



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



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE *Carramboa*
tachirensis EN CEPAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL**

www.bdigital.ula.ve

Trabajo presentado ante la Ilustre Universidad de Los Andes para optar al
título de Licenciadas en Bioanálisis

Autores:

Jennifer Lorena Ardila Morales

C.I. V-25.728.410

Nátaly Daniela Véliz Lozada

C.I. V-25.308.131

Tutora:

Dra. Alida Pérez Colmenares

Mérida, Mayo de 2023

DEDICATORIA

Este logro se lo dedico a la persona más importante de mi vida, mi madre Carmen Aidee. Tus palabras sinceras y tu amor incondicional son la fuerza que necesité para seguir luchando. Para ti papá, John Glen por siempre desear lo mejor para mí, tu don tan especial de hacer reír llenaron mi vida de muchas sonrisas.

Mi querido hermano Yhon Jayby, las peleas y lo lejos que vivimos nunca serán un obstáculo para acompañarnos y apoyarnos mutuamente.

Mi roomie Marialy Nataly, quien me acompañó aquellas largas noches durante tres años.

A mi novio, Alejandro de Jesús por sus profundas miradas de aliento, te dedico este párrafo porque siempre conseguiste la forma de buscar un equilibrio, tu serenidad ha sacado la mejor versión de mí.

Mis apreciados amigos, mi compañera de tesis Nátaly Daniela siempre tan organizada, José Rafael siempre tan extrovertido, María Daniela siempre tan glamorosa, Carlitos siempre tan cariñoso y Yessica Andreína siempre soportando mi bullying. Así es como los recordaré siempre en mi corazón

Jennifer Lorena

DEDICATORIA

En primera instancia a los pilares que han puesto todo de sí mismos para que yo lograra alcanzar cada una de mis metas, Nancy Violeta y Danys Daniel. Lo que soy y seré como profesional pero sobre todo como ser humano es por ustedes.

A mi Titi Natalia Danni, que el esfuerzo que se refleje en este arduo trabajo sirva siempre como el mejor ejemplo de perseverancia y constancia en la vida. Deseo poder ser un modelo a seguir para ti en lo que nos quede de camino.

A esos 4 luceros que desde donde estén estoy completamente segura que están orgullosos de mis logros. Aunque ya no estén aquí, los extraño como el primer día.

A Jennifer Lorena, porque bendigo siempre el día que hace 8 años te condujo a convertirte en mi persona. Este recorrido ha sido sublime a tu lado.

A Yessica Andreína, aunque en una parte del sendero decidiste emprender otros rumbos y que el trío se convirtiese en un dúo, nunca te has alejado e insistes en formar parte de esto.

A las personas que han partido antes de lo esperado y que por la inclemencia del tiempo no pudieron ver materializado este trabajo, muy especialmente al Profesor Luis Beltrán Rojas Fermín, por ser el pionero de esta investigación, sin su ímpetu y amor por el conocimiento esto no habría sido posible. El logro también es suyo y hoy lo verá con regocijo desde donde se encuentre.

Nátaly Daniela

AGRADECIMIENTOS

Hoy quiero agradecer a Dios, por darme día tras día la fuerza suficiente para no rendirme en cada batalla.

A la Universidad por abrirme las puertas a un mundo lleno de oportunidades.

A la Facultad de Farmacia y Bioanálisis porque siempre fue un honor volver a sus aulas de clases aún en las peores circunstancias.

A la Escuela de Bioanálisis por permitirme pasar los mejores años de mi vida envuelta con tantas personas maravillosas.

Doy gracias a las fuerzas infinitas del universo por rodearme de las mejores personas, mis compañeros, amigos y ahora colegas, por cruzarse en mi camino y compartir tantas sonrisas y lágrimas.

A mi madre, quien me acompañó a inscribirme en lo que sería una de las mejores decisiones de mi vida.

A mi padre por sacrificarse tantas horas de trabajo para darme lo mejor.

A mi hermano quien es la mejor versión de constancia y perseverancia.

A mi familia por siempre recibirme con un abrazo inmenso que me llena el corazón.

No me alcanzaría la vida para agradecerles lo que han hecho por mí, sin su apoyo, colaboración e inspiración esto habría sido imposible.

Jennifer Lorena

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso porque no ha dejado de demostrarme su amor infinito en cada paso de mi vida.

A mi alma máter, la ilustre Universidad de Los Andes, por convertirse en la casita más enriquecedora y desbordante de ilusiones que cualquier joven puede tener.

A la Facultad de Farmacia y Bioanálisis porque independientemente de las adversidades sigues siendo formadora de profesionales de calidad. Mis mejores momentos ocurrieron entre tus aulas, pasillos y laboratorios.

Al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga Del Hierro” por adoptar a estas tesis y permitirnos crear conocimiento nuevo en tu laboratorio. Gracias a los que laboran en él, al Sr. Emilio Salazar por tanta paciencia y colaboración.

A la Dra. Alida Pérez por ser la tutora más cool, la Dra. Ysbelia Obregón porque más que cotutora fuiste el motor de esta investigación, la Dra. Rosa Aparicio por no desampararnos nunca y la Dra. Yndra Cordero por brindarnos oportunidades siempre. Son un equipo dinamita.

A Nelvis Daniel y Nailyn Eliany, gracias por ser y estar en cada paso de este trabajo y desde el día uno ser nuestros hermanitos del IIFFB.

Agradezco a estas excepcionales personas: Joeika Yurnary, José Rafael, Seniel Santo, Clara Azize, Rima Carolina, su presencia será siempre luz.

A mi núcleo familiar, mamá, papá, titi, una estadía terrenal no es suficiente para agradecer tanto. A María Eugenia, por ser mi cómplice en todo momento, haces que jamás me sienta sola.

*De todos ustedes es este triunfo, nuestra la satisfacción de brindárselo.
Gracias totales!*

Nátaly Daniela

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	3
Planteamiento del Problema.....	3
Justificación de la Investigación.....	5
Objetivos de la Investigación.....	6
Objetivo General.....	6
Objetivos Específicos.....	6
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	7
Alcances de la Investigación.....	7
Limitaciones de la Investigación.....	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	8
Trabajos Previos.....	8
Antecedentes Históricos.....	11
Bases Teóricas.....	13
Familia Asteraceae.....	13
Subtribu Espeletiinae.....	16
<i>Carramboa tachirensis</i>	18
Productos Naturales.....	23
Extractos Vegetales.....	32
Métodos de Obtención de los Extractos Vegetales.....	33
Tamizaje Fitoquímico.....	35
Bacterias.....	43

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
Clasificación de las Bacterias.....	43
Mecanismo de Resistencia de las Bacterias	50
Antibióticos.....	53
Clasificación de los Antibióticos	53
Actividad Antibacteriana	54
Definición Operacional de Términos.....	57
Operacionalización de las Variables.....	60
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	63
Tipo de Investigación.....	63
Diseño de Investigación	63
Población y Muestra	64
Unidad de Investigación	64
Selección del Tamaño de la Muestra	64
Sistema de Variables.....	65
Instrumento de Recolección de Datos	65
Procedimiento de la Investigación	66
Recolección del Material Vegetal	66
Obtención del Extracto	66
Tamizaje Fitoquímico	67
Actividad Antibacteriana.....	72
Reactivación de las Cepas Bacterianas.....	72
Análisis de la Actividad Antibacteriana.....	72
Diseño de Análisis	76
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	77
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

ÍNDICE DE FIGURAS

N°		Pág.
1	Estructura del nuevo diterpeno presente en <i>Espeletia semiglobulata</i>	18
2	Flores, Hojas y Tallos de <i>Carramboa tachirensis</i>	19
3	Estructuras de la fracción neutra presente en <i>Carramboa tachirensis</i>	21
4	Estructuras de la fracción ácida presente en <i>Carramboa tachirensis</i>	22
5	Formación de los Metabolitos Secundarios.....	24
6	Elementos del Metabolismo del Carbono en Relación con las Rutas de Síntesis de Metabolitos Secundarios.....	26
7	Estructura Química de un Triterpeno.....	27
8	Estructura Química de los Compuestos Fenólicos.....	29
9	Estructura Química de los Glucósidos.....	31
10	Estructura Química de los Alcaloides.....	32
11	Reacción de Liebermann-Burchard.....	35
12	Reacción de Hidroxamato Férrico.....	36
13	Reacción de Ehrlich.....	37
14	Reacción de Hidróxido de Amonio.....	37
15	Reacción de Shinoda.....	38
16	Reacción de FeCl ₃	39
17	Reacción de Pb (C ₂ H ₃ O ₂) ₂	39
18	Reacción de Gelatina-sal.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

N°		Pág.
19	Reacción de Zn(s), HCl y NaOH.....	40
20	Reacción de Molish.....	42
21	Plásmido, Transposón e Integrón que Confieren Resistencia Bacteriana.....	51
22	Mecanismos de Resistencia Antibacteriana.....	52
23	Representación de los Resultados Obtenidos para Terpenos: Triterpenos/Esteroles.....	81
24	Representación de los Resultados Obtenidos para Terpenos: Lactonas Sesquiterpénicas.....	82
25	Representación de los Resultados Obtenidos para los Compuestos Fenólicos.....	83
26	Representación de los Resultados Obtenidos para Cumarinas.....	84
27	Representación de los Resultados Obtenidos para los Flavonoides.....	85
28	Representación de los Resultados Obtenidos para Taninos.....	86
29	Representación de los Resultados Obtenidos para Quinonas.....	87
30	Representación de los Resultados Obtenidos para Saponinas.....	88
31	Representación de los Resultados Obtenidos para los Alcaloides..	89
32	Halo de Inhibición del Extracto Etanólico de las Hojas de <i>Carramboa tachirensis</i> en <i>Enterococcus faecalis</i>	92
33	Halo de Inhibición del Extracto Etanólico de las Hojas de <i>Carramboa tachirensis</i> en <i>Staphylococcus aureus</i>	92

ÍNDICE DE FIGURAS

N°		Pág.
34	Halo de Inhibición del Extracto Etanólico de las Hojas de <i>Carramboa tachirensis</i> en <i>Escherichia coli</i>	93
35	Halo de Inhibición del Extracto Etanólico de las Hojas de <i>Carramboa tachirensis</i> en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	93
36	Halo de Inhibición del Extracto Etanólico de las Hojas de <i>Carramboa tachirensis</i> en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	94

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

N°		Pág.
1	Microorganismos Encontrados en Diferentes Rangos de Temperatura.....	45
2	Microorganismos Encontrados en Diferentes Rangos de pH.....	45
3	Operacionalización de la Variable Independiente.....	61
4	Operacionalización de la Variable Dependiente	62
5	Características Macroscópicas de los Extractos Etanólico y Acuoso de las Hojas de <i>Carramboa tachirensis</i>	78
6	Resultado del Tamizaje Fitoquímico de los Extractos Etanólico y Acuoso de las Hojas de <i>Carramboa tachirensis</i>	80
7	Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana del Extracto Etanólico y Acuoso de las Hojas de <i>Carramboa tachirensis</i>	91

ÍNDICE DE ESQUEMAS

N°		Pág.
1	Procedimientos para la Identificación de los Componentes de <i>Carramboa tachirensis</i>	69
2	Pruebas Químicas Cualitativas para Determinar los Metabolitos Secundarios de los Extractos de <i>Carramboa tachirensis</i>	70
3	Procedimiento para Determinar la Actividad Antibacteriana del Extracto de <i>Carramboa tachirensis</i> por el Método de Difusión en Agar (Kirby-Bauer).....	75

www.bdigital.ula.ve



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



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE *Carramboa tachirensis* EN CEPAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL

Autoras:

Jennifer Lorena Ardila Morales

Nátaly Daniela Véliz Lozada

Tutora: Prof. Alida Pérez Colmenares

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue confirmar la relación entre el extracto de *Carramboa tachirensis* y la actividad antibacteriana frente a cepas de referencia internacional. Se recolectaron las hojas en el páramo El Batallón, camino a Pregonero, Estado Táchira en Venezuela. El extracto fue obtenido mediante la maceración en frío de las hojas con disolventes orgánicos como etanol y agua, posteriormente su composición química se analizó cualitativamente mediante el tamizaje fitoquímico, obteniéndose positividad ante la presencia de lactonas sesquiterpénicas, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas y alcaloides, en el extracto etanólico. En contraposición, el extracto acuoso fue positivo para quinonas, pero se logró evidenciar la ausencia de triterpenos, esteroides y cumarinas. Finalmente, el ensayo de la actividad antibacteriana fue evaluado con el método de difusión en agar (Kirby-Bauer), el extracto etanólico tuvo una concentración de 10 mg/mL, mostrando una formación de halos de inhibición ante *Enterococcus faecalis* (7 mm), *Staphylococcus aureus* (8 mm), *Klebsiella pneumoniae* (7 mm) y *Pseudomonas aeruginosa* (8 mm), mientras que frente a *Escherichia coli* no mostró actividad alguna. Este es el primer reporte en extractos polares de *Carramboa tachirensis*.

Palabras claves: actividad antibacteriana, *Carramboa tachirensis*, extractos vegetales, metabolito secundario, tamizaje fitoquímico, cepas de referencia internacional.

INTRODUCCIÓN

El estudio y uso de plantas medicinales se ha dado desde tiempos prehistóricos hasta los tiempos actuales, debido al alto potencial biológico curativo que poseen para el tratamiento de diferentes afecciones (Hoogesteger, 1994). Esto con el fin de demostrar la gran ventaja en cuanto a presentar alguna actividad biológica. Al respecto, Otero y Ferrer en el 2006 definen la actividad antibacteriana como la capacidad de una sustancia química de matar o inhibir el crecimiento y así producir reducción de la población bacteriana en el huésped.

Si bien es cierto, existen sustancias extraídas a partir del material a estudiar que brindan al investigador facilidad a la hora de realizar algún tipo de investigación en el laboratorio. Tal es el caso de lo que dedujeron García, Martínez, Ortega y Castro en el 2010, sobre los extractos vegetales que son mezclas complejas de metabolitos secundarios, aislados de las plantas por diversos métodos, que actúan como biocidas en contra de una amplia gama de microorganismos.

Debe señalarse que, en vista de la inexistencia de estudios que involucren la actividad antibacteriana con el extracto de *Carramboa tachirensis*, las autoras se refieren a investigaciones generadoras de un creciente interés por la posible relación con el trabajo al que se ha dado inicio. Ya que la obtención de ellos ha sido fruto de distintos tratamientos a géneros parentales de la especie *Carramboa tachirensis*.

El objetivo general de esta investigación fue confirmar la relación entre la composición química del extracto de *Carramboa tachirensis* y la actividad antibacteriana frente a cepas de referencia internacional.

El siguiente trabajo de investigación está estructurado en V capítulos. El Capítulo I, denominado El Problema, contiene los siguientes elementos: Planteamiento del Problema, Justificación, Objetivos, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II, llamado Marco Teórico abarca: Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas y Operacionalización de las variables. El Capítulo III, titulado Marco Metodológico comprende los siguientes puntos: Tipo y Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Instrumento de Recolección de Datos, Procedimientos de la Investigación y Diseño de Análisis. El Capítulo IV integrado por los Resultados y Discusiones. El Capítulo V constituido por las Conclusiones y Recomendaciones. Finalmente, Referencias Bibliográficas.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

A través de la existencia de la humanidad sobre la Tierra, una de sus preocupaciones ha sido mantener la salud, la aparición de nuevas enfermedades han motivado al hombre, a lo largo de siglos, a buscar una solución o un paliativo para estos males, a través del ensayo con plantas. Sin embargo, hasta hace relativamente pocos años empezó el estudio científico de las mismas y sus componentes químicos con propiedades medicinales o sus actividades biológicas. Cabe mencionar que tan sólo entre el 5 % al 15 % de las aproximadamente 250000 especies de uso medicinal se han investigado. Esto subraya el gran potencial de las plantas en la búsqueda de nuevos medicamentos (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

En efecto, los productos naturales tales como los extractos vegetales y/o sus compuestos puros proveen oportunidades ilimitadas para el desarrollo de nuevas drogas que puedan ser utilizadas para el control microbiano. A su vez, los antibióticos han ayudado a transformar muchas patologías que alguna vez fueron mortales, en problemas controlables de salud, especialmente en los países desarrollados. Sin embargo, en los países en vía de desarrollo y en los países subdesarrollados, casi la mitad (47 %) de las muertes de menores de cinco años, es atribuida a las infecciones respiratorias, gastrointestinales y a la sepsis neonatal, a pesar que podrían ser prevenidas y tratadas (Alava e Ibarra, 2014; Rivas y cols., 2016).

Debe señalarse que, cuando se habla de la habilidad de las bacterias de alterarse a sí mismas en una variedad de ingeniosas formas para sobrevivir a la presencia de concentraciones de antibióticos que deberían matarlas normalmente; se hace referencia a resistencia de ciertos antibióticos (Alava e Ibarra, 2014).

Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que más de la mitad de los medicamentos son prescritos, dispensados o vendidos inapropiadamente y la mitad de todos los pacientes fallan en tomar tales medicamentos correctamente. Las indicaciones médicas incorrectas, así como el uso indebido de agentes antimicrobianos, administración, ruta, dosis y duración del tratamiento son también factores de riesgo para crear resistencia (Alava e Ibarra, 2014).

Es por eso, que la resistencia tiene un impacto múltiple en la asistencia sanitaria: obliga al microbiólogo clínico a disponer de herramientas fiables para reconocer y analizar el problema, disminuye las opciones de tratamiento empírico y dirigido, obliga a emplear antimicrobianos de mayor espectro, contribuye al aumento de la morbimortalidad de causa infecciosa y de los costes de la atención sanitaria y exige a corto o medio plazo el desarrollo de nuevos antimicrobianos que ayuden a controlar este grave problema (Martínez y Calvo, 2010).

En vista de la situación actual del problema descrita anteriormente, las autoras de esta investigación formulan el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál será la relación entre la composición química de los extractos de *Carramboa tachirensis* y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional?

Justificación de la Investigación

Desde hace miles de años, cuando el hombre fue encontrando curas o paliativos para las enfermedades que le aquejaban en hojas, raíces, cortezas, semillas, frutos o flores de árboles silvestres, además de dar inicio a lo que se conoce como herbolaria, se empezó a establecer una relación empírica entre el tipo de planta y la actividad biológica atribuida a cada una, distinguiendo una de otra solo por las características externas más notorias y por su aroma, ya que aún no se establecía lo que hoy se conoce como taxonomía vegetal. El estudio de las mismas en las últimas décadas, ha permitido encontrar nuevas moléculas con posibilidad de actuar como nuevos fármacos (Rivas y cols., 2016).

Tenemos pues, que en los años recientes la producción de nuevos antibióticos ha disminuido de forma considerable y ha surgido como un problema de consecuencias impredecibles la resistencia a estos por la aparición en las bacterias, virus, hongos, y protozoarios de mecanismos defensivos con el fin de evadir la acción destructiva de estas sustancias. La rapidez con que surgen los microorganismos multirresistentes no es igual a la velocidad con que surgen nuevos antibióticos, por tanto, se concibe que pronto no habrá nuevos de estos agentes para tratar a pacientes con sepsis graves (Fernández, López, Ponce y Machado, 2003).

Sin duda, la utilización de los extractos vegetales brinda una gama de posibilidades en cuanto a opciones terapéuticas contra diversos microorganismos. Por esto, se hace sumamente necesaria la determinación de la actividad antibacteriana en el extracto de *Carramboa tachirensis*, frente a cepas de referencia internacional, con el propósito de ofrecer alternativas

de tratamiento, sobre todo a una población bastante necesitada como la perteneciente a nuestro país.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la relación entre la composición química de los extractos de *Carramboa tachirensis* y la actividad antibacteriana frente a cepas de referencia internacional.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos etanólico y acuoso de las hojas de *Carramboa tachirensis* mediante maceración en frío.
- Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos previamente a través de pruebas químicas de coloración y/o precipitación.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos frente a cepas grampositivas y gramnegativas de referencia internacional a través del método de difusión en agar en disco (Kirby-Bauer).

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

El logro de esta investigación consistió en contribuir con nuevos conocimientos sobre la composición química de *Carramboa tachirensis*, además confirmó la relación causal de la actividad antibacteriana de los extractos de la planta de interés frente a cepas de referencia internacional, para conocer sus beneficios terapéuticos y usos como tratamiento alternativo. Cabe destacar que este es el primer reporte en extractos polares de esta especie encontrada en Venezuela.

Limitaciones de la Investigación

Las limitaciones que se presentaron en el desarrollo de esta investigación fueron las siguientes: los constantes cortes de electricidad, de agua, de gas y de internet que dificultaron el desarrollo de la parte experimental y revisión bibliográfica. También, la escasa afluencia de transporte tanto público como privado. Así mismo, los requerimientos en el ámbito de bioseguridad en este período de pandemia por Covid-19. Finalmente, el alto costo de reactivos y deterioro de la infraestructura de los laboratorios donde se llevó a cabo la investigación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Márquez, Pérez, Rojas, Aparicio, Ramos, Obregón y Usubillaga, en el año 2023, publicaron un estudio llamado: Un nuevo diterpeno *ent*-kaureno aislado de hojas de *Espeletia semiglobulata* Cuatrec. y su potencial actividad antimicrobiana. El objetivo del estudio fue informar el aislamiento, la identificación estructural y la actividad antimicrobiana de un nuevo diterpeno de tipo kaureno en la fracción neutra de *Espeletia semiglobulata* Cuatrec. Las hojas se secaron a 40 °C durante 48 horas y se trituraron, el material molido se extrajo a temperatura ambiente con una mezcla de hexano/éter dietílico (3:1, v/v) por un período de dos días. Los residuos sólidos se disolvieron en la misma mezcla y se agitaron con NaOH acuoso al 5 %. La fase acuosa se llevó a pH 3 mediante la adición de HCl concentrado y se agitó con hexano para obtener la fracción ácida. La solución original que quedó después del excedente del tratamiento alcalino, se mezcló con carbón activado y se hirvió por 10 minutos. Se obtuvo una fracción neutra después de un tratamiento de cromatografía en columna abierta. La fracción neutra se sometió a separación cromatográfica y se obtuvieron cuatro diterpenos de tipo kaureno: tres conocidos como *ent*-kaur-16-eno-19-al, *ent*-kaur-18-*epi*-16-eno-4-ol, *ent*-kaur-16-eno-19-ol y uno nuevo elucidado como *ent*-kaur-3-acetoxi-15-eno **(1)**. Estos compuestos fueron evaluados y estudiados a través de ensayos

antimicrobianos, donde este nuevo *ent*-kaureno mostró un potencial de inhibición significativo contra el crecimiento de cepas bacterianas gramnegativas. *Escherichia coli* (ATCC 25922): 8 mm, *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357): 10 mm, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853): 8 mm, también mostró inhibición contra el crecimiento de la cepa fúngica *Candida krusei*: 8 mm, a una concentración de 2 mg/mL. Estos resultados revelaron una notable relación entre la estructura y la actividad natural del núcleo del *ent*-kaureno respecto a la posición C-3 (anillo A de la unidad de perhidrofenantreno), cuya oxigenación o adición de un grupo aceptor o donante de enlaces de hidrógeno, mejora la actividad antimicrobiana. Esta investigación guarda relación con el tema debido a que en su análisis químico se obtuvieron diterpenos de tipo kaurenos, anteriormente aislados en la especie de estudio.

Cortez en el año 2021, publicó una investigación llamada: Actividad antibacteriana y composición química del extracto de las hojas de *Espeletiaopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec. Tuvo como objetivo confirmar la actividad antibacteriana y composición química del extracto de las hojas de *E. pannosa*. Se secaron las hojas frescas de *E. pannosa* a 40 °C, luego fueron molidas y se efectuó una extracción con hexano-éter 3:1 a 40 °C hasta agotamiento del material vegetal. A los ensayos correspondientes se les realizó el tamizaje fitoquímico para determinar de forma cualitativa los metabolitos secundarios, lo que reveló compuestos alcaloidales con el reactivo de Drangendorff, así como esteroides y triterpenos, con la reacción de Liebermann-Burchard; mientras que no se encontraron saponinas, fenoles, taninos, flavonoides, quinonas, lactonas y cumarinas, por lo que podría inferirse que, estos metabolitos no se encuentran en el extracto apolar de la parte aérea de la *E. pannosa* o que quizá estén pero en baja concentración. Posteriormente, la muestra se sometió a un estudio de actividad

antibacteriana usando la técnica de difusión en agar en disco frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, en una concentración de 1000 ppm; estos indicaron una sensibilidad para la mayoría de las bacterias ensayadas. Tal es el caso de *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *E. coli*; con un halo de inhibición de 7 mm, mientras *P. aeruginosa* con un halo de inhibición de 7 mm también. Mientras que, para el *E. faecalis* no se observó inhibición del halo. Este trabajo de investigación guarda relación con el tema porque se realizó en uno de los ocho géneros que conforman la subtribu Espeletiinae y por consiguiente es un género hermano de la especie en estudio.

Obregón, Rojas, Aparicio y Usubillaga, en el año 2021, publicaron un estudio llamado: Análisis de las fracciones ácida y neutra presentes en *Carramboa tachirensis* (Aristeg.) Cuatrec. (Asteraceae) por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masa (CG/EM). El objetivo del estudio fue analizar las fracciones ácida y neutra obtenidas del extracto de las hojas de *C. tachirensis* mediante CG-EM. Se secaron las hojas frescas de *C. tachirensis* a 35 °C por 3 días; luego se sometió el material seco y molido a extracción con *n*-hexano:éter dietílico (3:1) a temperatura ambiente durante 4 días. El extracto crudo se concentró a sequedad para dar un residuo sólido. Se añadió una cantidad del extracto crudo disuelto en una mezcla de *n*-hexano-dietil éter (3:1), agitado con una solución al 5 % de NaOH. La fase acuosa resultante se acidificó con HCl concentrado a pH 3 y se agitó con *n*-hexano:éter dietílico (3:1) para la obtención de la fracción ácida. Además, la fracción neutra obtenida fue decolorada por ebullición con carbón activado en hexano y purificado a través de un gel de sílice columna. Se realizó la metilación de la fracción ácida y se analizó por CG/EM para su posterior identificación por comparación con estándares auténticos y el uso de bases de datos Wiley (6th Edition), NIST 05 y Adams (2007). El análisis por CG/EM de la fracción ácida metilada permitió la identificación de varios ácidos

kaurénicos presentes en la resina de *C. tachirensis*. El porcentaje de abundancia resultante de la fracción ácida fue el ácido *ent*-kaur-16-eno-19-oico o ácido kaurénico **(7)** con 11,16 %, ácido *ent*-kaur-9(11)-dieno-19-oico o ácido grandiflorénico **(10)** con 9,18 % y ácido *ent*-kaur-15 α -hidroxi-16-eno-19-oico **(9)** con 17,03 %. De igual modo, en el extracto de las hojas de la fracción neutra fueron identificados por CG-EM el *ent*-kaur-16-eno-19-ol o kaurenol **(2)** con una abundancia de 2,63 %, ruilopezol **(6)** con 2,30 %, *epi*-ruilopezol **(3)** con 5,19 %, 16 β -kauranol **(4)** con 14,47 % y 16 α -kauranol **(5)** con 2,78 %. Este trabajo de investigación guarda relación con el tema porque es el primer reporte fitoquímico para *C. tachirensis* y el género *Carramboa*.

Antecedentes Históricos

A lo largo de la historia se conocen plantas cuyos extractos han sido usados en pócimas o curaciones, estos conocimientos se transmitieron de generación a generación. Además, le eran atribuidas características de acuerdo a su forma, color o hábitat. También, son efectivas en el área terapéutica por sus múltiples propiedades (Marcano y Hasegawa, 2002; Lizcano y Vergara, 2008).

Desde el siglo XVIII se han empleado sustancias químicas para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Paul Ehrlich quien formuló los principios de toxicidad selectiva, reconoció las reacciones químicas específicas entre microorganismos y medicamento, la aparición de la resistencia a estos y el papel de la terapéutica combinada para combatirlos. Posteriormente se descubrieron las sulfonamidas lo que acrecentó el interés en sustancias antibacterianas de origen microbiano llamadas antibióticos. De

allí surgió la penicilina, estreptomina, tetraciclina, cloranfenicol, entre otras (Manrique y Mosquera, 1997).

Sucedo pues, que en la actualidad se conocen diferentes tipos de metabolitos secundarios entre los cuales destacan: ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides, antraquinonas, antibióticos, lignanos, cumarinas, esteroides y terpenos. La variedad estructural dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación (Kuklinski, 2000).

Históricamente, la inmensa mayoría de investigaciones fitoquímicas desarrolladas hasta hace unas décadas estaban dirigidas a determinar estructuras novedosas; hoy día esos estudios se orientan hacia el aislamiento e identificación de compuestos biológicamente activos, especialmente encauzados a atacar dolencias que afectan a toda la humanidad y que cobran a diario más vidas, como lo es el cáncer, SIDA, afecciones cardiovasculares, diabetes, así como otras enfermedades endémicas, ya sea malaria, tripanosomiasis, leishmaniasis y otras (Marcano y Hasegawa, 2002).

En relación a lo expuesto anteriormente, la subtribu Espeletiinae de la familia Asteraceae comprende plantas que crecen a más de 2500 msnm en Los Andes del norte de América del Sur. Los ácidos kaurénicos, así como otros diterpenoides, parecen desempeñar un papel en la protección de estas plantas contra las bajas temperaturas. Por otro lado, se ha descubierto que algunos ácidos kaurénicos son útiles como materiales de partida para la síntesis de algunas sustancias de potencial interés farmacológico. Hay más de 100 especies de Espeletiinae en Venezuela, Colombia y Ecuador, todas

las especies estudiadas hasta ahora contienen mezclas de diferentes ácidos kaurénicos (Viloria, Rojas y Usubillaga, 1997).

Bases Teóricas

Familia Asteraceae

Sin duda, la familia Asteraceae, tradicionalmente conocida bajo el nombre de Compositae, es uno de los grupos dominantes en la flora de Venezuela, está constituida mayoritariamente por especies herbáceas arbustivas y trepadoras. Además, el número de las mismas aumenta progresivamente en la zona tropical, en los sitios montañosos de elevada altitud. En este sentido, son escasos los representantes de esta familia en las distintas formaciones boscosas de tierra caliente. Igualmente, el número de especies en la planicie llanera del país, están escasamente representadas. Algunas de las especies de la familia forman parte de las llamadas malezas pantropicales (Aristeguieta, 2003).

Estas extraordinarias y exclusivas plantas, están distribuidas en las altas serranías de Los Andes de Venezuela, Colombia y Ecuador. Su gran valor científico merece el establecimiento de un instituto especializado para el cultivo y análisis químico respectivo de las mismas debido a la alteración que sufre la zona alta andina por el ámbito urbanístico y agrícola, pero también por otra actividad de reciente ejercicio que se basa en la adquisición de dichas especies basándose en sus propiedades medicinales y curativas atribuidas a sus hojas (Aristeguieta, 2003).

Inicialmente fue dividida en 2 subfamilias: Asteroideae Lindl. y Cichorioideae Kitam. Según el sistema de Bentham, que data de 1873, corresponden 12 tribus a la primera y una sola a la segunda respectivamente, pero desde los trabajos descritos en 1987, se sugieren evidencias moleculares que han servido de base para una nueva sistematización de la familia, determinando la existencia de varios clados supragenéricos. En 1992 se estableció la mayor antigüedad filética del taxón basal de la familia, un grupo finalmente designado Barnadesioideae con rango de subfamilia; su notoria presencia en la flora Argentina (en Los Andes y el sur del país) ha sustentado la hipótesis del origen patagónico de la familia de las Asteráceas. Cuando investigadores entre 1994 y 1996 reinterpretaron los caracteres macromorfológicos de los grupos, resultó un sistema de 3 subfamilias: Barnadesioideae, Asteroideae y Cichorioideae, con 17 tribus. Estudios filogenéticos moleculares llevaron a escindir la Subfamilia Cichorioideae y revalidar antiguos conceptos genéricos o crear nuevos géneros. Con el paso del tiempo se sumaron nuevos géneros y subfamilias a este enorme grupo. Así, en las recientes clasificaciones sugeridas entre 2007 y 2008 se reconocen 12 subfamilias estrictamente monofiléticas, que comprenden 40 tribus (Del Vitto y Petenatti, 2009).

La familia Asteraceae según Del Vitto y Petenatti en el año 2009, se caracteriza por una variedad de sustancias como los ácido iso- y clorogénico, isoflavonoides, lactonas sesquiterpénicas y alcoholes triterpénicos pentacíclicos. Por otro lado, presenta aceites esenciales cuyo producto principal son los terpenos; los alcaloides de tipo pirrolizidínicos y derivados acetilénicos también lo conforman. No obstante, carece de compuestos como los taninos verdaderos y de iridoides.

Los glúcidos se pueden almacenar en órganos subterráneos y en semillas, son la principal fuente de reserva hidrocarbonada, de digestibilidad

y pueden reemplazar el almidón; además, forman frútanos como la insulina. Conjuntamente, realizan la síntesis de ciclitoles como el L-inositol y su isómero esciloinositol. Por otra parte, acumulan prótidos como proteína amorfa, lípidos y lípidos seminales ricos en ácidos grasos de cadenas cortas como el linoleico y esteárico, en menor proporción presentan oleico, linolénico y palmítico (Del Vitto y Petenatti, 2009).

En la familia Asteraceae se reconocen un gran número de especies (23.000), con una amplia distribución en todo el planeta. Convirtiendo así a esta familia en una fuente de recursos alternativos y renovables para la humanidad. Siendo muchas de sus especies utilizadas en agricultura, industria, medicina, comercio, entre otras (Izco, 2004).

Comparada con otras grandes familias de plantas (como Poáceas y Fabáceas) tiene menor valor económico para el hombre, aunque incluye una cantidad de especies útiles desde diversos puntos de vista. El uso etnobotánico de muchas de ellas ha ayudado al progreso y sustento de gran número de pueblos en todo el mundo, satisfaciendo sus necesidades de alimento, forraje, leña, medicinas, etc. Desde el punto de vista estrictamente económico, unas 40 especies tienen importancia directa en alimentación humana (hortalizas y “semillas” oleaginosas) e indirectamente por productos obtenidos por la industria. Otras especies silvestres tienen potencial nutricional, muchas son de interés tecnológico u ornamental y centenares rinden metabolitos secundarios de uso farmacéutico o industrial, o aportan néctar y polen para la producción apícola y forraje para la producción ganadera (Del Vitto y Petenatti, 2009).

Subtribu Espeletiinae

La subtribu Espeletiinae, descrita por Cuatrecasas (1976), es un grupo representativo de la familia Asteraceae, conformado por ocho géneros (*Carramboa*, *Espeletiopsis*, *Coespeletia*, *Espeletia*, *Libanothamnus*, *Ruilopezia*, *Tamania* y *Paramiflos*). Esto incluye a 146 especies conocidas como frailejones, inciensos, trementinos o tabaqueros. Sus especies se extienden desde la cordillera de Mérida, Táchira y Trujillo en Venezuela, en las tres cordilleras en Colombia, y la parte media y norte de Ecuador (Cuatrecasas, 1987).

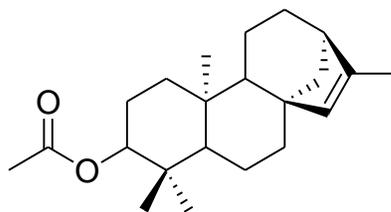
En Venezuela la subtribu Espeletiinae es la más representativa de la flora de los páramos andinos. Aun cuando se pueden encontrar frailejones desde el Norte de Ecuador, Colombia, incluyendo el macizo de Santa Marta y en la Cordillera de la Costa (Monasterio, 1980).

Con base en lo descrito por Meccia, Quintero, Rojas, Usubillaga y Carmona en el 2010, es necesario mencionar que las especies de esta subtribu producen principalmente diterpenos del tipo kaureno, los cuales tienen interés desde el punto de vista químico, botánico y medicinal, ya que han manifestado actividad citotóxica en diferentes líneas de células de carcinoma (Díaz, Dorta, Cueto, Roviroso, San-Martín, Loyola y Darias, 2003), efectos esteroideogénicos (Moriwaki, Gomi, Itoh, Lida, Tsugawa, Tanui, Fuji, Dode y Kajimoto, 1986) y efectos pro-apoptóticos en humanos contra líneas celulares PC-3 de cáncer prostático (Ruiz, Rodrigues, Arvelo, Usubillaga, Monsalve, Diez y Galindo, 2008; Nagashima, Kondoh, Kawase, Simizu, Osada, Watanabe, Sato y Asakawa, 2003). En menor proporción producen triterpenos (Tellez, Torrenegra, Pedroso y Martínez, 2000), sesquiterpenos (Bohlmann, Suding, Cuatrecasas, King y Robinson, 1980; Bohlmann, Zdero,

Cuatrecasas, King y Robinson, 1980) y aceites esenciales (Khouri, Usubillaga, Rojas y Galarraga, 2000; Aparicio, Romero, Khouri, Rojas y Usubillaga, 2002).

De este modo, todas estas especies presentan como metabolitos secundarios derivados diterpénicos de tipo kaureno, siendo el ácido kaurénico **(7)** el principal núcleo encontrado en esta subtribu. El ácido grandiflorénico **(10)**, ácido *ent*-kaur-15 α -hidroxi-16-eno-19-oico **(9)** y el ácido *ent*-15 α -acetoxi-kaur-16-eno-19-oico, también el kaurenol **(2)** han sido estudiados ampliamente, mostrando una variedad de propiedades biológicas independientemente del origen de la fuente de obtención. Entre sus propiedades se han descrito: anti-inflamatoria, antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, hipoglucemiante, analgésica, genotóxica y citotóxica (Cordero, Lucena, Araujo, Usubillaga, Rojas, Aparicio, Moujir y Ustáriz, 2022).

Es importante mencionar, la presencia de un nuevo diterpeno (Figura 1) llamado *ent*-kaur-3-acetoxi-15-eno **(1)** aislado de las hojas de *Espeletia semiglobulata* (Cuatrec), a partir de una fracción neutra separada por cromatografía. Asimismo, posee un grupo moderadamente hidrofílico (éster) en posición C-3, cuyo impedimento estérico es bajo y esto le confiere la ventaja de interactuar y establecer puentes de hidrógeno con grupos aceptores/donadores en la membrana del microorganismo, pudiendo atravesarla y dañarla. Por lo tanto, el resultado reflejó actividad antimicrobiana pero solo frente a cepas gramnegativas y una cepa fúngica (Márquez y cols., 2023).



ent-kaur-3-acetoxi-15-eno (1)

Figura 1. Estructura del nuevo diterpeno presente en *Espeletia semiglobulata*. Tomado y modificado de Márquez y cols., 2023.

Carramboa tachirensis

Desde el punto de vista botánico, *Carramboa tachirensis* es un árbol no fistuloso que presenta hojas marcescentes, tiene pecíolos escasamente diferenciados, con vaina ancha basalmente anular (Figura 2). Posee láminas subcoriáceas hasta coriáceas y con ápice angostamente obtuso o agudo. La similitud en la morfología foliar, floral y la extrema variación foliar y en algunos casos floral de las distintas poblaciones de *Carramboa*, hace difícil la identificación y delimitación de algunas de sus especies. Por tal motivo, se consideró la posibilidad de integrar información de diversa fuente (morfológica y anatómica), con el objeto de facilitar la identificación e intentar reconocer híbridos (Morillo y Briceño, 2007).



Figura 2. Flores, Hojas y Tallos de *Carramboa tachirensis*. Fuente: Luis Beltrán Rojas Fermín[†].

Carramboa tachirensis (Aristeg). Cuatrec, es un híbrido cuyas especies parentales son *Carramboa pittieri* (Cuatrec) y *Ruilopezia marcescens* (S.F. Blake) Cuatrec. y es perteneciente a la subtribu Espeletiinae (Asteraceae). Hay 105 especies de Espeletiinae en Colombia, 75 en Venezuela y 1 en Ecuador, pero solo *Carramboa* se encuentra en Venezuela, específicamente crece en el páramo El Batallón, Estado Táchira a una altitud de 2800 msnm. Además, *Carramboa badilloi* (Cuatrec), *Carramboa littlei* (Aristeg), *Carramboa pittieri* (Cuatrec), *Carramboa rodriguezii* (Cuatrec), *Carramboa trujillensis* (Cuatrec) y *Carramboa wurdackii* (Ruiz-Terán y López-Fig.) han sido aceptados como taxones (Obregón, Rojas, Usubillaga, Pouységu y Quidau, 2015).

Dado que con anterioridad los únicos estudios realizados en la especie que nos atañe se efectuaron en base a obtención de fracción ácida y neutra o bien sea de aceite esencial para la identificación de metabolitos primarios y secundarios, es necesario mencionar inicialmente, que el análisis de la

fracción ácida y neutra en *Carramboa tachirensis*, reveló que en su fracción neutra (Figura 3) se identificó kaurenol **(2)** con 2,63 %, *epi*-ruilopeziol **(3)** con 5,19 %, 16 β -kaurenol **(4)** con 14,47 %, 16 α -kaurenol **(5)** con 2,78 % y ruilopeziol **(6)** con 2,30 %. Por otro lado, en su fracción ácida (Figura 4) se identificó el ácido *ent*-kaur-16-eno-19-oico **(7)** con 11,16 %, ácido *ent*-kaur-19-oico **(8)** con 9,18% , ácido *ent*-15 α -hidroxi-16-eno-kaur-19-oico **(9)** con 17,03 %, en bajas proporciones el ácido *ent*-kaur-9(11)-dieno-19-oico con 1,89 % **(10)**, ácido *ent*-kaur-15 α -isovaleroxi-16-eno-19-oico **(11)** con 5,59 % y ácido *ent*-kaur-15-oxo-16-eno-19-oico **(12)** con 5,01% (Obregón y cols., 2021).

De modo similar, debe señalarse que en el año 2015 Obregón y cols, realizaron el estudio de la composición química del aceite esencial de la Asteraceae híbrida *Carramboa tachirensis* (Aristeg.) Cuatrec. De esta manera obtuvieron como resultados compuestos químicos en cantidades significativas, entre los que se destacan germacreno-D, trans- β -guaieno, E- γ -bisaboleno, β -cariofileno, α -pineno, α -copaeno y *ent*-kaur-16-eno-19-al o kaurenal.

Dentro de este marco, los géneros parentales presentan una composición química semejante al de la especie de estudio; tal es el caso del género *Ruillopezia*, que fue evaluado a partir de ensayos fitoquímicos y específicamente mediante CG-EM donde se determinó como compuesto mayoritario presente a los ácidos kaurénicos, de este modo, se detectó en *Ruillopezia marcescens* el ácido *ent*-kaur-16-eno-19-oico **(7)** con 44,3 %, ácido *ent*-kaur-9(11)-16-dieno-19-oico **(10)** con 9,6 %, ácido *ent*-kaur-15 α -hidroxi-16-eno-19-oico **(9)** con 5,8% y el ácido 15-O-senecioxi-kaur-16-eno-19-oico con 15,9 %, en forma de ésteres metílicos (Usubillaga, Romero y Aparicio, 2003).

Paralelamente, en *Carramboa pittieri* se identificaron 41 componentes entre los que se destacan germacreno-D con 28,9 %, *ent*-kaur-16-eno-19-al 15,1 %, β -selineno 8,2 %, β -cariofileno 6,1 % y α -copaeno con 5,1 %. Donde dichos componentes identificados representaron el 94,2 % del total del aceite obtenido de la especie parental (Rojas, Gutiérrez, Cordero y Usubillaga, 2008).

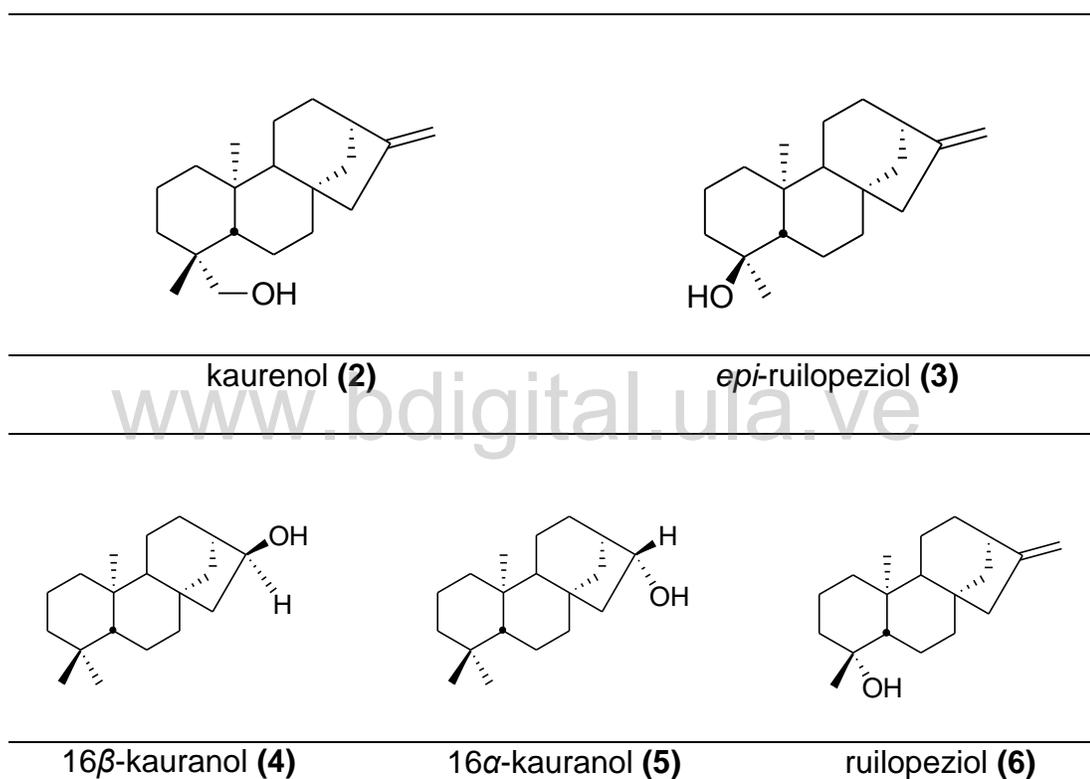
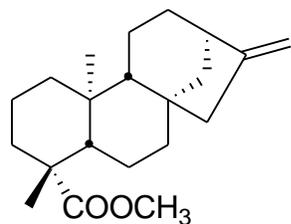
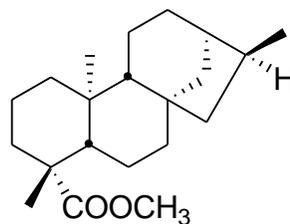


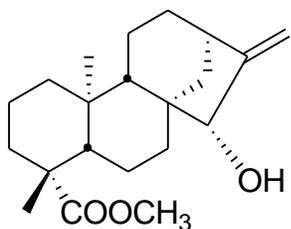
Figura 3. Estructuras de la fracción neutra presente en *Carramboa tachirensis*. Tomado y modificado de Obregón, Rojas, Aparicio y Usubillaga, 2021.



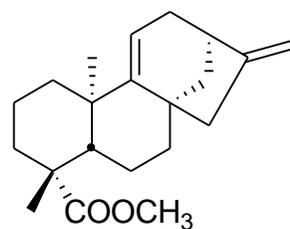
Ácido *ent*-kaur-16-eno-19-oico (7)



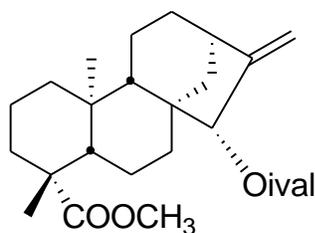
Ácido *ent*-kaur-19-oico (8)



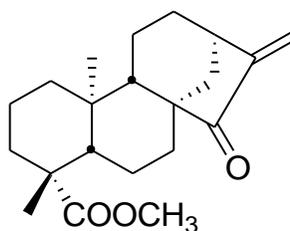
Ácido *ent*-kaur-15 α -hidroxi-16-eno-19-oico (9)



Ácido *ent*-kaur-9(11)-dieno-19-oico (10)



Ácido *ent*-kaur-15 α -isovaleroxi-16-eno-19-oico (11)



Ácido *ent*-kaur-15-oxo-16-eno-19-oico (12)

Figura 4. Estructuras de la fracción ácida presente en *Carramboa tachirensis*. Tomado y modificado de Obregón, Rojas, Aparicio y Usabillaga, 2021.

Productos Naturales

Gutiérrez y Estévez en el 2009, definieron a los productos naturales como un conjunto de procesos en el que participan compuestos con una distribución mucho más limitada y específica según el ser vivo. Además, son considerados como productos para la adaptación de un organismo y su supervivencia, son específicos para un grupo de especie taxonómicamente relacionada y se encuentran en poca cantidad. Por consiguiente, están formados a partir de los metabolitos primarios cuya síntesis requiere de la luz solar, por ende, esto es considerado como proceso endotérmico.

No obstante, existen organismos incapaces de absorber la luz, pero obtienen su energía de la degradación de carbohidratos. Por lo tanto, el acetil-CoA, el ácido shikímico y el ácido mevalónico son los principales intermediarios, cuyo trabajo en conjunto o por sí solos puede biosintetizar los productos como los ácidos grasos, antraquinonas, terpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas, lignanos, entre otros (Figura 5).

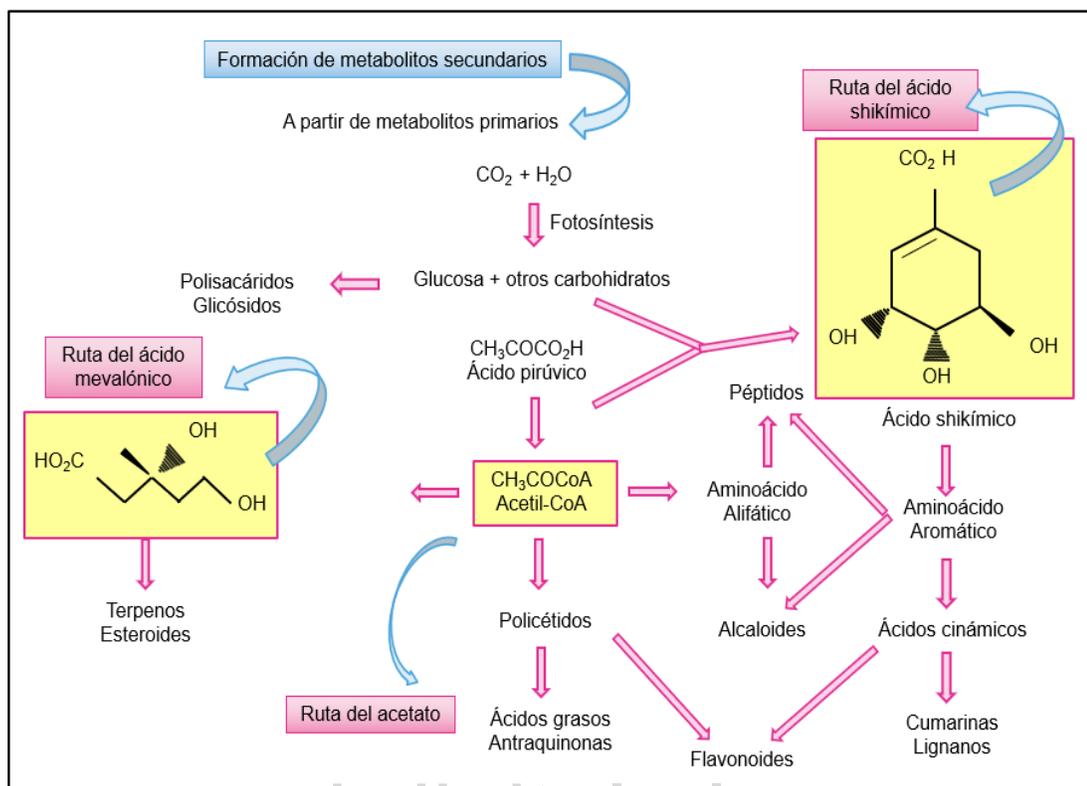


Figura 5. Formación de los Metabolitos Secundarios. Tomado y modificado de Gutiérrez y Estévez, 2009.

Por otro lado, en el 2009 Ávalos y Pérez determinaron algunas funciones ecológicas de los productos naturales identificándolos como atrayentes o repelentes de animales. En cierto modo, muchos son pigmentos esenciales en la reproducción, atrayendo insectos polinizadores o animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo en la dispersión de semillas. Además, pueden portarse como repelentes para proteger a la planta frente a predadores generando sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. Aun así, intervienen en los mecanismos de defensa frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales. De tal

manera, se pueden agrupar en cuatro clases principales: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides.

Rutas Biosintéticas

La síntesis de metabolitos secundarios depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos solo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico. De este modo, los metabolitos secundarios establecen cierta importancia sobre las plantas al contribuir a la defensa de la misma y ataque de las plagas, contribuyendo en su supervivencia. Sin embargo, estas moléculas orgánicas derivan su síntesis a partir del metabolismo primario descrito por Sierra, Barros, Gómez, Mejía y Suárez en el año 2018.

En efecto, los terpenos se pueden desarrollar a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetyl-CoA se condensan para formar este ácido que a su vez reacciona hasta formar isopentenil pirofosfato (IPP). O bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP. Mientras que los compuestos fenólicos también adquieren dos vías básicas implicadas en la biosíntesis: la del ácido malónico y la del ácido shikímico (Figura 6) (Aválos y Pérez, 2009).

Por el contrario, los alcaloides se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina (Aválos y Pérez, 2009).

importancia en la calidad de productos agrícolas. Cabe destacar que, entre los triterpenos (Figura 7) se encuentran esteroides y esteroles como lo es la molécula del β -sitosterol (**13**). La principal función de los esteroles en plantas es formar parte de las membranas y determinar su viscosidad y su estabilidad, aportándole la función protectora frente a insectos.

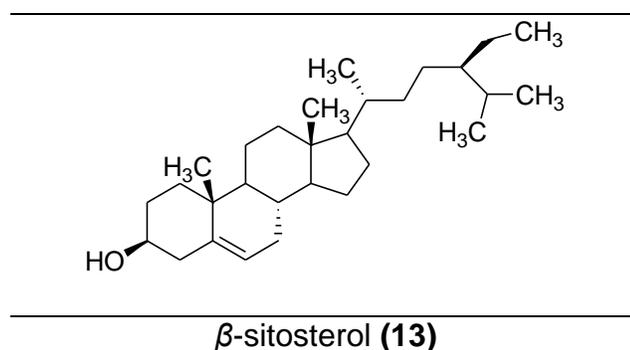


Figura 7. Estructura Química de un Triterpeno. Tomado y Modificado de Hung, Falero, Pérez, Tirado, Balcinde y Pineda, 2005.

www.bdigital.ula.ve

Compuestos Fenólicos

Los fenoles (**14**) son un grupo de metabolitos secundarios muy diverso, pueden estar representados por moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta formar polímeros complejos (Figura 8). De ahí que, entre los grupos de interés se encuentran las cumarinas, son consideradas como derivados de la lactona del ácido *o*-hidroxicinámico distribuidas libremente en las plantas, la más abundante es la umbeliferona (**15**), cuya utilidad es actuar como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación, algunas muestran fototoxicidad frente a insectos tras activarse por luz ultravioleta (UV). Por otro lado, los lignanos (**16**) son dímeros oxigenados del fenilpropano y se pueden encontrar formando una asociación paralela, se

encuentran en la pared celular de los tejidos de soporte, transporte, aportan dureza mecánica y rigidez a los tallos (Domínguez, 1973; Aválos y Pérez, 2009; Martín, 2018).

Sin embargo, los flavonoides **(17)** son pigmentos verdes caracterizados por su defensa, las antocianinas son flavonoides responsables de los colores de las flores, los frutos y las hojas contribuyendo en la polinización y en la dispersión de semillas. Ahora bien, los taninos son sustancias astringentes, solubles en agua o solventes hidroalcohólicos generando coloides para formar coágulos sobre heridas o mucosas, siendo muy eficaces durante una hemorragia, se oxidan en medio alcalino y pueden unirse a proteínas desnaturizándolas. Particularmente, la proantocianidina **(18)** representa a los polifenoles más complejos y está localizada en las semillas de la uva. Por esto, se categorizan en: taninos condensados, que no pueden ser hidrolizados, pero sí oxidados por un ácido fuerte y taninos hidrolizables, que son heterogéneos y contienen ácidos fenólicos, sobre todo ácido gálico y azúcares simples (Domínguez, 1973; Albornoz, 1992; Aválos y Pérez, 2009).

Por último, las quinonas son dicetonas insaturadas, estas se reducen a polifenoles y se regeneran en presencia de oxígeno, presentan pigmentación de amarillo a violeta e intervienen en los fenómenos de respiración y de transporte de electrones como la fumaquinona **(19)** (Domínguez, 1973).

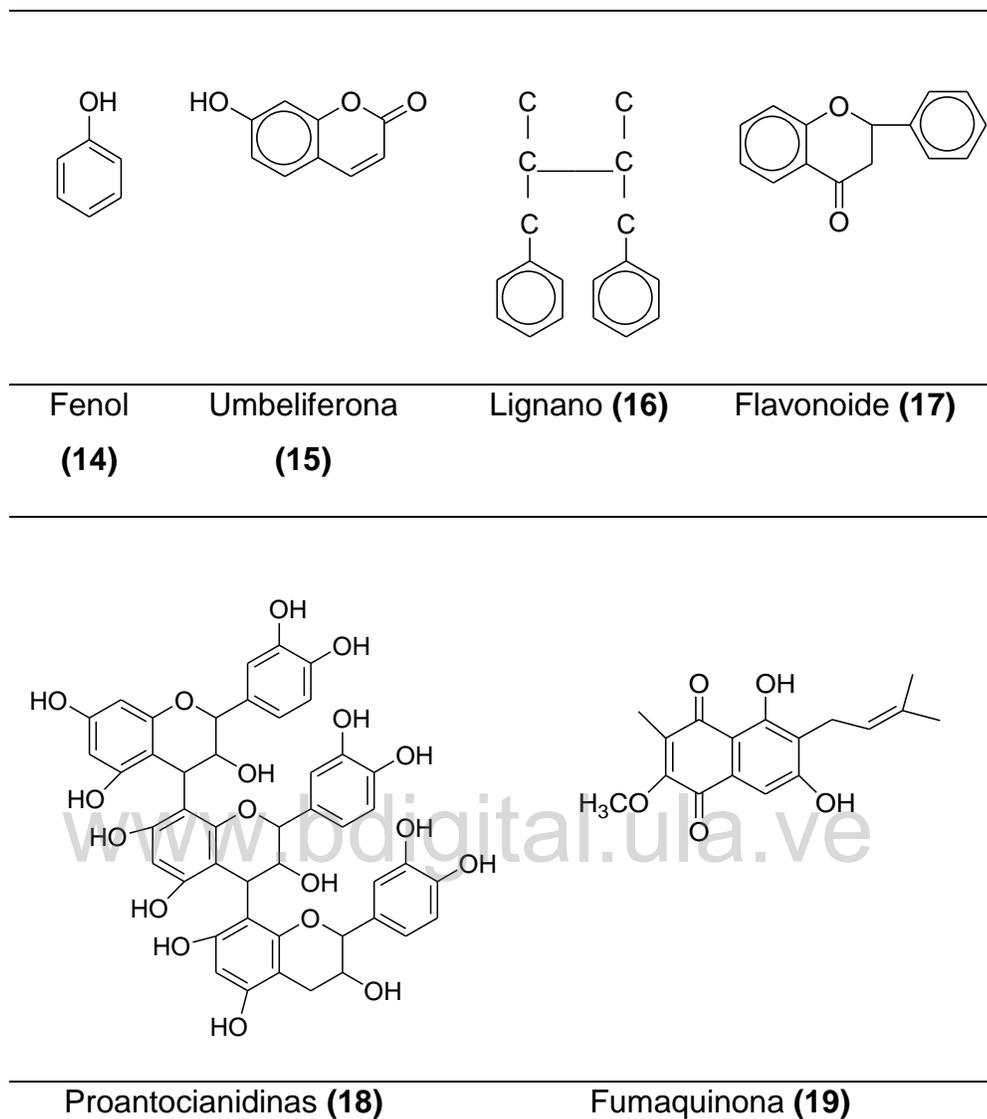


Figura 8. Estructura Química de los Compuestos Fenólicos. Tomado y modificado de Domínguez, 1973; Cortez, 2021.

Glucósidos

Los glucósidos son compuestos con un enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo (Figura 9). Existen tres categorías de interés particular, destacándose en primer lugar, las saponinas. Estas son encontradas como glicósidos esteroideos que contienen moléculas de azúcar en su estructura, poseen propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón. Las saponinas se disuelven en agua para disminuir la tensión superficial por ello al sacudir sus soluciones forma una espuma abundante y relativamente estable, cuando se realiza su hidrólisis se obtienen carbohidratos y una aglicona llamada sapogenina, la cual puede tener un esqueleto esteroideal como el de tipo colano como la esmilagenina **(20)** (Domínguez, 1973; Ávalos y Pérez, 2009).

El segundo lugar lo ocupan los glicósidos cardíacos, que son sustancias amargas muy similares a las saponinas esteroideas y conservan también propiedades detergentes, pero su estructura presenta una lactona, la porción de azúcar contiene de 3 a 5 moléculas de monosacáridos, por lo general metilpentosa y desoxiazúcares muy especiales como la convalotoxina **(21)** frecuentes en hojas y raíces (Domínguez, 1973).

Así mismo, los glicósidos cianogénicos son compuestos nitrogenados, que aparentemente al degradarse cuando la planta es aplastada liberan sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno. Por último, se ha incluido una cuarta familia, como los glucosinolatos debido a su estructura similar a los glicósidos, estos se degradan y desprenden sustancias volátiles responsables del aroma, el olor y el gusto de condimentos como la mostaza y de vegetales como el repollo, brócoli o coliflor (Ávalos y Pérez, 2009).

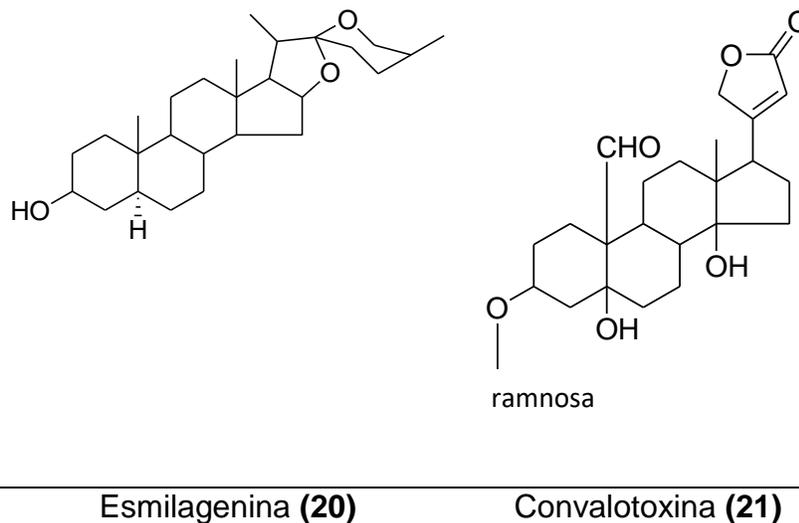


Figura 9. Estructura Química de los Glucósidos. Tomado y modificado de Domínguez, 1973.

www.bdigital.ula.ve
Alcaloides

Los alcaloides (Figura 10) son un grupo heterogéneo de bases vegetales nitrogenadas, son sólidos incoloros como laconiina (22), líquidos como la nicotina (23), amarillos como la berberina (24) o rojos como la queleritrina (25). Asimismo, se pueden distinguir al ser solubles en agua, contener al menos un átomo de nitrógeno en la molécula y exhibir actividad biológica, como la morfina. Hasta cierto modo, la mayoría son heterocíclicos como la efedrina (26), aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos, es decir, no son cíclicos (Aválos y Pérez, 2009).

Es importante destacar, que estas moléculas orgánicas son sintetizadas a partir de aminoácidos o de sus derivados inmediatos presentando cierta

toxicidad y son activas sobre el sistema nervioso central (Sierra y cols., 2018).

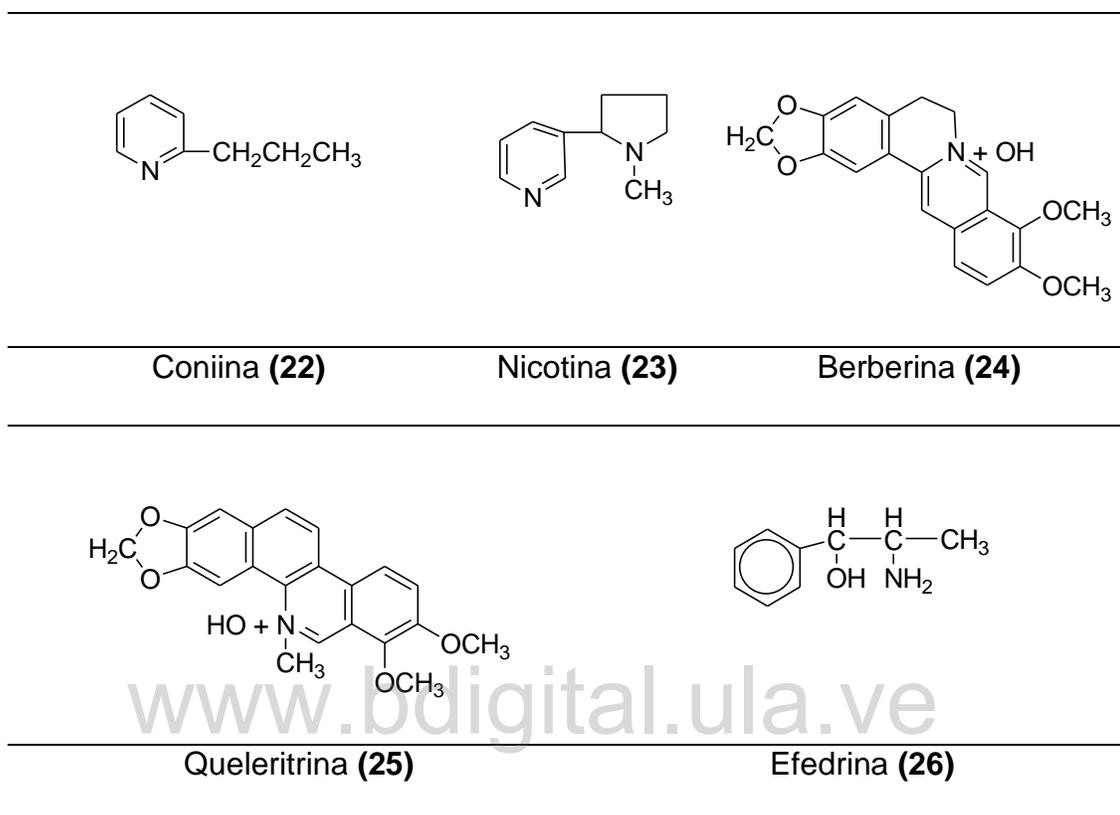


Figura 10. Estructura Química de los Alcaloides. Tomado y modificado de Domínguez, 1973.

Extractos Vegetales

García y cols en el 2010, dedujeron que los extractos vegetales son mezclas complejas de metabolitos secundarios, aislados de las plantas por diversos métodos como la destilación por arrastre de vapor, por expresión de los frutos o por medio de Soxhlet. Los principales componentes químicos de estas mezclas son mono y sesquiterpenos incluyendo carbohidratos,

alcoholes, éter, aldehídos y cetonas, los cuales son responsables de la fragancia y las propiedades biológicas tales como antiinflamatoria, antioxidante y anticancerígena. Es por eso, que actúan como biocidas en contra de una amplia gama de microorganismos como bacterias, hongos, virus, protozoarios, insectos y plantas.

Métodos de Obtención de los Extractos Vegetales

Extracción de Soxhlet

Se entiende por extracción de Soxhlet a un procedimiento que radica en la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas. Consiste en recircular los vapores condensados con un sifón a la fuente de disolvente encontrada en evaporación continua, arrastrando los principios activos de la materia prima. Por lo tanto, utiliza un solvente orgánico, el cual refluye a través de la muestra contenida en un dedal poroso de celulosa o vidrio. Posee como privilegio un contacto continuo de la muestra con una porción fresca de disolvente, simplicidad, bajo coste de adquisición y la posibilidad de procesar grandes cantidades de la droga vegetal (Sierra y cols., 2018).

Extracción con Solventes Volátiles

Es un método establecido para representar el mejor perfume original de las flores a diferencia de otros procedimientos. De este modo, la muestra seca y molienda se pone en contacto con disolventes orgánicos tales como

alcohol y cloroformo. Estos disolventes solubilizan la esencia, pero también la solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras obteniendo al final una oleorresina o un extracto impuro (Sierra y cols., 2018).

Extracción por Arrastre de Vapor

Es una técnica que consiste en vaporizar dos líquidos inmiscibles a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto de una corriente directa de vapor de agua. El vapor ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición y disminuir la temperatura de ebullición al adicionar la tensión (presión) del vapor, que se inyecta, a la de los componentes volátiles de los aceites esenciales. Los vapores que salen se enfrían hasta condensar y los dos líquidos inmiscibles: agua y aceite esencial, finalmente, se separan por gravedad (Armijo, Vicuña, Romero, Condorhuamán e Hilario, 2012).

Extracción por Maceración

Es una técnica que se fundamenta según Sierra y cols en el año 2018, en una extracción sólida-líquida donde la materia prima posee serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretende extraer. Por lo cual, el proceso genera dos productos, el sólido de esencias o el propio extracto. Es decir, la materia orgánica reposa en soluciones de alcohol por períodos de tiempo definidos y los aceites esenciales son recuperados evaporando el alcohol, generalmente en rota-vapores.

Tamizaje Fitoquímico

La composición química de los extractos puede establecerse cualitativamente mediante el tamizaje o Screening Fitoquímico, que consiste en la obtención de extractos de plantas con solventes apropiados, tales como agua, acetona, alcohol, cloroformo y éter. Otro solvente, el diclorometano, se usa específicamente para la extracción de terpenoides. Posterior a la extracción, se llevan a cabo reacciones de coloración, las cuales son reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo (Castillo, Zavala y Carrillo, 2017).

Triterpenos y/o esteroides: Estos metabolitos secundarios presentan en común un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo β y en la posición 5-6 (Domínguez, 1973).

- **Reacción de Liebermann-Burchard:** Es una prueba colorimétrica compuesta por una mezcla de ácido sulfúrico y anhídrido acético (Figura 11) que producen sustancias cromóforas con el ciclopentanoperhidrofenantreno, por el incremento de los dos dobles enlaces conjugados formados por la deshidratación e isomerizaciones en los terpenos y esteroides. Su positividad se expresa con la aparición de coloraciones roja o verde (Domínguez, 1973).

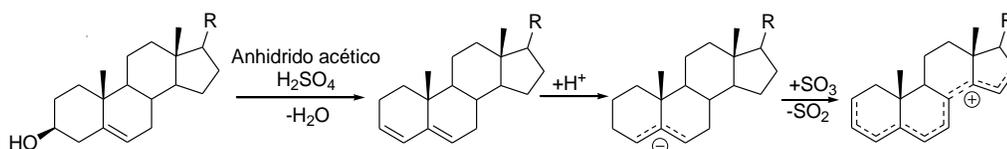


Figura 11. Reacción de Liebermann-Burchard. Tomado y modificado de Domínguez, 1973.

Sesquiterpenlactonas: Son metabolitos secundarios que se encuentran en numerosas especies o familias de plantas. El interés de estas moléculas se justifica por las múltiples actividades biológicas que presentan, entre las que se destacan la actividad antineoplásica y citotóxica, ambas vinculadas a la función del agrupamiento α -metilen- γ -lactona, al parecer por ataque nucleofílico de determinados centros activos de las proteínas al doble enlace a través de una adición de Michael (Ruiz y Suárez, 2015).

- **Reacción con Hidroxamato Férrico:** Son los ésteres, lactonas, ácidos y anhídridos, los que reaccionan con hidroxilamina formando ácidos hidroxámicos, estos generan hidroxamato férrico (Figura 12), causando un cambio en la coloración que da café o violeta cuando la prueba es positiva.



Figura 12. Reacción de Hidroxamato Férrico. Tomado y modificado de Parra, Castro y Aponte, 2016.

Cumarinas: Contienen un anillo aromático unido a un heterociclo oxígeno. Se consideran compuestos fenólicos, cuando un grupo hidroxilo está unido a un esqueleto de estructura cumarina. Un ejemplo de esto es el compuesto umbeliferona (**15**), en el que hay un grupo hidroxilo en la posición 7 en el anillo aromático (Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila y Bravo, 2014).

- **Reacción con Reactivo de Ehrlich:** Donde se genera una lactonización del ácido *cis*-*o*-hidroxicinámico o ácido cumarínico (Figura 13),

determinándose la presencia del grupo furano, la muestra se disuelve en etanol y se agrega una solución de *p*-dimetilaminobenzaldehído, en etanol y después cloruro de hidrógeno gaseoso, formándose una coloración naranja.

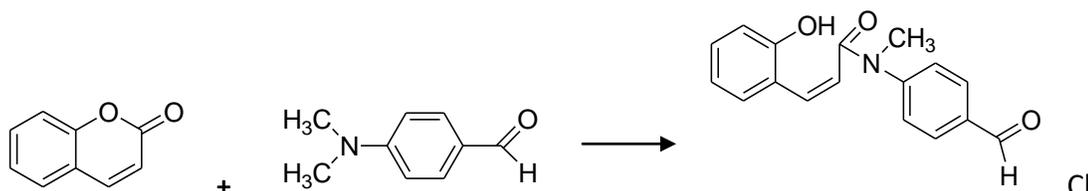


Figura 13. Reacción de Ehrlich. Tomado y modificado de Parra, Castro y Aponte, 2016.

- Ensayo de Hidróxido de Amonio: Las cumarinas presentan alta absorción en la región UV del espectro (Figura 14), refleja en presencia de amoniaco una fluorescencia variable, de azul a amarillo y a púrpura (Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011).



Figura 14. Reacción de Hidróxido de Amonio. Tomado y modificado de Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011.

Flavonoides: Denotan un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura benzo- γ -pirano, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares, en forma de glicósidos (Cartaya y Reynaldo, 2001).

- **Reacción de Shinoda:** Los extractos etanólicos que son tratados con un pequeño trozo de magnesio y unas gotas de HCl (Figura 15), generan coloraciones desde rosa muy débil hasta un rojo escarlata si están presentes flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas (flavonoides con el núcleo benzopirona). De tal manera, el hidrógeno generado produce por reducción el ión flavilio de color rojo escarlata (Domínguez, 1973; Cartaya y Reynaldo, 2001).

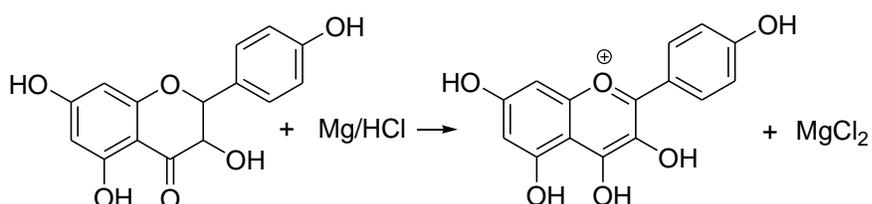


Figura 15. Reacción de Shinoda. Tomado y modificado de Domínguez, 1973.

Taninos: Se definen como metabolitos secundarios derivados de plantas que pueden ser ésteres de ácido gálico o sus derivados unidos a una amplia variedad de polifenoles, catequina o núcleos triterpenoides (Olivas, Wall, González, López, Álvarez, De La Rosa y Ramos, 2015).

- **FeCl₃:** La reacción de FeCl₃ (Figura 16) con compuestos fenólicos genera una precipitación coloración verde que sugiere presencia de derivados del catecol, este resultado se debe al ataque producido por el ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (Domínguez, 1973; Coy, Parra y Cuca, 2014).

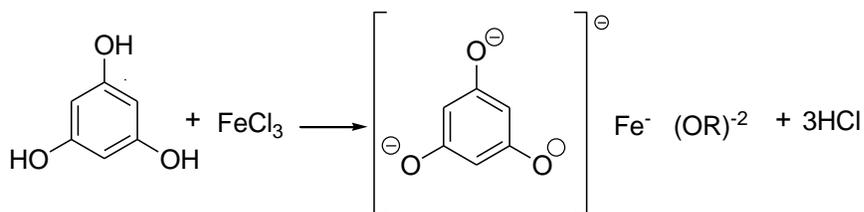


Figura 16. Reacción de FeCl_3 . Tomado y modificado de Domínguez, 1973; Coy y cols., 2014.

- Acetato de Plomo: Los taninos reaccionan con $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ (Figura 17) generando turbidez o un precipitado blanco que indica positividad en la prueba.



Figura 17. Reacción de $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$. Tomado y modificado de Parra y cols., 2016.

- Gelatina-sal: Todos los taninos reaccionan con este reactivo (Figura 18), precipitando las proteínas de sus soluciones, ya que dentro de las características de estos compuestos está la precipitación de proteínas, lo que indica positividad.

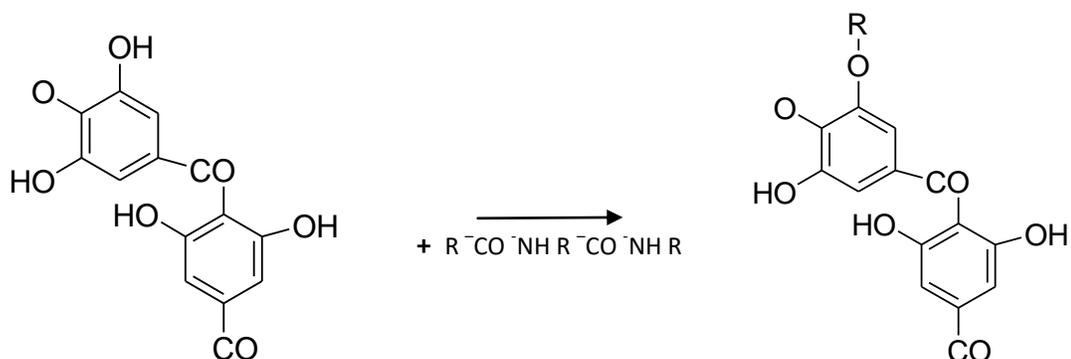


Figura 18. Reacción de Gelatina-sal. Tomado y modificado de Parra y cols., 2016.

Quinonas: Se caracterizan por un anillo diona completamente conjugado. Pueden ser clasificadas como ubiquinonas, con la coenzima Q10 como un ejemplo típico, antraquinonas cuando tienen dos anillos fenólicos en la estructura de quinona, como la emodin y naftoquinonas (poco frecuentes) que tienen un solo anillo aromático ligado al anillo conjugado por un grupo cetona doble (Peñarrieta y cols., 2014).

- Zn(s), HCl y NaOH: Las quinonas tienden a dar colores amarillos, rojos o púrpuras, en presencia de ácidos o álcalis concentrados (Figura 19).

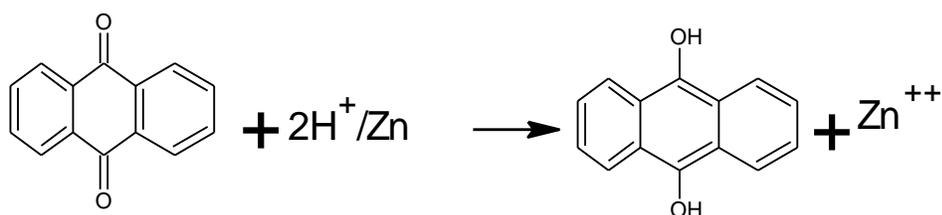


Figura 19. Reacción de Zn(s), HCl y NaOH. Tomado y modificado de Parra y cols., 2016.

Saponinas: Son metabolitos secundarios que constituyen una gran familia de compuestos estructuralmente constituidos por un anillo terpenoide

o esteroidal, conocidos como aglicona o saponina, sustituidos por oligosacáridos a través de enlaces glucosídicos que les confieren un carácter anfílico (Ahumada, Ortega, Chito y Benítez, 2016).

- Vao: La prueba con Vao para Saponinas recibe el nombre de Rosenthaler, para que el resultado sea positivo debe evidenciarse la formación de una coloración violeta en la interfase.
- Espuma: Al agitar vigorosamente la mezcla de extracto etanólico en una solución acuosa, se determinó la capacidad de formar una espuma estable que no desaparece tras pasar unos minutos. La característica estructural de estos compuestos se las confiere su carácter anfótero debido a la combinación que presentan con un grupo polar (Carbohidrato) y uno no polar (Esteroides o triterpeno), propiedad que les permite actuar como tensioactivos naturales; disminuyendo así la tensión superficial del agua (Carvajal, Uribe, Sierra y Rueda, 2009; Parra y cols., 2016).

Glucósidos Cardiotónicos: Poseen una estructura esteroidal que se caracterizan por llevar en el C-17 un anillo de lactona no saturado, los cardenólidos tienen específicamente un anillo pentagonal con un doble enlace conjugado con el grupo carbonilo. Además, y como parte de la denominada glicona, incluyen en la posición 3 moléculas de azúcar como sustituyentes (Amaringo, Hormaza y Arias, 2011).

- Prueba con Reactivo de Molish: Basada en la deshidratación del carbohidrato por ácido sulfúrico (Figura 20) o ácido clorhídrico, para producir un aldehído, que se condensa con dos moléculas de un fenol, (generalmente α -naftol, aunque otros fenoles como el resorcinol y el timol también dan productos de color), lo que da como resultado un anillo violeta.

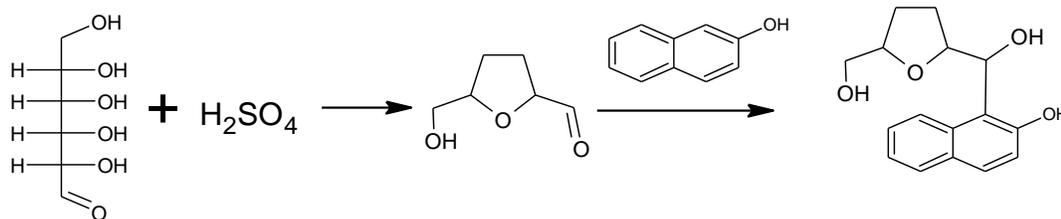


Figura 20. Reacción de Molish. Tomado y modificado de Parra y cols., 2016.

Alcaloides: Los alcaloides propiamente dichos, son de carácter alcalino, y en presencia de extractos ácidos tienen la capacidad de formar sales. Estas sales de alcaloides son solubles en medio acuoso ácido, pero cuando reaccionan con sales de metales pesados tienden a insolubilizarse formando precipitados con reactivos como el mercuriyoduro de potasio (Mayer), el yoduro de bismuto (Dragendorff) y el yoduro de potasio (Wagner), como se indican a continuación (Domínguez, 1973; Martínez, 2020):

- Reacción con reactivo de Dragendorff: Este reactivo contiene yoduro de potasio, donde al reaccionar nitrato de bismuto $Bi(NO_3)_3$ con el ácido (HCl) forman precipitados.
- Reacción con reactivo de Mayer: Precipita la mayoría de los alcaloides en medio ácido favoreciendo la formación de precipitados cristalinos de color blanco. Cuando el yoduro de potasio reacciona con el cloruro de mercurio forma un precipitado rojo de yoduro de mercurio, el cual es soluble en exceso de iones de yoduro dando la formación de un anión complejo incoloro (Parra y cols., 2016; Ochoa y Sarmiento, 2018).
- Reacción con reactivo de Wagner: Se disuelve yoduro de potasio en agua destilada, la mayoría de las soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados floculentos color marrón (Domínguez, 1973).

Bacterias

Son microorganismos pertenecientes al reino procariota, es decir que no tienen núcleo definido, su forma y tamaño es variado y algunas forman endosporas resistentes para sobrevivir en ambientes externos. También, carecen de sistemas de membranas internas y en su citoplasma se localizan cuerpos de inclusión, los ribosomas y el nucleóide junto con el material genético. Además, poseen una membrana plasmática y pared celular que es química y morfológicamente compleja conteniendo peptidoglicano (Lizarbe, 2009).

Clasificación de las Bacterias

Según su Morfología

A través de un microscopio las bacterias consiguen estar representadas por tres formas básicas. Las esféricas denominadas cocos cuyas agrupaciones son homogéneas y pueden observarse en forma de diplococos, tétradas, sarcinas, estreptococos y estafilococos. Por otro lado, las alargadas serán los bacilos, estos son cilíndricos en forma de bastón, largos y delgados o pequeños y gruesos con extremos redondeados, rectos o afilados. También, los mismos toman posiciones en forma de diplobacilos, estreptobacilos, empalizada y filamentosas. Por último, las que presentan una o varias curvas o forma de hélice estarán figuradas por los espirilos, espiroquetas y vibriones (Vargas y Kuno, 2014).

Según su Nutrición

Las bacterias se alimentan a través de su membrana al introducir sustancias desde su exterior. Sin embargo, ellas pueden catalogarse de acuerdo al origen de los alimentos, fuentes de energía y tipo de respiración. Asimismo, ante el consumo de cualquier nutriente derivado del carbono como azúcares, metano y otros hidrocarburos, son conocidas como heterótrofas. O, al contrario, son autótrofas si se alimentan del gas atmosférico dióxido de carbono (Chávez, Arreguín, Cifuentes y Rodríguez, 2017).

Ahora bien, según la obtención de energía se clasifican en fotótrofas, si adquieren su energía de luz solar o quimiótrofas, si utilizan reacciones químicas en presencia o ausencia de oxígeno. Así mismo, son litótrofas al usar compuestos inorgánicos u organótrofas porque consiguen energía de estructuras químicas que tienen el elemento carbono. Es más, a partir de ciertas reacciones químicas dentro de la célula son capaces de desprender energía en forma de ATP, la cual es el combustible celular para mantener las funciones vitales de las células (Chávez y cols., 2017).

Según su Requerimiento de Crecimiento

Factores físicos como la temperatura (Tabla 1), pH (Tabla 2) o presión osmótica constituyen como condicionantes en las interacciones biológicas y de supervivencia que desarrollan las bacterias para su crecimiento (Corrales, Antolinez, Bohórquez y Corredor, 2015).

Tabla 1. Microorganismos Encontrados en Diferentes Rangos de Temperatura.

Rango de temperatura en °C	Tipos de microorganismos
10-15	Psicrófilos
20-30	Psicrótrofos
30-37	Mesófilos
42-46	Termótrofos
50-80	Termófilos

Tomado y modificado de Corrales y cols., 2015.

Tabla 2. Microorganismos Encontrados en Rangos Diferentes de pH.

pH	Tipo de microorganismo
1,1-5,5	Acidófilos
5,5-8,0	Neutrófilos
8,5-11,5	Alcalonófilos

Tomado y modificado de Corrales y cols., 2015.

Por su parte, hay también factores químicos indispensables para el metabolismo de las bacterias como lo son las fuentes de carbono, nitrógeno (amoníaco), minerales como lo es el azufre, oxígeno molecular,

oligoelementos y factores de crecimiento. Por esto, se pueden dividir de acuerdo a sus características de aireación de la siguiente manera (Macías, Mera, Espinoza, Vite, Vallejo, Mendoza y cols., 2019):

- Los aerobios obligados solo crecen en presencia de oxígeno.
- Los anaerobios obligados solo crecen en ausencia de oxígeno.
- Los facultativos se desarrollan en presencia o ausencia de oxígeno.
- Los microaerófilos solo crecen a bajas tensiones de oxígeno.

Según su Tinción

Las bacterias reaccionan de modo distinto frente a la coloración por las diferencias estructurales en sus paredes:

Tinción de Gram: Es necesario señalar, que las grampositivas tienen un peptidoglicano en su pared celular más grueso con un gran número de uniones cruzadas, dando como resultado un plano de malla pequeña. Mientras las gramnegativas presentan un polímero con pocos entrecruzamientos que determina una malla plana de tamiz grande, pero con una pared más delgada. Por lo tanto, al agregar el yodo se forma un complejo cristal violeta-mordiente con un tamaño molecular mayor al tamiz del peptidoglicano de las positivas y menor al tamiz de las negativas (Reynoso, Magnoli, Barros y Demo, 2015).

En consecuencia, cuando se decoloran con alcohol-acetona las células grampositivas retienen el complejo colorante-mordiente y permanecen de color violeta, en cambio en las gramnegativas es alterada su capa externa de lipopolisacáridos y el complejo es eliminado. Por eso, las negativas son incoloras hasta que se le agrega el colorante de contraste (safranina) adquiriendo el color rosado (Reynoso y cols., 2015).

Coloración de Ziehl-Neelsen: Los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) como el *Mycobacterium* y *Nocardia*, contienen una gran cantidad de ceras asociadas a la mureína de la pared celular. Estas ceras de lípidos sólidos contienen ácidos grasos de cadena muy larga (ácidos micólicos) que serían la causa de la resistencia a los métodos habituales de tinción. Por lo tanto, se debe emplear alta concentración de carbolfucsina y aplicar calor, el calentamiento derrite la cera y aumenta la penetración, reteniendo el colorante (Ramírez, García, Longa, Sánchez, Nieves, Velasco, Araque y Mosqueda, 2010; Reynoso y cols., 2015).

Luego se trata con ácido-alcohol, un decolorante que elimina el color rojo de las bacterias que no son pertenecientes a este grupo. Los BAAR retienen el color rojo porque las ceras vuelven a solidificarse al enfriarse y no actúa el decolorante, mientras que los que no son BAAR permanecen incoloros hasta agregar azul de metileno que actúa como colorante de contraste logrando obtener una coloración azul (Reynoso y cols., 2015).

Teniendo en cuenta que cada aislamiento microbiano es, con una alta probabilidad, distinto de otro aislamiento de la misma especie, cuando se quiere realizar cualquier trabajo microbiológico en condiciones estándar, reproducibles en cualquier momento y lugar, es necesario efectuar el control de calidad con cepas de referencia conocidas, siendo las más importantes las brindadas por el *American Type Culture Collection* (ATCC) de Estados Unidos (EEUU). Las cepas ATCC básicas recomendadas por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de EEUU para el método de difusión son *Enterococcus faecalis* ATCC 29121, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y, entre otras, las cuales se seleccionan de acuerdo con el grupo de antimicrobianos a evaluar y el

aislado clínico que vaya a ser sometido a prueba de susceptibilidad (Morales, Castro, Mendoza, Rubiano y Pacheco, 2017).

Enterococcus faecalis

Es una bacteria grampositiva encontrada en la flora normal gastrointestinal y tracto genitourinario femenino y se ha identificado una frecuente relación con las enfermedades nosocomiales. En cierto modo, no es formador de endosporas y se presenta en forma de cocos en pares o cadenas cortas, no son móviles, son anaerobios facultativos, quimiorganótrofos con metabolismo fermentativo. En efecto, es catalasa negativa o débilmente positiva y la presencia de este microorganismo es indicativo de contaminación fecal de fuentes humanas (Díaz, Rodríguez y Zhurbenko, 2010).

Staphylococcus aureus

Es un microorganismo que se encuentra ampliamente diseminado en el ambiente debido a que posee características particulares de virulencia y resistencia. Son bacterias grampositivas cuya morfología se presenta en cocos y sus agrupaciones se asemejan a racimos de uva. También, es catalasa y coagulasa positiva, no son móviles ni presentan cápsula. Además, sus colonias son respectivamente lisas, elevadas, brillantes y con bordes enteros, presenta una consistencia cremosa y pigmentación amarilla, cuando se cultivan en agar sangre la mayoría de cepas producen β -hemólisis.

Sucede pues, que esta bacteria ha sido implicada principalmente en enfermedades transmitidas por alimentos por la capacidad del patógeno en producir toxinas (Zendejas, Ávalos y Soto, 2014; Cervantes, García y Salazar, 2014).

Escherichia coli

Es una bacteria gramnegativa, con forma de bacilo, anaerobio facultativo, usualmente móvil por la presencia de flagelos peritricos. De este modo, su hábitat es el gastrointestinal debido a su colonización en esta área pocas horas después del nacimiento del hombre. Sin duda, esta bacteria es usada como indicador de una posible contaminación fecal. Por otro lado, las pruebas bioquímicas para su identificación se establecen como oxidasa negativa, producción de indol, rojo de metilo positivo, no hidroliza la urea ni fermenta la lactosa entre otras (Rodríguez, 2002; Soto, Pérez y Estrada, 2016).

Klebsiella pneumoniae

Es un bacilo gramnegativo, no móvil, perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Se encuentra en la mucosa de la nasofaringe y del intestino del ser humano siendo la especie de mayor importancia clínica. Usualmente desarrolla cápsula y es responsable principalmente de infección del tracto urinario y neumonía en personas sin enfermedades de base, pero

la mayoría son adquiridas en el hospital o pacientes con una condición debilitante (López y Echeverría, 2010).

Pseudomonas aeruginosa

Es un patógeno ubicuo, oportunista y bastante persistente en el medio ambiente. Tiene forma de bastón con un flagelo polar de tinción gramnegativa, crece mejor en aerobiosis y presenta pili. También se encuentra relacionado con infecciones nosocomiales y de pacientes inmunosuprimidos. Además, conserva la capacidad de adaptarse a condiciones adversas como pH y osmolaridad de la orina. De tal manera, que tiene la incapacidad de fermentar lactosa, pero utiliza fuentes de carbono y nitrógeno como acetato y amoníaco obteniendo energía de la oxidación de azúcares. Finalmente, es capaz de producir una cápsula extracelular de alginato y formar varios tipos de biopelículas (Paz, Mangwani, Martínez, Álvarez, Solano y Vázquez, 2019).

Mecanismos de Resistencia de las Bacterias

En primer lugar, la resistencia natural es un carácter constante de una misma especie bacteriana siendo un mecanismo permanente determinado genéticamente y sin correlación con la dosis del antibiótico. Debe señalarse en cambio, que la resistencia adquirida es una particularidad propia de una bacteria, al ser una modificación de la carga genética ya sea por mutación o por adquisición de genes de resistencia a plásmidos, transposones e

integrones (Figura 21). Visto de esta forma, los plásmidos y transposones son elementos genéticos móviles donde se transportan los genes de resistencia. No obstante, los plásmidos son fragmentos de ADN bacteriano. Es entonces, que los transposones son secuencias de ADN que pueden ser trasladados entre cromosomas o de un cromosoma a plásmido o entre plásmidos gracias a un sistema de recombinación, y los integrones permiten capturar varios genes exógenos determinando la aparición de una cepa multirresistente (Pérez y Robles, 2013).

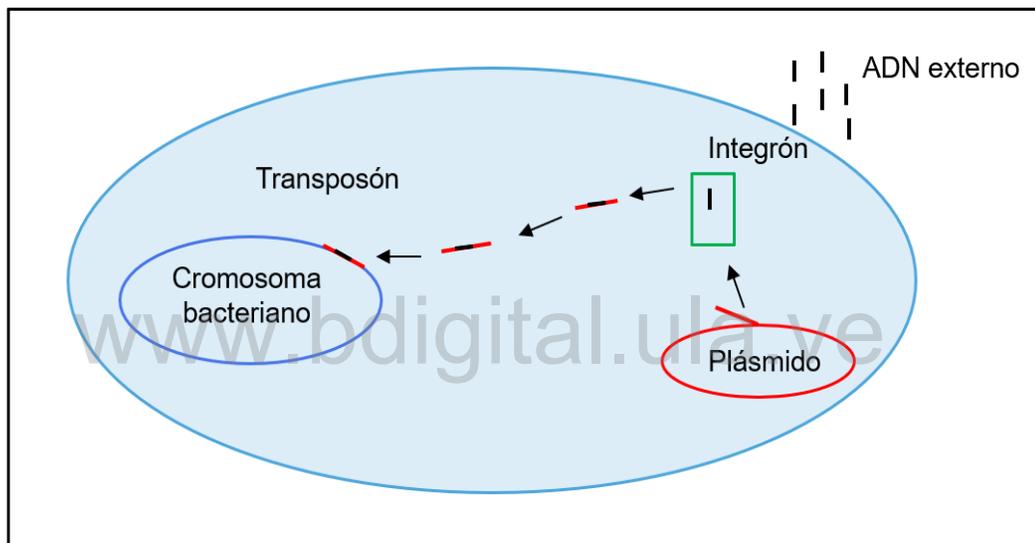


Figura 21. Plásmido, Transposón e Integrón que Confieren Resistencia Bacteriana. Tomado y modificado de Pérez y Robles, 2013

Las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos. En efecto, es aún más preocupante cuando ha desarrollado más de un mecanismo de resistencia y cuando tiene la facilidad de transmitirlo, no solo a su descendencia, sino también a otras bacterias de su misma o diferente especie. Así mismo, se conoce que estos procesos pueden ocurrir todos de

manera simultánea. A continuación, se destacan cuatro mecanismos principales (Figura 22) (Moreno, González y Beltrán, 2009):

- Enzimas hidrolíticas.
- Modificación del sitio activo.
- Disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano.
- Bombas de eflujo.

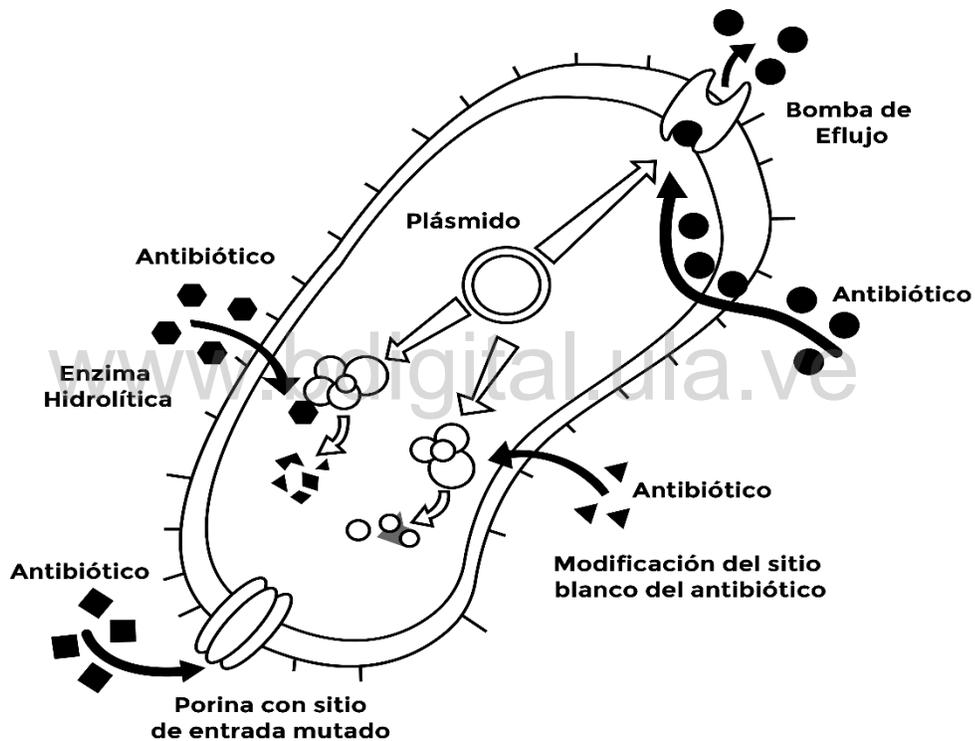


Figura 22. Mecanismos de Resistencia Antibacteriana. Tomado y modificado de Moreno, González y Beltrán, 2009

Antibióticos

Son sustancias químicas con acción farmacológica producto de un microorganismo, capaces de inhibir o destruir el crecimiento bacteriano (Millán, 2019).

Clasificación de los Antibióticos

Según su Efecto Antimicrobiano

Se pueden dividir en bacteriostáticos y bactericidas. Los primeros alcanzan concentraciones en los tejidos solamente para inhibir la multiplicación de los microorganismos sin matarlos. Por otro lado, los bactericidas tienen un efecto letal debido a que lisan o destruyen el microorganismo (Millán, 2019).

Según el Espectro de Actividad

El espectro de acción amplio consiste en actuar sobre un gran número de especies y géneros diferentes de bacterias. No obstante, los de espectro de acción reducida se encargan de producir un efecto en un grupo pequeño de microorganismos (Millán, 2019).

Según su Mecanismo de Acción

Millán en el año 2019, hace referencia como mecanismo de acción de los antibióticos a la capacidad de una sustancia química para atravesar la barrera superficial de la bacteria, llegar y fijarse en su diana. Así mismo, estos se pueden clasificar en la síntesis de la pared celular, síntesis proteica, síntesis de ácidos nucleicos, integridad de la membrana plasmática y síntesis de cofactores metabólicos.

Actividad Antibacteriana

La actividad antibacteriana según Otero y Ferrer en el 2006, se define como la capacidad de una sustancia química de matar o inhibir el crecimiento. También inhibir la síntesis de la pared celular, aumentar la permeabilidad de la membrana y síntesis de proteínas. Además, producir reducción de la población bacteriana en el huésped.

Métodos para Determinar la Actividad Antibacteriana

Existen diferentes métodos de laboratorio que han sido empleados para evaluar *in vitro* la susceptibilidad de las bacterias ante agentes microbianos. Sin duda, es evidente discutir que los resultados pueden ser influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de susceptibilidad de cada compuesto evaluado. Finalmente, se pueden describir las siguientes técnicas (Ramírez y Marín, 2009):

Método de Difusión en Agar

Este procedimiento fue diseñado por Bauer, Kirby, Sherris y Turck desarrollado en 1966 cuyo protocolo consiste en establecer de forma cuantitativa el efecto de un conjunto de antibióticos sobre las cepas bacterianas aisladas de procesos infecciosos. Análogamente, se basa en la relación entre la concentración del antibiótico y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa en un medio de cultivo. Por esto, el inóculo debe ser sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar sobre la cual se deposita discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro. En el caso de evaluar varias sustancias de disco de papel de filtro, se deben colocar de manera equidistante y se procede a incubar por 24 horas, luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos observados con el antibiótico control (Ramírez y Marín, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Método de Difusión en Agar en Pozo Modificado

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer y cols (método de Kirby-Bauer) en 2009. Este método de difusión en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad por sus siglas en inglés NCCLS, de Estados Unidos. El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997; Sierra, Romero y Orduz, 2012).

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

Método de Dilución

www.bdigital.ula.ve

Esta técnica según Ramírez y Marín en el año 2009, es usada para determinar la concentración mínima bactericida y la concentración inhibitoria mínima (CIM). Es decir, busca encontrar la concentración más baja de sustancia que puede prevenir el crecimiento de un microorganismo. Así mismo, se usan tubos o micro-placas que contienen las concentraciones del extracto vegetal. Ahora bien, el organismo en estudio es inoculado en los diferentes pozos de las micro-placas y la CIM es determinada después de la incubación. En el método de dilución en agar, las cajas se siembran por profundidad con una determinada concentración de extracto vegetal. Acto seguido, se realiza la inoculación con el microorganismo en estudio y se incuba por 24 horas, después de esta se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas.

Concentración Inhibitoria Mínima

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución. A su vez, esta técnica permite confirmar la resistencia inusual dando respuestas definidas cuando el resultado obtenido bajo otros métodos es indeterminado. Primeramente, se puede realizar en micro dilución y con las placas de 96 pocillos 12 mm x 8 mm, en las que se estudia en cada una de ellas, el mismo microorganismo, 8 antimicrobianos y 11 diluciones usando la última columna como control de crecimiento (Ramírez y Marín, 2009).

Además, la placa de micro dilución debe sellarse con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben. Posterior a la incubación se observa la turbidez o se procede a la adición del bromuro. Sin embargo, las células vivas son capaces de reducir este compuesto de color amarillo a una solución de formazán, que es un agregado insoluble que precipita en forma de cristales violeta, evidenciando de esta forma actividad metabólica (Ramírez y Marín, 2009).

Definición Operacional de Términos

Principio Activo

Son aquellos componentes presentes en las plantas medicinales con acción farmacológica; a su vez son extraídos a partir de una droga vegetal, con la finalidad de provocar una acción en el organismo, estos pueden ser de

diferentes tipos y se puede clasificar en metabolitos primarios y secundarios (Carrión y García, 2010).

Metabolito Primario

Es el resultado de varias reacciones químicas catalizadas por las enzimas y proporcionando a las células la energía y macromoléculas indispensables para la construcción de células, se producen por lo general durante el crecimiento exponencial. De esta manera, la mayor parte del carbono, nitrógeno y de la energía térmica son convertidos en elementos comunes y necesarios para su funcionamiento como los aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos (Ávalos y Pérez, 2009).

Droga Vegetal

Son aquellas porciones de las plantas medicinales que contienen en mayor o menor proporción uno o varios de los principios activos que se extraen; los mismos pueden ser hojas, flores, frutos, tallos, raíces o semillas (Carrión y García, 2010).

Planta Medicinal

Es una especie vegetal con sustancias químicas o principios activos que tienen propiedades terapéuticas o se pueden utilizar para la fabricación de fármacos (Sierra y cols., 2018).

Resistente

Se describe como aquellas cepas bacterianas que no son inhibidas por las concentraciones séricas del antibiótico normalmente alcanzadas con las dosis habituales del mismo. Por lo tanto, la bacteria posee un mecanismo de resistencia o la eficacia clínica del antibiótico frente al microorganismo no ha sido comprobada (Ramírez y cols., 2010).

Intermedio

Es una categoría clínica descrita para las pruebas de susceptibilidad *in vitro*. De esta forma, las cepas bacterianas pueden ser inhibidas por concentraciones del antibiótico superiores a las dosis habituales, siempre y cuando se puedan aumentar las dosis empleadas y que el antibiótico se concentre fisiológicamente en el tejido o lugar infectado (Ramírez y cols., 2010).

www.bdigital.ula.ve

Sensible

Implica que una enfermedad proporcionada por una bacteria puede ser tratada adecuadamente con la dosis de antibiótico establecida para el tipo de infección y especie infectante, a menos que existan contraindicaciones (Ramírez y cols., 2010).

Operacionalización de las Variables

Según Palella y Martins en 2010 una variable es un concepto abstracto y por ende no medible. Por esto, la operacionalización es un proceso en el cual se determinan los indicadores que caracterizan las variables de una investigación. Todo esto a fin de hacerlas medibles y observables con un grado de precisión y facilidad. A continuación, se presenta el cuadro de Operacionalización de las Variables (Tabla 3 y 4).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 3. Operacionalización de la Variable Independiente: Composición Química del Extracto de las hojas de *Carramboa tachirensis*.

Variable	Tipo	Definición conceptual ¿Qué es?
Composición química del extracto de las hojas de <i>Carramboa tachirensis</i> .	Independiente Explicativa	Los extractos son mezclas complejas de metabolitos secundarios aislados de las plantas (García y cols., 2010).
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
Pruebas químicas cualitativas preliminares también conocidas como Tamizaje fitoquímico	Triterpenos y/o Esteroles: Reacción de Liebermann-Burchard.	Coloración verde para esteroles o rojo para triterpenos.
	Sesquiterpenolactonas: Hidroxamato férrico	Coloraciones roja, violeta o rosa
	Compuestos fenólicos: Tricloruro férrico.	Coloración de azul a negro
	Cumarinas: Hidróxido de amonio.	La presencia de fluorescencia azul-violeta.
	Flavonoides: Reacción de Shinoda.	Coloración naranja a rojo para flavonas; si es rojo flavonoles y magenta flavononas.
	Taninos: Prueba de gelatina.	Un precipitado blanco indica presencia de taninos.
	Antraquinonas: Hidróxido de amonio.	Aparición de una coloración roja.
	Quinonas: Ácido sulfúrico concentrado	
	Saponinas: Prueba de espuma.	Formación de abundante espuma
	Glicósidos cardiotónicos: Ensayo de Kedde	Coloración púrpura o violácea.
Alcaloides: Reacciones de Dragendorff, Mayer y Wagner.	Aparición de turbidez o precipitados.	

Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.

Tabla 4. Operacionalización de la Variable Dependiente: Actividad Antibacteriana del Extracto de las hojas de *Carramboa tachirensis*

Variable	Tipo	Definición conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana del extracto de las hojas de <i>Carramboa tachirensis</i> .	Dependiente Explicada	Es la capacidad de una sustancia química que puede matar o inhibir el crecimiento y puede también inhibir la síntesis de la pared celular, aumentar la permeabilidad de la membrana celular e interferir con la síntesis de proteínas. Además, puede producir reducción en la población bacteriana en el huésped (Otero y Ferrer, 2006).
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
-Método de difusión en Disco (Kirby-Bauer).	<p>Cepas grampositivas: -<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212) - <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)</p> <p>Cepas gramnegativas: -<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) -<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 23357) -<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)</p>	Presencia o ausencia del halo de inhibición (mm) frente a cepas grampositivas y gramnegativas.

Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Hurtado en el 2012, señala el tipo de investigación como el grado de profundidad y tipo de resultado, y que está en concordancia con el objetivo general. Además, existen diez tipos de investigación, tales como: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. Entre ellos, la investigación de tipo confirmatoria tiene como propósito verificar la hipótesis. En tal sentido, la investigación que se realizó tuvo como finalidad establecer la relación entre la composición del extracto obtenido de las hojas de *Carramboa tachirensis* y la actividad antibacteriana, frente a cepas de referencia internacional.

Diseño de Investigación

El diseño de investigación tiene que ver con los procedimientos específicos para recoger los datos (Hurtado, 2012). Esta investigación tuvo un diseño de campo porque la muestra fue recolectada en fuentes vivas.

Así mismo, fue cuasi experimental debido a que el extracto se sometió a determinadas condiciones para observar los efectos de la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional. También, fue de laboratorio a causa de que los datos se recolectaron en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Además, el estudio se llevó a cabo en la actualidad por esa razón es estimado como contemporáneo. Adicionalmente la muestra se recolectó en una sola oportunidad por eso es considerado transversal y es bivariable ya que involucra una variable dependiente como una independiente.

Población y Muestra

www.bdigital.ula.ve

Unidad de Investigación

La población está identificada por la planta *Carramboa tachirensis*, ubicada en el páramo El Batallón camino a Pregonero, Estado Táchira, Venezuela.

Selección del Tamaño de la Muestra

La “n” muestral en esta investigación estuvo representada por las hojas de la especie *Carramboa tachirensis* perteneciente a la familia Asteraceae. Es un tipo de muestra no probabilística también llamada muestra dirigida, ya que supone un procedimiento de selección informal. Es importante destacar

una desventaja como el hecho de que, al no ser probabilística, no es posible calcular con precisión el error estándar, es decir, no podemos calcular con qué nivel de confianza hacemos una estimación. Esto es un grave inconveniente si consideramos que la estadística inferencial se basa en la teoría de la probabilidad (Hernández, Fernández y Baptista, 2010).

Sistema de Variables

Las variables de esta investigación estuvieron relacionadas con: la variable independiente: Composición química del extracto de las hojas de *Carramboa tachirensis*, y la variable dependiente: Actividad antibacteriana del extracto de las hojas de *Carramboa tachirensis*.

www.bdigital.ula.ve

Instrumento de Recolección de Datos

Los resultados de la investigación estuvieron representados mediante el uso de tablas. Además, de fotografías referentes a las distintas reacciones observadas durante el tamizaje fitoquímico y la actividad antibacteriana.

Procedimientos de la Investigación

Recolección del material vegetal

Carramboa tachirensis (Aristeg.) Cuatrec. es un híbrido perteneciente a la subtribu Espelettinae (Asteraceae), cuyas hojas fueron recolectadas en el páramo El Batallón camino a Pregonero, Estado Táchira en Venezuela a una altitud de 2800 msnm. Un ejemplar de comprobante (G. Morillo y L. Rojas 13520) fue depositado en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes e identificado por el profesor Gilberto Morillo de la Facultad de Ciencias Forestales y Medio Ambiente de la Universidad de Los Andes (Obregón y cols., 2015).

www.bdigital.ula.ve

Obtención del Extracto

Los extractos fueron obtenidos en el Laboratorio “A” del Instituto de Investigaciones “Dr Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, donde las hojas de *Carramboa tachirensis* fueron separadas del resto del material vegetal y colocadas por separado en la estufa a 40 °C y posteriormente se molieron. Para llevar a cabo el proceso de extracción de los componentes de la planta, se pesaron 100 g del material seco y molido de hojas y se empleó el método de extracción por maceración, que consistió en remojar el material, con solventes de polaridad creciente como etanol (alcohol etílico) y agua.

Tamizaje Fitoquímico

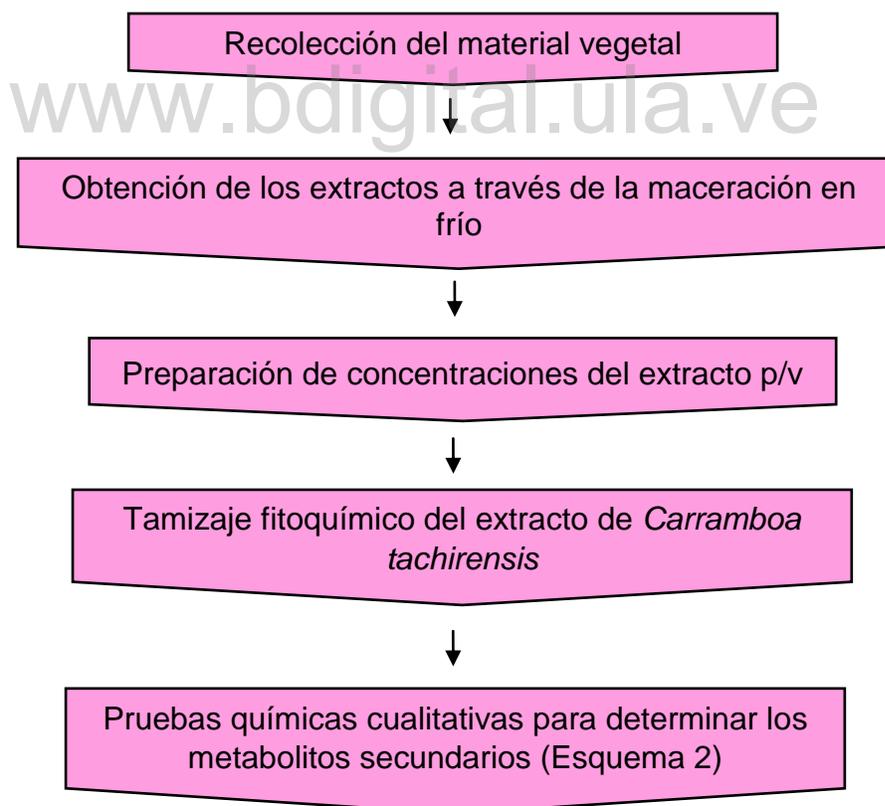
Ante todo hay que acotar, que cada metabolito secundario recibe un trato diferente en cuanto a las pruebas preliminares, para la identificación de sus componentes (Esquema 1). Siguiendo el mismo orden de ideas, las pruebas químicas empleadas para la determinación de estos metabolitos (Esquema 2) de la planta de estudio serán representadas a través de las siguientes pruebas (Domínguez, 1973; Albornoz, 1992; Castillo y cols., 2017):

- **Triterpenos y Esteroles:** El extracto se disolvió en cloroformo y se agregó 1 mL de anhídrido acético y luego 1 gota de ácido sulfúrico por las paredes del tubo, llevándose a cabo la reacción de Liebermann-Burchard, lo que evidencia el positivo con la formación de un anillo verde o azul para esteroles y un anillo rojo, magenta o violeta para triterpenos.
- **Sesquiterpenlactonas:** El extracto se colocó en un tubo de ensayo, al que se le adicionó hidróxido de sodio al 10 % incorporando un color amarillo o naranja a la solución, al agregar el ácido clorhídrico se debe perder el color inicial indicando la presencia de este metabolito.
- **Polifenoles:** El extracto evaporado a sequedad se retomó con su respectivo disolvente en un tubo de ensayo, se le agregó una gota de cloruro férrico al 1 %, la formación de la tonalidad azul a negro indica aquellos derivados del ácido gálico y las coloraciones verdes derivados del catecol.

- **Cumarinas:** El extracto se disolvió en el solvente de origen y se le adicionó hidróxido de amonio, luego se colocó en una lámpara de luz ultravioleta, lo que evidencia la reacción positiva con la emisión de una fluorescencia color azul.
- **Flavonoides:** El extracto disuelto en etanol se colocó en un tubo de ensayo con virutas de magnesio y HCl concentrado; la presencia de la coloración roja, magenta, fucsia o amarillo al dejar reposar por 15 minutos indica reacción positiva. En otro tubo se trató el extracto con hidróxido de sodio al 10 %, la positividad se refleja al aparecer los siguientes colores: amarillo a rojo de xantonas y flavonas, de café a naranja flavonoles, de purpura a rojizo chalconas y azul antocianinas.
- **Taninos:** El extracto crudo se trasvasó a un tubo de ensayo con una solución al 1 % de gelatina en cloruro de sodio, logrando que se produzca una precipitación por desnaturalización de la gelatina que evidencia presencia de taninos.
- **Quinonas:** El extracto se sitúa en una cápsula de porcelana al que se le agrega ácido sulfúrico concentrado, el reporte muestra su positividad cuando aparece un matiz rojo.
- **Saponinas:** Una porción del extracto seco se disolvió en 1 mL de agua para posteriormente someterlo a una vigorosa agitación durante un minuto, lo que evidencia la reacción positiva con la formación de abundante espuma que se mantiene por 1 hora.

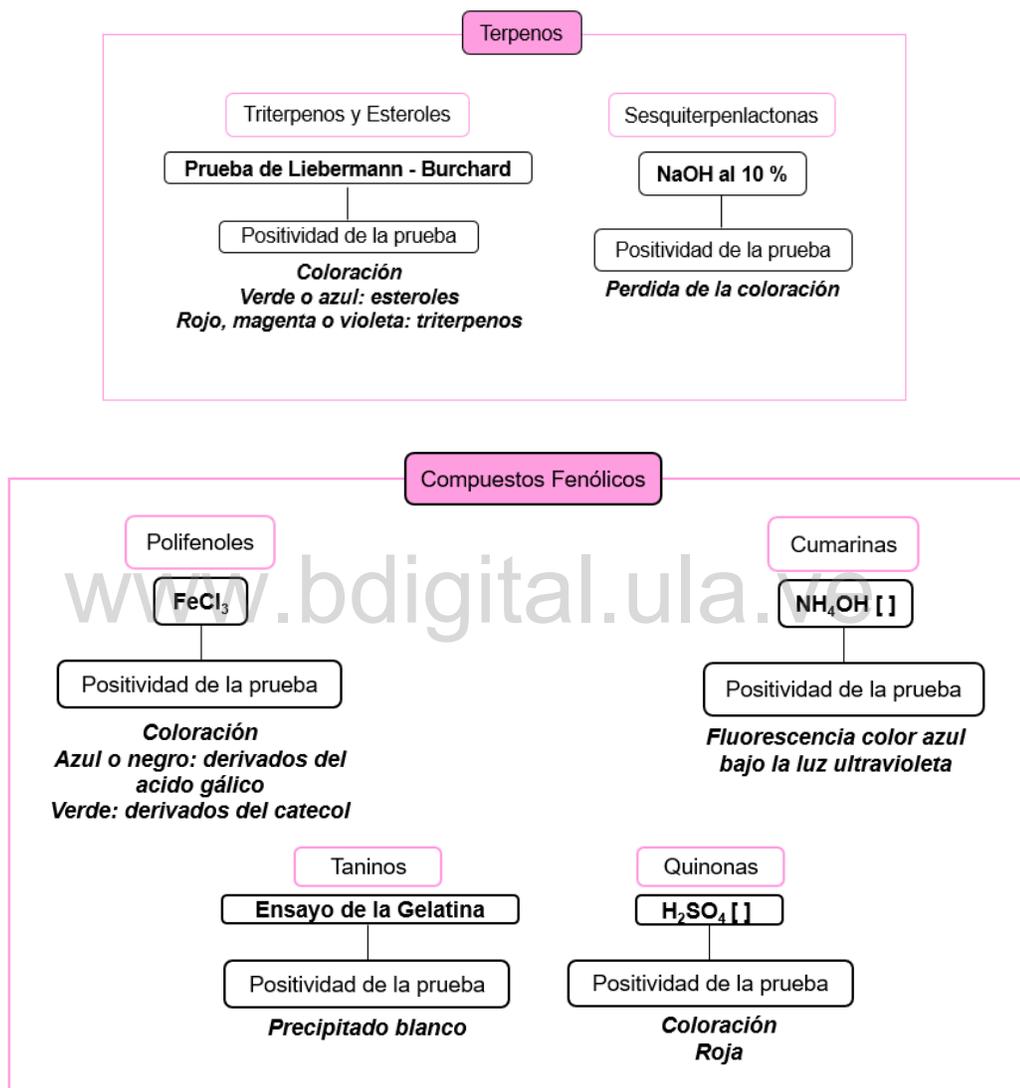
- **Alcaloides:** El extracto se retomó con 8 mL de HCl al 10 % y se sometió a calentamiento, luego se dejó enfriar y seguidamente se filtró y se trasvasó a 3 tubos de ensayo para tratarse por separado con los reactivos de Dragendorff, Mayer y Wagner, con la finalidad de detectar alcaloides débilmente básicos, básicos y sales cuaternarias de amonio. Es así entonces, que el reactivo de Dragendorff se evidencia con un precipitado de rojo a naranja, el de Mayer con un precipitado blanco y el de Wagner con un precipitado rojo pardo.

Esquema 1. Procedimiento para la Identificación de los Componentes de *Carramboa tachirensis*



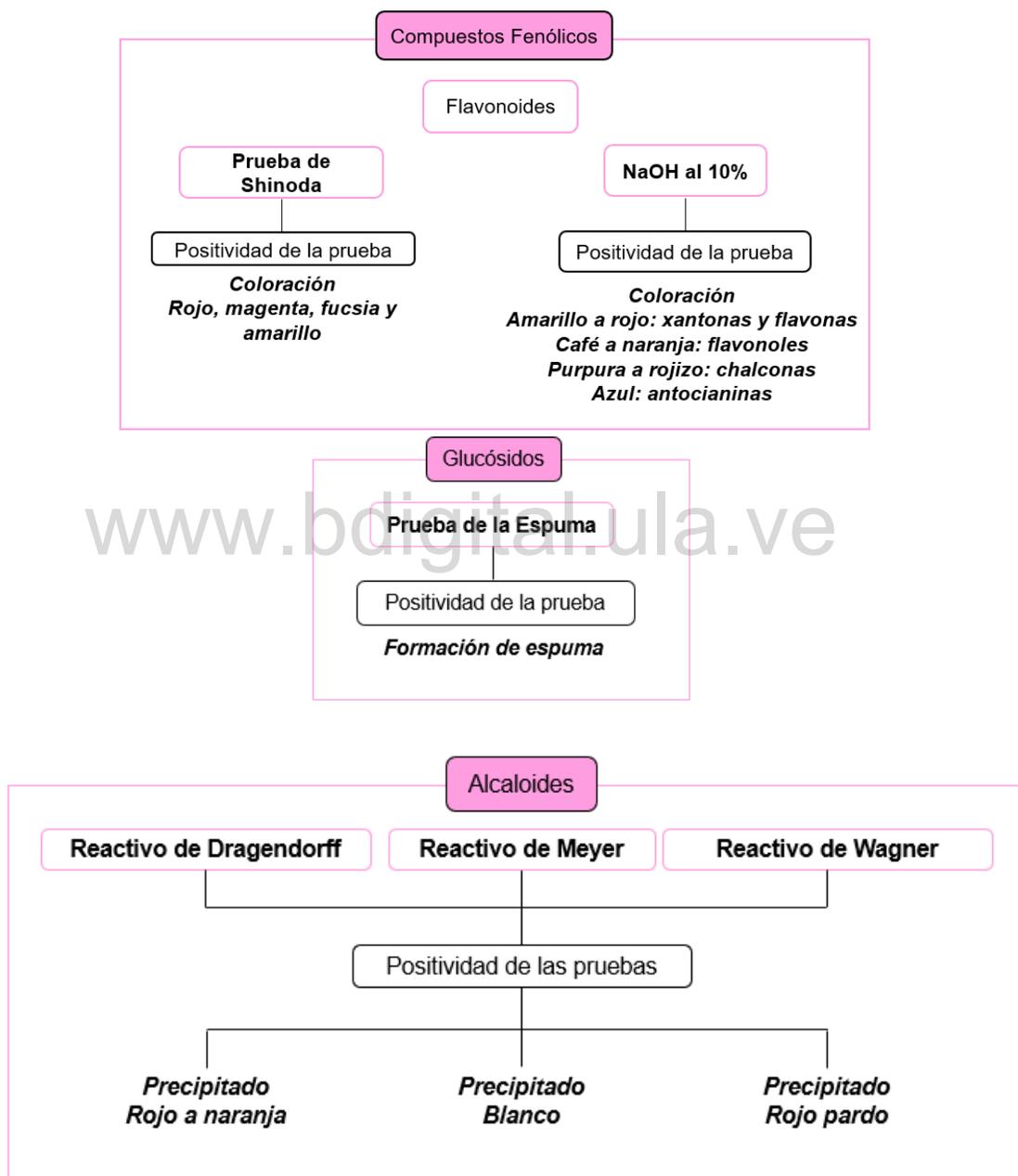
Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.

Esquema 2. Pruebas Químicas Cualitativas para Determinar los Metabolitos Secundarios de los Extractos de las Hojas de *Carramboa tachirensis*



Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.

Esquema 2. Pruebas Químicas Cualitativas para Determinar los Metabolitos Secundarios de los Extractos de las Hojas de *Carramboa tachirensis* (Continuación)



Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.

Actividad Antibacteriana

Reactivación de las Cepas Bacterianas

El cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes bajo la responsabilidad de la Lic. María Eugenia Nieves facilitó a esta investigación 3 cepas gramnegativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*; además 2 cepas grampositivas: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*; a las que se dio el tratamiento respectivo y se usó el aislamiento y repique adecuado en medio BHI, por sus siglas en inglés (Brain Heart Infusion), para posteriormente lograr probar la actividad antibacteriana del extracto (Pérez, 2019).

Determinación de la Actividad Antibacteriana

La actividad antibacteriana por el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) se realizó en el Laboratorio de Actinomicetos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes bajo la responsabilidad de la Dra. Yndra Cordero y el Auxiliar de Laboratorio Emilio Salazar, llevándose a cabo a mediante los siguientes pasos (Esquema 3):

- **Obtención de los Microorganismos:** Se seleccionaron 5 cepas bacterianas de referencia internacional pertenecientes a la *American Type Culture Collection* (ATCC), las cuales se utilizaron para comprobar

la actividad antibacteriana de los extractos en estudio, grampositivas: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), gramnegativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

- **Preparación de los Inóculos Bacterianos:** El ensayo se realizó a partir de una placa de cultivo de 18 horas de cada microorganismo en agar Müeller-Hinton a 37 °C. Una vez obtenidas las cepas bacterianas frescas y purificadas, se preparó el inóculo bacteriano tomando una cantidad de las colonias de cada microorganismo con la ayuda de un asa en aro estéril y se suspendió en solución salina fisiológica (NaCl al 0,85 %) ajustándose a una turbidez del 0,5 de la escala de McFarland ($\times 10^{6-8}$ UFC/mL) (Prescott, Harley y Klein, 2004).

www.bdigital.ula.ve

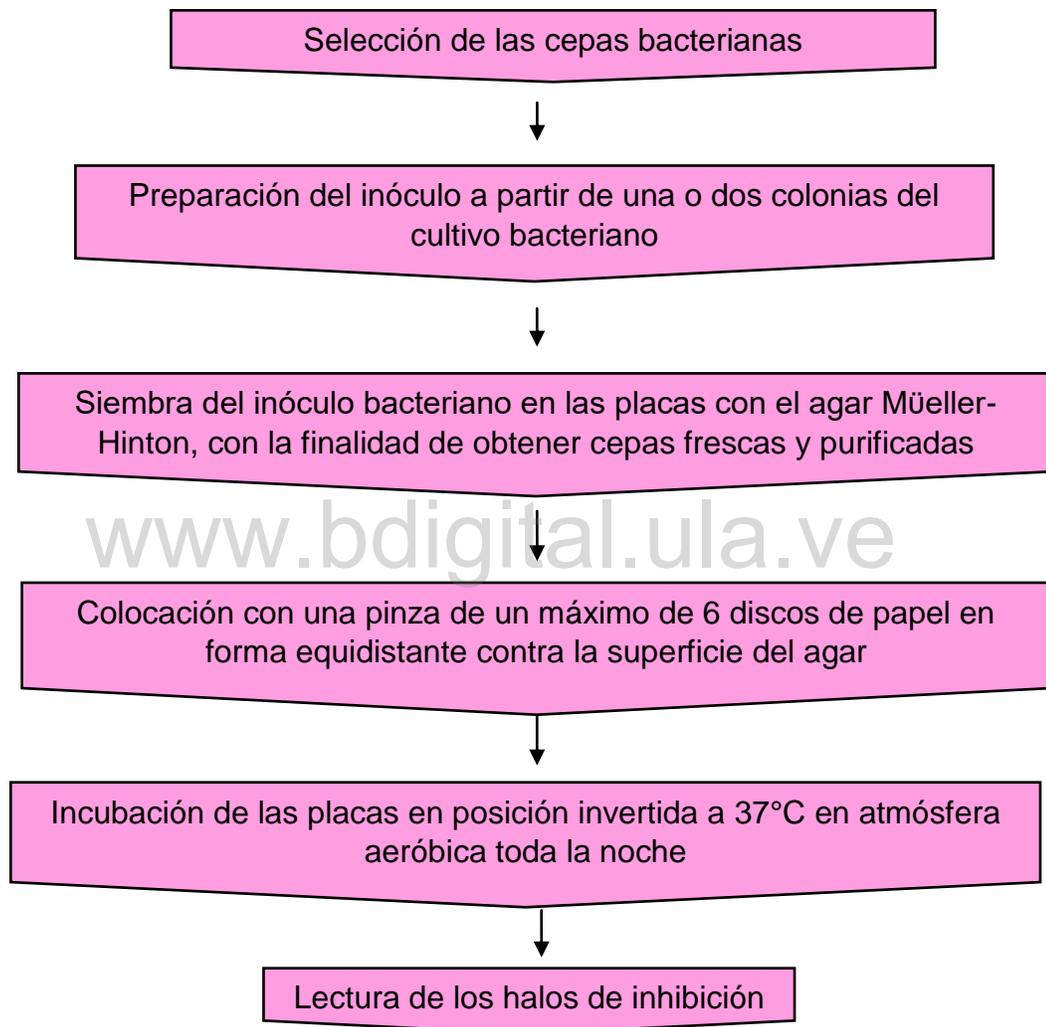
- **Preparación del Material para la Actividad Antibacteriana:** Se prepararon las placas con aproximadamente 20 mL de agar Müeller-Hinton, las cuales fueron esterilizadas previamente y por último se dejaron solidificar para su posterior uso.
- **Preparación de la Muestra:** Se pesaron 10 mg del extracto en 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener así una solución con una concentración de 10000 ppm para cada extracto.
- **Inoculación de las Placas y Determinación de la Actividad Antibacteriana por el Método de Difusión de Agar (Kirby – Bauer):** Se realizó la inoculación de las placas de agar Müeller-Hinton tomando un inóculo de cada bacteria y deslizando el hisopo impregnado por la placa,

rotando la misma sin dejar ningún espacio libre, hasta lograr una siembra uniforme y se dejó secar. Posteriormente se colocaron en forma equidistante los discos de papel estériles de aproximadamente 6 mm, los cuales fueron impregnados con cada una de las soluciones de los extractos y sus respectivos controles tanto positivo como negativo. Para comprobar la sensibilidad de los microorganismos se utilizaron como control positivo los siguientes antibióticos de uso comercial: Ampicilina® (AMP) de 10 µg, Eritromicina® (ERI) de 15 µg y Piperacilina® (PIP) de 100 µg, con el fin de inhibir el crecimiento bacteriano. El control negativo consistió en un disco de papel impregnado con Dimetilsulfóxido (DMSO), el cual se utilizó para disolver la muestra y se dejaron incubando por un lapso de 24 horas a 37 °C.

- **Lectura de los Halos de Inhibición:** Finalizado el tiempo de incubación, se llevó a cabo la lectura de los halos de inhibición los cuales fueron expresados en milímetros (mm).

A título ilustrativo, indicaremos que las placas se deben incubar a 37 °C en la atmósfera adecuada. Sin embargo, se debe evitar en lo posible la incubación en presencia de CO₂, ya que modifica el pH del medio y esto puede afectar la actividad de algunos antibióticos. La lectura se debe realizar entre 18 y 24 horas. Este método es adecuado únicamente para bacterias patógenas de crecimiento rápido. Una incubación más prolongada puede dar lugar a interpretaciones erróneas del halo de inhibición (Gamazo, López y Díaz, 2005).

Esquema 3. Procedimiento para Determinar la Actividad Antibacteriana del Extracto de las Hojas de *Carramboa tachirensis* por el Método de Difusión en Agar (Kirby - Bauer)



Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.

Diseño de Análisis

Los datos recolectados en la presente investigación fueron analizados desde un punto de vista cuali-cuantitativo. Palella y Martins en 2010 refieren que los datos sean medidos numéricamente con el fin de ser analizados a través de operaciones matemáticas. Siendo estudiadas las características que se midan según su naturaleza cuantitativa o cualitativa. Asimismo, dichas características cuantitativas pueden ser discretas o continuas y tienen una escala de medida de intervalo y de razón. Por otro lado, las características cualitativas tienen una escala de medida nominal y ordinal.

El universo de esta investigación fue representado por las plantas de la familia Asteraceae. Además, la población de estudio es la especie *Carramboa tachirensis*. Finalmente, la muestra estuvo representada por las hojas de la especie en estudio.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Inicialmente, las hojas de *Carramboa tachirensis* fueron secadas en una estufa, posteriormente molidas y colocadas en maceración con disolventes polares como el etanol y agua, después el líquido se filtró y concentró el rotavapor hasta obtener los extractos secos, para ser almacenados a temperatura ambiente en un frasco de vidrio seco y limpio.

El extracto etanólico presentó un aspecto sólido, un olor a caramelo y su peso fue de 32,76 g, por otro lado, el extracto acuoso conservó el aspecto de un líquido con olor característico y peso de 155,57 g, siendo representados ambos extractos por una tonalidad marrón oscuro. Cabe resaltar, que el peso del material seco fue de 1500 g y el porcentaje de rendimiento, así como las características macroscópicas de los extractos se encuentran reflejados en la Tabla 5.

Tabla 5. Características Macroscópicas de los Extractos Etanólico y Acuoso de las hojas de *Carramboa tachirensis*

Características	Extracto Etanólico	Extracto Acuoso
Aspecto	Sólido	Líquido
Color	Marrón oscuro	Marrón oscuro
Olor	Caramelo	Característico
Peso del extracto	32,76 g	155,57 g
Rendimiento del extracto	2,18 %	NR*

Leyenda: NR: No se Realizó*.

Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.

***Nota:** No se determinó porque no se logró concentrar a sequedad el extracto acuoso.

Tamizaje Fitoquímico

El material vegetal se sometió a un conjunto de ensayos cualitativos para la determinación de metabolitos secundarios, ya que arrojan información preliminar acerca de su composición para conocer su potencial, este procedimiento consistió en obtener extractos de la planta para poder comparar estos compuestos extraídos con disolventes de diferentes polaridades, posteriormente realizando pruebas de coloración y precipitación con la intención identificar dichas sustancias de interés.

Por esto, los extractos fueron probados en una variedad de reacciones como la de Baljet para la determinación de lactonas sesquiterpénicas (Figura

24), tricloruro férrico para polifenoles (Figura 25), hidróxido de sodio al 10 % para flavonoides (Figura 27), gelatina para taninos (Figura 28) y espuma para saponinas (Figura 30), mostrando su positividad solo cuando se analizó el extracto etanólico. A su vez, el extracto acuoso fue positivo para quinonas (Figura 29) usando ácido sulfúrico. Observamos también, que las pruebas de alcaloides con Dragendorff, Mayer y Wagner (Figura 31) fueron positivas para ambos extractos excepto la de Mayer en el caso del extracto etanólico.

Paralelamente, llevando a cabo el análisis para identificar los triterpenos, esteroides (Figura 23) y cumarinas (Figura 26) con sus respectivas pruebas antes mencionadas fueron debidamente representadas con resultados negativos demostrando la ausencia de estos metabolitos secundarios en el extracto proveniente de las hojas de *Carramboa tachirensis*, como se puede evidenciar en la Tabla 6.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 6. Resultados del Tamizaje Fitoquímico de los Extractos Etanólico y Acuoso de las Hojas de *Carramboa tachirensis*

Metabolito/Pruebas Químicas	Extracto Etanólico	Extracto Acuoso
Triterpenos/Esteroles Liebermann-Burchard	Negativo	Negativo
Lactonas Sesquiterpénicas Baljet	Positivo	Negativo
Polifenoles FeCl₃	Verde-marrón	Negativo
Cumarinas NH₄OH_[1]	Negativo	Negativo
Flavonoides Shinoda	Negativo	Negativo
	Positivo	
NaOH al 10 %	Café-Naranja	Negativo
Taninos Gelatina	Positivo	No se realizó
Quinonas H₂SO₄[1] (Cápsula)	Negativo	Positivo Ligero rojo
Saponinas Espuma	Positivo	Negativo
Dragendorff	Positivo	Positivo
Mayer	Negativo	Positivo
Wagner	Positivo	Positivo

Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.

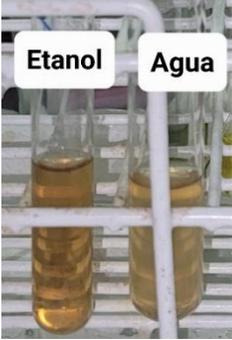
Figura 23. Representación de los Resultados Obtenidos para Terpenos: Triterpenos/Esteroles

Terpenos	
	
Leyenda:	
Metabolito	Triterpenos/Esteroles
Prueba	Liebermann-Burchard
Resultado	Negativo para ambos extractos

Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.

La prueba de Liebermann-Burchard evidencia su positividad cuando aparece la formación de un anillo verde o azul en presencia de esteroides y un anillo rojo, magenta o violeta para los triterpenos; es necesario destacar que durante este procedimiento analítico ninguno de los extractos viró de color, por ende, no poseen en su composición química triterpenos ni esteroides.

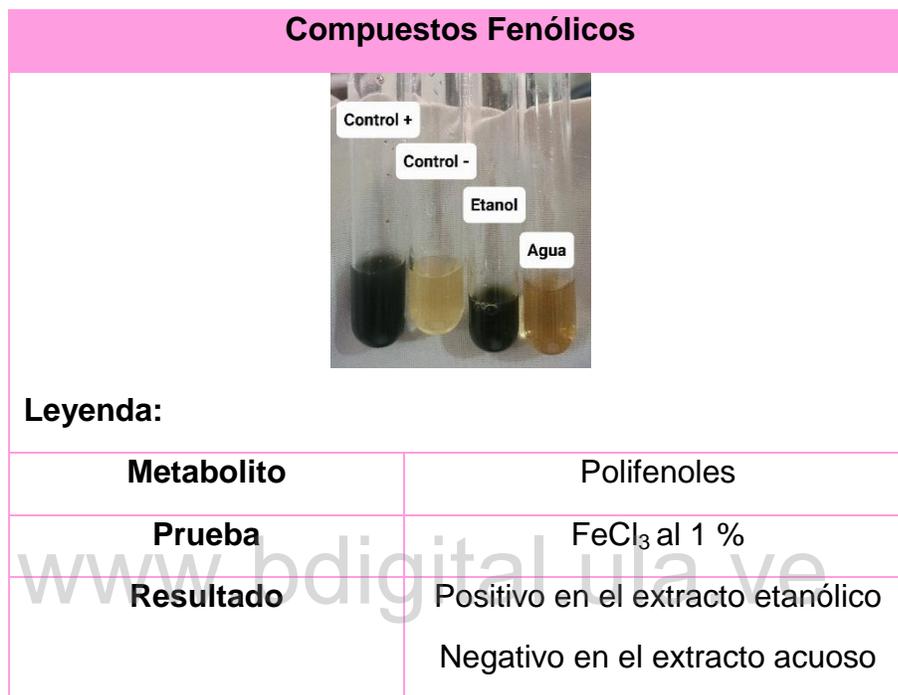
Figura 24. Representación de los Resultados Obtenidos para Terpenos: Lactonas Sesquiterpénicas

Lactonas Sesquiterpénicas	
	
Leyenda:	
Metabolito	Lactonas Sesquiterpénicas
Prueba	Baljet
Resultado	Positivo en el extracto etanólico Negativo en el extracto acuoso

Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.

El extracto obtenido en etanol presenta lactonas sesquiterpénicas, ya que la combinación entre la base fuerte (NaOH) y el ácido fuerte (HCl) mostró la tendencia a desaparecer o revertir el color amarillo-naranja que se había obtenido tras agregar la base al tubo de ensayo con el extracto. Por el contrario, esta reacción para el extracto acuoso fue negativa al no ocurrir ningún cambio visible en el color previamente logrado.

Figura 25. Representación de los Resultados Obtenidos para los Compuestos Fenólicos



Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.

El tricloruro férrico al 1 % fue añadido en los tubos de ambos extractos lo que desencadenó en la aparición de una tonalidad verde en el extracto etanólico, mostrando positividad e indicando que su composición química presenta sustancias derivadas del catecol. En cambio, el extracto acuoso mantuvo el color original sin revelar ninguna alteración o viraje, demostrando así la ausencia de polifenoles en ese extracto.

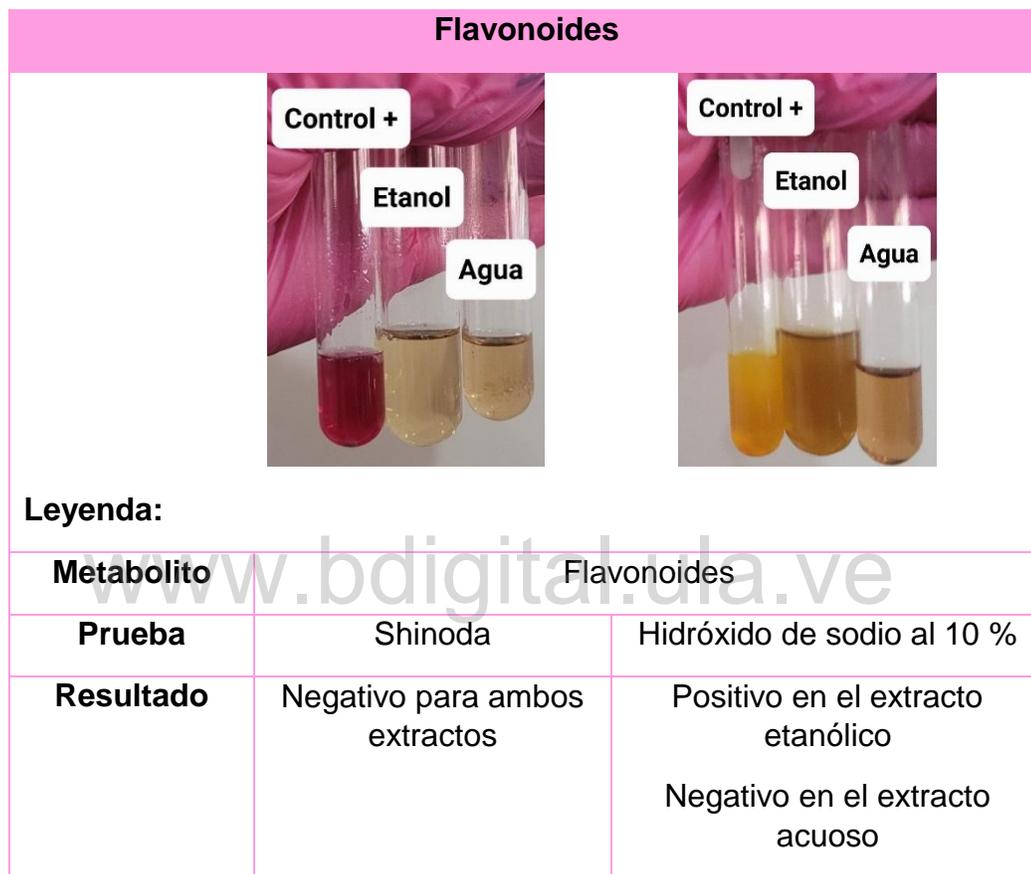
Figura 26. Representación de los Resultados Obtenidos para Cumarinas

Cumarinas	
	
Leyenda:	
Metabolito	Cumarinas
Prueba	Hidróxido de amonio concentrado
Resultado	Negativo para el extracto etanólico No se determinó en el acuoso

Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.

El extracto etanólico fue tratado con hidróxido de amonio concentrado, luego se trasladó a un cuarto oscuro para emplear el uso de una lámpara de luz ultravioleta (UV), bajo la cual no se logró observar ninguna emisión de una fluorescencia color azul, por lo tanto, esto es indicativo de la ausencia de cumarinas. Por su parte, el extracto acuoso fue excluido de esta prueba debido a la negatividad que arrojó frente al análisis de polifenoles.

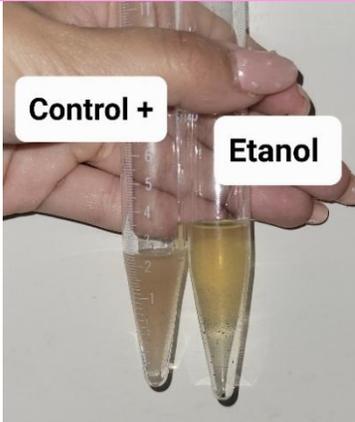
Figura 27. Representación de los Resultados Obtenidos para los Flavonoides



Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.

La prueba de Shinoda consistió en reaccionar virutas de magnesio con un ácido fuerte y curiosamente como consecuencia ambos extractos no cambiaron de color durante la reacción, por lo tanto, indicó ser un ensayo con resultado negativo. No obstante, al realizar la prueba con hidróxido de sodio al 10 %, el extracto etanólico viró de café a naranja, revelando la presencia de Flavonoles, mientras que el extracto acuoso resultó ser negativo.

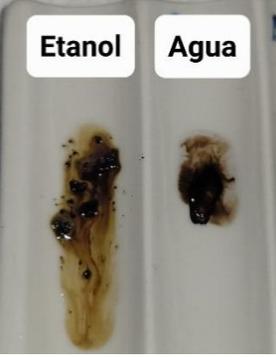
Figura 28. Representación de los Resultados Obtenidos para Taninos.

Taninos	
	
Metabolito	Taninos
Prueba	Gelatina
Resultado	Positivo para el extracto etanólico (no se llevó a cabo en el acuoso)

Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.

El extracto etanólico fue añadido en un tubo con una solución de gelatina, que al entrar en contacto ocasionó la desnaturalización de la misma, produciendo una precipitación que deja en evidencia la presencia de taninos en la muestra. Sin embargo, este ensayo no fue realizado en el extracto de naturaleza acuosa puesto que el análisis con FeCl_3 al 1 % para polifenoles mostró un resultado negativo.

Figura 29. Representación de los Resultados Obtenidos para Quinonas.

Quinonas	
	
Leyenda:	
Metabolito	Quinonas
Prueba	Ácido sulfúrico concentrado
Resultado	Negativo en el extracto etanólico Positivo en el extracto acuoso

Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.

Una porción pequeña de los extractos obtenidos se colocó en una cápsula donde se les adicionó un ácido fuerte para llevar a cabo la reacción química, en la cual el extracto etanólico no mostró ningún cambio, mientras que el extracto acuoso evidenció un viraje a una ligera tonalidad roja demostrando su positividad para este metabolito secundario.

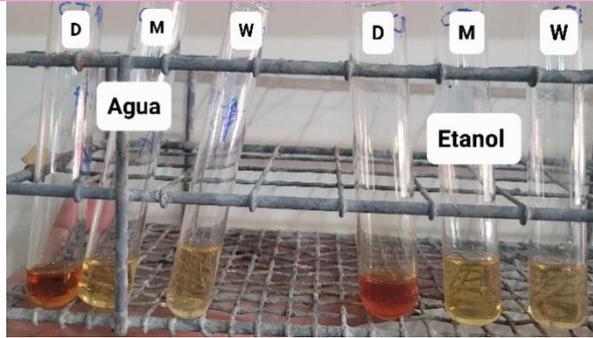
Figura 30. Representación de los Resultados Obtenidos para Saponinas



Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.

Ambos extractos fueron disueltos en agua y agitados vigorosamente por un tiempo determinado, donde al cabo de alrededor de 1 minuto el extracto etanólico evidenció la presencia de espuma abundante que se mantuvo por un tiempo prolongado de más o menos 1 hora. A diferencia del extracto acuoso que no produjo espuma en ningún momento.

Figura 31. Representación de los Resultados Obtenidos para los Alcaloides

Alcaloides	
	
Leyenda:	
Metabolito	Alcaloides
Prueba	Dragendorff (D)
Resultado	Positivo para ambos extractos
Prueba	Mayer (M)
Resultado	Negativo en el extracto etanólico Positivo en el extracto acuoso
Prueba	Wagner (W)
Resultado	Positivo para ambos extractos

Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.

Al realizar la prueba con el reactivo de Dragendorff (D), ambos extractos presentaron un resultado positivo. Seguidamente, la prueba con el reactivo de Mayer (M) demostró una negatividad en el extracto etanólico y positividad en el extracto acuoso. Por último, en la prueba con el reactivo de Wagner (W) se visualizaron resultados positivos tanto en el extracto etanólico como en el

acuoso. Dicha positividad en las tres pruebas se reflejó con la formación de precipitados independientemente del reactivo utilizado.

Actividad Antibacteriana

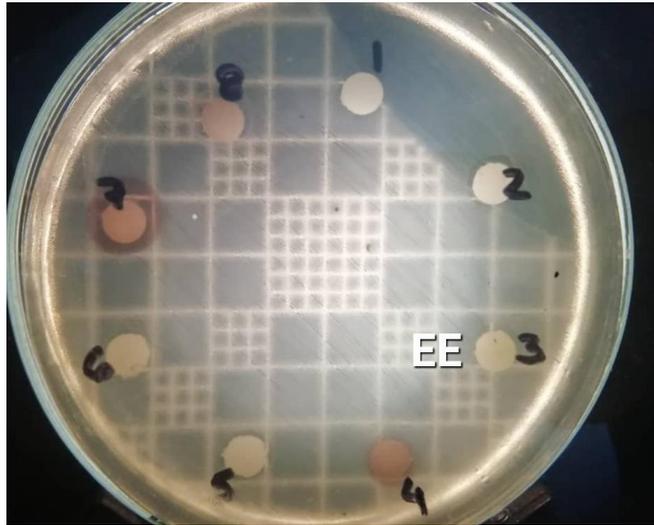
La actividad antibacteriana de las hojas de *Carramboa tachirensis* fue evaluada a través de la técnica de difusión en disco en agar de Kirby-Bauer del extracto etanólico de las hojas, utilizando una concentración de 10 mg/mL frente a cepas bacterianas de referencia internacional pertenecientes a la *American Type Culture Collection* (ATCC), 2 grampositivas: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Figura 32) y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Figura 33). Además, 3 gramnegativas: *Escherichia coli* ATCC 25922 (Figura 34), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 (Figura 35) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 36). El extracto acuoso no fue evaluado ya que no se logró disolver el material seco en el Dimetilsulfóxido (DMSO). Los resultados de esta actividad antibacteriana se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados Obtenidos de la Actividad Antibacteriana del Extracto Etanólico y Acuoso de las Hojas de *Carramboa tachirensis*

Cepas de Referencia Internacional	Concentración (mg/mL)	Halo de Inhibición (mm) Extracto Etanólico	Controles
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	10	7	DMSO** (Control -)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10	8	Controles +
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10	ND*	Eritromicina® 15µg
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	10	7	Ampicilina® 10µg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10	8	Piperacilina® 100µg

Leyenda: ND: No Determinado*. DMSO: Dimetilsulfóxido**

Fuente: Ardila, Véliz y Pérez, 2023.



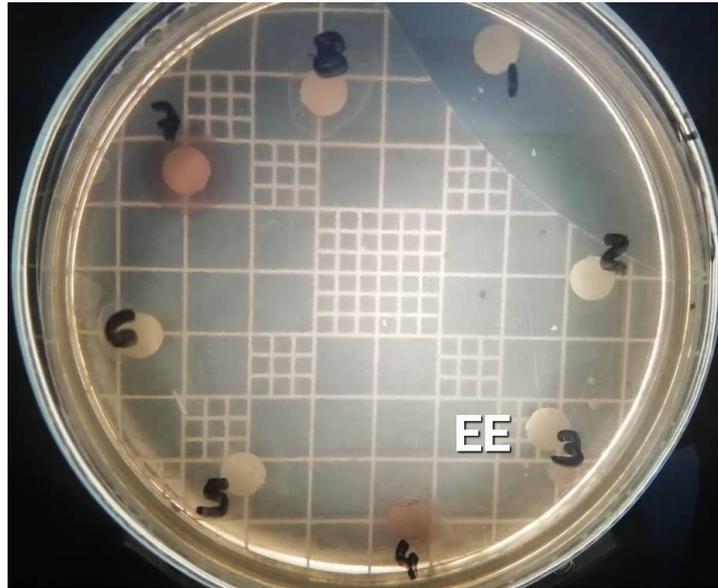
Leyenda: EE: Extracto Etanólico

Figura 32. Halo de Inhibición del Extracto Etanólico de las Hojas de *Carramboa tachirensis* en *Enterococcus faecalis*



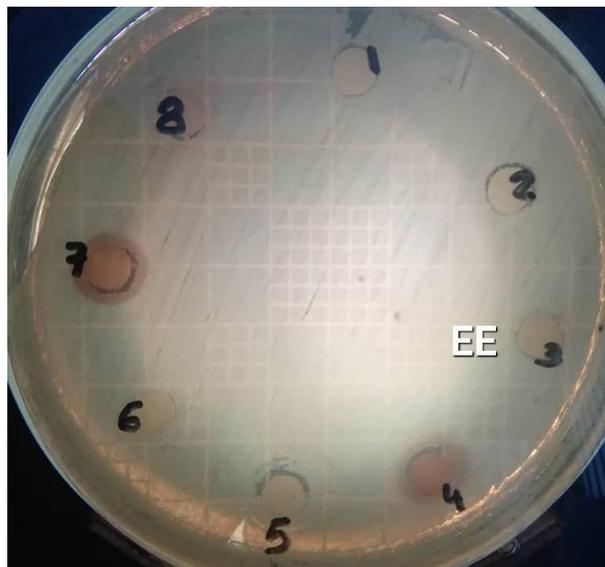
Leyenda: EE: Extracto Etanólico

Figura 33. Halo de Inhibición del Extracto Etanólico de las Hojas de *Carramboa tachirensis* en *Staphylococcus aureus*



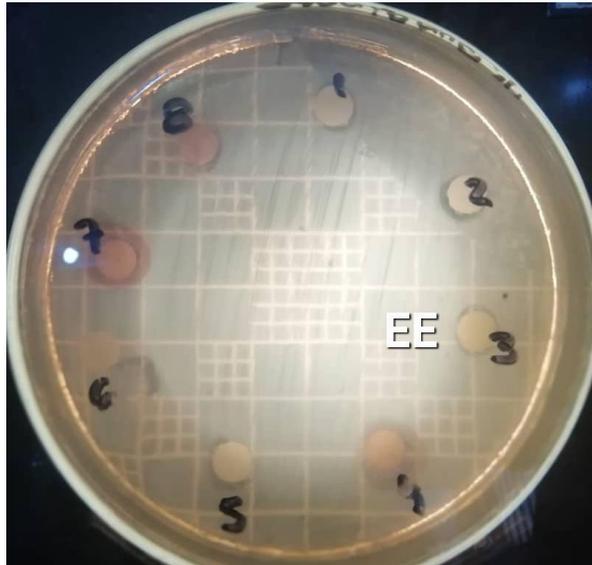
Leyenda: EE: Extracto Etanólico

Figura 34. Halo de Inhibición del Extracto Etanólico de las Hojas de *Carramboa tachirensis* en *Escherichia coli*



Leyenda: EE: Extracto Etanólico

Figura 35. Halo de Inhibición del Extracto Etanólico de las Hojas de *Carramboa tachirensis* en *Klebsiella pneumoniae*



Leyenda: EE: Extracto Etanólico

Figura 36. Halo de Inhibición del Extracto Etanólico de las Hojas de *Carramboa tachirensis* en *Pseudomonas aeruginosa*

Discusiones

La especie *Carramboa tachirensis*, ha sido poco estudiada, por lo cual en la presente investigación se aportan conocimientos desde el punto de vista fitoquímico y de actividad biológica. Las escasas investigaciones dificultaron a las autoras realizar las discusiones por lo cual se fundamentaron en los reportes efectuados sobre otras especies de *Carramboa*.

El análisis fitoquímico del extracto etanólico de *C. tachirensis* permitió determinar la presencia de lactonas sesquiterpénicas, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas y alcaloides, mientras que en el extracto acuoso se comprobó la presencia de quinonas y alcaloides. Según los reportes fitoquímicos previos, los compuestos mayoritarios de los extractos apolares de esta planta lo constituyen diterpenos tipo *ent*-kaureno los cuales

no se pudieron determinar mediante el tamizaje fitoquímico, adicionalmente los extractos que se prepararon para la presente investigación son de elevada polaridad siendo de gran importancia los resultados obtenidos ya que es la primera vez que se evidencia este tipo de metabolitos en *C. tachirensis*.

Estos resultados pueden atribuirse a que el perfil fitoquímico de las plantas depende de numerosos factores como el genotipo, la edad fisiológica de la planta, el tipo de órgano, las condiciones edafoclimáticas, el momento del corte y el procesamiento de la muestra, y de ello dependerá también la actividad biológica que posean (Rubio, Valdivia, Camacho, Matos, Sosa y Pérez, 2018).

Las pruebas cualitativas realizadas durante el tamizaje fitoquímico para los alcaloides, reflejaron ser positivo en 5 de los 6 ensayos elaborados, siendo la reacción de Mayer para el extracto etanólico el único negativo; lo que indica la posible presencia de estos metabolitos secundarios en las hojas de *Carramboa tachirensis*. Sin embargo, Habib en el año 1980, ha discutido la posible aparición de falsas reacciones positivas con sustancias que ni siquiera contienen nitrógeno en sus moléculas frente a la prueba con Dragendorff. Así pues, los aldehídos, triterpenos, cetonas, lactonas, éteres, ésteres, epóxidos y peróxidos con un enlace etileno o grupos alquilo libres en el carbono β reaccionaron positivamente formando un precipitado, debido a que la molécula debe contar con un grupo oxigenado rico en electrones y grupos donadores de electrones en el carbono β , que aumentan la densidad electrónica sobre el oxígeno y por ende aumentan la reactividad, mientras que grupos aceptores la disminuyen o la hacen desaparecer.

Tal es el caso de Cortez en el 2021, que al realizar el tamizaje fitoquímico del extracto hexano-éter de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* obtuvo una

posible falsa reacción positiva para los alcaloides con el reactivo de Dragendorff, lo cual ella atribuye a la presencia de compuestos de tipo esteroides y triterpenos como causantes de ese resultado cruzado debido a la abundancia de los mismos establecidos a través de tres cruces.

La importancia de *Carramboa tachirensis* en cuanto a su composición química viene dada por la relación directa que tiene con sus especies parentales *Carramboa pittieri* y *Ruilopezia marcescens*, ya que comparten una marcada similitud en los compuestos identificados en cada una de ellas. Y en vista de que a la especie de interés solo se ha estudiado desde el aspecto de obtención de su fracción ácida y neutra o bien sea por aceite esencial, tomamos la iniciativa de realizar una comparación con sus padres.

Como lo afirman Obregón y cols en el 2015, que al evaluar el aceite esencial de *Carramboa tachirensis* en comparación con sus especies parentales encontraron que todas son ricas en sesquiterpenos, diterpenos y monoterpenos, sin embargo, a pesar de que la especie en estudio en teoría contiene un promedio de la composición química de sus padres, esta reveló ser más parecida químicamente a la de *Carramboa pittieri*, ya que esta última contiene gran cantidad de sesquiterpenos (67,2 %), diterpenos moderados (17,5 %) y mínima cantidad de monoterpenos (8,9 %), tal cual como la especie híbrida *Carramboa tachirensis*, que posee sesquiterpenos en un 74,6 %, diterpenos en un 11,4 % y monoterpenos en un 6,2 %. A diferencia de *Ruilopezia marcescens* cuyos resultados fueron de sesquiterpenos (26,3 %), diterpenos (0,3 %) y monoterpenos (65,6 %).

Debido a que los géneros y especies que conforman la subtribu Espeletiinae son productoras de diterpenos, es necesario mencionar que son de tipo kaurenos (Ávalos y Pérez, 2009) y son determinables a través de la técnica de CG-EM, tal es el caso de lo evaluado por Obregón y cols en el

2021, que analizaron las fracciones ácida y neutra de *Carramboa tachirensis* mediante CG-EM y lograron identificar varios ácidos kaurénicos en la resina, como el ácido *ent*-kaur-16-eno-19-oico (11,16 %), ácido grandiflorénico (9,18 %) y ácido *ent*-15 α -hidroxi-16-eno-kaur-19-oico (17,03 %) de la fracción ácida y también kaurenol (2,63 %), epi-ruilopeziol (5,19 %) y 16 β -kaurano (14,47 %) de la fracción neutra.

En referencia a la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Carramboa tachirensis* se evidenció una sensibilidad a una concentración de 10 mg/mL frente a las cepas de *Enterococcus faecalis* (7 mm), *Staphylococcus aureus* (8 mm), *Klebsiella pneumoniae* (7 mm) y *Pseudomonas aeruginosa* (8 mm). Es importante señalar que la actividad antibacteriana relacionada con *C. tachirensis* no ha sido descrita previamente y debido a la poca información fitoquímica de esta especie no es posible hacer una correlación directa de los metabolitos secundarios presentes en los extractos con la actividad antibacteriana que presentaron, sin embargo existen algunos trabajos donde se menciona esta actividad para otras especies pertenecientes a la subtribu Espeletiinae a la cual pertenece la especie en estudio y con los cuales se realizó una comparación con lo que se encuentra reportado en la literatura.

En tal sentido, los diterpenos tipo kaurenos que han sido aislados en especies hermanas de *Carramboa tachirensis* presentan actividad antibacteriana, por ejemplo, el estudio realizado por Cordero, Lucena, Araujo, Usubillaga, Rojas y Moujir en el 2017 sobre la actividad antibacteriana de los diterpenos del kaureno en *Coespeletia moritziana*, donde el ácido grandiflorénico presentó actividad sobre *Staphylococcus aureus* (CIM 20 μ g/mL), *Bacillus subtilis* (CIM 5 μ g/mL) y *Enterococcus faecalis* (CIM 10 μ g/mL). En cambio, el ácido kaurénico mostró actividad únicamente sobre

Bacillus subtilis (CIM 10 µg/mL), al igual que el ácido 15 α -acetoxi-kaurénico y el kaurenol (CIM 40 µg/mL).

De igual modo, Márquez y cols en 2023 que reportaron un nuevo producto natural por primera vez en el extracto de las hojas de *Espeletia semiglobulata* (*ent*-kaur-3-acetoxi-15-eno), el cual mostró actividad antimicrobiana a una concentración de 2 mg/mL frente a cepas bacterianas gramnegativas, *Escherichia coli* (8 mm), *Klebsiella pneumoniae* (10 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (8 mm) y una cepa fúngica *Candida krusei* (8 mm).

Similarmente, Cortez en 2021 evaluó en el extracto hexano-éter de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* la actividad antibacteriana a una concentración de 1000 ppm y obtuvo sensibilidad ante *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*, todas ellas con la formación de un halo de inhibición de 7 mm y *Pseudomonas aeruginosa* con un halo de 6 mm. Mientras que no se observó halo de inhibición frente a *Enterococcus faecalis*. Evidenciando así resultados similares a los de esta investigación y recomendando dirigir el estudio de dicha actividad a través de otros métodos de evaluación.

Los mecanismos mediante los cuales los metabolitos secundarios inhiben el crecimiento bacteriano se han vinculado con cambios en las propiedades físico-químicas de la membrana celular y la interferencia con procesos metabólicos vitales en los microorganismos patógenos. Los flavonoides pueden afectar el crecimiento microbiano por inhibición de la biosíntesis de ácidos nucleicos y otros procesos metabólicos; mientras que las sustancias de naturaleza terpenoide pueden interferir con la síntesis de los componentes de las membranas biológicas (Nayak, Ramdath, Marshall, Isitor, Eversley, Xue y Shi, 2010). De igual manera, los taninos y los compuestos fenólicos pueden inhibir el crecimiento bacteriano, debido a la capacidad que tienen

estas sustancias de formar complejos irreversibles con proteínas, lo cual afecta sus propiedades biológicas y ocasiona la muerte de los microorganismos (Cowan, 1999). Los taninos también pueden disminuir la actividad de enzimas bacterianas mediante la quelatación de iones imprescindibles para la función catalítica de estos polipéptidos (Rubio y cols., 2018).

En relación a lo expuesto anteriormente, se presume que la actividad observada en el extracto etanólico de las hojas de *C. tachirensis* pudo deberse a un efecto sinérgico (efecto de la mezcla de compuestos en el extracto y no a un constituyente en particular) y que los disolventes utilizados para la extracción de los metabolitos secundarios de las plantas juegan un papel importante ya que de ellos dependerán las características químicas de las sustancias a extraer lo cual tiene influencia directa sobre la actividad biológica de los mismos.

En última instancia, podemos inferir que los compuestos polares reportados e identificados en el extracto etanólico de las hojas de *Carramboa tachirensis* se quedan retenidos de cierta manera en el papel de filtro de celulosa utilizado como material ideal en el método de difusión en disco en agar de Kirby – Bauer y por ende estos no difunden correctamente. Tal es el caso de lo que afirman Manrique y Mosquera en 1997, que al evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones obtenidos a partir de *Espeletia murilloii* Cuatrec. y *Espeletopsis guacharaca*, exponen el método utilizado como lo es el ensayo de bioautografía que utiliza placas cromatográficas de sílica gel o de celulosa que se colocan en cajas de Petri correspondientes y recomiendan que al utilizar este tipo de material previamente se proceda a eliminar el disolvente usado para evitar falsas bandas de inhibición.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

El extracto etanólico de las hojas de *Carramboa tachirensis* evidenció en el tamizaje fitoquímico la presencia de lactonas sesquiterpénicas, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, saponinas y alcaloides, mientras que el extracto acuoso arrojó positividad solo para quinonas y alcaloides.

El extracto etanólico de las hojas de *Carramboa tachirensis* presentó actividad antibacteriana frente a cepas ATCC de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 10 mg/mL con halos de inhibición que variaron entre 7-8 mm.

Los resultados obtenidos en esta investigación son de gran relevancia ya que este es el primer reporte fitoquímico y de actividad antibacteriana de los extractos polares de las hojas de *Carramboa tachirensis* y pueden ser utilizados como referencia para futuras investigaciones relacionadas botánicamente.

Recomendaciones

Realizar el análisis fitoquímico de los extractos polares de *Carramboa pittieri* y *Ruillopezia marcescens*.

Evaluar otras actividades biológicas como antiinflamatoria, antifúngica, citotóxica, antioxidante o anticancerígena de los extractos de las hojas *Carramboa tachirensis*.

Aislar e identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos polares de las hojas de *Carramboa tachirensis*.

Extender la investigación aquí descrita efectuando el estudio de los tallos, flores, raíces y semillas de *Carramboa tachirensis* en busca de otros metabolitos secundarios útiles.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 Ciencia Químico Farmacéuticas**. 45 (3), 438-469.
- Alava, S., e Ibarra, A. (2014). *Resistencia bacteriana a los antimicrobianos en hemocultivos realizados en el hospital "Dr. Julio Villacreses Colmont" de Solca-Portoviejo en el período mayo-octubre del 2013* (Tesis de Pregrado). Universidad Técnica de Manabí, Ecuador.
- Albornoz, M. (1992). *Medicina tradicional herbaria*. Venezuela: Editorial Instituto Farmacoterápico Latino S.A.
- Amaringo, F., Hormaza, A., y Arias, M. (2011). Thevetin B: glicósido cardiotónico predominante en *Thevetia peruviana*. **Scientia et Technica** 3 (49), 298-303.
- Aparicio, R., Romero, M., Khouri, N., Rojas, L., y Usubillaga, A. (2002). Volatile constituents from the leaves of three *Coespeletia* species from the Venezuelan Andes. **Journal of Essential Oil Research**. 14, 37-39.
- Aristeguieta, L. (2003). *Estudio dendrológico de la flora de Venezuela*. Venezuela: Editorial Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales.
- Armijo, J., Vicuña, E., Romero, P., Condorhuamán, C., y Hilario, B. (2012). Modelamiento y simulación del proceso de extracción de aceites esenciales mediante la destilación por arrastre con vapor. **Revista Peruana de Química e Ingeniería Química**. 15 (2), 19-27.

- Ávalos, G., y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. **Reduca**, 2 (3), 119-145.
- Bata, M., Debiao, L., y Saikia, A. (2006). Antibacterial activity of the crude extract of chinese Green Tea. **African Journal of Biotechnology**. 7 (10), 1571-1573.
- Bohlmann, F., Suding, H., Cuatrecasas, J., King, R., y Robinson, H. (1980). Tricyclic sesquiterpenes and futher diterpenes from *Espeletia* species. **Phytochemistry**. 19, 2399- 2403.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales*. Zaragoza: Acribia.
- Carrión, A., y García, C. (2010). *Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia metódica* (Tesis de Pregrado). Universidad de Cuenca, Ecuador.
- Cartaya, O., y Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. **Cultivos Tropicales**. 22 (2), 5-14.
- Carvajal, L., Uribe, Y., Sierra, N., y Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). **Revista Colombia Forestal**, 12, 161-170.
- Castillo, G., Zavala, D., y Carrillo, M. (2017). Análisis fitoquímico: una herramienta para develar el potencial biológico y farmacológico de las plantas. **Tlatemoani**. 8 (24), 71-86.
- Cervantes, E., García, R., y Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. **Revista Latinoamericana Patología Clínica y Medicina de Laboratorio**. 61 (1), 28-40.
- Chávez, A., Arreguín, R., Cifuentes, J., y Rodríguez, E. (2017). ¿Cómo funcionan los microbios? **Ciencia**. 68 (2), 26-35.

- Cordero, Y., Lucena, M., Araujo, L., Usubillaga, A., Rojas, L., Aparicio, R., Moujir, L., y Ustáriz, F. (2022). Efecto citotóxico de diterpenos derivados del ácido *ent*-kaureno aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec. **Revista Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. 21 (3), 404-417.
- Cordero, Y., Lucena, M., Araujo, L., Usubillaga, A., Rojas, L., y Moujir, L. (2017). Actividad antibacteriana de diterpenos del kaurano aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec. **Revista de la Facultad de Farmacia**. 59 (2), 03-07.
- Corrales, L., Antolinez, D., Bohórquez, J., y Corredor, A. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. **NOVA: publicación científica**. 13 (24), 55-81.
- Cortez, M. (2021). Actividad antibacteriana y composición química del extracto de las hojas de *Espeletopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec. (Tesis de pregrado). Universidad de Los Andes, Mérida.
- Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**. 12 (4), 564-582.
- Coy, C., Parra, J., y Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (Rutaceae). **Revista Elementos**. 4 (4), 31-39.
- Cuatrecasas, J. (1987). Clave diagnóstica de las especies de *Ruilopezia* (Espeletiinae, Heliantheae, Compositae). **Anales Del Jardín Botánico De Madrid**. 44 (2), 401-419.
- Del Vitto, L., y Petenatti, E. (2009). Asteráceas de importancia económica y ambiental. Primera Parte. Sinopsis morfológica y taxonómica,

- importancia ecológica y plantas de interés industrial. **Multequina**. 18 (2), 87-115.
- Díaz, A., Dorta, E., Cueto, M., Rovirosa, J., San-Martín, A., Loyola, A., y Darías, A. (2003). Labdane diterpenes with a new oxidation pattern from the marine pulmonate *Trimusculus peruvianus*. **Tetrahedron**. 59, 4805-4809.
- Díaz, M., Rodríguez, C., y Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. **Revista Cubana de Higiene y Epidemiología**. 48 (2), 147-161.
- Domínguez, X. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica*. México: LIMUSA S. A.
- Fernández, F., López, J., Ponce, L., y Machado, C. (2003). Resistencia Bacteriana. **Revista Cubana de Medicina Militar**. 32 (1), 44-48.
- Gamazo, C., López, I. y Díaz, R. (2005). *Manual práctico de microbiología* (3ra Ed., pp. 121-125). España: Editorial Elsevier Masson.
- García, C., Martínez, A., Ortega, J., y Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. **Química Viva**. 9 (2), 86-96.
- Gutiérrez, A., y Estévez, A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el s. xxi. **Revista de la Real Academia de Ciencia Exacta, Física y Natural**. 103 (2), 409-420.
- Habib, A. (1980). False-Positive Alkaloid Reactions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 69 (1), 37-43.

- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2010). *Metodología de la investigación*. Chile: Editorial McGraw Hill.
- Hoogesteger, C. (1994). *Uso de plantas medicinales*. México: Editorial Pax México.
- Hung, B., Falero, A., Pérez, C., Tirado, S., Balcinde, Y., y Pineda, M. (2005). Fitosteroles. Parte 1. Tendencias actuales y aplicaciones biomédicas. ***Revista CENIC Ciencias Biológicas***. 36 (1), 23-30.
- Hurtado, J. (2012). *Metodología de la investigación Guía para una comprensión holística de la ciencia*. Colombia: Editorial Quirón Ediciones.
- Izco, J. (2004). *Botánica*. España: Editorial McGraw Hill.
- Khouri, N., Usubillaga, A., Rojas, L., y Galarraga, F. (2000). Essential oil of *Espeletia weddellii*. ***Flavour and Fragrance Journal***. 15, 263-265.
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia, estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. España: Editorial Ediciones Omega.
- Lizarbe, A. (2009). Bacterias y virus ¿cómo nos defendemos? ***Revista de la Real Academia de Ciencia Exactas, Físicas y Naturales***. 103 (1), 115-172.
- Lizcano, A., y Vergara, J. (2008). *Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Esperomeles ferrugineas, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

- López, J., y Echeverría, L. (2010). *K. pneumoniae*: ¿la nueva superbacteria?. Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia. **latreia**. 23 (2), 157-165.
- Macías, A., Mera, L., Espinoza, M., Vite, F., Vallejo, P., Mendoza, L., Cedeño, D., Casanova, M., Medina, F., Pigüave, J., Vélez, M., Cevallos, B., Ubillús, S., Ipiales, J., Arteaga, S., Vivas, C., Escobar, C., Vera, M., y Terán, M. (2019). *Microbiología y salud*. España: Editorial Área de Innovación y Desarrollo, S.L.
- Manrique, E., y Mosquera, O. (1997). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones obtenidas a partir de Espeletia murilloii Cuatrec. y Espeletopsis guacharaca* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Venezuela: Editorial Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.
- Márquez, A., Pérez, A., Rojas, L., Aparicio, R., Ramos, F., Obregón, Y., y Usubillaga, A. (2023). Un nuevo diterpeno *ent*-kaureno aislado de hojas de *Espeletia semiglobulata* Cuatrec. y su potencial actividad antimicrobiana. **Biología, medicina y química de productos naturales**. 12 (1), 151-157.
- Martin, D. (2018). Los compuestos fenólicos: una aproximación a sus biosíntesis, síntesis y actividad biológica. **Revista de Investigación Agraria y Ambiental**. 9 (1), 81-103.
- Martinez, A. (2020). *Química de productos naturales*. Universidad de Antioquia. Colombia.
- Martínez, L., y Calvo, J. (2010). Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud

- pública. ***Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica***. 28 (4), 4-9.
- Meccia, G., Quintero, P., Rojas, L., Usubillaga, A., y Carmona, J. (2010). Análisis de los ácidos kaurénicos presentes en *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec. de Los Andes venezolanos. ***Avances en la Química***. 5 (1), 45-49.
- Millán, Y. (2019). *Antibióticos y agentes quimioterapéuticos*. Ponencia presentada como complemento de la Unidad de Aprendizaje 7 de la Unidad Curricular Bacteriología y Virología General de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela).
- Monasterio, M. (1980). *Estudios Ecológicos en los Páramos Andinos*. Venezuela: Editorial de la Universidad de Los Andes.
- Morales, G., Castro, G., Mendoza, Y., Rubiano, L., y Pacheco, J. (2017). Una mirada rápida al control de calidad interno en el quehacer diario del laboratorio de microbiología. ***Medicina & Laboratorio***. 23 (9 y 10), 459-474.
- Moreno, C., González, R., y Beltrán, C. (2009). Mecanismos de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. ***Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello***. 69 (2), 185-192.
- Morillo, G., y Briceño, B. (2007). Estudio sobre *Carramboa tachirensis* (Aristeg.) Cuatrec. (Asteraceae) y sus afines. ***Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia***. 24 (1), 475-481.
- Moriwaki, K., Gomi, M., Itoh, Y., Lida, S., Tsugawa, M., Tanui, S., Fuji, K., Dode, M., y Kajimoto, T. (1986). Steroidogenic effect on *ent*-kaur-16-

en-15 β -ol (kaurenol) on isolated rat adrenal cells. **Life Science**. 38, 453-458.

Nagashima, F., Kondoh, M., Kawase, M., Simizu, S., Osada, H., Watanabe, M., Sato, M., y Asakawa, Y. (2003). Apoptosis-inducing properties of ent-kaurene-type diterpenoids from the liverwort *Jungermannia truncate*. **Planta Médica**. 69, 377- 379.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997). *Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar*. Villanova, Pennsylvania: NCCLS.

Nayak, B., Ramdath, D., Marshall, J., Isitor, G., Eversley, M., Xue, S., y Shi, J. (2010) Wound healing activity of the skin of the common grape (*Vitis vinifera*) Variant, Cabernet Sauvignon. **Phytotherapy Research**. 24 (8), 1151-1155.

Obregón, Y., Rojas, L., Aparicio, R., y Usubillaga, A. (2021). Análisis de las fracciones ácida y neutra presentes en *Carramboa tachirensis* (Aristeg.) Cuatrec. (Asteraceae) por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masa. **Revista de la Facultad de Farmacia**. 84 (1 y 2), 125-132.

Obregón, Y., Rojas, L., Usubillaga, A., Pouységu, L., y Quidau, S. (2015). Estudio de la composición química del aceite esencial de la Asteraceae híbrida *Carramboa tachirensis* (Aristeg.) Cuatrec. **Revista de la Facultad de Farmacia**. 57 (1), 17-21.

Ochoa, L., y Sarmiento, A. (2018). *Estudio fitoquímico de la especie vegetal Bucquetia glutinosa* (L.f.) DC. (Melastomataceae) y *evaluación de su actividad biológica* (Tesis de pregrado). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Bogotá D.C.

- Olivas, F., Wall, A., González, G., López, J., Álvarez, E., De La Rosa, L., y Ramos, A. (2015). Taninos hidrolizables; bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. **Nutrición Hospitalaria**. 31 (1), 55-66.
- Otero, M., y Ferrer, G. (2006). Medicamentos antibacterianos. En: V. Ausina y S. Moreno. (Eds.). *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. España: Editorial Médica Panamericana, S.A.
- Parella, S., y Martins, F. (2010). *Metodología de la investigación cuantitativa*. Venezuela: FEDUPEL.
- Parra, D., Castro, M., y Aponte, Y. (2016). *Marcha fitoquímica preliminar*. Corporación Tecnológica de Bogotá. Tecnología en Regencia de Farmacia. Quinto Semestre.
- Paz, V., Mangwani, S., Martínez, A., Álvarez, D., Solano, S., y Vázquez, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. **Revista Chilena de Infectología**. 36 (2), 180-189.
- Peñarrieta, J., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J., y Bravo, J. (2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. **Revista Bolivariana de Química**. 31 (2), 68-81.
- Pérez, A. (2019). *Reactivación de las cepas bacterianas*. Asesoría para elaboración del proyecto de investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela).
- Pérez, H., y Robles, C. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. **Revista Médica**. 4 (3), 186-191.

- Prescott, L., Harley, J., y Klein, D. (2004). *Microbiología*. España: Editorial McGraw Hill.
- Ramírez, A., García, E., Longa, A., Nieves, M., Velasco, J., Araque, M., y Mosqueda, N. (2010). *Manual práctico de bacteriología general*. Venezuela: Editorial Publicaciones Vicerrectorado Académico CODEPRE.
- Ramírez, L., y Marín, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. ***Scientia et Technica***. 2 (42), 263-268.
- Reynoso, M., Magnoli, C., Barros, G., y Demo, M. (2015). *Manual de microbiología general*. Argentina: Editorial Unirio.
- Rivas, M., Oranday, C., y Verde, S. (2016). *Investigación en Plantas de Importancia Médica*. México: Editorial OmniaScience.
- Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. ***Salud Pública de México***. 44 (5), 464-475.
- Rojas, L., Gutiérrez, R., Cordero, Y., y Usubillaga, A. (2008). Composición Química del Aceite Esencial de *Carramboa pittieri* (Cuatrec.) Cuatrec. (Asteráceas). ***Comunicaciones de productos naturales***. 3 (10), 1739-1740.
- Rubio, Y., Valdivia, A., Camacho, C., Matos, M., Sosa, M., y Pérez, Y. (2018). Composición fitoquímica y actividad antibacteriana de extractos de hoja de *Hamelia patens* Jacq. ***Biología Vegetal***. 18 (1), 37- 45.
- Ruiz, Y., Rodrigues, J., Arvelo, F., Usubillaga, A., Monsalve, M., Diez, N., y Galindo, I. (2008). Cytotoxic and apoptosis-inducing effect of *ent-* 15-

- oxo-kaur-16-en-19-oic acid, a derivative of grandiflorolic acid from *Espeletia schultzei*. **Phytochemistry**. 69, 432-438.
- Ruiz, E., y Suárez, M. (2015). Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. **Revista CENIC Ciencias Biológicas**. 46 (1), 9-24.
- Sierra, I., Romero, M., y Orduz, S. (2012). Determinación de la actividad antimicrobiana e insecticida de extractos producidos por bacterias aislada del suelo. **Actualidad Biológica**. 34 (96), 5-19.
- Sierra, M., Barros, M., Gómez, D., Mejía, A., y Suarez, D. (2018). *Productos naturales: metabolitos secundarios y aceites esenciales*. Colombia: Editorial UNIAGRARIA.
- Soto, Z., Pérez, L., y Estrada, D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en Colombia. **Revista Salud Uninorte**. 32 (1), 105-122.
- Tamayo, R., Verdecia, A., y Mojera, I. (2011). Tamizaje Fitoquímico de los extractos alcohólicos, etéreo y acuosos de las hojas y tallo de la *Isocarpha cubana* B. **MULTIMED**. 15 (3), 1-8.
- Tellez, A., Torrenegra, R., Pedroso, J., y Martinez, A. (2000). Cyclo eucalen-3 β -(2-methyl butanoate). New cycloeucalen isolate from the *Espeletia barclayana* Cuatrec. (Asteraceae). **Molecules**. 5, M-163.
- Usubillaga, A., Romero, M., y Aparicio, R. (2003). Kaurenic acid in Espeletiinae. **Acta Horiculturae**. 597 (17), 129-130
- Vargas, T., y Kuno, A. (2014). Morfología bacteriana. **Revista Actualización Clínica**. 49 (2), 2594-2598.

- Viloria, E., Rojas, L., y Usubillaga, A. (1997). Analysis of kaurenic acids methyl esters by gas chromatography. ***Journal of High-Resolution Chromatography***. 20 (3), 50-51
- Zendejas, G., Avalos, H., y Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. ***Revista Biomédica***. 25 (3), 129-143.

www.bdigital.ula.ve