



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



**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE LAS PARTES AÉREAS DE *Justicia  
secunda* Vahl (ACANTHACEAE)**

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar por el título de Licenciado en  
Bioanálisis**

**Tesista:**

Br. Tatiana K. López C.

**Tutora:**

Dra. Marielba Morillo.

Mérida, 08 de agosto de 2019

## **Dedicatoria**

Este trabajo lo dedico, primeramente, a Dios que con su manto protector siempre ha cuidado de mí, no me ha dejado caer y me ha permitido estar donde estoy.

A mis padres Iraima y Félix que con su amor incondicional han sido el mayor apoyo y con su conducta ejemplar me han hecho una persona de bien.

A mis hermanos, Beatriz y Jesús que con su amor fraternal han estado conmigo en momentos buenos y malos.

A mi compañero de vida, Edi, que con su amor, apoyo y comprensión me ha acompañado durante este largo transitar.

A mis sobrinos, Susej y Sebastián que con sus risas y travesuras me han dado alegría cuando sentía decaer.

A mi hijo Paul que ha sido el mayor regalo que la vida me ha dado y que aunque aún no está en mis brazos desde mi vientre llena de felicidad y ternura cada día.

Para ellos, este trabajo.

## **Agradecimientos**

Primeramente, agradezco a Dios y a mis padres porque ellos son mi pilar fundamental en todo.

A la Universidad de Los Andes que es mi segunda casa y que siempre me ha dado las mayores alegrías en mi vida académica. Siempre me sentiré agradecida y orgullosa de ser ulandina.

A la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por permitirme cumplir mi sueño de formarme como Licenciada en Bioanálisis junto a los mejores profesores, técnicos y compañeros.

Al Instituto de investigaciones por haberme permitido realizar esta investigación en sus instalaciones.

A mi tutora Profa. Marielba Morillo, le agradezco por haberme dado el privilegio de ser su tesista y por todo el amor, dedicación y compromiso que tuvo para con este trabajo. Sin sus conocimientos, tiempo y esfuerzo este trabajo no sería lo que es.

A la jurado Profa. Vanessa Hernández, por su colaboración en la realización de esta investigación, enriqueciéndola con todos sus conocimientos.

A las jurados Profa. Diolimar Buitrago y a la Dra. Rosa Aparicio, por su colaboración en esta investigación para mejorarla y enriquecerla.

Al profesor Tomás Visbal, por toda la colaboración brindada en este trabajo.

Al Ing. Juan Carmona por su colaboración en la identificación de la planta usada en este trabajo.

A los técnicos, en especial al Sr. Eduardo y al Sr. Emilio, por su ayuda y paciencia en el montaje de cada una de las pruebas.

A los Profesores que durante toda la carrera dieron su mejor esfuerzo y me permitieron obtener los conocimientos que fueron indispensables para llevar a cabo este trabajo.

A mis compañeros y amigos que me han brindado su apoyo no solo académicamente, sino emocionalmente con su amistad y cariño.

A todos, ¡GRACIAS!

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

## Índice de contenido

Contenido	Pág
<b>Índice de figuras</b>	x
<b>Índice de tablas</b>	xii
<b>Índice de gráficos</b>	xiv
<b>Índice de esquemas</b>	xv
<b>Resumen</b>	xvi
<b>Introducción</b>	1
<b>Capítulo I</b>	
El problema	3
Planteamiento del problema.	3
Justificación e importancia de la investigación.	4
Objetivos de la investigación.	5
Objetivo general.	5
Objetivos específicos.	5
Alcances y limitaciones.	5
<b>Capítulo II</b>	
Marco teórico	7
Trabajos previos.	7
Antecedentes históricos o epistemológicos.	10
Familia Acanthaceae.	10
Características de la familia Achantaceae.	10
Composición química reportada en la familia Acanthaceae y sus usos farmacológicos.	12
Generalidades del género Justicia.	13
Composición química reportada en el género Justicia y usos farmacológicos.	13
Generalidades de <i>Justicia secunda</i> Vahl.	16
Compuestos químicos reportados en <i>Justicia secunda</i> Vahl.	17
Actividad farmacológica reportada en <i>Justicia secunda</i> Vahl.	18

Bases teóricas.	19
Productos naturales.	19
Metabolitos secundarios presentes en los productos naturales.	19
Fenoles y ácidos fenólicos.	19
Quinonas.	20
Cumarinas.	21
Flavonoides.	22
Antocianinas.	23
Taninos.	24
Alcaloides.	25
Esteroles.	25
Terpenos.	26
Monoterpenos.	27
Sesquiterpenos.	27
Diterpenos.	28
Triterpenos.	29
Saponinas.	29
Tetraterpenos (Carotenoides).	30
Estudio fitoquímico.	31
Selección del material.	31
Tamizaje fitoquímico	31
Métodos de extracción de material vegetal.	33
Por arrastre de vapor	33
EFS, fluidos supercríticos.	33
Extracción sólido-líquido.	34
Con disolventes (extracción discontinua).	34
Maceración.	34
Infusión.	34
Decocción o cocimiento.	35

Con disolventes (extracción continua).	35
dilución.	35
Soxhlet.	35
Extracción líquido-líquido.	35
Extracción en fase sólida.	36
Pruebas de actividad biológica.	36
Actividad antibacteriana.	36
Métodos para la determinación de la actividad antibacteriana	37
Dilución en agar	37
Dilución y micro-dilución en caldo	38
Difusión en agar o Kirby Bauer	38
Actividad antioxidante	39
Clasificación de los antioxidantes.	39
Principales antioxidantes presentes en la naturaleza.	40
Ácido ascórbico (Vitamina C)	40
Vitamina E	40
Carotenoides	40
Polifenoles	41
Método de DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo).	41
Toxicidad frente a <i>Artemia salina</i>	42
<i>Artemia salina</i> .	42
Definición operacional de términos.	44
Definición operacional de variables	46
Hipótesis	49
Hipotesis nula	49
<b>Capítulo III</b>	
Marco metodológico	50

Tipo de investigación.	50
Diseño de la investigación.	50
Población y muestra.	51
Instrumento de recolección de datos.	52
Recolección del material vegetal.	52
Preparación de los extractos vegetales.	53
Estudio fitoquímico de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl.	55
Tamizaje fitoquímico	55
Evaluación de la actividad antibacteriana	58
Preparación de las muestras.	59
Microorganismos evaluados	59
Preparación del Agar Mueller-Hinton.	60
Elaboración de los medios.	61
Actividad antioxidante.	63
Toxicidad sobre <i>Artemia salina</i> .	66
Reactivos.	67
Preparación de la solución marina.	68
Eclosión de los quistes.	68
Realización de la prueba.	69
<b>Capítulo IV</b>	
Resultados y discusión	72
<b>Capítulo V</b>	
Conclusiones	91
Recomendaciones	92
<b>Referencias bibliográficas</b>	93

## Índice de figuras

<b>Figura</b>	<b>Pág</b>
Figura 1. Estructuras de algunos compuestos reportados en el género Justicia.	14
Figura 2. Especie <i>Justicia secunda</i> Vahl.	16
Figura 3. Estructura de algunos compuestos fenólicos	20
Figura 4. Estructura de una <i>orto</i> -benzoquinona	21
Figura 5. Estructura de escopoletina	22
Figura 6. Estructura de la flavona apigenina	23
Figura 7. Estructura de la antocianina pelargonidina	23
Figura 8. Estructura del tanino glucogalina	24
Figura 9. Estructura del alcaloide papaverina	25
Figura 10. Estructura del colesterol	26
Figura 11. Estructura del terpeno geraniol	26
Figura 12. Estructura del monoterpeno limoneno	27
Figura 13. Estructura del sesquiterpeno cadineno	28
Figura 14. Estructura del diterpeno pimarano	28
Figura 15. Estructura del triterpeno lupeol	29
Figura 16. Estructura de la saponina dioscina	30
Figura 17. Estructura del compuesto carotenoide $\beta$ -caroteno.	31

Figura 18. Reacción química entre el radical DPPH y una especie antioxidante.	41
Figura 19. <i>Artemia salina</i>	43
Figura 20. Voucher de <i>Justicia secunda</i> Vahl.	53
Figura 21. Secado y molido de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl	54
Figura 22. Maceración y filtración de los extractos las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl	54
Figura 23. Preparación agar Müller-Hinton	61
Figura 24. Preparación del agar y montaje de los cilindros	62
Figura 25. Siembra del inóculo, de los extractos e incubación	63
Figura 26. Preparación de los extractos para actividad antioxidante	66
Figura 27. Montaje prueba de toxicidad en <i>Artemia salina</i>	70
Figura 28. Resultado del estudio fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de <i>Justicia secunda</i> Vahl	73
Figura 29. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl.	76

## Índice de tablas

Tabla	Pág
Tabla 1. Taxonomía de <i>Justicia secunda</i> Vahl.	17
Tabla 2. Compuestos químicos reportados en <i>Justicia secunda</i> Vahl.	17
Tabla 3. Definición operacional de las variables de la investigación	47
Tabla 4. Microorganismos evaluados	60
Tabla 5. Diluciones empleadas de las muestras	65
Tabla 6. Diluciones empleadas para realizar la curva patrón de ácido ascórbico	65
Tabla 7. Composición de la solución salina que simula el agua de mar	68
Tabla 8. Clasificación de toxicidad según el CYTED.	70
Tabla 9. Estudio fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl	72
Tabla 10. Potencial antibacteriano de los extractos etanólicos de las partes aéreas de <i>Justicia secunda</i> Vahl a la concentración de 500 ppm.	75
Tabla 11. Barrido actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de <i>Justicia secunda</i> Vahl.	78
Tabla 12. Actividad antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl.	79
Tabla 13. Datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto etanólico de <i>J. secunda</i> Vahl (% de inhibición) a través del método DPPH.	80
Tabla 14. Análisis de varianza de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl (% de inhibición) a través del método DPPH	81

Tabla 15. Actividad antioxidante del extracto hexanoico de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl.	81
Tabla 16. Datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto hexanoico de <i>J. secunda</i> Vahl (% de inhibición) a través del método DPPH.	82
Tabla 17. Análisis de varianza de la actividad antioxidante del extracto hexanoico de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl (% de inhibición) a través del método DPPH.	83
Tabla 18. Actividad antioxidante del extracto diclorometanólico de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl.	83
Tabla 19. Datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto diclorometanoico de <i>J. secunda</i> Vahl (% de inhibición) a través del método DPPH.	84
Tabla 20. Análisis de varianza de la actividad antioxidante del extracto diclorometanoico de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl (% de inhibición) a través del método DPPH.	85
Tabla 21. Comparación de la actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl.	85
Tabla 22. Comparación de la concentración eficiente 50 (mg/mL) de los extractos de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl.	87
Tabla 23. Cuantificación de la DL50 de los extractos etanólicos de las partes aéreas de <i>Justicia secunda</i> Vahl y los controles sobre <i>Artemia salina</i> .	89

## Índice de gráficos

<b>Gráfico</b>	<b>Pág</b>
Gráfico 1. Actividad antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl	80
Gráfico 2. Actividad antioxidante del extracto hexanoico de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl	82
Gráfico 3. Actividad antioxidante del extracto diclorometanoico de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl	84
Gráfico 4. Comparación de la actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl	87
Gráfico 5. Comparación de la concentración eficiente 50 (mg/mL) de los extractos de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl	88
Gráfico 6. Porcentaje (%) de Letalidad del extracto etanólico de las partes aéreas de <i>Justicia secunda</i> Vahl sobre <i>Artemia salina</i>	89

## Índice de esquemas

<b>Esquema</b>	<b>Pág</b>
Esquema 1. Estudio fitoquímico de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl	55
Esquema 2. Procedimiento para realizar las pruebas de actividad antibacteriana de los extractos de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl	59
Esquema 3. Procedimiento para realizar la prueba de actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl	64
Esquema 4. Procedimiento para realizar la prueba de toxicidad del extracto polar de las partes aéreas de <i>J. secunda</i> Vahl sobre <i>Artemia salina</i>	67

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



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



**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE LAS PARTES AÉREAS DE *Justicia  
secunda* Vahl (ACANTHACEAE)**

**Mérida – Venezuela**

**Trabajo de Grado**

**Realizado por:  
Br. Tatiana López  
Tutora: Dra. Marielba Morillo**

**RESUMEN**

Se obtuvieron los extractos hexanoico, diclorometanoico y etanólico, de las partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl, familia Acanthaceae y se realizó el estudio fitoquímico de los mismos. Se evaluaron sus efectos antibacteriano (técnica de difusión en pozo) y antioxidante (método DPPH), además se valoró la toxicidad sobre *Artemia salina*. En el extracto etanólico se determinó la presencia de alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos; en el diclorometanoico esteroides y compuestos fenólicos y en el hexanoico se comprobó la presencia de esteroides. Por otro lado, el extracto etanólico de *J. secunda* Vahl no mostró halo de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ni *Pseudomonas aeruginosa*. Todos los extractos mostraron actividad antioxidante, siendo el extracto etanólico el que presentó mayor actividad, con un % de inhibición superior a 50 %. En cuanto a la toxicidad, el extracto etanólico mostró un DL<sub>50</sub> entre 919,32 y 3781,9 ppm, siendo relativamente inocuo. En general, los resultados obtenidos sugieren que los extractos de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl podrían ser una alternativa para ser usados en la formulación de fármacos a futuro, debido a su potencial como antioxidante y su baja toxicidad.

**Palabras claves:** *Justicia secunda*, Acanthaceae, actividad biológica, *Artemia salina*.

## Introducción

Desde tiempos antiguos, el ser humano ha utilizado los productos naturales como los extractos vegetales para el tratamiento de diversas enfermedades. La importancia de los productos naturales radica en la propia función biológica en la que son biosintetizados. Pueden ser útiles por sus posibilidades directas como agentes terapéuticos, para la preparación de sustancias bioactivas o como materia prima para la síntesis de sustancias de interés farmacológico ya que son capaces de realizar acciones útiles para la salud en procesos patológicos (Gutiérrez y Estévez, 2009).

En base al uso que se les da a los productos naturales surge lo que se denomina medicina tradicional, que según la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la suma total de los conocimientos, capacidades y prácticas basados en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas utilizadas para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales. Siendo este conocimiento, para algunas poblaciones, una fuente accesible de atención sanitaria y en algunos casos la única (OMS, 2013).

De esta forma, se conoce gran cantidad de plantas utilizadas dentro de la medicina tradicional. Ejemplo de ello, son las plantas pertenecientes a la familia Acanthaceae. Esta familia pantropical con 200 géneros y 4000 especies, cuenta con especies que han sido reportadas con actividad medicinal, como son las pertenecientes al género *Justicia* (Ezcurra, 1999).

*Justicia secunda* Vahl, es una de las especies con mayores propiedades medicinales dentro de su género, es empleada para tratamientos en pacientes con anemia, diabetes y para picaduras de insectos, entre otros usos (Gómez, Reyes y Aguilar, 2012). Al mismo tiempo, estudios fitoquímicos de los extractos de *Justicia secunda* Vahl, han mostrado la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, antocianinas y leucoantocianinas que en muchos casos justificarían las propiedades curativas que se le atribuyen (Gbenou, Tossou, Dansou, Fossou y Moudachirou, 2006).

Por lo antes mencionado, en los últimos años ha surgido la interrogante sobre la posible actividad biológica de *J. secunda* Vahl, debido a sus características fitoquímicas que sugieren esta posibilidad, no obstante, hay pocas investigaciones que han evaluado dicha actividad (Corrêa y Alcântara, 2012). Es por esto que la presente investigación se plantea realizar un estudio fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl y se determinará su actividad antibacteriana, antioxidante y toxicidad en *Artemia salina*.

En el capítulo I, se abarca la problemática, justificación, objetivos y la denominación de las variables del estudio. En el capítulo II, se abordan los antecedentes que acompañan el estudio y los fundamentos necesarios para la realización y comprensión de las variables, se establece la hipótesis y la conceptualización de las variables. En el capítulo III, se describe el diseño, metodología, técnicas necesarias para la investigación, además se define la población y la muestra. En el capítulo IV, se presentan los resultados obtenidos durante la investigación, datos estadísticos, gráficas y se discute sobre el significado de cada resultado.

## Capítulo I

### El problema

#### Planteamiento del Problema.

*Justicia secunda* Vahl es una planta que se localiza en diferentes tipos de climas y ambientes tropicales y templados. En Venezuela, esta planta se encuentra ampliamente distribuida en zonas cálidas (Gómez y col., 2012).

*Justicia secunda* Vahl es utilizada dentro de la medicina tradicional en muchos países de América como: Colombia, Guyana, Venezuela y también en países del continente africano (Gómez y col., 2012). Se le conoce por tener gran efectividad en el tratamiento de diferentes tipos de anemia como la anemia falciforme por ello muchas veces recibe el nombre común de sanguinaria (Mpiana y col., 2010).

En distintos estudios fitoquímicos de la planta, se ha determinado que posee como compuestos químicos principales: alcaloides, flavonoides, taninos, antocianinas y leucoantocianinas (Gbenou y col., 2006). Los flavonoides particularmente se consideran compuestos con actividad antibacteriana (Marcano y Hasegawa, 2002); Igualmente se ha reportado presencia de compuestos fenólicos, los cuales se asocian con una posible actividad antioxidante (Zambrano y Bustamante, 2017), todo esto sugiere que *Justicia secunda* Vahl podría tener propiedades bactericidas.

A pesar de estos importantes hallazgos, son pocos los estudios que han evaluado la actividad biológica de la planta. Las investigaciones sobre la planta se han centrado en la actividad de la misma en patologías como la anemia, diabetes e hiperuricemia (Cantillo,

Güette, Baldiris, Jaramillo, y Olivero, 2007), existiendo pocos ensayos referentes a su actividad antioxidante, antibacteriana y biotoxicidad.

Mediante la problemática presentada, se ha tomado la decisión de formular la siguiente interrogante: ¿Cuál es la relación entre la composición química de los extractos de las partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl y su actividad biológica?

### **Justificación e importancia de la investigación.**

Los objetivos de esta investigación responden a la necesidad de ampliar los estudios sobre las posibles propiedades antibacterianas, antioxidantes y de toxicidad sobre *Artemia salina* de los extractos de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl. Como se ha dicho anteriormente, a pesar de que se ha estudiado principalmente su actividad como tratamiento alternativo de diferentes patologías principalmente metabólicas, son pocos los trabajos donde se ha evaluado su actividad biológica.

Ante este vacío en el conocimiento sobre la planta, se hace necesario realizar una investigación que permita confirmar la composición química de los extractos de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl y la relación que existe con la actividad biológica de la misma y de esta manera sentar las bases para próximos estudios, que pudieran en un futuro sugerir su uso como tratamiento alternativo a diferentes enfermedades como las infecciosas causadas por bacterias.

## **Objetivos de la investigación.**

### ***Objetivo general.***

Confirmar la relación que existe entre la composición química y la actividad biológica de los extractos de las partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl (Acanthaceae).

### ***Objetivos específicos.***

- Determinar la composición química preliminar de los extractos de las partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl. a través de pruebas específicas.
- Confirmar la actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl por el método DPPH.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos frente a bacterias grampositivas o gramnegativas mediante pruebas de susceptibilidad.
- Valorar la toxicidad del extracto etanólico de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl en *Artemia salina*.

### **Alcances y limitaciones de la investigación.**

Con esta investigación se busca ampliar los estudios sobre *Justicia secunda* Vahl, que permitan confirmar la composición química y actividad biológica de los extractos de las partes aéreas de la misma y de esta forma sentar las bases para que en investigaciones posteriores se profundice sobre su mecanismo de acción, así como plantear la posibilidad de un tratamiento alternativo en base a los extractos de las partes aéreas de la planta.

En relación a las limitaciones de la investigación, esta investigación se plantea como un estudio altamente viable y factible, sin embargo, podrían presentarse los siguientes obstáculos:

- Alto costo de los reactivos necesarios.
- Fallas eléctricas
- Daño de algún equipo que impida culminar con éxito la investigación.
- Situación país, que dificulte el cumplimiento de los objetivos de la tesis.

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

## Capítulo II

### Marco teórico

#### Trabajos previos.

Zambrano y Bustamante (2017), realizaron una investigación sobre *Justicia secunda* Vahl en Ecuador, utilizando como método para el análisis fitoquímico, técnicas cualitativas para la determinación de los principales metabolitos presentes en los extractos de las hojas y técnicas gravimétricas para la determinación de cenizas totales, sólidos totales y porcentaje de humedad. En su estudio, comprobaron la presencia de alcaloides, cumarinas y glucósidos fenólicos en el extracto hidroalcohólico; alcaloides, taninos, glucósidos fenólicos, triterpenos y esteroides en el extracto alcohólico y alcaloides, triterpenos y esteroides en el extracto etéreo. Esta investigación se relaciona con el presente trabajo en que ambas hacen un estudio fitoquímico de partes aéreas de la planta.

Onoja, Ezeja, Omeh y Onwukwe (2016) evaluaron la actividad antioxidante, analgésica y antiinflamatoria *in vitro* del extracto metanólico de las hojas de *Justicia secunda* Vahl, usaron ratas como animales de experimentación. La actividad antiinflamatoria se evaluó empleando el modelo inducido de carragenano y formalina de edema de la pata, y la actividad analgésica mediante el reflejo de contorsión inducido por el ácido acético y el modelo examen del reflejo de la cola, mientras que la actividad antioxidante se evaluó a través del método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y de poder antioxidante reductor del hierro (FRAP). El estudio sugirió que *J. secunda* Vahl posee actividad antiinflamatoria, analgésica y antioxidante, dicho trabajo tiene relación con

nuestra investigación en cuanto a la determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH.

Akibou y col. (2014) llevaron a cabo un estudio químico de tres plantas (*Tectona grandis*, *Uvaria chameae* y *Justicia secunda* Vahl) en Benin (África). Los métodos utilizados para la caracterización de los grandes grupos químicos presentes en el extracto etanólico de las hojas y cortezas de estas plantas fueron el método de Folin y espectrofotometría. *J. secunda* Vahl, mostró la presencia de varios metabolitos secundarios como: saponinas, alcaloides, taninos, mucílagos, antraquinonas, leucoantocianina, antocianinas y triterpenos. Al igual que la presente investigación, este trabajo de Akibou y col. abarcó el análisis fitoquímico de los extractos de partes aéreas de la planta.

Koffi y col. (2013) realizaron una investigación que tuvo como objetivo obtener extractos acuosos de *Justicia secunda* Vahl para el estudio fitoquímico de la planta. Los extractos acuosos se procesaron mediante la técnica de extracción-concentración en tres pasos: la extracción con agua asistida por ultrasonido, seguida de microfiltración de flujo cruzado del extracto crudo y su concentración por ósmosis inversa y se determinó la presencia de polifenoles y flavonoides. Los compuestos polifenólicos encontrados podrían explicar la actividad antioxidante observada en la planta y permite una mejor comprensión de sus propiedades farmacológicas.

Carrington, Cohall, Gossell-Williams y Lindo (2012), estudiaron el uso de *J. secunda* Vahl en el tratamiento de infecciones por heridas en diabéticos, determinaron la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de la planta utilizando el método de Kirby-Bauer modificado, evaluando la actividad de la planta frente a tres cepas bacterianas:

*S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 278503 y *E. feacalis* (cepa clínica), reportaron que no presentó actividad antibacteriana frente a dichas cepas. Dicha investigación coincide con el presente trabajo, debido a que ambas evalúan la actividad antibacteriana frente a cepas como *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Cantillo y col. (2007), realizaron un estudio sobre la concentración letal media de los extractos de *Justicia secunda* Vahl sobre *Artemia franciscana* (crustáceo) y su actividad hemolítica. En este trabajo los autores determinaron que los extractos acuosos y en diclorometano presentaron mayor toxicidad que los extractos metanólicos, esta investigación sugiere, de acuerdo con los resultados obtenidos, que solo el extracto metanólico es el más apropiado para ser utilizado terapéuticamente o con fines estéticos en productos farmacéuticos por presentar la menor toxicidad. El trabajo de Cantillo y col. tiene relación estrecha con la presente investigación, en ambos experimentos se evaluó la toxicidad de los extractos de *J. secunda* Vahl frente a crustáceos con características similares que pertenecen al mismo género.

Rojas, Ochoa, Ocampo y Muñoz (2006), investigaron la actividad antimicrobiana de diez plantas usadas en la medicina tradicional colombiana entre las cuales destaca *Justicia secunda* Vahl, evaluaron las concentraciones mínimas inhibitorias de la misma frente a microorganismos como *Candida albicans* (CMI=0,5 µg/mL), *Escherichia coli* (CMI= 0,6 µg/mL) y *Pseudomonas aeruginosa* (CMI= 1,3 µg/mL). En base a los resultados, los autores refieren que la planta mostró alta actividad contra *C. albicans*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Esta investigación se encuentra directamente relacionada con nuestro trabajo

ya que también muestra la actividad antibacteriana de los extractos de *J. secunda* Vahl frente a cepas como *E. coli* y *P. aeruginosa*.

### **Antecedentes históricos o epistemológicos.**

#### ***Familia Acanthaceae.***

Se caracterizan por ser plantas herbáceas o erectas, raros arbustos o árboles pequeños, poco incandescentes; presentan hojas opuestas, pecioladas y enteras, inflorescencias axilares o terminales y frecuentemente cuentan con espigas (Montiel, 1991).

Es una gran familia pantropical, rara de zonas templadas. Esta familia posee alrededor de 250 géneros y 4000 especies distribuidas a lo largo de los trópicos, de estos géneros el más grande es el género *Justicia* con 300 especies aproximadamente (Morhardt y Morhardt, 2003).

Muchas especies de la familia Acanthaceae se cultivan como ornamentales por sus flores llamativas, como: *Acanthus mollis* L., "cucaracha", *Justicia floribunda* (C. Koch), *Justicia rizzinii* Wassh., "bandera española", *Justicia brandegeana* Wassh. & L.B.Sm., y especies de los géneros *Aphelandra*, *Fittonia*, *Pachystachys*, *Ruellia*, etc. Algunas especies también tienen importancia económica como forrajeras de emergencia en épocas de escasez de gramíneas (Ezcurra,1999).

#### ***Características de la familia Acanthaceae.***

La familia Acanthaceae presenta las siguientes características (Ezcurra,1999):

- a) **Porte:** plantas generalmente herbáceas, anuales o perennes, algunas lianas, a veces arbustivas, rara vez árboles. Tallos herbáceos o leñosos geniculados erectos a veces volubles, glabros o pubescentes, cilíndricos y angulosos.
- b) **Hojas:** opuestas, decusadas y simples.
- c) **Flores:** perfectas desde actinomorfas hasta zigomorfas, generalmente bracteadas y con bractéolas, a veces de vivos colores. Flores aisladas o en racimos, espigas o en racimos de cimas.
- d) **Perianto:** cáliz persistente, profundamente 5-lobado (ocasionalmente 4-lobado); corola gamopétala, típicamente 5-lobada, frecuentemente bilabiada, con el labio superior 2-lobado y el inferior 3-lobado.
- e) **Androceo:** 4 estambres, didínamos, fijos al tubo de la corola o 2, y en este caso con estaminodios. Disco nectarífero anular, hipógino, craso.
- f) **Gineceo:** ovario súpero, 2 carpelos, 2 lóculos, óvulos anátropos, axilares pocos en cada lóculo (2-10), estilo simple, filiforme, persistente (como hilo pendiente después de la antesis), con estigma a menudo bilobulado.
- g) **Frutos:** cápsula loculicida (drupa en algunos géneros), a menudo de dehiscencia elástica, con valvas que se arquean y con jaculadores (retináculos).
- h) **Semillas:** con testa de varios tipos: glabras, verrugosas, hirsuto-mucilaginosas y escamosas, pocas en número y exalbuminadas, generalmente aplanadas, lenticulares, con una escotadura en la base y sostenidas por el funículo modificado en protuberancia o en proyecciones en forma de gancho que son los jaculadores.

- i) **Distribución y hábitat:** principalmente nativas de los trópicos, aunque algunas se extienden a las regiones templadas. Los grandes centros de dispersión son Indomalasia, África, Brasil y América central. Existen los ejemplares resistentes a las sequías y de biotopos semiacuáticos.

*Composición química reportada en la familia Acanthaceae y sus usos farmacológicos.*

Los géneros más numerosos de esta familia son en el género Justicia y el género Ruellia, ambos géneros han sido estudiados por sus posibles usos tradicionales como medicamentos. En el género Ruellia se ha reportado presencia de D-glucorónico, de 7-apigenina campesterol, colesterol, glicina, leucina, tirosina, valina, taninos y  $\beta$ -sitosterol en todas las partes de la planta. En las raíces contiene lupeol, saponinas, gomas, resinas y ácido gálico (Cabrero, 2005).

Asimismo, el uso medicinal de las plantas del género Ruellia se basa en los compuestos que posee: el ácido gálico al igual que los taninos son antisépticos y astringentes empleado en el tratamiento de la disentería crónica, diarreas, leucorrea, menorragia, otras hemorragias. El lupeol es antirreumático, también algunas especies de Ruellias, son utilizadas como tratamiento para la gonorrea y como antiinflamatoria (Cabrero, 2005).

Se ha registrado un total de 24 especies de la familia Acanthaceae, específicamente del género Justicia, con propiedades medicinales. Tienen popular uso contra el cáncer,

bronquitis, cólicos o dolores menstruales, infecciones de la piel, entre otras (Correa y Alcántara, 2011).

### ***Generalidades del género Justicia.***

El género *Justicia* fue propuesto por Carlos Linneo y publicado en especie *Plantarum* en 1753. Un siglo más tarde, en su tratado sobre *Acanthaceae*, Nees (1847) delimitó el género *Justicia* en Asia y África. Además, creó varios nuevos géneros relacionados con *Justicia* para ubicar a un gran número de especies recientemente descritas desde el nuevo mundo. Más tarde, Bentham (1876) y Lindau (1893) ampliaron el concepto de *Justicia* de Nees y redujeron a sinónimos muchos géneros. Actualmente, se ha aceptado lo propuesto por Graham (1998), que incluye entre 600 y 700 especies dentro del género (Gómez y col., 2012).

De igual manera, el género *Justicia* L. de distribución pantropical es uno de los más numerosos dentro de la familia *Acanthaceae*, ya que cuenta con más de 600 especies (Acosta, 2007). Se caracterizan por ser arbustos o subarbustos erectos o escandescientes con hojas opuestas e inflorescencias generalmente en espigas o panículas. Además, cuenta con cáliz de 4 a 5 sépalos y fruto en forma de cápsula claviforme (Durkee, 1978).

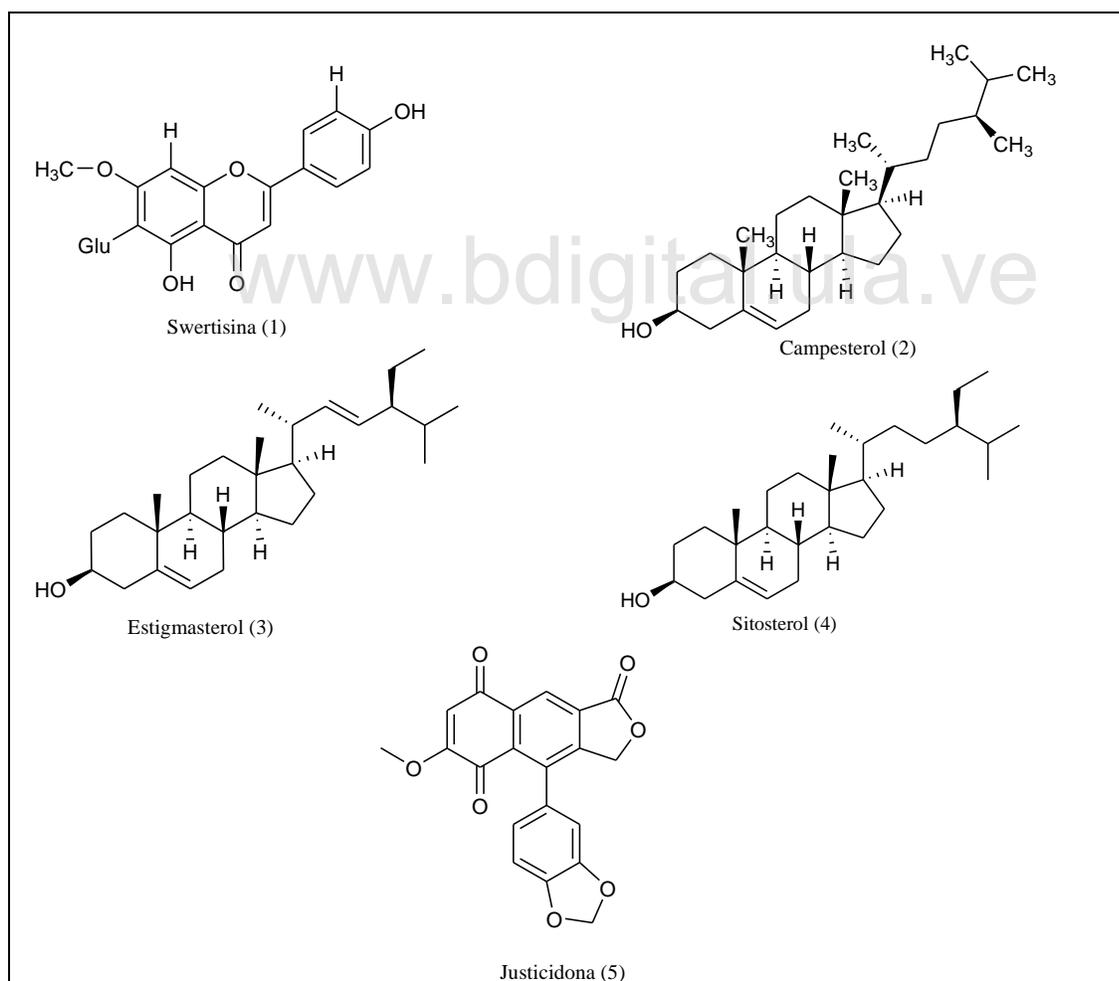
### ***Composición química reportada en el género Justicia y usos farmacológicos.***

El género *Justicia* se caracteriza por poseer metabolitos como alcaloides de tipo quinazolininas como la vasicina aislado en *J. adhatoda*, ligninas, flavonoides como la swertisina (1), cumarinas y terpenos. De igual forma, se ha aislado en varias especies aceites esenciales, vitaminas, ácidos grasos y ácido salicílico. Posee esteroides como

campesterol (2), estigmasterol (3), sitosterol (4), compuestos aislados de las raíces de *J. flava*, *J. spicigera*, y *J. gendarussa* (García y León, 2013).

Por otro lado, en algunas especies se ha reportado la presencia de esteroides, saponosidos y compuestos fenólicos. Estas plantas, además suelen contener lignanos como la justidicidona (5) (Germosén, 2005).

En la *Figura 1*, se pueden observar las estructuras de algunos de los compuestos reportados en plantas del género *Justicia*.



*Figura 1.* Estructuras de algunos compuestos reportados en el género *Justicia*. Tomado y modificado de: García y León, 2013; Germosén, 2005.

### ***Actividad farmacológica reportada para este género.***

Dentro de este género destacan especies como: *Justicia pectoralis*, *Justicia adhatoda*, *Justicia spicigera* y *Justicia secunda* Vahl. *Justicia pectoralis*, es empleada machacada o entera para golpes y torceduras, en decocción para dolor de estómago y para los nervios. Además, se han descrito efectos citotóxicos de *J. pectoralis* contra células tumorales y leucémicas, esto atribuido a su alto contenido de lignanos (Germosén, 2005).

Mientras tanto, *Justicia adhatoda* L. se utiliza en infusión para tratar la bronquitis, la diarrea y daños del estómago y en lavados como cicatrizante, desinfectante de heridas y antifúngica (Vera, 2014). De igual forma, los extractos de las hojas de especies como *J. reptans* han mostrado efecto contra el VIH, mediante la inhibición de la replicación del virus, el cual ha sido atribuido a la presencia de dos flavonoides glicosilados (Corrêa y Alcântara, 2012).

Finalmente, *J. spicigera* se utiliza en México en la medicina tradicional para curar enfermedades como la disentería, diabetes, leucemia y anemia, se utiliza también como antipirético, antiespasmódico, antiinflamatorio, para aliviar trastornos menstruales, nervios, insomnio, bronquitis, desordenes intestinales (náuseas, diarrea, vómito e infecciones). Esta especie ha sido reportada con propiedades antioxidantes debido al contenido de flavonoides en sus partes aéreas, especialmente en tallo (Navarrette y col., 2016).

### ***Generalidades de Justicia secunda Vahl***

En la *Figura 2*, se puede observar una planta madura de *Justicia secunda Vahl*.



*Figura 2.* Especie *Justicia secunda Vahl*.

*Nombre Científico:* *Justicia secunda Vahl (Vahl)*

*Nombres Comunes:* Singamochila, cascajera, sanguinaria, yerba de la sangre, sangre de cristo, insulina, la hoja de la vida, curatodo, canilla de pollo, entre otros (Zambrano y Bustamante, 2017).

*Justicia secunda Vahl*, es un pequeño arbusto perenne de 0,5-1 m de altura, con flores rojo-violeta que se agrupan en 5 pétalos sobre la corola. Proviene de regiones tropicales y templadas, por lo que se encuentra ampliamente distribuida en varios países (García y León, 2013).

*Zonas de distribución* (Gómez y col., 2012):

- Planta nativa de: Sur América.

- Caribe: Barbados, Antillas Neerlandesas, Trinidad y Tobago; Islas Vírgenes (EEUU), etc.
- Mesoamérica: Panamá.
- América del Sur: Guayana Francesa, Guyana, Surinam Venezuela y Colombia.
- África: El Congo.

*Taxonomía:*

En la Tabla 1, se puede observar la clasificación taxonómica de la especie *J. secunda* Vahl.

Tabla 1

*Taxonomía de Justicia secunda* Vahl.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Filo</b>	Scrophulariales
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Magnoliophyta
<b>Familia</b>	Acanthaceae
<b>Sub-familia</b>	Acanthoideae
<b>Tribu</b>	Justicieae
<b>Género</b>	<i>Justicia</i>
<b>Especie</b>	<i>Justicia secunda</i> Vahl

Tomado y modificado de National Germplasm Resources Laboratory, 2010)

***Compuestos químicos reportados en Justicia secunda* Vahl.**

En la Tabla 2, se muestran los compuestos químicos reportados según la literatura en diferentes extractos de *Justicia secunda* Vahl (Zambrano y Bustamante, 2017; Akibou y col., 2014; Koffi y col. 2006).

Tabla 2

*Compuestos químicos reportados en Justicia secunda Vahl.*

<b>Extracto</b>	<b>Compuestos químicos reportados</b>
Extracto hidroalcohólico	Alcaloides, cumarinas y glucósidos fenólicos.
Extracto alcohólico	Alcaloides, taninos, glucósidos fenólicos, triterpenos y esteroides.
Extracto etéreo	Alcaloides, triterpenos y esteroides.
Extracto acuoso	Saponinas, alcaloides, taninos, mucílagos, antraquinonas, leucoantocianina, antocianinas y triterpenos, polifenoles y flavonoides.

***Actividad farmacológica reportada en Justicia secunda Vahl.***

*Justicia secunda* Vahl, ha sido usada por las poblaciones latinoamericanas en afecciones como anemia, dolores de riñones, oídos, garganta, hipoglucemiante, energizante e hipolipemiante, sin que se haya establecido aun su eficacia (Zambrano y Bustamante, 2017; Corrêa y Alcântara, 2012).

En América Central y el norte de Sur América se utiliza en la medicina tradicional para el tratamiento de cálculos renales. En Venezuela se utiliza como antipirético, en Colombia también se utiliza para los trastornos de la glicemia y para el tratamiento de diferentes patologías infecciosas; también tiene aplicación etnoveterinaria para lesiones por mordeduras de serpientes y problemas de disentería de perros de caza (Gómez y col., 2012).

## **Bases teóricas**

### **Productos naturales.**

En sentido amplio un producto natural está formado por todos los compuestos de la naturaleza. En sentido más restrictivo un producto natural comprende solo los metabolitos secundarios que son específicos de las especies (Gutiérrez y Estévez, 2009). Muchos productos naturales se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes, colorantes, entre otros (Ávalos y Pérez, 2009).

Estos compuestos deben diferenciarse de los metabolitos primarios que son los productos químicos necesarios para la vida, resultantes del metabolismo vital de todo ser vivo, son: los carbohidratos, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos. En contraste a los metabolitos primarios, los productos naturales o metabolitos secundarios son subproductos de rutas metabólicas normales que ocurren en ciertas especies, siendo particulares dentro de un grupo taxonómico, estado de vida o tejido presentando una distribución restringida dentro del reino vegetal dando origen a la quimiotaxonomía (Torres, 2004).

### **Metabolitos secundarios presentes en los productos naturales.**

#### ***Fenoles y ácido fenólico.***

La denominación de ácido fenólico se puede aplicar a todos los compuestos orgánicos que poseen como mínimo una función carboxílica y un hidroxilo fenólico. Los fenoles simples (catecol, guayacol, floroglucinol) son bastante escasos en la naturaleza

salvo la hidroquinona que se encuentra en diversas familias, frecuentemente en forma de glucósido del difenol o de su monometiléter. Los alquilfenoles y sus dépsidos, que provienen del metabolismo de un poli- $\beta$ -cetoéster, son característicos de los líquenes (Bruneton, 2001).

Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los derivados del ácido benzoico que tienen un esqueleto formado por fenilpropanoides que han perdido un fragmento de dos carbonos de la cadena lateral. Ejemplos de estos derivados son la vainillina (6) y el ácido salicílico (7) (Figura 3) actúan como reguladores del crecimiento vegetal, implicados en la resistencia de la planta frente a patógenos (Ávalos y Pérez, 2009).

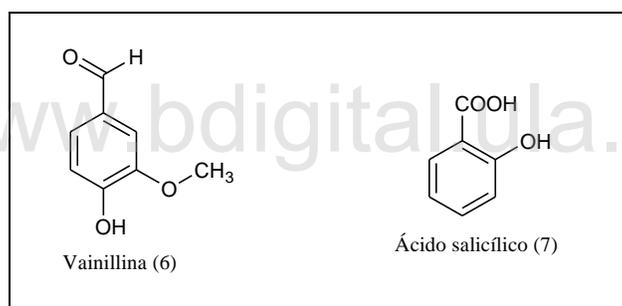
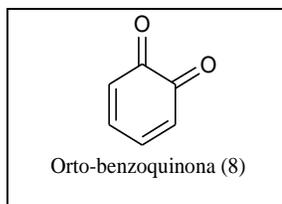


Figura 3. Estructura de algunos compuestos fenólicos.

### ***Quinonas.***

Las quinonas son dicetonas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles los que fácilmente las regeneran por oxidación. Contribuyen a la coloración de numerosos vegetales y animales, debido a sus pigmentos que van de amarillo a violeta. Algunos como la vitamina K, la ubiquinona y las plastoquinonas contribuyen en la respiración donando electrones y por ende se encuentran en todos los seres vivos (Domínguez, 1973)

Dependiendo del sistema aromático que dan al reducirse, las quinonas se clasifican en benzoquinonas **(8)** (*Figura 4*), naftaquinonas, antraquinonas y fenantraquinonas. Si los grupos cetónicos están continuos se les llama *orto* y si están separados por un grupo vinilo (-C=C-) *para* (Domínguez, 1973).



*Figura 4.* Estructura de una *orto*-benzoquinona **(8)**

### ***Cumarinas.***

Las cumarinas naturales poseen oxígeno en una o más de las seis posiciones nucleares disponibles, ya sea como fenoles, éteres o grupos glicósidos. Salvo pocas excepciones, se encuentran oxigenadas en C-7, en consecuencia, la 7-hidroxicumarina está biogénica y estructuralmente emparentada con las más complejas cumarinas (Barata y Debenedetti, 2007).

Es común, en muchas de ellas la presencia de cadenas isoprénicas enlazadas a un carbono del núcleo, a un átomo de oxígeno o a ambos. Estos grupos prenilos pueden encontrarse como una simple unidad de 3-metil-2-butenil, pero muchas veces es encontrado como su correspondiente epóxido o diol, o en una variedad de oxidaciones y formas reacomodadas de estas cadenas isoprénicas (Barata y Debenedetti, 2007).

Un ejemplo de cumarina, es escopoletina **(9)** (*Figura 5*)

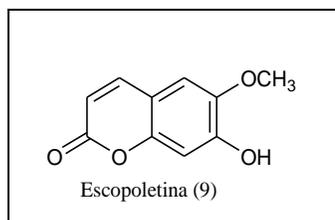


Figura 5. Estructura de escopoletina (9)

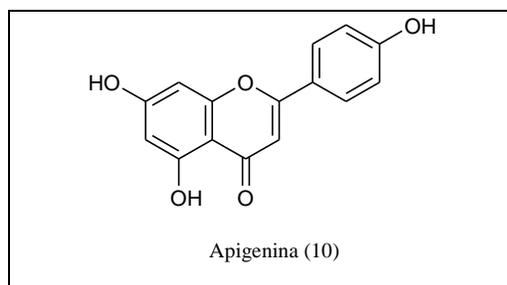
### ***Flavonoides.***

Los flavonoides son sustancias de bajo peso molecular producidas por casi todas las plantas vasculares. Los flavonoides están compuestos de dos anillos fenilos, ligados mediante un anillo pirano, lo cual nos deja en un esqueleto de difenilpiranos: C6-C3-C6 común en la mayoría de los flavonoides (Escamilla, Cuevas y Guevara, 2009).

La mayor parte de los flavonoides (a excepción de las catequinas) está presente en las plantas y alimentos en forma de  $\beta$ -glicósidos. Los flavonoides una vez hidrolizados (agliconas o flavonas) se conjugan por metilación, sulfatación o glucuronidación principalmente y debido a que tienen una capacidad de conjugación alta su concentración en el plasma es por lo general baja. Los flavonoides se dividen inicialmente en tres clases, dependiendo del sitio de unión del anillo B con el benzopirano: los flavonoides 1 (2-fenilbenzopiranos), isoflavonoides 2 (3-benzopiranos) y los neoflavonoides 3 (4-benzopiranos) (Estrada, Ubaldo y Araujo, 2012).

Se ha reportado que los flavonoides poseen propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas, antimicrobianas, antialérgicas, antitumorales, antiasmáticas e inhibidoras de enzimas como la transcriptasa reversa. Sin embargo, la principal propiedad biológica de los flavonoides y la más estudiada ha sido su actividad antioxidante (Pérez, 2003).

Un ejemplo de un compuesto flavonoide lo podemos observar en la *Figura 6*, donde se muestra la estructura de la flavona apigenina (**10**).

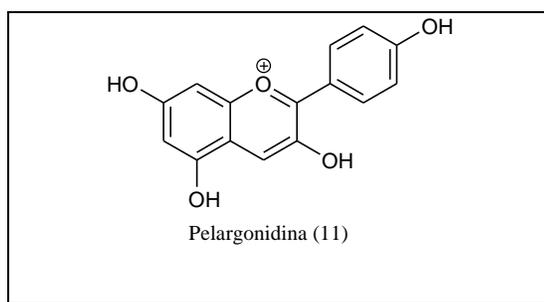


*Figura 6.* Estructura de la flavona apigenina (**10**).

### *Antocianinas.*

Las antocianinas representan el grupo más importante de pigmentos hidrosolubles, estos pigmentos son responsables de la gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul en varias frutas, vegetales y cereales. Estos compuestos son glucósidos de antocianidinas, pertenecientes a la familia de los flavonoides, compuestos por dos anillos aromáticos unidos por una cadena de 3C. En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad (Garzón, 2008).

Un ejemplo de una antocianina lo podemos observar en la *Figura 7*, donde se muestra la estructura de una pelargonidina (**11**).



*Figura 7.* Estructura de la antocianina Pelargonidina (**11**).

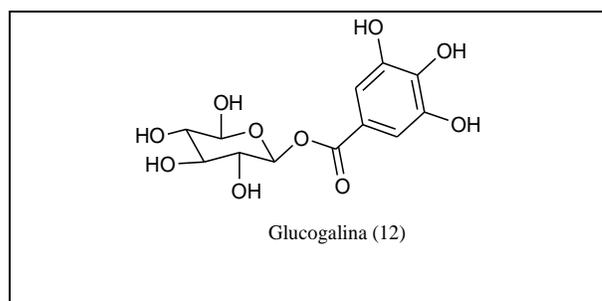
### ***Taninos.***

Los taninos son sustancias con propiedades similares a los de los agentes tánicos comerciales los cuales precipitan alcaloides y proteínas. Se caracterizan por ser sustancias astringentes, generalmente amorfos que pueden ser solubles en agua o soluciones hidroalcohólicas. Precipitan en soluciones acuosas con proteínas, especialmente albumina y gelatina, son fácilmente oxidables y se utilizan para el endurecimiento del cuero (Albornoz, 1980).

Los taninos se clasifican en:

- a. Hidrolizables (galotaninos y elagitaninos) aquellos que por tratamiento con ácido o por enzimas, se separan en la aglicona y en azúcares (Marcano y Hasegawa, 2002).
- b. Condensados, aquellos que por tratamiento no se degradan, polimerizan aún más, convirtiéndose en masas amorfas insolubles conocidas como flobafenos, estos son polímeros derivados de 3-hidroxi y 3,4-dihidroxi-flavonas (Marcano y Hasegawa, 2002).

Un ejemplo de un compuesto tanino lo podemos observar en la *Figura 8*, donde se muestra la estructura de la glucogalina (**12**).



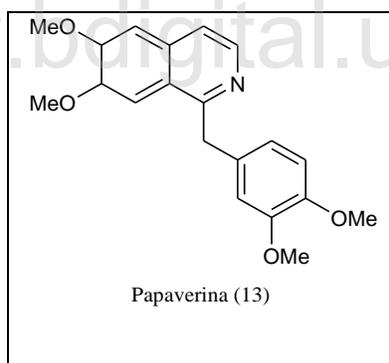
*Figura 8.* Estructura del tanino glucogalina (**12**).

### ***Alcaloides.***

Los alcaloides son sustancias básicas que contienen nitrógeno en un anillo heterocíclico, son derivados de aminoácidos, presentan distribución taxonómica limitada y se encuentran en plantas superiores como sales de un ácido orgánico (Martínez, Valencia, Jiménez y Galeano, 2008).

Atendiendo a su solubilidad, propiedad empleada para extraerlos y purificarlos, la base del alcaloide es soluble en solventes orgánicos y pueden formar sales solubles en solventes polares cuando se encuentra en ácidos minerales diluidos (Martínez y col., 2008).

Un ejemplo de un compuesto alcaloide lo podemos observar en la *Figura 9*, donde se muestra la estructura de Papaverina (**13**).

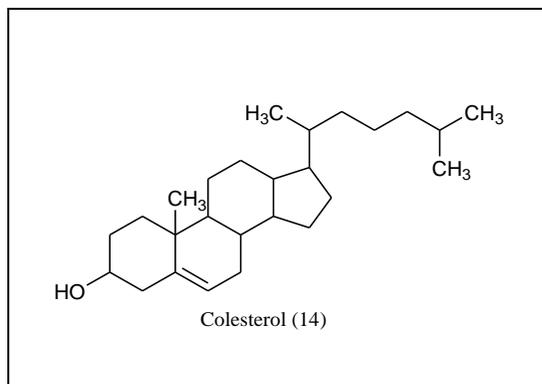


*Figura 9.* Estructura del alcaloide Papaverina (**13**).

### ***Esteroles.***

Son alcoholes sólidos  $C_{27}$  a  $C_{29}$  átomos, de origen animal. Su esqueleto está formado fundamentalmente por un ciclopentano perhidro fenantreno, común a todos los esteroides y una cadena lateral en la que puede insertarse radical metilo (serie ergostano) o etilo (serie estigmastano), particularmente en  $C_{24}$ . Todos los esteroides poseen un grupo hidroxilo en  $C-3$  (Domínguez, 1973).

Un ejemplo de un esteroide se puede observar en la *Figura 10*, donde se muestra la estructura del colesterol (**14**).

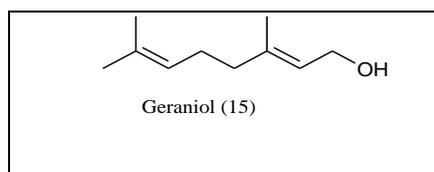


*Figura 10.* Estructura del colesterol (**14**).

### ***Terpenos.***

Los terpenos o isoprenoides son un conjunto de sustancias que conforman uno de los grupos de fitoquímicos 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-butadieno), 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 y Aleixandre, 2012).

En la *Figura 11* se muestra la estructura del triterpeno geraniol (**15**).

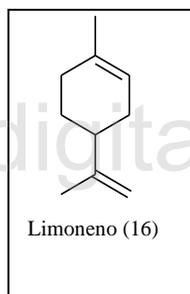


*Figura 11.* Estructura del terpeno geraniol (**15**).

### ***Monoterpenos.***

Son biogénicamente derivados de unidades de isopreno y están distribuidos en una gran variedad de sistemas vivos: plantas microorganismos e insectos están compuestos de 10 carbonos y 2 unidades de isopreno. La formación de la cadena con 10 átomos de carbono procede por condensación. De la última unidad la pérdida del H pro-R o pro-S sobre C-2 origina la unión *trans* o *cis*. Existen varios tipos estructurales, los que siguen la regla del isopreno o esqueletos regulares y los llamados irregulares en las cuales no se mantiene la secuencia de los carbonos que conforman los dos fragmentos de isopreno unidos cabeza-cola (Marcano y Hasegawa, 2002).

En la *Figura 12* se muestra la estructura del monoterpeno limoneno (**16**).



*Figura 12.* Estructura del monoterpeno limoneno (**16**).

### ***Sesquiterpenos.***

Contienen 15 átomos de carbono y algunos de ellos están presentes en los aceites esenciales denominados azulenos por desarrollar una coloración azul por tratamiento con ácidos o por calentamiento u oxidación. Estos compuestos presentan el esqueleto carbonado del azuleno generado a partir de algunos sesquiterpenos (Marcano y Hasegawa, 2002).

Un ejemplo de un compuesto sesquiterpeno lo podemos observar en la *Figura 13*, donde se muestra la estructura del cadineno (**17**).

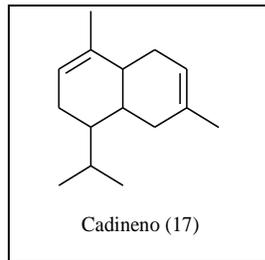


Figura 13. Estructura del sesquiterpeno cadineno (17).

### ***Diterpenos.***

Se biosintetizan por ciclaciones progresivas del geranyl geranyl pirofosfato (GGPF). Este esqueleto aparece en el fitol, el cual está presente abundantemente en las plantas conformando la parte lipofílica de la clorofila. Los diterpenos se han aislado de vegetales superiores, están presentes en aceites esenciales como el geranylgeraniol en el aceite de linaza y el geranylgeraniol en el aceite de jazmín, también en algunos insectos, microorganismos y fuentes marinas (Marcano y Hasegawa, 2002).

Un ejemplo de un compuesto diterpeno lo podemos observar en la *Figura 14* donde se muestra la estructura del pimarano (18).

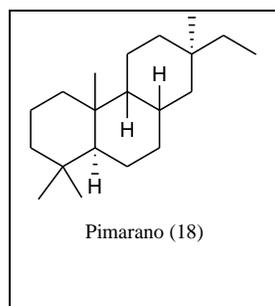
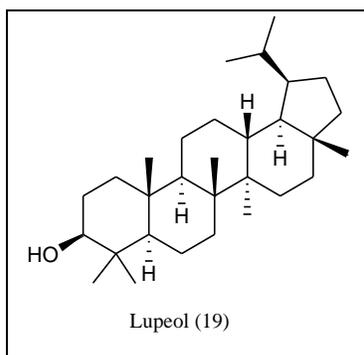


Figura 14. Estructura del diterpeno pimarano (18).

### ***Triterpenos.***

Presentan 30 átomos de carbono poseen una estrecha relación con los esteroides y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza tanto en el reino vegetal como en el animal (Marcano y Hasegawa, 2002).

Un ejemplo de un compuesto triterpeno lo podemos observar en la *Figura 15*, donde se muestra la estructura del lupeol (**19**).



*Figura 15.* Estructura del triterpeno lupeol (**19**).

### **Saponinas.**

Las saponinas son metabolitos secundarios que constituyen una gran familia de compuestos estructuralmente constituidos por un anillo terpenoide o esteroidal, conocidos como aglicona o sapogenina, sustituidos por oligosacáridos a través de enlaces glucosídicos que les confieren un carácter anfifílico. De acuerdo con el número de sustituciones, se pueden encontrar agliconas mono, di o triglicosiladas, también denominadas mono, di o tridesmosídicas (Ahumada, Ortega, Chito y Benítez, 2016).

Un ejemplo de un compuesto saponina lo podemos observar en la *Figura 16*, donde se muestra la estructura de la dioscina (**20**).

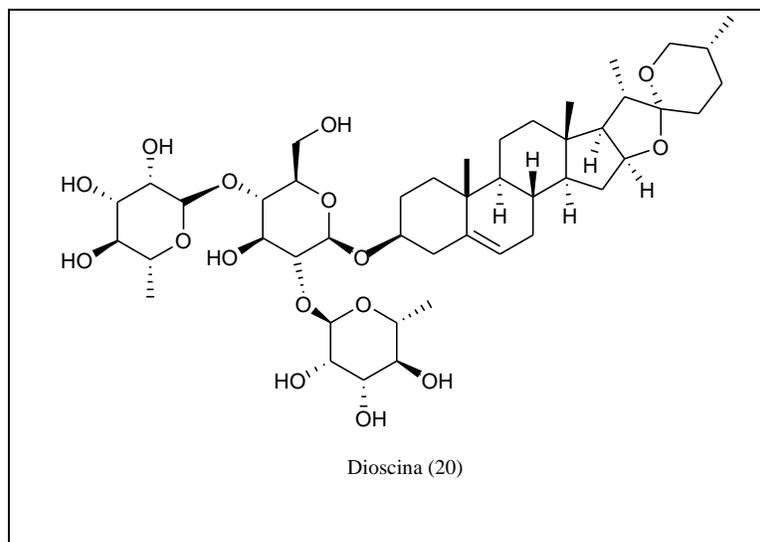


Figura 16. Estructura de la saponina dioscina (20).

### ***Tetraterpenos (Carotenoides).***

Los carotenoides están constituidos por unidades múltiples de isopreno con un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado en cada uno de los extremos. Existen dos tipos de carotenoides: los carotenos, que no contienen oxígeno en sus anillos terminales y las xantofilas que si los tienen. Las funciones oxigenadas más comunes son los grupos hidroxilo (OH) y epoxi (epóxidos 5,6 ó 5,8). También se encuentran los grupos aldehído (CHO), ceto (C=O), carboxi (CO<sub>2</sub>H), carbometoxi (CO<sub>2</sub>Me) y metoxi (OMe). Se han aislado y caracterizado más de 600 carotenoides, pero este número es menor en los alimentos (Carranco, Calvo, y Pérez, 2011).

Un ejemplo de un compuesto carotenoides lo podemos observar en la *Figura 17*, donde se observa la estructura del  $\beta$ -Caroteno (21).

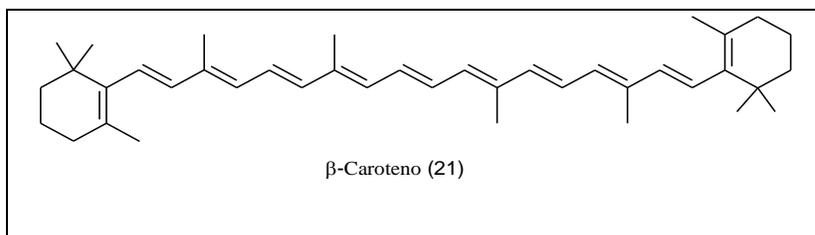


Figura 17. Estructura del compuesto carotenoide  $\beta$ -Caroteno.

### **Estudio fitoquímico.**

#### ***Selección de material.***

Esto depende del interés del estudio, puede ser particular o estar enfocado en un tipo químico de compuesto o metabolito secundario y en una determinada actividad biológica (Marcano y Hasegawa, 2002).

De manera general, se localiza la planta, luego se comprueba su clasificación botánica y se ubica en la literatura, todo esto para buscar información sobre los constituyentes químicos de la planta, se procede a la extracción, purificación y finalmente se realizan las pruebas biológicas tanto de extractos como de compuestos puros si así lo amerita el estudio (Marcano y Hasegawa, 2002).

#### ***Tamizaje fitoquímico.***

Son exámenes sencillos que se hacen en plantas recién cosechadas, ya que cuando el material no está fresco, a veces los resultados no son reproducidos en el laboratorio. Según Marcano y Hasegawa (2002), las pruebas más comunes son:

- a) *Alcaloides*: El crudo se evapora hasta casi sequedad; si durante este proceso se detecta olor de amoníaco o aminas, se evidencian alcaloides que además deben ser inestables. El extracto se obtiene de la maceración con HCl diluido, se precipita con reactivo de

Meyer o se somete a reacciones de color con reactivo de Dragendorff o con ácido yodoplatinico.

- b) *Saponinas*: el extracto acuoso se agita. la aparición de espuma es indicio de la presencia de estos compuestos. Una parte del crudo se hidroliza con HCl 10 % o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 % en reflujo) y el hidrolizado se concentra y se extrae con acetato de etilo o cloroformo. La fracción orgánica debe contener las sapogéninas y otros materiales no hidrolizables. Tanto el crudo total como el extracto orgánico provenientes de la hidrólisis, se analizan para esteroides y triterpenos (reacción de Libermann Burchard).
- c) *Taninos*: el extracto en NaOH al 10 %, se trata con una solución de gelatina al 1 %. La presencia de taninos se manifiesta con la precipitación del compuesto proteína-tanino.
- d) *Flavonoides*: El crudo total se lleva a sequedad y se desgrasa con éter de petróleo. El extracto alcohólico se trata con un trozo de magnesio y HCl. El test será positivo para flavonoides si se produce una coloración roja al dejar en reposo la reacción por unos 10-20 minutos y una gota del extracto total se absorbe sobre el papel de filtro y se rocía con una solución de cloruro de aluminio al 1 % en etanol. La aparición de una mancha fluorescente amarilla bajo luz UV es indicativa de la presencia de flavonoides.
- e) *Antraquinonas*: El crudo total llevado a sequedad, se extrae con KOH (0,5 N), se filtra, se acidifica con ácido acético y se agita con benceno. Si la capa orgánica toma una coloración roja al alcalinizarla con hidróxido de amonio, hay antraquinonas presentes.
- f) *Glicósidos cianogénicos*: Al material fresco macerado se añaden gotas de cloroformo y se calienta a 50-70 °C en tubo cerrado, los vapores se ponen en contacto con un papel

de filtro impregnado en una solución al 1% de ácido pícrico en carbonato de sodio al 10 %. Los compuestos cianogénicos se manifiestan con una mancha roja sobre el papel; el tiempo de reacción varía, puede tomar hasta dos horas.

### ***Métodos de extracción de material vegetal.***

Entre los procesos extractivos de los diferentes compuestos fitoquímicos, destacan las nuevas tecnologías entre las que se encuentra la extracción en fluidos supercríticos. Pero a menudo se utilizan otros procesos extractivos más convencionales, como los de arrastre de vapor (Valcárcel y Gómez, 1988).

#### *Por arrastre de vapor.*

Se utiliza para la extracción de aceites esenciales ya que éstos contienen compuestos volátiles o aromáticos como los alcoholes y cetonas, siendo este método perfecto para su extracción mediante el uso de vapor saturado a presión atmosférica. Al líquido acuoso que se obtiene se le hace extracción con cloroformo y el extracto clorofórmico que se obtiene se lleva al rotavapor y luego a una columna para separación cromatográfica (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

#### *EFS, fluidos supercríticos.*

Un fluido supercrítico es una sustancia, mezcla o elemento que, mediante operaciones mecánicas, bajo unas condiciones operativas de presión y temperatura, se sitúa por encima de su punto crítico, pero por debajo de la presión que hace falta para condensarlo en un sólido (Valcárcel y Gómez, 1988).

### *Extracción sólido-líquido.*

La extracción de muestras sólidas con solventes, generalmente conocida como extracción sólido-líquido, es un método muy utilizado en la separación de compuestos antioxidantes a partir de residuos sólidos. Estos residuos requieren la extracción con solventes convencionales y la posterior eliminación de estos para obtener un extracto concentrado. Los solventes más habituales son agua acidificada, etanol, metanol, isopropanol, hexano, ciclohexano, tolueno, xileno, ligroína, éter etílico, éter isopropílico, acetato de etilo, acetona, cloroformo (Tábío, Díaz, Rondón, Fernández y Piloto, 2017)

### *Con disolventes (extracción discontinua).*

#### *Maceración.*

Es un método de extracción sólido-líquido donde el material vegetal que se pretende extraer contiene compuestos solubles en el líquido de extracción a utilizar. Para realizar el proceso se corta o muele el material vegetal, fresco o seco, se coloca en recipientes adecuados, se coloca el disolvente seleccionado por polaridad: hexano, cloroformo y finalmente etanol o metanol en reposo con un equipo en agitación continua a temperatura ambiente durante un intervalo de días que puede ser de 3 a 5 (Rivas y col., 2016).

#### *Infusión.*

El disolvente se hierve y posteriormente se introduce la planta a extraer, dejándose enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente. El extracto recibe el nombre de infusión o té (Valcárcel y Gómez, 1988).

*Decocción o cocimiento.*

La planta es cubierta con el disolvente (agua), y se lleva a ebullición por 15 a 30 minutos posteriormente se enfría y se filtra (Valcárcel y Gómez, 1988).

*Con disolventes (extracción continua).*

*Percolación.*

Consiste en colocar el material fragmentado en un recipiente cónico o cilíndrico haciendo pasar un disolvente apropiado a través del mismo. El tamaño de la particular no debe ser menor a 3 mm para permitir que el disolvente fluya sin embargo el material debe estar debidamente compactado para que el disolvente eluya con cierta lentitud dando tiempo al mismo de tomar contacto con los componentes que se desean extraer (Lamarque y col., 2008).

*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 (Valcárcel y Gómez, 1988).

*Extracción líquido-líquido.*

Consiste en extraer los analitos de una muestra líquida mediante un disolvente inmiscible en ella, como puede ser una fase acuosa con un disolvente orgánico no miscible. El pH es fundamental para conseguir buen rendimiento (Valcárcel y Gómez, 1988).

### *Extracción en fase sólida.*

Se emplean columnas o cartuchos capaces de retener el analito, que se extrae posteriormente con un pequeño volumen de disolvente (Valcárcel y Gómez, 1988).

### **Pruebas de actividad biológica.**

La actividad biológica se refiere a cualquier efecto que ejerce la muestra sobre los seres vivos. Para determinar tal actividad se cuenta con múltiples ensayos, entre ellos los ensayos *in vivo* e *in vitro*. Los ensayos *in vitro* son los más utilizados por ser más económicos, utilizar menos material y las condiciones experimentales son más controlables (Marcano y Hasegawa, 2002).

### ***Actividad antibacteriana.***

Existen diversas sustancias que pueden destruir ciertas bacterias (efecto bactericida) o inhibir su crecimiento (efecto bacteriostático). Estas sustancias pueden ser producidas por microorganismos como el caso de la penicilina producida por el hongo *Penicillium nectarus*. Sin embargo, existen otras sustancias que son sintetizadas químicamente que pueden ser de origen natural o mediante procesos industriales y son llamados agentes antimicrobianos. En el caso de los extractos vegetales, si poseen acción bactericida o bacteriostática son considerados agentes antimicrobianos (Tortora, Funke y Case, 2007).

Las pruebas más comunes para medir la actividad antimicrobiana de un antibiótico o de un agente antimicrobiano son las pruebas de difusión del disco en agar (Kirby-Bauer), dilución en agar o caldo, antibiograma ATB rápido y el método epsilométrico ET. Para evaluar la actividad antibacteriana de un extracto vegetal se utilizan principalmente, la

prueba de difusión del disco en agar y la prueba de dilución en agar o caldo (Tortora y col., 2007).

*Métodos para la determinación de la actividad antibacteriana.*

La efectividad de cada método puede ser afectada por diferentes factores tales como el origen del extracto, volumen del inóculo, la fase de crecimiento del microorganismo el medio de cultivo utilizado el tiempo de incubación, la temperatura, el pH y la actividad de agua del medio entre muchos otros factores (Reyes, Palou, y López, 2014).

Estos métodos pueden clasificarse en métodos cuantitativos y cualitativos.

*Métodos cuantitativos:* son aquellos procedimientos que permiten determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) (Taroco, Seija y Vignoli, 2006).

*Métodos cualitativos (disco difusión):* son aquellos procedimientos que permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente (Taroco y col., 2006).

Los métodos más utilizados para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos son:

a) *Dilución en agar:* es utilizado generalmente para determinar si el extracto es letal contra el microorganismo, además se usa con microorganismo aeróbicos o microaerofilico con una velocidad variable de crecimiento. Para esta técnica se prepara diferentes diluciones de los extractos, las diluciones se añaden a los agares y estos son puestos en cápsulas de Petri para su solidificación. Finalmente, los microorganismos en prueba previamente

diluidos son inoculados en los agares e incubados a su temperatura y tiempo óptimos (Reyes y col., 2014).

b) *Dilución y micro-dilución en caldo*: Las técnicas de dilución y microdilución consisten en preparar una serie de tubos con una determinada cantidad de caldo de cultivo en cada uno, a la que se incorpora una cantidad de antibiótico creciente, de modo que se obtengan concentraciones dobles progresivas. Se siembran las bacterias, se incuban y a las 18-24 horas se observa el crecimiento. El tubo con la menor concentración de antibiótico que ha inhibido la bacteria indica la concentración mínima inhibitoria (Prats, 2005).

c) *Difusión en agar o Kirby Bauer*: este es un método cualitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido. Partiendo de una muestra clínica siempre se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica. Este método consiste en depositar en la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado en antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano (Taroco y col., 2006).

### *Actividad antioxidante.*

Los radicales libres son la principal amenaza oxidativa de las células, estos radicales pueden ser endógenos y exógenos, pueden inducir un amplio espectro de reacciones nocivas para el organismo animal en especial el ser humano. Sin embargo, existen sustancias que actúan como protectores, que, en conjunto con las moléculas ricas en electrones, que el propio organismo produce pueden contrarrestar los efectos dañinos y estabilizar los radicales libres, estabilizando los radicales libres, dichas sustancias son conocidas como antioxidantes (Bello, 2005).

### *Clasificación de los antioxidantes.*

Los antioxidantes pueden ser clasificados en dos tipos: antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.

*Antioxidantes enzimáticos:* Las células de los tejidos biológicos poseen sistemas enzimáticos que actúan como protectores de la oxidación por medio de la inactivación de sustancias potencialmente oxidativas como las especies reactivas de oxígeno (EROS) dentro de las que se incluyen el  $O_2$ , el  $H_2O$  y el  $OH^-$ , inactivando el estado de oxidación de los metales de transición, que son potenciales catalizadores de la oxidación (Martínez y col., 2009).

Entre las enzimas con las actividades antes descritas están la catalasa que cataliza la descomposición de peróxido de hidrogeno  $H_2O_2$ , la superóxidodismutasa que inhibe la oxidación lipídica catalizando la transformación de superóxido  $O_2^-$ , la glutatión peroxidasa que cataliza la reducción de los peróxidos lípidos y el peróxido de hidrogeno por medio de

la glutaciona y las ferroxidasas que son enzimas catalizadoras de la oxidación del óxido ferroso FeO a férrico Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Frontera, Herring, Micheli, y Silver, 2008).

*Antioxidantes no enzimáticos:* Son un complemento de los enzimáticos que son intracelulares, los antioxidantes no enzimáticos se encargan de compensar a los radicales libres que son liberados o que pertenecen al espacio intracelular; en este grupo se incluye a la vitamina E, el  $\beta$ -caroteno o precursor de la vitamina A y también la vitamina B que forma parte de la enzima glutatión reductasa que regenera al glutatión (Herrerías, Díaz y Jiménez, 1996).

*Principales antioxidantes presentes en la naturaleza.*

*Ácido Ascórbico (Vitamina C):* Es un derivado de un azúcar de seis carbonos considerado un regenerador de antioxidantes ya que participa en reacciones que le permiten reducir compuestos libres que se encuentran inestables por falta de un electrón (Cubero, Monferrer y Villalba, 2002).

*Vitamina E:* Es una molécula que posee su sitio activo en el grupo 6-hidroxilo de anillo cromanol de su estructura, es un elemento capaz de inhibir la síntesis de creatina quinasa y la xantina oxidasa lo que ayuda a proteger varias enzimas de la membrana celular de la oxidación producida por metales como el mercurio, el cadmio o el plomo (Minguez, Galán, Fernández y Méndez, 1996).

*Carotenoides:* Son muy valiosos para proteger las grasas, ya que actúan inhibiendo la reacción del oxígeno con los lípidos (Minguez, Galán, Fernández y Méndez, 1996).

*Polifenoles:* Son los antioxidantes más abundantes de las dietas, que limitan los procesos oxidativos debido a su capacidad de combinarse con metales de transición, además es capaz de neutralizar las moléculas que se producen durante la activación del oxígeno (Flanzy, 2003).

*Método de DPPH (2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo).*

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*, uno de los más utilizados es la medida *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* nos dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Kuskoski, Azuero, Troncoso, Mancini y Fett, 2005).

Se han descrito diversas técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas medicinales, pero aquella que ha recibido una preferencial atención es la técnica que utiliza el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo. Este radical libre es susceptible a reaccionar con compuestos a través de un proceso caracterizado por la cesión de un átomo de hidrogeno proporcionado por el agente antioxidante (Guija, Inocente, Ponce y Zarzosa, 2015).

En la *Figura 18* se muestra la reacción química entre el 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) y una molécula antioxidante.

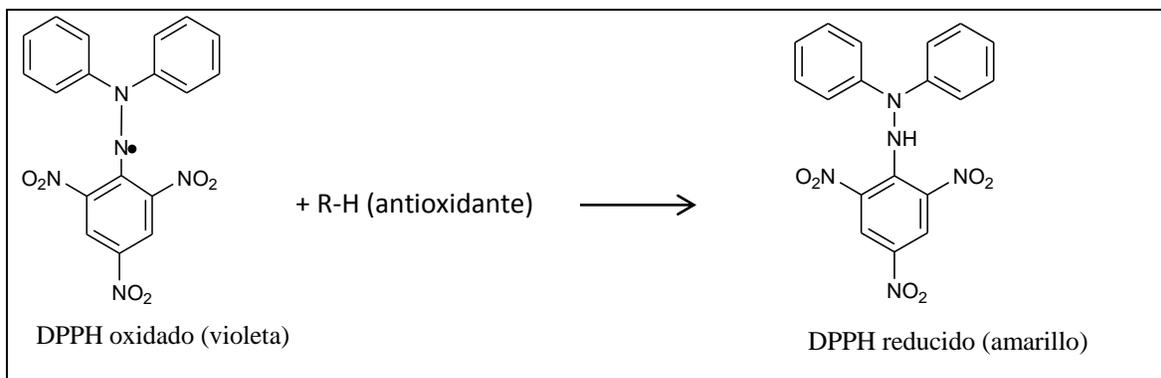


Figura 18. Reacción química entre el radical DPPH y una especie antioxidante.

El fundamento del método DPPH consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; la absorbancia es medida espectrofotométricamente a 517 nm. La diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres (Castañeda y col., 2008).

www.bdigital.ula.ve

### ***Toxicidad sobre Artemia salina.***

#### *Artemia salina.*

También llamado camarón amarillo, son camarones de pequeño tamaño, de cuerpo de colores carmelitas y transparentes a la luz, pertenecientes a la división Arthropoda, clase Crustacea, subclase Branchiopoda (Figura 19). El género *Artemia* está compuesto por varias especies, de las cuales se han identificado al menos cuatro especies bisexuales, entre ellas *Artemia salina* Leach, *Artemia persimilis* Piccinelli y *Artemia franciscana* Kellog y *Artemia partenogenetica* Bowen y Sterling (Pino y Lazo, 2010).

El crustáceo de *Artemia salina* vive en aguas hipersalinas y salobres y puede crecer a temperaturas entre 6 y 35 °C, se alimenta de algas y bacterias y es fuente de alimento para

peces, pájaros y varios invertebrados. Las hembras producen huevos que en condiciones externas favorables, eclosionan produciendo larvas de un tamaño aproximado de 1 mm. Los huevos también pueden formar quistes y permanecer en esta forma por un año o más. *A. salina* en condiciones favorables, se convierten en adultos transcurridas 6 a 8 semanas, alcanzando un tamaño promedio de 7 mm (Pino y Lazo, 2010).

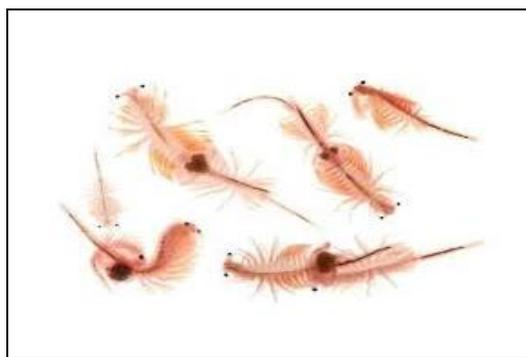


Figura 19. *Artemia salina*

Los nauplios o larvas de este crustáceo, actúan como un indicador natural en la presencia de toxicidad en las fuentes donde se desarrollan ya que son altamente sensibles a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de plantas con actividad biológica. A pesar de ser una prueba útil, no es selectiva para ninguna molécula química. (Michael y col., 1956).

Es así como el primer reporte de su uso como organismo de prueba aparece en 1956, descrito por Michael, posteriormente en 1982 fue adaptado por Meyer como un bioensayo preliminar útil en la investigación de toxicidad en productos naturales. En 1993, Solis y col., propusieron un nuevo ensayo, para evaluar toxicidad frente a *Artemia salina* en microplacas mostrando resultados comparables al método de tubo de ensayo publicado previamente, este estudio requiere pequeñas cantidades del extracto y facilita evaluar un

gran número de muestras y diluciones (Solis y col, 1993; Meyer y col., 1986 ; Michael y col., 1956;).

Este organismo representa el único género animal en todo el mundo cuyo estado criptobiótico (quiste) está disponible comercialmente de manera continua, como fuentes de alimentos para peces y crustáceos en acuicultura. Por tanto, existe una disponibilidad permanente de huevos (quistes) a partir de los cuales pueden ser obtenidas las larvas evitando así la necesidad de mantener colonias en el laboratorio (Pino y Lazo, 2010).

Este bioensayo de toxicidad *in vitro* es un método rápido, simple y de bajo costo. El procedimiento consiste en exponer los nauplios de *A. salina* a los compuestos activos y/o los extractos naturales, para determinar valores de dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), de los cuales se considera como extracto tóxico, aquellos con una DL<sub>50</sub> menor o igual a 30 µg/mL (Meyer y col., 1982). Los valores obtenidos de DL<sub>50</sub>, no advierte una actividad fisiológica o biológica en particular, solo son indicadores de toxicidad a nivel celular que pueden orientar investigaciones más específicas (Sánchez y Neira, 2005).

### ***Definición operacional de términos.***

#### *Coloración de Gram.*

Es un tipo de coloración diferencial compuesta que permite clasificar a las bacterias en grampositivas y gramnegativas según la composición de su pared celular (Ramírez, 2015).

### *Bacterias grampositivas.*

Son bacterias cuya pared celular está compuesta por capas gruesas de peptidoglicano, lo cual hace que se deshidrate y sus poros se mantengan cerrados durante la coloración de Gram reteniendo el colorante violeta de genciana y al microscopio se observa de color purpura (Ramírez, 2015).

### *Bacterias gramnegativas.*

Son bacterias cuya pared celular está compuesta por altos contenido de lípidos, lo cual hace que al decolorar queden poros en la pared y permita la salida del compuesto violeta de genciana-yodo y al agregar el colorante de contraste, la safranina, tomen un color rosado (Ramírez, 2015).

### *Concentración inhibitoria mínima (CIM).*

Se refiere a la menor concentración de antimicrobiano que inhibe por completo el desarrollo bacteriano visible (Forbes, Sahm y Weissfeld, 2009).

### *Escala de turbidez de MacFarland.*

Es un estándar que nos permite comparar la turbidez de la suspensión con el inóculo para evaluar si el tamaño del mismo es el apropiado para la prueba de susceptibilidad. Esta escala se prepara mezclando diferentes volúmenes de ácido sulfúrico al 1 % y de cloruro de bario al 1,175 %, para obtener soluciones con densidades ópticas específicas (Forbes y col., 2009).

*Concentración eficiente 50 (IC<sub>50</sub>).*

Concentración efectiva del extracto que logra atrapar el 50 % de los radicales libres DPPH de una solución preparada a 0.1 mM (Murillo, Lombo, Tique y Méndez, 2007).

*Porcentaje de Inhibición (% I).*

Medida del daño oxidativo a un sustrato oxidable que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra (Fernández, Villaño, Troncoso y García, 2006).

***Definición operacional de las variables.***

Hernández, Fernández y Baptista (2010), afirmaron que una variable es una propiedad que puede variar y cuya variación es susceptible de medirse. Por lo tanto, en el siguiente punto se establecen las variables a desarrollar en el proyecto de investigación, como se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Definición operacional de las variables de la investigación

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual ¿Qué es?	Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
Composición química	Independiente o explicativa Cualitativa	Estudio de los componentes químicos de las plantas que comprende la extracción, separación y detección de dichos componentes mediante formación de compuestos colorados, cromatografía, radiación o fluorescencia (Flores, Castañeda, Montiel, y Hernández, 2014).	A través del tamizaje fitoquímico	Presencia de alcaloides, cumarinas, compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, taninos, quinonas, terpenos o esteroides.	La aparición de turbidez, un precipitado, espuma, coloración o fluorescencia.
Actividad Antibacteriana	Dependiente o explicativa discreta	Capacidad de una sustancia de inhibir la multiplicación o incluso de destruir una bacteria (Albornoz, 1980).	Difusión en pozos de agar (Kirby Bauer modificado)	Resistente Sensible Sensibilidad intermedia Frente a cepas de referencia internacional.	Presencia del halo de inhibición frente a cepas de referencia internacional.

Continuación Tabla 3. Definición operacional de las variables de la investigación

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual ¿Qué es?	Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
Actividad antioxidante	Dependiente o explicativa y discreta	La actividad antioxidante se centra principalmente en la búsqueda de compuestos capaces de capturar radicales del medio ambiente que lo rodea (Contreras, Días, Celis, Rojas, Méndez, Rosenzweig, y Ontiveros, 2017).	Método de DPPH	Compuestos: fenólicos, flavonoides, taninos, entre otros	% de inhibición
Toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	Dependiente o explicativa y discreta	La toxicidad es la capacidad intrínseca que posee un agente químico de producir efectos adversos sobre un organismo (Silbergeld, 1998). En este caso la capacidad de los extractos de producir efecto adverso sobre <i>Artemia salina</i> .	Mediante exposición de los nauplios de <i>A. salina</i> a los extractos naturales, para determinar valores de dosis letal 50 (DL <sub>50</sub> ).	Extremadamente tóxico Altamente tóxico Moderadamente tóxico Ligeramente tóxico Prácticamente no tóxico Relativamente inocuo	Valores de DL <sub>50</sub>

### **Hipótesis.**

De acuerdo a la composición química reportada por algunos investigadores, para *Justicia secunda* Vahl, que demuestra la alta potencialidad biológica y farmacológica de esta especie, se esperaría que, dependiendo de sus componentes químicos, algunos de los extractos de las partes aéreas de esta planta, presenten actividad antioxidante, antibacteriana y que el extracto polar de la misma sea inocuo sobre *A. salina*.

### **Hipótesis nula.**

De acuerdo a la composición química reportada por algunos investigadores, para *Justicia secunda* Vahl, que demuestra la alta potencialidad biológica y farmacológica de esta especie, se esperaría que dependiendo de dependiendo de sus componentes químicos, algunos de los extractos de las partes aéreas de esta planta, no presenten actividad antioxidante, antibacteriana y que el extracto polar de la misma no sea inocuo sobre *A. salina*.

## Capítulo III

### Marco metodológico

#### **Tipo de investigación.**

El proyecto realizado fue de tipo confirmatorio, según Hurtado (2010) lo define como un tipo de investigación cuyo propósito consiste en precisar diferencias y semejanzas entre dos o más grupos con respecto a un mismo evento. En este caso los dos grupos serian la composición química de *Justicia secunda* Vahl y su actividad biológica con el fin de determinar la relación existente entre ambas.

#### **Diseño de investigación.**

Según Arias (2012), el diseño de investigación es la estrategia general que ha adoptado el investigador para responder al problema planteado. En esta investigación se empleó un diseño de laboratorio, que consiste en recolectar datos a partir de fuentes vivas o materiales, pero cuando estas fuentes se encuentran en un ambiente creado artificialmente para efectos de la investigación o en un ambiente que no suele ser el habitual para las unidades de estudio (Arias 2012).

La fuente de esta investigación deriva de datos primarios, es decir proviene directamente de la fuente que lo produce, de ahí que, la especie *Justicia secunda* Vahl, fue previamente tratada para obtener de ella los extractos, la actividad biológica de estos extractos se evaluó mediante diferentes técnicas en el laboratorio. Es decir, la planta no fue estudiada en la naturaleza (contexto habitual), sino que fue tratada mediante diversos

procesos físicos y químicos para evaluar su actividad antibacteriana, actividad antioxidante y toxicidad sobre *A. salina*.

Por otra parte, según la temporalidad y la secuencia de las mediciones, la presente investigación fue de diseño transversal, ya que se hizo el estudio de la actividad biológica de los extractos en un momento único en el tiempo. Además, esta investigación tuvo un diseño contemporáneo, ya que la ocurrencia del evento de estudio se dio en el momento presente y el investigador pudo ser testigo (Hernández y col., 2010).

### **Población y muestra.**

La población no es más que el conjunto limitado de individuos de una misma clase que se unen entre sí por tener características comunes, las cual se estudia para la obtención de datos de la investigación (Martínez, 2002); en la presente investigación se considera como población toda la planta de la especie *Justicia secunda* Vahl. Este tipo de población puede ser denominada como no finita ya que la misma es constituida por todas las plantas que pertenecen a la especie *Justicia secunda* Vahl, ya que éstas comparten las mismas características.

Según Martínez (2002), se entiende por muestra un subgrupo de la población que debe ser representativo de la misma, y que se extrae cuando no es posible medir a cada uno de las unidades de la población. En esta investigación, la muestra fue las partes aéreas de la especie *Justicia secunda* Vahl que fue recolectadas en el Jardín de plantas medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y más específicamente los extractos obtenidos de la misma.

### **Instrumento de recolección de datos.**

Se tomó en cuenta que la recolección de datos se hizo por medio de hojas o cuaderno de trabajo; ya que es una investigación experimental de laboratorio, debe llevarse un registro de los resultados de cada prueba realizada, para posteriormente elaborar tablas que nos permitan medir, cuantificar los resultados obtenidos para tal fin, se utilizó un programa estadístico.

### ***Recolección del material vegetal.***

Las partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl, se recolectaron en el Jardín de plantas medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis ubicado en el municipio Libertador del estado Mérida, a una altitud de 1630 msnm.

Se tomaron los tallos, hojas y flores para su identificación y elaboración de un voucher. La planta fue identificada botánicamente por el Ing. Juan Carmona, adscrito al Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

En el herbario Dr. José L. Ruiz Terán, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA, Mérida, reposa un voucher de fecha 25 de septiembre de 2017 con número 4 de la colección, donde figuran como recolectores de la planta la Profa. Marielba Morillo, el Ing. Juan Carmona y la Br. Tatiana López (*Figura 20*).

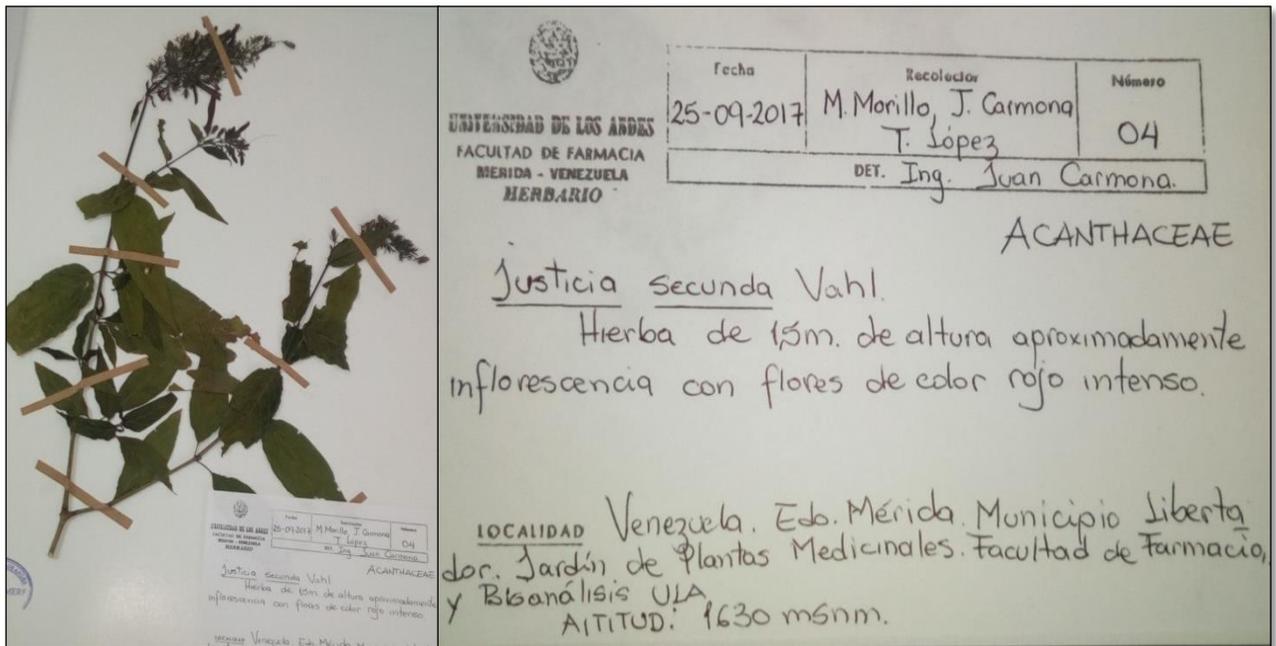


Figura 20. Voucher de *Justicia secunda* Vahl.

### Preparación de los extractos vegetales.

Se utilizaron hojas, tallo y flores de la planta, posteriormente se cortaron en trozos pequeños, se colocaron en la estufa a 40 °C durante 48 horas, luego fueron molidas y se pesaron en la balanza Denver Instrument XL 3100 obteniéndose 82,5 g del material vegetal seco (Figura 21), este material fue almacenado en un lugar seco a temperatura ambiente (Esquema 1).

Primero, se preparó el extracto hexanóico por maceración a temperatura ambiente, para tal fin, se colocó el material molido en 200 mL de hexano y se dejó macerar durante dos días, se procedió a filtrar y concentrar el extracto hasta sequedad empleando el rotaevaporador IKA RV 10 digital a 45 °C. Este procedimiento se repitió dos veces más, en este extracto se concentran los compuestos apolares de la planta.

Seguidamente, se prepararon los extractos diclorometanoico y etanólico, mediante el mismo procedimiento que para el extracto hexanólico, esta vez utilizando como solvente el diclorometano y el etanol. En el extracto diclorometanoico se encuentran los compuestos medianamente polares, mientras que en el extracto etanólico, los compuestos polares (Figura 22).

Finalmente, se obtuvieron 600 mg de extracto hexanólico, 1030 mg de extracto diclorometanoico y 1150 mg de extracto etanólico.



Figura 21. Secado y molido de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl

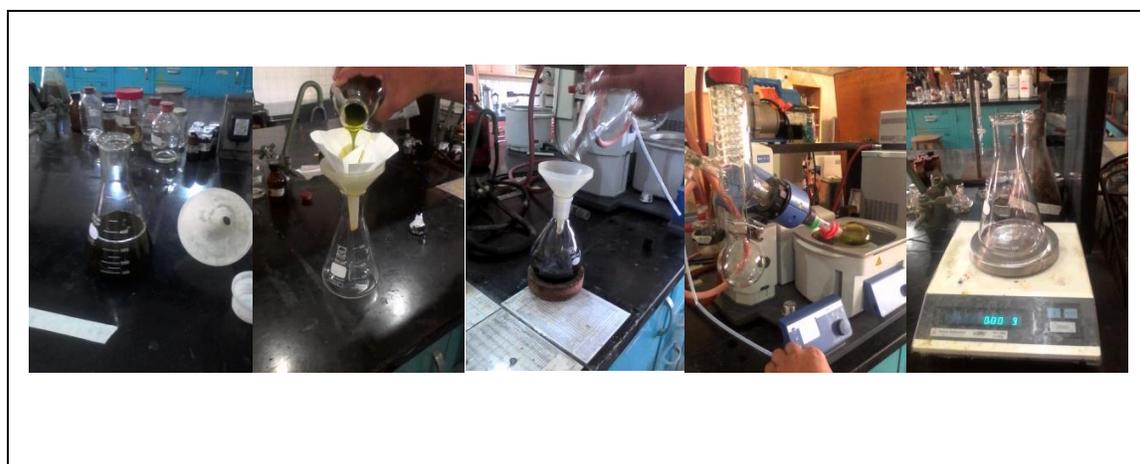
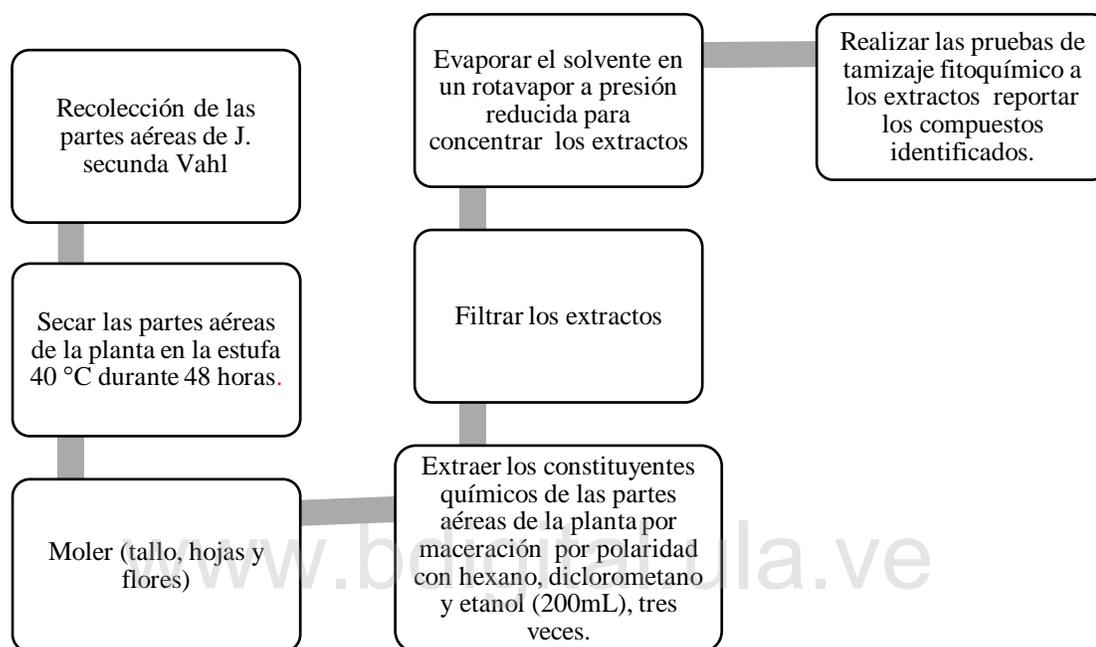


Figura 22. Maceración y filtración de los extractos las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.

## Estudio fitoquímico de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.

En el *Esquema 1* se muestra el procedimiento del estudio fitoquímico de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.



*Esquema 1.* Procedimiento del estudio fitoquímico de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl

### ***Tamizaje fitoquímico.***

Se realizó, la identificación de los grupos de metabolitos secundarios presentes en cada extracto mediante las siguientes pruebas químicas:

#### *Alcaloides.*

Ensayo de Dragendorff, Wagner y Mayer

Técnica:

1. Se pesó 100 mg del extracto etanólico y se le adicionó 10 mL de HCl al 10 %, se colocó el tubo en baño de maría hasta ebullición por 30 minutos.
2. Se filtró el contenido del tubo y el filtrado se distribuyó en 3 tubos de ensayo.
3. Se adicionó a cada tubo gotas del reactivo correspondiente (Dragendorff, Wagner y Mayer).
4. La aparición de turbidez o un precipitado, indicó la positividad de la prueba.

*Terpenos y/o esteroides.*

Ensayo de Liberman-Burchard

Técnica:

1. Se disolvieron los tres extractos en 0,5 mL de diclorometano anhidro.
2. Se añadió 0,5 mL de anhídrido acético a cada uno.
3. Se le adicionó cuidadosamente por las paredes del tubo unas gotas de ácido sulfúrico concentrado.
4. Se consideró positiva la prueba cuando apareció coloración roja, verde o azul.

*Saponinas.*

Prueba de la espuma

Técnica:

1. Se colocó en un tubo una pequeña cantidad de cada uno de los extractos y se adiciono 1 mL de agua.
2. Se agitó vigorosamente durante un minuto.
3. La prevalencia de espuma durante más de 5 minutos, indicó la positividad de la prueba.

### *Polifenoles.*

#### Prueba con $\text{FeCl}_3$

#### Técnica:

1. A 1 mL de solución alcohólica de los extractos diclorometanoico y etanólico, se le agregó una gota de solución acuosa de cloruro férrico al 10 %.
2. La formación de color azul o verde indica la presencia de fenoles.

### *Taninos.*

#### Prueba de la gelatina

#### Técnica:

1. Se disolvió el extracto etanólico en agua, aparte se preparó una solución al 10 % de gelatina y se puso en contacto con el extracto acuoso.
2. Si se produce desnaturalización de la proteína que se evidencia con la presencia de un precipitado o la ruptura de la gelatina, se considera positiva la prueba.

### *Flavonoides.*

#### Ensayo de Shinoda

#### Técnica:

- a) Se tomó 1 mL de solución de cada extracto.
- b) Se añadieron algunas virutas de Mg, sujetar el tubo con una pinza. Se añadió cuidadosamente por la pared del tubo unas gotas de HCl concentrado.
- c) La aparición de coloraciones naranja o violeta, se considera prueba positiva.

### *Quinonas*

#### Técnica

Adicionar 2 gotas de hidróxido de amonio concentrado al extracto metanólico disuelto en etanol en un tubo de ensayo. La prueba se considera positiva si se presenta una coloración roja que aparece en los dos primeros minutos.

### *Cumarinas*

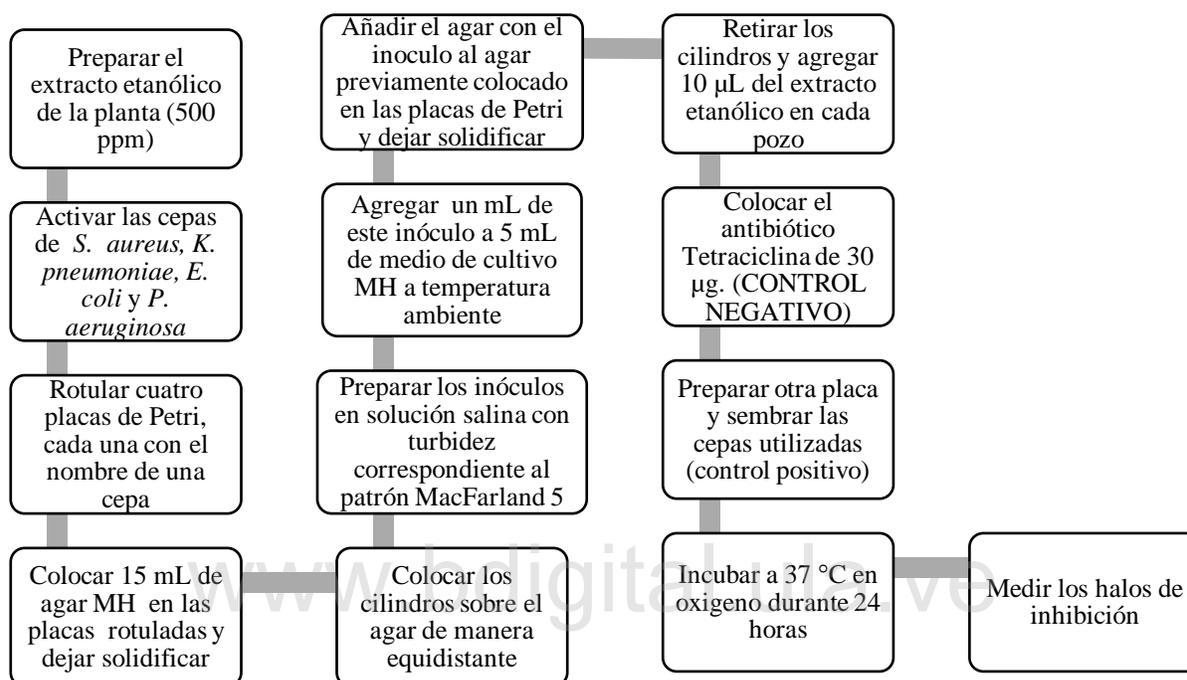
#### Técnica

Adicionar 2 gotas de hidróxido de amonio concentrado al extracto metanólico en tubo de ensayo. La prueba se considera positiva si se presenta una fluorescencia azul- violeta bajo luz UV.

### ***Evaluación de la actividad antibacteriana.***

La evaluación de la actividad antibacteriana se llevó a cabo en el Laboratorio de Vacunas, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA bajo la supervisión de la Dra. Vanessa Hernández.

En el *Esquema 2*, se muestra el procedimiento para realizar las pruebas de determinación actividad antibacteriana de los extractos de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.



*Esquema 2.* Procedimiento para realizar las pruebas de actividad antibacteriana de los extractos de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.

#### *Preparación de las muestras.*

Se preparó una dilución madre a una concentración de 500 ppm del extracto etanólico de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl utilizando como solvente el dimetilsulfóxido al 10% (DMSO), el cual sirvió también como control negativo.

#### *Microorganismos evaluados.*

Para la evaluación de la actividad antibacteriana mediante el método Kirby Bauer modificado, se estudiaron cuatro microorganismos (Tabla 4); una especie de bacteria

grampositiva y tres de gramnegativas de referencia internacional pertenecientes a la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), las cuales fueron:

Tabla 4

*Microorganismos evaluados*

<b>Microorganismo</b>	<b>ATCC</b>	<b>Tinción de Gram</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Positiva
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23357	Negativa
<i>Escherichia coli</i>	25922	Negativa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Negativa

La activación o enriquecimiento de las cepas bacterianas se realizó en medio agar nutritivo o agar infusión cerebro corazón (BHI), incubadas por 24 horas.

*Preparación de agar Müller-Hinton.*

Para la preparación del agar Müller-Hinton (MH) (*Figura 23*), se tomaron 13,3 g del polvo de agar y se disolvieron en 350 mL agua caliente purificada y se mezcló. Se llevó la solución al microondas hasta que se formó una espuma de más de un 1 cm de grosor, verificando que el agar estuviera transparente lo que indica que el agar se fundió completamente.

Se llenaron 15 tubos con 5 mL de agar MH y 15 tubos con 15 mL del mismo, se llevaron a autoclave por 15 minutos a 121 °C a 15 libras de presión para esterilizarlos.



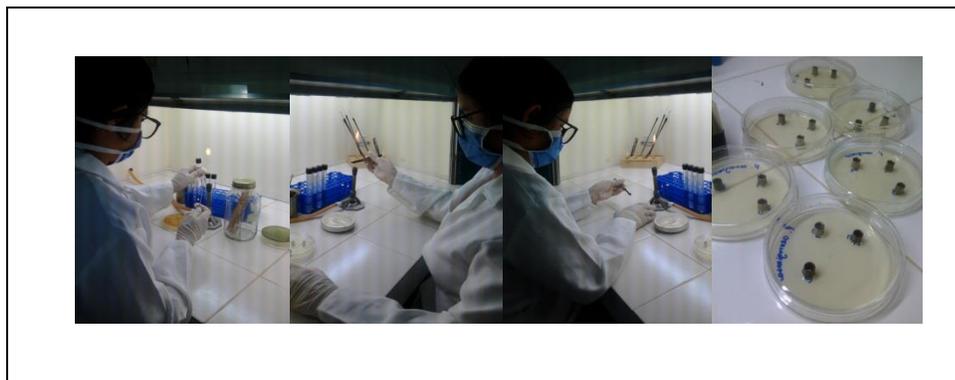
Figura 23. Preparación agar Müeller-Hinton

*Elaboración de los medios.*

1. Se rotularon las placas de petri con el nombre de cada cepa.
2. Los tubos que contenían 15 mL de agar MH se vertieron en cada placa y se dejó solidificar, luego se colocaron equidistantes 3 cilindros de 6 mm de diámetro sobre el agar en cada una de las placas.
3. Los inóculos se prepararon en solución salina estéril (0,85 % p/v NaCl), a partir de un cultivo fresco de cada cepa bacteriana en medio agar Nutriente o agar Infusión Cerebro Corazón (BHI), hasta que se logró una turbidez óptica correspondiente al patrón MacFarland N° 05 (D.O. 0,08 – 0,10 a 625 nm), con la ayuda de un espectrofotómetro, que equivale a  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL.
4. Una vez preparado el inóculo de cada bacteria, 1 mL de este inóculo fue añadido a 5 mL de medio de cultivo MH a temperatura ambiente. Estos 5 mL de medio con el inóculo fueron añadidos a los 15 mL del agar en las placas de Petri previamente solidificados, sin retirar los cilindros, y se dejaron a temperatura ambiente hasta que solidificaran.

5. Se retiraron los cilindros y se formaron en cada placa tres pozos, se colocaron 10  $\mu\text{L}$  del extracto etanólico en los pozos (pozo número 2 para el extracto de *J. secunda* Vahl) y para el control positivo se colocó el antibiótico de amplio espectro Tetraciclina de 30  $\mu\text{g}$  de la marca Sensi Disc TM de referencia 230998.
6. Se preparó una placa control del crecimiento de las cepas, se rotuló, se dividió en 4 y se sembraron las cepas utilizadas.
7. Se llevó a incubación a 37 °C en oxígeno durante 24 horas.
8. La sensibilidad se determinó por la medida del diámetro del halo de inhibición de crecimiento, donde los halos mayores o iguales a 14 mm se consideraron halos de inhibición significativos, de acuerdo con el protocolo establecido por el CLSI, 2011.

En la *Figura 24*, se muestra el procedimiento de elaboración de los medios y en la *Figura 25*, siembra del inóculo de los extractos e incubación.



*Figura 24.* Preparación del agar y montaje de los cilindros

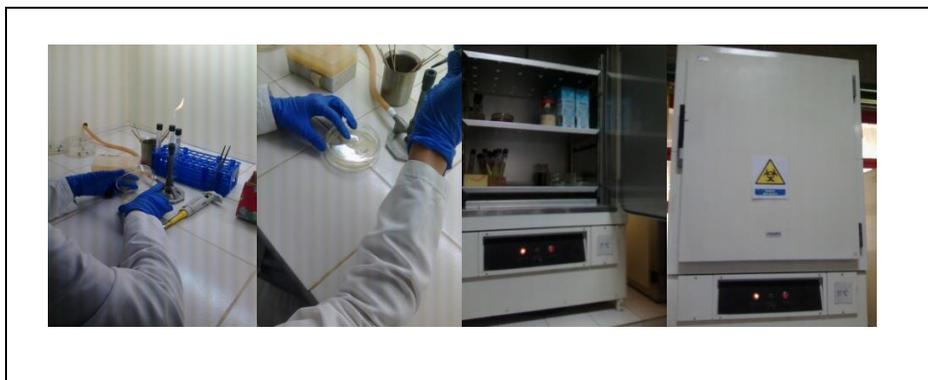
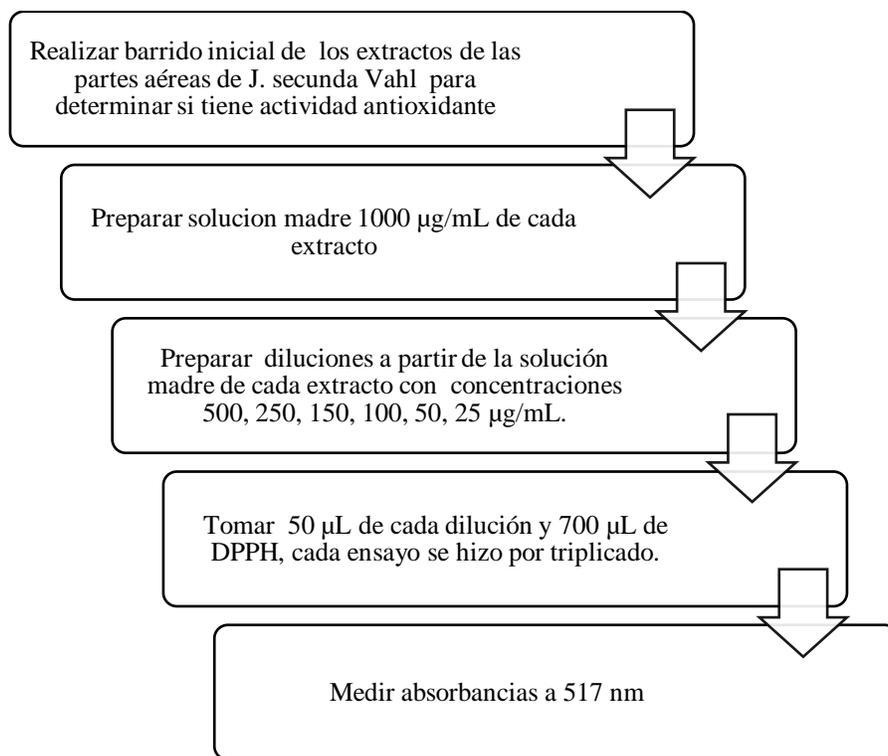


Figura 25. Siembra del inóculo, de los extractos e incubación

### ***Actividad Antioxidante.***

El ensayo para la determinación de actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl, se realizó en el Departamento de Ciencias de Los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo supervisión de la Dra. Marielba Morillo, utilizando el método DPPH.

En el *Esquema 3*, se muestra el procedimiento para realizar la prueba de actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.



Esquema 3. Procedimiento para la realización de la prueba de actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.

#### Procedimiento.

1. Se preparó una solución madre de cada uno de los extractos, tomando 4 mg de cada uno de los extractos en tubos eppendorf y se disolvieron en 1mL de metanol.
2. El ensayo se realizó por triplicado utilizando 3 tubos para cada uno de los extractos, los cuales contenían 700 µL de DPPH y 300 µL del mismo, se dejó en reposo en la oscuridad por 30 minutos.
3. Pasado los 30 minutos se procedió a medir la absorbancia en el espectrofotómetro Genesys 10 Bio Thermo Electron Corporation, a una longitud de onda de 517 nm.

4. Con cada uno de los extractos que presentaron actividad antioxidante en el barrido inicial, se preparó una solución madre de concentración de 1 µg/mL y a partir de la misma se prepararon varias diluciones y se procedió a determinar la actividad antioxidante (Tabla 5).
5. Se realizó una curva patrón con ácido ascórbico (Tabla 6), partiendo de una solución madre con una concentración de 1 mM (17,6 mg en 100 mL de metanol).

En las Tablas 5 y 6, se muestran las diferentes proporciones en mL de la solución madre y metanol para preparar las diferentes diluciones.

Tabla 5  
*Diluciones empleadas de las muestras*

	Concentración mg/mL					
	0,5	0,25	0,15	0,1	0,05	0,025
Madre (1 mg/mL)	0,5 mL	0,25 mL	0,15 mL	0,1 mL	0,05 mL	0,025mL
metanol	0,5 mL	0,75 mL	0,85 mL	0,9 mL	0,95 mL	0,975 mL

Tabla 6  
*Diluciones empleadas para realizar la curva patrón de ácido ascórbico*

	Concentración mg/mL			
	0,088	0,044	0,022	0,011
Madre (0,176 mg/mL)	0,5 mL	0,25 mL	0,125 mL	0,0625 mL
metanol	0,5 mL	0,75 mL	0,875 mL	0,9375 mL

En la *Figura 26*, se muestra la preparación de los extractos para la determinación de la actividad antioxidante.



*Figura 26.* Preparación de los extractos para actividad antioxidante

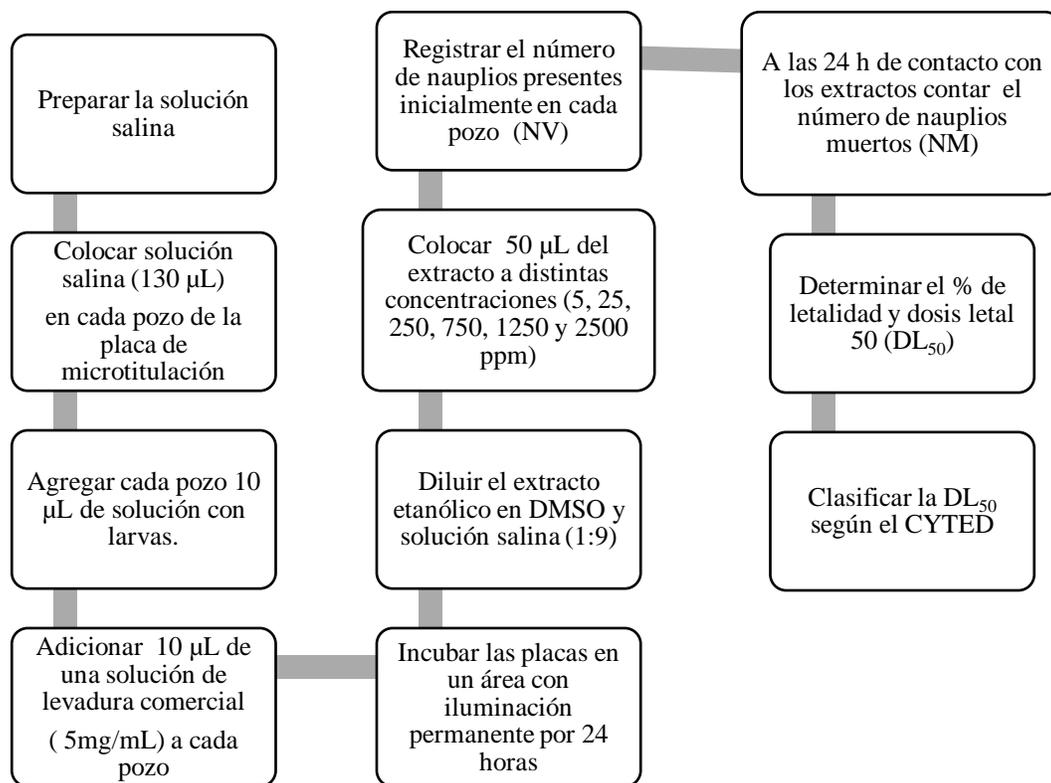
Finalmente, se determinó el % de inhibición y el IC50 en (mg/mL) de cada uno de los extractos.

#### *Estudio Estadístico.*

El estudio estadístico se realizó con el programa IBM SPSS Statistic editor de datos, versión 21 Los datos fueron estudiados estadísticamente utilizando el programa IBM SPSS Statistic editor de datos, versión 21.

#### *Toxicidad sobre Artemia salina.*

En el *Esquema 4*, se muestra el procedimiento para realizar la prueba de toxicidad del extracto polar de las partes aéreas de *J.secunda*. sobre *Artemia salina*.



Esquema 4. Procedimiento para realizar la prueba de toxicidad del extracto polar de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl sobre *Artemia salina*

La evaluación de toxicidad sobre nauplios (larvas) de *Artemia salina* del extracto etanólico de las partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl, se realizó en el Departamento de Ciencias de Los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo supervisión de la Dra. Marielba Morillo y el Dr. Tomas Visbal. Este método estándar se basó en la determinación de la concentración o dosis que causa la muerte al 50 % de una población de larvas de *Artemia salina* en 24 horas, esta dosis es conocida como dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>).

#### Reactivos.

Los reactivos utilizados para evaluar la toxicidad de los extractos frente a *Artemia* fueron: Cloruro de sodio (NaCl), sulfato de magnesio hexahidratado (MgSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O),

cloruro de magnesio hexahidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), cloruro de potasio (KCl), bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) y dodecil sulfato de Sodio, levadura comercial y quistes del crustáceo *Artemia salina*.

*Preparación de la solución marina.*

En el desarrollo del bioensayo, primero se preparó una solución marina de aproximadamente 1000 mL (agua de mar artificial) (Tabla 7), que proporcionó las condiciones necesarias para el desarrollo de los nauplios de *Artemia*. Esta solución se mantuvo en aireación constante (burbujeo) 72 horas previas al bioensayo, con la finalidad de oxigenar la misma (Plaza, 2015).

Tabla 7  
*Composición de la solución salina que simula el agua de mar*

Sales	g/L
Cloruro de Sodio (NaCl)	27,65
Sulfato de Magnesio hexahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	14,29
Cloruro de Magnesio hexahidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	5,18
Cloruro de Potasio (KCl)	0,697
Bicarbonato de Sodio ( $\text{NaHCO}_3$ )	0,143
Carbonato de Sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	0,035
Cloruro de Calcio ( $\text{CaCl}_2$ )	1,54
Agua destilada estéril	1000mL

*Eclosión de los quistes.*

Al finalizar el tiempo de aireación de la solución marina (72 horas), se dividió la solución en dos recipientes (Fiolas) con 500 mL aproximadamente en cada uno, en una de las fiolas, se añadió alrededor de 250 mg de quistes, manteniendo una temperatura constante de  $28 \pm 2$  °C por 48 h (tiempo necesario para su eclosión y así obtener los nauplios). La solución marina contenida en la otra fiola, se utilizó como diluyente para

preparar las diluciones del extracto etanólico y llenado de las placas (ambos recipientes se mantuvieron con aireación constante).

*Realización de la prueba.*

1. Se colocaron 130  $\mu\text{L}$  de solución salina (aireada) en cada pozo de una placa de microtitulación (*Figura 27*).
2. Se agregaron a cada pozo 10  $\mu\text{L}$  de solución con larvas, que contenían entre 10 y 15 larvas.
3. Se le adicionó 10  $\mu\text{L}$  de una solución de levadura comercial (5mg/mL) a cada pozo.
4. Se incubaron las placas en un área con iluminación permanente por 24 horas, para excitar su actividad metabólica.
5. Se colocaron 50  $\mu\text{L}$  del extracto etanólico, a distintas concentraciones (5, 25, 250, 750, 1250 y 2500 ppm). El extracto se diluyó en DMSO y solución salina (1:9). Se incluyó, además, un grupo control negativo (con todos los elementos del ensayo, excepto la muestra a ensayar) y un grupo control positivo (Dodecil sulfato de sodio, DDSS 10 %) con seis réplicas para cada grupo.
6. Se registraron el número de nauplios presentes inicialmente en cada pozo (NV), y al cabo de 24 h de contacto con los extractos se realizó el conteo del número de nauplios muertos (NM).
7. Se calculó el porcentaje de letalidad mediante la ecuación (Sánchez y Neira, 2005).

$$\% \text{ de letalidad} = \frac{NM}{NV} \times 100$$

NM= Número de muertos    NV= Número de vivos

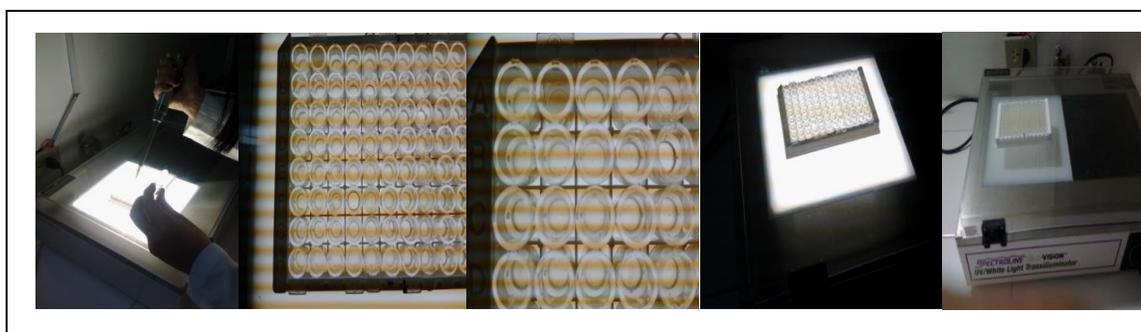
8. Se determinó la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) con un intervalo de confianza del 95 %, utilizando para este fin el método de análisis Probit, utilizando el programa estadístico SPSS, 15.0 para Windows.

Se clasificaron la DL<sub>50</sub> de los extractos evaluados según la toxicidad, tomando como referencia las recomendaciones el Programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el desarrollo (CYTED) (Tabla 8), (Sánchez y Neira, 2005)-

Tabla 8  
*Clasificación de toxicidad según el CYTED.*

Concentración DL <sub>50</sub>	Categoría
1-10	Extremadamente tóxico
10-100	Altamente tóxico
100-500	Moderadamente tóxico
500-1000	Ligeramente tóxico
1000-1500	Prácticamente no tóxico
> 1500	Relativamente inocuo

En la *Figura 27*, se muestra el procedimiento para la realización de la prueba de toxicidad en *A. salina*.



*Figura 27. Montaje prueba de toxicidad en Artemia salina*

### **Estudio Estadístico.**

El estudio estadístico se realizó con el programa IBM SPSS Statistic editor de datos, versión 21 Los datos fueron estudiados estadísticamente a través de análisis de regresión PROBIT.

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

## Capítulo IV

### Resultados y discusión

#### Estudio fitoquímico de los extractos de la partes aéreas de *J. secunda* Vahl.

En la Tabla 9, se presentan los resultados del estudio fitoquímico de los extractos hexanóico, diclorometanoico y etanólico de la parte aéreas de *J. secunda* Vahl.

El análisis fitoquímico preliminar arrojó la presencia en el extracto etanólico de alcaloides, esterolees y compuestos fenólicos; en el diclorometanoico esterolees y compuestos fenólicos y en el hexanóico de esterolees (*Figura 28*).

Tabla 9  
*Estudio fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de J. secunda Vahl.*

Metabolitos secundarios	Prueba	Extractos		
		Hexanoico	Diclorometanoico	Etanólico
Alcaloides	Dragendorf			+++
	Wagner			+++
	Mayer			+++
Esteroles	Liebermann-Bucher	++	+++	+
Terpenos	Liebermann-Bucher	-	-	-
Compuestos fenólicos	FeCl <sub>3</sub>	-	+	+++
Flavonoides	Shinoda	-	-	-
Saponinas	Prueba de la espuma	-	-	-
Taninos	Prueba de la gelatina			-
Cumarinas y Quinonas	Prueba NH <sub>4</sub> OH	-	-	-

+++ Muy abundante, ++ abundante, + presente en poca concentración

			
Alcaloides	Compuestos fenolicos	Esteroles y terpenos	Flavonoides
			
Saponinas	Taninos	Cumarinas y quinonas	

Figura 28. Resultado del estudio fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl

Los resultados obtenidos en el estudio fitoquímico son similares a los reportados por Zambano y Bustamante (2017), Akibou y col. (2014) y Koffi y col. (2013), sin embargo difieren en varios compuestos determinados en estos estudios como son: taninos, quinonas, saponinas y flavonoides, que están ausentes en nuestro estudio. Esto podría deberse al hecho de que en el caso de los estudios de Akibou y col. y Koffi y col., la planta fue recolectada en el continente africano donde hay características ambientales, como luz, temperatura y precipitaciones, diferentes a las de Venezuela que pueden influir en la producción de metabolitos secundarios (Acosta, 2003).

La luz es posiblemente el factor de mayor significación, ya que favorece el crecimiento de los tejidos jóvenes etapa en la cual se sustenta la teoría ocurre la acumulación de los principios activos. La temperatura también juega un papel importante en la producción de metabolitos secundarios, influye en el crecimiento acelerado y en el equilibrio entre el proceso de fotosíntesis y respiratorio y por consiguiente en la producción de los principios activos, con relación a las precipitaciones, la misma juega un rol fundamental al modificar los efectos ecológicos de otros factores, por ejemplo, regulador de las temperaturas (Acosta, 2003).

En este sentido, la disponibilidad de agua contribuye a la producción de taninos condensados; al encontrarse en periodo de escasez de agua, las plantas cierran sus estomas y restringen el proceso de fotosíntesis. De este modo se esperaría una relación negativa entre el estrés hídrico y la producción de compuestos fenólicos (Varón y Granados, 2012).

Por otro lado, Valares (2011) afirma que las características de la planta como el contenido de agua, proteínas y metabolitos secundarios generalmente cambian durante la estación de crecimiento y estado de desarrollo de un órgano. Las hojas jóvenes secretan mayor cantidad de flavonoides y diterpenos que los tallos y estos a su vez más que las hojas maduras. Los flavonoides son los compuestos más abundantes, y presentan diferencias significativas entre hojas jóvenes, maduras y tallos. Por tanto, la edad de la planta es otro aspecto que pudo haber influido en que algunos metabolitos no hayan sido aislados como en trabajos previos.

Otro aspecto inherente a la planta y que incide en el contenido metabolitos secundarios, es la parte de la planta utilizada. Se ha demostrado que las partes de la planta presentan distintas productividades de metabolitos secundarios, y que se acumulan cantidades de metabolitos diferentes de acuerdo con la parte de la planta a la cual corresponde tal acumulación (Varón y Granados, 2012). También, algunas investigaciones, han demostrado que la altura de la planta puede afectar la producción y acumulación de compuestos fenólicos y flavonoides (Cabrera y col, 2017).

**Actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de las partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl.**

En la Tabla 10, se muestran los resultados de actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de las partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl.

Tabla 10

*Potencial antibacteriano de los extractos etanolicos de las partes aéreas de Justicia secunda Vahl a la concentración de 500 ppm.*

<i>Bacteria</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Extracto etanólico	Halo de inhibición			
	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

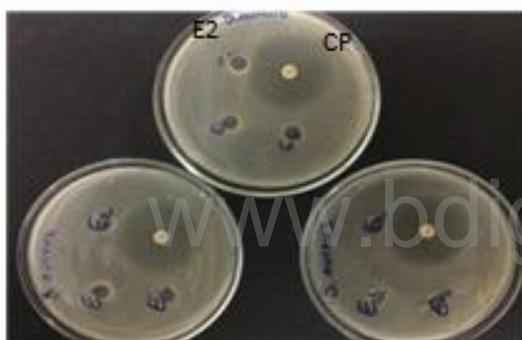
Los resultados obtenidos en la actividad antibacteriana, se muestran en la *Figura 29*, donde se pueden observar ausencia del halo de inhibición frente a bacterias ATCC.

Control de crecimiento de las cepas bacterianas



Pozo sembrado: E2. El extracto etanólico de *J. secunda* Vahl no presentó halo de inhibición.

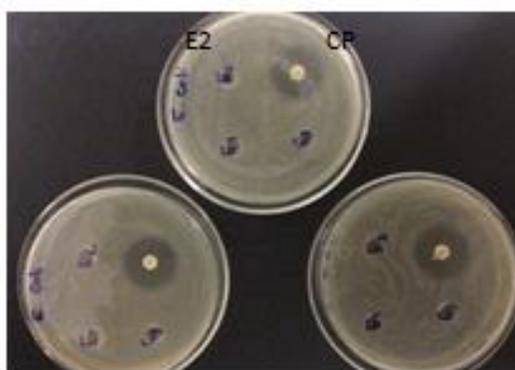
Control positivo (CP, tetraciclina): Presentó halo de inhibición.



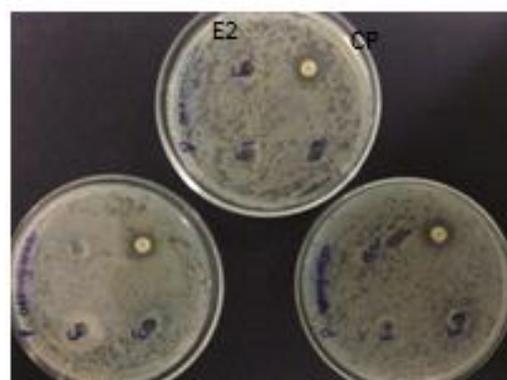
*Staphylococcus aureus* ATCC 25923



*Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357



*Escherichia coli* ATCC 25922



*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Figura 29. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las partes aereas de *J. secunda* Vahl.

Estos resultados coinciden con los reportados por Carrington y col. (2012), quienes afirmaron que los extractos etanólicos de *J. secunda* Vahl no presentaron actividad antibacteriana frente *S. aureus* ATCC 25923 y *P. aeruginosa* ATCC 278503, dichos autores utilizaron el método de Kirby-Bauer modificado.

Sin embargo, la presente investigación difiere de los resultados presentados por Rojas y col. (2006), donde reportaron alta actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *J. secunda* Vahl, contra *E. coli* y *P. aeruginosa*. Esto podría deberse al sitio de recolección de la planta debido a que el estudio de Rojas y col. utilizaron tanto plantas de los Andes colombianos como plantas de la zona del pacífico, en nuestro caso solo se utilizaron plantas recolectadas en Mérida, Venezuela (Andes venezolanos).

Como se mencionó anteriormente, diversos factores ambientales como luz, temperatura y precipitaciones, así como la edad de la planta y la parte de la planta utilizada pueden interferir en la producción de metabolitos secundarios. La reducción en la producción y concentración de estos metabolitos podría a su vez afectar la actividad antibacteriana, ya que los efectos antibacterianos están relacionados con la biosíntesis de compuestos biológicamente activos como fenoles, flavonoides y alcaloides (Azüero, Jaramillo, San Martín y D'Armas, 2016).

## Actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.

### *Determinación de actividad antioxidante por el método DPPH.*

La actividad antioxidante fue determinada por el método DPPH, previamente se realizó un barrido a los extractos con el fin de conocer si estas poseían potencial antioxidante. Los resultados del barrido preliminar se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11

*Barrido actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de Justicia secunda Vahl a 517 nm*

Extracto	Absorbancias			%I
	$\lambda_1$	$\lambda_2$	$\lambda_3$	
Hexanoico	0,163	0,153	0,163	70,4
Diclorometanóico	0,185	0,184	0,185	65,9
Etanólico	0,106	0,107	0,107	80,1
DPPH	0,537	0,537	0,537	-

*Cálculos del porcentaje de inhibición:*

*Extractos diclorometanoicos*

$$\%I = \frac{0,537 - 0,183}{0,537} \times 100\% = 65,9\%$$

*Extractos etanólicos*

$$\%I = \frac{0,537 - 0,107}{0,537} \times 100\% = 80,1\%$$

*Extractos hexanoicos*

$$\%I = \frac{0,537 - 0,159}{0,537} \times 100\% = 70,4\%$$

Se determinó la actividad antioxidante en los tres extractos debido a que el barrido mostró que en todos los casos los porcentajes (%) de inhibición, estuvieron por encima del 50 %.

***Actividad antioxidante extracto etanólico de las partes aéreas de J. secunda Vahl.***

En la Tabla 12 se muestran los resultados de la actividad antioxidante del extracto etanolico de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.

Tabla 12  
*Actividad antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de J. secunda Vahl.*

<b>Concentración (mg/mL)</b>	<b>% Inhibición</b>
0,75	53,0 ± 0,1
0,5	40,4 ± 0,1
0,25	28,2 ± 0,1
0,2	25,8 ± 0,2
0,1	20,0 ± 0,1
0,05	16,1 ± 0,2

Existe diferencias estadísticamente significativas entre datos ( $p < 0,05$ ) con un nivel de confianza de 95,0 %.

Se pudo observar y comprobar que la capacidad antioxidante del extracto etanólico es alta ya que a su máxima concentración de dilución el porcentaje de inhibición fue de  $53.0 \pm 0.1$  %, en comparación de 94,6 % del ácido ascórbico utilizado como control positivo (*Grafico 1*).

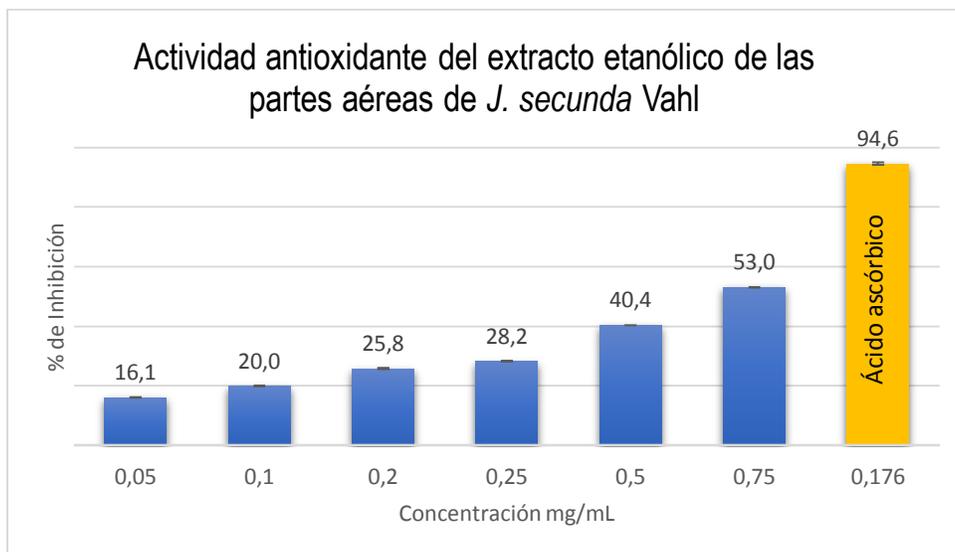


Gráfico 1. Actividad antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.

El estudio estadístico se muestra en la Tabla 13, y se completó con un análisis ANOVA de una sola vía (Tabla 14).

Tabla 13

*Datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto etanólico de *J. secunda* Vahl (% de inhibición) a través del método DPPH.*

	Estadísticos		
		mg/mL	%
N	Válidos	6	6
	Perdidos	0	0
Media		0,3083	30,5833
Error típico. de la media		0,10910	5,62497
Mediana		0,2250	27,0000
Moda		0,05 <sup>a</sup>	16,10 <sup>a</sup>
Desv. típ.		0,26724	13,77830
Varianza		0,071	189,842
Rango		0,70	36,90
Mínimo		0,05	16,10
Máximo		0,75	53,00

a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.

Tabla 14

*Análisis de varianza de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las partes aéreas de J. secunda Vahl (% de inhibición) a través del método DPPH.*

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	946,667	1	946,667	1489,801	0,000
Residual	2,542	4	0,635		
Total	949,208	5			

La variable independiente es concentración (mg/mL).

***Actividad antioxidante del extracto hexanoico de J. secunda Vahl.***

En la Tabla 15 se muestran los resultados de la actividad antioxidante del extracto hexanoico de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.

Tabla 15

*Actividad antioxidante del extracto hexanoico de las partes aéreas de J. secunda Vahl.*

Concentración (mg/mL)	% Inhibición
0,5	38,7 ± 0,2
0,15	37,3 ± 0,6
0,1	36,5 ± 0,3
0,05	35,8 ± 0,5

No Existe diferencias estadísticamente significativas entre datos ( $p > 0,05$ ) con un nivel de confianza de 95.0 %.

Según los resultados, se puede observar que la capacidad antioxidante del extracto hexanoico es moderada ya que a su máxima concentración de dilución el porcentaje de inhibición fue de  $38,7 \pm 0.2$  %, en comparación de 94,6 % del ácido ascórbico utilizado como control positivo (*Grafico 2*).

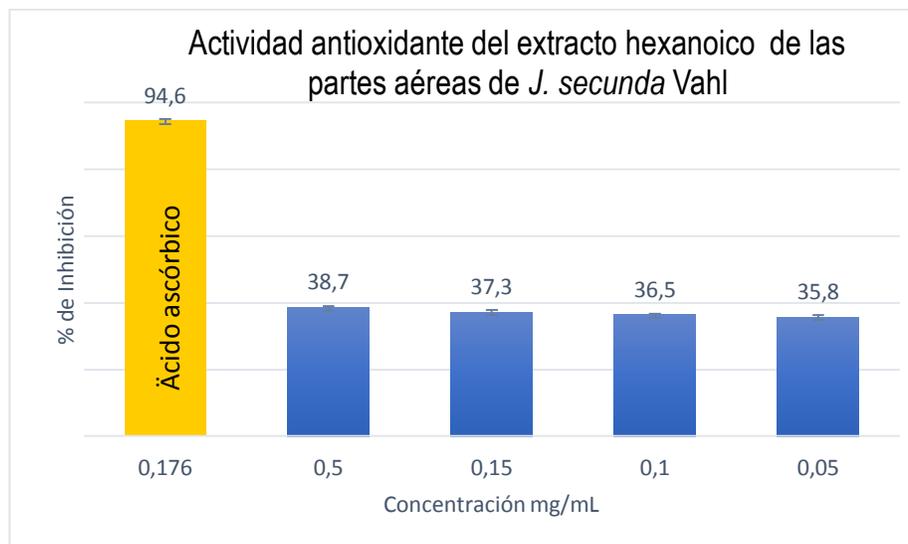


Gráfico 2. Actividad antioxidante del extracto hexanoico de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.

El estudio estadístico se muestra en la Tabla 16, se completó con un análisis ANOVA de una sola vía (Tabla 17).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 16

*Datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto hexanoico de J. secunda Vahl (% de inhibición) a través del método DPPH.*

		Estadísticos	
		mg/mL	%
N	Válidos	5	5
	Perdidos	0	0
Media		0,1952	48,5800
Error típ. de la media		0,07920	11,51509
Mediana		0,1500	37,3000
Moda		0,05 <sup>a</sup>	35,80 <sup>a</sup>
Desv. típ.		0,17710	25,74853
Varianza		0,031	662,987
Rango		0,45	58,80
Mínimo		0,05	35,80
Máximo		0,50	94,60

a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.

Tabla 17

*Análisis de varianza de la actividad antioxidante del extracto hexanoico de las partes aéreas de J. secunda Vahl (% de inhibición) a través del método DPPH.*

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	1,148	1	1,148	,001	,974
Residual	2650,800	3	883,600		
Total	2651,948	4			

La variable independiente es Concentración (mg/mL).

### ***Actividad antioxidante extracto diclorometanoico de J. secunda Vahl.***

En la Tabla 18 se muestran los resultados de la actividad antioxidante del extracto diclorometanoico de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.

Tabla 18

*Actividad antioxidante del extracto diclorometanoico de las partes aéreas de J. secunda Vahl.*

Concentración (mg/mL)	% Inhibición
0,05	12,3 ± 0,2
0,1	14,9 ± 0,2
0,2	18,2 ± 0,1
0,5	22,0 ± 0,5
0,75	27,7 ± 0,3

Existe diferencias estadísticamente significativas entre datos ( $p < 0,05$ ) con un nivel de confianza de 95.0 %.

Se pudo observar que la capacidad antioxidante del extracto diclorometanoico es moderada ya que a su máxima concentración de dilución el porcentaje de inhibición fue de  $27,7 \pm 0,3$  %, en comparación de 94,6 % del ácido ascórbico utilizado como control positivo (*Grafico 3*).

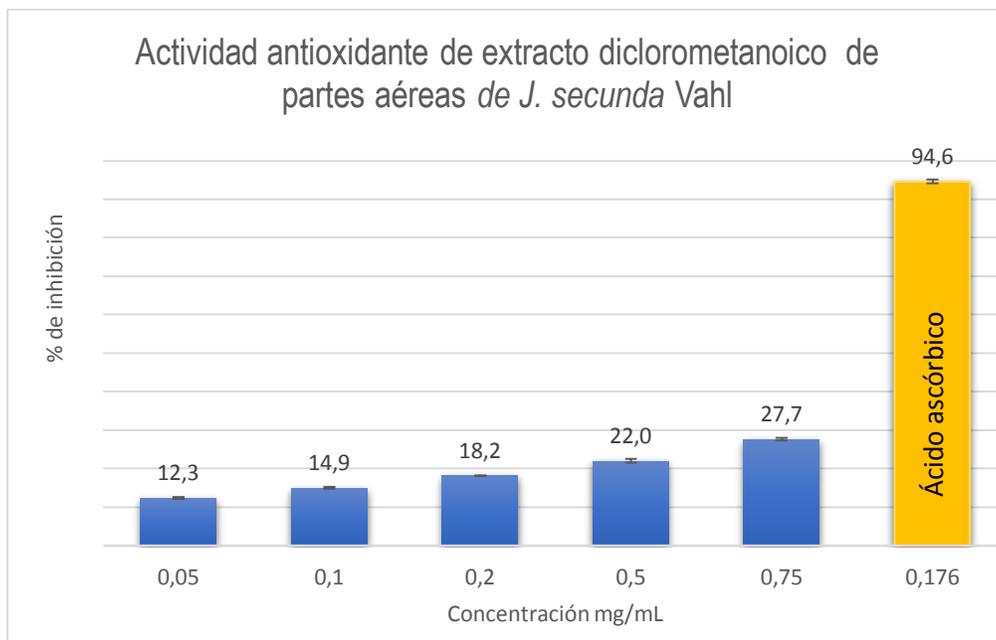


Gráfico 3. Actividad antioxidante del extracto diclorometanoico de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl

El estudio estadístico se muestra en la Tabla 19, y se completó con un análisis ANOVA de una sola vía (Tabla 20).

Tabla 19

*Datos estadísticos de la actividad antioxidante del extracto diclorometanoico de J. secunda Vahl (% de inhibición) a través del método DPPH.*

Estadísticos			
		mg/mL	%
N	Válidos	5	5
	Perdidos	0	0
Media		0,3200	19,0200
Error típ. de la media		0,13285	2,71135
Mediana		0,2000	18,2000
Moda		0,05 <sup>a</sup>	12,30 <sup>a</sup>
Desv. típ.		0,29707	6,06276
Varianza		0,088	36,757
Rango		0,70	15,40
Mínimo		0,05	12,30
Máximo		0,75	27,70

a. Existen varias modas. Se mostrará el menor de los valores.

Tabla 20

*Análisis de varianza de la actividad antioxidante del extracto diclorometanoico de las partes aéreas de J. secunda Vahl (% de inhibición) a través del método DPPH.*

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	142,322	1	142,322	90,732	0,002
Residual	4,706	3	1,569		
Total	147,028	4			

La variable independiente es mg/mL.

En la Tabla 21 se muestra la comparación de la actividad antioxidante de los tres extractos de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.

Tabla 21

*Comparación de la actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de J. secunda Vahl.*

	Concentración (mg/mL)	% I
Ácido ascórbico	0,176	94,6
Extracto etanólico	0,75	53,0
Extracto hexanoico	0,5	38,7
Extracto diclorometanoico	0,75	27,7

En base a los resultados obtenidos, se puede inferir que los extractos etanólicos de las partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl son los que presentan mayor actividad antioxidante de los tres extractos, con un porcentaje de inhibición por encima del 50 %, de igual manera los extractos hexanoico y diclorometanoico presentan una actividad antioxidante moderada si se comparan con el ácido ascórbico. Los resultados de este estudio coinciden con los resultados reportados por Onoja y col. (2016), donde se mostró que los extractos de *Justicia secunda* Vahl tienen alto potencial antioxidante.

Según Kuskoski y col. (2005), muchos trabajos relacionan la capacidad antioxidante con el contenido de compuestos fenólicos, cada componente fenólico puede contribuir de forma y proporción diferente. Además, es necesario considerar que dicha correlación no solo depende de la concentración y la calidad antioxidante, sino también de su interacción con otros componentes y la metodología aplicada.

La alta actividad antioxidante mostrada por los extractos de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl, coinciden con los metabolitos reportados en el estudio fitoquímico de los extractos como fueron los compuestos fenólicos, que son sustancias conocidas por su alta actividad antioxidante. Se ha mostrado que existe una correlación lineal positiva entre el contenido fenólico y la capacidad antioxidante de distintas hierbas culinarias y medicinales (Paladino, 2008). Esto se puede corroborar en nuestro trabajo ya que el extracto etanólico que presentó mayor concentración de compuestos fenólicos fue el que mostró mayor actividad antioxidante.

En el Grafico 4, se muestra la Comparación de la actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.

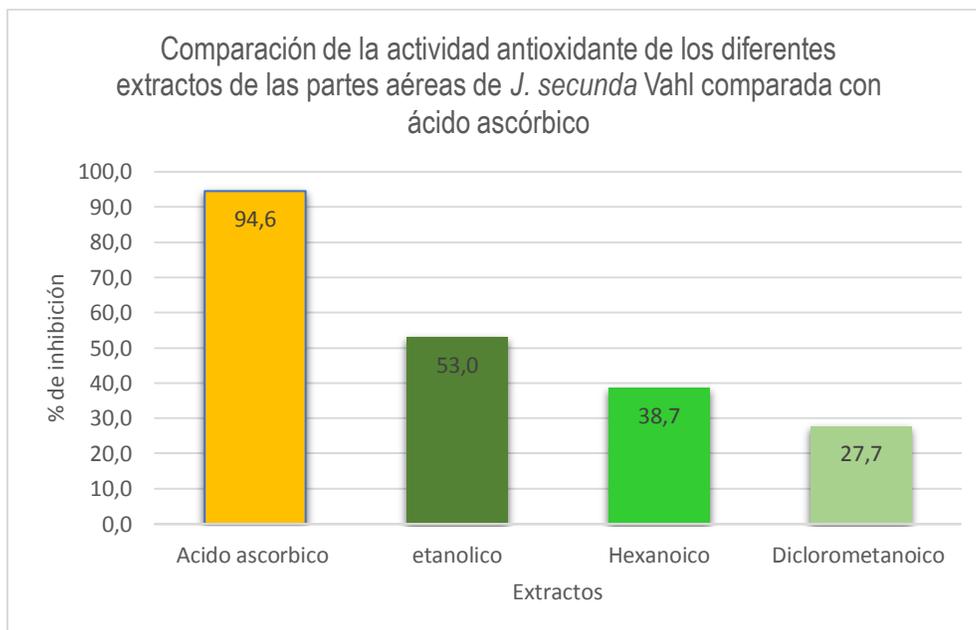


Grafico 4. Comparación de la actividad antioxidante de los extractos de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.

### Concentración eficiente 50 (mg/mL) de los extractos de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.

En la Tabla 22 se presenta la concentración eficiente de cada uno de los extractos de *J. secunda* Vahl y en el Gráfico 5, se observa una comparación entre la concentración eficiente de cada extracto. La concentración eficiente más baja la del extracto etanólico, seguida del hexanoico y diclorometanoico respectivamente.

Tabla 22  
Comparación de la concentración eficiente 50 (mg/mL) de los extractos de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.

Extracto	IC <sub>50</sub> PROM (mg/mL)
Etanólico	0,69 ± 0,01
Hexanoico	1,17 ± 0,07
Diclorometanoico	1,84 ± 0,05

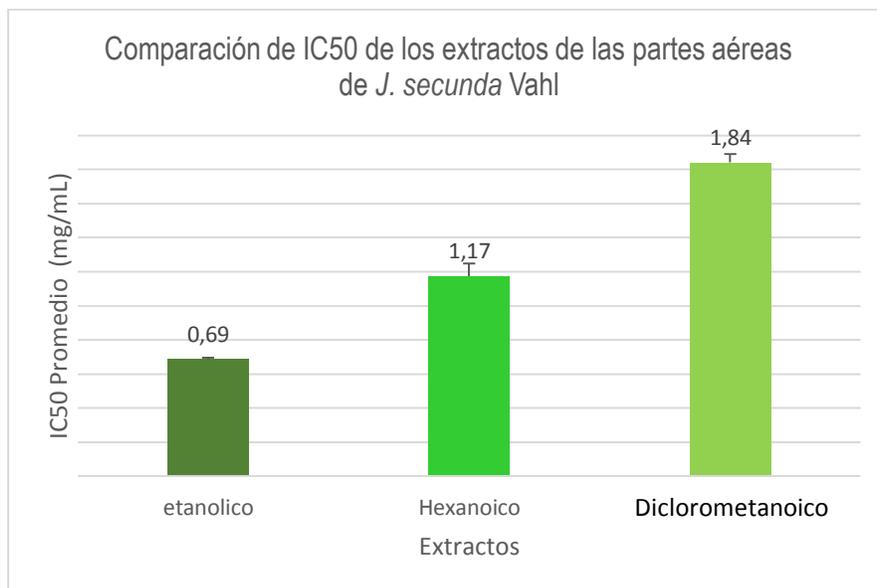


Gráfico 5. Comparación de la concentración eficiente 50 (mg/mL) de los extractos de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl.

Según el estudio de Echavarría, Franco y Martínez (2009), las especies vegetales que presentan valores de  $IC_{50}$  similares entre sí, tienen una capacidad análoga de capturar el radical DPPH, además esta capacidad se corresponde a una mayor concentración de fenoles totales. Es decir los extractos con mayor contenido fenólico son los de mayor actividad inhibidora del radical DPPH.

Del mismo modo, otros estudios confirman que existe una relación inversamente proporcional, entre la  $IC_{50}$  y la actividad antioxidante, a menor valor del  $IC_{50}$  mayor actividad anti radical. Mediante las pruebas químicas de caracterización, se ha detectó la presencia de flavonoides, taninos, triterpenos, alcaloides y saponinas en plantas con  $IC_{50}$  bajo y en algunas especies también se ha reportado, polifenoles, glucósidos cianogénicos, lactonas, cumarinas, esteroides y antraquinonas (Benitez y col., 2016).

**Toxicidad del extracto etanólico de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl sobre *Artemia salina*.**

En la Tabla 23, se muestran los resultados del bioensayo de letalidad en *Artemia salina*, aplicado al extracto etanólico de las partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl y los controles.

Tabla 23  
Cuantificación de la DL50 de los extractos etanólicos de las partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl y los controles sobre *Artemia salina*.

Extractos	DL (ppm)	Límite de confianza (95%) ppm		Categoría según el CYTED
		Límite inferior	Límite superior	
Partes aéreas	1767,011	919,319	3781,910	Relativamente inocuo
DMSO	-	-	-	Inocuo
DDSS	23,372	33,507	28,026	Altamente tóxico

DL50: Dosis letal 50; signo (-) valores muy altos; DMSO: Dimetilsulfoxido DDSS: Dodecil sulfato de sodio.

En el Gráfico 6, se muestran los porcentajes de letalidad del extracto etanólico de las partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl sobre *Artemia salina*.

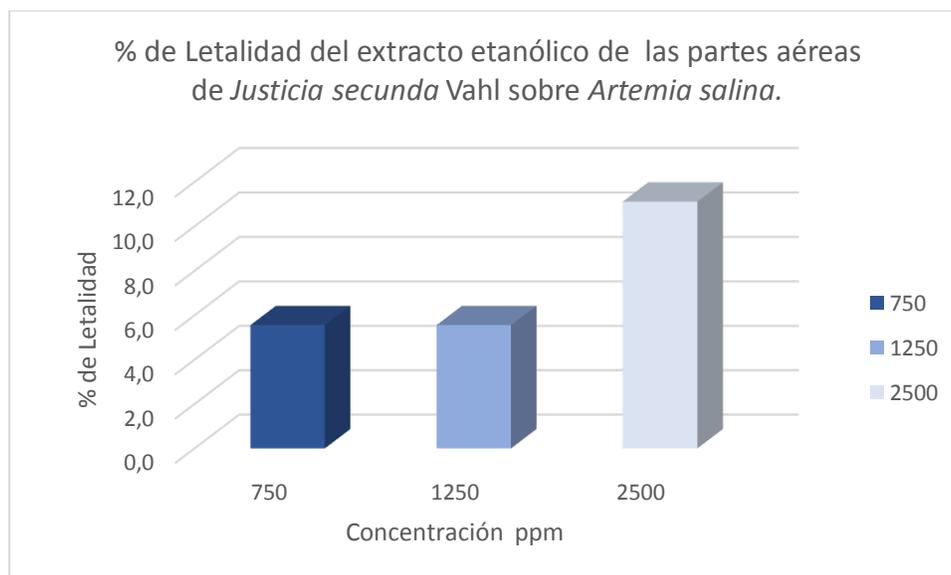


Gráfico 6. Porcentaje (%) de letalidad del extracto etanólico de las partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl sobre *Artemia salina* a las concentraciones probadas en unidades de ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ).

El resultado de la toxicidad del extracto etanólico de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl sobre *Artemia salina* de la presente investigación coinciden con los resultados de Cantillo y col. (2007), quienes reportaron que los extractos metanólicos, diclorometanoicos y acuosos mostraron baja toxicidad.

Según Sanabria, López y Gualdrón (1997), la presencia de algunos metabolitos secundarios en los extractos de las plantas se relaciona directamente con la letalidad sobre las larvas de *A. salina* de dichos extractos, estos metabolitos son los taninos, las saponinas, las cumarinas y especialmente los alcaloides y las lactonas terpenicas. Los autores destacan que la letalidad sobre *A. salina* depende además de la concentración de la sustancia, de otros metabolitos que no fueron estudiados por ellos y de la interacción entre los mismos.

Esta afirmación podría explicar el hecho de la baja toxicidad mostrada por el extracto etanólico de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl ya que en nuestro estudio, estuvieron ausentes los metabolitos secundarios taninos, saponinas, cumarinas y lactonas terpénicas.

## Capítulo V

### Conclusiones

- En el extracto hexanólico de las partes aéreas de *Justicia secunda* Vahl se comprobó presencia de esteroides; en el extracto diclorometanoico esteroides y compuestos fenólicos y el extracto etanólico presentó los siguientes compuestos: alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos.

- El extracto etanólico no presentó halo de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ni frente a *Pseudomonas aeruginosa*.

- El extracto etanólico presentó un porcentaje (%) de inhibición del radical DPPH, igual a 53,0 %, el extracto hexanoico 38,7 % y el extracto diclorometanoico de 27,7 % y la  $IC_{50}$  del extracto etanólico fue de 0,69 mg/mL, la del extracto hexanoico 1,17 mg/mL y la del extracto diclorometanoico 1,84 mg/mL.

- El extracto etanólico de las partes aéreas de *J. secunda* Vahl, resultó ser relativamente inocuo sobre *Artemia salina*.

## Recomendaciones

- Estudiar los extractos hexanoico y diclorometanoico de las artes aéreas de *J. secunda* Vahl por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, para conocer su composición química.

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

## Referencias bibliográficas

- Acosta, L. (2003). Principios agroclimáticos básicos para la producción de plantas medicinales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 1. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962003000100008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962003000100008).
- Acosta, S. (2007). Especie nueva de *Justicia* (Acanthaceae) del bosque tropical caducifolio de la costa de Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78, 11-14.
- Ahumada, A., Ortega, A., Chito, D., y Benítez, R. (2016). *Saponinas de quinua (Chenopodium quinoa Willd.): un subproducto con alto potencial biológico*. *Revista Colombiana de Ciencias Químicas Farmacológicas*, 45(3), 438-469.
- Akibou, M., Agbangnan, D., Bossou, A., Koudoro, Y., Noudogbessi, J., Avlessi, F., y Sohounhloue, D. (2014) Chemical characterization and biological activities of extracts of three plants used in traditional medicine in benin: *Tectona grandis*, *Uvaria chameae* and *Justicia secunda* Vahl. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 7(5), 23-27. Recuperado de: <https://www.researchgate.net/publication/267750328>.
- Albornoz, A. (1980). *Productos Naturales: Estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Caracas, Venezuela: Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela.
- Arias, F. (2012). *El proyecto de la investigación. Introducción a la metodología científica* (6ta edición). Caracas, Venezuela: Editorial Episteme.
- Ávalos, A., y Pérez-Urria, E. (2009) Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*. 2 (3),119-145.
- Azuero, A., Jaramillo, C., San Martín, D., y D'Armas, H. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. *Revista Ciencia UNEMI*. 9 (20), 11 - 18.
- Barata, S., y Debenedetti, S. (2007). Identificación de cumarinas en especies autóctonas del género *Pterocaulon* ell. Buenos Aires, Argentina: Universidad de Belgrano. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/273692784\\_Identificacion\\_de\\_cumarinas\\_en\\_especies\\_autoctonas\\_del\\_genero\\_Pterocaulon\\_Ell](https://www.researchgate.net/publication/273692784_Identificacion_de_cumarinas_en_especies_autoctonas_del_genero_Pterocaulon_Ell).
- Bello, J. (2005). *Calidad de vida, alimentos y salud humana: Fundamentos científicos*. Madrid, España: Ediciones Díaz Santos.
- Benítez, R., Echavarría, H., D'Armas, R., Nubia, L., Matute, L., Jaramillo, C., y Rojas, L. (2016). Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales. *Revista Ciencia UNEMI*. 9 (20), 29-35. Recuperado de: <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/344>
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica-Plantas medicinales*. Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Cabrera, J., Jaramillo, C., Dután, F., Cun, J., García, P., y Rojas, L. (2017). Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam. en función de su edad y altura. *Bioagro*. 29(1), 53-60.
- Cabrero, I. (2005). *Las plantas y sus usos en las islas de Providencia y Santa Catalina*. Cali, Colombia: Programa editorial Universidad del Valle.
- Cantillo, J., Güette, J., Baldiris, R., Jaramillo, B., y Olivero, J. (2007). Evaluación de la toxicidad aguda frente a *Artemia franciscana* y la actividad hemolítica de los extractos acuosos, en diclorometano y metanólico parcial de *Justicia secunda* Vahl (Val.). *Scientia et Technica*, 1(33), 257-258. Recuperado de: <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/6093>.

- Carranco, M., Calvo, M., y Pérez, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 61(3), 233-241. Recuperado de: [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-06222011000300001](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222011000300001)
- Carrington, S., Cohall, D., Gossell-Williams, M., y Lindo, F. (2012). The Antimicrobial Screening of a Barbadian Medicinal Plant with Indications for Use in the Treatment of Diabetic Wound Infections. *West Indian Med*, 61 (9), 861. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24020224>
- Castañeda, B., Llica, E., y Vásquez, L. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas peruanas. *Horizonte Médico*, 8 (1), 56-72. Recuperado de: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2012000200006](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2012000200006)
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2011). *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline-Third Edition*. Wayne, PA: CLSI.
- Contreras, B., Días, L., Celis, M., Rojas, J., Méndez, L., Rosenzweig, P. y Ontiveros, J. (2017). Actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de Pimenta racemosa var. racemosa (Mill.) J.W. Moore (Myrtaceae) de Táchira – Venezuela. *Ciencia Ingeniería*, 38 (3), 1-5. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/5075/507555085003/html/index.html>
- Corrêa, G., y Alcântara, A. (2011). Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia* - a review. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22 (1), 220-238. Recuperado de: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2012000100031](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2012000100031).
- Cubero, N., Monferrer, A., y Villalba, J. (2002). *Aditivos alimentarios*. Madrid, España: Mundi Prensa Libros, S.A.
- Domínguez, X. (1973). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Mexico, D.F: Editorial Limusa, S.A.
- Durkee, L. (1978). Acanthaceae en flora de Panamá. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 65 (1), 155-283. Recuperado de <http://www.jstor.org/stable/2395356>
- Echavarría B., Franco A., y Martínez A. (2009). Evaluación de la actividad antioxidante y determinación del contenido de compuestos fenólicos en extractos de macroalgas del Caribe colombiano. *Vitae*. 16 (1), 126-131. Recuperado de: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0121-40042009000100015](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0121-40042009000100015)
- Escamilla, C. Cuevas, E., y Guevara, J. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Revista Facultad Médica UNAM*, 52(2), 73-75. Recuperado de: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no52-2/RFM052000207.pdf>
- Ezcurra, C. (1999). Acanthaceae. *Aportes Botánicos de Salta – Ser Flora. Herbario MCNS. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta*. 6 (4), 13-15. Recuperado de: <http://eprints.natura.unsa.edu.ar/363/1/ACANTHACEAE.pdf>.
- Estrada, R., Ubaldo, D., y Araujo, A. (2012). Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud Mental* 35 (5), 375-384. Recuperado de: <http://www.scielo.org.mx/pdf/sm/v35n5/v35n5a4.pdf>
- Fernández, M., Villaño, D., Troncoso, A., y García, M. (2006). Revisión de los métodos de evaluación de la actividad antioxidante in vitro del vino y valoración de sus efectos in vivo. *ALAN*. 56 (2), 110-122. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/262704807\\_Revisión\\_de\\_los\\_métodos\\_de\\_evaluación\\_de\\_la\\_actividad\\_antioxidante\\_in\\_vitro\\_del\\_vino\\_y\\_valoración\\_de\\_sus\\_efectos\\_in\\_vivo](https://www.researchgate.net/publication/262704807_Revisión_de_los_métodos_de_evaluación_de_la_actividad_antioxidante_in_vitro_del_vino_y_valoración_de_sus_efectos_in_vivo)
- Flanzy, C. (2003). *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Madrid, España: Ediciones Mundi prensa.
- Flores, V., Castañeda, O., Montiel, T., y Hernández, G. (2014). Análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de hojas de *Hemiphylacus novogalicianus*, una especie endémica de México. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 22(63), 18-23. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/html/674/67435407003/>

- Forbes, B., Sahn, D., y Weissfeld, A. (2009). *Diagnóstico microbiológico*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Frontera W., Herring, S., Micheli, L., y Silver, J. (2008). *Medicina deportiva clínica. Tratamiento médico y rehabilitación*. Madrid, España: Editorial Elsevier.
- García, J., y León Y. (2013) Notas sobre la presencia de *Justicia secunda* Vahl (Acanthaceae) en Cuba. *Revista Infociencia*. 17(2), 5-8.
- Garzón, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta biol. Colomb.*, 13(3), 27-36. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v13n3/v13n3a2.pdf>
- Gbenou, J., Tossou, R., Dansou, P., Fossou, M., y Moudachirou, M. (2006). Étude des Propriétés Antianémiques de *Justicia secunda* Vahl (Acanthaceae) chez des Rats de Souche Wistar. *Phaml. Méd. Trad. Afr.* 14(42), 45-54. Recuperado de: <http://greenstone.lecames.org/collect/revu/index/assoc/HASH6949.dir/A-006-00-026-029.pdf>
- Germosén, L. (2005). *Framacopea Vegetal Caribeña*. Ciudad de Pointe-à-Pitre, Guyana: Tramil.
- Gómez, J., Reyes, R., y Aguilar, I. (2012). Chemistry and Pharmacology of Selected Asian and American Medicinal Species of *Justicia*. En Gupta, V. (Ed), *Bioactive Phytochemicals: "Perspectives for Modern Medicine"* (pp.457-475). Buenos Aires, Argentina.
- Guija, E., Inocente, M., Ponce, J., y Zarzosa, E. (2015). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horizonte Médico*, 15 (1), 57-60. Recuperado de: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-558X2015000100008](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-558X2015000100008)
- Gutiérrez, A., y Estévez, A. (2009). Relevancia de los Productos Naturales en el Descubrimiento de Nuevos Fármacos en el S. XXI. *Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Esp)* 103 (2), 409-419. Recuperado de: <http://www.rac.es/ficheros/doc/00899.pdf>
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2010). *Metodología de la Investigación* (5ta edición). México, D.F.: Editorial McGrawHil
- Herrerías, J., Díaz, A., y Jiménez, M. (1996). *Tratado de Hepatología*. Sevilla, España: Universidad de Sevilla, Secretariado de publicaciones.
- Hurtado, J. (2010). *El Proyecto de Investigación*. Caracas, Venezuela: Quirón Ediciones.
- Koffi, E., Le Guernevé, K., Lozano, P., Meudecc, E., Adjé, F., Bekro, Y., y Lozano, Y. (2013). Polyphenol extraction and characterization of *Justicia secunda* Vahl leaves for traditional medicinal uses. *Industrial Crops and Products* 49. 682-689. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669013002872?via%3Dih>
- Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A., Mancini, J., y Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25 (4), 4726-732. Recuperado de: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612005000400016](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612005000400016)
- Lamarque, A., Zygadlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M., y Maestri, D. (2008). *Fundamentos Teóricos-Prácticos de Química Orgánica*. Córdoba, Argentina: Grupo editor Encuentro.
- López, N., y Aleixandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 32(3), 81-91. Recuperado de: <https://revista.nutricion.org/PDF/PROPIEDADES.pdf>
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela.
- Martínez, A., Valencia, G., Jiménez, N., y Galeano, M. (2008). *Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica*. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Martínez, M. (2002). *La nueva ciencia: su desafío, lógica y método*. Ciudad de México México: Trillas

- Meyer, B., Ferrigni, N., Putman, J., Jacobsen, L., Nichols, D. y McLaughlin, J. (1982). Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medical*. 45 (1), 31-34. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7100305>
- Michael, A., Thompson C., y Abramovitz, M. (1956). *Artemia salina* as a test organism bioassay. *Science*. 123 (3194), 464. Recuperado de: <https://science.sciencemag.org/content/123/3194/464.1>
- Minguez, I., Galán, M., Fernández, J., y Méndez, D. (1996). *Carotenoides en el pimentón. Factores responsables de su degradación*. Madrid, España: Raycar, S.A.
- Montiel, M. (1991). *Introducción a la flora de Costa Rica*. San José, Costa Rica: Editorial de la Universidad de Costa Rica.
- Morhardt, S., y Morhardt, E. (2003). *California Desert Flowers: An Introduction to Families, Genera, and Species*. Los Angeles, Estados Unidos: University of California Press
- Mpiiana, P., Ngbolua, T., Bokota M., Kasonga, T., Atibu, E., Tshibangu, D., y Mudogo, V. (2010). *In vitro* effects of anthocyanin extracts from *Justicia secunda* Vahl on the solubility of hemoglobin S and membrane stability of sickle erythrocytes. *Blood Transfusion*. 8(4), 248-254.
- Murillo, E., Lombo, O., Tique, M., y Méndez, J. (2007). Potencial Antioxidante de *Bauhinia kalbreyeri* Harms (FABACEAE). *Información Tecnológica*. 18(6), 65-74.
- National Germplasm Resources Laboratory. (2010). United States Department of Agriculture Agricultural Research Service, Beltsville Area: USDA. Recuperado de: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?414246>
- Navarrete, T., Delgado, S., Padilla, N., Sumaya, M., Olalde, G., Robles, A., y García, M. (2016). Propiedades hipoglucemiantes de la especie *Justicia spicigera* Schlechtendal (Scrophulariales: Acanthaceae). *Métodos en Ecología y Sistemática*, 11(1), 24. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/304827928\\_Propiedades\\_hipoglucemiantes\\_de\\_la\\_especie\\_Justicia\\_spicigera\\_Schlechtendal\\_Scrophulariales\\_Acanthaceae](https://www.researchgate.net/publication/304827928_Propiedades_hipoglucemiantes_de_la_especie_Justicia_spicigera_Schlechtendal_Scrophulariales_Acanthaceae)
- Organización Mundial de la Salud. *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional* (2013). Recuperado de <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201es/s21201es.pdf>
- Onoja S., Ezeja, M., Omeh, Y., y Onwukwe, B. (2016). Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities of methanolic extract of *Justicia secunda* Vahl leaf. *Alexandria Journal of Medicine. Alexandria University Faculty of Medicine*. 53 (3), 207-213. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2090506816300690>
- Paladino, S. (2008). *Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en las semillas de la vid (Vitis vinifera L.)*. Universidades Nacionales de Cuyo, La Rioja, San Juan y San Luis.
- Pérez, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana Investigación Biomedica*, 22(1), 48-57. Recuperado de: [http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22\\_1\\_03/ibi07103.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/ibi/vol22_1_03/ibi07103.pdf)
- Pino O. y Lazo F. (2010). Ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista de Protección Vegetal*. 22 (1), 34-43. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522010000100008](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522010000100008)
- Plaza, C. (2015). *Identificación y estudio de actividades biológicas de nueve especies de líquenes, colectadas en el estado Mérida*. Mérida, Venezuela. Universidad de Los Andes.
- Prats, G. (2005). *Microbiología Clínica*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Ramírez, R. (2015). *Técnicas Básicas de Microbiología y su Fundamento*. México D.F.: Editorial Trillas.
- Reyes, F., Palou, E., y López-Malo, A. (2014). Métodos de Evaluación de la Actividad Antimicrobiana y la Determinación de los Aceites Químicos de los Aceites Esenciales. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. 8 (1), 68-78. Recuperado de: <http://web.udlap.mx/tsia/files/2015/05/TSIA-81-Reyes-Jurado-et-al-2014.pdf>

- Rivas, C., Oranday, y Verde, M. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. Nuevo León, México: OmniaScience.
- Rojas, J., Ochoa V., Ocampo S., y Muñoz J. (2006). Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complement Altern Med.* 6 (2), 1-6. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16483385>.
- Sanabria A., López, S., y Gualdrón R. (1997). Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químicas.* 26 (1), 15-19. Recuperado de: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/56452/55415>
- Sánchez, L. y Neira, A. (2005). Bioensayo general de Letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava* L. y *Psidium guineense*. *Fundación Universitaria Juan de Castellanos*, 2(1), 40-45. Recuperado de: <file:///D:/Nueva%20carpeta/469-Texto%20del%20art%C3%ADculo-1466-1-10-20181022.pdf>
- Silbergeld, E., (1998). Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Madrid, España: Organización Internacional del Trabajo.
- Solis, P., Wright, C., Anderson, M., Gupta, M., y Phillipson, J. (1993). A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina*. *Planta Médica*, 59 (3), 250-252. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8316592>
- Tábío, D., Díaz, Y., Rondón, M., Fernández, E., y Piloto, R. (2017). Extracción de aceites de origen vegetal. *Universidad de Aguascaliente*, 26 (74), 1-4. Recuperado de: [https://www.researchgate.net/publication/317007345\\_Extraccion\\_de\\_aceites\\_de\\_origen\\_vegetal](https://www.researchgate.net/publication/317007345_Extraccion_de_aceites_de_origen_vegetal)
- Taroco, R., Seija, V., y Vignoli, R. (2006). *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Montevideo, Uruguay: Femur.
- Torres, C. (2004). *Investigación en la transformación secundaria de frutos, tubérculos, flores, hojas o tallos de especies pertenecientes a ecosistemas andinos. Informe técnico*. Bogotá, Colombia: Jardín Botánico José celestino Mutis-Subdirección científica.
- Tortora, G., Funke, B., y Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Valares, C. (2011). *Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente*. Badajoz Universidad de Extremadura.
- Valcárcel, M., y Gómez, A. (1988). *Técnicas analíticas de separación* (1ª edición). Barcelona, España: Editorial Reverte.
- Varón, L., y Granados, J. (2012). *Interrelación entre el contenido de metabolitos secundarios de las especies *Gliricidia sepium* y *Tithonia diversifolia* y algunas propiedades físicoquímicas del suelo*. Bogota, Colombia: Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD).
- Vera, B. (2014). *Conocimiento tradicional e inventario de plantas medicinales en el corregimiento de San Cristobal (minicipio Medellin, Antioquia)*. Universidad nacional de Colombia. Medellín, Colombia.
- Zambrano, P., y Bustamante, K. (2017). Caracterización y estudio fitoquímico de *Justicia secunda* Vahl (Sanguinaria, Singamochilla, Insulina). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(1), 1-8. Recuperado de: <http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v22n/pla16117.pdf>