



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



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA
DEL *Heliotropium indicum* L. EN CEPAS DE REFERENCIA
INTERNACIONAL**

www.bdigital.ula.ve

Autores:

Morales Naivedy
C.I. V-24.960.327.
Sandoval Kristel
C.I: V-25.338.342

Tutor:

Prof. Ysbelia Obregón

Mérida, Mayo de 2023

DEDICATORIA

Dedicamos esta tesis a la Universidad de los Andes por brindarnos la oportunidad de adquirir conocimientos y herramientas necesarias para nuestra formación académica y personal.

Asimismo, a la doctora Ysbelia Obregón, por su importante papel en el proceso de investigación y por habernos brindado orientación y apoyo durante todo el proceso de elaboración.

Dedicada también a los profesores Alida Pérez, Rosa Aparicio, Yndra Cordero y José Salazar, que guiaron y ayudaron en cada una de las etapas de esta tesis, ya que, gracias a su valiosa experiencia y conocimiento, esta investigación ha sido posible.

Queremos expresar nuestro profundo agradecimiento a todos ellos, ya que, sin su contribución y dedicación, la realización de esta tesis no habría sido posible.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a Dios por darme la fuerza y la sabiduría necesaria para completar esta tesis. Su presencia en mi vida ha sido fundamental para guiar mis pasos y permitirme enfrentar todos los obstáculos que se presentaron en el camino.

A mis padres, quiero darles las gracias por su amor incondicional y su apoyo constante en cada etapa de mi vida. Sin ellos, no estaría aquí hoy, celebrando el logro de haber completado esta tesis. Gracias por ser mi inspiración y mi motivación para seguir adelante.

A mi hijo, agradezco por ser mi mayor alegría y mi mayor fuente de motivación. Tú eres la luz de mi vida y todo lo que hago es por ti. Espero que puedas ver que los sueños pueden hacerse realidad si trabajamos con dedicación y perseverancia.

A mis abuelos, quienes me han enseñado tanto con su sabiduría y amor a lo largo de mi vida, les agradezco por siempre estar presentes y enseñarme lo importante que es la familia.

A Genessis, Astrid y Carlitos, ustedes son como mis hermanos, siempre me apoyaron y estuvieron presentes en mi vida, gracias por todo, aunque no podemos estar físicamente juntos, nuestros corazones siguen conectados.

A mis tíos, Omar, Carlos y en especial a mi tía Coromoto son como mis segundos padres, gracias por sus consejos, amor y dedicación. Sus mensajes y palabras me llenaron de ánimos durante estos años.

A mi pareja, agradezco por el amor, el apoyo y la comprensión en todos los momentos difíciles y los momentos felices. Espero que podamos seguir creciendo juntos y superar cualquier obstáculo que se presente en el futuro.

Finalmente, a mis amigos en especial a Naivedy, Mirbeli, Yasney, Aury y Roxana, les agradezco por el aliento, el apoyo y los momentos de risa y felicidad. Gracias por acompañarme en cada paso de este camino y ser una parte importante en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, infinitas gracias a Dios todopoderoso por haberme dado la sabiduría y el entendimiento para poder llegar al final de mi carrera.

Les agradezco a mis padres Denys Morales y Betty Albornoz (+) que siempre me brindaron su apoyo incondicional, con su cariño me impulsaron a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades. A mi padre por ser mi compañero fiel, desde mi despertador, hasta la llamada del final del día. A mi madre que partió muy pronto al encuentro con Dios, pero que sigue siendo mi amiga fiel, mi guía, mi luz e inspiración para seguir en pie. Finalmente, mil gracias a ambos por hacer de mí, una persona centrada, educada, y feliz.

A mis hermanas Naidy, Naivys, Naidibi y Nairy; mis sobrinas Nairelin, María, y Mariana, son el mejor regalo que me pudo dar la vida, quienes cumplen a la perfección el concepto de familia. Gracias por apoyarme siempre, por sus palabras, juegos, momentos de llanto para drenar, sus ayudas económicas, y demás detalles, han sido el empujoncito que necesitaba cuando sentía que quería tirar la toalla.

A mi novio, Frank Reyes, por darle color y alegría a mis días, gracias por aguantar los altos y bajos siempre a mi lado, por sentir mis cargas como si también fueran tuyas, y buscar soluciones a todo lo que se presenta. Además, por compartir tu familia conmigo, a ustedes mil gracias (Familia Reyes Vivas) por cada abrazo, cada palabra de aliento, cada felicitación, y por quererme como a una hija más.

A todos mis compañeros, ya que muchos de ellos se han convertido en mis amigos, cómplices y hermanos de universidad, especialmente Kristel, Mirbeli, Yasney, Aury y Roxana. Gracias por las horas compartidas, los trabajos realizados en conjunto y las historias vividas.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	3
Planteamiento del Problema.....	3
Justificación e Importancia de la Investigación.....	4
Objetivos de la Investigación.....	7
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	8
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	10
Trabajos Previos.....	10
Antecedentes Históricos.....	13
Bases Teóricas.....	15
<i>Productos naturales.....</i>	<i>15</i>
<i>Clasificación de los metabolitos secundarios.....</i>	<i>16</i>
<i>Familia Boraginaceae.....</i>	<i>23</i>
<i>Género Heliotropium.....</i>	<i>24</i>
<i>Heliotropium indicum L.....</i>	<i>25</i>
<i>Extractos vegetales.....</i>	<i>30</i>
<i>Tamizaje fitoquímico.....</i>	<i>32</i>
<i>Actividad antibacteriana.....</i>	<i>40</i>
Definición Operacional de Términos.....	49
<i>Pubescencia.....</i>	<i>49</i>
<i>Disolvente ideal.....</i>	<i>49</i>
<i>Hojas pecioladas.....</i>	<i>49</i>
<i>Extracción.....</i>	<i>50</i>

ÍNDICE DE CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

<i>Inflorescencia</i>	50
<i>Compuestos bioactivos</i>	50
<i>Cepas de referencia internacional</i>	51
<i>Sésil</i>	51
<i>Fitoquímico</i>	51
<i>Metabolitos secundarios</i>	52
Operacionalización de las Variables.....	53
Operacionalización de la variable dependiente.....	53
Operacionalización de la variable independiente.....	54
Hipótesis.....	55
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	56
Tipo de Investigación.....	56
Diseño de Investigación.....	56
Población y Muestra.....	57
Sistema de Variables.....	57
Instrumento de Recolección de Datos.....	57
Procedimiento de la Investigación.....	58
Diseño de Análisis.....	71
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	73
Resultados	73
<i>Análisis fitoquímico preliminar</i>	74
<i>Evaluación de la actividad antibacteriana</i>	79
Discusiones.....	82
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	86
Conclusiones.....	86
Recomendaciones.....	87
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS	88

ÍNDICE DE TABLAS

Nº	Tablas	Pág.
1	Clasificación taxonómica de la familia Boraginaceae.....	24
2	Clasificación taxonómica del <i>Heliotropium indicum</i> L.....	26
3	Operacionalización de la variable dependiente actividad antibacteriana del <i>Heliotropium indicum</i> L. en cepas de referencia internacional.....	53
4	Operacionalización de la variable independiente composición química del <i>Heliotropium indicum</i> L.....	54
5	Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).....	68
6	Pesos obtenidos de los extractos vegetales de hexano y etanol de las hojas de <i>Heliotropium indicum</i> L.....	73
7	Determinación del porcentaje de rendimiento de los extractos de hexano y etanol de las hojas de <i>Heliotropium indicum</i> L.....	74
8	Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos obtenidos de las hojas de <i>Heliotropium indicum</i> L.....	75
9	Reporte de los resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de los extractos de las hojas de <i>Heliotropium indicum</i> L.....	76
10	Resultados obtenidos de la evaluación antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de <i>Heliotropium indicum</i> L.....	80

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Nº	Esquemas	Pág.
1	Recolección de la especie vegetal y obtención de los extractos de <i>Heliotropium indicum</i> L.....	60
2	Técnicas cualitativas para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el <i>Heliotropium indicum</i> L.....	63
3	Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico del <i>Heliotropium indicum</i> L. por el método de difusión de disco en agar (Kirby Bauer).....	70

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Figuras	Pág.
1	Estructura química del alcaloide de pirrolizidina.....	17
2	Estructura química del isopreno.....	18
3	Estructura química del fenol.....	18
4	Estructura química de los flavonoides.....	19
5	Estructura química de las saponinas.....	20
6	Estructura química de la procianidina (tanino condensado).....	21
7	Estructura química de las quinonas.....	22
8	Estructura química de las cumarinas.....	23
9	<i>Heliotropium indicum</i> L.....	26
10	Estructura química de los principales alcaloides pirrolizidínicos presentes en el <i>Heliotropium indicum</i> L.....	27
11	Estructura química de los principales triterpenos y esteroides presentes en el <i>Heliotropium indicum</i> L.....	29
12	Extractor de Soxhlet.....	31
13	Fundamento químico de la reacción de Dragendorff.....	34
14	Fundamento químico de la reacción Liebermann-Burchard.....	35
15	Fundamento químico de la reacción con Cloruro Férrico (FeCl ₃)	36
16	Fundamento químico de la reacción de Shinoda.....	36
17	Fundamento químico de la reacción de taninos con gelatina.....	38
18	Fundamento químico de la reacción de las cumarinas.....	39
19	Fundamento químico de la reacción de quinonas.....	39
20	Reporte ilustrado de los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de <i>Heliotropium indicum</i> L., correspondiente a la muestra número 13.....	80



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Productos Naturales
UNIDAD CURRICULAR: TRABAJO DE GRADO II



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL
Heliotropium indicum L. EN CEPAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL**

Autoras:

Kristel Sandoval

Naivedy Morales

Tutor:

Prof.(a). Ysbelia Obregón

RESUMEN

El *Heliotropium indicum* L. es una planta originaria de las zonas tropicales del continente euroasiático, en la cual se han encontrado una gran variedad de metabolitos secundarios, destacándose los alcaloides, los cuales poseen actividad antibacteriana. Por esta razón, el objetivo de esta investigación fue confirmar la relación entre la composición química de los extractos de *Heliotropium indicum* L. y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional. Se realizó la obtención de los extractos vegetales a partir de las hojas de la planta en estudio, con solventes de diferente polaridad como: hexano y etanol, los cuales se utilizaron para realizar el análisis fitoquímico preliminar, y posterior a esto se determinó la actividad antibacteriana mediante el método de difusión de disco en agar (Kirby- Bauer) con una concentración del extracto de 10 mg/mL. En los resultados se evidenció la presencia de metabolitos secundarios tales como triterpenos/esteroles y flavonoides en el extracto de hexano; así mismo en el extracto etanólico se determinó la presencia de esteroles y alcaloides, y además dicho extracto presentó actividad antibacteriana frente a las cepas de referencia internacional, con halos de inhibición de 7 mm de diámetro para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, y de 8 mm de diámetro para *Enterococcus faecalis*, y *Klebsiella pneumoniae*. La importancia de esta investigación fue que representó el primer reporte proveniente del Estado Mérida sobre la composición química preliminar de los extractos de las hojas de *Heliotropium indicum* L. y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional.

Palabras clave: *Heliotropium indicum* L., Extracto vegetal, Composición química, Tamizaje fitoquímico, Actividad antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

Los extractos de diversas plantas medicinales han sido utilizados desde la antigüedad para una variedad de propósitos; gracias a su actividad antibacteriana, han sido incluidos en los procesos farmacológicos, representando una alternativa en la salud. *Heliotropium indicum* L. es una planta que pertenece a la familia Boraginaceae, proveniente del continente euroasiático, conocida como “heliotropo indio”. El nombre “heliotropo” deriva del griego “helios” que significa sol, y “tropein” que significa "girar" por el hecho de que las flores de estas plantas giran hacia el sol (Abdullah y Dash, 2013).

Por otra parte, la actividad antibacteriana se refiere a la capacidad de ciertas sustancias de eliminar o inhibir el crecimiento bacteriano sin dañar el ambiente u organismo que los rodea. Los antibacterianos según la acción ejercida en las bacterias se clasifican en bactericidas, el cual elimina el agente bacteriano, y bacteriostáticos, los cuales inhiben el crecimiento bacteriano. Se ha determinado que los extractos de diversas plantas contienen metabolitos primarios y secundarios, estos últimos poseen actividad antibacteriana, motivo por el cual se ha incrementado su uso en la medicina alternativa (García, 2010). Es por esto, que la presente investigación se basó en el estudio de la composición química del *Heliotropium indicum* L., en el cual se ha evidenciado la presencia de metabolitos secundarios, los cuales le confieren actividad antibacteriana a la planta, debido a que posee alcaloides de pirrolizidina (Bruneton, 2001).

El siguiente trabajo de investigación fue 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, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las variables e

Hipótesis. El Capítulo III, titulado Marco Metodológico comprende los siguientes puntos: Tipo y Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Instrumento de Recolección de Datos, Procedimientos de la Investigación y Diseño de Análisis. El Capítulo IV, denominado Resultados y Discusión, y El Capítulo V, llamado Conclusiones y Recomendaciones.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

En las organizaciones mundiales encargadas de velar por la salud humana, existe una preocupación global por la aparición de nuevos mecanismos de resistencia de los patógenos, a los antimicrobianos convencionales. Muchos medicamentos disponibles actualmente se vuelven ineficaces en la prevención y tratamiento de las infecciones, debido principalmente, a la aparición cada vez mayor de patógenos oportunistas multirresistentes, se estima que la resistencia bacteriana ocasionará 10 millones de muertes por año para el 2050 (Alcántar, Giono, Morfin, Santos y Torres, 2021). Por otra parte, las posibilidades terapéuticas se ven notablemente disminuidas por falta de nuevos medicamentos que actúen frente a diversos patógenos, y a pesar de la disponibilidad de fármacos para el tratamiento de estas infecciones, se presentan otros problemas como la restricción en el espectro de acción, costo y efectos adversos en el paciente (León, Tomas y Torres, 2017).

Debido a estas razones, en el año 2017 la Organización Mundial de la Salud (OMS), emitió un comunicado en el cual orientaba sus esfuerzos hacia la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos que superen dichas limitaciones (Alcántar y cols., 2021). Razón por la cual, recomienda y promueve el uso de productos naturales con fines medicinales, ya que éstos han demostrado ser eficaces y además presentan un riesgo mínimo para la salud del hombre. Dichos productos naturales aportan una gran cantidad de

compuestos químicos con carácter antibacteriano, como lo son los metabolitos secundarios, algunos de los cuales muestran actividad *in vitro* comparable a la de los antibacterianos utilizados en la terapéutica. Éstas sustancias pueden ser utilizadas directamente, o como base para la síntesis de nuevos principios útiles en el tratamiento de las infecciones (León, Tomas y Torres, 2017).

Una vez descrita la situación actual del problema de estudio, las autoras de esta investigación formulan el siguiente enunciado holopráxico: ¿Cuál es la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química del *Heliotropium indicum* L. en cepas de referencia internacional?

Justificación e Importancia de la Investigación

La necesidad que llevo a los autores a realizar la investigación, se basó en la resistencia a los antibacterianos, la cual ha ocasionado un problema de salud pública. Sin embargo, es importante destacar que ésta no es una enfermedad; esto debido a que la resistencia no suele ser un problema de patogénesis, sino de limitación de opciones terapéuticas. Por tanto, el problema básico radica en que se depende de los antibacterianos para tratar las infecciones (Hans, 1992).

Debido a esto, la búsqueda de sustancias con actividad antimicrobiana representa uno de los retos más grandes a nivel mundial. Dado que uno de los mayores problemas para la salud son los mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias. Es por esto, que existe una gran necesidad en cuanto a la búsqueda de sustancias con actividad antibacteriana (García, 2010).

Muchas clases de plantas contienen fitoquímicos, los cuales presentan actividad antibacteriana y son de especial interés en la industria farmacéutica para la obtención de fármacos inocuos y efectivos (Goyal y Sharma, 2014). Estos compuestos han hecho enormes contribuciones a la salud humana, ya

que a través de ellos el hombre ha encontrado en los recursos naturales la solución a diferentes problemáticas. Sin embargo, se evidencia la necesidad de seguir buscando nuevos compuestos que permitan solucionar el problema actual (Medina, 2000).

Por tal razón, investigaciones recientes han enfocado sus estudios en la búsqueda de nuevos compuestos que tengan efectos antibacterianos. Puesto que el desarrollo de patógenos multirresistentes es el resultado inevitable del uso indiscriminado de antibióticos. En pocas palabras, solo el descubrimiento y desarrollo continuo de nuevos fármacos con mecanismos de acción novedosos, provenientes de fuentes naturales, podrán ayudar a sobrellevar este problema (Souza, 2017).

La bioactividad presente en los compuestos fitoquímicos ha despertado el interés de muchos investigadores, debido a que estos pueden intervenir en los diferentes procesos metabólicos del organismo, cumpliendo un papel muy importante en el área terapéutica gracias a sus múltiples propiedades. Por esta razón, se ha evidenciado un aumento en el desarrollo de técnicas analíticas, que permitan determinar e identificar principios bioactivos en especies vegetales (Melvin, 2002).

En las últimas décadas, se ha empleado el uso de los metabolitos secundarios para el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas. Éstos sirven como modelos químicos para el diseño y la síntesis de nuevas drogas. Por lo tanto, es importante hacer estudios científicos para conocer su composición química, ya que un conocimiento científico hace posible una aplicación libre de riesgos (Ávalos y Pérez, 2009).

Actualmente, se ha evidenciado un avance en la proliferación de enfermedades causadas por microorganismos patógenos, la cual es una preocupación generalizada que constituye un factor de riesgo para la salud. Es por esto, que representa una tendencia la búsqueda de fuentes naturales, como lo son las plantas, de las cuales se han aislado compuestos bioactivos que inhiben el crecimiento bacteriano. Por tanto, se puede afirmar que las

plantas se han convertido en fuentes de hallazgos de numerosas drogas (Medina, 2000).

Desde la antigüedad, las plantas han presentado potencialidades, las cuales han sido utilizadas para curar enfermedades. Teniendo como desventaja el desconocimiento en muchos casos de la composición y caracterización de sus principios activos (Bruneton, 2001). Por tal motivo, investigaciones actuales han determinado componentes bioactivos presentes en la planta *Heliotropium indicum* L, que han demostrado tener actividad antibacteriana (Bharathajothi, Bhaaskarant y Menaca, 2015). Sin embargo, la mayor parte de los estudios realizados a dicho espécimen vegetal, se han llevado a cabo en la India y en el Sur de África, mientras que, en América Latina, y específicamente en Venezuela, han sido escasos los informes de dicho espécimen, motivo por el cual se realizó este trabajo con la finalidad de aportar nuevas bases teóricas para futuras investigaciones (Sarkar, y cols., 2021).

www.bdigital.ula.ve

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la relación entre la composición química del *Heliotropium indicum* L. y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos de las hojas del *Heliotropium indicum* L. utilizando la técnica de reflujo, con los solventes como hexano y etanol.
- Identificar la composición química preliminar de los extractos de *Heliotropium indicum* L. mediante el tamizaje fitoquímico.
- Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Heliotropium indicum* L. frente a cepas de referencia internacional; mediante el método de difusión de disco en agar (Kirby- Bauer).

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

El alcance de la investigación es progresivo y se marca con verbos logro (Hurtado, 2010). En tal sentido, el conocimiento que se generó durante esta investigación estuvo relacionado con confirmar la relación entre la composición química del *Heliotropium indicum* L. y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional, por tanto, esta investigación tuvo un alcance confirmatorio.

Mediante la realización de esta investigación se obtuvo la composición química preliminar de los extractos hexano y etanol de las hojas del *Heliotropium indicum* L., y partir de la identificación de los metabolitos secundarios, se determinó la actividad antibacteriana de dichos compuestos frente a cepas de referencia internacional. Con la finalidad de aportar una nueva alternativa terapéutica ante el fenómeno de resistencia desarrollado por las bacterias. Esta investigación representó el primer reporte proveniente del Estado Mérida sobre la composición química preliminar de los extractos de *Heliotropium indicum* L. y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional.

Limitaciones de la Investigación

Entre las limitaciones que presentó esta investigación, destacaron la ubicación de la especie *Heliotropium indicum* L., debido a que se encuentra ubicada en las zonas aledañas a la población de Encontrados, Municipio Catatumbo del Estado Zulia. Además de esto, el tiempo de cosecha de la misma, es anual, por lo que solo estaba presente en los meses de abril y mayo. A esto se le sumó los altos costos que representaron la obtención de los medios de cultivos específicos para la realización de las pruebas de

susceptibilidad, además de las constantes fallas del servicio eléctrico que entorpecieron la realización de los procedimientos necesarios para llevar a cabo la investigación. Aunado a esto, el problema del servicio de transporte público dificultó tanto el traslado hacia la zona donde se encuentra ubicado el espécimen vegetal, así como también hacia el Instituto donde se realizó la parte experimental del proceso investigativo.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Nakkuntod y Prapatsorn (2021), realizaron un estudio titulado: Potencial de las malezas herbarias tailandesas para la actividad antimicrobiana utilizando el método de difusión en disco de agar, cuyo objetivo fue evaluar el potencial de las actividades antifúngicas y antibacterianas de los extractos acuoso, acetona, hexano y metanólico, de cuatro especies de malezas las cuales fueron *Polygonum tomentosum* Willd, *Eclipta prostrata* L., *Heliotropium indicum* L. y *Cleome viscosa* contra *Candida albicans*, *Malassezia furfur*, *Malassezia globosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* utilizando el método de difusión en agar con disco. Las hojas de *Heliotropium indicum* se recogieron de diferentes localizaciones; las mismas fueron lavadas, secadas a la sombra y pulverizadas en polvo grueso, para su posterior extracción con agua, acetona, hexano y metanol durante 48 horas en un extractor soxhlet. Los extractos se concentraron en vacío para producir extractos secos, los cuales se utilizaron para el estudio de la actividad antimicrobiana a una concentración de 12 mg/mL. El resultado de la evaluación de los extractos metanólicos de *Eclipta prostrata* L., *Heliotropium indicum* L. y *Cleome viscosa* L. mostraron buena inhibición para *S. aureus* y *B. subtilis*; las zonas de inhibición para *S. aureus* fueron $10,0 \pm 0,5$, $9,0 \pm 0,5$ y $13,0 \pm 0,5$ mm para los géneros anteriormente descritos, y para *B. subtilis* fueron $9,0 \pm 0,5$, $9,0 \pm 0,5$ y $13,0 \pm 0,5$ mm respectivamente. Además, se determinó que los extractos con

agua, acetona y hexano de todas las plantas no tuvieron actividad antibacteriana sobre *E. coli*, ni efecto antifúngico.

Ihtesham y Khan (2019), realizaron un estudio titulado: Potencial antibacteriano y antifúngico *in vitro* de extractos crudos metanólicos de algunas especies de *Heliotropium*; el cual tuvo como objetivo determinar la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos metanólicos obtenidos de tres especies del género *Heliotropium* (*H. europeum* L., *H. curassavicum* L., y *H. crispum* D.) frente a cinco cepas bacterianas patógenas las cuales fueron *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y *Enterobacter aerogenes*, y dos cepas de hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus*. La obtención del extracto metanólico se llevó a cabo mediante maceración, durante 3 días seguidos; posteriormente, se sometió a filtración y luego se concentró empleando el uso del rotavapor. Seguido a esto se realizaron diluciones del extracto a 5,0, 7,5, 10,0, 12,5 y 15,0 mg/mL, que fueron utilizadas para la determinación de la actividad antimicrobiana, para lo cual se emplearon los métodos de difusión en agar y dilución en tubo. Todas las concentraciones anteriormente mencionadas se probaron contra las cepas bacterianas y solo se ensayaron las concentraciones de 10, 12,5 y 15 mg/mL para cepas fúngicas. Además, se empleó el uso de la Doxiciclina ® como control positivo y del Dimetilsulfóxido (DMSO) como control negativo. La actividad de *Heliotropium* spp. se comparó con el antibiótico estándar nombrado anteriormente. Los resultados indicaron que las concentraciones de los extractos de las tres plantas tuvieron una amplia gama de actividad antibacteriana y antifúngica. Se evidenció que todas las cepas bacterianas presentaron una mayor sensibilidad frente a los extractos de las tres plantas a una concentración de 15 mg/mL, siendo *Staphylococcus aureus* la cepa más sensible y *Bacillus subtilis*, la cepa con menor sensibilidad. El extracto metanólico de estas plantas mostró una buena inhibición del crecimiento contra las dos especies de hongos utilizadas, frente a las 3 concentraciones ensayadas. Se concluyó con que la sensibilidad de los microorganismos

incrementa al aumentar la concentración del extracto, los cuales tienen una actividad de amplio espectro, pero inferior a la del antibiótico estándar, por esta razón se recomienda la utilización de dichos extractos en el desarrollo de tratamientos alternativos contra varios organismos patógenos, debido a que presentan efectos secundarios reducidos.

Adedeji y Osungunna (2018), realizaron un estudio titulado: Cribado fitoquímico y actividad antibacteriana del extracto de metanol de *Heliotropium indicum*. Cuyo objetivo fue determinar el efecto antibacteriano y los componentes bioactivos presentes en *H. indicum* L., evaluando el extracto metanólico frente a cinco cepas bacterianas las cuales fueron *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Para la obtención del extracto metanólico las hojas frescas fueron secadas al sol durante aproximadamente 2 semanas y molidas por separado en polvo fino utilizando un molinillo mecánico; y empleando el método de maceración para la extracción. Se pesaron por separado 20 g de la parte de la planta en polvo y se agregó 100 mL de metanol a temperatura ambiente durante 72 horas en condiciones regulares de agitación. El extracto se filtró utilizando papel de filtro Whatman número 1, los filtrados se evaporaron a la sequedad para su posterior utilización en el cribado fitoquímico. Para el estudio de la actividad antibacteriana se empleó el método de difusión en pozo modificado (Kirby-Bauer) empleando concentraciones del extracto de 6,25, 12,5, 25, 50, 100 y 200 mg/mL. El análisis fitoquímico reveló la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, saponinas y taninos. El resultado de la evaluación de la actividad antibacteriana reveló que tanto *S. aureus* y *Klebsiella* spp. se inhibieron a 50, 100 y 200 mg/mL, mientras que *P. aeruginosa* y *P. mirabilis* fueron inhibidos a 100 mg/mL y 200 mg/mL, por otra parte *E. coli* se inhibió solo a 200 mg/mL de concentración del extracto.

Antecedentes Históricos

Desde tiempos muy remotos las plantas han sido utilizadas para curar enfermedades gracias a sus principios activos, los cuales se encuentran en estructuras como hojas, raíces, flores, frutos, tallos y cortezas. Los principios activos son nutrientes esenciales que los animales y los seres humanos incorporan a su metabolismo al consumir vegetales, semillas o frutos en su dieta, y los beneficios aportados por ellos a la salud, son múltiples. Todos estos principios activos son aislados y patentados por industrias como la farmacéutica para la elaboración de medicamentos, pero esta utilización con fines médicos no es una acción nueva, desde hace miles de años el ser humano ha extraído sustancias de las plantas con la finalidad de curar diversas patologías (García, 2019).

El uso de las plantas medicinales se remonta a la antigüedad. Los pueblos primitivos empleaban diferentes sustancias que obtenían de las plantas para curar las enfermedades; en Egipto usaban las plantas medicinales de una manera controlada, existe un documento llamado el Papiro de Ebers, del año 1700 a.C., donde se registraron más de setecientas fórmulas en las que aparecen muchas plantas medicinales. Por otra parte, en China, la aplicación de plantas en medicina era practicada ya en el año 5000 a.C. Existe un compendio, en un libro llamado Pen Tsao, donde se reúne el estudio de más de trescientas plantas; contiene más de ocho mil fórmulas preparadas con base en sustancias obtenidas de vegetales y animales. En la India, la utilización de las plantas medicinales, se menciona en textos como el Rig- Veda, uno de los libros sagrados del brahmanismo, en este y otros textos hindúes se incluyen fórmulas farmacéuticas con diferentes plantas como ungüentos, infusiones, y cataplasmas (García, 2019). El *Heliotropium indicum* L., conocido como “heliotropo indio” es comúnmente utilizado en la India, presentando una larga historia en la medicina tradicional en muchos países del mundo, el jugo extraído de las hojas machacadas se utilizaba para

curar heridas y úlceras de la piel, mientras que las infusiones de la planta se empleaban para tratar procesos inflamatorios tanto en animales como en humanos. Además, se informa que en la composición fitoquímica de dicha especie, se ha evidenciado la presencia de metabolitos primarios y metabolitos secundarios, éstos últimos presentan bioactividad antimicrobiana (Abdullah y Dash, 2013).

www.bdigital.ula.ve

Bases teóricas

Productos Naturales

Un producto natural, es un compuesto químico o sustancia producida por un organismo vivo encontrado en la naturaleza, que tiene generalmente una actividad farmacológica o biológica para su uso en el descubrimiento de fármacos, debido a su gran disponibilidad en la naturaleza. Los productos naturales pueden ser extraídos de los tejidos de las plantas terrestres, organismos marinos o caldos de fermentación de microorganismos. Los constituyentes que son identificados y aislados de plantas han sido utilizados para la síntesis de una gran variedad de drogas, durante las últimas décadas. En los años recientes, debido al creciente interés en el uso de productos farmacéuticos, las sustancias naturales son la principal fuente de medicinas alternativas, que se utilizan en el tratamiento de muchas enfermedades (Nawaz y Sarwer, 2016).

Los productos naturales se clasifican de acuerdo a su estructura química, en compuestos alicíclicos o cicloalifáticos como terpenoides, esteroides y algunos alcaloides; compuestos aromáticos o benzoicos como fenoles y quinonas; compuestos heterocíclicos, como alcaloides y flavonoides. Estos productos son biosintetizados en los organismos mediante reacciones enzimáticas, en las cuales la fuente de carbono más frecuentemente utilizada es la glucosa, la misma es fotosintetizada en las plantas verdes. Durante la evolución de la investigación fitoquímica, se han elaborado diversas teorías de las rutas biosintéticas de los productos naturales, y en la actualidad se conocen tres grandes vías o rutas fundamentales:

- **Ruta del ácido mevalónico:** el ácido mevalónico o su forma ionizada, el mevalonato, es un importante metabolito intermediario en la biosíntesis de colesterol, a partir de él se forman unidades de prenilo

que tras uniones sucesivas conducen a la formación de isoprenoides tales como terpenoides, esteroides y carotenoides.

- **Ruta del ácido shikímico:** el ácido shikímico es precursor de diversos intermediarios metabólicos aromáticos, como los taninos, los fenilpropanoides, los lignanos, los aminoácidos aromáticos, así como sus derivados entre los cuales destacan los glucósidos cianogénicos aromáticos, catecolaminas, melaninas, los flavonoides, y diversos alcaloides. El intermediario principal es el ácido shikímico.
- **Ruta del acetato-malonato:** es una ruta policétida en la cual a partir de malonato y acetato se forman los policétidos y ácidos grasos (Marcano y Hasegawa, 2002).

Clasificación de los metabolitos secundarios

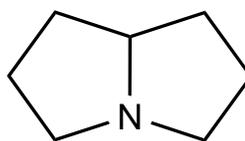
Alcaloides

El nombre alcaloide quiere decir sustancia análoga a los álcalis. Son metabolitos secundarios de las plantas, sintetizados generalmente, a partir de aminoácidos, por lo tanto, son nitrogenados (Klages, 1968). Los alcaloides de pirrolizidina son un grupo de alcaloides que presentan una estructura de pirrolizidina y se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Se consideran de gran interés farmacológico, biológico y quimiotaxonómico. Estos metabolitos se han aislado de una amplia variedad de plantas, especialmente de géneros pertenecientes a la familia Boraginaceae (Sammy, 2005).

La estructura química de los alcaloides de pirrolizidina está basada en un anillo de pirrolizidina, que consiste en dos anillos fusionados con un átomo de nitrógeno como puente (Figura 1). Existen dos grupos principales, los alcaloides de pirrolizidina insaturados y saturados; dependiendo de la existencia o no, de un doble enlace en las posiciones uno y dos del anillo.

Hasta la fecha se conocen aproximadamente 600 alcaloides de pirrolizidina diferentes, todos con un perfil común de toxicidad (Sammy, 2005). Los alcaloides de pirrolizidina inducen necrosis dependiente de la dosis o inhibición de la mitosis, pero independientes de la vía de administración (Fayer, 2021). Debido a los efectos tóxicos que presentan estos alcaloides, no se recomienda el uso de especies vegetales que contengan dichos metabolitos en la terapia interna, los usos externos para curar la cicatrización de heridas y las infecciones de la piel son menos riesgosos (Sarkar y cols., 2021).

Figura 1. Estructura química del alcaloide de pirrolizidina.

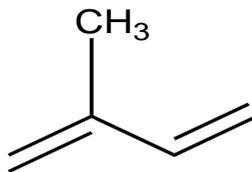


Tomado y modificado de Sammy, 2005.

Triterpenos y/o Esteroides

Con el nombre de terpenos o isoprenoides se conoce a un conjunto de sustancias que conforman uno de los grupos de fitoquímicos más difundidos. Estos compuestos tienen un origen biosintético común y, aunque con estructuras químicas muy distintas, todos ellos proceden de la condensación del isopreno. El cual es un hidrocarburo con cinco átomos de carbono (Figura 2), que se encuentra principalmente en los alimentos de color verde, en productos derivados de la soja y en los cereales (Aleixandre, López y Miguel, 2012).

Figura 2. Estructura química del isopreno.

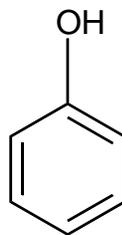


Tomado y modificado de Aleixandre, López y Miguel, 2012

Fenoles

Son compuestos orgánicos que resultan de reemplazar un hidrógeno de su anillo aromático por uno o más hidroxilos, siendo este su grupo funcional (Figura 3). Éstos son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas, y actúan como fitoalexinas, las cuales son moléculas de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas frente a un amplio espectro de hongos y bacterias patógenas. Los fenoles además tienen la propiedad de pigmentar muchas partes de la planta mediante antocianos, los cuales son pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales y que otorgan el color rojo, púrpura o azul a las hojas, flores y frutos (Martínez, 1982).

Figura 3. Estructura química del fenol.



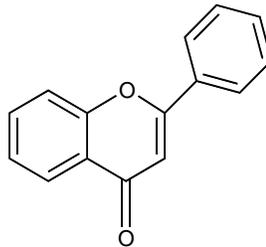
Tomado y modificado de Martínez, 1982.

Flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios polifenólicos que comúnmente presentan un grupo cetona y normalmente poseen pigmentos de coloración amarilla (Figura 4). Dentro de los flavonoides se pueden distinguir cuatro grupos principales, los flavonoides, los isoflavonoides, los neoflavonoides y los antocianos. Los flavonoides son sintetizados en el citoplasma y luego migran hacia su destino final en las vacuolas celulares. Además, cumplen funciones metabólicas importantes en las plantas, algunas funciones son comunes a todas las plantas y otras son específicas de algunos taxones, como ejemplo de funciones universales, los flavonoides son responsables de la resistencia de las plantas a la fotooxidación de la luz ultravioleta del sol y una función muy importante es la atracción de los animales polinizadores, a través del color o el olor que dan a la planta o a sus flores (Barrón y García, 2011).

www.bdigital.ula.ve

Figura 4. Estructura química de los flavonoides.



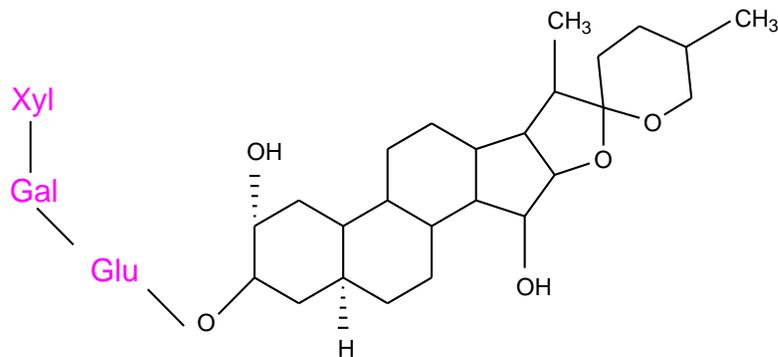
Tomado y modificado de Barrón y García, 2011.

Saponinas

Las saponinas son glucósidos de esteroides o de triterpenoides, llamadas así por sus propiedades semejantes a las del jabón. Cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (representado por el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el glucósido) y forman una

espuma cuando se les agita en agua (Figura 5). Existe una gran variedad de plantas que contienen saponinas en distintas concentraciones, y por hidrólisis de estas se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada genéricamente sapogenina (Blanco y Mena, 2015).

Figura 5. Estructura química de las saponinas.

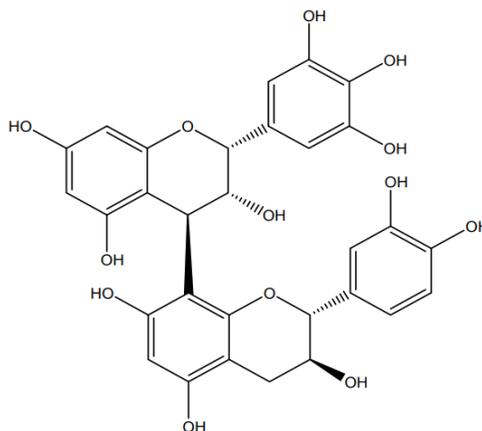


Tomado y modificado de Blanco y Mena, 2015.

Taninos www.bdigital.ula.ve

Los taninos son compuestos químicos de carácter fenólico de alto peso molecular, no cristalizables, que forman con el agua soluciones coloidales de reacción ácida y de sabor astringente. Están presentes en un gran número de plantas producto del metabolismo secundario, pueden ser hidrolizables y condensados (Figura 6). Además, su carácter hidrosoluble permite que sea de fácil extracción y de gran utilidad en la industria química y farmacéutica (López y Medrano, 2012).

Figura 6. Estructura química de la procianidina (tanino condensado).



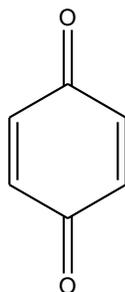
Tomado y modificado de López y Medrano, 2012.

Quinonas

Son compuestos cíclicos formados por uno o más anillos hexagonales, que contiene dos funciones oxo, de tal manera, que los dos grupos carbonilos están unidos al menos por 2 dobles enlaces (C=C) para formar un sistema de dobles enlaces conjugados (Figura 7). Las quinonas son un grupo de sustancias orgánicas semivolátiles, de naturaleza ubicua, pertenecen al grupo de las dicetonas cíclicas conjugadas; que por reducción se convierten en polifenoles, los que fácilmente la regeneran por oxidación. Por sus colores amarillo- violeta contribuyen a la pigmentación de numerosos vegetales y de algunos animales. Algunas como la vitamina K, la ubiquinona (coenzima Q) y las plastoquinonas intervienen en los fenómenos respiratorios, transportando electrones, por lo que se encuentran en todos los seres vivos. Por el sistema aromático que dan al reducirse, se les puede dividir en: benzoquinonas, naftaquinonas, antraquinonas y fenantraquinonas. Según su biosíntesis se les considera como acetogeninas, en particular las antraquinonas y

naftaquinonas, mientras que las benzoquinonas pueden provenir de 2 rutas, del ácido shikímico y del ácido mevalónico (Domínguez,1979).

Figura 7. Estructura química de las quinonas



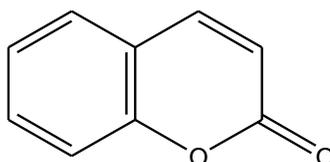
Tomado y modificado de Domínguez,1979.

Cumarinas

Las cumarinas constituyen un grupo importante de compuestos naturales, se les considera derivados de la lactona del ácido o-hidroxicinámico. Son compuestos químicos que poseen el esqueleto de un anillo bencénico unido a un solo carbono, derivan de un fenilpropanoide al que se le deleccionaron dos carbonos de la cadena propánica (Figura 8). Son biosintetizadas por las plantas por la vía del ácido shikímico, a partir de la fenilalanina. En plantas, se encuentran en los tegumentos de las semillas, frutos, flores, raíces, hojas, y tallos, aunque la mayor concentración se encuentra en general en frutos y flores. Son compuestos importantes no sólo en las respuestas defensivas de la planta, sino, a los que se les atribuye una importante actividad farmacológica que hace posible en humanos, coadyuvar en el tratamiento de múltiples enfermedades y padecimientos (Reija, 2007). Se ha descrito que pueden ser anticoagulantes como el dicoumarol y la coumarina, espasmolíticas e hipercolesterémicas, o inhibidoras del crecimiento vegetal. Los glicósidos cumarínicos se pueden hidrolizar por tratamientos con ácidos

o enzimas, y recuperarse después la aglicona, e identificar los azúcares por cromatografía en papel, y formación de derivados. Además, deberá intentarse aislar e identificar el glucósido aprovechando su polaridad y la fluorescencia de las cumarinas vistas con luz ultravioleta (Domínguez,1979).

Figura 8. Estructura química de las cumarinas



Tomado y modificado de Domínguez,1979.

Familia Boraginaceae

www.bdigital.ula.ve

La Familia Boraginaceae comprende cerca de 100 géneros y más de 2000 especies dividida en cinco subfamilias Boraginoideae, Cordioideae, Ehretioideae, Heliotropioideae y Wellstedioideae; distribuidas por las regiones tropicales, subtropicales y templadas de ambos hemisferios, las cuales se cultivan como ornamentales, forestales y medicinales. Dicha familia generalmente está formada por plantas herbáceas o pequeños arbustos, su clasificación taxonómica se muestra en la tabla 1. Las hojas son alternas, sin estípulas, simples y a menudo presentan vellosidades, aunque no todos los miembros de la familia, tiene hojas vellosas; el carácter tosco de las vellosidades se debe al óxido de silicio y al carbonato de calcio. Las flores aparecen reunidas por lo general en cimas escorpioides (Miranda y Pereira, 2008).

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de la familia Boraginaceae

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Boraginaceae

Tomado y modificado de Miranda y Pereira, 2008.

Ésta familia comprende un grupo de plantas que son importantes para la farmacología y la cosmetología. El efecto terapéutico de dicha familia está relacionado con la presencia de muchos compuestos biológicamente activos, incluidos naftaquinonas, flavonoides, terpenoides y fenoles. Los metabolitos aislados de estas plantas exhiben efectos antimicrobianos, antitumorales, antivirales, antiinflamatorio y anticonceptivo. Sin embargo, estas plantas también son ricas en alcaloides de pirrolizidina (Dresler y Wójcik, 2017).

Género Heliotropium

El *Heliotropium* es un género ampliamente extendido de plantas que se caracterizan por ser hierbas anuales, y que además son hermafroditas. Presentan hojas pecioladas, inflorescencias en cimas helicoidales o flores solitarias a lo largo de los tallos frondosos. Se encuentran distribuidas en regiones templadas y tropicales de ambos hemisferios y son utilizadas para el tratamiento de enfermedades. Se denomina 'heliotropo indio' y es altamente endémico en India y Bangladesh, también se encuentra en diferentes partes del mundo, especialmente en muchos países africanos (Sarkar y cols., 2021). En la historia de la medicina popular, las plantas del género *Heliotropium* se utilizan en tratamientos de inflamaciones, gota,

reumatismo, enfermedades de la piel, trastornos menstruales y picaduras venenosas (Nawaz y Sarwer, 2016).

Algunos informes fitoquímicos sobre éste género revelaron la presencia de diversos metabolitos tanto primarios, como secundarios, entre los que se incluyen carbohidratos, proteínas, aminoácidos, glucósidos, alcaloides, aceites volátiles, taninos, mucílagos, flavonoides, esteroides y saponinas respectivamente (Kumar, Meher y Shankar, 2019). Se ha descrito que diferentes especies del género *Heliotropium* son examinadas por presentar valiosas propiedades farmacológicas; la especie *Heliotropium angiospermum* Murray, posee varios alcaloides, entre los cuales se destacan los de pirrolizidina (Espinosa, y Villaseñor, 1998); por otro lado el *Heliotropium curassavicum* contiene saponinas y alcaloides cuaternarios, que deben ser estudiados a futuro para establecer si se trata realmente de alcaloides, o de diferentes compuestos (González y Robledo, 2016). La especie de *Heliotropium arborescens* Linneo, posee compuestos fenólicos y flavonoides (Alvarado, 2017); todos estos metabolitos secundarios poseen actividades biológicas significativas como antimicrobianos, antitumorales, antivirales, antiinflamatorio, y en la cicatrización de heridas (Nazaw y Sarwer, 2016).

***Heliotropium indicum* L.**

Se trata de una hierba erecta con tallos pubescentes, flores pequeñas, blancas o color lila azulado, poseen cinco pétalos, arregladas a lo largo de una punta retorcida. Es una planta proveniente del continente euroasiático, conocida como “heliotropo indio”; el nombre “heliotropo” deriva del griego “helios” que significa sol, y “tropein” que significa "girar" por el hecho de que las flores de estas plantas giran hacia el sol (Abdullah y Dash, 2013). Tiene la apariencia de la cola de un alacrán, por este motivo es llamado comúnmente rabo de alacrán (Bharathajothi, Bhaaskarant y Menaca, 2015).

Según lo descrito por Fuentes (2006), esta planta pertenece a la familia Boraginaceae, al género *Heliotropium* y a la especie *indicum*, tal como se describe en la tabla 2. Ésta es una hierba que posee tallos cilíndricos de 1-5 mm de grosor, densamente pubescentes hacia el ápice, flores sésiles hermafroditas y tetracíclicas (Figura 9). Los componentes químicos de *H. indicum* L incluyen flavonoides, terpenoides, esteroides, saponinas, taninos y alcaloides de pirrolizidina. Además, presenta actividades farmacológicas como la actividad antibacteriana, antihelmíntica, antiinflamatoria, y toxicológicas (Ceballos, Gómez y Sánchez, 2017).

Figura 9. *Heliotropium indicum* L.



Tomado y modificado de Bharathajothi, Bhaaskarant, y Menaca, 2015.

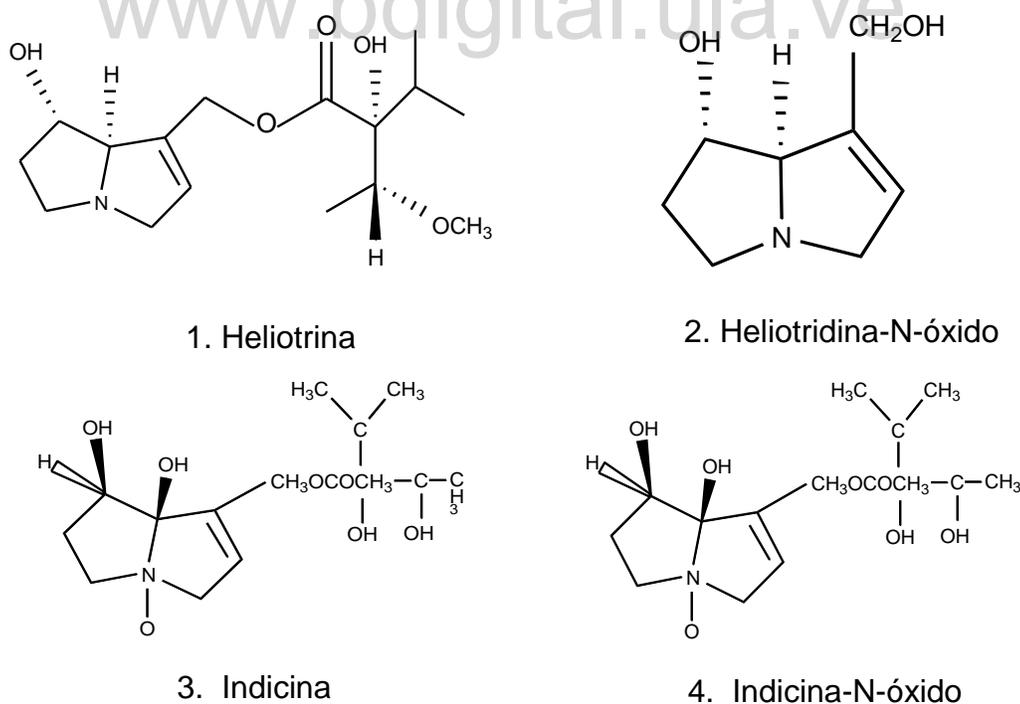
Tabla 2. Clasificación taxonómica del *Heliotropium indicum* L.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Familia	Boraginaceae
Género	<i>Heliotropium</i>
Especie	<i>H. indicum</i>

Tomado y modificado de Abdullah y Dash, 2013.

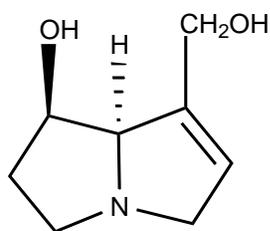
Se ha descrito que, dentro de su composición química, ésta contiene una gran variedad de metabolitos secundarios, reportándose diversos alcaloides de pirrolizidina en toda la planta, entre los cuales se incluyen heliotrina (1), heliotridina-N-óxido (2), indicina (3), indicinina, indicina-N-óxido (4), retronecina (5), supinidina (6) y lindelofidina. Además, las partes aéreas contienen equinina, heleurina (7), supinina (8) lasiocarpina (9), y N-óxido de lasiocarpina. Dentro de las semillas se han identificado otros alcaloides como la cinoglosina, europina-N-óxido, heleurina-N-óxido, heleotrina-N-óxido y heliotrina. Alcaloides como putrescina, espermidina, homoespermidina y espermina se han identificado en las hojas. La helindicina (10) es un nuevo alcaloide de pirrolizidina que se ha aislado de las raíces de *H. indicum* L. (Figura 10) (Abdullah y Dash, 2013).

Figura 10. Estructura química de los principales alcaloides pirrolizidínicos presentes en el *Heliotropium indicum* L.

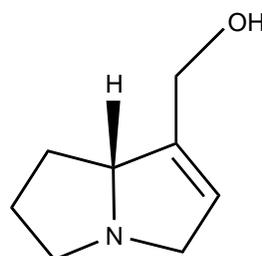


Tomado y modificado de Abdullah y Dash, 2013.

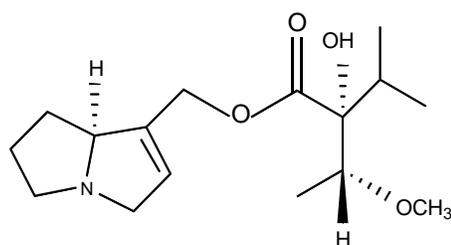
Figura 10. Estructura química de los principales alcaloides pirrolizidínicos presentes en el *Heliotropium indicum* L. (Continuación).



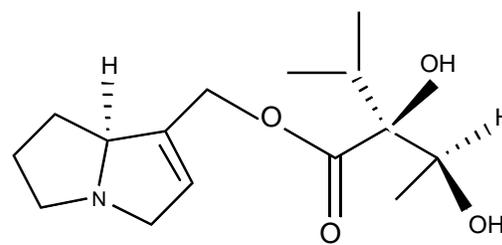
5. Retronecina



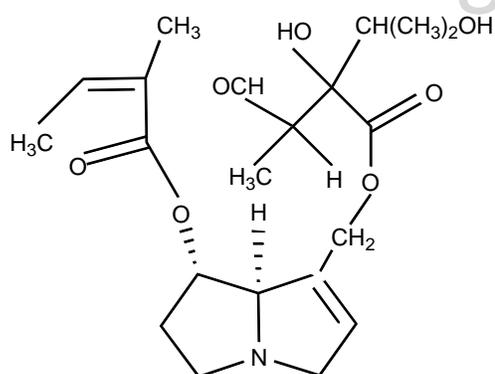
6. Supinidina



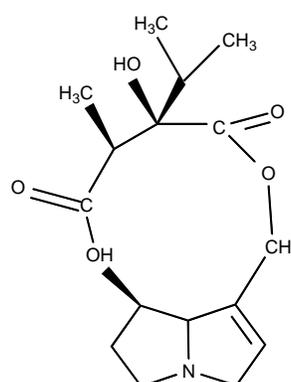
7. Heleurina



8. Supinina



9. Lasiocarpina



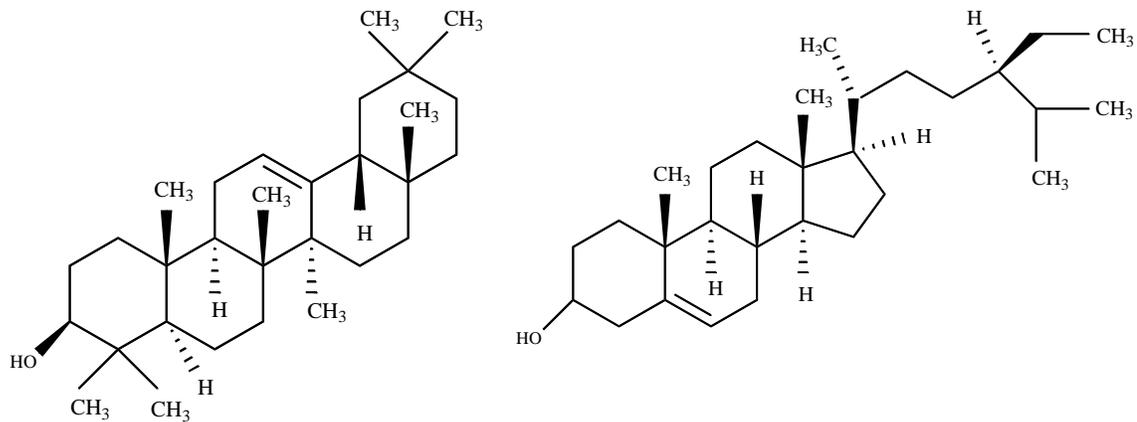
10. Helindicina

Tomado y modificado de Abdullah y Dash, 2013.

Además de alcaloides, se han identificado varios triterpenos y esteroides dentro de los que se incluyen amirina (**11**), lupeol, calinasterol, sitosterol (**12**), estigmasterol (**13**) y campesterol, los cuales han sido reportados en toda

planta (Figura 11). Todos estos compuestos le confieren actividad biológica al *Heliotropium indicum* L., como antimicrobiano y antiviral (Abdullah y Dash, 2013).

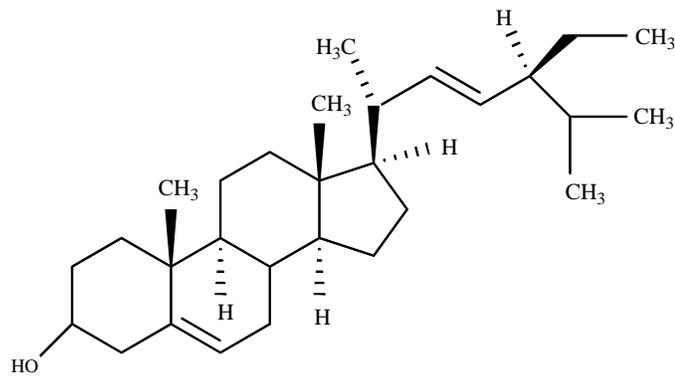
Figura 11. Estructura química de los principales triterpenos y esteroides presentes en el *Heliotropium indicum* L.



11. Amirina

12. Sitosterol

www.bdigital.ula.ve



13. Estigmasterol

Tomado y modificado de Nawaz y Sarwer, 2016.

Extractos Vegetales

Se define como extracto vegetal el producto líquido obtenido a partir de plantas o parte de ellas, con varios procedimientos y con varios solventes. Gracias a este proceso los principios activos, los cuales representan la parte activa de la planta, pasan al disolvente. De esta forma, pueden ser utilizados con mucha más facilidad y precisión en la industria farmacéutica (Sharapin, 2000).

Métodos de obtención de extractos vegetales

Maceración

Es un proceso de extracción sólido- líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretenden extraer (Albornoz, 1980). Consiste en remojar la materia prima fragmentada con el solvente para que este penetre la estructura celular y disuelva las sustancias. El material se agita esporádicamente por un periodo mínimo de dos días. Luego se decanta el líquido, filtrando y exprimiendo el residuo (Burdock, 1975).

Lixiviación

Es un proceso que consiste en disolver selectivamente, en un solvente apropiado, los componentes mayoritarios o los elementos traza de una muestra o un metal líquido. Se trata de un proceso inverso a la precipitación. Otro nombre que recibe esta técnica es disolución selectiva (Gómez y Valcárcel, 2004).

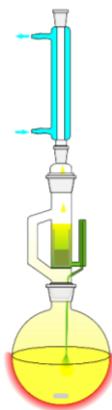
Extracción con solventes orgánicos

Es un procedimiento que consiste en agitar una solución acuosa con el disolvente orgánico elegido. El cual, por ser inmisible con el agua, formara dos capas fácilmente separables. De esta manera, la sustancia orgánica (solute), presente en la solución acuosa se distribuirá entre el agua (fase acuosa) y el disolvente orgánico (fase orgánica). Las sales inorgánicas prácticamente insolubles en el disolvente orgánico, permanecerán en la fase acuosa (Vogel, 1974).

Extracción continúa

Es la técnica usada en la separación de sustancias orgánicas a partir de un material sólido. Es ampliamente utilizada en el aislamiento de productos naturales, presentes en tejidos de plantas o animales. Para dicha técnica se emplea el uso de un aparato conocido como extractor de soxhlet (Figura 12). El cual está diseñado de tal forma que permite que un mismo volumen del disolvente empleado, actúe repetidas veces sobre el material y extraiga la sustancia deseada (Brewsrer, Calvin y Vanderwerf, 1970).

Figura 12. Extractor de Soxhlet.



Tomado y modificado de Brewsrer, Calvin y Vanderwerf, 1970.

Calentamiento a reflujo

El reflujo es una técnica experimental de laboratorio para el calentamiento de reacciones. Las cuales transcurren a temperatura superior a la del ambiente, causando que el disolvente se evapore y se condense en el refrigerante de reflujo, volviendo de nuevo al matraz. Es ampliamente utilizada en aquellos procedimientos que requieren mantener un volumen de reacción constante. Además, presenta como ventaja la obtención de dos extractos que se pueden obtener simultáneamente y en un periodo corto de tiempo (Durst, y Gokel, 1985).

Tamizaje fitoquímico

El tamizaje o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Este consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del mismo, constituyen únicamente una orientación, y deben interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico (Sharapin, 2000). Algunos de los ensayos existentes, para los diferentes grupos de metabolitos secundarios son:

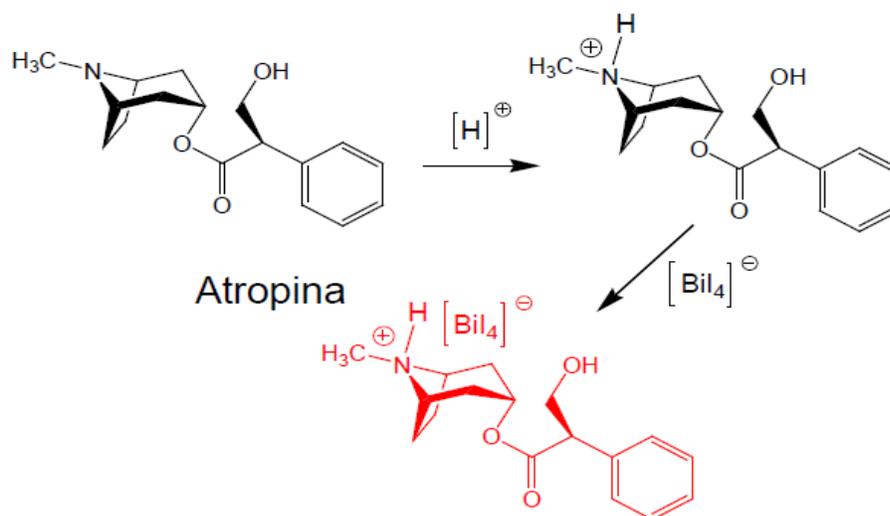
Alcaloides

La extracción de estos compuestos depende tanto de la naturaleza del material a procesar como de las estructuras químicas. Así como, de las propiedades físicas de los alcaloides presentes que se desean separar del

material biológico. Por estar casi siempre en forma de sal, son solubles en agua, además pueden utilizarse solventes orgánicos, si son transformados a sus bases libres por alcalinización. Las bases cuaternarias son casi siempre solubles en agua, por lo que debe recurrirse a su precipitación por formación de complejos. Esto se realiza empleando el uso de solución de yodo- yoduro de potasio (reactivo de Wagner), bicloruro de mercurio, tetrayoduro de potasio (reactivo de Mayer), nitrato de bismuto pentahidratado (reactivo de Dragendorff), solución de ácido pícrico (reactivo de Hager), entre otros (Marcano y Hasegawa, 2002).

En ésta investigación se llevó a cabo tres reacciones para la identificación de alcaloides. Una de ellas, es la de Dragendorff, la cual se fundamenta en la detección de alcaloides empleando el uso de agentes reveladores, que se basan en la capacidad que tiene los alcaloides en estado de sal, obtenidos a partir de extractos ácidos, de combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tungsteno, formando precipitados con coloraciones específicas. La presencia de alcaloides por este método se evidencia por la formación de un precipitado naranja rojizo cuando los alcaloides están en presencia del reactivo en una solución ácida (Figura 13). Es importante destacar que cuando se acopla a un método espectrofotométrico se puede desarrollar un método cuantitativo, rápido y fácil para la estimación total de alcaloides por precipitación de Dragendorff (Arango, 2008).

Figura 13. Fundamento químico de la Reacción de Dragendorff



Tomado y modificado de Aponte, Castro y Parra, 2016.

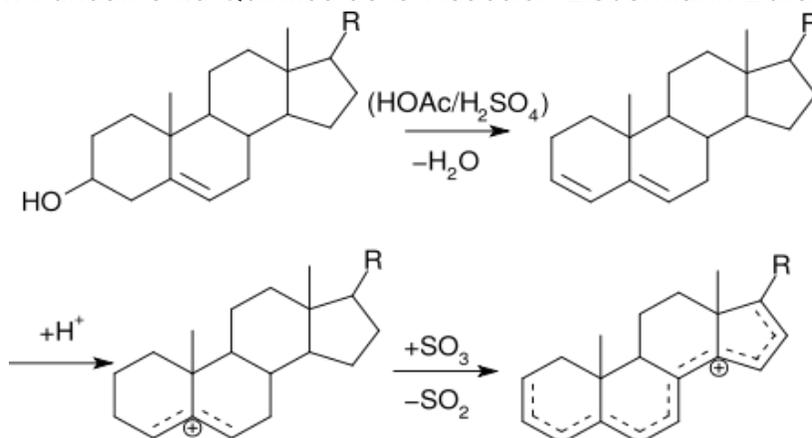
Otra prueba empleada en la identificación de alcaloides es la de Wagner, en la que se utiliza una solución acuosa de yodo con yoduro de potasio que reacciona con los alcaloides presentes en el extracto vegetal, provocando la formación de un precipitado de color marrón. Además de esta última, existe otra prueba para la caracterización no específica de alcaloides, en la que se emplea el uso del reactivo de Mayer, éste reacciona con los alcaloides, originando un precipitado blanco o amarillo claro, que puede ser amorfo o cristalino (Remington, 2003).

Triterpenos y/o Esteroides

Para su análisis preliminar en plantas la prueba más comúnmente usada es la de Liebermann-Burchard que se basa en la reacción de los triterpenos y esteroides con el anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado, produciéndose una pérdida de agua y una protonización del colesterol (Figura 14). Seguido a esto se constituyen en medio anhidro polímeros de

hidrocarburos no saturados de intenso color verde azulado, indicando la positividad de la reacción (Carvajal y Uribe, 2009).

Figura 14. Fundamento Químico de la Reacción Liebermann-Burchard

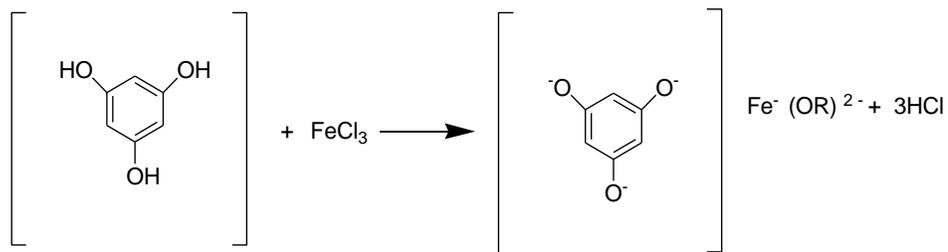


Tomado y modificado de Carvajal y Uribe, 2009.

Fenoles

Para la identificación de los mismos, se utilizó el ensayo con cloruro férrico (FeCl₃), que consiste en una reacción de sustitución en la cual el hierro del cloruro férrico sustituye al protón del grupo hidroxilo (-OH) dando como resultado la formación de fenóxido férrico. Esta respuesta se debe al ataque producido por el ion Cl⁻ al hidrogeno del grupo -OH, provocando una ruptura del enlace y la unión del grupo fenóxido al Fe³⁺ (Figura 15). Dicha reacción se caracteriza por generar soluciones vivamente coloreadas (azul, verde y violeta). Si el color es amarillo débil, el mismo que el FeCl₃, la reacción se considera negativa (Martínez, 1982).

Figura 15. Fundamento Químico de la Reacción con cloruro férrico (FeCl₃)

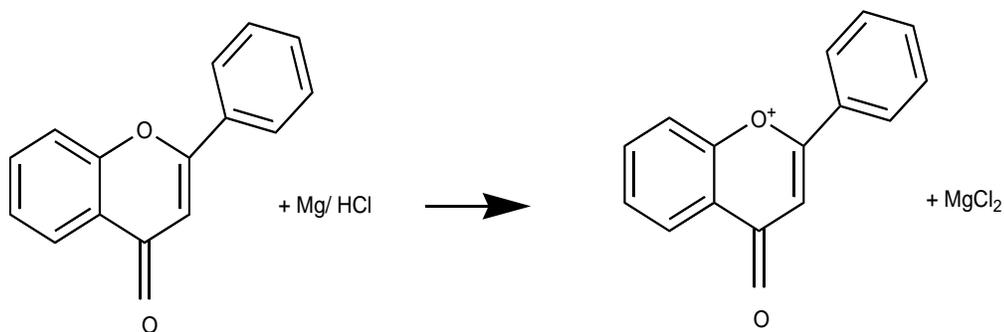


Tomado y modificado de Aponte, Castro y Parra, 2016.

Flavonoides

Para su detección se emplea principalmente la prueba de Shinoda, la cual consiste en una reacción de oxidación del magnesio metálico por la acción del ácido clorhídrico concentrado, dando como productos al dihidrógeno, que es eliminado en forma de gas y el cloruro de magnesio, que es el que forma complejos con los flavonoides dando coloraciones características. El magnesio divalente intensifica la coloración por estar doblemente coordinado (Figura 16). (Vidaurre, 2011).

Figura 16. Fundamento Químico de la Reacción de Shinoda



Tomado y modificado de Aponte, Castro y Parra, 2016.

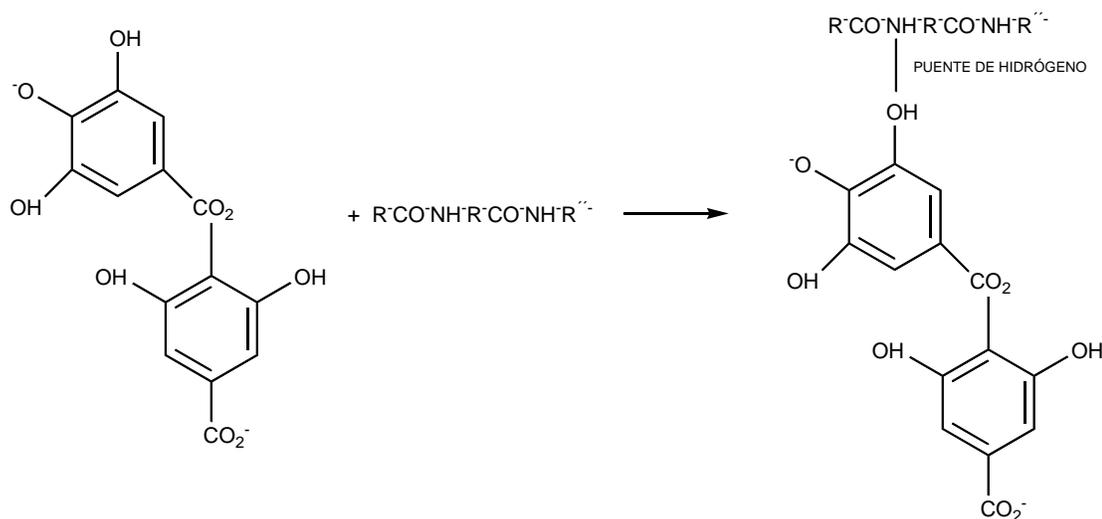
Saponinas

Las dos pruebas más empleadas en la detección de saponinas son la de hemólisis y la de formación de espuma, puesto que al ser tensoactivas las saponinas inestabilizan la membrana celular de los eritrocitos, induciendo su ruptura. Por otra parte, la prueba de formación de espuma consiste en agitar vigorosamente la solución acuosa obtenida del extracto etanólico total, en un tubo de ensayo y observar la espuma formada. Ésta debe ser estable por lo menos 30 minutos para poder establecer la presencia de saponinas (Carvajal y Uribe, 2009).

Taninos

Se distinguen dos grupos básicos de taninos que difieren por su estructura y origen biogénico: taninos hidrolizados y condensados o catéquicos. Los taninos hidrosolubles por tratamientos con ácidos se separan en azúcares y ácidos fenólicos, mientras que los condensados no se degradan. Los primeros, son compuestos reductores que forman sales complejas coloreadas con todos los metales (FeCl_3) y precipitan con acetato de plomo y alcaloides. También poseen la propiedad de coagular la gelatina o curtir la piel, razón por la cual otra prueba para su identificación es el ensayo de gelatina al 1 % cuya positividad se evidencia por la aparición de un precipitado blanco, ya que los taninos tienen la propiedad de reaccionar con las proteínas formando compuestos insolubles (Figura 17) (Delporte, 2010).

Figura 17. Fundamento Químico de la Reacción de Taninos con gelatina

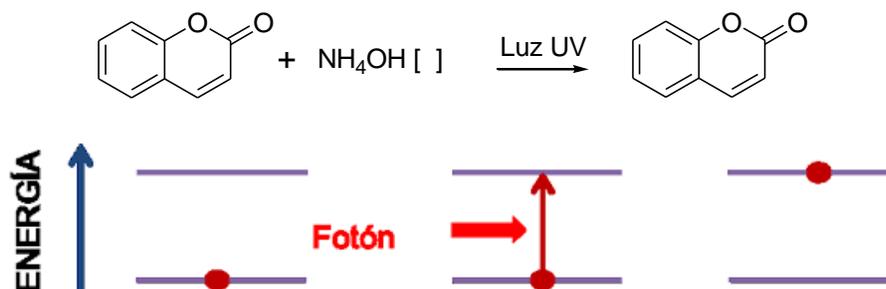


Tomado y modificado de Aponte, Castro y Parra, 2016.

Cumarinas

Son compuestos derivados de las lactonas, estos exhiben una fuerte fluorescencia azul o verde al ser irradiados con luz ultravioleta, propiedad que se aprovecha para su detección. Adicionalmente, puesto que todas las cumarinas poseen en su estructura una γ -lactona, pueden identificarse mediante las reacciones propias para lactonas. Las cumarinas se caracterizan por su intensa absorción de la región UV del espectro a 365 nm, las cuales al ser examinadas a la luz ultravioleta presenta una coloración cuya fluorescencia es variable, de azul a amarillo y a púrpura, exaltada en presencia de hidróxido de amonio (Figura 18) (Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011).

Figura 18. Fundamento químico de la reacción de las cumarinas

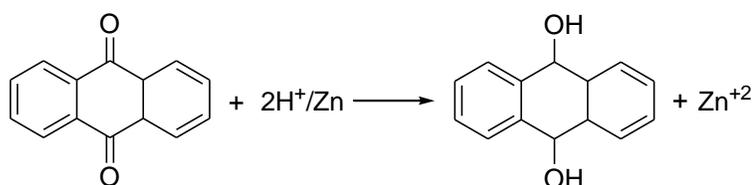


Tomado y modificado de Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011.

Quinonas

La naftoquinonas y antraquinonas libres, al ser tratadas con la solución de hidróxido amónico forman complejos de color rojo cereza. Al extracto se le adiciona peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico y se procede a calentar, bajo estas condiciones, se hidrolizan los enlaces glicosídicos y se oxidan las antronas y los antranoles hasta antraquinonas, las cuales al ser extraídas con tolueno y agitadas en presencia de una solución de hidróxido de sodio al 5 % que contiene hidróxido de amonio al 2 %, presentan coloraciones que van del rosado al rojo intenso, dependiendo de la concentración de estos compuestos en la muestra. Esta reacción es utilizada para la detección directa de quinonas en los extractos vegetales (Figura 19) (Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011).

Figura 19. Fundamento químico de la reacción de quinonas



Tomado y modificado de Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011.

Actividad antibacteriana

Es la capacidad de una sustancia de matar, destruir, inactivar o impedir la proliferación o acción patógena de un determinado microorganismo. Dicha sustancia puede ser de origen natural o sintetizada químicamente en el laboratorio, en ambos casos es conocida con el nombre de antibiótico. Éstos últimos a su vez se clasifican en bactericidas que lisan o destruyen el microorganismo, y en bacteriostáticos que inhiben la multiplicación bacteriana y además poseen un efecto reversible, es decir, que al retirar el antibiótico el microorganismo se sigue multiplicando. La actividad antibacteriana es determinada mediante pruebas de susceptibilidad, en las cuales se evalúa la respuesta de una bacteria frente a concentraciones preestablecidas de antibióticos (Koneman, 2008).

Bacterias

Son microorganismos procariotas, es decir, unos microorganismos unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi, ni retículo endoplásmico, que se reproducen por división asexual. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas; una pared grampositiva con una gruesa capa de peptidoglucano y una pared gramnegativa con una delgada capa de peptidoglucano, así como una membrana externa. El organismo humano está habitado por miles de especies bacterianas distintas, mientras algunas mantienen una relación transitoria, otras habitan en el ser humano de manera permanente (Koneman, 2008). En microbiología, las bacterias se pueden clasificar en dos grandes grupos según la estructura de la pared celular: las bacterias grampositivas y las bacterias gramnegativas (Spicer, 2009).

Bacterias gramnegativas

En microbiología, se denominan bacterias gramnegativas aquellas que no se tiñen de violeta, sino que lo hacen de un color rosado tenue, por la tinción de Gram. La característica clave que diferencia una bacteria gramnegativa de una bacteria grampositiva, es la composición y estructura de la pared celular. En las bacterias gramnegativas está formada por dos membranas lipídicas, una interna (citoplasmática) y otra externa, con un espacio entre ellas denominado espacio periplasmático. En dicho espacio, se dispone una capa de una sustancia llamada peptidoglicano, la cual es más delgada en bacterias gramnegativas que en grampositivas (Spicer, 2009). Las cepas gramnegativas que se utilizarán para llevar a cabo este estudio serán: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Klebsiella pneumoniae

Es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella*, que además desempeña un papel importante como causa de las enfermedades infecciosas oportunistas. Es un bacilo que fermenta la lactosa, la mayoría produce colonias sumamente mucoides en placas, debido a la producción de polisacáridos abundantes. Todas son inmóviles e indol negativas y son característicamente resistentes a múltiples antibióticos. Además de la resistencia natural de este microorganismo a la ampicilina y a la carbenicilina (García, 2005).

Pseudomonas aeruginosa

Es un bacilo gramnegativo, oxidasa positiva y puede crecer a temperaturas superiores a 42°C. Las cepas de esta especie presentan un característico color verde brillante, debido a la producción de pigmentos

piocianina, de color azul, y pioverdina, de color amarillo fluorescente, los cuales juntos le dan dicha coloración. Es un habitante común de agua, suelos y plantas. En los hospitales pueden ser encontrada en respiradores, humidificadores, verteros, duchas, piscinas de hidroterapia y ocasionalmente en las manos de los trabajadores de la salud. Es un patógeno oportunista, responsable de una alta gama de infecciones, principalmente nosocomiales (Lujan, 2014).

Escherichia coli

Es el microorganismo de vida libre que mejor se ha estudiado. Son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, fermentadores y oxidasa negativa. Pueden ser móviles la mayoría o inmóviles, son parte de la familia Enterobacteriaceae. La mayor parte de ellas fermentan la lactosa y son capaces de producir indol a partir de triptófano (García, 2005).

Bacterias grampositivas

Son aquellas que poseen una pared celular interna y una pared de peptidoglucano, ésta última forma el exoesqueleto que da consistencia y forma esencial para la replicación y supervivencia a la bacteria. No poseen membrana externa, presentan aproximadamente 25 láminas de glicano de 20 a 80 nm de grosor, está compuesta por otras sustancias como ácidos teicóicos y lipoteicóicos. Se tiñen de color morado, ya que retienen el colorante. Estas bacterias son más sensibles a los antibióticos que las gramnegativas (Murray, 2009). Las cepas que se utilizarán para llevar a cabo este estudio serán especies de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

Staphylococcus aureus

Son cocos grampositivos, con un diámetro de 0,5 a 1,5 μm ; están agrupados formando racimos de uvas. Estas son bacterias inmóviles, no esporuladas, y no poseen cápsula, además son anaerobias facultativas. La especie *Staphylococcus aureus* produce catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno libre), característica que se utiliza para diferenciar éste género de los *Streptococcus* y *Enterococcus* los cuales son catalasa negativa (Cervantes, García y Paz, 2014).

Enterococcus faecalis

Son células bacterianas esféricas y ovoides, de tamaño 0,6 a 2,5 μm . son cocos grampositivos no formadores de endosporas. Se presentan en forma de pares o de cadenas cortas. Son no móviles y anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, con metabolismo fermentativo. Son más abundantes en el tracto gastrointestinal de los humanos, lo cual podría explicar su prevalencia en los aislamientos clínicos, además de su virulencia incrementada (Díaz, Rodríguez y Zhurbenko, 2010).

Actividad antibacteriana de los fitoquímicos

Son mecanismos en los cuales los fitoquímicos alteran la biología de los microorganismos (Medina, 2000). Esto puede ocurrir mediante la formación de complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas de las bacterias, inactivando la proteína y anulando su función la mayoría de las veces. Se ha evidenciado que este mecanismo es ejercido por las quinonas. Así mismo, se ha registrado que los alcaloides presentan un mecanismo de

acción basado en la intercalación entre la pared celular y el ADN del microorganismo (Domingo y López, 2003).

Además, existen otros fitoquímicos tales como el fenol, el cual es un metabolito secundario que ha demostrado tener actividad antibacteriana. Éste emplea como mecanismo la desorganización de las paredes y membranas celulares que contienen lípidos. Lo que conlleva a la pérdida del contenido celular y además éste también participa en la inactivación de los sistemas enzimáticos de las bacterias (Bharathajothi, Bhaaskarant y Menaca, 2015).

Mecanismos de acción de los antibióticos

Los agentes antimicrobianos actúan por una serie de mecanismos, muy diferentes entre ellos y cuyos blancos se encuentran en distintas regiones de la célula atacada. Las diversas regiones de ataque antibacteriano más importantes son:

- **Pared bacteriana:** Los antibióticos que atacan la pared bacteriana ejercen su efecto a través del bloqueo de su síntesis. Actúan interfiriendo en la síntesis de peptidoglicanos, los cuales son elementos esenciales en la constitución de la pared, al presentarse alteraciones en dicha pared se conduce a la lisis bacteriana. Cabe destacar, que estos antimicrobianos solo ejercen su efecto frente a microorganismos que están en crecimiento activo.
- **Membrana bacteriana:** algunos antibióticos actúan alterando la permeabilidad de la membrana externa de la pared celular, al unirse a los lipopolisacáridos y fosfolípidos de ésta, lo cual conlleva a la pérdida de componentes esenciales y a la muerte de la bacteria. Cabe destacar, que este mecanismo de acción solo se da en bacterias gramnegativas ya que estas son las únicas que poseen membrana externa.

- **Síntesis de proteínas:** algunos antibióticos tienen la capacidad de interferir en la síntesis de proteínas, actuando en diversos niveles del ribosoma. Dada la complejidad de este proceso, hay diversos blancos que son afectados por los diferentes agentes antibacterianos, estos pueden actuar a nivel de la porción 30S del ribosoma, induciendo errores en la lectura de la información aportada por el ARN mensajero. De esta manera, la proteína que se sintetice contendrá errores y no será útil. También son capaces de inducir alteraciones en la porción 50S del ribosoma, inhibiendo la transpeptidasa, lo que impide que se formen los péptidos. Todos estos mecanismos, de una u otra manera, detienen o desvían la síntesis de proteínas.
- **Síntesis de ácidos nucleicos:** los agentes que actúan a nivel de los ácidos nucleicos son varios y sus sitios de acción diversos. Estos pueden actuar impidiendo la síntesis de purinas, así como a nivel de las cadenas de ADN, impidiendo el superenrollamiento, por inhibición de la enzima topoisomerasa. Algunos de ellos, además dan lugar a la disrupción de las cadenas de ADN, impidiendo su reparación (Koneman, 2008).

Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias

Son estrategias que generan las bacterias para disminuir o inactivar la acción de los agentes antimicrobianos, ante el ataque de estos y así poder persistir dentro del hospedero. Estos mecanismos pueden ser intrínsecos, es decir, que los posee la bacteria en su interior de manera natural o extrínseco, si la bacteria los adquiere del medio por mutación cromosómica o recombinación genética. Los cambios genéticos son relativamente fáciles en bacterias, dada la simplicidad de su ADN y la facilidad con la que pueden adquirir ADN de otras bacterias. Estos cambios genéticos producen cambios biológicos en la bacteria y son esos cambios los responsables de la

resistencia. Las bacterias susceptibles a un antibiótico pueden adquirir resistencia, ya sea por mutación de sus genes o aceptando genes de resistencia de otra bacteria (Mendoza, 2008).

Dentro de los mecanismos de resistencia que los microorganismos han desarrollado, se encuentra la producción de enzimas que evitan el efecto del antibiótico. Estas pueden ser enzimas con actividad hidrolítica o modificadora. Además, pueden presentar bombas de expulsión o eflujo que son proteínas de membrana que toman el antibacteriano y lo expulsan fuera de la bacteria para impedir que llegue al sitio de acción.

Así mismo, pueden realizar cambios de permeabilidad de membrana para evitar que el antibiótico entre en la bacteria. Algunos microorganismos pueden alterar el sitio de acción del antimicrobiano, para que este no lo reconozca y no se una a él, evitando así que ejerza su efecto. Es importante destacar, que algunas bacterias pueden presentar más de un mecanismo de resistencia (Tortora, 2007).

www.bdigital.ula.ve

Métodos para la determinación de la actividad antibacteriana

Son un conjunto de procedimientos que permiten evaluar la actividad antibacteriana de una determinada sustancia. La selección del método más apropiado depende de la composición química de la sustancia a evaluar y del microorganismo objetivo. Entre los métodos más empleados para la evaluación antibacteriana de los componentes químicos presentes en las plantas se incluyen los de difusión y los de dilución (García, 1994).

Método de difusión de disco en agar (Kirby-Bauer)

En este método se emplean discos de papel absorbente, impregnados con una concentración conocida del antimicrobiano. Estos discos se colocan en la superficie de una placa de agar de Müller Hinton de 4 mm de espesor,

en la que se acaba de inocular una suspensión de la cepa por probar, con una turbidez equivalente al tubo 0,5 del nefelómetro de McFarland. Cuando el disco se humedece, el antimicrobiano difunde radialmente hacia afuera y crea un gradiente de concentración por disco. Así, el antimicrobiano está en alta concentración cerca del disco y va disminuyendo a medida que se aleja del mismo.

El diámetro del anillo de inhibición dependerá de la sensibilidad o resistencia del microorganismo por probar, así como también de la solubilidad de la droga y de la tasa de difusión a través del agar. Por eso, es importante controlar muy bien el medio de cultivo, su espesor, el tiempo de incubación y la concentración de las bacterias inoculadas, entre otros factores. Si se presentan zonas de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de los discos, la medición de esos diámetros de inhibición y su comparación con los valores de los cuadros de referencia, permite establecer si la cepa es resistente, intermedia o susceptible a esa droga (Gamboa y Rodríguez, 2005).

Método de difusión en pozo modificado (Kirby Bauer)

Para este método se emplea el uso del agar Müeller Hinton, el mismo se inocula masivamente en la superficie con la suspensión bacteriana y los controles (turbidez equivalente al patrón 0,5 McFarland), y se espera 15 minutos para permitir la absorción de éste en la superficie del medio. Con un sacabocados estéril se perfora el medio de cultivo buscando obtener un pozo de 6mm de diámetro, con bordes uniformes y hasta el fondo de la placa de petri. Se debe evaluar un extracto por placa, en cada pozo se agrega 20 µL de la dilución del extracto a probar, usando un pozo para el dimetilsulfoxido (DMSO) como control negativo. Los medios se incuban a una temperatura aproximada de 37°C durante 18-24 horas. Finalmente, se realiza la lectura de la susceptibilidad antimicrobiana, por observación y medición del halo de

inhibición alrededor de cada pozo. Los ensayos se realizan por duplicado para cada aislamiento bacteriano (Corrales y Melo, 2013).

Método de dilución en agar

Las técnicas de dilución en agar, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad "*in vitro*" de un antimicrobiano frente a un cultivo bacteriano. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de placas con agar, a los cuales se les agrega el antibiótico en distintas concentraciones. Luego se inoculan cada una de las placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Las pruebas se examinan después de incubar "overnight" a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se determina la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado. El resultado final depende significativamente de la metodología empleada. Por ello, para obtener valores reproducibles intra e inter laboratorios, cada detalle técnico debe ser cuidadosamente controlado (Malbran, 2012).

Definición Operacional de Términos

Pubescencia

En botánica, este término se refiere a cualquier órgano vegetal (hoja, tallo, fruto), que presenta una superficie vellosa cubierta de pelos finos, suaves y no muy largos, esto se da debido a que la epidermis de la planta presenta modificaciones, denominadas pelos. Esta pubescencia puede ser unicelular o pluricelular, pero su origen es siempre una sola célula epidérmica. Con frecuencia, forman una capa densa sobre las hojas, la cual actúa como barrera protectora de luz (Molina, 2008).

Disolvente ideal

Es aquel que disuelve gran proporción de la sustancia orgánica que se desea extraer, pero muy poco a las otras sustancias que la acompañan. Este debe ser volátil para facilitar su posterior eliminación por evaporación o destilación. Entre los solventes más usados en las extracciones están: hexano, éter de petróleo, éter etílico, cloroformo, tetracloruro de carbono, alcohol etílico, metanol, entre otros (Vogel, 1974).

Hojas pecioladas

Son hojas que se encuentran unidas al tallo mediante un peciolo. El peciolo o pedúnculo foliar, es el filamento, en general delgado y de color verde que une el limbo al tallo. Su haz suele ser plano o cóncavo, mientras que su envés suele ser convexo. Sus tejidos vasculares, que comunican la hoja con el tallo, permiten la llegada del agua y los minerales absorbidos por la raíz; tiene, además, la capacidad de orientar a la hoja en la dirección de la luz solar (Louis, 2008).

Extracción

Es la técnica más empleada para proceder a la separación y purificación de los componentes de una mezcla o para aislar un compuesto orgánico de sus fuentes naturales. Puede definirse como la separación de un componente de una mezcla por medio de un disolvente orgánico (inmiscible con el agua) en contacto con una fase acuosa. Lo que en realidad se realiza en una extracción es la transferencia de una sustancia de una fase a otra, normalmente de una fase acuosa a una orgánica (Gómez y Valcárcel, 2004).

Inflorescencia

En botánica se conoce como inflorescencia a la disposición de las flores sobre las ramas o un tallo. Por lo tanto, la inflorescencia supone una ramificación que, en líneas generales, es constante para cada especie vegetal. Se pueden distinguir 2 grupos de inflorescencia, la cimosa también denominada inflorescencia determinada, la cual tiene una flor en el extremo del tallo; y la inflorescencia racimosa, también conocida como indeterminada, en la que el tallo no termina con una flor (Maldonado, 1983).

Compuestos bioactivos

La bioactividad es la capacidad que tiene un material de interactuar químicamente con los tejidos de un organismo. Los compuestos bioactivos son sustancias químicas que se encuentran en pequeñas cantidades en las plantas y en algunos alimentos. La importancia de su estudio radica en que estos cumplen funciones en el cuerpo que pueden contribuir a la buena salud (Melvin, 2002).

Cepas de referencia internacional

Las cepas de referencia internacional son microorganismos conservados y distribuidos por colecciones de cultivo; que se encuentran definidos como mínimo a nivel de género y especie. Éstos se encuentran certificados para el control de calidad en microbiología. Son utilizados en disciplinas como la clínica, alimenticia, farmacéutica, cosmética, ambiental, y principalmente en estudios para la determinación de la actividad antibacteriana (Koneman, 2008)

Sésil

En botánica se utiliza el término sésil, para definir a los órganos o piezas de las plantas, generalmente hojas o partes de las flores, que carecen de una pieza soporte que la sostenga. Por tanto, se encuentran posadas directamente en el órgano o parte de la planta donde está localizada. En otras palabras, se refiere a hojas sin pecíolo o flores sin pedúnculo, es decir, que se encuentran unidas al tallo directamente (Herrera, 2008).

Fitoquímico

La palabra fitoquímico proviene del griego “*fito*” que significa planta y “*químico*” que significa sustancia química. Éstas son producidas por las plantas, y contienen el principio activo que permite caracterizar y diferenciar cada especie vegetal (Marcano y Hasegawa, 2002). Según Chasquibol (2003), son compuestos químicos desarrollados por las plantas, cuya importancia para su supervivencia es fundamental. En ellas, tales sustancias actúan como sistemas de defensa natural, protegiendo de infecciones e invasiones microbianas. Existen diferentes clases de fitoquímicos, y entre los principales se encuentran, los fenoles, taninos, alcaloides, flavonoides y saponinas.

Metabolitos secundarios

Son sustancias de estructura compleja presentes en concentraciones muy bajas. Las cuales ejercen efectos fisiológicos y farmacológicos sobre el hombre. Además, representan el principio activo de la planta, y son altamente valorados a nivel comercial (Ávalos y Pérez, 2009)

Los metabolitos secundarios son conocidos también como productos químicos, que derivan del metabolismo primario. Se sintetizan en bajas concentraciones y no de forma generalizada en la planta. Éstos no tienen función directa en los procesos de fotosíntesis, respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes, diferenciación o formación de carbohidratos, proteínas y lípidos (Marcano y Hasegawa, 2002). La obtención de estos metabolitos en especies vegetales, implica muchos inconvenientes, incluidos los cambios en sus constituyentes, dependiendo del clima o forma de cultivo, presencia de compuestos con efectos adversos o antagónicos, cambios en bioactividad durante su manipulación, almacenamiento y preparación de materiales (Sarkar y cols.,2021).

Operacionalización de las Variables

La definición operacional de las variables consiste en transformar un concepto abstracto en uno empírico. Con el fin de obtener el indicador que refleje la presencia de la variable en la población de estudio (Palella y Martins, 2004). Tal como se resume en las tablas 3 y 4 a continuación.

Tabla 3. Operacionalización de la variable dependiente actividad antibacteriana del *Heliotropium indicum* L. en cepas de referencia internacional

Variable	Tipo de variable	Definición
Actividad antibacteriana del <i>Heliotropium indicum</i> L. en cepas de referencia internacional	Dependiente Cuantitativa Continua	Es la capacidad de ciertas sustancias de eliminar o inhibir el crecimiento de agentes bacterianos (Prats, 2007).
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Se mide a través de un antibiograma, tal como: -Método de difusión en Disco (Kirby-Bauer).	Sensible Intermedio-moderado Resistente frente a las cepas grampositivas (<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Enterococcus faecalis</i>) y gramnegativas (<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>).	Tamaño de halos de inhibición en milímetros (mm).

Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón, 2023.

Tabla 4. Operacionalización de la variable independiente composición química del *Heliotropium indicum* L.

Variable	Tipo de variable	Definición
Composición química del <i>Heliotropium indicum</i> L.	Independiente Cualitativa	Se refiere a qué sustancias están presentes en una determinada muestra (Valenzuela, 1995).
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Se mide por medio del tamizaje fitoquímico a través de reacciones de identificación cualitativa	Presencia de fitoquímicos tales como: -Alcaloides -Fenoles -Taninos -Flavonoides -Saponinas -Triterpenos -Cumarinas -Quinonas	-Alcaloides: presencia de precipitado color rojo a naranja rojizo (Dragendorff) a marrón (Wagner) o a blanco (Mayer). -Fenoles: viraje de color a azul oscuro. -Taninos: aparición de un precipitado blanco. -Flavonoides: viraje de color a rojo (Shinoda). Viraje a amarillo-naranja (NaOH). -Saponinas: presencia de espuma. -Triterpenos/esteroles: viraje a color verde azulado o rojo-violeta. -Cumarinas: presencia de fluorescencia de color azul -Quinonas: presencia de color rojo.

Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón, 2023.

Hipótesis

Una variedad de trabajos previos reporta la presencia de diversos metabolitos secundarios biológicamente activos en el género *Heliotropium*, en especial alcaloides, los cuales poseen diversas actividades farmacológicas, entre las que destaca la actividad antibacteriana, por lo cual se espera que exista relación directa entre la composición química del *Heliotropium indicum* L. y la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de dicho espécimen, en cepas de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

La investigación en general responde a ciertos objetivos. De acuerdo a cada uno de estos objetivos, es posible derivar un tipo particular de investigación. Para identificar el tipo de investigación es importante conocer la relación que se quiere estudiar (Hurtado, 2010). En este caso la investigación que se realizó fue de tipo confirmatoria. De tal modo en esta investigación se confirmó la relación, entre la composición química del *Heliotropium indicum* L. y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional.

Diseño de Investigación

Esta investigación presentó un diseño de campo, debido a que las hojas frescas de *Heliotropium indicum* L. se recolectaron en las zonas aledañas a la población de Encontrados, Municipio Catatumbo, Estado Zulia. Además, fue de laboratorio, porque las hojas fueron procesadas en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes. El diseño también fue de tipo contemporáneo y transeccional, ya que los datos se obtuvieron en el presente y una sola vez. Finalmente fue bivariable, ya que el evento de estudio estuvo conformado por dos variables.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

La población es el conjunto de elementos, de los cuales se quiere conocer o investigar algunas de sus características. La muestra es un subconjunto representativo de un universo o población (Arias, 2006). La unidad de investigación fue la especie en estudio *Heliotropium indicum* L.

Selección del tamaño muestral

La “n” muestral estuvo representada por las hojas de la especie en estudio *Heliotropium indicum* L.

Sistema de Variables

Las variables de esta investigación fueron sistematizadas en dependiente, la cual estuvo representada por la actividad antibacteriana y depende de los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos a partir de la especie en estudio; y la variable independiente que corresponde a la composición química del *Heliotropium indicum* L.

Instrumento de Recolección de Datos

Son los recursos de los cuales se puede valer el investigador para acercarse a los fenómenos de su evento de estudio. En esta investigación se empleó el uso de tablas que permitieron clasificar ambas variables de estudio y además se llevó a cabo la observación directa, la cual permitió identificar los metabolitos secundarios presentes en el *Heliotropium indicum* L., así como la presencia de los halos de inhibición en las pruebas de

susceptibilidad, lo que permitió clasificar a los microorganismos como sensibles, intermedios o resistentes, frente a los extractos etanólicos obtenidos.

Procedimiento de la Investigación

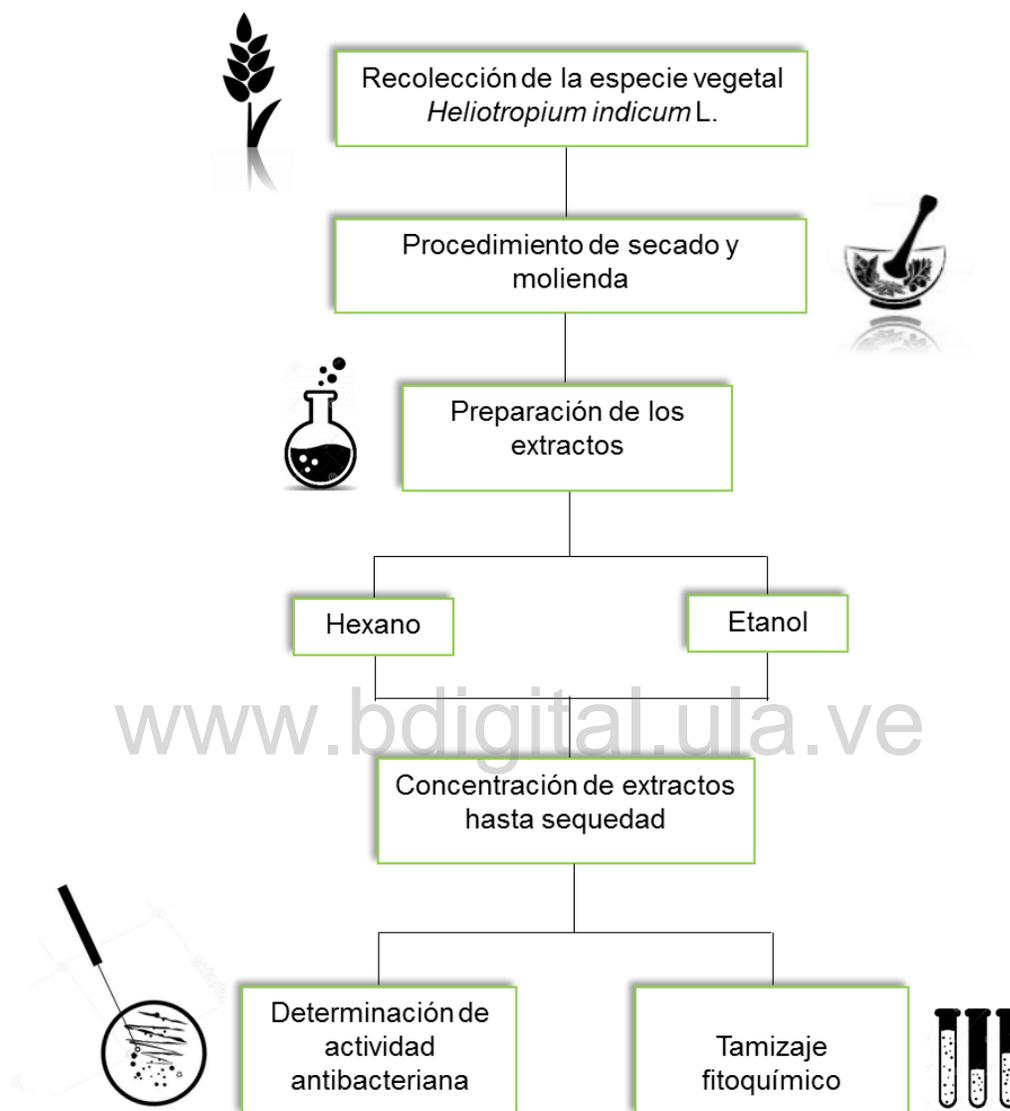
El procedimiento que se siguió en esta investigación comprende la recolección del material vegetal, preparación de los extractos vegetales, realización de las pruebas químicas preliminares, y finalmente la determinación de la actividad antibacteriana. Este consistió en dos procesos, el primero de ellos, tuvo como finalidad determinar la composición química de los extractos vegetales, e inició con la recolección del material, en este paso se localizó la planta, se comprobó su clasificación botánica, se ubicó en la literatura química, y esto informó sobre los posibles constituyentes químicos, lo que permitió planificar el fraccionamiento, la purificación y las pruebas biológicas. La planta fue recolectada en la población de Encontrados, Municipio Catatumbo, Estado Zulia y se procesó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales, del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, bajo la asesoría de la Dra. Ysbelia Obregón.

El material vegetal que se usó tuvo un peso de 180 gramos, el mismo fue destinado para la obtención de los extractos orgánicos. Previo a esto, las hojas de *Heliotropium indicum* L. fueron separadas, y luego sometidas a secado a temperatura ambiente hasta obtener un peso constante. Luego se realizó el proceso de molienda empleando el uso de un molino de cuchilla, con lo cual se obtuvo un peso de 28,7 gramos. Seguido a esto, para la preparación de los extractos vegetales, el material seco y molido fue tratado mediante la técnica de reflujo con disolventes de polaridad ascendente tales como: hexano y etanol.

Una vez se realizó la etapa de extracción, se procedió a realizar la concentración del extracto hasta sequedad. La cual consistió en eliminar parte del solvente, para aumentar el contenido de sólidos en el extracto (Esquema 1). Este proceso se realizó a presión reducida con lo que se disminuyó la temperatura de calentamiento, necesaria para la salida del solvente. El rotavapor fue una buena alternativa para este tipo de trabajo en el laboratorio, razón por la cual fue utilizado en esta investigación (Sharapin, 2000).

www.bdigital.ula.ve

Esquema 1. Recolección de la especie vegetal y obtención de los extractos de *Heliotropium indicum* L.



Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón, 2023.

Análisis fitoquímico preliminar

Los extractos de hexano y etanol fueron utilizados para la identificación de los diversos compuestos fitoquímicos presentes en la planta. El extracto polar (etanol) además se utilizó para la determinación de la actividad

antibacteriana (Ávila y Fonte, 2010). El análisis fitoquímico preliminar se realizó a través de diferentes técnicas de identificación cualitativa (Esquema 2). Éstas fueron de precipitación, colorimétricas, de espuma y de fluorescencia. Las pruebas empleadas para la identificación de alcaloides fueron de precipitación, se llevaron a cabo mediante el uso del reactivo de Dragendorff, el cual se realizó en un tubo de ensayo, al agregar 1 mL de los extractos previamente tratados con ácido clorhídrico (HCl) al 10 % y 1 mL del reactivo de Dragendorff, la formación de un precipitado rojo o naranja indicó la positividad de la prueba (Arango, 2008).

Para la identificación de alcaloides se llevaron a cabo dos pruebas más, en una de ellas se utilizó el reactivo de Wagner y se realizó en un tubo de ensayo al adicionar 1 mL de los extractos, más 1 mL de reactivo de Wagner, en esta prueba, un precipitado marrón indicó resultado positivo. La otra prueba que se desarrolló fue la de Mayer, la cual se realizó al agregar en un tubo de ensayo 1 mL de los extractos, más 1 mL de reactivo de Mayer, la aparición de un precipitado blanco o color crema indicó un resultado positivo (Remington, 2003).

De igual forma para indicar la presencia de fenoles y taninos, se utilizó el método de cloruro férrico (FeCl_3), para el cual se empleó el uso de dos tubos, uno con el control blanco (hexano) y el otro con el extracto, este último se preparó al agregar aproximadamente 1 mL del extracto y al adicionar un mililitro de solución de cloruro férrico al 2,5 % en agua. Al tubo de ensayo marcado como blanco se le adicionó 1 mL de hexano y 1 mL de cloruro férrico al 2,5 % en agua. La positividad de la prueba se evidenció, por un cambio de coloración a azul oscuro o la formación de algún precipitado, lo que fue indicativo de la presencia de fenoles o taninos pirogálicos. Por otra parte, si el cambio fue a verde oscuro indicó la presencia de fenoles o taninos de tipo catecol (Aguilar, Gutiérrez, y Robles, 2016). Además de esto, para la identificación de taninos también se utilizó la prueba de la gelatina al 1 %, para lo cual se diluyó la gelatina en 4 mL de agua destilada, se llevó a

calentamiento y se trasvaso a dos tubos de ensayo, el primero representaba el control positivo al cual se le añadió etanol, el mismo tiene la capacidad de romper la gelatina, mientras que en el segundo tubo se agregó 1 mL del extracto etanólico del espécimen vegetal disuelto en agua destilada, la presencia de taninos se evidencia por la aparición de un precipitado blanco (Marcano y Hasegawa, 2002).

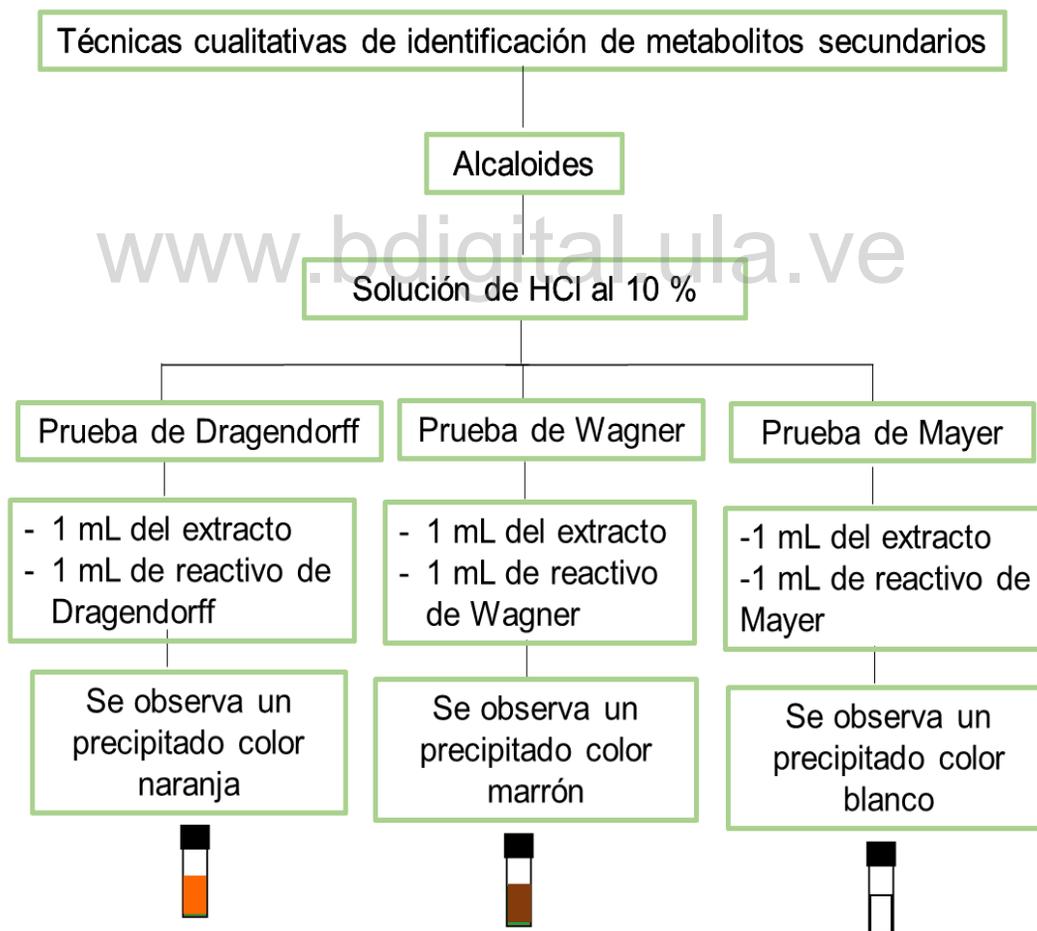
Para la identificación de flavonoides, se utilizó la prueba de Shinoda e hidróxido de sodio (NaOH), estas fueron llevadas a cabo al agregar en un tubo de ensayo 2 mL de los extractos; para la prueba de Shinoda se adicionó de 2 a 3 virutas de magnesio metálico y 0,3 mL de ácido clorhídrico concentrado. Se dejó reposar por 10 minutos y se anotó la coloración observada (Aguilar, Gutiérrez, y Robles, 2016). Ahora bien, para la prueba de NaOH se adicionó 1 mL del mismo y la positividad de la prueba se evidenció por un viraje a color amarillo-marrón. En cuanto a la identificación de saponinas, se utilizó el método de espuma, el cual consistió en agitar vigorosamente la solución acuosa, obtenida del extracto etanólico total, en un tubo de ensayo y luego se observó la espuma formada. Ésta debió ser estable por lo menos 30 minutos para poder establecer la presencia de saponinas, y un aspecto importante fue la altura de la espuma, de modo que al presentarse una altura mayor a 5 mm se consideró la positividad de la prueba (Blanco y Mena, 2015).

Así mismo, para identificar triterpenos y/o esteroides se realizó la prueba de Liebermann-Burchard, en la cual se mezcló 2 mL del extracto con 1 mL de cloroformo, luego se agregó 3 mL del reactivo de Liebermann-Burchard, la aparición de color en el lapso de una hora determinó que la prueba es positiva, con la formación de colores azul o verde para esteroides y rojo o violeta para triterpenos (Carvajal y Uribe, 2009). Para la identificación de cumarinas, se realizó la prueba de fluorescencia en un tubo de ensayo, al cual se agregó 2 mL del extracto vegetal, 2 a 3 gotas de hidróxido de amonio (NH₄OH), posteriormente el tubo se llevó a la lámpara de luz ultravioleta (UV)

y se evitó el contacto directo de la luz con las manos; la positividad de la prueba se observó por la presencia de fluorescencia de color azul.

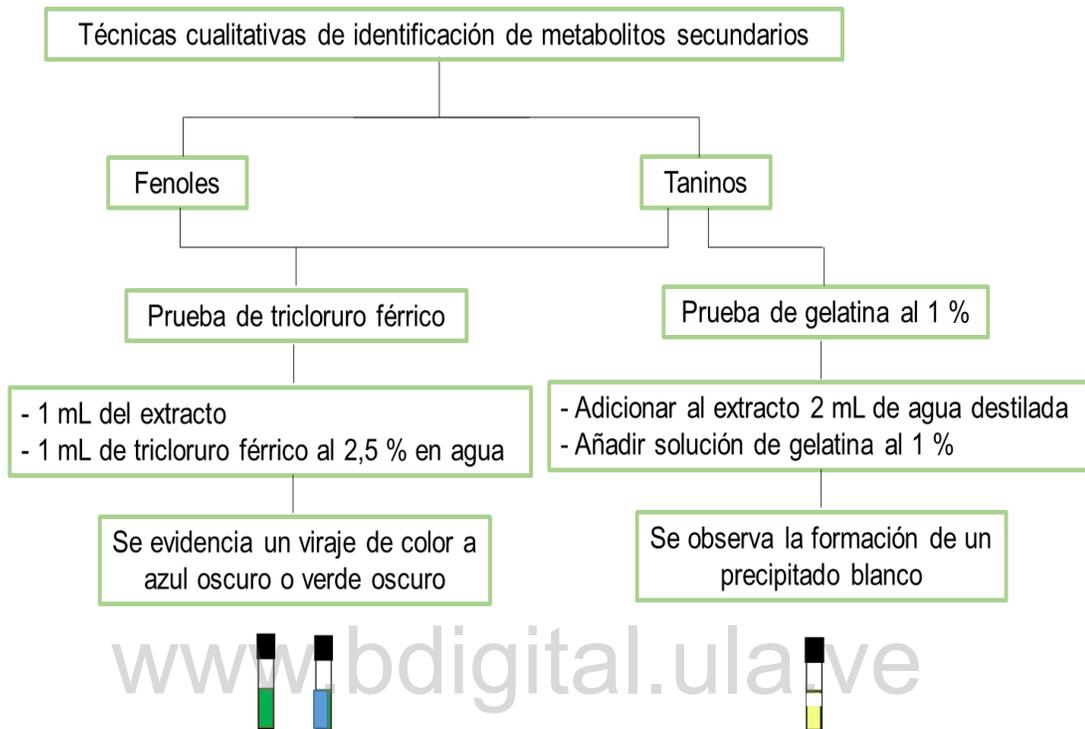
Por otro lado, para la identificación de quinonas, se empleó la reacción de Borntrager, que consistió en colocar una porción del extracto de etanol y de hexano en una cápsula de porcelana. Seguido a esto, se agregó de 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico sobre cada porción de extracto; la positividad de la prueba se evidenció por la aparición de un color rojo- violeta fugaz.

Esquema 2. Técnicas cualitativas para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el *Heliotropium indicum* L.



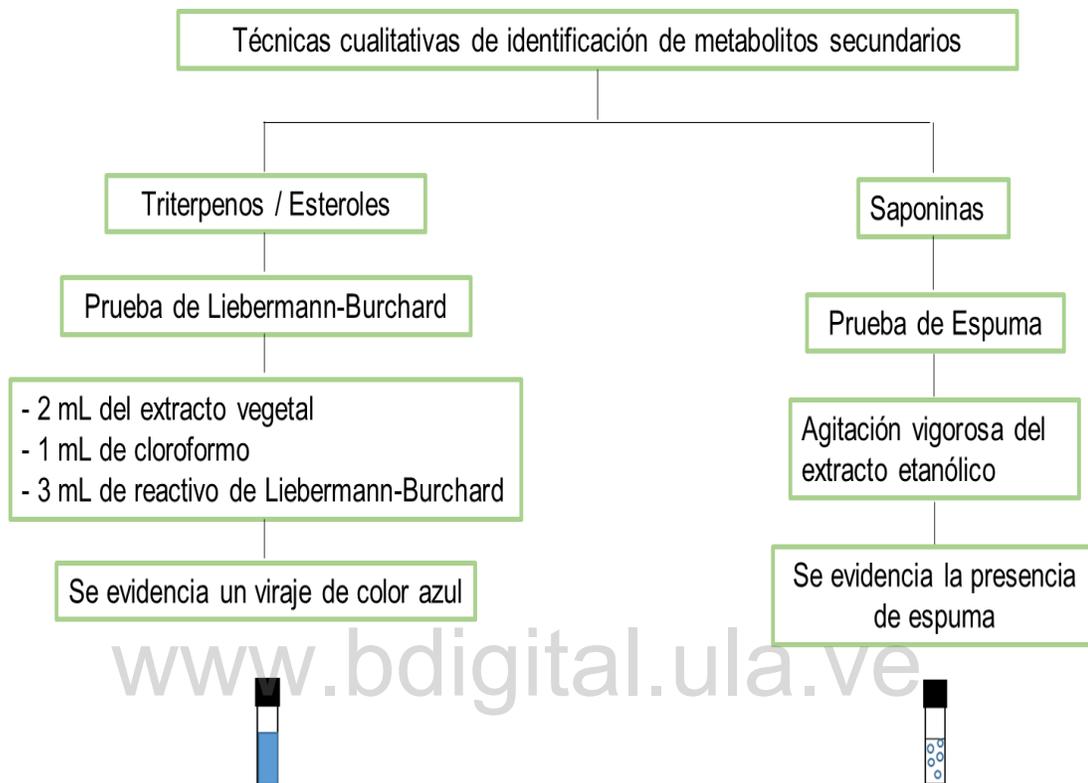
Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón, 2023.

Esquema 2. Técnicas cualitativas para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el *Heliotropium indicum* L. (Continuación).



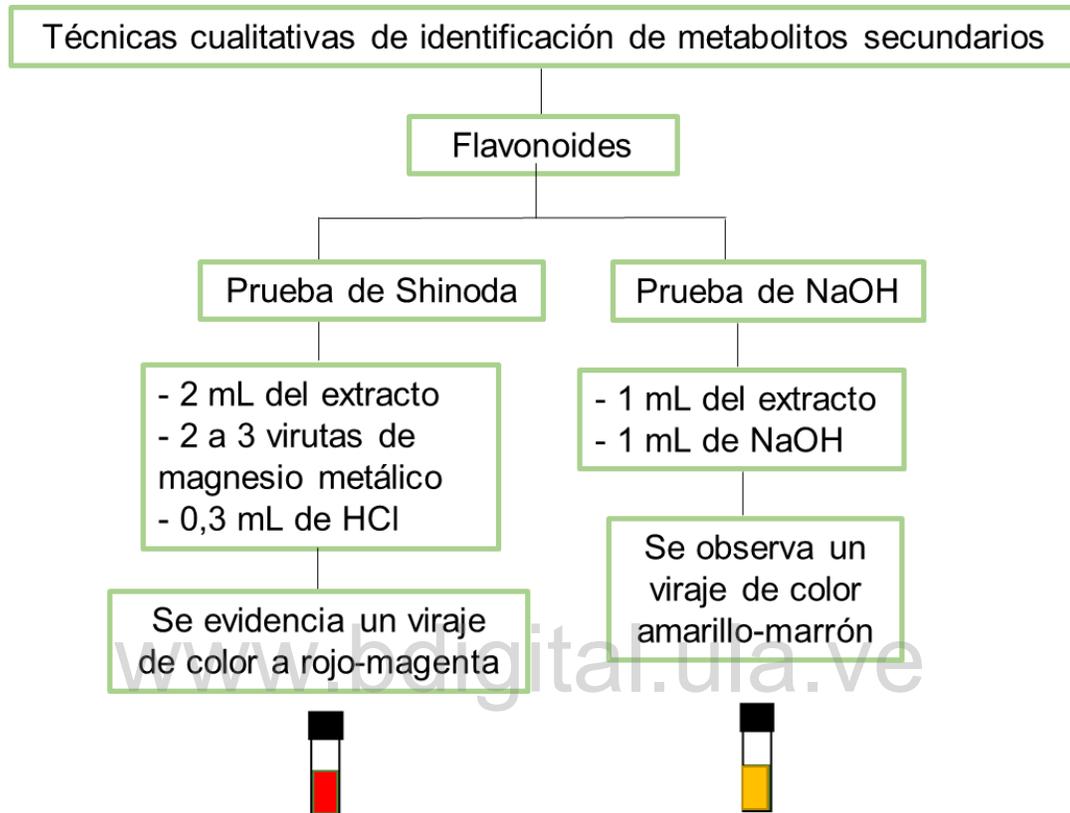
Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón, 2023.

Esquema 2 Técnicas cualitativas para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el *Heliotropium indicum* L. (Continuación).



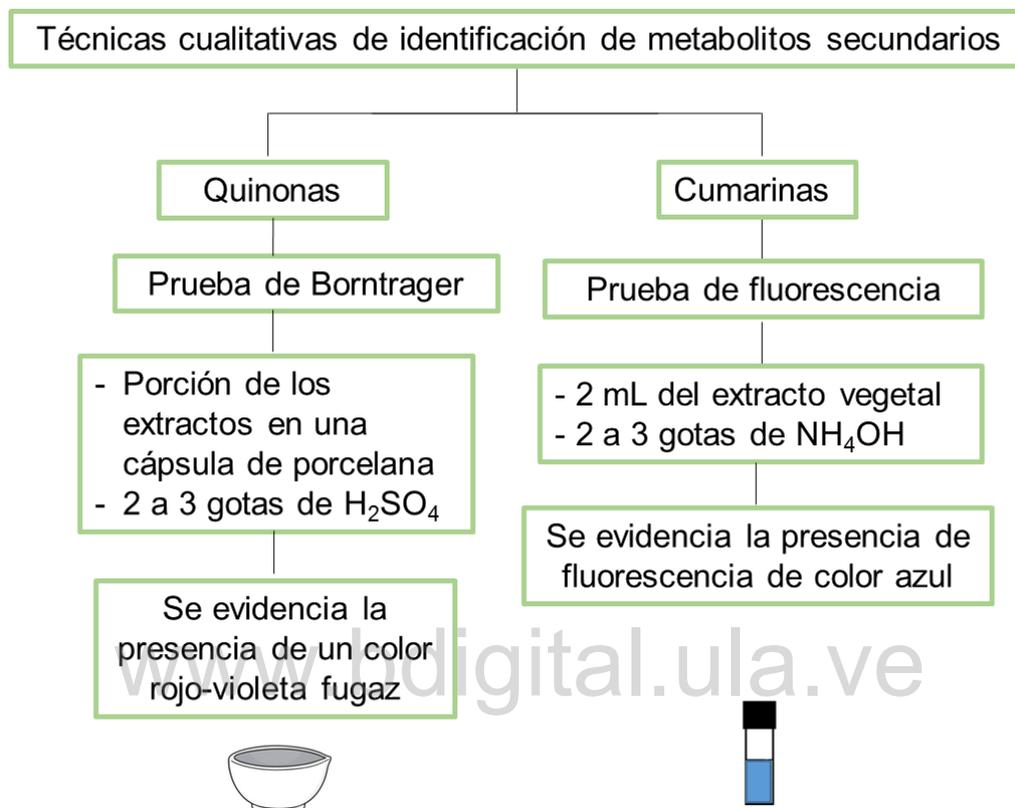
Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón, 2023.

Esquema 2 Técnicas cualitativas para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el *Heliotropium indicum* L. (Continuación).



Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón, 2023.

Esquema 2 Técnicas cualitativas para la identificación de metabolitos secundarios presentes en el *Heliotropium indicum* L. (Continuación).



Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón, 2023

Evaluación de la actividad antibacteriana

El segundo proceso experimental consistió en la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *Heliotropium indicum* L.; para lo cual se seleccionaron cinco cepas bacterianas, dos pertenecientes al grupo de las bacterias grampositivas y tres del grupo de bacterias gramnegativas, las cuales fueron cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC) (Tabla 5), estas bacterias fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad

de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, a cargo de la Licenciada María Eugenia Nieves. El procedimiento se desarrolló en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA), bajo la asesoría de las Profesoras Yndra Cordero e Ysbelia Obregón.

Tabla 5. Cepas de Referencia Internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC)

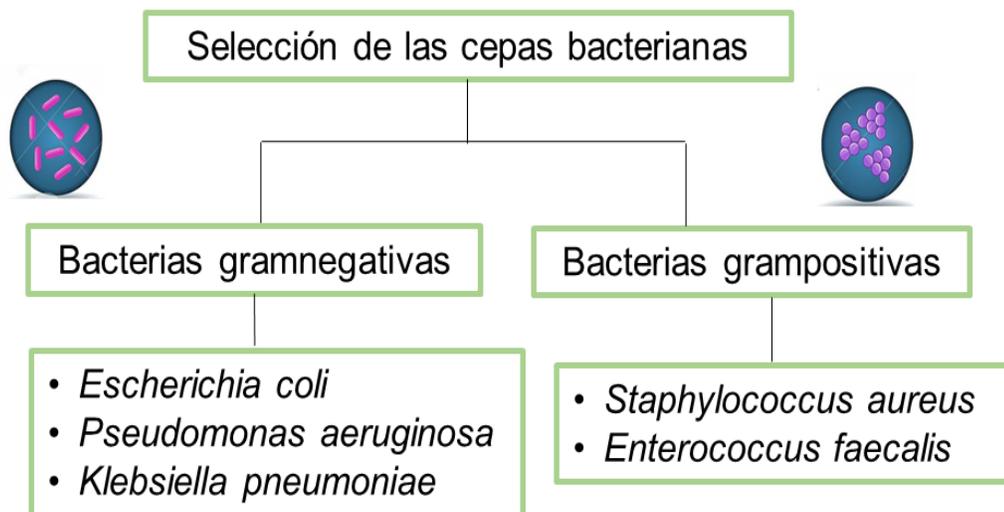
Bacterias grampositivas (ATCC)	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
Bacterias gramnegativas (ATCC)	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 23357
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922

Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón (2023).

Se aplicó el método de difusión de disco en agar (Kirby-Bauer), el cual se basó en la difusión del antimicrobiano sobre el medio de agar y se evaluó el crecimiento de las bacterias y se categorizaron como sensibles, intermedias o resistentes. La concentración del extracto de *Heliotropium indicum* L. que se utilizó, fue de 10 mg/mL. En este procedimiento se usó como control negativo el dimetilsulfóxido (DMSO). Como control positivo se empleó el uso de antibióticos comerciales, tales como Eritromicina ®, Ampicilina ® y Piperacilina ® en concentraciones de 15 µg, 10 µg y 100 µg respectivamente, para las cinco cepas bacterianas.

El medio de cultivo empleado para las cepas fue el agar Müller Hinton, el cual se preparó colocando aproximadamente 18 mL de dicho agar estéril, dejándolo solidificar a temperatura ambiente. Para la preparación de los pre-inóculos bacterianos, las cepas a ensayar se incubaron en agar Müller Hinton a 37 °C de 16 a 18 horas antes de hacer el ensayo microbiano, debido a que en ese tiempo las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento. Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas, se preparó un inóculo bacteriano a una concentración igual a la del estándar 0,5 de Mc Farland, con la ayuda de un asa estéril, se tomó una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en tubos 13x100 previamente esterilizados, que contenían 5 mL de una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0,9 % hasta alcanzar una turbidez equivalente al patrón de Mc Farland (10^8 UFC/mL). Las placas que contenían el agar Müller Hinton, fueron inoculadas con la suspensión microbiana preparada anteriormente, y se eliminó el líquido sobrenadante con un hisopo de algodón estéril. Seguido a esto, se extendió por la superficie del agar en varias direcciones, con el fin de sembrar uniformemente el medio de cultivo. En cada placa se colocaron discos de papel de filtro Whatmann N° 1, de 6 mm de diámetro, los cuales se esterilizaron previamente con luz ultravioleta (LUV), durante toda una noche, luego fueron impregnados con el extracto etanólico de la planta en estudio, y finalmente se colocaron en las placas inoculadas. Posterior a esto, las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas. Éste procedimiento fue realizado para cada microorganismo, transcurrido el periodo de incubación, se observó la formación de halos de inhibición y se procedió a registrar los diámetros en milímetros (mm). Para concluir se realizó la lectura, de acuerdo a las categorías interpretativas, y se clasificaron las bacterias como sensible, intermedio/moderado y resistente (Esquema 3).

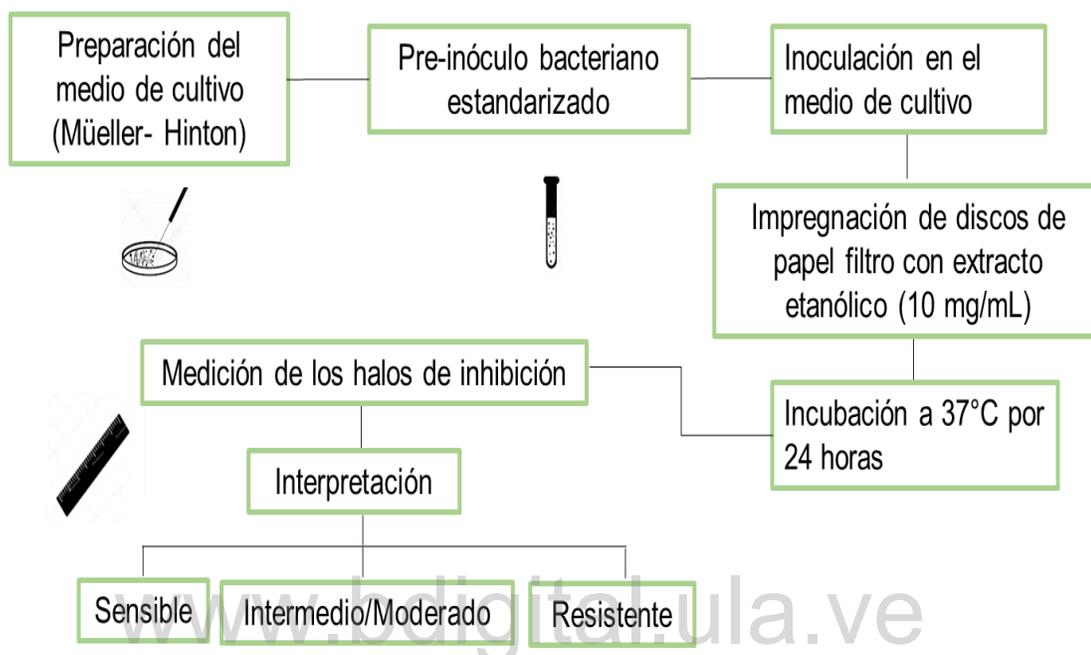
Esquema 3 Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico del *Heliotropium indicum* L. por el método de difusión de disco en agar (Kirby Bauer).



Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón, 2023.

www.bdigital.uba.ve

Esquema 3 Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico del *Heliotropium indicum* L. por el método de difusión de disco en agar (Kirby Bauer) (Continuación).



Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón, 2023.

Diseño de Análisis

Existen dos tipos de enfoques de investigación: cualitativo y cuantitativo. En esta investigación el análisis de los datos fué realizado a través de un enfoque tanto cuantitativo, como cualitativo. Al respecto, Pallela y Martins (2004) refirieron que el enfoque cuantitativo se basa en la expresión numérica de los datos y el análisis realizado a través de operaciones matemáticas, este enfoque estuvo representado por el diámetro en milímetros (mm) de los halos de inhibición registrados en las pruebas de susceptibilidad. Mientras que el enfoque cualitativo no se basa en

mediciones ni expresiones numéricas, sino en características de la unidad de investigación, y estuvo representado por las características químicas observadas en las pruebas preliminares de identificación, que se llevaron a cabo en el tamizaje fitoquímico. Sin embargo, a pesar de que el tamizaje fitoquímico fue expresado cualitativamente, este dejó entrever una frecuencia, la cual pudo ser absoluta o relativa, indicativa de la predominancia de metabolitos secundarios, con respecto a la ausencia de algunos de ellos.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Se recolectaron 180 gramos de las hojas de *Heliotropium indicum* L. las cuales fueron sometidas a secado y molienda, obteniéndose un peso de 28,7 gramos de material vegetal seco y molido, el cual se llevó a extracción con disolventes de polaridad ascendente tales como: hexano y etanol. Luego de la etapa de extracción, se realizó la concentración del extracto hasta sequedad y se obtuvo un extracto de hexano de 0,31 g y un extracto de etanol de 0,92 g (Tabla 6). Posteriormente, se calculó el porcentaje de rendimiento de cada extracto (Tabla 7).

Tabla 6. Pesos obtenidos de los extractos vegetales de hexano y etanol de las hojas de *Heliotropium indicum* L.

	Cantidad (gramos)	
	Hexano	Etanol
Extracto de las hojas de <i>Heliotropium indicum</i> L.	0,31 g	0,92 g

Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón (2023).

Para la determinación del porcentaje de rendimiento (%R) se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{\text{peso final del extracto obtenido}}{\text{peso inicial de la muestra}} \times 100$$

Tabla 7. Determinación del porcentaje de rendimiento de los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Heliotropium indicum* L.

	Extracto de hexano	Extracto de etanol
Peso inicial de la planta seca y molida (g)	28,7 g	28,7 g
Peso final del extracto (g)	0,31 g	0,92 g
% de Rendimiento	1,08 %	3,20 %

Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón (2023).

Análisis fitoquímico preliminar

Los extractos obtenidos a partir de las hojas de *Heliotropium indicum* L. fueron sometidos a una serie de pruebas químicas, con la finalidad de determinar la presencia de los distintos metabolitos secundarios contenidos en dicha planta. Mediante las pruebas cualitativas se demostró que el extracto de hexano de las hojas de *Heliotropium indicum* L. contenía triterpenos y esteroides, lo cual se evidenció mediante la aparición de un anillo de color rojo y verde respectivamente; mientras que el extracto etanólico presentó esteroides, por cual se observó un anillo de color verde; además se determinó la presencia de alcaloides en dicho extracto, mediante la aparición de un precipitado naranja-rojizo, a través de la prueba de Dragendorff. Por otra parte, en el estudio de los flavonoides se determinó la presencia de los mismos en el extracto de hexano, a través de la prueba de hidróxido de sodio (NaOH) cuya positividad se demostró mediante un viraje de color a amarillo-naranja.

Por el contrario, se evidenció la ausencia de los compuestos como saponinas, fenoles, taninos, cumarinas y quinonas, en los extractos ensayados (Tabla 8 y 9).

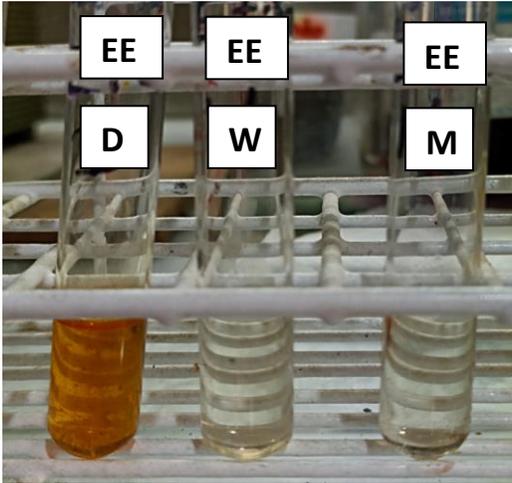
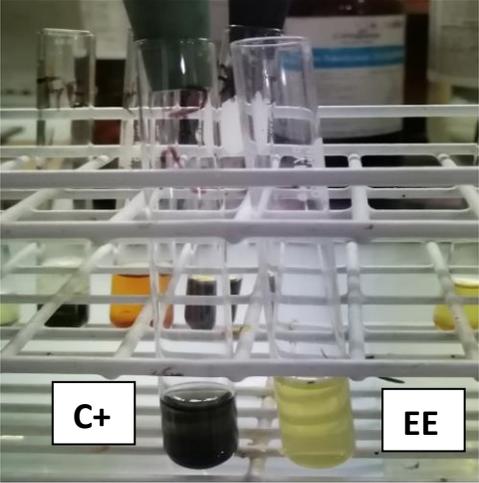
Tabla 8. Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos obtenidos de las hojas de *Heliotropium indicum* L.

Pruebas químicas	Extractos	
	Hexano	Etanol
Alcaloides		
Dragendorff	-	+
Wagner	-	-
Mayer	-	-
Triterpenos y esteroides	++	+
Liebermann-Burchard	(Verde/ Rojo)	(Verde)
Compuestos fenólicos (FeCl ₃)	ND	-
Saponinas Espuma	ND	-
Taninos Gelatina al 1%	ND	-
Flavonoides Shinoda NaOH al 10%	- +	- -
Cumarinas NH ₄ OH	-	-
Quinonas H ₂ SO ₄	-	-

Leyenda: No determinado (ND), Negativo (-), Positivo (+).

Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón (2023).

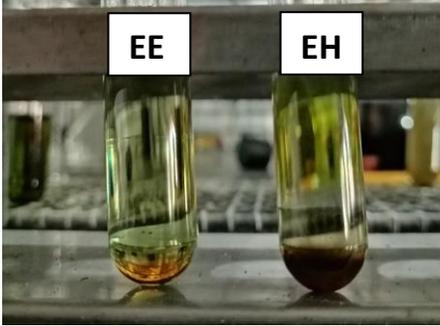
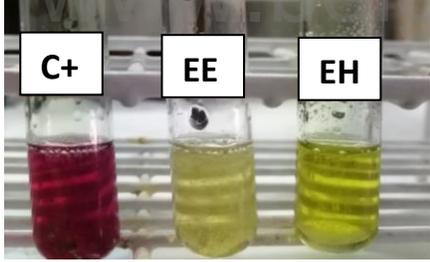
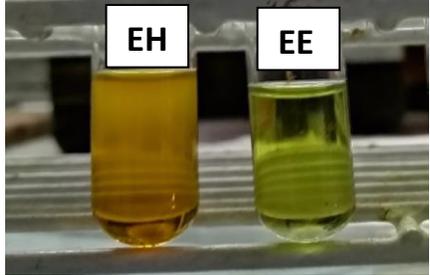
Tabla 9. Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de los extractos de las hojas de *Heliotropium indicum* L.

Imagen de los resultados para alcaloides	
	<p style="text-align: center;"><u>Interpretación de resultados</u></p> <p>-Metabolitos determinados: Alcaloides</p> <p>-Prueba: Dragendorff (D), Wagner (W) y Mayer (M)</p> <p>-Reporte: Extracto etanólico: positivo para la prueba de Dragendorff y negativo para las pruebas de Wagner y Mayer. Extracto de hexano: Negativo para las 3 pruebas.</p>
Imagen de los resultados para compuestos fenólicos	
	<p style="text-align: center;"><u>Interpretación de resultados</u></p> <p>-Metabolitos determinados: Compuestos fenólicos</p> <p>-Prueba: Tricloruro férrico (FeCl₃)</p> <p>-Reporte: Negativo para el extracto de etanol</p>

Leyenda: Control Positivo (**C+**), Extracto de etanol (**EE**), Extracto de hexano (**EH**), Dragendorff (**D**), Wagner (**W**) y Mayer (**M**).

Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón (2023).

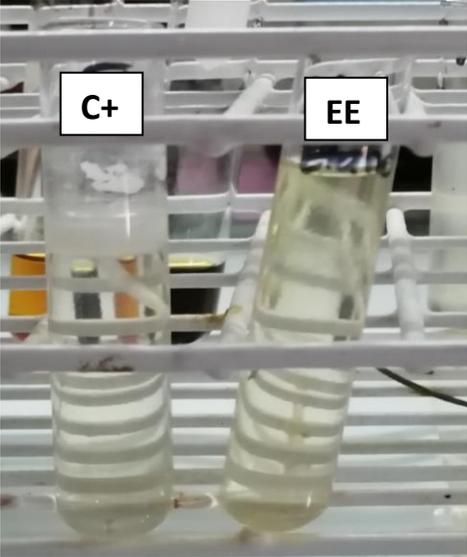
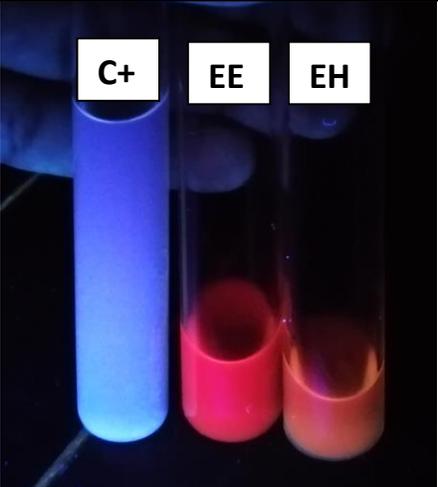
Tabla 9. Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de los extractos de las hojas de *Heliotropium indicum* L. (Continuación).

Imagen de los resultados para triterpenos/esteroles	
	<p><u>Interpretación de resultados</u></p> <p>-Metabolitos determinados: Triterpenos/esteroles</p> <p>-Prueba: Liebermann-Burchard</p> <p>-Reporte: Positivo para el extracto de hexano (verde/rojo) y para el extracto de etanol (verde)</p>
Imagen de los resultados para flavonoides	
<p>Prueba Shinoda</p>  <p>Prueba NaOH</p> 	<p><u>Interpretación de resultados</u></p> <p>-Metabolitos determinados: Flavonoides</p> <p>-Prueba: Shinoda e Hidróxido de Sodio al 10 % (NaOH)</p> <p>-Reporte: Positivo para el extracto de hexano en la prueba de Hidróxido de Sodio (amarillo-naranja), y negativo para el extracto de etanol. Negativo para ambos extractos en la prueba de Shinoda.</p>

Legenda: Control Positivo (C+), Extracto de etanol (EE), Extracto de hexano (EH).

Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón (2023).

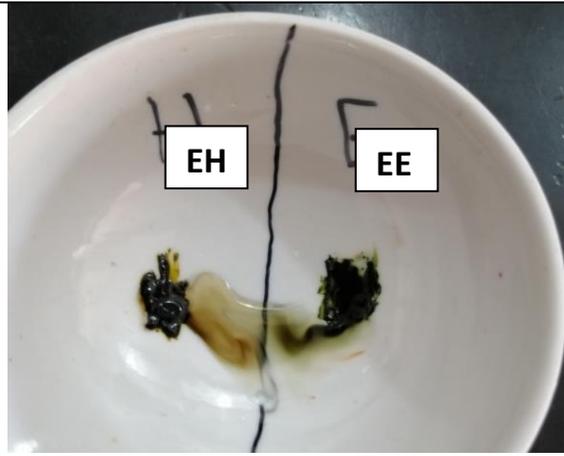
Tabla 9. Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de los extractos de las hojas de *Heliotropium indicum* L. (Continuación).

Imagen de los resultados para taninos	
	<p style="text-align: center;"><u>Interpretación de resultados</u></p> <p>-Metabolitos determinados: Taninos</p> <p>-Prueba: Gelatina al 1 %</p> <p>-Reporte: Negativo para el extracto de etanol</p>
Imagen de los resultados para cumarinas	
	<p style="text-align: center;"><u>Interpretación de resultados</u></p> <p>-Metabolitos determinados: Cumarinas</p> <p>-Prueba: Hidróxido de amonio concentrado</p> <p>-Reporte: Negativo para el extracto de hexano y de etanol</p>

Leyenda: Control Positivo (**C+**), Extracto de etanol (**EE**), Extracto de hexano (**EH**).

Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón (2023).

Tabla 9. Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de los extractos de las hojas de *Heliotropium indicum* L. (Continuación).

Imagen de los resultados para quinonas	
	<p style="text-align: center;"><u>Interpretación de resultados</u></p> <p>-Metabolitos determinados: Quinonas</p> <p>-Prueba: Ácido sulfúrico concentrado</p> <p>-Reporte: Negativo para el extracto de hexano y de etanol</p>
Imagen de los resultados para saponinas	
	<p style="text-align: center;"><u>Interpretación de resultados</u></p> <p>-Metabolitos determinados: Saponinas</p> <p>-Prueba: Ensayo de espuma</p> <p>-Reporte: Negativo para el extracto de etanol</p>

Leyenda: Control Positivo (**C+**), Extracto de etanol (**EE**), Extracto de hexano (**EH**).

Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón (2023).

Evaluación de la actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de *Heliotropium indicum* L. fue evaluada mediante el método de difusión en agar con disco (Kirby-Bauer). Para esto se utilizó una concentración de 10 mg/mL

del extracto, frente a cinco cepas de referencia internacional (Tabla 10) y posteriormente se midió los halos de inhibición y se realizó la categorización de las bacterias ensayadas (Figura 20).

Tabla 10. Resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Heliotropium indicum* L.

Muestra ensayada [10 mg/mL]	Halos de inhibición de las cepas bacterianas ATCC (mm)			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>K.pneumoniae</i> ATCC 23357
Extracto etanólico	7	8	7	8
DMSO	0	0	0	0

Nota: no hubo crecimiento de la cepa bacteriana *Escherichia coli* ATCC 25922.

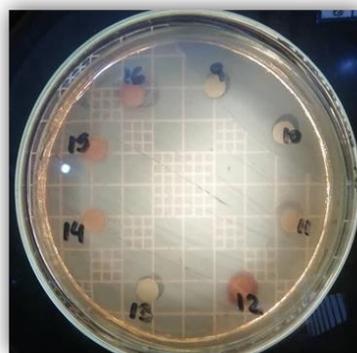
Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón (2023).

Figura 20. Reporte ilustrado de los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Heliotropium indicum* L., correspondiente a la muestra número 13.

Staphylococcus aureus



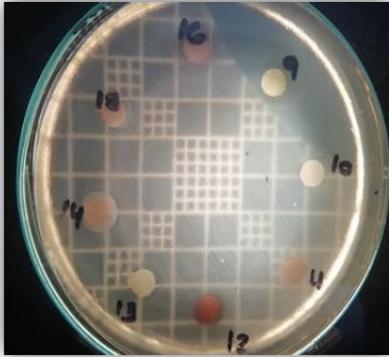
Pseudomonas aeruginosa



Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón (2023).

Figura 20. Reporte ilustrado de los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Heliotropium indicum* L., correspondiente a la muestra número 13. (Continuación).

Enterococcus faecalis



Klebsiella pneumoniae



Elaborado por: Morales, Sandoval y Obregón (2023).

www.bdigital.ula.ve

Discusiones

Este trabajo tuvo como finalidad evaluar la composición química y la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos a partir de las hojas de *Heliotropium indicum* L. Obteniéndose un extracto de hexano y uno de etanol, a los cuales se les realizó un screening fitoquímico a través de una serie de reacciones químicas cualitativas, determinando así la presencia o ausencia de los distintos metabolitos secundarios ensayados. Los resultados obtenidos revelaron la presencia de triterpenos, esteroides y flavonoides en el extracto de hexano, mientras que en el extracto de etanol se evidenció la presencia de esteroides y alcaloides. Por otra parte, en la evaluación fitoquímica de compuestos como fenoles, saponinas, taninos, cumarinas y quinonas, se comprobó la ausencia de los mismos, en ambos extractos.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, Goyal y Sharma en el año 2014, realizaron una investigación sobre la composición fitoquímica de las plantas del género *Heliotropium*, para la cual utilizaron tallos y hojas de diversas especies, las cuales fueron sometidas a una extracción continua (extracción en caliente), con solventes de polaridad ascendente como el diclorometano, etanol y agua, determinando la presencia de fitoquímicos bioactivos en los tallos y hojas del *Heliotropium indicum* L., tales como: alcaloides de pirrolizidina, fenoles, terpenos, esteroides y quinonas. Esta investigación se correlaciona con el presente trabajo, ya que en ambos se evidencio la presencia de alcaloides, terpenos y esteroides, sin embargo, los investigadores demostraron la presencia de otros metabolitos secundarios mencionados anteriormente y esto pudo deberse a que ellos utilizaron diferentes partes de la planta y diferentes solventes. Además, la recolección del espécimen se realizó en diferentes ubicaciones geográficas (India y Venezuela) y se ha demostrado que esta última influye en la síntesis de metabolitos secundarios. Según Sarkar y cols., (2021), las especies vegetales presentan cambios en sus bioconstituyentes, dependiendo del

clima o forma de cultivo, presencia de compuestos con efectos adversos o antagonicos, cambios en bioactividad durante su manipulaci3n, almacenamiento y preparaci3n de materiales, por tal motivo estas pudieran ser las razones de las discrepancias observadas en los resultados de ambas investigaciones.

Por otro lado, la investigaci3n fitoquímica del extracto metan3lico de las hojas de *Heliotropium indicum* L realizado por Adedeji y Osungunna en el a3o 2018, fue llevado a cabo empleando el m3todo de maceraci3n para la obtenci3n del extracto metan3lico. El an3lisis fitoquímico confirmo la presencia de metabolitos secundarios como alcaloides, saponinas y taninos, los cuales resultaron negativos en la presente investigaci3n, a excepci3n de los alcaloides. Esta diferencia de resultados pudo ser originada, debido a la variaci3n en las condiciones de ensayo empleadas para la t3cnica de extracci3n, tales como, la t3cnica de maceraci3n y el uso de metanol como solvente; mientras que en este trabajo la t3cnica de extracci3n empleada fue reflujo en caliente y se us3 como solventes el hexano y etanol. Debido a la presencia de alcaloides en dicho espécimen vegetal, se puede intuir que estos presentan actividad antibacteriana, ya que en estos metabolitos secundarios se conoce un mecanismo de acci3n que se basa en la intercalaci3n entre la pared celular y en ADN del microorganismo.

En cuanto a la evaluaci3n de la actividad antibacteriana, fue realizada posteriormente al tamizaje fitoquímico, empleando el m3todo de difusi3n en agar con disco (Kirby-Bauer), permitiendo determinar la actividad presentada por el extracto etan3lico de las hojas de *Heliotropium indicum* L., frente a cepas bacterianas de referencia internacional (ATCC) tales como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. Se emple3 como control negativo el Dimetilsulf3xido (DMSO); arrojando resultados indicativos de tener actividad antibacteriana, presentando halos de inhibici3n de 7 mm de diámetro contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y de 8 mm frente a

Enterococcus faecalis y *Klebsiella pneumoniae*; por otra parte, en cuanto a la cepa de *Escherichia coli*, fue indeterminada, debido a que no hubo crecimiento bacteriano.

Los investigadores Adedeji y Osungunna en el año 2018, realizaron un estudio de la actividad antibacteriana del extracto de metanol de *Heliotropium indicum* frente a cinco cepas bacterianas las cuales fueron *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Para lo cual se empleó el método de difusión en pozo modificado (Kirby-Bauer) con concentraciones del extracto de 6,25, 12,5, 25, 50, 100 y 200 mg/mL. Los resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana revelaron que tanto *S. aureus* y *Klebsiella* spp. se inhibieron a 50, 100 y 200 mg/mL del extracto, mientras que *P. aeruginosa* y *P. mirabilis* fueron inhibidos a 100 mg/mL y 200 mg/mL, *E. coli* se inhibió solo a 200 mg/mL de concentración del extracto. En base a esto, en líneas generales, se puede confirmar la correlación entre ambas investigaciones en cuanto a la capacidad inhibitoria del *Heliotropium indicum* L., frente a las diversas cepas bacterianas, puesto que, a pesar de usar diferentes métodos para la evaluación antibacteriana, así como diferentes concentraciones de los extractos ensayados, se evidencio la presencia de actividad antibacteriana en ambos estudios. Sin embargo, cabe destacar que en esta investigación se utilizó una concentración de 10 mg/mL de extracto, siendo esta inferior a las concentraciones que demostraron tener actividad inhibitoria significativa (50, 100 y 200 mg/mL), frente a las cepas bacterianas ensayadas por de Adedeji y Osungunna.

Así mismo, en el año 2021, Olaleye y Toloja, realizaron un estudio sobre la actividad antibacteriana del *Heliotropium indicum* L. contra cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, empleando el método de difusión de disco en agar (Kirby-Bauer) en el cual se demostró la actividad antibacteriana del extracto metanólico de las flores de *Heliotropium indicum* L. contra las cepas mencionadas, registrando halos de inhibición de 32 mm

de diámetro para *S. aureus* y de 28 mm de diámetro para *E.coli*, frente a una concentración de extracto metanólico de 100 mg/mL por lo que se evidencia una diferencia significativa en los diámetros de los halos de inhibición al compararlos con la presente investigación; esto es debido a que se utilizaron diferentes partes de la planta en estudio, así como diferentes concentraciones del extracto, ya que en dicha investigación usaron flores y una concentración de 100 mg/mL del extracto , mientras que en el presente trabajo se utilizaron hojas del espécimen vegetal y una concentración de 10 mg/mL. Además, en el proceso de la obtención de los extractos del presente ensayo, se emplearon hexano y etanol como solventes, mientras que, Olaleye y Toloja usaron metanol; razón por la cual se presentan discrepancias entre ambos estudios.

Por otra parte, Nakkuntod, y Prapatsorn en el 2021, realizaron un estudio para evaluar la actividad antimicrobiana de diversas malezas, entre las cuales estuvo incluido el *Heliotropium indicum* L., para lo cual se utilizó el método de difusión en agar con disco, ensayando los extractos acuosos, acetona, hexano y metanólico, de las malezas, a una concentración de 12 mg/mL contra *Candida albicans*, *Malassezia furfur*, *Malassezia globosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*. El resultado de la evaluación del extracto metanólico de *Heliotropium indicum* L. mostró actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *B. subtilis*; registrando un halo de inhibición de 9,0 mm de diámetro para ambas cepas bacterianas. Esta investigación se correlaciona con el presente estudio debido a que se utilizó el mismo método y concentraciones similares para la determinación de la actividad antibacteriana, obteniéndose halos de inhibición con diámetros cercanos en ambas investigaciones. Ya que en el presente estudio se registró un halo de inhibición de 7 mm de diámetro para la cepa de *S. aureus* empleando una concentración del extracto etanólico de 10 mg/mL.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Mediante la técnica de extracción por reflujo, se lograron obtener los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Heliotropium indicum* L., con un porcentaje de rendimiento de 1,08 % y 3,20 % respectivamente.
- El tamizaje fitoquímico que se realizó al extracto de hexano, reveló la presencia de triterpenos, esteroides y flavonoides
- El análisis fitoquímico del extracto de etanol de las hojas de *Heliotropium indicum* L. demostró la presencia de alcaloides y esteroides.
- La actividad antibacteriana del extracto etanólico, a una concentración de 10 mg/mL, se realizó mediante el método de difusión de disco en agar (Kirby-Bauer) y presentó frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* un halo de inhibición de 7 mm de diámetro cada una, mientras que *Enterococcus faecalis* y *Klebsiella pneumoniae* presentaron un halo de inhibición de 8 mm cada una. Por otra parte, en cuanto a la cepa de *Escherichia coli*, fue indeterminada, debido a que no hubo crecimiento bacteriano.
- Esta investigación representó el primer reporte proveniente del Estado Mérida sobre la composición química preliminar de los extractos de *Heliotropium indicum* L. y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional.

Recomendaciones

- Obtener extractos vegetales utilizando distintos solventes (metanol, diclorometano y agua), así como diferentes técnicas de extracción, con la finalidad de aislar e identificar diversos metabolitos secundarios de distinta naturaleza, de acuerdo a su polaridad.
- Para la extracción se recomienda utilizar como espécimen vegetal distintas partes de la planta en estudio, como lo son flores, tallos, raíces y frutos, con el fin de identificar otros metabolitos presentes en dichas partes, además es importante tener en cuenta la ubicación geográfica de la planta, ya que influye en la producción de metabolitos secundarios.
- Analizar la actividad antibacteriana de los extractos de hexano y etanol, por medio de la técnica de dilución en caldo, para obtener la concentración inhibitoria mínima (CIM), de esta manera se lograría determinar la concentración exacta a la cual las cepas bacterianas son inhibidas, además de permitir la comparación de resultados al aplicar el método de difusión de disco en agar (Kirby-Bauer).
- Evaluar otras actividades biológicas de los extractos de las hojas *Heliotropium indicum* L., tales como: actividad antifúngica, cicatrizante, antioxidante y antiinflamatoria.

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Abdullah, M., y Dash, G. (2013). Una revisión del *Heliotropium indicum* Linn. *International Journal Pharmaceutical Sciences and Research*, 4 (4), 1253-1258.
- Adedeji, K., y Osungunna, M. (2018). Cribado fitoquímico y actividad antibacteriana del extracto de metanol de *Heliotropium indicum*. *International Scholars Journals*, 12 (7), 001-004.
- Aguilar, A., Gutiérrez, M., y Robles, M. (2016). Identificación cualitativa de metabolitos secundarios y determinación de la citotoxicidad de extractos de tempisque (*Sideroxylum capiri* Pittier). *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, 2 (3), 3-8.
- Albornoz, A. (1980). *Productos Naturales, Sustancias y Drogas Extraídas de Plantas*. Caracas: Consejo de Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela.
- Alcántar, M., Giono, S., Morfin, M., Santos, J., y Torres, F. (2021). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta Médica de México*, 156 (2), 2-6.
- Aleixandre, A., López, N., y Miguel, M. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos sobre la salud. *Revista Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 32 (3), 81-91.
- Alvarado, V. (2017). Actividad antioxidante y citotóxica de 35 plantas medicinales de la cordillera negra. *Universidad Mayor de San Marcos*, 4 (2), 52-54.
- Aponte, Y., Cardona, C., y Parra, D. (2016). *Marcha fitoquímica preliminar*. Corporación Tecnológica de Bogotá en Regencia de Farmacia. Bogotá, Colombia.
- Arango, J. (2008). *Alcaloides y compuestos nitrogenados*. Medellín: Universidad de Antioquia.
- Arias, F. (2006). *El proyecto de investigación*. Caracas: Editorial Episteme

- Ávalos, A., y Pérez, E. (2009). Metabolitos secundarios de plantas. *Reduca*, 3 (2),4-5.
- Ávila, J., y Fonte, P. (2010). *Salud Ecológica*. Maracaibo: HENRYFB.
- Barrón, R., y García, M. (2011). Flavonoides y actividad antioxidante de *Calia secundiflora*. *Revista fitotecnia mexicana*, 34 (3), 81-82.
- Bharathajothi, P., Bhaaskarant, T., y Menaca, P. (2015). Actividad antimicrobiana y evaluación fitoquímica de la planta medicinal *Heliotropium indicum* L. *Journal of Microbiology and Biotechnology research*, 5 (2), 8-11.
- Blanco, Y., y Mena, L. (2015). Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20 (1), 106-116.
- Brewsrer, R., Calvin, A., y Vanderwerf, W. (1970). *Curso Práctico de Química Orgánica*. Madrid: Editorial Alhambra.
- Bruneton, J. (2001). *Plantas medicinales, fitoquímica y farmacognosia*. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Burdock, G. (1975). *Fernaroli's, Handbook of flavor ingredients*. New York: Editorial C.R.C Press.
- Carvajal, R., y Uribe, Y. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). *Revista Colombiana Forestal*, 12 (2), 161-170.
- Cervantes, E., García, R., y Paz, S. (2014). Características generales del *Staphylococcus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61 (1), 28-40.
- Ceballos, C., Gómez, H., y Sánchez, F. (2017). Actividad antibacteriana de *Cordia dentata* Poir, *Heliotropium indicum* Linn y *Momordica charantia* Linn en la costa del norte de Colombia. *Revista colombiana científica, química y farmacológica*, 46 (2), 143-159.
- Chasquibol, N. (2003). Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia. *Revista Periódica Ingeniería Química*, 5 (2), 9-20.

- Corrales, M., y Melo, A. (2013). Evaluación del potencial antibacterial *in vitro* de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. *Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 11 (19), 1794-1800.
- Delporte, C. (2010). *Farmacognosia Trabajos Prácticos*. Santiago de Chile: Consejo de Publicaciones del Departamento de Química Farmacológica.
- 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.
- Domingo, D., y López, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16, (4), 385-393.
- Domínguez, X. (1979). *Métodos de investigación fitoquímica*. México: Editorial Limusa.
- Dresler, S., y Wójcik, M. (2017). Comparación de algunos metabolitos secundarios contenidos en las diecisiete especies de la familia Boraginaceae. *Pharmaceutical Biology*, 55 (1), 691-695.
- Durst, H., y Gokel, G. (1985). *Química orgánica experimental*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Espinosa, G., y Villaseñor, R. (1998). *Catálogo de malezas de México*. México: Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario.
- Fayer, M. (2021). *Heliotropium*; un género rico en alcaloides de pirrolizidina: una revisión sistemática siguiendo su fitoquímica y farmacología. *Phytomedicine Plus*, 17 (2), 1-9.
- Fuentes, C. (2006). *Flora arvense*. Colombia: Bayer CropScience S.A y Universidad Nacional de Colombia.
- Gamboa, M., y Rodríguez, E. (2005). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.

- García, C. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química viva*, 9 (2), 1666-1700.
- García, P. (1994). *Microbiología Clínica Práctica*. Cádiz: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz.
- García, P. (2019). Historia del uso de las plantas medicinales y su relación con la salud. *Evidentia*, 1 (6), 10.
- García, V. (2005). *Introducción a la Microbiología*. Madrid: Editorial EUNED.
- González, B., y Robledo, J. (2016). Análisis fitoquímico de *Heliotropium curassavicum* var. *Fructiculosum*. *Plantas medicinales nativas*, 2 (3), 2-3.
- Gómez, A., y Valcárcel, M. (2004). *Técnicas Analíticas de Separación*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Goyal, N., y Sharma, S. (2014). Fitoconstituyentes bioactivos y extractos de plantas del género *Heliotropium*. *International Journal of Green Pharmacy*, 8 (4), 217-225.
- Hans, S. (1992). *Microbiología general*. Madrid: Editorial Panamericana.
- Herrera, A. (2008). *Botánica*. Texas: Editorial Universidad de Texas.
- Hokche, O. (2008). *Catálogo de la Flora Vasculare Venezolana*. Caracas: Fundación Instituto Botánico de Venezuela.
- Hurtado, J. (2010). *Guía para la comprensión holísticas de la ciencia*. Caracas: Fundación Sypal.
- Ihtesham, Y., y Khan, U. (2019). Potencial antibacteriano y antifúngico *in vitro* de extractos crudos metanólicos de algunos *Heliotropium* spp. *Avance en la Investigación de Plantas Medicinales*, 7(3), 79-84.
- Klages, F. (1968). *Tratado de Química Orgánica*. Barcelona: Editorial Reverté S.A.
- Koneman, E. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*. México: Editorial Médica Panamericana.

- Kumar, A., Meher, A., y Shankar, B. (2019). *Heliotropium indicum*: farmacognosia, fisicoquímica y enfoques fitoquímicos. *Revista de Investigación Farmacéutica Avanzada*, 2 (1), 464-468.
- León, J., Tomas, G., y Torres, J. (2017). Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de hojas de *Luma chequen* frente a patógenos de origen clínico. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 1 (37), 5-7.
- López, J., y Medrano, A. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia*, 6 (2), 85-87.
- Louis, G. (2008). *Los tres reinos de la naturaleza o museo pintoresco de historia natural: Botánica*. Madrid: Gaspar y Roig.
- Lujan, D. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: Un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamérica*, 48 (4), 465-474.
- Malbran, C. (2012). Método de Determinación de Sensibilidad Antimicrobiana por Dilución. *MIC testing*, 2 (32), 30-32.
- Maldonado, S. (1983). Sobre la inflorescencia, morfología floral, embriología y polen de Leguminosae. *Boletín de la sociedad argentina de botánica*, 22 (4), 177-203.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Caracas: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela.
- Martínez, J. (1982). *Análisis orgánico cualitativo*. Bogotá: Departamento de Publicaciones de la Facultad de Ciencias.
- Medina, J. (2000). *Guía de antimicrobianos y tratamientos de las infecciones*. Madrid: Editorial Días de Santos.
- Melvin, W. (2002). *Nutrición para la salud*. Barcelona: Editorial the McGraw-Hill.
- Mendoza, N. (2008). *Farmacología Médica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.

- Miranda, J., y Pereira, R. (2008). Sinopsis taxonómica de la familia Boraginaceae. *Acta Botánica de Brasil*, 22 (3), 701-703.
- Molina, M. (2008). Variación de la pubescencia foliar en las plantas y sus implicaciones funcionales a lo largo de gradientes altitudinales. *Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*, 17 (1), 146-154.
- Murray, P. (2009). *Microbiología Médica*. Barcelona: Editorial Elsevier.
- Nakkuntod, M., y Prapatsorn, J. (2021). Potencial de las malezas herbarias tailandesas para la actividad antimicrobiana utilizando el método de difusión en disco de agar. *Revista Biotecnología de células vegetales y biología molecular*, 22 (3), 14-24.
- Nawaz, S., y Sarwer, W. (2016). Etnofarmacológico, fitoquímico y farmacognóstico potencial del género *Heliotropium*. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13 (2), 259-280.
- Olaleye, M., y Toloja, O. (2021). Estudio comparativo de la actividad antibacteriana de algunas plantas medicinales seleccionadas sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. *Revista Internacional de Publicaciones y Reseñas de Investigación*, 2 (12) 466-470.
- Osungunna, M. (2010). Estimación fitoquímica y actividad antibacteriana de *Heliotropium indicum* L. contra las bacterias comunes aisladas de seres humanos. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3 (8), 213-216.
- Parella, S. Y Martins, F. (2004). *Metodología de la Investigación Cuantitativa*. Caracas: FEDUPEL.
- Prats, G. (2007). *Microbiología clínica*. Barcelona: Editorial Médica Panamericana.
- Reija, O. (2007). *Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes*. España: Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes.
- Remington, A. (2003). *Farmacología*. Uruguay: Editorial Médica Panamericana.

- Sammy, J. (2005). Alcaloides de pirrolizidina de *Heliotropium indicum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 6 (16), 11-13.
- Sarkar, et al. (2021). *Heliotropium indicum* Linn: De la granja a fuente de bioactivos. *Hindawi*, 2 (1), 4-21.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
- Souza, E. (2017). Actividad antimicrobiana *in vitro* de los metabolitos producidos por el *Heliotropium indicum* frente a los microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Proteus vulgaris*. *Repositorio Institucional*, 1 (2), 1-11.
- Spicer, J. (2009). *Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas*. Australia: Editorial Elsevier.
- 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. *Red de Revistas Científicas*, 2 (3), 3-5.
- Tortora, G. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Bogotá: Editorial Médica Panamericana.
- Valenzuela, C. (1995). *Química General*. Madrid: Editorial Salamanca.
- Vidaurre, M. (2011). Características farmacognósticas de las hojas de *Capparis avicennifolia*. *Revista Médica Vallejana*, 4 (2), 121-122.
- Vogel, A. (1974). *Practical Organic Chemistry*. Madrid: Editorial Alhambra Longman.