



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



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LAS
HOJAS DE *Cassia alata* L. EN BACTERIAS GRAMPOSITIVAS Y
GRAMNEGATIVAS

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

Autor:

Paola A. Uzcátegui B.

C.I. V- 22.929.462

Tutor:

Prof. Ysbelia M. Obregón D.

Mérida, noviembre de 2022

DEDICATORIA

A Dios, por ser la fuerza que he necesitado en los momentos difíciles, por hacer del tiempo perfecto un camino lleno de luz cuando necesito claridad y confort.

A mi familia, por ser apoyo incondicional, quienes han formado parte de este logro a cada paso y en todo momento.

A José Andrés Nieto, por permanecer a mi lado en cada nuevo reto y apoyarme incondicionalmente hasta el final.

www.bdigital.ula.ve

Paola Uzcátegui

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por llenar mis días de luz y fortaleza, porque de cada experiencia he aprendido en amor perfecto y confianza plena.

A mi familia, gracias por haber hecho el mayor esfuerzo posible para darme la mejor educación, por brindarme valores cultivados bajo responsabilidad, respeto, honestidad y amor, gracias por ser apoyo incondicional y ejemplo a seguir.

A mi tutora la Profesora Ysbelia Obregón, por ser paciente y excelente consejera, gracias por ser un ejemplo claro de perseverancia, entrega y dedicación.

Al Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, a cada uno de sus miembros, que abrieron sus puertas para mí y me apoyaron hasta el final; especialmente a cada una de las profesoras que hacen vida científica con tanta dedicación y compromiso, también al Sr Emilio Salazar, que me brindó su ayuda en el laboratorio guiándome con paciencia y dedicación .

A José Andrés, por formar parte de este proceso siendo paciente e incondicional, por apoyarme cuando me quería rendir; por ser mi compañero y sustentarme todo este tiempo, gracias.

A mi casa de estudio, la ilustre Universidad de Los Andes de la cual me llena de orgullo formar parte, gracias por brindarme la oportunidad de formarme en lo que más amo; la ciencia, gracias a su gente.

Paola Uzcátegui

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	3
Planteamiento del Problema	3
Justificación de la Investigación	5
Objetivos de la Investigación.....	7
<i>Objetivo General</i>	7
<i>Objetivos Específicos</i>	7
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	8
<i>Alcances de la Investigación</i>	8
<i>Limitaciones de la Investigación</i>	8
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	9
Trabajos Previos	9
Antecedentes Históricos de la Investigación	11
Bases Teóricas	12
<i>Familia Fabaceae</i>	12
<i>Subfamilia Caesalpinioideae.</i>	15
<i>Género Cassia</i>	17
<i>Especie Cassia alata L.</i>	21
<i>Productos Naturales</i>	25
<i>Extractos Vegetales</i>	32
<i>Tamizaje Fitoquímico</i>	35

<i>Bacterias</i>	38
<i>Tinción de Gram</i>	39
<i>Mecanismos de Resistencia</i>	40
<i>Antibióticos</i>	41
<i>Actividad Antibacteriana</i>	42
<i>Técnicas para Medir la Actividad Antibacteriana</i>	43
Definición Operacional de Términos.....	44
Operacionalización de las Variables.....	45
Hipótesis	48
CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO.....	49
Tipo de Investigación	49
Diseño de Investigación.....	49
Población y Muestra	50
<i>Unidad de Investigación</i>	50
<i>Selección del Tamaño de la Muestra</i>	50
Sistema de Variables.....	50
Instrumentos de Recolección de Datos	50
Procedimientos de la Investigación	51
<i>Recolección de la Muestra</i>	52
<i>Método Utilizado para la Preparación de los Extractos</i>	52
<i>Tamizaje Fitoquímico</i>	53

<i>Determinación de la Actividad Antibacteriana por el Metodo de Difusion en Disco</i> <i>(Kirby-Buer)</i>	55
Diseño de Análisis	58
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	59
Resultados	60
<i>Estudio Fitoquímico Preliminar</i>	60
<i>Evaluación de la Actividad Antibacteriana</i>	65
Discusiones	66
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	70
Conclusiones	70
Recomendaciones	71
BIBLIOHEMEROGRAFIA	70

ÍNDICE DE TABLAS

N°		Pág.
1	Clasificación taxonómica de la Subfamilia Caesalpinioideae.....	15
2	Clasificación taxonómica del Género <i>Cassia</i>	18
3	Clasificación taxonómica de la especie <i>Cassia alata</i>	22
4	Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de <i>Cassia</i> <i>alata</i>	47
5	Operacionalización de la variable independiente: Composición química de los extractos de las hojas de <i>Cassia alata</i>	48
6	Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).....	57
7	Descripción del peso de los extractos y su rendimiento porcentual.....	61
8	Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos obtenidos de las hojas de <i>Cassia alata</i> L.....	62
9	Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de <i>Cassia alata</i> L.....	63
10	Resultados obtenidos para la determinación de la actividad antibacteriana de extractos de <i>Cassia alata</i> L.....	66
11	Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de <i>Cassia alata</i> L.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

N°	Pág.
1 Estructura química de los metabolitos secundarios aislados de la familia Fabaceae.....	14
2 Estructura química del isoflavonoide (pterocarpano) presente en la Subfamilia Caesalpinioideae.....	16
3 Ácidos triterpénicos presentes en la subfamilia Caesalpinioideae.....	17
4 Metabolitos secundarios aislados del Género <i>Cassia</i>	19
5 Compuestos polifenólicos de algunas especies de <i>Cassia</i>	21
6 Planta <i>Cassia alata</i> , hojas, frutos y flores.....	22
7 Metabolitos secundarios presentes en <i>Cassia alata</i>	23
8 Estructura general de los alcaloides.....	26
9 Estructura química de las lactonas y fenilpropanoides.....	27
10 Estructura general de los compuestos flavonoides.....	28
11 Estructura química del ácido shikímico.....	29
12 Estructura química de los aminoácidos aromáticos.....	30
13 Estructura química de los compuestos precursores del ácido shikímico.....	31
14 Biosíntesis de flavonoides y estilbenos.....	31
15 Unidad estructural del isopreno.....	32
16 Morfología Bacteriana.....	39
17 Pared Celular de las Bacterias grampositivas.....	40
18 Pared Celular de las Bacterias gramnegativas.....	40
19 Identificación botánica de <i>Cassia alata</i>	53

ÍNDICE DE ESQUEMAS

N°	Pág.
1	Procedimiento empleado para la obtención e identificación de los componentes de las hojas de <i>Cassia alata</i> L.....54
2	Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de <i>Cassia alata</i> L.....62

www.bdigital.ula.ve



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



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LAS
HOJAS DE *Cassia alata* L EN BACTERIAS GRAMPOSITIVAS Y
GRAMNEGATIVAS

Autor: Paola A. Uzcátegui B.

Tutor: Prof. Ysbelia M. Obregón D.

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y el tamizaje fitoquímico de las hojas de *Cassia alata* L., en bacterias grampositivas y gramnegativas. La planta fue recolectada en la localidad de Santa Cruz, estado Zulia, su identificación botánica se realizó en herbario de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis donde se almacenó para ser procesada en el laboratorio del Instituto de Investigación de la misma facultad, las hojas secas y molidas fueron sometidas a reflujo en caliente con hexano y etanol con el fin de separar los metabolitos secundarios en dos grupos: polares y apolares. Partiendo de los extractos obtenidos, se realizaron pruebas de identificación por medio del tamizaje fitoquímico, logrando la identificación de compuestos como: triterpenos, esteroides y alcaloides. Y por último se comprobó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas utilizando el método de difusión en disco (Kirby Bauer), donde se demostró que los extractos fueron activos frente a *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Klebsiella pneumoniae*, mientras que frente a *Staphylococcus aureus* no mostró actividad.

Palabras clave: *Cassia alata*, tamizaje fitoquímico, actividad antibacteriana, bacterias grampositivas y gramnegativas.

INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años la herbolaria medicinal ha sido considerada como una ciencia que estudia la utilización de los productos o extractos de origen vegetal para prevenir, atenuar o curar un estado patológico, a través de los principios o propiedades químicas de los mismos (Prieto, Ocampo, Fernández y Pérez, 2005).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) definió las plantas medicinales, como todo vegetal que contiene sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o preventivos y que son precursores de hemisíntesis quimiofarmacética (World Health Organization, 2014).

Entre las propiedades que pueden poseer estos productos de plantas se encuentra la actividad antibacteriana que es ejercida por sustancias bactericidas (ejercen una acción letal para la bacteria) o bacteriostáticos (solo inhiben transitoriamente el crecimiento bacteriano) (Salcedo, 2017). Para conocer los principios de los extractos de una planta se puede utilizar el tamizaje fitoquímico, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en la misma a través de una serie de pruebas bioquímicas principalmente colorimétricas (Sharapin, 2000). Una de las plantas evidenciada en la literatura como poseedora de actividad antibacteriana es la *Cassia alata*, un arbusto perenne de 2 a 4 metros de altura originario de América tropical, perteneciente a la subfamilia *Caesalpinacea* (Chatterjee, Chatterjee y Dutta, 2013).

En 2013, Chatterjee, Chatterjee y Dutta hicieron una investigación comparando los diferentes extractos de *Cassia alata* con antibióticos comerciales y concluyeron que la *C. alata* es una especie que posee actividad antimicrobiana significativa. Al considerar los porqués de esta investigación, los autores encontraron razones que justifican la realización de la misma, la que más destaca es la actividad de los metabolitos secundarios de *C. alata* que están estrechamente relacionados con la inhibición del

crecimiento de patógenos formadores de biopelículas (Saito, Trentin, Macedo, Pungartnik y Gosmann, 2012).

Por lo tanto, la investigación centra su interés sobre el evento de estudio basado en la actividad antibacteriana y tamizaje fitoquímico desde el punto de vista confirmatorio, ya que se pretende confirmar la relación que existe entre la actividad antibacteriana y el tamizaje fitoquímico de las hojas de *Cassia alata* L. en bacterias grampositivas y gramnegativas.

Esta investigación ha sido sistematizada de la siguiente manera. El Capítulo I: El Problema, formado por los siguientes subtítulos: Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II: Marco Teórico, en este se enmarcan los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos o Epistemológicos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las Variables e Hipótesis. El Capítulo III: Marco Metodológico, describe el Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Unidad de Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Procedimientos o Metodología de la Investigación y Diseño de Análisis. El capítulo IV está titulado como Resultados y Discusiones, y el capítulo V está titulado y compuesto por, Conclusiones y Recomendaciones.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

A partir de 1928, cuando Alexander Fleming descubrió la penicilina, comenzó la época de los antibióticos y desde esa fecha, en las décadas siguientes, se produjo un incremento de forma exponencial en la creación de nuevas clases de estos agentes, especialmente en países desarrollados. Sin embargo, en los años recientes ha surgido como un problema de consecuencias impredecibles la resistencia bacteriana a los antibióticos, por la aparición en las bacterias de mecanismos defensivos con el fin de evadir la acción de estas sustancias (Monroy y Prieto, 2015).

Uno de los mecanismos de resistencia más usados por la bacteria es disminuir o evitar la presencia del antibiótico en su interior modificando su permeabilidad, alterando su mecanismo de transporte activo en la membrana celular o generando mecanismos de eliminación activa del antibiótico (Echeverría, 1998). Este proceso es conocido como resistencia bacteriana, y es según la Organización Mundial de la Salud, una de las mayores amenazas para la salud en el mundo, la seguridad alimentaria y el desarrollo (World Health Organization, 2014).

Existen reportes en la literatura que evidencian la gran variedad de géneros de plantas con propiedades antibacterianas y antifúngicas, entre las cuales está la *Cassia alata*, ampliamente cultivada en Cuba, se emplea por la población como antiherpético, diurético, anticatarral y contra afecciones cutáneas, en Suramérica como laxante y como veneno para peces y en África se planta cerca de las casas para espantar a las hormigas (Chatterjee, Chatterjee y Dutta, 2013).

La especie *C. alata* ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional debido a la presencia de metabolitos secundarios que le confieren actividad biológica para

ejercer efectos antibacterianos y antifúngicos que permiten la utilización de esta planta como alternativa terapéutica (Carpio y Ambida, 2019).

En la Universidad Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Brazil, se realizó el primer estudio que muestra la capacidad de metabolitos de *C. alata* sobre dos importantes patógenos formadores de biopelículas (*Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*) donde se concluyó que la actividad de la *Cassia alata* está estrechamente relacionada con la inhibición del crecimiento bacteriano (Saito, Trentin, Macedo, Pungartnik y Gosmann, 2012).

Estos metabolitos secundarios presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (García y Pérez, 2009).

Una vez descrita la situación del problema de estudio, la autora elaboró el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación que existe entre la composición química y la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Cassia alata* L., en bacterias grampositivas y gramnegativas?

Justificación de la Investigación

Actualmente, la aparición de bacterias resistentes o multiresistentes a fármacos antibacterianos, representa un grave problema de salud pública a nivel mundial; esta problemática requiere una vigilancia constante, situación que desafía a la comunidad científica para la búsqueda de alternativas. La disminución de la eficacia y el aumento de la toxicidad de los antibióticos sintéticos agravan el problema; por lo que los científicos están buscando compuestos naturales para obtener soluciones. Al respecto, la medicina tradicional basada en el uso de plantas medicinales representa una alternativa para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias resistentes o multiresistentes, tanto en humanos como animales (Valle, Andrade, Puzon, Cabrera y Rivera, 2015).

Las plantas destinan una cantidad de energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que se denominan metabolitos secundarios, por ejemplo, los terpenos, los compuestos fenólicos y por último los alcaloides, muchos de estos metabolitos han demostrado poseer actividad biológica en el tratamiento de enfermedades, y son usados popularmente por la medicina tradicional, como método curativo o preventivo (Abarca, Reyes, Alvarado, Jiménez y Corral, 2006).

Existen reportes en la literatura que evidencian la gran variedad de géneros de plantas con propiedades antibacterianas y antifúngicas, entre las cuales está *Cassia alata* (Chatterjee, Chatterjee y Dutta, 2013).

Se han realizado estudios que demuestran la diversidad de grupos funcionales de compuestos entre los que se destacaron los alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas, triterpenos, esteroides y quinonas presentes en los extractos de *Cassia alata* L. (Barrese, Hernández y García, 2005).

El estudio y manejo adecuado de las plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional o alternativa es de vital importancia, ya que más de un tercio de la población en vías de desarrollo carece de medicamentos esenciales para mantener la salud, por lo

tanto, la creación de posibles fármacos que sean seguros y efectivos pueden ser una herramienta exitosa para incrementar el acceso a medidas de salud para los que carecen de ellas (World Health Organization, 2014).

www.bdigital.ula.ve

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la relación entre la composición química de los extractos de las hojas de *Cassia alata* L. y la actividad antibacteriana en bacterias grampositivas y gramnegativas.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos orgánicos (hexano y etanol) de las hojas de la especie *Cassia alata* L. por la técnica de reflujo en caliente.
- Identificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos de las hojas de *C. alata* L. mediante el tamizaje fitoquímico.
- Determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *C. alata* L. frente a bacterias grampositivas y gramnegativas.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

La siguiente investigación tiene como alcance aportar nuevos conocimientos relacionados con la determinación de la actividad antibacteriana de *Cassia alata* L., también confirmar que dicha actividad esté relacionada con la composición química de los extractos de la planta mencionada, para promover estrategias terapéuticas de origen vegetal como alternativa en contra de los mecanismos de resistencia bacteriana.

Limitaciones de la Investigación

En el desarrollo del presente trabajo investigativo las limitaciones estuvieron representadas por el alto costo y escasez de los materiales, productos e instrumentos necesarios para la ejecución de la parte experimental de la investigación. Las limitantes que se encontraron fueron de tipo económicas, por ser difícil la adquisición del agar Mueller Hinton en el que se valorará la actividad antibacteriana, también se incluyen los cortes de luz.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Mar'ie, Zamzani y Nashihah (2022), realizaron una investigación titulada “Actividad antibacteriana del extracto etanólico de los tallos de *Cassia alata* contra *Staphylococcus aureus*”. El objetivo de dicha investigación fue determinar si los tallos de la planta presentaban actividad contra *S. aureus*, para esta investigación se utilizó un método de extracción asistido por ultrasonido, obteniendo concentraciones del extracto del 25 %, 50 %, 75 % y 100 %, los halos de inhibición para dichas concentraciones fueron de 17,6 mm, 21 mm, 22,6 mm y 25 mm para la concentración de 100 % respectivamente. Los resultados revelaron que a mayor concentración del extracto mayor es su actividad antibacteriana; también concluyeron que la extracción asistida por ultrasonido es más efectiva que las extracciones convencionales para la obtención de metabolitos secundarios, ya que utilizando la extracción por maceración se obtuvo 0,42 % para flavonoides, por otro lado, con la extracción asistida por ultrasonido el nivel de flavonoides fue de 0,75 %. Los investigadores también concluyeron que el extracto de las hojas de *Cassia alata* es menos efectivo contra *S. aureus* que el extracto de los tallos, ya que los halos de inhibición del extracto de las hojas fueron de 5 mm, 7,2 mm, 7,6 mm y 12,2 mm respectivamente.

Eusebio y cols (2020) realizaron un trabajo de investigación en la revista Advance online publication que se tituló “Decocción de las hojas de *Cassia alata* para el tratamiento de la tiña imbricata en una tribu indígena del sur de filipinas”. El objetivo de la investigación consistió en determinar la eficacia de la decocción de hojas de *Cassia alata* preparada en la comunidad para el tratamiento de la tiña imbricata. Para esta determinación se instruyó a los pacientes que se aplicaran la decocción de hojas

de *C. alata* durante 4 semanas. Antes y después del tratamiento se evaluó la gravedad de la enfermedad a través de las puntuaciones de la escala analógica visual (VAS) y las cantidades de hidróxido de potasio (KOH) de los raspados de piel. Dos asesores evaluaron la gravedad de la enfermedad en base a fotografías. Después de 4 semanas, el 95 % había disminuido las puntuaciones VAS de prurito. Hubo una diferencia significativa en las puntuaciones de gravedad de la enfermedad antes y después del tratamiento. Este es el primer estudio que mostró el potencial de una decocción de hojas preparada por la comunidad como una opción de tratamiento para la tiña imbricata.

En el 2019, Carpio y Ambida publicaron en la revista Advance Pharmaceutical Journal una investigación titulada “Actividad antibacteriana de los extractos crudos de las raíces y cortezas de *Cassia alata* Linn”. Su objetivo fue estudiar la actividad antibacteriana de las raíces y las cortezas de la planta frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Para esta investigación se usaron 250 gramos de raíces y 300 de corteza, como control positivo se usaron antibióticos comerciales como cloranfenicol y tetraciclina, la actividad antibacteriana del extracto crudo se realizó utilizando discos de papel filtro empapados con el mismo en placas cultivadas con *S. aureus* y *E. coli*, se procedió a incubar por 24 horas a temperatura ambiente. Los resultados revelaron que los extractos crudos de raíz y corteza de *C. alata* Linn, tienen actividad antibacteriana contra los microorganismos de la prueba según lo indicado por las zonas de inhibición alrededor de los discos de papel filtro, el extracto crudo de raíz tuvo una zona de inhibición promedio de 9 mm en *S. aureus* y 9 mm en *E. coli*; por otro lado el extracto crudo de la corteza tuvo una zona de inhibición de 7,3 mm en *S. aureus* y 12,3 mm en *E.coli* siendo así más efectivo que el extracto de las raíces.

Asimismo, Le (2019) realizó una investigación científica publicada por la revista Bulgarian Chemical Communications, titulada “Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de los extractos de hojas y semillas de *Cassia alata* L.”. Su objetivo fue determinar la presencia de algunos compuestos bioactivos de los extractos etanólicos de hojas y semillas de la planta; como taninos, saponinas, antraquinonas y flavonoides.

La actividad antibacteriana fue determinada la técnica de concentración inhibitoria mínima (CIM). En este estudio se llegó a la conclusión de que los extractos de las hojas inhiben el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* a una CIM de 400 mg/mL; *S. enteritidis* y *B. subtilis* a una CIM de 800 mg/mL. Además, el extracto etanólico de semillas también inhibe *S. aureus* a una CMI de 200 mg/mL, en cambio para *E. coli*, *S. enteritidis* y *B. subtilis* presento una CIM de 400 mg/mL, respectivamente.

Antecedentes Históricos de la Investigación

A lo largo de la historia, diferentes culturas han creado un conocimiento de remedios vegetales que han constituido la base de la medicina moderna, existen evidencias del uso de plantas medicinales a través de los siglos, estos usos han quedado documentados en libros como la biblia, el papiro de Ebers (escrito por los egipcios) que describe unas 200 plantas medicinales y sus aplicaciones (Domínguez, 1979).

El Códice Florentino en el siglo XVI menciona con respecto a la *Cassia alata*, (aún no había sido clasificada) que las hojas y las raíces molidas en agua eran de utilidad para los apostemas. En el mismo siglo, Francisco Hernández comenta que las hojas o raíces machacadas y untadas curan las rozaduras. Para el siglo XX, Maximino Martínez la reporta como antipirético, antisifilítico, catártico, contra dermatosis, diaforético, diurético y para curar enfermedades venéreas (Estrada, 1989).

Los primeros trabajos importantes sobre este género fueron realizados por Colladon, quién en 1816 publicó el “Histoire Médicale et Systématique des Casses”, en el cual hizo gran énfasis en la utilización farmacéutica de la esta especie. En 1837, doce años más tarde Vogel, efectúa un trabajo sobre este género al realizar el estudio de las Leguminosas del Brasil, en él enumera 278 especies, de las cuales serían confirmadas posteriormente 200 de ellas (Bravo, 1977).

En el año 1871, George Bentham hace una revisión del género, donde pudo identificar y describir 338 especies, con posterioridad a la revisión del género realizada por G. Bentham, y hasta nuestros días, se han publicado varios trabajos por diversos

autores y para distintos países; estos autores consideran que el número de especies actualmente consideradas es de aproximadamente 600, con un elevado número y gran distribución en Brasil (Bravo, 1977).

En 1995 se publicó en la revista *Journal of Ethnopharmacology* una de las primeras investigaciones sobre las propiedades y características de la *C. alata*, en la cual evaluaron actividad antimicrobiana del extracto crudo de *Cassia alata* en distintos microorganismos patógenos que pueden causar enfermedades de la piel en humanos. Los resultados del presente trabajo indicaron que, existen propiedades antifúngicas en el extracto crudo de etanol de hojas de *Cassia alata* y que dicha actividad puede deberse a la presencia de crisofanol en las hojas (Ibrahim y Osman 1995).

En la misma revista anteriormente mencionada, en el año 2003, se publicó un estudio denominado “Actividad antimicrobiana de los extractos acuosos y etanólicos de *Cassia alata*”, donde se estudiaron los extractos etanólicos y acuosos de las hojas y corteza de *C. alata* sobre hongos (*Aspergillus fumigatus* y *Microsporum canis*), levaduras (*C. albicans*) y bacterias (*Staphylococcus aureus* y *E. coli*) la prueba *in vitro* sobre la actividad antibacteriana reveló que los extractos de etanólicos y acuosos de hojas de *C. alata* inhibieron el crecimiento de *S. aureus*, mientras que la *E.coli* no fue inhibida por ninguno de los extractos. Se concluyó entonces que dicha planta posee actividad antimicrobiana (Somchit, Reezal, Nur y Mutalim, 2003).

Bases Teóricas

Familia Fabaceae

Aspectos Botánicos

Es una familia con abundantes e importantes especies, es la tercera familia más grande de las angiospermas después de Orchidaceae y Asteraceae, y la segunda después de las Poaceae (gramíneas). Su característica principal, y por la cual se reconoce fácilmente, es su fruto en legumbre, también por poseer hojas alternas, compuestas, con estípulas y generalmente pulvinuladas (Rodríguez y Gámez, 2010).

Distribución Geográfica

Presentan una amplia distribución mundial, ya que es cosmopolita; a nivel mundial se han reportado 730 géneros y 19.400 especies. En Venezuela, la familia comprende alrededor de 151 géneros y 993 especies, incluyendo nueve endémicas, ampliamente distribuidas en todas las zonas de vida, siendo la más abundante la Faboideae con 489 especies, seguida por las Caesalpinoideae y Mimosoideae con 278 y 229 especies respectivamente. En la ciudad de Mérida existe una gran variedad de leguminosas arbóreas, de importancia ecológica, medicinal, alimenticia y ornamental, siendo estas comunes en parques, avenidas, plazas y áreas boscosas (Rodríguez y Gámez, 2010).

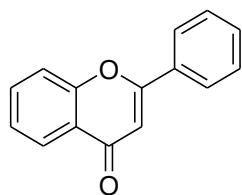
Clasificación Taxonómica de la Familia

Taxonómicamente la familia Fabaceae o Leguminosae pertenece al reino Plantae, se divide en 3 subfamilias: Faboideae Rudd, Caesalpinioideae DC y Mimosoideae DC (Rodríguez y Gámez, 2010).

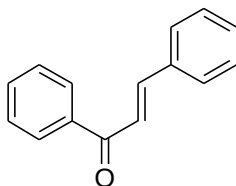
Metabolitos Secundarios aislados de la Familia Fabaceae

Los estudios fitoquímicos relacionados con esta familia de plantas revelan el contenido de saponinas, triterpenos y diferentes tipos de flavonoides (Figura 1) incluyendo flavononas (1), chalconas (2) e isoflavonas (3) (Reyes y Castro, 2017).

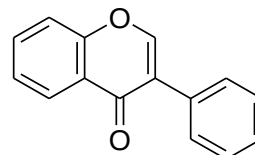
Figura 1. Estructura química de los metabolitos secundarios aislados de la familia Fabaceae.



Flavononas **(1)**



Chalconas **(2)**



Isoflavonas **(3)**

Tomado y modificado de Reyes y Castro, 2017.

Usos Etnobotánicos

Las plantas de esta familia se conocen por ser comestibles tanto por animales domésticos como por humanos. Desde el punto de vista de la alimentación humana, lo más importante son las semillas, tomadas directamente como alimento. Las leguminosas contribuyen a la seguridad alimentaria, a la nutrición, a combatir el cambio climático y a favorecer la biodiversidad. Muchas de ellas han sido cultivadas como ornamentales, otras como plantas forrajeras y otras por sus semillas o legumbres comestibles o porque de ellas se extraen aceites, tinturas o principios activos medicinales (Llamas y Acedo, 2018).

Actividad Farmacológica

Entre la actividad farmacológica descrita para las distintas especies de las Fabaceae se destacan el tratamiento de la ictericia, el control de procesos febriles, su empleo en procesos inflamatorios de distinta etiología y el tratamiento del cáncer (Gómez y cols., 2015).

Subfamilia Caesalpinioideae

Aspectos Botánicos

Árboles, a veces con raíces tabulares, arbustos, o hierbas, anuales o perennes, menos frecuentemente lianas. Hojas alternas, pecioladas, bipinnadas. Flores zigomorfas, generalmente bisexuales. Legumbres alargadas, rectas o encorvadas. Semillas numerosas, con o sin endosperma mucilaginoso (Ulibarri, 2008). Se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera (Tabla 1):

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de la Subfamilia Caesalpinioideae.	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Subfamilia:	Caesalpinioideae

Tomado y modificado de Ulibarri, 2008.

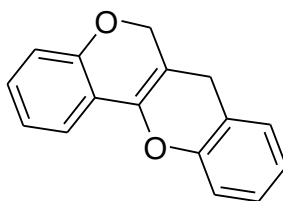
Distribución Geográfica

Las Caesalpinioideae son un grupo predominantemente tropical de 160 géneros con 2000 especies. El mayor número de géneros se encuentra en África tropical y América tropical. En Malasia hay 25 géneros autóctonos, que contienen 200 especies nativas y más de 30 cultivadas, introducidas o naturalizadas. Además, también hay al menos ocho géneros comúnmente introducidos y ampliamente cultivados con doce especies (Hou, Larsen y Larsen, 2000).

Metabolitos Secundarios Aislados de la Subfamilia

Diversos estudios han demostrado la presencia de flavonoides en esta subfamilia, principalmente isoflavonoides en sentido amplio, los flavonoides prenilados y los 5-desoxiflavonoides. Ejemplos de su ocurrencia en Caesalpinioideae son el isoflavonoide pterocarpano de las hojas de *Cassia torosa* (ver figura 2) (Kitakana y Takido, 1991).

Figura 2. Estructura química del isoflavonoide (pterocarpano) presente en la Subfamilia Caesalpinioideae.

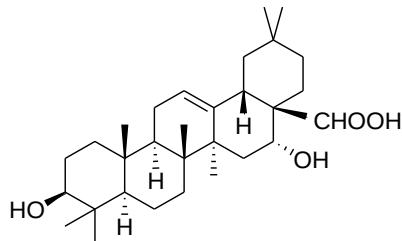
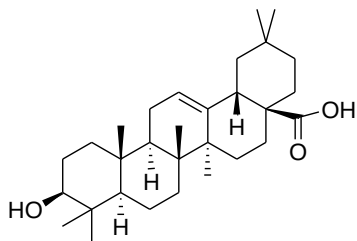


Pterocarpano (4)

Tomado y modificado de Kitakana y Takido, 1991.

También se ha estudiado la presencia de taninos en raíces, tallos y frutos de plantas leñosas de regiones subtropicales, Caesalpiniaceae produce materiales tánicos en los frutos secos de algunas especies de *Caesalpinia* sudamericanas e indias, la evidencia disponible sugiere que los ácidos triterpénicos de tipo oleaneno (Figura 3) son las principales sapogeninas en Caesalpiniaceae: ácido oleanólico (5) y ácido equinocístico (6) (Hou, Larsen y Larsen, 1996).

Figura 3. Ácidos triterpénicos presentes en la subfamilia Caesalpinioideae.



Ácido oleanólico (5)

Ácido equinocístico (6)

Tomado y modificado de Hou, Larsen y Larsen, 1996.

Usos Etnobotánicos

La subfamilia Caesalpinioideae ha desempeñado un papel importante en la herbolaria y la medicina popular como purgante y laxante debido a sus ingredientes activos, además, es parte de remedios herbales y tónicos (Pansa, 2011).

Según el Ayurveda, las hojas y las semillas de algunas especies de la subfamilia Caesalpinioideae son laxantes, antihelmíntico, oftálmico, tónico hepático, cardiotónico y expectorante, también son útiles en lepra, tiña, flatulencia, cólico, dispepsia, estreñimiento, tos, bronquitis y trastornos cardíacos (Deodor, Khadabadi, Kamdi e Ingle, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Actividad farmacológica

Los estudios farmacológicos realizados con las especies probaron las actividades antiulcerogénicas (Bacchi y cols., 1995; Gonzalez, 2005), antiinflamatorio, analgésico (Carvalho y cols., 1996), antibacteriano, antifúngico (Ximenes, 2004), antioxidante (Gonzalez, 2005), antimicrobiano (Farias, 2013; Magalhaes y cols., 2015), hepatoprotector (Hassan y cols., 2015), hipoglucemiante (Vasconcelos y cols., 2011), además de tener efectos cardiovasculares (Menezes y cols., 2007) y viricida contra Herpesvirus y Poliovirus (Lopes y cols., 2013).

Género Cassia

Aspectos Botánicos

El género *Cassia*, con 600 especies aproximadamente, es el más grande de la subfamilia Caesalpinoideae y está distribuido en los trópicos y subtrópicos. El género representa una gran diversidad de formas de vida: árboles, arbustos y hierbas perennes. En general, la flor es de pétalos amarillos. Carece de olor perceptible y presenta asimetría (Delgado y Sousa, 2016). Se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera (Tabla 2):

Tabla 2. Clasificación Taxonomía del género <i>Cassia</i>	
Reino:	Plantae
Clase:	Equisetopsida C. Agard
Subclase:	Magnoliidae
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Género:	<i>Cassia</i> L.

Tomado y modificado de trópicos.org.

Distribución Geográfica

El género *Cassia* L (Tabla 2) posee representantes en casi todos los continentes con clima tropical, subtropical y templado. Es un género de amplia distribución en los trópicos, en los pastizales y alrededor de pueblos y aldeas en África occidental (Bravo, 1977).

Metabolitos Secundarios Aislados del Género *Cassia*

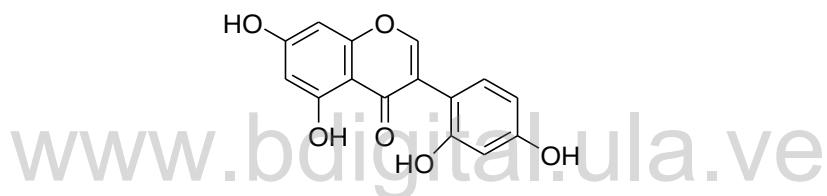
El tamizaje fitoquímico de algunas especies del género *Cassia* como la *Cassia uniflora* Mill ha demostrado la existencia de varias familias de metabolitos secundarios de interés biológico y farmacológico como: flavonoides, antocianinas, fenoles, taninos,

terpenos, esteroides, quinonas y cumarinas (Morales, Fonseca, Almeida, Morales y Torres, 2011).

Entre los compuestos que se han aislado de plantas de este género destacan (Figura 4), flavonas como la 2,5,7,4'-tetrahidroxi isoflavona (**7**); también se han identificado compuestos flavonoides (Fatmawati, Purnomo y Bakar, 2020).

Los compuestos polifenólicos de algunas especies de *Cassia* muestran actividad antihelmíntica (Figura 5), entre ellos: niclosamida (**8**), oxiclozanida (**9**) y bitionol (**10**) estos interfieren con la generación de energía en parásitos helmintos (Deodor y cols., 2009).

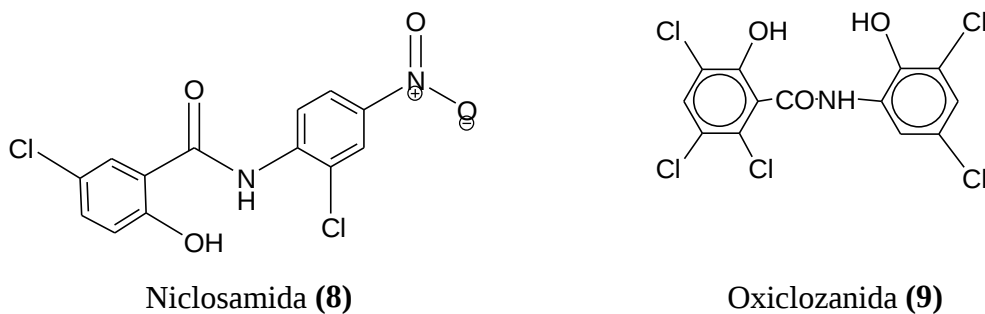
Figura 4. Metabolitos secundarios aislados del Género *Cassia*.

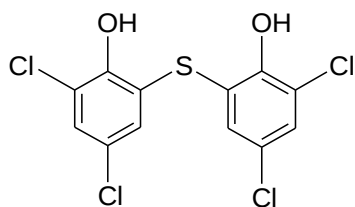


2,5,7,4'-tetrahidroxi isoflavona (**7**)

Tomado y modificado de Fatmawati, Purnomo y Bakar, 2020.

Figura 5. Compuestos polifenólicos de algunas especies de *Cassia*.





Bitionol (10)

Tomado y modificado de Fatmawati, Purnomo y Bakar, 2020.

Usos Etnobotánicos

Este género es utilizado por lo general de forma local, las personas suelen usar estas plantas para leña, fabricación de escobas y techos naturales, muchas especies son cultivadas como plantas ornamentales, algunas menciones populares indican que algunas especies se utilizan para tinturas (Bravo, 1977).

Las cortezas y las raíces de *C. occidentalis* fueron empleadas por los guaraníes contra la malaria, empleándose todavía como antipirético en Paraguay y otras zonas tropicales (Lythgoe, 1972).

Estudios etnobotánicos realizados en Cuba, reconocen a varias especies del género *Cassia* como plantas que poseen interés por sus propiedades medicinales y se reportan empleos tradicionales como antihipertensivos, antiinflamatorios, antiinfecciosos, diuréticos, antitumorales, antianémicos, antimicrobianos, antiherpéticos, anticatarrales, analgésicos, contra afecciones cutáneas, para el tratamiento de trastornos estomacales, espasmos, cólicos nefríticos y cálculos renales (Morales, Fonseca, Almeida, Morales y Torres, 2011).

Actividad Farmacológica

Se reporta como la acción más reconocida de las quinonas detectadas en las plantas del género *Cassia* la de laxante. También se han reconocido los efectos beneficiosos de las hojas de estas plantas en el tratamiento antiparasitario y contra infecciones cutáneas de origen bacteriano y fúngico. Las cumarinas aisladas en el género tienen

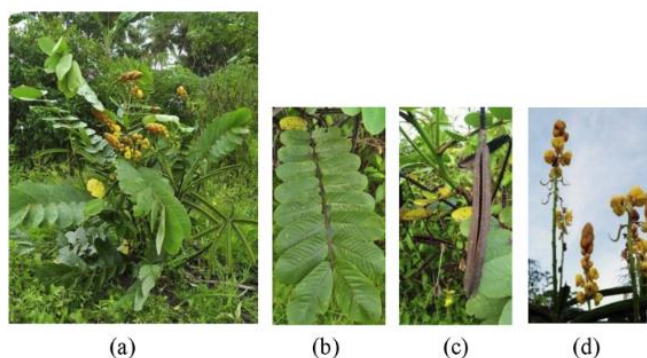
efectos anticoagulantes y actividad vasodilatadora, además, se han reportado propiedades antiespasmódicas, antiparasitarias e insecticidas (Morales y cols., 2011). Un estudio comprobó acción antimicrobiana de *Cassia grandis* sobre: *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis* (Quesada y cols., 2016).

Especie Cassia alata L.

Aspectos Botánicos

La especie *Cassia alata* es conocida comúnmente como *Senna* salvaje, *Cassia* de tiña, arbusto de vela en inglés y asuwun en idioma yoruba. Crece de 6 a 12 pies y se puede identificar por sus picos cerosos erectos que se asemejan a una vela antes de que se abran los senos individuales. Las hojas grandes, simétricas bilaterales, opuestas y se pliegan juntas por la noche. El fruto es vaina, mientras que las semillas son pequeñas y cuadradas (Figura 6) (Faruq, Hassan y Adebote, 2003).

Figura 6. Partes de la planta *Cassia alata* L.



(a) Planta *Cassia alata*, (b) hojas, (c) fruto, (d) flores

Tomado y modificado de Fatmawati, Purnomo y Bakar, 2020.

Esta planta se encuentra en la vegetación secundaria a lo largo de las riberas de los ríos y crece rápidamente (Faruq, Hassan y Adebote, 2003). Se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera (Tabla 3):

Tabla 3. Clasificación Taxonomía de la especie <i>Cassia alata</i>	
Reino:	Plantae
Clase:	Equisetopsida C. Agard
Subclase:	Magnoliidae
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Género:	<i>Cassia</i> L.
Especie:	<i>Cassia alata</i> L.

Tomado y modificado por trópicos.org.

www.bdigital.ula.ve

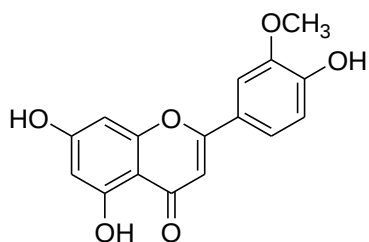
Distribución Geográfica

Cassia alata es un arbusto originario del sudeste asiático, el norte de Australia, América Latina, Fiya y África y se puede encontrar muy extendido en las regiones tropicales, cultivándose con fines medicinales (Faruq, Hassan y Adebote, 2003).

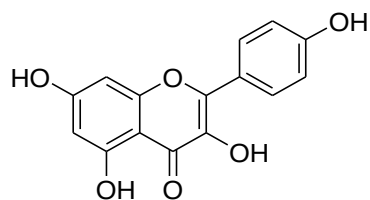
Metabolitos Secundarios Aislados en *Cassia alata* L.

Esta planta presenta dentro de sus principales metabolitos secundarios (Figura 7) varios flavonoides como crisoeriol (11), kaempferol (12), quercetina (13), 5,7,4'-trihidroflavanona (14), kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosido (15), algunos hidrocarburos saturados como tetratriacontano (16), *n*-dotriacontanol (17), *n*-triacontanol (18), además de los ácidos palmítico (19) esteárico (20) (Gupta y Singh, 1991; Liu, Xu, Zou y Yang, 2009).

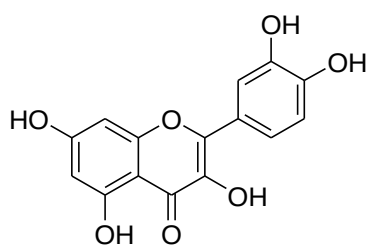
Figura 7. Metabolitos secundarios presentes en *Cassia alata*.



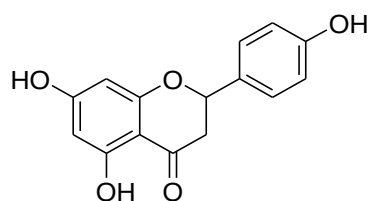
Crisoeriol (11)



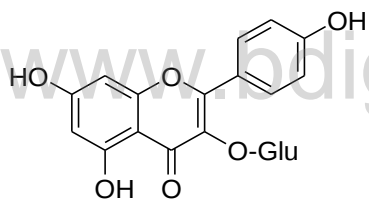
Kaempferol (12)



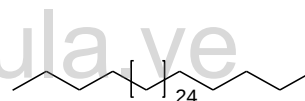
Quercetina (13)



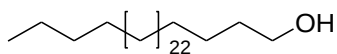
5,7,4'-trihidroflavanona (14)



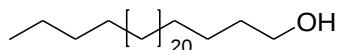
kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosido (15)



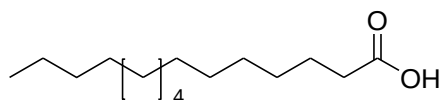
Tetratriacontano (16)



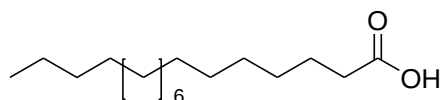
***n*-dotriacontanol (17)**



***n*-triacontanol (18)**



Ácido palmítico (19)



Ácido esteárico (20)

Tomado y modificado de Liu, Xu, Zou y Yang, 2009.

Usos Etnobotánicos

Tiene aplicaciones muy importantes en la medicina popular, en Ghana y Costa de Marfil, las decocciones de las hojas y las raíces se usan para tratar la diarrea, la disentería y otros problemas gastrointestinales. Informes recientes han acreditado el uso de *C. alata* en el tratamiento exitoso de hemorroides, estreñimiento, hernia inguinal, parasitosis intestinal, blenorragia, sífilis y diabetes (Makinde y cols., 2007). En la parte norte de Nigeria, los practicantes de hierbas medicinales utilizan las raíces, los tallos y las hojas para tratar quemaduras, infecciones de la piel y de las heridas, enfermedades diarreicas, infecciones gastrointestinales y del tracto respiratorio superior. Informes anteriores en la literatura científica indicaron que algunas hojas y raíces de *C. alata* se pueden usar como remedio para forúnculos, heridas, infecciones del tracto urinario y gastrointestinal, diarrea y escarlatina (El-Mahmood y Doughari, 2008).

Actividad Farmacológica

La especie *Cassia alata* ha sido estudiada ampliamente para determinar la función farmacológica de sus metabolitos secundarios. Un estudio demostró que los extractos de metanol, etanol, agua y cloroformo son activos contra varias especies bacterianas como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *Shigella boydii* y *Pseudomonas aeruginosa* (Mahida y Mohan, 2006).

También se ha comprobado la actividad de los metabolitos secundarios de *C. alata* sobre dos importantes patógenos formadores de biopelículas (*Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*) donde se concluyó que la actividad de la especie en estudio está estrechamente relacionada con la inhibición del crecimiento bacteriano (Saito, Trentin, Macedo, Pungartnik y Gosmann, 2012).

Se han estudiado los extractos de hojas y raíces de *Cassia alata* por su actividad antibacteriana contra *Neisseria gonorrhoeae*, se concluyó que los extractos de raíces son más potentes que los de hojas, independientemente del disolvente utilizado para la extracción; también ha sido estudiada su actividad sobre; bacterias, hongos y amebas.

Las bacterias específicas contra las cuales se han encontrado actividad en las hojas son: *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp y *Escherichia coli* (Otto, Ameso y Onegi, 2015).

Productos Naturales

A toda la diversidad de compuestos que el hombre extrae de un vegetal y aprovecha o intenta darle alguna utilización los denominamos productos naturales vegetales, el término se refiere generalmente a los metabolitos secundarios, con real o potencial utilidad para el hombre y/o para la adaptación de la planta al medio ambiente. En este sentido, dichos metabolitos pueden clasificarse en metabolitos primarios y secundarios (Ringuelet y Viña, 2013).

Metabolitos primarios

Los metabolitos primarios serían todos aquellos que son esenciales para el funcionamiento de toda materia viva, responsables de su estructura y de todas las reacciones necesarias para mantener el estado vital y posibilitar el crecimiento, el desarrollo y la reproducción, comprenden los glúcidos o hidratos de carbono, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos (Ringuelet y Viña, 2013).

Metabolitos secundarios

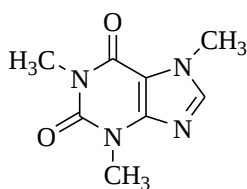
Los metabolitos secundarios cumplen funciones que no resultan estrictamente vitales en los tejidos y representan en ocasiones compuestos de desecho del metabolismo. No están, en general, directamente involucrados con el crecimiento y desarrollo, ni participan en procesos como la obtención de energía. Muchos de ellos son aprovechados por la planta que los sintetiza para interactuar con el medio, ya sea para atraer polinizadores, repeler predadores, impedir la competencia con otras plantas,

adaptarse a condiciones adversas de suelo o clima (Ringuelet y Viña, 2013). Los grandes grupos de metabolitos secundarios a tratar serán:

Alcaloides

Estructuralmente contienen uno o varios átomos de nitrógeno en su molécula, a menudo formando parte de un anillo heterocíclico (Figura 8), son derivados biosintéticamente de aminoácidos, de actividad farmacológica significativa. Su peso molecular oscila entre 100 y 900. (Ringuelet y Viña, 2013).

Figura 8. Estructura general de los alcaloides



(21)

Tomado y modificado de Ringuelet y Viña, 2013.

Ruta Biosintética de los Alcaloides

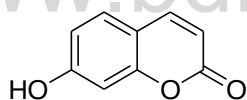
Las rutas biosintéticas son diversas y los precursores que utilizan las plantas son los aminoácidos: L-ornitina, L-arginina, L-lisina, histidina, L-fenilalanina, L-triptófano o L-tirosina. En general la estructura carbonada del aminoácido es mantenida intacta en la estructura del alcaloide, mientras que el carbono del ácido carboxílico sufre descarboxilación. En algunos casos la molécula requiere carbonos suplementarios, y éstos pueden ser proporcionados por grupos acetatos, es decir que, el resto de la

molécula deriva de otras vías como: la vía del acetato, la vía del ácido shikímico o la vía del ácido mevalónico (Bruneton, 2001).

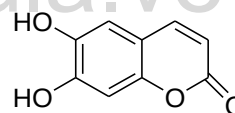
Cumarinas e Hidroxicumarinas

Son un grupo de compuestos fenólicos simples, presentan el esqueleto básico fenilpropanoide. Algunos ejemplos que pueden mencionarse (Figura 9) incluyen a la cumarina, la umbeliferona (7-hidroxicumarina) (22), la esculetina (6,7-dihidroxicumarina) (23) y la escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicumarina) (24) (Ringuelet y Viña, 2013).

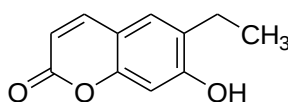
Figura 9. Estructura química de las lactonas fenilpropanoides.



Umbeliferona (22)



Esculetina (23)



Escopoletina (24)

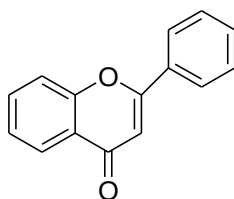
Tomado y modificado de Ringuelet y Viña, 2013.

Flavonoides

Los flavonoides son un grupo muy diverso de compuestos fenólicos, de los cuales se conocen más de 6.000 estructuras diferentes. El esqueleto común a todos los integrantes del grupo consta de dos anillos de seis átomos de carbono unidos mediante un puente de tres átomos de carbono que forma un tercer ciclo (Figura 10). Son

compuestos que presentan afinidad con el agua, se acumulan en las vacuolas celulares y otorgan una variedad de colores, comprendidos desde el rojo carmesí al azul y violeta, rosado, blanco y amarillo (Ringuelet y Viña, 2013).

Figura 10. Estructura general de los compuestos flavonoides



(25)

Tomado y modificado de Ringuelet y Viña, 2013

Estilbenos

Se trata de un grupo de compuestos estrechamente relacionados con los flavonoides, por compartir precursores en común durante su proceso de biosíntesis e incluso por presentar ciertas propiedades similares (Bowsher, Steer y Tobin, 2008). La estructura de los estilbenos está representada por dos anillos fenilo unidos entre sí mediante un puente de dos átomos de carbono (puente eteno). Se encuentran en un grupo relativamente pequeño de especies y muestran una diversidad interesante de actividades biológicas. Particularmente, se los ha mencionado como sustancias con efectivas propiedades antifúngicas (Ringuelet y Viña, 2013).

Ligninas

Se trata de un polímero complejo, heterogéneo, formado mayoritariamente por derivados fenilpropanoides que corresponden a los llamados monolignoles. La diferencia estructural entre estos compuestos radica en la cantidad y posición de los grupos metoxilo unidos al anillo fenilo (Bowsher, Steer y Tobin, 2008).

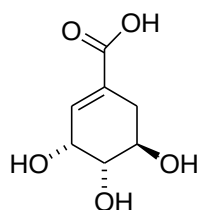
Taninos

Los taninos se caracterizan por ser compuestos solubles en agua. Son químicamente reactivos y fácilmente oxidables, ya sea por acción de enzimas vegetales específicas o por efecto de metales. La actividad biológica de los taninos se correlaciona con su capacidad de unirse a las proteínas y combinarse con enzimas, sus propiedades antimicrobianas han sido ampliamente reconocidas y avalan algunos usos en medicina popular de plantas ricas en estos compuestos (Heldt, 2005).

Rutas Biosintéticas de los Fenoles

Los compuestos fenólicos, se originan a partir de las siguientes vías metabólicas secundarias: a) Directamente a partir del ácido shikímico (Figura 11), que es considerado el precursor común de todo el grupo (Ringuelet y Viña, 2013).

Figura 11. Estructura química del ácido shikímico

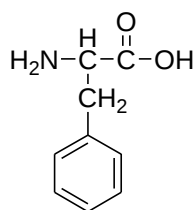


Ácido shikímico (26)

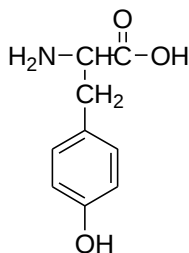
Tomado y modificado de Ringuelet y Viña, 2013

b) A partir de los aminoácidos aromáticos como: fenilalanina (27), tirosina (28) y triptófano (29) (Figura 12). La fenilalanina en particular (y en algunos casos la tirosina) actúa como precursor de algunos grupos de compuestos fenólicos. Es la denominada vía fenilpropanoide (Ringuelet y Viña, 2013).

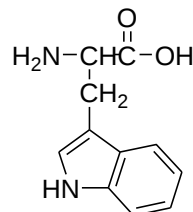
Figura 12. Estructura química de los aminoácidos aromáticos.



Fenilalanina (27)



Tirosina (28)



Triptofano (29)

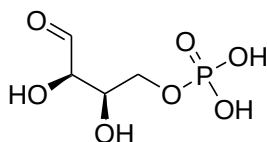
Tomado y modificado de Ringuelet y Viña, 2013.

c) A partir de una vía combinada, donde participan compuestos fenilpropanoides por un lado y por otro el malonato (anión del ácido malónico), bajo la forma de malonilCoA. Esta es la denominada vía fenilpropanoide-malonato (Ringuelet y Viña, 2013).

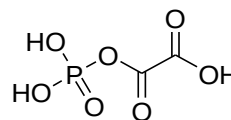
Ruta del Ácido Shikímico

Es considerada la ruta precursora común de todo el grupo, los sustratos iniciales para la síntesis de ácido shikímico provienen de las vías de degradación de glúcidos. Los compuestos de partida son la eritrosa fosfato (30), proveniente de la ruta oxidativa de las pentosas fosfato, y el fosfoenolpiruvato (31), compuesto intermediario de la glucólisis (Figura 13) (Ringuelet y Viña, 2013).

Figura 13. Estructura química de los compuestos precursores del ácido shikímico



Eritrosa fosfato (30)



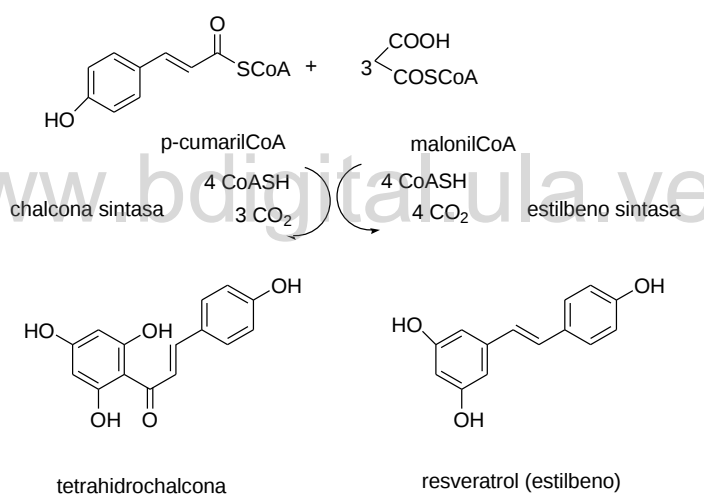
Fosfoenolpiruvato (31)

Tomado y modificado de Ringuelet y Viña, 2013.

Vía fenilpropanoide-malonato

Otra de las vías metabólicas que dan origen a parte de los compuestos fenólicos es la denominada vía fenilpropanoide-malonato. Las clases de compuestos fenólicos originados a través de esta ruta son fundamentalmente los flavonoides y estilbenos (Figura 14) (Ringuelet y Viña, 2013).

Figura 14. Biosíntesis de Flavonoides y Estilbenos.



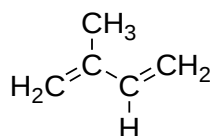
Elaborado por Uzcátegui, 2022.

Terpenoides

Un gran número de sustancias vegetales están incluidas en este grupo de metabolitos secundarios, son liposolubles, y biosintéticamente asociados a la vía del ácido mevalónico o a la vía gliceraldehído fosfato - ácido pirúvico, es quizás el grupo más numeroso, y tienen como unidad estructural básica a la molécula de isopreno (Figura 15) (Ringuelet y Viña, 2013). Sus esqueletos carbonados se forman por la unión de dos o más de estas unidades de 5 C, de ahí que también se los denomina

isoprenoides. Son extraídos de los tejidos de las plantas con éter o cloroformo (Ringuelet y Viña, 2013).

Figura 15. Unidad estructural del isopreno.



www.bdigital.ula.ve

Isopreno (32)

Elaborado por Uzcátegui, 2022.

Ruta biosintética de los terpenos

La biosíntesis de los terpenoides está compartimentalizada, los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos son producidos en compartimentos citosólicos y en el retículo endoplasmático, mientras que el isopreno, monoterpenos, diterpenos y tetraterpenos se sintetizan en los plástidos (Croteau, Kutchan, y Lewis, 2000).

Las vías biosintéticas para la síntesis de los terpenos difieren mucho en esos compartimentos: la clásica vía del ácido mevalónico en el citosol y retículo endoplasmático, y la vía del gliceraldehído fosfato y piruvato en los plástidos.

Extractos Vegetales

El proceso de extracción consiste en incorporar las sustancias activas de una planta a un solvente, que generalmente suele ser agua o alcohol. Se puede realizar en frío o en caliente, y el producto resultante puede ser una solución concentrada o espesa en función de la sustancia de origen (Albornoz, 1980).

En la extracción y purificación de compuestos orgánicos mediante el empleo de solventes, suelen seguir ciertas reglas basadas en las analogías estructurales existentes entre la sustancia a extraer y el disolvente que se empleará para tal fin. De este modo, para la extracción de glúcidos, lípidos, alcaloides, pigmentos, etc., a partir de los tejidos vegetales o animales que los contienen (o de los líquidos orgánicos provenientes de ellos) se emplearán disolventes cuya estructura sea semejante o afín a la de las sustancias que se quieren extraer. La polaridad de los compuestos es otro elemento a tener en cuenta al considerar la solubilidad de un soluto en un solvente dado. Es así que los solventes fuertemente polares disuelven solutos altamente polares, mientras que los solventes poco polares disuelven los solutos de baja polaridad (Ringuelet y Viña, 2012).

Métodos de Extracción

Los métodos de extracción implican el tratamiento del material vegetal con el disolvente adecuado, que solubilice dentro de lo posible, únicamente el principio activo deseado. El proceso de extracción se puede realizar de forma discontinua en frío como la maceración, semicontinuo en caliente por medio de la destilación de arrastre por vapor, de forma continua por medio del soxhlet, entre otros (Oliva, 2012).

Extracción por Reflujo

Es una técnica para extraer y preservar los compuestos esenciales en las especies vegetales, durante el reflujo, la evaporización de la mezcla que se hierve es seguida por la condensación de estos vapores sobre las paredes interiores de un condensador, éste

se refrigera con el agua que fluye por una camisa envolvente a su alrededor (Canales, Carazo y Centeno, 2011).

Extracción por Maceración

Este es un método de extracción sólido-líquido donde el material vegetal que se pretende extraer contiene compuestos solubles en el líquido de extracción. Para realizar este proceso el material vegetal se corta en pequeños trozos o molido, fresco o seco se coloca en recipientes adecuados, añadiendo el solvente seleccionado por polaridad: hexano (o éter de petróleo), cloroformo y finalmente metanol o etanol en reposo o en un equipo con agitación continua, a temperatura ambiente durante 5 días cada extracción (Bonatti, 1991).

Percolación

La percolación es el flujo del agua o de otro líquido a través de los poros o intersticios de una capa permeable, pudiendo o no llenar el líquido los poros de los materiales granulosos más o menos finos, que rellenan el medio filtrante (Torres, Vega y Garibaldi, 2006).

Extracción Continua (Soxhlet)

El método clásico para obtener distintos constituyentes orgánicos de tejidos vegetales secos (madera, semillas, raíces, hojas) es una extracción continua del material pulverizado en un equipo Soxhlet (Figura 16) con distintos solventes que permiten extraer las sustancias buscadas con un mayor o menor grado de pureza. El material vegetal (seleccionado y pulverizado) es agotado en primer lugar con un solvente de tipo no polar o de polaridad intermedia: éter de petróleo, benceno, cloroformo, éter etílico, etc. Luego la muestra es tratada con distintos alcoholes como etanol, metanol (solventes de tipo polar) y finalmente con agua (Ringuelet y Viña, 2012).

Para la extracción del material vegetal se puede dividir en: Parte aérea (flores, fruto, semillas, hojas, tallos) y raíz, el estudio fitoquímico puede ser de la planta completa o una de sus partes para un análisis específico (Ringuelet y Viña, 2013).

Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico consiste en la obtención de extractos de plantas con solventes apropiados, tales como agua, acetona, alcohol, cloroformo y éter. Otro solvente, el diclorometano, se usa específicamente para la extracción de terpenoides (Sharapin, 2000).

Posterior a la extracción, se llevan a cabo reacciones de coloración, las cuales son reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Algunas de las reacciones evalúan grupos de sustancias y otros la presencia de otros compuestos como ácidos grasos, azúcares reductores, polisacáridos y mucílagos (Sharapin, 2000). Dentro de las principales pruebas químicas para la identificación de metabolitos secundarios están:

Ensayo de Sudán

Es un método utilizado generalmente para demostrar la presencia de grasas mediante tinción de triglicéridos, aunque también tiñe otros lípidos. Perteneció al grupo de colorantes indiferentes, que son aquellos que no tienen afinidad por estructuras ácidas o básicas, se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos, respectivamente (Pereira, Vega, Almeida y Morales, 2009).

Ensayo de Dragendorff

Permite conocer en el extracto acuoso alcohólico y diclorometánico la presencia de alcaloides, con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, agregando 3 gotas del reactivo de Dragendorff. Se considera (+) cuando se presenta opalescencia, (++) cuando presenta turbidez definida y (+++) cuando presenta precipitado (Marcano y Hasegawa, 2002).

Ensayo de Mayer y Wagner

Sirve para identificar alcaloides, se procede de la forma descrita para el ensayo de Dragendorff, hasta obtener la solución ácida. Si al añadir 2 o 3 gotas de la solución reactiva de Mayer o Wagner respectivamente, se observa opalescencia, turbidez definida, precipitado coposo, entonces se considera positiva la presencia de este tipo de metabolito. En el caso de alcaloides cuaternarios y/o aminoácidos libres, estos sólo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia debe observarse la aparición de turbidez definida o precipitado coposo en todos los casos, ya que la aparición de opalescencia puede dar un resultado falso, pues puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias (Pereira, Vega, Almeida, Morales, 2009).

Ensayo de Liebermann–Burchard

Esta prueba permite identificar triterpenos y esteroides debido a que ambos tipos de productos poseen un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6 (Covo, 2017). Un ensayo positivo se reconoce por un cambio rápido de coloración: rosado-azul, verde intenso o verde oscuro-negro. El color es debido al grupo hidroxilo (-OH) del sitosterol reacciona con los reactivos lo que genera un aumento en la conjugación de la insaturación del anillo (Marcano y Hasegawa, 2002).

Ensayo de Shinoda

Reconoce la presencia de flavonoides. El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos (Covo, 2017). El Magnesio reacciona con el HCl, el hidrógeno generado produce por reducción el ión flavilio de color rojo escarlata (varía desde el rosa muy débil hasta rojo escarlata) (Dominguez, 1979).

Ensayo de Antocianinas

Permite identificar en los extractos la existencia de estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. La aparición de un color rojo a marrón en la fase amílica es indicativa de un ensayo positivo. La presencia de estructuras tipo polisacárido, que forman un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua de donde se extrae, denota la presencia de mucílagos (Covo, 2017).

Ensayo de Espuma

Las saponinas, glicósidos de compuestos esteroidales y triterpenoidales, se manifiestan por la formación de una espuma persistente cuando se agita el vegetal con agua (Marcano y Hasegawa, 2002).

Al ser un grupo de glicosidos se disuelven en agua caliente disminuyendo la tensión superficial de ésta, por lo tanto, al sacudir o agitar la muestra se forma una espuma abundante y relativamente estable (Dominguez, 1979).

Ensayo del Cloruro Férrico

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y taninos en un extracto vegetal. Un ensayo es positivo cuando: (1) desarrollo de una coloración rojo-vino: compuestos fenólicos en general, (2) desarrollo de una coloración verde intensa:

taninos del tipo pirocatecólicos y (3) desarrollo de una coloración azul: taninos del tipo pirogalotánicos (Alayo y Guevara, 2012).

Ensayo de la Gelatina

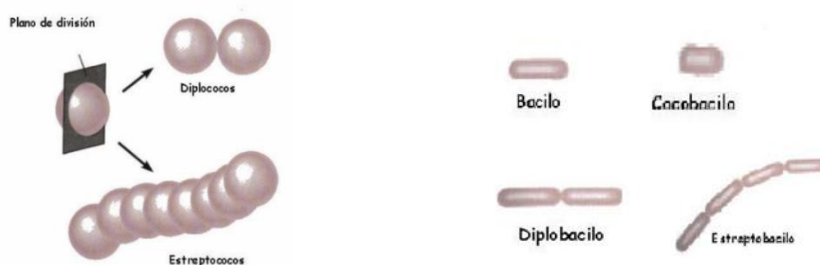
Permite reconocer la presencia de taninos, que son polifenoles que tienen la propiedad de unirse a las proteínas y precipitarlas. Por esta razón, se emplea el reactivo de gelatina al 1%, el cual produce un precipitado blanco en presencia de taninos (Alayo y Guevara, 2012).

Bacterias

Se denominan “bacterias” al diverso grupo de microorganismos unicelulares, procariotas, que se pueden encontrar prácticamente en cualquier ambiente (suelos, agua, aire, y como simbioses, parásitos, o patógenos del hombre, otros animales y plantas). Son los organismos más pequeños que contienen toda la maquinaria requerida para su crecimiento y autorreplicación a expensas del material alimenticio (Garcés y Saravia, 2008).

La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Se diferencian según su forma en cocos, bacilos y espirilos (Figura 17) (Pérez y Mota, 2006).

Figura 16. Morfología Bacteriana



Tomado y modificado de Garcés y Saravia, 2008.

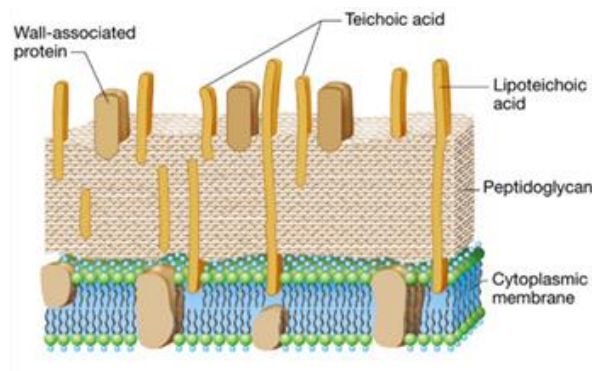
Tinción de Gram

Para la identificación bacteriana se utilizan técnicas como la tinción Gram, que es un tipo de tinción diferencial empleado en microbiología que permite diferenciar rápida y fácilmente las bacterias según sus características morfológicas. El principio del método se basa en la tinción de todas las bacterias mediante cristal violeta o violeta de genciana y posteriormente decolorar los microorganismos con alcohol-acetona, lo que sucede con los gramnegativos, mientras que los grampositivos siguen manteniendo la coloración. Posteriormente se utiliza un colorante de contraste para visualizar los microorganismos gramnegativos como la fucsina o safranina. De este modo podemos visualizar las bacterias grampositivas de color azul-violáceo mientras que las gramnegativas se visualizaran de color rojo o rosa (Mora, 2012).

Bacterias grampositivas

Las bacterias grampositivas poseen una pared que está constituida por varias capas peptidoglucano que conforma una estructura rígida y gruesa. Además, la pared celular de estas bacterias contiene ácidos teicoicos, que están compuestos principalmente por un alcohol y fosfato (Figura 18) (Tortora, Funke y Case, 2007).

Figura 17. Pared Celular de las Bacterias grampositivas

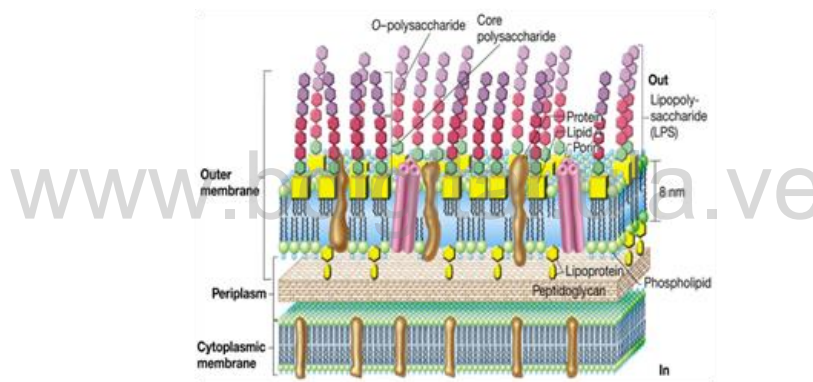


Tomado y modificado de Garcés y Saravia, 2008.

Bacterias gramnegativas

Las bacterias gramnegativas poseen una pared celular compuesta por pocas capas de peptidoglucano y una membrana externa, compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos (Figura 19). El peptidoglucano está unido a lipoproteínas de la membrana externa. La pared de las bacterias gramnegativas no posee ácido teicoico (Tortora, Funke y Case, 2007).

Figura 18. Pared Celular de las Bacterias gramnegativas



Tomado y modificado de Tortora, Funke y Case, 2007.

Mecanismos de Resistencia

Para ejercer su acción, un antibiótico requiere ingresar a la bacteria, mantenerse intacto hasta llegar a su lugar de acción y luego unirse al punto donde va a ejercer su función en la bacteria (Riverón, Hernández, Martínez, y Machado, 2003).

Estos microorganismos han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antibióticos. El primero de ellos es por la posición de un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, una bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que puede eliminar además muchos de estos agentes antibacterianos. El segundo, se realiza mediante la disminución de la

permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entrada. La producción de enzimas inactivantes de los antibióticos constituye el tercer mecanismo. De esta forma son inhibidos los aminoglucósidos y el cloranfenicol, por medio del acetil transferasa, y el caso más típico, el de las betalactamasas, para el grupo de los betalactámicos. Por último, algunos antibióticos ejercen su acción contra las bacterias uniéndose a una proteína esencial para la supervivencia de estas, la resistencia bacteriana se produce cuando el germen modifica la proteína diana, y cambia su función (Riverón, Hernández, Martínez y Betarte, 2003).

Todos estos mecanismos de protección los desarrolla la bacteria modificando su información genética, a veces con variaciones sencillas, o variando grandes segmentos de su código genético (Echeverría, 1998).

Antibióticos

Son sustancias que impiden el desarrollo o favorecen la muerte de un microorganismo. En la práctica se utiliza el término "antibiótico" para englobar a los antimicrobianos biológicos (sintetizados por un microorganismo vivo) y de síntesis. Ambos se caracterizan por poseer toxicidad selectiva, ya que no afectan a las células del huésped. Se clasifican de acuerdo a su efecto en bactericidas (acción letal) y bacteriostáticos (solo inhiben el crecimiento temporalmente). También se pueden clasificar según su espectro de acción en amplio espectro (cuando actúan tanto en bacterias grampositivas como en gramnegativas) y de espectro limitado (sólo actúan contra cocos o bacilos) (Basualdo, Coto y Torres, 2006).

Clasificación de los Antibióticos

Se han diseñado varios esquemas para la clasificación de los antibióticos, sin embargo, la más utilizada es la que los agrupa de acuerdo con su mecanismo de acción y estructura química (Araque, 2000).

Inhibidores de la Síntesis de la Pared Celular Bacteriana

Los antibióticos Betalactámicos inhiben la síntesis de la pared bacteriana uniéndose a enzimas que actúan en la fase final de la síntesis del peptidoglucano inactivándola, además, inducen un efecto autolítico, por lo tanto, su efecto es bactericida (Araque, 2000).

Inhibidores de la Función de la Membrana Citoplasmática

Su estructura química está conformada por polipéptidos que se unen a los fosfolípidos de la membrana citoplasmática, alterando su permeabilidad y ocasionando su destrucción (Araque, 2000).

Inhibidores de la Síntesis de Proteínas

Este grupo de antibióticos actúa uniéndose a la unidad 30S ribosomal o a la unidad 50S ribosomal, inhibiendo la síntesis de proteínas (Araque, 2000).

Inhibidores de la Síntesis de Ácidos Nucleicos

Son un grupo de antibióticos de estructura compleja que inhiben la síntesis de ARN bacteriano mediante la inhibición de la enzima ARN polimerasa, su acción es bactericida (Araque, 2000).

Actividad Antibacteriana

Se define como la capacidad que posee una molécula natural (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintética o semisintética, de inducir la muerte o detener el crecimiento de bacterias (Seija y Vignoli, 2006).

Técnicas para Medir la Actividad Antibacteriana

Existen diferentes métodos, que incluyen las determinaciones de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI), la eficacia antimicrobiana y la evaluación del espectro antimicrobiano (Reyes, Palou y López, 2014). Entre ellos están:

Dilución en Agar

El método de dilución en agar es utilizado preparando diferentes diluciones del antimicrobiano que luego se añaden a los agares y son colocados en capsulas de Petri para su solidificación. Finalmente, los microorganismos en prueba son inoculados en los agares e incubados a su temperatura y tiempos óptimos (Reyes, Palou y López, 2014).

Dilución en Caldo

Este método se lleva a cabo en tubos con medios líquidos (caldos), los cuales contienen concentraciones crecientes del antimicrobiano, en el cual se inocula un numero definido de bacterias, posterior a la incubación, la presencia de turbidez indica el crecimiento del microorganismo (Reyes, Palou y López, 2014).

Difusión en Agar

El método de difusión en agar ha sido el más utilizado para determinar la actividad antimicrobiana contra microorganismos aeróbicos, el agar solidificado se inocula con la suspensión requerida del microorganismo; un papel filtro es impregnado con una concentración conocida del antimicrobiano, el cual es colocado en la superficie del agar. Posteriormente las placas de Petri son incubadas a temperatura y tiempo óptimos, este método se fundamenta en el principio de difusión del antimicrobiano hacia todo el agar, lo que conduce a la inhibición del crecimiento bacteriano mediante la formación

de zonas de inhibición, la susceptibilidad del microorganismo está relacionada con el tamaño de dicha zona (Reyes, Palou y López, 2014).

Definición Operacional de Términos

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Es la concentración del antibiótico requerida para impedir el crecimiento bacteriano a partir de la incubación de bacterias en fase de crecimiento rápido, durante un periodo de incubación de una noche. Este término se utiliza para determinar la sensibilidad bacteriana a un antibiótico específico (Basualdo, Coto y Torres, 2006).

Resistencia Bacteriana

Es el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos (Riverón, Hernández, Martínez y Betarte, 2003).

Sensibilidad Bacteriana

Se considera que una bacteria es sensible a un antibacteriano cuando la concentración de este en el lugar de la infección es al menos 4 veces superior a la concentración inhibitoria mínima (CIM). Una concentración por debajo de la CIM califica a la bacteria de resistente y los valores intermedios como de moderadamente sensibles (Riverón, Hernández, Martínez y Betarte, 2003).

Solvente

El término solvente se refiere a sustancias orgánicas en estado líquido, utilizadas para disolver sólidos o gases u otros líquidos, la mayoría de ellos son derivados del petróleo o sintéticos (Huerta, 2005).

Fitoquímica

Es la disciplina que tiene como principal objetivo el estudio de los constituyentes químicos de las plantas. El estudio de tales compuestos abarca: sus estructuras químicas, metabolismo (biosíntesis y degradación), distribución natural, función biológica, extracción y evaluación cuali-cuantitativa (Ringuelet y Viña, 2013).

Fitoterapia

Vocablo proveniente del griego *phyton* = vegetal, también se le conoce como Medicina Herbaria. Trata del uso de las plantas como ayuda terapéutica, en el procuramiento de la salud y la lucha contra la enfermedad, restableciendo mecanismos alterados de los sistemas orgánicos, evitando, aliviando y curando afecciones (Albornoz, 1992).

www.bdigital.ula.ve

Etnobotánica

Es el campo científico que estudia las interrelaciones que se establecen entre el hombre y las plantas, a través del tiempo y en diferentes ambientes. El desarrollo de la etnobotánica es estudiado por disciplinas científicas tales como la propia botánica, sociología, psicología, antropología, ecología e historia (Albornoz, 1992).

Operacionalización de las Variables

La operacionalización de las variables es el procedimiento mediante el cual se determinan los indicadores que caracterizan o tipifican a las variables de una investigación, con el fin de hacerlas observables y medibles con cierta precisión y facilidad. En este estudio por ser una investigación de causa y efecto (confirmatoria), las variables son de tipo continua: variable dependiente (Tabla 4) y cuantitativa, discreta: variable independiente (Tabla 5) (Palella y Martins, 2012).

Tabla 4. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *Cassia alata*.

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana de las hojas de <i>Cassia alata</i>	Dependiente Cuantitativa Discreta	Se define como la capacidad que posee una molécula natural (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintética o semisintética, de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias, virus u hongos (Seija y Vignoli 2006).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
La actividad antibacteriana se puede medir por: - Método de Difusión del Disco (Kirby-Bauer) - Método modificado de pozos de agar	Cepas grampositivas: - <i>Staphyococcus aureus</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> Cepas gramnegativas: - <i>Escherichia coli</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Klebsiella pneumoniae</i>	- Sensible - Resistente -Presencia o ausencia del halo de inhibición frente a cepas grampositivas y gramnegativas

Fuente: Uzcátegui y Obregón, 2022.

Tabla 5. Operacionalización de la variable independiente: Composición química de los extractos de las hojas de *Cassia alata*.

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química de los extractos de las hojas de <i>Cassia alata</i>	Independiente Cualitativa Discreta	Son moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos (Ringuelet y Viña, 2013).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
Pruebas químicas como Tamizaje fitoquímico o Screening fitoquímico.	Las pruebas químicas cualitativas a realizar son:	
	- Alcaloides	Aparición de turbidez o precipitado
	- Esteroles y/o triterpenos	Coloración azul o verde
	- Saponinas	Coloración violeta
	- Compuestos fenólicos simples	Formación de abundante espuma
	- Taninos	Coloración de azul a negro
	- Flavonoides	Precipitado blanco
	- Quinonas y Antraquinonas	Coloración naranja a rojo para flavonas; si es rojo para flavonoles y magenta para flavononas
	- Glicosidos cardiotónicos	Coloración roja
		coloración purpura o violácea

	- Sesquiterpenlactonas	Coloraciones roja, violeta o rosa
--	------------------------	-----------------------------------

Fuente: Uzcátegui y Obregón, 2022.

Hipótesis

Las especies del género *Cassia* han sido usadas como plantas medicinales en diferentes partes del mundo, asimismo, se ha reportado el aislamiento de metabolitos tales como flavonoides, alcaloides, esteroides, entre otros, que presentan gran variedad de actividades biológicas, en tal sentido se presume que los extractos de las hojas de *Cassia alata* L. posean metabolitos secundarios similares y los mismos sean activos frente a cepas bacterianas de referencia internacional ATCC grampositivas y gramnegativas.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

El tipo de investigación se refiere a la clase de estudio que se va a realizar. Orienta sobre la finalidad general del estudio y sobre la manera de recoger informaciones o datos necesarios (Palella y Martins, 2012). Esta investigación fue tipo confirmatoria, ya que se se quiso confirmar la relación que existe entre la composición química y la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de *Cassia alata* frente a cepas grampositivas y gramnegativas.

Diseño de Investigación

La presente contó con un diseño experimental, de campo y laboratorio, ya que las muestras se recolectaron en un ambiente natural en el Estado Zulia, Municipio Colón, específicamente en zonas aledañas a la población de Santa Cruz de Zulia, las cuales fueron procesadas en el laboratorio del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. El investigador domina las condiciones bajo las cuales se realiza el experimento y modifica sus variables independientes para obtener resultados. Por otra parte, la investigación fue contemporánea ya que, la recolección sucedió durante el desarrollo de la investigación y transversal porque las muestras se recolectaron solo una vez (Hurtado, 2010).

Población y Muestra

Unidad de Investigación

La unidad de investigación estuvo representada por la especie de *Cassia alata* situada en situada en el Estado Zulia, Municipio Colón, específicamente en zonas aledañas a la población de Santa Cruz de Zulia, y se analizaron en el Laboratorio del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Los Andes.

Selección del Tamaño de la Muestra

La “n” muestral estuvo representada por 420,49 gramos de hojas frescas de la especie *C. alata*.

Sistema de Variables

Las variables que tienen relación con el objetivo de la investigación son las siguientes:

- Variable dependiente (VD): Actividad antibacteriana del extracto de las hojas de *Cassia alata* L.
- Variable independiente (VI): Composición química de los extractos de las hojas de *Cassia alata*

Instrumentos de Recolección de Datos

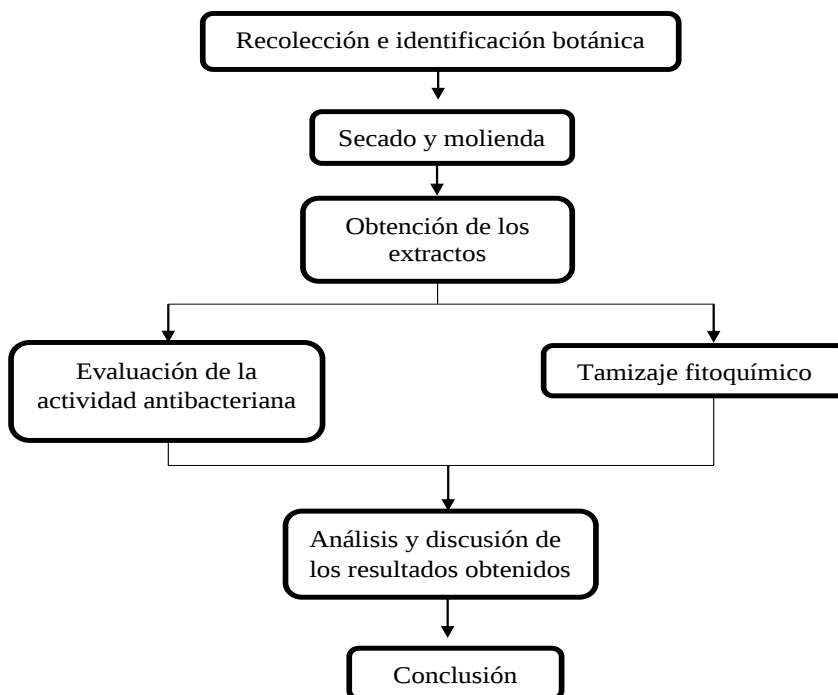
Esta investigación estuvo enfocada en la técnica de observación, que consiste en estar a la expectativa frente al fenómeno, del cual se tomó y se registró la información

para su posterior análisis, que se realizó por medio de la utilización de tablas para recopilar de manera cualitativa de los datos obtenidos de las pruebas preliminares para la identificación de los metabolitos presentes en la planta en estudio, de igual forma se registraron los datos recopilados arrojados por el método empleado para la determinación de la actividad antibacteriana; en ella se ha apoyado el investigador para obtener el mayor número de datos (Palella y Martins, 2012).

Procedimientos de la Investigación

El procedimiento de la investigación se describe en el esquema 1, con los diferentes estadios que se realizaron durante la realización del este proyecto.

Esquema 1. Procedimiento empleado para la obtención e identificación de los componentes de las hojas de *Cassia alata* L.



Fuente: Uzcátegui y Obregón, 2022.

Recolección de la Muestra

El procedimiento que se realizó en la siguiente investigación inicia con la recolección de las hojas de la planta en las adyacencias de la población de Santa Cruz del Zulia y luego una muestra testigo fue llevada al herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis para su identificación botánica (Figura 20) (Verde, García y Rivas, 2016).

Figura 19. Identificación botánica de *Cassia alata*.

UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA
MÉRIDA - VENEZUELA
HERBARIO

Fecha	Recolector	Número
01-11-2017	Ana García e Ysbelia Obregon	01

DET. Dr. Pablo Meléndez
CAESALPINIOIDEAE

Senna alata (L.) Roxb.

LOCALIDAD: Venezuela. Edo. Zulia. Municipio Colón.
Santa Cruz del Zulia. Barrio La Victoria.

ALTITUD:

www.bdigital.ula.ve

Fuente: Uzcátegui y Obregón, 2022.

Método Utilizado para la Preparación de los Extractos

Una vez obtenida la planta, el método a utilizar para la preparación de los diferentes extractos orgánicos fue la técnica de extracción en caliente por reflujo la cual es realizada a una temperatura suave que oscila alrededor de los 40 o 60 °C (Carrión y García, 2010).

Las hojas se llevaron a la estufa donde se secaron a 40 °C y posteriormente se molieron, para comenzar el proceso de extracción se pesaron 158,20 g del material

molido, sometiénolo a extracción por el proceso de reflujo en caliente a una temperatura de 40 °C usando hexano (solvente apolar) y etanol (solvente polar) como disolventes, se esperó que enfriaran los extractos, luego se filtró cada uno por separado para posteriormente llevar a cabo la concentración en el rotavaporador a 80 rpm y 50 °C. Obteniendo 20 g de extracto de etanol con un rendimiento de 12,64 % y 22,30 g de extracto de hexano con un rendimiento de 14,09 %.

Tamizaje Fitoquímico

Se llevaron a cabo reacciones de coloración, las cuales son reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. (Sharapin, 2000).

Determinación de Alcaloides

Una porción de los extractos se disuelve en 2 mL de ácido clorhídrico al 5-10 %, se calienta y se filtra hasta que el filtrado sea completamente transparente. Se toma una alícuota de filtrado para cada ensayo con los reactivos para alcaloide: Wagner, Mayer y Dragendorff. Se considera como positiva las pruebas que formen un precipitado naranja a rojo (Wagner), precipitado blanco a naranja (Mayer) y precipitado blanco a naranja (Dragendorff) (Marcano y Hasegawa, 2002).

Determinación de esteroides y triterpenos

Se realizó la prueba de Liebermann-Burchard. Se tomó una pequeña cantidad del extracto previamente llevados a sequedad, se adicionó diclorometano en cantidad suficiente para cubrir las muestras, se colocó en el ultrasonic hasta disolver las muestras, se añadió 0,5 mL de anhídrido acético, luego se adicionó cuidadosamente por las paredes de los tubos 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se consideró positiva al observar una coloración azul o verde que indicó la presencia de esteroides (Marcano y Hasegawa, 2002).

Determinación de Flavonoides

Se utilizaron dos pruebas para la determinación de flavonoides: la reacción de Shinoda y la reacción de hidróxido de sodio al 10 % que se describen a continuación:

Reacción de Shinoda

Se mezclaron virutas de Magnesio, HCl concentrado y el extracto de la planta. Después de algunos minutos el color rosa muestra la presencia de flavonoides (Marcano y Hasegawa, 2002).

Hidróxido de sodio al 10 %

Se adicionan 0,5 mL de NaOH si se forma una coloración de amarillo a rojo indica la presencia de xantonas y flavonas, de café a naranja flavonoles; de purpura a rojizo chalconas y azul de antocianidas (Marcano y Hasegawa, 2002).

www.bdigital.ula.ve

Determinación de antraquinonas y quinonas

Se colocaron 5 mL del extracto hexano y etanólico en una capsula de porcelana y se concentró a sequedad, posteriormente se dividió el extracto siruposo en 2 porciones. Se agregó 1 gota de hidróxido de amonio concentrado a una parte del extracto; la ausencia de una coloración roja indica la negatividad de la prueba para antraquinonas. Se agrega 1 gota de ácido sulfúrico concentrado a otra porción de los extractos; la ausencia de una coloración roja indica la negatividad para quinonas (Marcano y Hasewaga, 2002).

Determinación de cumarinas

Se disolvió la muestra en 1 mL de etanol y en otro tubo con 1 mL de diclorometano, se agregó unas gotas de hidróxido de amonio concentrado a ambos tubos, se llevaron los tubos a la lámpara de luz ultravioleta (UV) a 365 nm, la ausencia de fluorescencia azul indicó la negatividad de la prueba (Marcano y Hasewaga, 2002).

Determinación de la Actividad Antibacteriana por el Método de Difusión en Disco **(Kirby- Bauer)**

La determinación de la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de las hojas de *Cassia alata* L. se describe en el esquema 2.

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer y cols., (método de Kirby-Bauer). Esta prueba 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.

Bacterias estudiadas

Para este estudio se seleccionaron cinco especies de bacterias: dos especies pertenecen a las bacterias grampositivas y tres pertenecientes a las bacterias gramnegativas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), 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 Ugenia Nieves (Tabla 6).

Tabla 6. Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).

Bacterias Gram positivas (ATCC).	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
Bacterias Gram negativas (ATCC).	
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 23357
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853

Elaborado por Uzcátegui, 2022.

Preparación de placas

En las placas de Petri se preparó el medio de cultivo colocándose aproximadamente 10 mL de Agar Müeller Hinton (Merck ®) estéril, dejándose solidificar a temperatura ambiente.

Preparación de pre-inóculos bacterianos

Las cepas a ensayar se incuban en agar Müeller Hinton a 37 °C por 16 a 18 horas antes de hacer el ensayo microbiano, ya que es en ese tiempo donde las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano (Anon, 2003). Una vez que se obtienen las cepas bacterianas frescas y purificadas se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de una asa en aro estéril, tomándose de ésta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en una solución de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0,85 % previamente estéril, hasta alcanzar la turbidez del patrón de MacFarland N° 0,5 equivalentes a 10^{6-8} UFC/mL.

Preparación de los inóculos bacterianos

Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas, se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa estéril, tomándose de esta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en tubos 13x100 previamente estéril que contenían 5 mL de una solución de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0,85 % hasta que alcanzó una turbidez equivalente al patrón de Mac Farlán (10^{6-8} UFC/mL).

Inoculación de las placas

Una vez preparada las placas, se inocularon en forma homogénea en la superficie de cada una de ellas con cada uno de los inóculos bacterianos previamente preparados en solución de NaCl al 0,85 % (bacterias en estudio), utilizando para ello un hisopo de algodón estéril.

Preparación de los discos

Se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los cuales se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), durante toda una noche. Previo a la preparación del inóculo se impregnaron los discos de papel con 10 µL de la muestra en estudio a una concentración comprendida 10.000 ppm. También se utilizaron discos de antibióticos comerciales como control positivo con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar (Tabla 10) y como control negativo discos impregnados con 10 µL del solvente dimetil sulfóxido (DMSO).

Colocación de los discos impregnados

En las placas de Petri con Agar Müeller Hinton previamente inóculados con cada cepa estudio, se colocaron los discos impregnados con 10 µL de la dilución de 10.000 ppm de la muestra a ensayar y se colocaron los discos de antibióticos comerciales como control positivo (Tabla 9) correspondiente a cada de las cepas en estudio, además del control negativo; usando una pinza metálica previamente esterilizada (Bauer y cols, 1966).

Pre-incubación e incubación de las placas

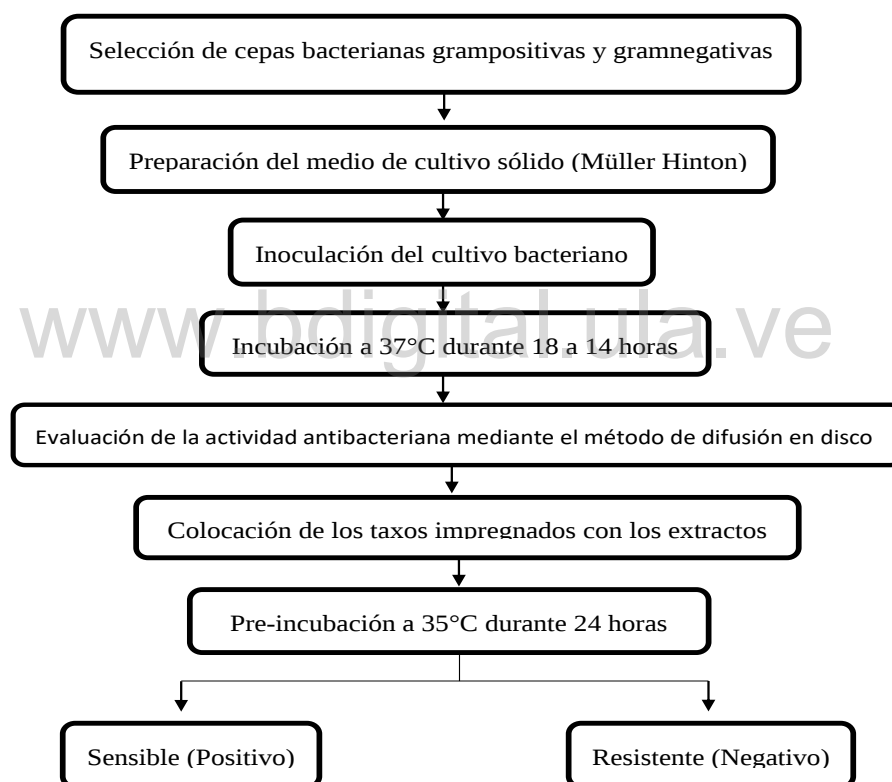
Después de haber colocado los discos en las placas con Agar Müeller Hinton previamente inóculados, estas se dejaron en la nevera a temperatura de 4 °C aproximadamente durante 30 min (pre-incubación), con la finalidad de que los discos impregnados con sus diferentes muestras difundieran a través del Agar, para luego llevarlas a la estufa durante 24 h a temperatura de 37 °C en posición invertida en atmósfera aeróbica (incubación).

Lectura de las placas

Luego de ser incubadas cada una de las placas por un lapso de tiempo de 24 h estas fueron revisadas para realizar la lectura de las mismas con una regla milimétrica. Donde

se consideró un resultado positivo o sensible (presencia de actividad antibacteriana) cuando se observó un halo de inhibición alrededor del disco, y se tomó como resultado negativo o resistente (sin actividad antibacteriana) la ausencia de dicho halo. El diámetro de la zona de inhibición producto de la actividad antibacteriana de las muestras en estudio se expresó en milímetros (mm) (Bauer y cols, 1966).

Esquema 2. Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *Cassia alata* L.



Fuente: Uzcátegui y Obregón, 2022.

Diseño de Análisis

Los datos recolectados en la fase interactiva del proceso de investigación fueron analizados a través de un enfoque cuantitativo y cualitativo, al expresar numéricamente los resultados. Asimismo, en el análisis de los datos de la investigación no se utilizarán

métodos estadísticos, estos datos obtenidos en las pruebas preliminares serán recopilados de manera cualitativa y expresados a través de tablas (Palella y Martins, 2012).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

Las hojas de *Cassia alata* L. fueron sometidas a un proceso digestión en caliente con dos solventes orgánicos: hexano y etanol, por separado, obteniéndose dos extractos (Tabla 7).

Tabla 7. Descripción del peso de los extractos y su rendimiento porcentual.

Parte de la planta	Peso	Peso del extracto	Rendimiento del extracto
Hojas molidas	158,20 g	Extracto de hexano: 22,30 g	14,09 %
		Extracto de etanol: 20 g	12,64 %

Elaborado por Uzcátegui, 2022.

Estudio Fitoquímico Preliminar

Los extractos obtenidos a partir de las hojas de la planta *Cassia alata* L., fueron sometidos a las distintas pruebas químicas preestablecidas para conocer el grupo de metabolitos secundarios presentes en la muestra; siendo de forma cualitativa la revelación de cada uno de los componentes por fenómenos químicos de reacción como: viraje de color, precipitados, turbidez del medio, y fluorescencia por exposición a la luz UV. Estos fenómenos fueron los indicativos primordiales para la presencia de los metabolitos presentes de la planta en estudio (Tabla 8 y 9).

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

Prueba química	Hexano	Etanol
Alcaloides		

Dragendorff	ND	+
Mayer	ND	+
Wagner	ND	-
Quinonas	ND	-
Antraquinonas	-	-
Cumarinas	-	-
Flavonoides		
Shinoda	-	-
NaOH	-	-
Triterpenos y esteroides	Triterpenos: + (rojo) Esteroides: + (verde)	Triterpenos: - No hay viraje Esteroides: + (verde)
Compuestos fenólicos	-	-
Taninos	-	-
Saponinas	ND	-
Lactonas	-	-
Lactonas sesquiterpénicas	-	-
Glicósidos cardiotónicos	-	-

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

Elaborado por: Uzcátegui (2022).

Tabla 9. Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de *Cassia alata* L.

Prueba	Control positivo	Reporte
---------------	-------------------------	----------------

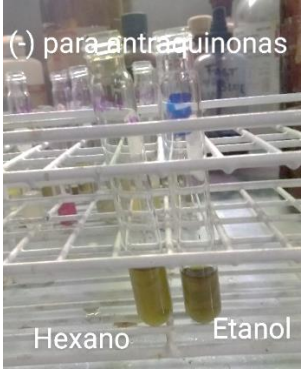
		Prueba: Reactivos de Dragendorff, Wagner y Mayer. Metabolito determinado: Alcaloides Reporte: Positivo para Dragendorff, Wagner y Mayer, formación de precipitados. Tubos: extracto de etanol.
		Prueba: H₂SO₄ Metabolito determinado: Quinonas Reporte: Negativo, no hay viraje de color. H: extracto de hexano. E: extracto de etanol.
		Prueba: NH₄OH cc. Metabolito determinado: Antraquinonas Reporte: Negativo (no hay viraje de color). Tubos: extracto de hexano y etanol.

Tabla 9. Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de *Cassia alata* L. (continuación).

		Prueba: Fluorescencia UV Metabolito determinado: Cumarinas Reporte: Negativo, no hay presencia de fluorescencia azul. Tubos: extractos de hexano y etanol.
		Prueba: Shinoda Metabolito determinado: Flavonoides Reporte: Negativo, no hay viraje de color a rojo intenso. Tubos: extractos de hexano y etanol

		Prueba: NaOH Metabolito determinado: Flavonoides Reporte: Negativo, no hay viraje de color. Tubos: extractos de hexano y etanol.
---	---	--

Tabla 9. Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de *Cassia alata* L. (continuación).

	Prueba: Lieberman – Burchard Metabolito determinado: triterpenos y esteroides. Reporte: Positivo Viraje de color verde para esteroides en ambos extractos y viraje rojo para triterpenos solo en el extracto de hexano. Tubos: extractos de hexano y etanol.
--	---



Elaborado por: Uzcátegui (2022).

Evaluación de la Actividad Antibacteriana

Se determinó a través del método de difusión en disco en agar (Kirby-Bauer), en el extracto etanólico de las hojas, a una concentración de 10 mg/ mL o 10.000 ppm, frente a las diferentes cepas bacterianas ATCC: dos especies grampositivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), y tres especies gramnegativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Los resultados de esta actividad antibacteriana se muestran en la tabla 10 (ver anexos 1,2 y 3).

Tabla 10. Resultados obtenidos para la determinación de la actividad antibacteriana de extractos de *Cassia alata* L.

Muestras ensayadas [] 10.000 ppm	Halos de inhibición en milímetros (mm) de bacterias ATCC				
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357
EHE	0	8	ND	8	8
DMSO (C-)	0	0	0	0	0
Controles positivos	Halos de inhibición en milímetros (mm) de los controles positivos				
Eritromicina 15 µg	32	-	-	-	-
Ampicilina 10 µg	-	32	-	-	-
Piperacilina 100 µg	-	-	27	27	27

Leyenda: EHE: Extracto hojas etanol, mm: Milímetros. DMSO: dimetil sulfoxido, (C-): Control negativo, ND: no determinado

Elaborado por: Uzcátegui (2022).

Discusiones

En la presente investigación se obtuvo por digestión en caliente los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Cassia alata* L., a los cuales se les realizaron las pruebas químicas cualitativas que demostraron la presencia de algunos metabolitos secundarios tales como: esteroides, triterpenos y alcaloides. Posteriormente se realizó un screening antibacteriano al extracto de etanol, el cual nos permitió conocer la

actividad de dicho extracto. Al comparar los resultados obtenidos con los estudios anteriores en cuanto a la caracterización fitoquímica de extractos de *Cassia alata* L. recolectada en diferentes países, esta investigación reflejó tener composición química similar.

Según Raji y cols (2015), el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Cassia alata* cultivada en India, evidenció la presencia de alcaloides, triterpenos y esteroides, por otro lado, el extracto de cloroformo demostró poseer terpenos, alcaloides, flavonoides, esteroides y proteínas, por lo tanto, los metabolitos secundarios detectados en el presente estudio están de acuerdo con las características fitoquímicas de la planta descritas en la literatura, ya que en esta investigación ambos extractos dieron positividad para esteroides; por otro lado el extracto de etanol fue positivo para alcaloides y solo el extracto de hexano evidenció la presencia de triterpenos.

El estudio realizado por Barrese, Hernández y García (2005), demostró la presencia de metabolitos secundarios tales como: taninos, alcaloides, triterpenos, esteroides, flavonoides, y quinonas en los extractos etéreo, acuoso y alcohólico, de las hojas de *Cassia alata* cultivada en la Habana Cuba, dichos extractos fueron obtenidos por extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente; correlacionando esta investigación con la nuestra en la cual se demostró la presencia de algunos de estos metabolitos como es el caso de alcaloides, triterpenos y esteroides en las hojas de *Cassia alata* L.

Saha, Proma, y Khan (2020), realizaron un tamizaje fitoquímico al extracto de *n*-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol, de las hojas de *Cassia alata*, cultivada en Bangladés; en el cual demostraron la presencia de esteroides en todos los extractos y como estos compuestos pueden ser los responsables de las propiedades antibacterianas, antiparasitarias, cardiotónicas y hepatoprotectoras de la planta, lo cual coincide con la presente investigación ya que se identificaron esteroides en los extractos de hexano y etanol estudiados.

Por otra parte, Oladeji, Adelowo y Odelade (2016), en un tamizaje fitoquímico realizado en los extractos etanólico y metanólico de las hojas de *Cassia alata* cultivada en Nigeria, identificaron metabolitos secundarios como antraquinonas, flavonoides y saponinas, estos hallazgos difieren con respecto al tamizaje de nuestra investigación ya que dichos metabolitos están ausentes en los extractos analizados de las hojas de *Cassia alata*.

Los mismos autores demostraron que el extracto etanólico de las hojas de la planta, obtenido mediante extracción en soxhlet presentó actividad antibacteriana contra *Klebsiella* spp a una CMI de 180 µg/ mL, lo cual concuerda con el resultado de esta investigación, ya que el extracto etanólico de las hojas de *Cassia alata* demostraron tener efecto inhibitorio frente a *Klebsiella pneumoniae* con un halo de inhibición de 8 mm.

Alam, Karim, y Khan (2009), concluyeron que los extractos de etanol y cloroformo de las hojas de *Cassia alata* (cultivada en Bangladés) obtenidos por maceración, a una concentración de 100 mg/mL presentaban actividad antibacteriana contra cepas de *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 19 mm, *Bacillus subtilis* (17 mm) y *Salmonella typhi* (16 mm), además se encontró que *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* eran resistentes a los extractos probados, estos resultados difieren de los resultados obtenidos en esta investigación ya que no se evidenció que el extracto de las hojas de *Cassia alata* presentara actividad antibacteriana contra *S. aureus*.

Así mismo, Angelina y cols (2021), en su estudio sobre la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Cassia alata* cultivada en diferentes localidades de Indonesia, demostró poseer actividad antibacteriana contra *S. aureus* (CMI 250 µg/mL), *S. epidermidis*, y *B. subtilis* (CMI 125 µg/ mL), estos resultados difieren con la presente investigación ya que el extracto de etanol utilizado no evidenció actividad antibacteriana contra *S. aureus*.

Según Thiviya y cols. (2022), estas diferencias arrojadas en diferentes investigaciones están relacionadas con la parte utilizada para la extracción, el método

de extracción, la temporada de cosecha, edad de la planta, naturaleza del suelo y condiciones ambientales, además, las variaciones en la composición química tienen un efecto directo sobre las actividades biológicas que poseen los extractos estudiados.

Por otro lado, Jeyaseelan, Tharmila y Thavaranjit (2011), en su estudio “Estudio *in vitro* de los extractos acuosos de las hojas de *Cassia alata* y su actividad antibacteriana” utilizando hojas cultivadas en Sri Lanka, concluyeron que los extractos obtenidos en caliente y en frío a una concentración de 100 mg/mL presentaban actividad antibacteriana frente a cepas de *P. aeruginosa* con una zona de inhibición de 19 mm, relacionándose con la presente investigación ya que el extracto etanólico de la planta presentó actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa* con una zona de inhibición de 8 mm.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- En los extractos de hexano y etanol obtenidos de las hojas de *Cassia alata* L. se identificó mediante el tamizaje fitoquímico la presencia de esteroides. Por otro lado, en el extracto etanólico se demostró la presencia de esteroides y alcaloides.
- Sin embargo, solo el extracto de hexano evidenció la presencia de triterpenos.
- El extracto etanólico obtenido de las hojas de *Cassia alata* L. presentó actividad antibacteriana contra las cepas ensayadas de *Enterococcus faecalis* (8 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (8 mm) y *Klebsiella pneumoniae* (8 mm), sin embargo, el extracto etanólico obtenido de las hojas de *Cassia alata* L. no fue activo contra *Staphylococcus aureus*.
- El estudio de la composición química de las hojas de la especie *Cassia alata* L. es el primer reporte en Venezuela.
- Adicionalmente este proyecto proporciona de manera especial el primer trabajo que determina la actividad antibacteriana de las hojas de la especie *Cassia alata* L. en Venezuela.

Recomendaciones

- Evaluar si los extractos de las hojas de *Cassia alata* L. presentan otro tipo de actividad biológica como antioxidante, fotoprotectora o antifúngica.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) para evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Cassia alata*.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *Cassia alata* L. en cepas nosocomiales

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Abarca, N., Reyes, J., Alvarado, E., Jiménez, N., y Corral, J. (2006). El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto. *Vidsupra* 1(2), 1.
- Alayo, N., y Guevara L. (2012). Identificación preliminar de fitoconstituyentes en las inflorescencias de *Bejaria aestuans* L. Universidad Nacional de Trujillo., Facultad de Farmacia y Bioquímica. Perú-Trujillo. Trabajo de grado para optar por el título de bachiller en Farmacia y Bioquímica.
- Alam, M., Karim, M., y Khan, S. (2009). Antibacterial activity of different organic extracts of *Achyranthes aspera* and *Cassia alata*. *Journal of Scientific Research*, 1(2), 393-398.
- Albornoz, A. (1980). *Productos naturales: estudio de sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Caracas: Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela.
- Albornoz, A. (1992). *Medicina Tradicional Herbaria. Guía de Fitoterapia*. Caracas-Venezuela: Instituto Farmacoterápico Latino S.A.
- Anon, A. (2003). Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9, 1.
- Angelina, M., Mardhiyah, A., Dewi, R., Fajriah, S., Muthiah, N., Ekapratiwi, Y., y Hartati, S. (2021). Physicochemical and phytochemical standardization, and antibacterial evaluation of *Cassia alata* leaves from different locations in Indonesia. *Pharmacia*, 68(4), 947-956.
- Araque, M. (2000). *Antibióticos*. Mérida: Universidad de Los Andes.
- Bacchi, M., Sertié, A., Villa, N., y Katz, H. (1995). Antiulcer action and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. *Planta Medica*, 61(03), 204-207.
- Barrese, Y., Hernández, M., y García, O. (2005). Caracterización y estudio fitoquímico de *Cassia alata* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 10(2), 1-2.
- Basualdo J., Coto C., y Torres R. (2006). *Microbiología Biomédica*. Argentina: Atlante.

- Bauer, A., Kirby W., Sherris J., y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45, 493-496.
- Bravo, D. (1977). Estudio morfológico y taxonómico del género *Cassia* (Leguminosae) en la Argentina: Sección Chamaesenna, serie Aphyllae y serie Pachycarpae. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia. Fitoquímica-Plantas Medicinales. Zaragoza: Editorial Acribia.
- Bonatti, A. (1991). Formulation of plant extracts into dosage form. En R. O. B. Wijesekera (Ed.), *The Medicinal Plant Industry*. 106-107.
- Bowsher, C., Steer, M., y Tobin, A. (2008). Plant Biochemistry. New York: Taylor & Francis Group.
- Carpio, J., y Ambida, P. (2019). Antibacterial activity of *Cassia alata* Linn (Acapulco) roots and barks crude extracts. *Advance Pharmaceutical Journal*, 4(1), 15-19.
- Carrera, C., Gómez, R., y Zuñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Medica*, 38 (2), 149-158.
- Carrión, A., y García, C. (2010). Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica. Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Químicas Escuela de Bioquímica y Farmacia. Cuenca- Ecuador. Trabajo para la obtención al título de Bioquímica y Farmacéutica.
- Carvalho, J., Teixeira, J., Souza, P., Bastos, J., Dos Santos Filho, D., y Sarti, S. (1996). Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 53 (3), 175-178.
- Canales, D., Carazo, L., y Centeno, J. (2011). Determinación de los metabolitos secundarios de la hoja seca de la especie vegetal *Cordia inermis* mediante tamizaje fitoquímico. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua., Facultad

- de Ciencias Químicas., León-Nicaragua. Trabajo de grado para optar por el título de Licenciado en Química Farmacéutica.
- Chatterjee, S., Chatterjee, S., y Dutta, S. (2013). *Cassia alata* an Useful Antimicrobial Agent. *Medicinal and Aromatic Plants*, 2 (1), 1-2.
- Covo, E. (2017). Evaluación de la actividad antibacteriana de los metabolitos de extractos de semillas de *Mammea americana* sobre *Enterococcus faecalis*. Universidad de Cartagena., Facultad de Odontología., Cartagena-Bolívar. Trabajo de grado para la obtención del título de Especialista en Endodoncia.
- Croteau, R., Kutchan, T., y Lewis, N. (2000) Natural Products (Secondary Metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 24, 1250-1319
- Delgado, A., y Sousa, M. (2016). Biología floral del género *Cassia* en la Región de los Tuxtlas, Veracruz. *Botanical Sciences*, (37), 4–6.
- Deodor, S., Khadabadi, S., Kamdi, K., y Ingle, V. (2009). In vitro anthelmintic activity of *Cassia tora*. *International Journal of ChemTech Research*, 1(2), 177-179.
- Dominguez, X., (1979). *Métodos en Investigación Fitoquímica*. México: Limusa.
- Echeverría, J. (1998). Resistencia bacteriana. *Revista Médica Herediana*, 9(2), 53.
- El-Mahmood, A., y Doughari, J. (2008). Phytochemical screening and antibacterial evaluation of the leaf and root extracts of *Cassia alata* Linn. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(7), 1-2.
- Estrada, E. (1989). *Códice Florentino: Su formación Etnobotánica*. México: CIESAS
- Eusebio, K., Dofitas, B., Balita, C., Tioleco, G., Jandoc, L., y Frez, M. (2020). *Senna (Cassia) alata* (Linn.) roxb. leaf decoction as a treatment for *Tinea imbricata* in an indigenous tribe in southern Philippines. *Mycoses*, 63(11), 1233–1234.
- Fatmawati, S., Purnomo, A., y Bakar, M. (2020). Chemical constituents, usage and pharmacological activity of *Cassia alata*. *Heliyon*, 6(7), 1-3.
- Farias, N. (2013). Atividade antimicrobiana invitro do extrato etanólico de *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae). Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

- Faruq, U., Hassan, L., y Adebote, K. (2003). Identification of antibacterial agents in *Cassia Alata* L. *Sakata Journal of Veterinary Sciences*, 5 (2), 10.
- Garcés, A., y Saravia, K. (2008). *Morfología y estructura de los microorganismos* (trabajo de Investigación). Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- García, G., y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA*, 2 (3): 119-145.
- Gómez, L., Espino, C., Guerrero, E., Morán, J., López, J., Montenegro, G., Olmedo, D., y Gupta, M. (2015). Cribado de la actividad antimicrobiana de Plantas Panameñas de la Familia *Fabaceae*. *Revista Médica De La Universidad De Costa Rica*, 8(2), 3–4.
- Gonzalez, F. (2005). Estudio farmacognóstico e farmacológico de *Caesalpinia ferrea* Martius Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo.
- Gupta, D. and Singh, J. (1991). Flavonoid glycosides from *Cassia alata*. *Phytochemistry*, 30: 2761-2763.
- Hassan, S., El-Sammad, N., Mousa, A., Mohammed, M., Hashim, A., Werner, V., y Nawwar, M. (2015). Hypoglycemic and antioxidant activities of *Caesalpinia ferrea* Martius leaf extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(6), 462-471.
- Heldt, H. (2005). *Plant Biochemistry*. San Diego: Elsevier Academic Press.
- Hernández, R., Fernández., C., y Baptista, P. (2010). *Metodología de la investigación*. México D.F: McGraw-Hill Education.
- Hou D., Larsen, K., y Larsen, S. (1996). *Caesalpiniaceae* (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Flora Malesiana-Series 1, Spermatophyta*, 12(2), 2,14,16.
- Huerta, M. (2005). *Estudio para minimizar la formación de espuma en mezclas de aminos utilizadas en el proceso de endulzamiento de gas natural* (Trabajo de Investigación). Universidad de las Américas de Puebla, México.
- Hurtado, J. (2010). *En la guía para la comprensión holística de la ciencia*. Caracas: Editorial Magisterio.

- Ibrahim, D., y Osman, H. (1995). Antimicrobial activity of *Cassia alata* from Malaysia. *Journal of Ethnopharmacology*, 45(3), 151–156.
- Irigoyen J., Proal J., Jáquez V., y Orona, A. (2013). Actividad fitoquímica de la 9,10 antraquinona y sus derivados . *Vidsupra*, 3,2-4.
- Jeyaseelan, E., Tharmila, S., y Thavaranjit, A. (2011). Invitro evaluation of different aqueous extracts of *Senna alata* leaves for antibacterial activity. *SLJIM*, (2), 64-69.
- Kitakana, S., y Takido, M. (1991). Studies on the constituents of the leaves of *Cassia Torosa* Cav. II. the structure of two novel flavones, Torosaflavone C and D. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 39 (12), 1.
- Llamas, F., y Acedo, C. (2018). Las leguminosas (Leguminosae o Fabaceae): Una síntesis de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la Familia a lo largo del tiempo. *Ambiociencias*, (14), 15-16.
- Le, P. (2019). Phytochemical screening and antimicrobial activity of extracts of *Cassia alata* L. leaves and seeds. *Bulgarian Chemical Communications*, 51(3), 1-4.
- Liu, A., Xu, L., Zou, Z. and Yang, S. (2009). Studies on chemical constituents from leaves of *Cassia alata*, 34: 861-863.
- Lythgoe, T. (1972). Alcaloides de *Cassia carnavall* Speg (Leguminosa) (Doctoral dissertation) Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.
- Lopes, N., Faccin-Galhardi, L., Espada, S., Pacheco, A., Ricardo, N., Linhares, R., y Nozawa, C. (2013). Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. *International Journal of Biological Macromolecules*, 60, 93-99.
- Mar'ie, A. M., Zamzani, I., y Nashihah, S. (2022). Antibacterial activity of *Cassia alata* stems ethanol extract against *Staphylococcus aureus*. *Acta Pharmaciae Indonesia*, 10(1), 5462-5462.

- Magalhaes, L., Pussente, C., Azevedo, L., y Crespo, J. (2015). Avaliação da atividade antibacteriana do extrato de *Caesalpinia ferrea* Martius e desenvolvimento de uma formulação fitocosmética. *Revista Científica da Faminas*, 11(1), 21-31.
- Mahida, Y., y Mohan, J. (2006). Screening of Indian plant extracts for antibacterial activity. *Pharmaceutical Biology*, 44(8), 2-4.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Universidad Central de Venezuela: Caracas.
- Makinde, A., Igoli, J., Ta'Ama, L., Shaibu, S., y Garba, A. (2007). Antimicrobial activity of *Cassia alata*. *African Journal of Biotechnology*, 6 (13), 1509.
- Menezes, I., Moreira, Í., Carvalho, A., Antonioli, A., y Santos, M. (2007). Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: involvement of ATP-sensitive potassium channels. *Vascular Pharmacology*, 47(1), 41-47.
- Monroy, M., y Prieto, F. (2015). Determinación de la composición química y evaluación de la actividad antibacteriana del agente esencial obtenido de *Allium savillum* (Tesis de Pregado). Universidad de Los Andes, Mérida; Venezuela.
- Mora, X. (2012). Diferenciando bacterias grampositivas y gramnegativas. *Selecciones Avícolas*. 25-26.
- Morales, A., Fonseca, A., Almeida, M., Morales, G., y Torres, E. (2011). Tamizaje fitoquímico de *Cassia uniflora* Mill. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(4), 331-336.
- Organización Mundial de la Salud. (2014). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*. Recuperado de https://www.who.int/topics/traditional_medicine/WHO-strategy/es/
- Otto, R., Ameso, S., y Onegi, B. (2015). Assessment of antibacterial activity of crude leaf and root extracts of *Cassia alata* against *Neisseria gonorrhoea*. *African Journal of Biotechnology*, 8(19), 5076-5083.

- Oladeji, S., Adelowo, F., y Odelade, K. (2016). Mass spectroscopic and phytochemical screening of phenolic compounds in the leaf extract of *Senna alata* L. Roxb. (Fabales: Fabaceae). *Brazilian Journal of Biological Sciences*, 3(5), 209-219.
- Oliva, I. (2012). Fraccionamiento bioguiado y tamizaje fitoquímico de extractos hexánico de acetato de etilo y clorofórmicos de laurel: *Litsea glaucescens* HBK y *Litsea guatemalensis* Mez. Universidad de San Carlos de Guatemala., Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia., Guatemala. Trabajo de grado para la obtención del título de Química Farmacéutica.
- Pansa M. (2011). Species diversity, usages, molecular markers and barcode of medicinal senna species (Fabaceae, caesalpinioideae) in Thailand. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(26), 1–2.
- Palella, S., y Martins, F. (2012). *La metodología o el marco metodológico*. Caracas: FEDUPEL.
- Pereira, S., Vega, D., Almeida, M. y Morales, G. (2009). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas de la *Trichilia hirta* L. *Revista Química Viva*, 3 (8), 6.
- Pérez, Y., Jiménez, M., y Pulpeiro, O. (2005). Caracterización y estudio fitoquímico de *Cassia alata* L. *Revista cubana de plantas medicinales*, 10 (2), 3-4.
- Pírez, M., Mota, M. (2006). Temas de bacteriología y virología médica. Montevideo: Oficina del libro FEFMUR.
- Prashant, T., Bimlesh, K., Mandeep, K., Gurpreet, K. y Harleen, K. (2011). Phytochemical Screening and Extraction: a Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1), 98-99.
- Prieto, A., Ocampo A., Fernández A., y Pérez M. (2005). El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso en Cuba y México. *Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 8(1), 39-40.

- Quesada, A., Pesantes, O., Bustamante, K., Auxiliadora, M. y Tafur, V. (2016). Actividad antimicrobiana de *Cassia grandis* L. f. *Revista Universidad de Guayaquil*, 122, (1), 34-40.
- Raji, P., Sreenidhi, J., Sugithra, M., Renugadevi, K., y Samrot, A. (2015). Phytochemical screening and bioactivity study of *Cassia alata* leaves. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, (12), 291-296.
- Reyes, E., y Castro, J. (2017). Metabolitos secundarios en plantas medicinales usados para problemas gastrointestinales, una revisión sobre medicina ancestral ecuatoriana. *Revista Bases de la Ciencia*, 2(3), 2-4.
- Reyes, E., Palou E., y López, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *TSIA UDLAP*, 11(2), 70-72
- Ringuelet, J., y Viña, S. (2013). *Productos Naturales Vegetales*. Buenos Aires, Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de la Plata.
- Riverón, F., Hernández, J., Martínez, L., y Betarte, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 8 (1), 44-45.
- Rodríguez, S. y Gámez, L. (2010). Clave vegetativa para la identificación de árboles de la familia Fabaceae de la Ciudad de Mérida, Venezuela. *Pittieria*, (34), 89-111.
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., y García, J. (2005). *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica. 339-342.
- Saha, K., Proma, R., y Khan, N. (2020). Phytochemical screening of plant extracts and GC-MS analysis of n-hexane extract of the leaves of *Cassia alata* Linn. *J Phytopharmacol*, 9 (5), 342-7.
- Saito, S., Trentin, D., Macedo, A., Pungartnik, C., y Gosmann, G. (2012). Bioguided fractionation shows *Cassia alata* extract to inhibit *Staphylococcus epidermidis*

- and *Pseudomonas aeruginosa* growth and biofilm formation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (12), 1-13.
- Salcedo, J. (2017). *Estudio fitoquímico y actividad antibacteriana de los frutos de Sicana odorífera* Naudin (Cucurbitaceae) (Tesis de Pregado). Universidad de Los Andes, Mérida.
- Seija, V., y Vignoli, R. (2006). Principales grupos de antibióticos. *Temas de bacteriología y virología médica*, 631-633.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de la tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: Roberto pinzón.
- Somchit, M. N., Reezal, I., Nur, I. E., y Mutalib, A. R. (2003). Invitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 84 (1), 1–4.
- Torres C., Vega D. y Garibaldi O. (2006). Procedimiento para la Prueba de Percolación. Centro de Investigaciones Hidráulicas e Hidrotécnicas Área de Hidráulica, Universidad Tecnológica de Panamá.
- Tortora, G. J., Funke, B. R. y Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Thiviya, P., Gunawardena, N., Gamage, A., Madhujith, T., y Merah, O. (2022). Apiaceae family as a valuable source of biocidal components and their potential uses in agriculture. *Horticulturae*, 8 (7), 614.
- Ulibarri, E. A. (2008). Los géneros de Caesalpinioideae (Leguminosae) presentes en Sudamérica. *Darwiniana*, nueva serie, 46 (1), 69-72.
- Valle, D., Andrade, J., Puzon, J., Cabrera, E., y Rivera, W. (2015). Antibacterial activities of ethanol extracts of Philippine medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5 (7), 532-540.
- Vasconcelos, C., Maranhão, H., Batista, T., Carneiro, E., Ferreira, F., Costa, J., y Wanderley, A. (2011). Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of

Caesalpinia ferrea Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 137 (3), 1533-1541.

World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva: World Health Organization. [Online]. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112647/1/WHO_HSE_PED_AIP_2014.2_eng.pdf.

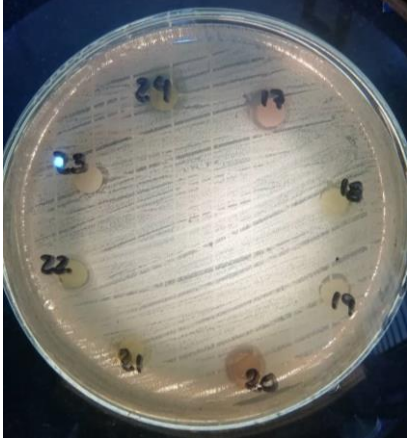
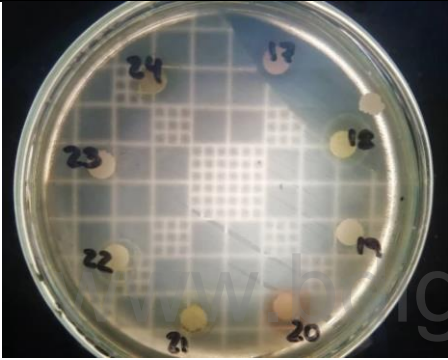
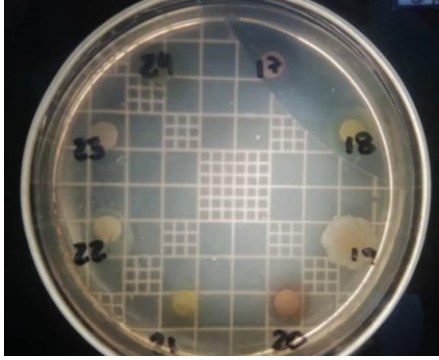
Ximenes, N. (2004). Purificação e caracterização da lectina da vagem de *Caesalpinia ferrea* (CfePL), (aplicação biológica Master's tesis), Universidade Federal de Pernambuco.

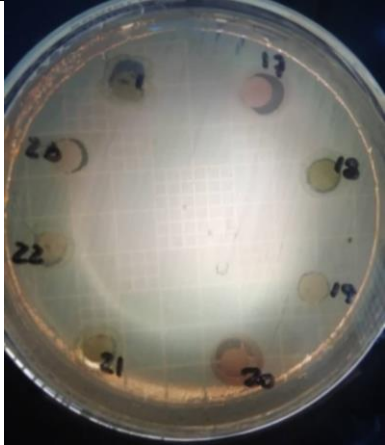
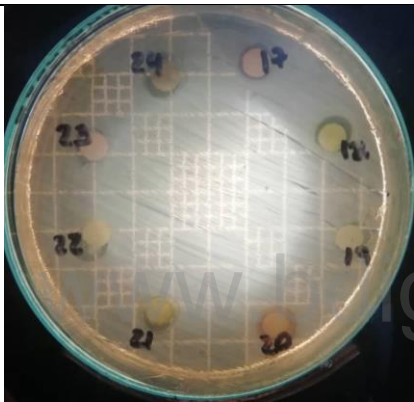
www.bdigital.ula.ve

ANEXOS

Tabla 11. Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Cassia alata* L.

Prueba	Reporte
--------	---------

	Prueba: Kirby- Bauer Especie en estudio: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 Disco nro. 18
	Prueba: Kirby- Bauer Especie en estudio: <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 Disco nro. 18
	Prueba: Kirby- Bauer Especie en estudio: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 Disco nro. 18

	Prueba: Kirby- Bauer Especie en estudio: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357 Disco nro. 18
	Prueba: Kirby- Bauer Especie en estudio: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853. Disco nro. 18