica*, Lima, Perú. Recuperado de <http://revistas.unimagdalena.edu.co/index.php/intropica/article/view/111>.
- Pharmacopea (2007). *Botanical extracts*. USP 30. Recuperado de: <https://hmc.usp.org/sites/default/files/documents/HMC/GCs-Pdfs/c565.pdf>
- Pastor, R. (2006). Alteraciones del nicho ecológico. Resistencias bacterianas a los antibióticos. *Gac Sanit*; 20(1): 175-81.
- Plumel, M. (1991). *Le genre Himatanthus* (Apocynaceae). *Revisión taxonomique. Bradea*; 5(1):118.
- Pérez, M., Martínez, C. y Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2): 147-161.

- Prescott, L., Harley, J. y Klein, D. (1999). *Microbiología*. Madrid, España: Editorial McGraw-Hill.
- Pinedo, R. (2012). *Compendio de química orgánica experimental I* (1ra ed.). Lima, Perú: Editorial Universitaria.
- Polanco, X. (2003). *Calidad en la producción y elaboración de plantas medicinales* (II). Boletín de Plantas Medicinales y Aromáticas. Recuperado de: https://www.academia.edu/4975688/Obtenci%C3%B3n_de_extractos_a_partir_de_plantas_medicinales?auto=download
- Porte, L., Herre, B., Prat, S. y Chanqueo, L. (2007). *Enterococcus* spp. Parte I. *Revista Chilena de Infectología*, 24(3): 231-245.
- Ramírez, A., García, E., Longa, A., Sánchez, K., Nieves, M., Velasco, J., Araque, M. y Mosqueda, N. (2006). *Manual práctico de bacteriología general* (1ra ed.). Mérida, Venezuela.
- Ramírez, L. y Marín, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia Et Technica*; 15(42): 263-268.
- Revista MedULA Actividad bacteriostática y bactericida de extractos etanólicos de propóleos venezolanos y europeos sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. 2016. Vol 025, N° 1. <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/42789> .
- Rivera, E. (1999). Investigación reciente sobre las Plantas Medicinales Mexicanas. *Arquelogia Mexicana*; 7(39): 54-59.
- Rivero, R.; Rodríguez, E.; Menéndez, R.; Fernández, J.; Barrio, G. y González, M. (2002). Obtención y caracterización preliminar de un extracto de *Aloe vera* L. con actividad antiviral. *Rev. Cubana Plant Med.*; 7 (1):32-38.
- Robertson, J., Gomersall, M. & Gill, P. (1975). *Mycoplasma hominis*: growth, reproduction, and isolation of small viable cells. *J Bacteriol*; 124 (2): 1007-18.

- Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Revista Salud Pública de México*; 44(5): 464-476.
- Rozzi, N. y Singh, R. (2002). Supercritical Fluids and the Food Industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*; 1: 33-44.
- Ryan, K. y Ray, C. (2004). *Sherris Medical Microbiology* (4th ed.). McGraw Hill. ISBN 0-8385-8529-9.
- Seguro Social de Salud (ESSALUD, 2013). Resolución de Gerencia General 1207-GG-ESSALUD-2013. Lima, Perú: ESSALUD.
- Seyhan, E. (2000). *Química Orgánica: Estructura y Reactividad*. España: Editorial Reverté.
- Silva, A., Rao, C., Pinto, C., Pino, M., Cordero, M., Tamborini, Y., & Bolzani, V. (1998). Ésteres de triterpénicos *Himatanthus succuba* (Spruce) Woodson. *Nueva Quim*; 21(6): 702-704.
- Silvera, A. (2018). Ahora los venezolanos también exportan enfermedades. Diario Tal Cual. Disponible en: <http://www.talcualdigital.com/index.php/2018/23/ahora-venezuela-también-exporta-enfermedades>
- Smith. I. 2002, Manual de Enfermedades de las Plantas. Ediciones Mundi-prensa. Madrid. España
- Soares, F., Cavalcante, L., Rodrigues Romero, N. y Bandeira, M. (2016). *Himatanthus* Willd. Ex Schult. (Apocynaceae): Review. *Pharmacogn Rev*. 10(19): 6-10.
- Strohl, W. (1997). *Biotechnology of Antibiotics*». Informa Health Care. ISBN 0-8247-9867-8.
- Tabuti, S.; Dhillion, S.; Lyea, A. (2003) Traditional medicine in Bulamogi county, Uganda: its practitioners, users and viability. *Journal of Ethnopharm*; 85(19): 371-379.
- Terranova, m., Campos, R. y Sánchez, H. (2014). Uso de los metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Journal Agroecosystems*, 17(3): 489-499.

- Thomson, R. y Bertram, H. (2001). Laboratory diagnosis of central nervous system infections. *Infect Dis Clin North Am*; 15(4): 1047-71.
- Townsend, P. (2005). Antimicrobial activity of flavonoides. *Int. J. Antimicrob. Agents*; 26: 343.
- Ugaz, O. (2003). *Análisis fitoquímico y metabolitos secundarios. Manual de fitoterapia*. Lima, Perú: Universidad Católica del Perú.
- Van, H. (2006). René Dubos: unearthing antibiotics. *J. Exp. Med.*; 203(2): 259.
- Vásquez, R. (1999). *Flórula de las Reservas Biológicas de Iquitos*. Allpahuayo, Perú: Ed. Missouri Botanical Garden.
- Vele, G., Milano, B., Fernández, A., Williams, B., Michelangeli, F. (1999). *Plantas medicinales recopiladas de la etnobotánica nacional y el uso herbal por la población venezolana*. Memorias del Instituto de Biología Experimental.
- Vidal, J. (2003). *Escherichia coli* enteropatógena (ECEP): una causa frecuente de diarrea infantil. *Revista Salud en Tabasco*; 9(11): 188-193.
- Villar, M. (2014). *Farmacognosia general*. Madrid, España: Editorial Síntesis.
- Vinatoru, M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*; 8(3): 303-314.
- Wainwright, M. y Swan, H. (1986). C.G. Paine And The Earliest Surviving Clinical Records Of Penicillin Therapy. *Medical History*; 30(1): 42-56.
- Watson, L. y Dallwitz, M. (1994). *The Families of Flowering Plants*. Interactive Identification and Information Retrieval on CDROM version 1.0 1993, and colour illustrated manual.
- Wayne, P. (1999). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test national committee for clinical laboratory standards (NCCLS)*. Recuperado de: <https://www.nccls.org/es/source/orders/free/me-ac.pdf>.
- Wood, C., Lee, A., Vaisberg, D., Kingston, C. (2001). A Bioactive Spirolactone Iridoid and Triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. *Chem. Pharm. Bull.*; 49(1): 1477-1478.

Xenofonte de Almeida, S., Brito Monteiro, A., Martins da Costa, G., Socorro de Barro, G. (2017). *Himantanthus draticus*: a chemical and pharmacological review of this medicinal species, commonly found in the Brazilian Northeastern región. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27, 788-793.

Young K (2006). «The selective value of bacterial shape». *Microbiol Mol Biol Rev* 70 (3): 660-703. PMID 16959965.

www.bdigital.ula.ve

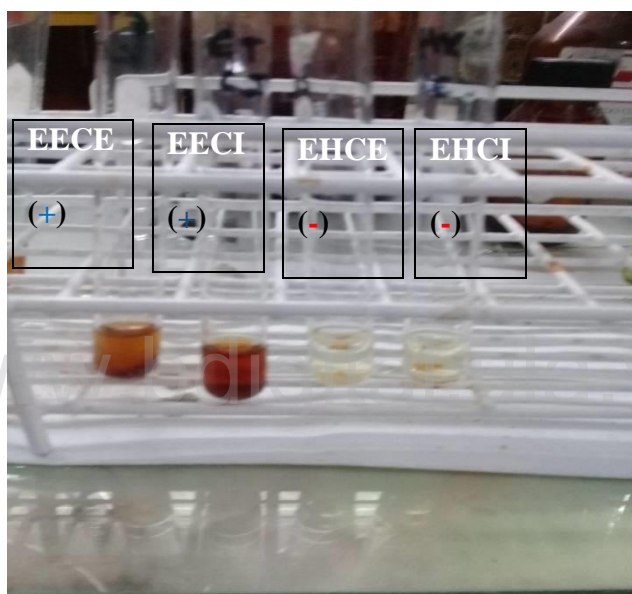
ANEXO

www.bdigital.ula.ve

Anexo A. Obtención de los extractos de *Himatanthus attenuatus*.

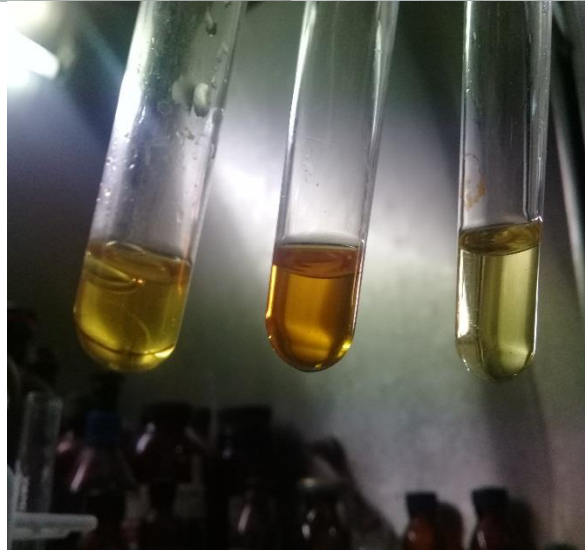
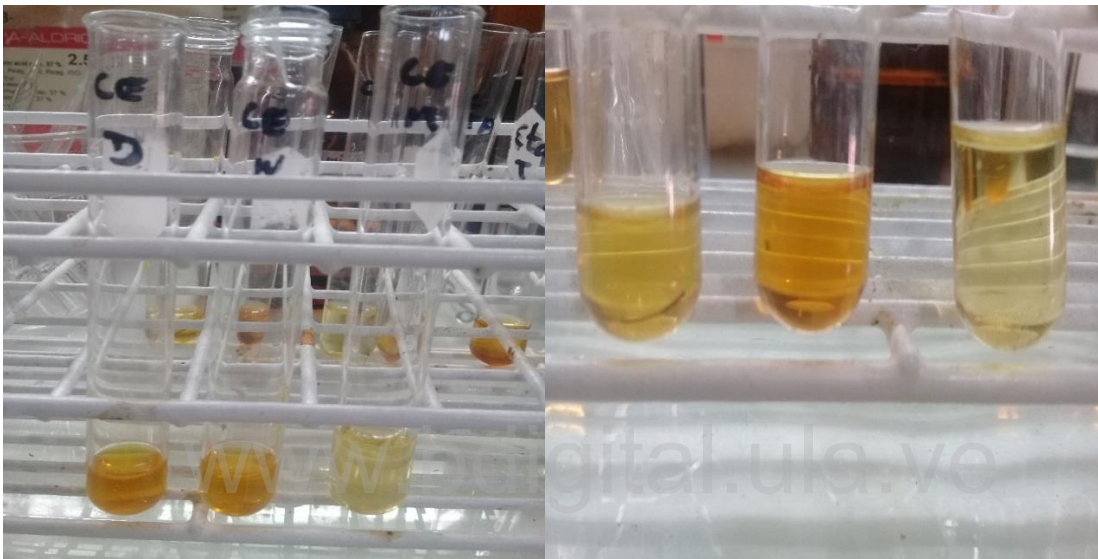


Anexo B. Resultados del tamizaje Fitoquímico de los extractos de *Himatanthus attenuatus*



Reacción de Lieberman Burchard

EECE: Extracto de Etanol, Corteza Externa, **EECI:** Extracto de Etanol, Corteza Interna, **EHCE:** Extracto de Hexano, Corteza Externa, **EHCI:** Extracto de Hexano, Corteza Interna.



Pruebas de Alcaloides

Anexo C. Halos de inhibición del extracto de hexano obtenido de las cortezas externas e internas del *Himatanthus attenuatus* frente a las cepas ensayadas.

