



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



TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Ruellia tuberosa* EN CEPAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL

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

Autora:

Abigail Iacobellis Lobo

C.I. V- 23.497.484

Tutora:

Prof. Ysbelia M. Obregón D.

Mérida, noviembre de 2022.

AGRADECIMIENTOS

Estoy muy feliz de tener un espacio para expresar mi gratificación a quienes me brindaron su apoyo de manera incondicional durante este tiempo.

A Dios porque a pesar de tantas adversidades enfrentadas en este recorrido hoy logro culminar esta etapa tan anhelada, ¿y cómo no? si puso en mi camino a personas maravillosas que estuvieron para mí cada segundo.

A mi mamá por ser tan linda y paciente conmigo, a mi papá por escucharme cuando tenía dudas, a mis hermanos Nicola y Giuliano porque sin duda somos un gran equipo. Agradecida con mi abuelita Mina, con mis tíos y primos. Los amo.

A mis compañeros de estudio ¡Gracias! y a mis amigos Anna Chacón, Elisa Salazar, Verónica Moreno, Ana García, Gabriel Domínguez, Luis Isla, Roxana Azuaje, Semer Aissami y Luis Palma quienes hicieron de este trayecto algo más ameno. Gracias miles.

Agradezco a la Universidad de Los Andes y la a Facultad de Farmacia y Bioanálisis por dedicarse a formar profesionales íntegros y de calidad.

Gracias al equipo que conforma el Instituto de Investigaciones Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro por prestarme su apoyo y abrirme las puertas.

A mis profesores por compartir conmigo todo lo aprendido, a mis jurados Prof. Alida Pérez y Prof. Rosa Aparicio agradecida por su entrega; así mismo le doy las gracias a mi tutora Prof. Ysbelia Obregón pues en el tiempo compartido siempre demostró ser excelente profesional y persona a través de su paciencia, dedicación y orientación.

Gracias a todos aquellos que no menciono acá pero que igualmente tienen un pedacito de mi logro, pues sin su ayuda no hubiese sido posible.

Gracias a todos por creer en mí, los quiero.

Abigail Iacobellis.

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a mi familia por enseñarme a ser perseverante, valiente y recordarme que Dios siempre está conmigo; son la fuente de mi inspiración.

A mis compañeros y amigos por brindarme su apoyo en las buenas y malas.

Dedicado a mis profesores por sus consejos y formación, al equipo de trabajo del Instituto de Investigaciones Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro en especial al profesor Luis Rojas ya que a pesar de su ausencia física seguirá dejando huellas en cada investigación que se realice.

Finalmente dedico mi trabajo a quienes por algún motivo hoy ya no están conmigo y estoy segura que estarían muy felices de verme cumplir este logro, se los dedico a mis tíos Hernán, Mariella, Miguel, Raúl, Jorge Alejandro, a mi abuelo Julio, mi nonna Salvadora, mamá Rosa y a José Manuel Chema mi amigo eterno.

Abigail Iacobellis

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
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>	<i>7</i>
<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>7</i>
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	8
<i>Alcances de la Investigación.....</i>	<i>8</i>
<i>Limitaciones de la Investigación.....</i>	<i>8</i>
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	9
Trabajos Previos.....	9
Antecedentes Históricos o Epistemológicos.....	12
Bases Teóricas.....	12
Familia Acanthaceae.....	12
Género <i>Ruellia</i>	15
Especie <i>Ruellia tuberosa</i>	22
Producto Natural.....	25
<i>Extractos vegetales.....</i>	<i>38</i>
<i>Métodos para la Obtención de los Extractos.....</i>	<i>38</i>
Tamizaje Fitoquímico.....	41

ÍNDICE DE CONTENIDO (Continuación)

	Pág.
<i>Pruebas Fitoquímicas para la Identificación de Metabolitos Secundarios</i>	42
Bacterias.....	46
<i>Tinción Gram</i>	47
<i>Antibióticos</i>	52
<i>Mecanismos de Acción de los Antibióticos</i>	53
<i>Metodologías para Determinar la Actividad Antibacteriana</i>	57
<i>Estándar de McFarland</i>	60
Definición Operacional de Términos.....	61
Operacionalización de las Variables.....	64
Hipótesis.....	67
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	68
Tipo de Investigación.....	68
Diseño de Investigación.....	68
Población y Muestra.....	69
<i>Unidad de Investigación</i>	69
<i>Selección del Tamaño de la Muestra</i>	69
Sistema de Variables.....	69
Instrumentos de Recolección de Datos.....	69
Procedimientos de la Investigación.....	70
Diseño de Análisis.....	80
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	81
Resultados.....	81
Discusiones.....	94
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	99

**ÍNDICE DE CONTENIDO
(Continuación)**

	Pág.
Conclusiones.....	99
Recomendaciones.....	100
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS.....	101

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

N° Tabla		Pág.
1	Géneros y especies de la familia Acanthaceae encontradas en el estudio florístico preliminar en la ciudad de Mérida, Venezuela.....	14
2	Taxonomía del Género <i>Ruellia</i>	16
3	Taxonomía de la especie <i>Ruellia tuberosa</i>	23
4	Antibióticos que inhiben la síntesis proteica.....	53
5	Antibióticos que alteran la membrana citoplasmática.....	53
6	Antibióticos que inhiben de la síntesis de la pared bacteriana.....	55
7	Antibióticos que bloquean la síntesis de factores metabólicos.....	56
8	Antibióticos que alteran el metabolismo o estructura de los ácidos nucleicos.....	56
9	Inhibidores de β -lactamasas.....	57
10	Escala de McFarland.....	61
11	Operacionalización de la Variable Dependiente: Actividad Antibacteriana del extracto de etanol de la especie <i>Ruellia tuberosa</i>	65
12	Operacionalización de la Variable Independiente: Composición química de los extractos de las hojas de la especie <i>Ruellia tuberosa</i>	66
13	Cepas de referencia internacional de Tipo Colección de Cultivos Americano (ATCC).....	76

**ÍNDICE DE TABLAS
(Continuación)**

N° Tabla		Pág.
14	Determinación del % de rendimiento de los extractos de hexano y etanol de las hojas de <i>Ruellia tuberosa</i>	82
15	Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos obtenidos de las hojas de <i>Ruellia tuberosa</i>	83
16	Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de <i>Ruellia tuberosa</i>	91
17	Diámetro de inhibición del extracto de etanol de las hojas de <i>R. tuberosa</i> con las bacterias <i>E.coli</i> y <i>B. subtilis</i>	97
18	Diámetro de inhibición del extracto de hexano de las hojas de <i>R. tuberosa</i> con las bacterias <i>E.coli</i> y <i>B. subtilis</i>	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº Figura		Pág.
1	Metabolitos secundarios aislados de la familia Acanthaceae.....	16
2	Metabolitos detectados en <i>Ruellia</i> : <i>R. dipteracanthus</i> , <i>R. graecizans</i> , <i>R. portellae</i> , <i>R. rosea</i> , y <i>R. tweediana</i> .	18
3	Metabolitos aislados de la especie <i>Ruellia rosea</i>	19
4	Metabolitos aislados del extracto de metanol de la especie <i>R. praeterminsa</i>	19
5	Metabolitos aislados y caracterizados de la fracción de n-butanol de la especie <i>R. patula</i>	20
6	Metabolitos aislados de la especie <i>R. brittoniana</i> .	21
7	Metabolitos aislados de la fracción de n-butanol de la especie <i>R. patula</i>	22
8	<i>Ruellia tuberosa</i>	23
9	Flavonoides y triterpenos aislado de <i>R. tuberosa</i>	24
10	Alcaloide tipo fenantreno aislado de <i>R. tuberosa</i>	25
11	Estructura de un alcaloide.....	26
12	Estructura básica de las benzopironas.....	27
13	Cambios en el anillo C de la estructura general de los flavonoides.....	28
14	Estructura de una saponina.....	29
15	Estructura de un tanino.....	30
16	Estructura de un lignano.....	31
17	Glicósido cardiotónico.....	32
18	Estructura de un triterpeno.....	33
19	Esqueleto básico de cucurbitacinas.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS (Continuación)

Nº Figura		Pág.
20	Estructura de un esteroi.....	35
21	Lactona sesquiterpénica.....	36
22	Equipo utilizado en la técnica Reflujo en caliente.....	39
23	Reacción de Flavonoides en el ensayo de Shinoda.....	43
24	Reacción de compuestos fenólicos.....	44
25	Reacción de quinonas.....	45
26	Reacción de triterpenos/esteroles.....	46
27	Paredes bacterianas de bacterias Gram positivas y Gram negativas.....	47
28	Organización estructural y fisiológica de los mecanismos de resistencia bacteriana.....	52
29	Curva de crecimiento bacteriano.....	77
30	Reporte de resultados de acuerdo a las características fitoquímicas de los extractos de las hojas de <i>Ruellia tuberosa</i>	84
31	Resultados de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de <i>Ruellia tuberosa</i>	91

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Nº Esquema		Pág.
1	Rutas biosintéticas.....	37
2	Procesamiento general de la investigación.....	71
3	Procedimiento para la determinación antibacteriana de los extractos de las hojas de <i>Ruellia tuberosa</i> por el método difusión en agar del disco (Kirby-Bauer).....	78

www.bdigital.ula.ve



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



TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
Ruellia tuberosa **EN CEPAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL**

Autora: Abigail Iacobellis Lobo

C.I: V – 23.497.494

Tutora: Prof. Ysbelia M. Obregón D.

RESUMEN

Ruellia tuberosa es una planta que se utiliza en la medicina popular por sus propiedades diuréticas, antidiabéticas, antipiréticas, analgésicas y antihipertensivas. El objetivo de esta investigación fue confirmar la relación entre la composición química de los extractos de las hojas de *Ruellia tuberosa* y la actividad antibacteriana en cepas Gram positivas y Gram negativas de referencia internacional. Los extractos se obtuvieron de las hojas secas y molidas a través del método de reflujo, utilizando hexano y etanol como solventes. En el tamizaje fitoquímico se determinó la presencia de triterpenos y esteroides en el extracto de hexano y esteroides en el extracto de etanol. La concentración empleada para la actividad antibacteriana fue de 1000 ppm, por el método de difusión en agar del disco (Kirby-Bauer). El extracto de etanol de las hojas de *Ruellia tuberosa* tuvo acción antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, observando un halo de inhibición de 7 milímetros (mm).

Palabras claves: Acanthaceae, *Ruellia tuberosa*, tamizaje fitoquímico, actividad antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

Los árboles y la vegetación urbana en general aportan estabilidad a los ecosistemas, además tienen gran importancia en la actualidad por su uso en la medicina alternativa; sin embargo, se debe determinar la composición química a través de procesos con diferentes solventes de extracción los cuales permitan que la obtención de los mismos se realice con eficacia, rapidez y bajo costo. La fitoquímica es la ciencia responsable de los estudios de cada grupo de plantas, desde su estructura molecular hasta sus actividades biológicas (Sharapin, 2000).

Los productos naturales son reconocidos como fitofármacos, es decir, compuestos que igualan el nivel de los fármacos en su síntesis. Por tal motivo se realizan estudios acerca de la actividad antibacteriana de las plantas, donde estas tienen la capacidad de eliminar o inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias patógenas, haciendo su efecto sin dañar el organismo (Vivot, Sánchez, Cacik y Sequín, 2012).

Actualmente la resistencia de antibióticos se ha convertido en una amenaza para la salud de los seres humanos a nivel mundial, constituye un problema que se ha agudizado cada vez más por el uso inadecuado y abuso de los agentes antibióticos (OMS, 2016).

En base a la revisión literaria se evidencia que existen diferentes géneros de plantas que presentan propiedades antibacterianas en su composición química, siendo un ejemplo el género *Ruellia*. Taxonómicamente pertenece a la familia Acanthaceae, su especie *R. tuberosa* es originaria de Jamaica y se ha extendido en gran parte de América. *Ruellia tuberosa* se conoce comúnmente como la yuquilla, es una planta de alta potencialidad en su uso etnofarmacéutico (Ciangherotti, Maldonado, Orsini, Perdomo, Álvarez, Salazar e Israel, 2013).

Diversas investigaciones han demostrado que *Ruellia tuberosa* presenta gran variedad de compuestos químicos que le confieren actividad biológica a nivel cardiovascular, antibacteriano, hipoglucemiante, entre otras. Estudios confirman el efecto antioxidante de *R. tuberosa* L en el daño renal inducido por diabetes (Ciangherotti, Maldonado, Orsini, Perdomo, Alvarez, Salazar e Israel, 2013). El principal objetivo de este estudio se refiere a Confirmar la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos de las hojas de *Ruellia tuberosa* en cepas Gram positivas y Gram negativas.

Este trabajo está estructurado siguiendo las normas APA a través de cinco capítulos; el Capítulo I está titulado como El Problema, se encuentra representado por el Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II se titula como Marco Teórico, dentro de este capítulo se encuentran los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases teóricas, Definición Operacional de Términos, Hipótesis y Operacionalización de las Variables. El Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Instrumento de Recolección, Metodología o Procedimientos de la Investigación y Diseño de Análisis conforman el Capítulo III titulado Marco Metodológico. Resultados y Conclusiones se titula el Capítulo IV, finalmente el Capítulo V Conclusiones y Recomendaciones.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Los antibióticos son medicamentos utilizados para tratar infecciones bacterianas, actualmente la resistencia de antibióticos se ha convertido en una amenaza para la salud de los seres humanos a nivel mundial. La resistencia antibacteriana constituye un problema de salud pública que se ha agudizado cada vez más por el mal uso o abuso de los agentes antibióticos, trayendo como consecuencia la mutación bacteriana limitando la eficacia de los medicamentos y causando fracaso terapéutico significativo; a su vez, incrementando los costos médicos y aumentando el índice de mortalidad (OMS, 2016).

En América Latina la falta de leyes reguladoras permite distribuir y vender los antibióticos libremente sin prescripción médica y la tarea de control en la región es difícil; por lo tanto, al no existir normas reguladoras sobre los antibióticos los consumidores pueden obtenerlos en cualquier lugar y por consiguiente la automedicación (OPS, 2004).

En Venezuela se han documentado cambios en la epidemiología de las infecciones nosocomiales, además de los estudios del Grupo Venezolano de Resistencia Bacteriana (GVRB), el equipo de trabajo del Laboratorio de Biología de Plásmidos del Instituto de Biología Experimental de la Universidad Central de Venezuela ha realizado investigaciones sobre la caracterización de plásmidos de bacterias procedentes de diferentes ambientes del país. Los estudios concluyen que las infecciones por bacterias resistentes a los antibióticos constituyen un problema de salud importante, especialmente las

causadas por cepas de *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Enterococcus* spp. (Rivas y Alonso, 2011).

Las bacterias pueden evadir los efectos letales de los antibióticos a través de varios mecanismos, lo que se espera actualmente son agentes antibacterianos de acción novedosas con la finalidad de contrarrestar la resistencia de las bacterias. Las fuentes naturales pueden ayudar a la obtención de varias sustancias con fines terapéuticos alternativos de bajo costo y seguros a la hora de emplearlos (Coy y Acosta, 2013).

Existen diferentes géneros de plantas que presentan propiedades antibacterianas gracias a su composición química, siendo las plantas del género *Ruellia* un ejemplar a evaluar debido a sus diversos metabolitos secundarios reportados. Estudios han demostrado que *Ruellia tuberosa* L. tiene las cualidades para ser una valiosa alternativa medicinal al poder regenerarse *in vitro* en organogénesis directa a través de un medio de cultivo con todos los nutrientes necesarios para su crecimiento. Los autores de esta investigación concluyeron que este protocolo podría ser utilizado para la conservación y la propagación clonal de esta planta medicinal tradicionalmente importante (Lakshmanan y Jothi, 2015).

Una vez descrita la situación del problema de estudio, la autora elaboró el siguiente enunciado holopráxico: ¿Cuál es la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos de las hojas de la *Ruellia tuberosa*., en cepas de referencial internacional?

Justificación e Importancia de la Investigación

Las plantas utilizadas con sabiduría son capaces de restituir fuerzas, revertir condiciones físicas adversas procurando alivio y bienestar a través de sus principios activos. Son organismos eucariontes multicelulares, autótrofos por fotosíntesis, posee paredes celulares de celulosa, órganos reproductores pluricelulares, alternancia de generaciones y adaptados a vivir en la tierra. Además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa (Ávalos y Pérez, 2009).

Los metabolismos secundarios o productos naturales provienen de la ruta de biosíntesis del metabolismo primario del carbono, estos se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos y presentan propiedades biológicas. Muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes por lo que también reciben la denominación de productos naturales (García y Pérez, 2009). Contribuyen a erradicar la resistencia bacteriana debido a la composición que presentan; por tal motivo se ha recurrido a la medicina alternativa como ayuda a las enfermedades nosocomiales (Coy y Acosta, 2013).

La resistencia de los patógenos hacia los antibióticos es muy común debido a que no existe un sistema de control que regule la automedicación en personas, creando mutaciones en las bacterias y haciendo difícil su eliminación. Las razones anteriores justificaron porqué se eligió trabajar con la especie botánica *Ruellia tuberosa*. También se identificaron las siguientes razones: las especies botánicas se utilizan contra la resistencia antibacteriana de microorganismos patógenos que puedan causar daños a los seres vivos (Vivot y cols., 2012). La composición química de las plantas nos proporciona información acerca de cómo están estructuradas desde el punto de vista

molecular y biológico así como también los metabolitos presentes que interviene en organismos biológicos (Sharapin, 2000).

La investigadora decidió focalizar su interés sobre el evento de estudio composición química y actividad antibacteriana desde el punto de vista analítico por dos razones: debido a los estudios previos de la planta que reportan amplia acción farmacológica que puede ser empleada en diferentes enfermedades. Según la literatura existe gran diversidad de plantas que poseen actividad antibacteriana siendo una de estas *Ruellia tuberosa* que además posee propiedades antioxidantes, hipoglucemiantes, analgésicas y antiinflamatorias (Ciangherotti, Maldonado, Orsini, Perdomo, Álvarez, Salazar e Israel, 2013; Chih-Yuan, Ru-Hai, Yangminig, Wen-Chang, Da-Wei, James, Yu-Fang, Wen-Chang, y Szu-Chuan, 2019).

www.bdigital.ula.ve

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la relación entre la composición química de los extractos de las hojas de *Ruellia tuberosa* y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Ruellia tuberosa* L. mediante la técnica de reflujo en caliente.
- Analizar la composición química de los extractos obtenidos (hexano y etanol) de las hojas de *Ruellia tuberosa* mediante pruebas químicas preliminares de laboratorio.
- Comprobar la actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de *R. tuberosa* sobre cepas Gram positivas y Gram negativas por el método difusión en agar del disco (Kirby-Bauer).

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

La presente investigación tuvo como alcance conocer los compuestos que están presentes en los extractos de las hojas de *Ruellia tuberosa* y la actividad antibacteriana de la planta mencionada con la finalidad de brindar alternativas terapéuticas frente a diversas cepas bacterianas.

Limitaciones de la Investigación

A medida del progreso de este trabajo de investigación las limitaciones técnicas estuvieron relacionadas con la suspensión de actividades por motivo de la pandemia fallas de los servicios públicos tales como energía eléctrica, gas y agua; aunado a esto, los altos costos de reactivos y materiales utilizados en el procedimiento experimental de la investigación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Castillo (2021), realizó un estudio acerca de la actividad antibacteriana y antioxidante de *Cordia dodecandra*, *Melochia nodiflora* y *Ruellia nudiflora* y aislamiento de los metabolitos secundarios. El objetivo de la investigación fue evaluar la actividad antibacteriana y antioxidante de las plantas *Cordia dodecandra*, *Melochia nodiflora* y *Ruellia nudiflora* y aislar y elucidar estructuralmente los metabolitos secundarios de la planta con mayor actividad biológica. Para la elaboración de este estudio se usaron todas las partes de la planta *R. nudiflora*, las cuales se llevaron a secado para posteriormente ser trituradas y de esta manera obtener los extractos de la plantas a través del método de maceración con metanol. Se probó la actividad antibacteriana del extracto a concentraciones de 5, 10 y 15 mg utilizando el método difusión en agar en pozo. El extracto de metanol mostró ser activo contra cepas de *Klebsiella* spp. (7 mm), por otro lado el extracto metanólico de la planta entera tuvo acción inhibitoria frente a *Streptococcus pyogenes* (20 mm). De todos los extractos probados en este estudio, *R. nudiflora* fue el que menor actividad tuvo; sin embargo, fue el único activo contra *S. pyogenes*, por lo que éste es el primer reporte de esta especie contra este patógeno.

En el 2019, Amajida, Purwoko y Susilowati, estudiaron la actividad antibacteriana de los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Ruellia tuberosa* contra *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. El objetivo del estudio fue determinar la actividad antibacteriana y concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de las hojas de *R. tuberosa* frente a *E. coli* y *B. subtilis* y su

composición fisicoquímica. Los extractos de hexano y etanol se obtuvieron a través de maceración y reflujo. El análisis fitoquímico del extracto de hexano demuestra que contiene solo terpenoides, mientras que el del extracto etanólico revela la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas y glucósidos. Las concentraciones del extracto de las hojas de *R. tuberosa* empleadas en la actividad antibacteriana fueron: P1 (125 mg/mL), P2 (250 mg/mL), P3 (500 mg/mL), P4 (1000 mg/mL) y P5 (2000 mg/mL). El control positivo fue un disco de Cloranfenicol (30 g), mientras que el control negativo utilizado fue el disolvente (DMSO). El método de difusión en agar utilizó un disco de papel para realizar la prueba de actividad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria del extracto se determinó mediante el método de dilución. El extracto de etanol presentó mejor actividad antibacteriana en todas las concentraciones frente a *E. coli* y *B. subtilis* que el extracto de hexano. La CMI del extracto de etanol contra *E. coli* fue de 500 mg/mL con un porcentaje de inhibición del 99,1 % mientras que para *B. subtilis* fue de 1000 mg/mL con un porcentaje de inhibición del 99 %.

Ramadhan, Sabarudin y Safitri (2018), realizaron una investigación titulada actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos hidroetanólicos de *Ruellia tuberosa* L. En dicho estudio realizaron la actividad antibacteriana y análisis fitoquímico de extractos hidroetanólicos de las raíces de *R. tuberosa* L, probados en bacterias Gram negativas y Gram positivas como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* respectivamente. Los metabolitos obtenidos en el análisis cualitativo fitoquímico fueron esteroides, flavonoides y compuestos fenólicos. Para la actividad antibacteriana se empleó el método de pozo modificado, donde se siembra la placa de agar nutritivo con diferentes concentraciones del extracto 100 %, 75 %, 50 %, 20 % y 10 %. Los antibióticos de elección para el control positivo fueron Cloranfenicol y Ampicilina. Los resultados indicaron que los extractos a bajas concentraciones (10 %)

inhibieron a las cepas de *E. coli* (7 mm) y *S. aureus* (7 mm) demostrado que el extracto de raíz hidroetanólico de *R. tuberosa* L. posee actividad antibacteriana que podría impedir el crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*.

www.bdigital.ula.ve

Antecedentes Históricos

El hombre desde la antigüedad, buscaba la cura de sus enfermedades de manera instintiva en la naturaleza, con el tiempo se descubrió el uso específico de las plantas medicinales para el tratamiento de ciertas enfermedades. En 1619 se conoció el primer registro de alcaloides en tratamiento exitoso de la malaria a través del extracto de corteza de Quina. Un descubrimiento sudamericano fue la eficacia de la raíz de Ipecacuanha en la disentería amebiana. A principios del siglo XX la quinina y emetina proporcionaban la única quimioterapia curativa conocida (Finch, Greenwood, Ragnar y Whitley, 2010).

El estudio de las plantas en las últimas décadas ha permitido identificar moléculas con la posibilidad de actuar como nuevos fármacos; según la base de datos la familia Acanthaceae se sitúa en el grupo de las Asteridae, perteneciente al orden Lamiales. Acanthaceae proviene del latín *acanthus* (acanto), planta mencionada por escritores romanos como Plinio y Virgilio, término que proviene del griego *akanthos* (cierto árbol espinoso de Egipto, uña de oso, planta cuyas hojas recuerdan las garras de un oso) (McDade, Masta, Moody y Waters, 2000). *Ruellia tuberosa* fue estudiada y considerada como una planta de uso medicinal, al demostrarse que posee propiedades curativas (Correa, Galdames y De Stapf, 2004; base de datos de la etiología de las palabras de Chile, 2022).

Bases Teóricas

Familia Acanthaceae

Las Acanthaceas son plantas dicotiledóneas representada por especies con flores conspicuas y un llamativo follaje, por otra parte se pueden distinguir en las hojas opuestas decusadas, nudos hinchados, línea interpeciolar más o

menos marcada, presencia de brácteas conspicuas, fruto cápsula, y carencia de plantas organolépticas como olor o látex. La gran mayoría de esta familia es de porte herbáceo o arbustivo pocos son los géneros que presentan especies arbóreas ya sean árboles pequeños o grandes, mientras que existe solo un reducido grupo que son exclusivamente lianas o enredaderas (León, 2006).

A lo largo del Neotrópico, posee una gran riqueza de especies siendo México y Centro América las porciones mejores inventariadas. Asimismo, América del Sur es considerada como una zona rica en especies, principalmente la parte norte de Argentina, Venezuela, Ecuador, Bolivia, Colombia y Perú (León, 2006).

Existen 4000 especies y 229 géneros a nivel mundial, es una de las 12 familias de angiospermas más diversas en el mundo. Mayormente terrestres, raramente acuáticas. Dentro de los géneros más importantes se encuentran: *Justicia* (400), *Barleria* (250), *Strobilanthes* (250), *Ruellia* (200), *Thunbergia* (150), *Aphelandra* (150); hasta el 2011 Venezuela estaba representada por 36 géneros y unas 149 especies ampliamente distribuidas, el territorio de Mérida está ocupado por 11 géneros y 12 especies siendo *Ruellia* el segundo género con mayor disposición (Tabla 1) (McDade, Masta, Moody y Waters, 2000; Lujan, Gutiérrez, Gavira y Aranguren 2011).

En el mundo cumple un importante rol ecológico al poseer un rango de adaptaciones ecológicas y formas florales 14 con una gran diversidad de síndromes de polinización y cambios de polinizador (Lujan, Gutiérrez, Gavira y Aranguren, 2011).

Tabla 1. Géneros y especies de la familia Acanthaceae encontradas en el estudio florístico preliminar en la ciudad de Mérida, Venezuela.

Especies	Nombre común	Hábitos
<i>Aphelandra tomentosa</i>	Gallito	Trepadora
<i>Asystasia gangética</i>	-	Hierba
<i>Bravaisia integerrima</i>	-	Árbol
<i>Hypoestes phyllostachya</i>	Salpicada	Hierba
<i>Megaskepasma erythrochlamys</i>	San Juan	Arbusto
<i>Pachystachys lutea</i>	Camarón	Sufrútife
<i>Pseuderanthemum carruthersii</i>	-	
<i>Ruellia simplex</i>	-	Hierba
<i>Ruellia tuberosa L</i>		Hierba
<i>Thunbergia alata</i>	-	Trepadora
<i>Hunbergia grandiflora</i>	Isabel segunda	Trepadora
<i>Trichanthera corymbosa</i>	-	Árbol

Tomado y modificado de Lujan, Gutiérrez, Gavira y Aranguren, 2011.

Se ha determinado una variedad de metabolitos secundarios en esta familia (alcaloides, compuestos fenólicos, cumarinas, taninos, flavonoides, glicósidos y triterpenos/esteroles), ocupando así un amplio campo en la medicina tradicional al utilizarse como antidepresivo, diurético (Shanmugasundaram, 2006; Lujan, Gutiérrez, Gavira y Aranguren, 2011; Chasin y Figueroa, 2016; Mora y Bustamante, 2017). Extractos crudos de plantas pertenecientes a la familia Acanthaceae mostraron actividad inhibitoria en un 40 % frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. (Meurer, McBeth, Hallihan y Delph, 2008).

Estudios confirman que el extracto alcohólico de las hojas de la especie *Aphelandra guayasii* Wassh posee actividad antibacteriana (Chasin y Figueroa, 2016). La especie *Justicia secunda* Valh. es muy utilizada en la medicina indígena colombiana por poseer actividad antioxidante, antihipertensiva, normoglucemiante, antifúngica, antibacteriana y antianémica (Domínguez, 2020).

En la Universidad de Los Andes en Venezuela, se determinó la actividad antiletal *in vivo* del extracto acuoso de *Barbelia lupulina*, una Acanthaceae que actúa sobre el veneno de la Cascabel tropical (*Crotalus durissus*) (Urdaneta y Páez 2009).

Género *Ruellia*

Según sus características botánicas está representado por hierbas perennes o generalmente arbustos pubescentes, consistolitos, hojas opuestas, enteras, raramente crenadas o dentadas. Gozan de flores pediceladas o bibractadas, sésiles o subsésiles, solitarias o fasciculadas; algunas presentan flores cleistógamas frecuentes, pequeñas y tubulosas. Su cáliz es profundamente pentapartido con los segmentos lanceolados, agudos, subiguales, son raros los laterales unidos con los anteriores. Su corona contiene un tubo basal corto o largo, ensanchado en una garganta cilíndrica o infundibuliforme, a veces se encuentra inflada. Su ápice posee un estilo subulado, bilobado, con el lóbulo posterior breve. Tienen semillas las cuales son de forma lenticulares con pubescencia higroscópicas en toda su superficie (Ezcurra y Azkue, 1989).

Su distribución es pantropical y se han descrito 200 especies, de las cuales 30 se encuentran en Venezuela (McDade, Masta, Moody y Waters, 2000; Bermúdez, 2015). Su descripción taxonómica se presenta en la tabla 2.

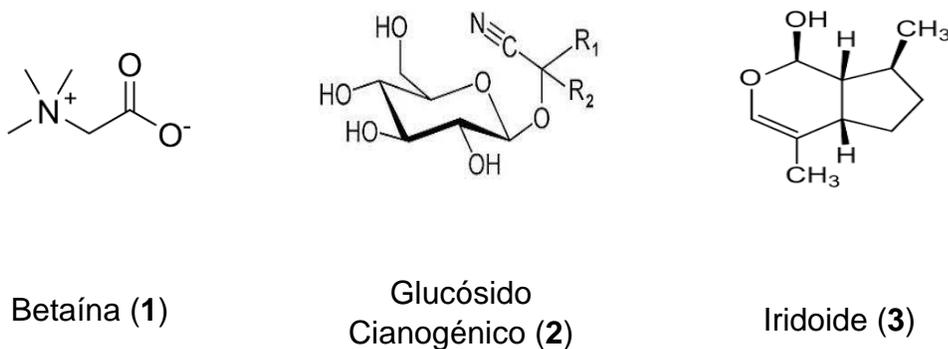
Tabla 2. Taxonomía del Género *Ruellia*

Clase	Equisetopsida C. Agardh
Sub clase	Magnoliidae Novák ex Takht
Super orden	Asteranae Takht.
Orden	Lamiales Bromhead
Familia	Acanthaceae Juss.

Tomado y modificado de Trópicos.org

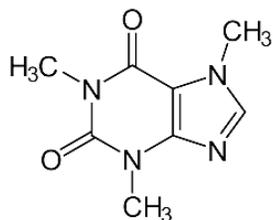
El género *Ruellia* se caracteriza por presentar una gama variada en metabolitos como: betaína (1), glucósido cianogénico (2), iridoides (3), alcaloide (4), flavonoide (5), lignano (6), terpeno (7), por lo que es complicado identificar un marcador quimiotaxonómico del mismo (Figura 1). Por ejemplo, la betaína N-metilnicotinoato (betaína del ácido N-metilnicotínico) (8) y el glicósido cianogénico taxifilina (9) han sido detectadas en cinco especies del género *Ruellia*: *R. dipteracanthus*, *R. graecizans*, *R. portellae*, *R. rosea*, y *R. tweediana* (Figura 2) (Bermúdez, 2015).

Figura 1. Metabolitos secundarios aislados del género Acanthaceae

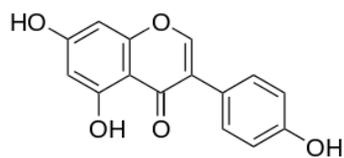


Tomado y modificado de Bermúdez, 2015.

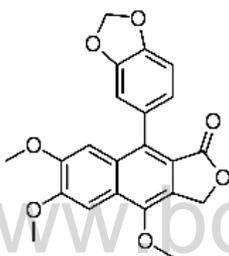
Figura 1. Metabolitos secundarios aislados del género *Ruellia*
(Continuación).



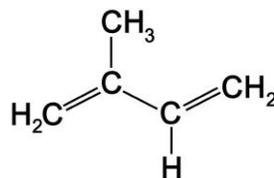
Alcaloide (4)



Flavonoide (5)



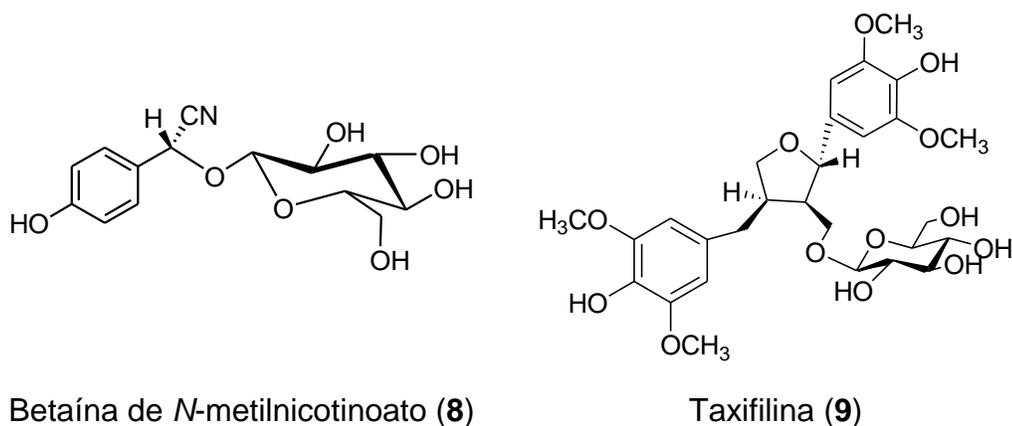
Lignano (6)



Terpeno (7)

Tomado y modificado de Bermúdez, 2015.

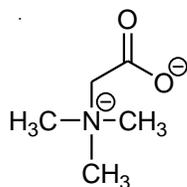
Figura 2. Metabolitos detectados en *Ruellia*: *R. dipteracanthus*, *R. graecizans*, *R. portellae*, *R. rosea*, y *R. tweediana*.



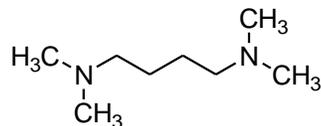
Tomado y modificado de Bermúdez, 2015.

De la especie *R. rosea* se ha reportado la presencia de la betaína N,N,N-trimetilalanoato (**10**) y el alcaloide N,N,N',N'- tetrametilputrescina (**11**) (Figura 3). En ninguna de las cinco especies mencionadas anteriormente han sido detectados iridoides ni la dhurrina (diastereoisómero de taxifilina). Del extracto de metanol de la especie *R. praeterminsa* se ha reportado el iridoide ácido 8-epi-deoxilogánico (**12**) junto con taxifilina (**9**) (Figura 4). Por otra parte, las propiedades estrogénicas y colinérgicas del extracto de metanol fueron asociadas a la presencia de esteroides (β -sitosterol (**13**), estigmasterol (**14**)) e iridoides ácido 8-epi- deoxilogánico (**12**), respectivamente (Figura 3) (Bermúdez, 2015).

Figura 3. Metabolitos aislados de la especie *Ruellia rosea*.



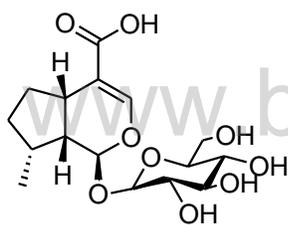
Betaína de *N,N,N*-trimetilalanoato
(10)



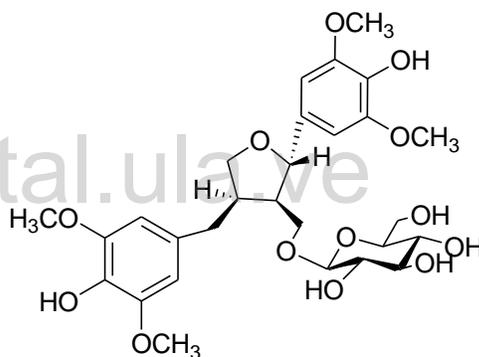
N,N,N',N'-tetrametilputrescina
(alcaloide alifático) (11)

Tomado y modificado de Bermúdez, 2015.

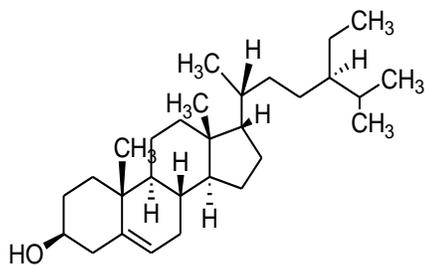
Figura 4. Metabolitos aislados del extracto de metanol de la especie *R. praeterminsa*.



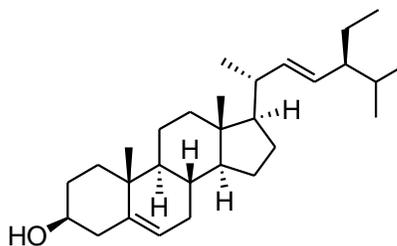
Ácido
8-*epi*-deoxilogánico
(iridoide) (12)



Taxifilina (9)



β -sitosterol (13)

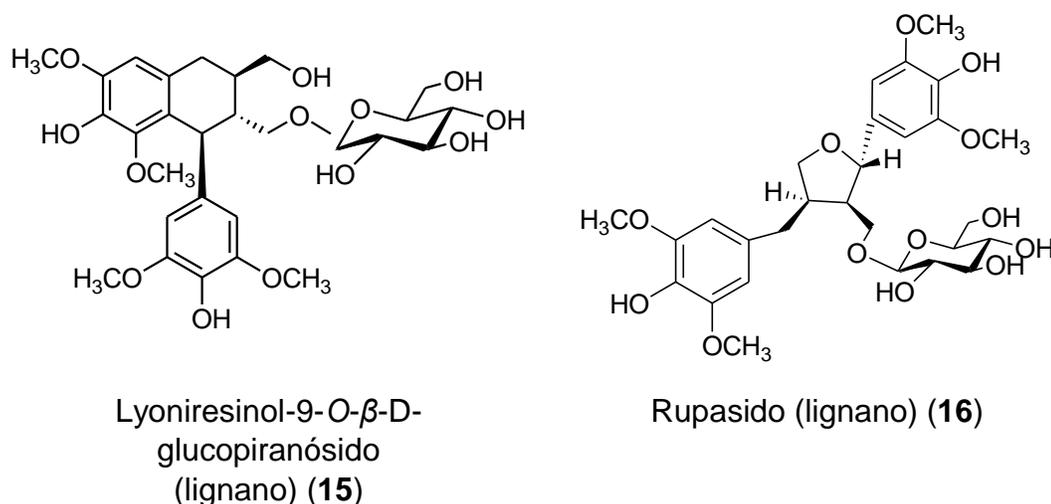


Estigmasterol (14)

Tomado y modificado de Bermúdez, 2015.

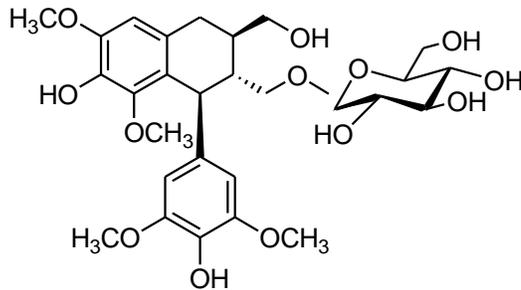
Los lignanos, lyoniresinol-9-O- β -glucopiranosido (**15**) y rupasido (**16**) han sido aislados y caracterizados de la fracción de n-butanol de la especie *R. patula* (Figura 5). Lyoniresinol-9-O- β -glucopiranosido (**15**) fue aislado de igual forma de la especie *R. brittoniana*. De ésta última especie se aisló ácido *p*-metoxibenzóico (**17**) y el dímero de 2,4-dienhexanoato de dimetilo (**18**), ambos provenientes de la fracción de acetato de etilo (Figura 6). Galactosa y α -etilgalactosa (**19**) fueron aislados de la fracción de n-butanol de la especie *R. patula* (Figura 5). Estos compuestos incrementaron la presión sanguínea en ratas anestesiadas dependiente de la dosis. Fue otro derivado de galactosa, 2-O- α -galactopiranosilglicerol hexaacetato (**20**) aislado de la especie *R. brittoniana* (Figura 6), el que disminuyó la presión sanguínea (-13,6% \pm 3,5), en ratas anestesiadas, a 50 μ g/Kg (Bermúdez, 2015).

Figura 5. Metabolitos aislados y caracterizados de la fracción de n-butanol de la especie *R. patula*.

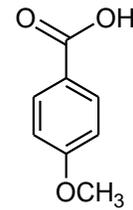


Tomado y modificado de Bermúdez, 2015.

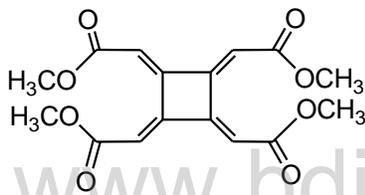
Figura 6. Metabolitos aislados de la especie *R. brittoniana*.



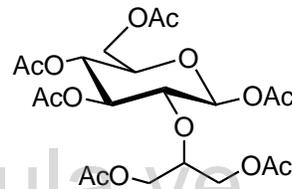
Lyoniresinol-9-O- β -D-glucopiranosido (lignano) (**15**)



Ácido *p*-metoxibenzoico (**17**)



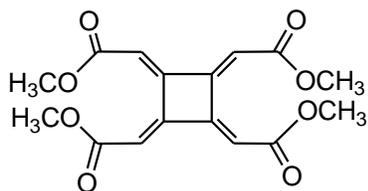
Dímero de 2,4-dieno hexanoato de dimetilo (**18**)



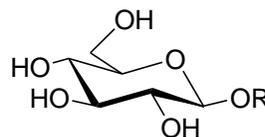
2-O- α -D-galactopiranosilglicerol hexacetato (azúcar) (**20**)

Tomado y modificado de Bermúdez, 2015.

Figura 7. Metabolitos aislados de la fracción de n-butanol de la especie *R. patula*



Dímero de 2,4-dieno hexanoato de dimetilo (**18**)



R= H α -galactosa
R= Etilo α -etil-galactosa (**19**)

Tomado y modificado de Bermúdez, 2015.

Especie *Ruellia tuberosa*

La especie *Ruellia tuberosa* L. fue reportada por primera vez por Carlos Linneo en 1753, es una planta arvense perteneciente a la familia Acanthaceae, también es conocida como *Ruellia picta* y *Ruellia clandestina*; es originaria de centro América y distribuida en lugares como: La India, América del Sur, Sureste de África y Sureste de Asia (Bermúdez, 2015).

Es una planta herbácea, dicotiledónea, ruderal de 30 cm a 60 cm de altura, de tallo cilíndrico, erecto con hojas opuestas, descusadas, elípticas, perinnervias de 6 cm a 8 cm de largo y 4,2 cm de ancho, cuyo peciolo es de 2 cm de raíces tuberosas y fusiformes. Sus flores son de color púrpura con 5 lóbulos subiguales de 12 mm a 14 mm, pedúnculo verde glabro, cáliz verde, tiene 4 estambres y pistilo. Sus frutos son una cápsula dehiscente de 20 mm de longitud con una forma oblonga elíptica con más de 20 semillas circulares, de color marrón, sensibles a la humedad. Figura 8 (Ezcurra y Azkue, 1989).

Figura 8. *Ruellia tuberosa*



Tomado y modificado de Choathani, Patel, Mishra y Vaghasiya, 2010.

Según el sistema de taxonomía botánica la especie *R. tuberosa* está clasificada como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Taxonomía de la especie *Ruellia tuberosa*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Acanthaceae
Subfamilia	Acanthoideaea
Tribu	Ruellieae
Género	<i>Ruellia</i>
Especie	<i>Ruellia tuberosa</i>

Tomado y modificado de Trópicos.org

En esta especie se han aislado e identificado metabolitos secundarios tales como: flavonoides, terpenoides, alcaloides y fenoles totales que justifican

la potencialidad terapéutica de esta planta y a su vez actividades biológicas: antioxidante, antiplasmódica, anticancerígenas, analgésicas, antifúngica, antiinflamatoria, diurética, antihipertensiva y antidiabética (Riera, Sanabria, Rodríguez, Escalante y Valera, 2014; Phakeovila y Disadee, 2013; Bermúdez, 2015).

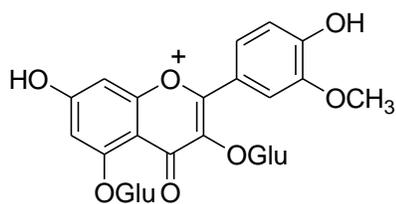
Dentro de los flavonoides que se han identificado en la especie *Ruellia tuberosa* podemos mencionar que en las hojas se encuentran: la apigenina (**21**) y luteolina (**22**) (Subramanian y Nair, 1974), mientras que de las flores se ha reportado malvidin-3,5-diglucosido (**23**) en cantidades apreciables. Del tubérculo de esta planta se ha obtenido el triterpeno lupeol (**24**). Figura 9. (Andhiwal y Chandra, 1985).

Figura 9. Flavonoides y triterpenos aislado de *R. tuberosa*.

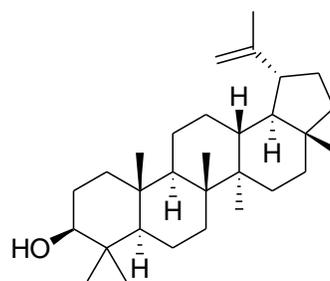


Apigenina (**21**)

Luteolina (**22**)



Malvidin-3,5-diglucosido (**23**)

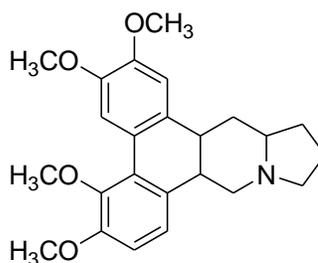


Lupeol (**24**)

Tomado y modificado de Andhiwal y Chandra, 1985.

De las partes aéreas de *R. tuberosa* aislaron e identificaron la tilocrebrina (**25**), un alcaloide de tipo fenantreno el cual se la ha atribuido propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias (Figura 10) (Arun, Giridharan, Suthar, Kulkari, Naik, Vlmurugan y Ram, 2008).

Figura 10. Alcaloide tipo fenantreno aislado de *R. tuberosa*.



Tilocrebrina (**25**)

Tomado y modificado de Arun, Giridharan, Suthar, Kulkari, Naik, Vlmurugan y Ram, 2008.

Producto Natural

Es toda sustancia de origen orgánico o inorgánico que se halle en la naturaleza que puede ser aislada y procesada por el hombre. El término mejorado significa cualquier producto natural en su condición de droga cruda, cuyo valor haya sido mejorado o perfeccionado mediante cualquier proceso físico. Esto no se refiere a productos que hayan sido artificialmente mezclados con otras sustancias o que la estructura molecular tal como se encuentra en la forma natural haya sido modificada (Albornoz, 1998).

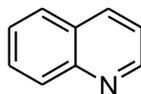
Los productos naturales son metabolitos secundarios que las plantas han desarrollado a lo largo de su evolución como mecanismos defensivos frente a patógenos. Estos compuestos desempeñan diversas funciones biológicas, incluyendo la regulación de mecanismos endógenos de defensa y la interacción con otros organismos (Gutiérrez y Estévez, 2009). Cada

metabolito secundario cumple funciones diferentes que se incluyen a continuación:

- **Alcaloides**

Los alcaloides son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que poseen en común tres características: solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y presentan actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos). Se encuentran en el 20% aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas. En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores como por ejemplo la quinolidina (**26**) (Figura 11). A dosis altas, los alcaloides resultan tóxicos, sin embargo, a dosis bajas tienen altos valores terapéuticos como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos (Ávalos y Pérez, 2009).

Figura 11: Estructura de un alcaloide



Quinolidina (**26**)

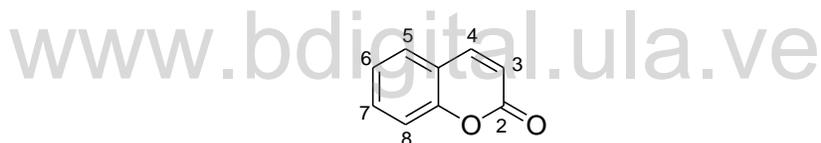
Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

- **Cumarinas**

Son compuestos químicos orgánicos que pertenecen a la familia de las benzopironas considerándose como un grupo de metabolitos secundarios de las plantas, aunque también se han encontrado en hongos y bacterias. Hay más de 1500 identificadas en más de 800 especies de plantas, que actúan

como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación (Domingo, 2003.) Las actividades biológicas registradas de las cumarinas, son entre otras, antitumoral, anti-arrítmicos, antiinflamatorios, antisépticos, analgésicos, contra la hipertensión, la osteoporosis, en tratamientos contra el asma y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Presentan actividad antimicrobiana, captan la radiación ultravioleta (UV) e inhiben la germinación. Dependiendo de su configuración, tienen habilidad para regular rutas celulares que se pueden usar para la prevención de cáncer. Además tienen influencia en el sistema nervioso central. La cumarina (**27**) tiene un sabor amargo y los animales la evitan siempre que pueden, pues produce hemorragias internas (Figura 12) (Sánchez, 2021).

Figura 12. Estructura básica de las benzopironas.



Cumarina (**27**)

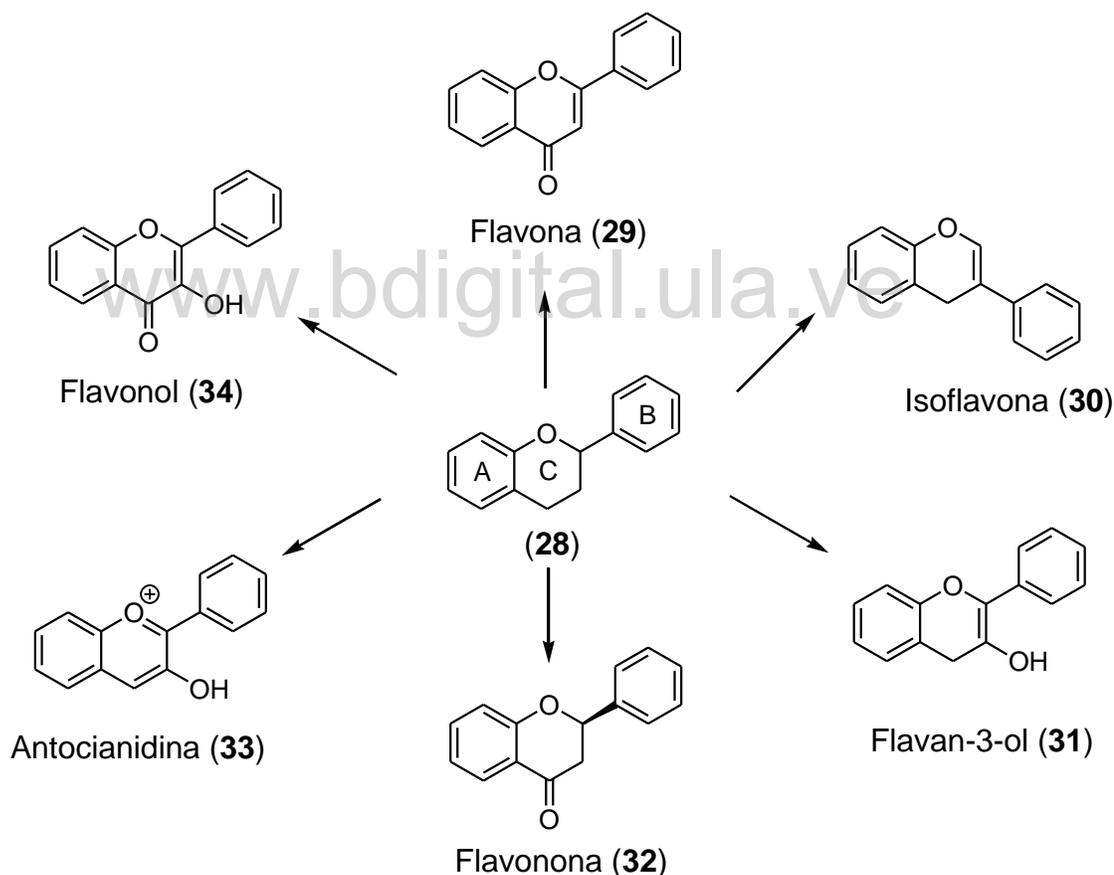
Tomado y modificado de Sánchez, 2021.

- **Flavonoides**

Es la clase más numerosa de los compuestos fenólicos. La palabra flavonoide deriva del latín flavus que significa amarillo. Son los responsables del color de las hojas de otoño, de los colores de algunos frutos y de muchas flores. Se biosintetizan a partir de la fenilalanina y de 3-malonil-CoA. Su producto es la estructura base y se cicla gracias a una enzima isomerasa. Se localizan principalmente en las partes aéreas de las plantas. Su distribución cuantitativa varía entre diferentes órganos y en diferentes poblaciones de una misma especie, esto se explica por la regulación de la expresión genética y la

interacción con factores ambientales como clima, altitud, nutrición y prácticas agrícolas. Al final del año 1989 se habían reportado más de 4000 estructuras. Para el 2014 se reportaron más de 8000. Las diferentes estructuras son el resultado de modificaciones en el anillo C (**28**) (flavona (**29**), isoflavona (**30**), flavan-3-ol (**31**), flavonona (**32**), antocianidina (**33**) y flavonol (**34**)) como se muestran en la figura 13 (Sánchez, 2021).

Figura 13. Cambios en el anillo C de la estructura general de los flavonoides.



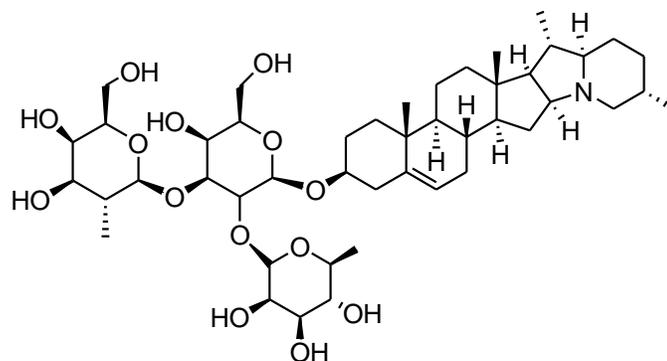
Tomado y modificado de Sánchez, 2021.

Sus principales efectos son a nivel de venas o capilares: disminuyen la permeabilidad y aumentan la resistencia. Algunos son diuréticos, antiespasmódicos, antiulcerosos, antiinflamatorios, antialérgicos, antihepatotóxicos, antitrombóticos y antivirales. Los flavonoides tienen efectos terapéuticos en la cardiopatía isquémica, la úlcera estomacal, la aterosclerosis, la diabetes y el cáncer. También se les atribuyen propiedades antimicrobianas y antifúngicas. Algunos se utilizan como colorantes. En general son no tóxicos de buena tolerancia pero de acción lenta (Sánchez, 2021).

- **Saponinas**

Las saponinas (35) son un grupo de glicósidos esteroidales o triterpenoides, dependiendo de la aglicona distribuidas en una gran variedad de plantas, se encuentran en más de 100 familias silvestres y cultivadas además de algunos organismos marinos. Se les conoce desde la antigüedad por su capacidad de formar espuma cuando se les agita con agua, también se caracterizan por su sabor amargo y por la hemólisis de eritrocitos. Muchas tienen propiedades farmacológicas por lo que se usan en fitoterapia, medicina popular y en la industria de cosméticos. Figura 14 (Sánchez, 2021).

Figura 14. Estructura de una saponina (35)

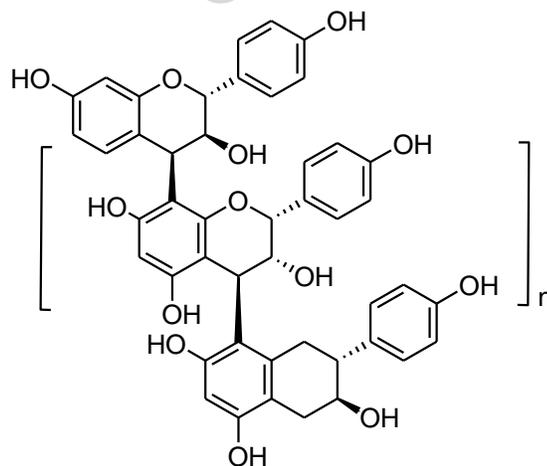


Tomado y modificado de Sánchez, 2021.

- **Taninos**

Los taninos (**36**) junto con las ligninas son los grupos más importantes de metabolitos secundarios en la defensa de las plantas, principalmente por sus propiedades derivadas de la estructura química que poseen (Figura 15). Tienen un ligero olor característico, sabor amargo y astringente, su color va desde el amarillo hasta el castaño oscuro. Expuestos al aire se tornan oscuros y pierden su eficacia para el curtido. Existen dos clases de taninos: taninos condensados también conocidos como proantocianidinas (flavan-3-ol) y los taninos hidrolizables los cuales son polímeros heterogéneos formados por ácidos fenólicos. Poseen actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos y levaduras y también muestran actividad contra parásitos como nemátodos gastrointestinales y helmintos (Sánchez, 2021).

www.bdigital.ula.ve **Figura 15.** Estructura de un tanino.



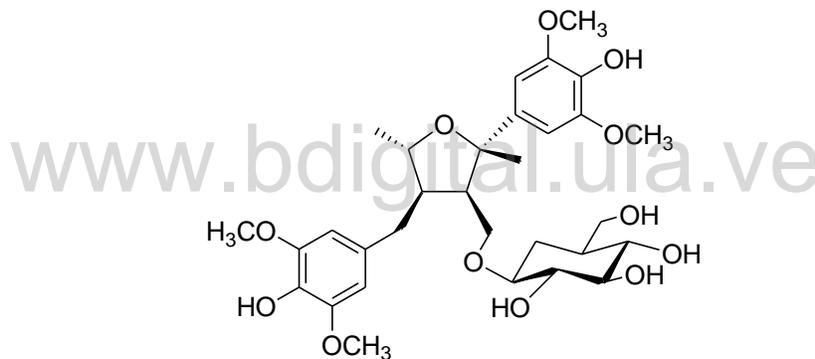
Tanino (36)

Tomado y modificado de Bermúdez, 2015.

- **Lignan**

Son compuestos químicos de bajo peso molecular, están presentes en muchas frutas y vegetales. Al igual que los flavonoides, los lignanos (**37**) poseen una débil actividad estrogénica compitiendo con los compuestos estrogénicos normales, impidiéndoles promover el crecimiento de tumores. Figura 16 (Chasquibol, Lengua, Delmás, Rivera, Bazán, Aguirre y Bravo, 2003).

Figura 16. Estructura de un lignano



Rupasido (**37**)

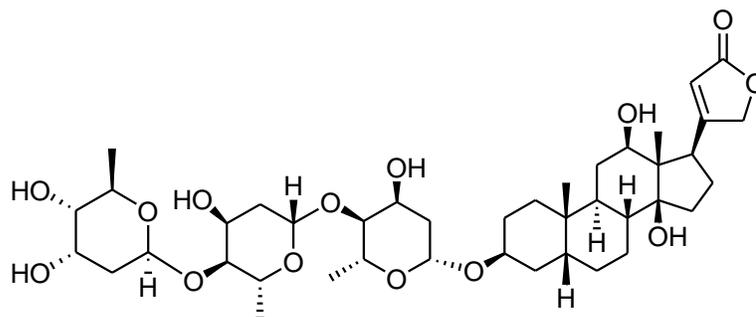
Tomado y modificado de Bermúdez, 2015.

- **Glicósidos cardiotónicos**

Los glicósidos son metabolitos que desempeñan importantes funciones. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos (**38**) y glicósidos. Figura 17 (Ávalos y Pérez, 2009). Se describió que los glucósidos cardiotónicos poseen beneficios sobre el corazón, ampliamente

utilizada en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca. Los efectos cardiotónicos derivan sobre el músculo cardiaco en relación dosis, ya que tienen un estrecho margen entre la dosis tóxica y la dosis terapéutica (Azcón y Talón, 2000).

Figura 17: Glicósido cardiotónico



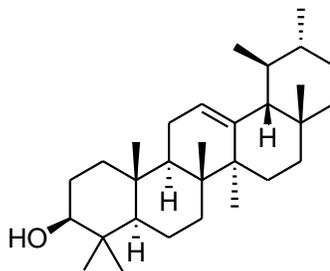
Digoxina (**38**)

Tomado y modificado de Sánchez, 2021.

- **Triterpenos**

Las amirinas, los ácidos oleanólicos y ursólico (comunes en las cubiertas protectoras de las plantas) y las cucurbitacinas son algunos de los triterpenos comunes presentes en las plantas. Las amirinas son un par de triterpenos pentacíclicos, que se nombran como α -amirina y β -amirina. Están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se han aislado a partir de una variedad de fuentes vegetales. La α -amirina (**39**) tiene efectos anticonceptivos, antiinflamatorios, hepatoprotector y gastroprotector. Figura 18 (Sánchez, 2021).

Figura 18. Estructura de un triterpeno



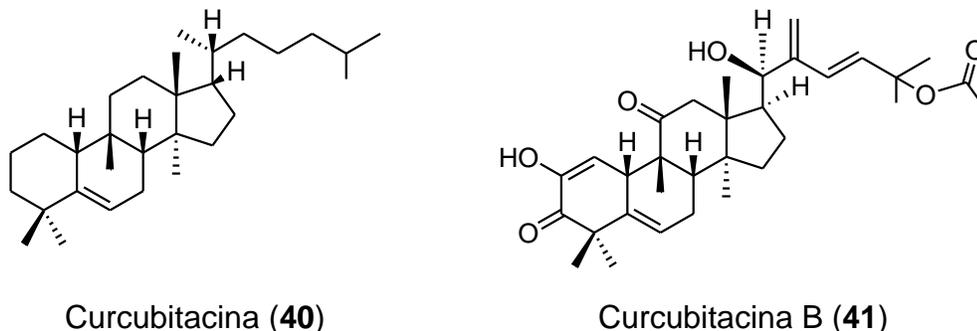
triterpeno α -amirin (**39**)

Tomado y modificado de Sánchez, 2021.

Los ácidos oleanólico y ursólico son ubicuos en las plantas (triterpenos pentacíclicos) y forman parte de la dieta humana debido a su presencia en hierbas medicinales y frutas. Se han estudiado las propiedades antibacterianas del ácido ursólico y los resultados obtenidos contra diferentes cepas de bacterias lo hacen un prototipo para nuevos antibióticos principalmente contra bacterias (Sánchez, 2021).

Las cucurbitacinas (**40-41**) son triterpenoides que se producen en las cucurbitáceas y son responsables del sabor amargo y de la toxicidad de algunas especies. Su estructura es altamente oxigenada y poseen un esqueleto común que incluye un grupo gem-dimetilo en C-4 y otros metilos en C-9 y C-14. Todas las cucurbitacinas también poseen un doble enlace C5-C6 y un metilo en C9 en lugar de C10. El esqueleto se puede encontrar libre o glicosilado (Figura 19). En un inicio se aislaron como los principios amargos de las cucurbitáceas. Tienen actividad citotóxica, anticancerígena, son purgantes, antiinflamatorios y actúan contra la fertilidad (Sánchez, 2021).

Figura 19. Esqueleto básica de cucurbitacinas

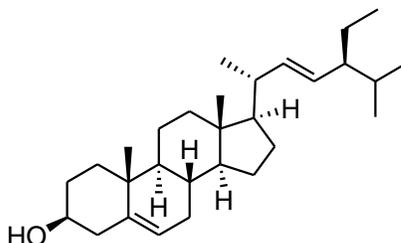


Tomado y modificado de Sánchez, 2021.

- **Esteroles**

Están presentes en la membrana celular y proporcionan resistencia de la membrana al estrés, realizan funciones de protección, estructurales, transporte y señalización. Sus estructuras son diversas, comúnmente se encuentran mezclas de β -sitosterol (C29), campesterol (C28) y estigmasterol (C29) (14) (Figura 20). La cantidad de esteroles en las células vegetales es constante generalmente para cada especie y en promedio son 23 miligramos (mg) de esteroles totales por 1 gramo (g) de peso seco. Poseen propiedades medicinales, agroquímicas, antitumorales, inmunosupresoras, hepatoprotectoras, antibacterianas, reguladoras del crecimiento vegetal, hormonas sexuales, antihelmínticos, citotóxicos y cardiotónicos. (Sánchez, 2021).

Figura 20: Estructura de un esteroles



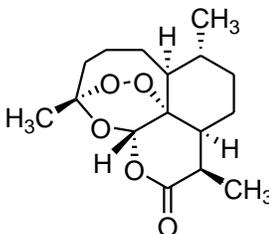
Estigmasterol (14)

Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

- **Lactonas sesquiterpénicas**

Son metabolitos secundarios terpenoides que contienen 15 átomos de carbono con estructura isoprenoide y un grupo funcional lactona (42) (Figura 21). Existen varios subtipos según el arreglo de sus esqueletos, los más representativos son los germacranólidos, eudesmanólidos y los guayanólidos. Subtipos menos representativos son los helenanólidos y pseudoguayanólidos. La mayoría de las lactonas sesquiterpénicas contienen un metileno anexo al ciclo conjugado con un grupo carbonilo, sus actividades biológicas se atribuyen a este grupo de átomos. Las lactonas sesquiterpénicas se encuentran en varias familias de Angiospermas, incluyendo Acanthaceae, Amaranthaceae, Apiaceae, Aristolochiaceae, Asteraceae, Bombacaceae, Burseraceae, Coriariaceae, Chloranthaceae, Euphorbiaceae, Illiciaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Orchidaceae, Polygonaceae y Winteraceae (Sánchez, 2021).

Figura 21. Lactona sesquiterpénica



Artemisina (**42**)

Tomado y modificado de Sánchez, 2021.

Rutas Biosintéticas de los Metabolitos Secundarios

Las rutas biosintéticas que dan lugar a metabolitos de uno y otro grupo (Esquema 1) están entrelazadas debido a que productos del catabolismo de un tipo de principios pueden ser inicio de la génesis de otro. Un compuesto determinado puede ser utilizado en el metabolismo primario o secundario dependiendo de la especie, etapa vegetativa y del medio ambiente en que se encuentre. Las variables climáticas que afectan el rendimiento en principios activos y metabolitos secundarios de las plantas medicinales son: temperatura, humedad, radiación solar en sus dos vertientes, luz y calor, régimen de vientos y química del suelo (Domínguez, 1979).

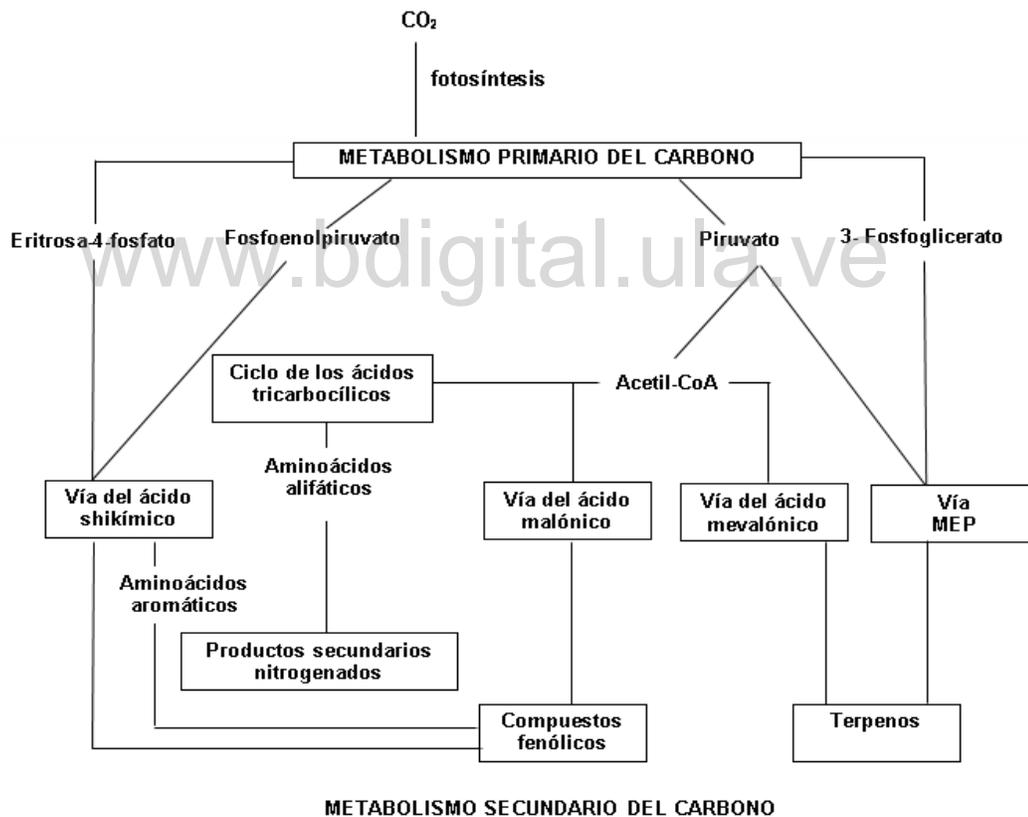
La competencia por nutrientes con otros organismos es otro factor que influye en la producción de metabolitos secundarios al igual que la protección de insectos y otros animales. El metabolismo primario forma un sistema integrado que se prolonga en dos direcciones: uno general o línea macromolecular para la síntesis de ácidos nucleicos, oligosacáridos y alcaloides tripánicos y otra serie de metabolismo leñoso que incluye lignoides, alcaloides bencilisoquinoleícos e indólicos y flavonoides (Domínguez, 1979).

El metabolismo secundario también produce polímeros especiales como los taninos condensados, taninos hidrolizables, ligninas, resinas, cutina,

suberina y ceras. La mayor parte de los compuestos de interés farmacognósticos se sintetizan por alguna de las siguientes tres grandes rutas:

- 1) Ruta de ácido shikímico y de los poliacetatos conducentes a la síntesis de sustancias aromáticas.
- 2) Ruta del ácido mevalónico que da lugar a terpenoides.
- 3) Ruta del metabolismo del nitrógeno, principalmente aminoácidos, que llevan a la síntesis del alcaloides (Domínguez, 1979).

Esquema 1. Rutas biosintéticas.



Tomado y modificado de Lincoln, 2006.

Extractos Vegetales

Son preparaciones concentradas de consistencia líquida, semisólida y plástica o sólida pulverulenta, que se obtienen a partir de las plantas o partes de ellas por acción de soluciones extractivas; esta acción puede ser o no hasta agotamiento mediante la utilización de solventes apropiados. Por su consistencia los extractos vegetales pueden ser fluidos o líquidos donde 1 litro de extracto contiene los principios de 1 kilogramo de la especie vegetal, los extractos semisólidos o pirulales son sólidos pero plásticos, pudiendo moldearse entre los dedos debido a la eliminación parcial del disolvente a presión reducida; los extractos secos o en polvo en el cual se elimina totalmente el disolvente, es decir, hasta sequedad total (Ferraro, Martino, Bandoni y Nadicir, 2015).

Métodos para la Obtención de los Extractos

A nivel popular basta muchas veces con extraer los principios activos de: raíz, hojas, flores, tallos de acuerdo a los antecedentes encontrados de la manera más sencilla, puede ser por medio de una infusión o decocción. En cambio para analizar las propiedades medicinales de una droga vegetal en muchos casos se recurrirá a métodos de extracción más complejos, que permitan obtener métodos reproducibles con cuantificación de principios activos en lo posible. Los métodos extractivos más empleados son: maceración, percolación y soxhlet (Verde, García y Rivas, 2016).

Reflujo

Consiste en enfriar el vapor del solvente con un refrigerante y devolverlo al balón que contiene el material para continuar el proceso, este sistema (Figura 22) garantiza que no haya pérdidas ni de material ni de solvente durante el proceso de extracción. La temperatura elevada del disolvente

permite una mejor extracción de los componentes deseados, ya que la solubilidad de la mayoría de las sustancias aumenta con la temperatura. Este método presenta el inconveniente de que muchos compuestos termolábiles se alteran o descomponen a la temperatura de ebullición del disolvente (Lamarque, Zygadlo, Labuckas, López, Torres y Maestri, 2008).

Figura 22. Equipo utilizado en la técnica Reflujo en caliente



Fuente: <https://quimica.laguia2000.com/quimica-organica/reflujo>

Maceración

Consiste en remojar la droga cruda fragmentada con el solvente para que este penetre la estructura celular y disuelva la sustancia. El material se agita esporádicamente por un periodo mínimo de dos días y hasta por semanas, seguidamente se decanta el líquido filtrándolo y exprimiendo el residuo (Albornoz, 1980).

Percolación

El material vegetal pulverizado se coloca en un percolador haciendo pasar continuamente el solvente a través de él, al atravesar sucesivamente las capas del material impelido por su propio peso y por la presión de la columna líquida, dicho solvente se satura de los principios solubles (Albornoz, 1980).

Decocción

El material crudo (corteza, raíces o tallo relativamente duros), se somete a ebullición con agua habiéndose colocado previamente en un recipiente apropiado para impedir que esta se derrame (Albornoz, 1980).

Extracción continua (Soxhlet)

Este método utiliza aparatos especialmente diseñados tales como el Soxhlet y los extractores líquidos. El Soxhlet es frecuentemente utilizado para operar con la sustancia finamente dividida, se coloca un cartucho y en el balón de destilación se deposita el solvente que se va a calentar hasta ebullición. Cuando esto sucede, sus vapores ascienden por el tubo lateral y se condensa en el refrigerante, retornando después a la sustancia en el cartucho. Cuando se nivela el solvente en los tubos comunicantes sifonea por el tubo y cae en el balón para repetir el ciclo sucesivas veces hasta agotar el material que se está extrayendo. En las extracciones líquido-líquido el solvente que se destila actúa como fuente ilimitada extractora. Hay dos tipos de extractores: para solventes más livianos o más pesados que el agua (Albornoz, 1980).

Tamizaje Fitoquímico

Comprende el estudio de los metabolitos secundarios de origen vegetal y la metodología que se sigue para este, va a depender de los objetivos que se quieran alcanzar (Marcano y Hasegawa, 2002). Existen diferentes métodos cualitativos para la detección preliminar de los diferentes metabolitos secundarios que pueden encontrarse en las plantas, basados en la extracción de estos mediante solventes orgánicos de diferentes polaridades y aplicando pruebas de coloración. Estas pruebas cualitativas son realizadas con el fin de identificar la presencia de el o los tipos de metabolitos secundarios presentes en las plantas (Colina, 2016).

Pruebas Fitoquímicas para la Identificación de Metabolitos Secundarios

Son pruebas preliminares sencillas y rápidas que permiten detectar cualitativamente la presencia de determinados grupos de compuestos (Rivera, 2018). Rodríguez en 1997 estableció que las reacciones químicas estandarizadas consisten en cambios químicos en algún grupo funcional de la estructura del metabolito y desde luego la formación de otro compuesto químico que al generar cambio en la naturaleza y distribución de los enlaces, produce una manifestación sensible como cambio o pérdida de color, también puede observarse la precipitación del nuevo compuesto o el desprendimiento de gas. Algunos de los ensayos que se colocan en práctica son:

- ***Ensayo de Sudán III***

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos. 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 (Rivera, 2018).

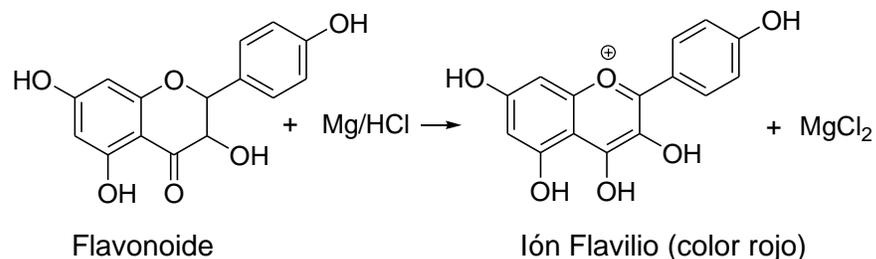
- ***Ensayo de Mayer, Dragendorff y Wagner***

Permiten identificar alcaloides, se debe añadir 2 o 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, Dragendorff y Wagner respectivamente. Si se observa opalescencia, turbidez definida, precipitado coposo, entonces se considera positiva la presencia de este tipo de metabolito. En el caso de alcaloides cuaternarios 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 (Rivera, 2018).

- ***Ensayo de Shinoda***

Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal. El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos (Peña, 2002). Esta prueba se fundamenta en que los extractos de etanol que son tratados con un pequeño trozo de magnesio y unas gotas de HCl generan coloraciones rojizas si están presentes flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas (flavonoides con el núcleo benzopirona), figura 23 (Parra, Castro y Aponte, 2016).

Figura 23. Reacción de Flavonoides en el ensayo de Shinoda



Tomado y modificado de Domínguez, 1979.

- **Ensayo de Antocianidinas**

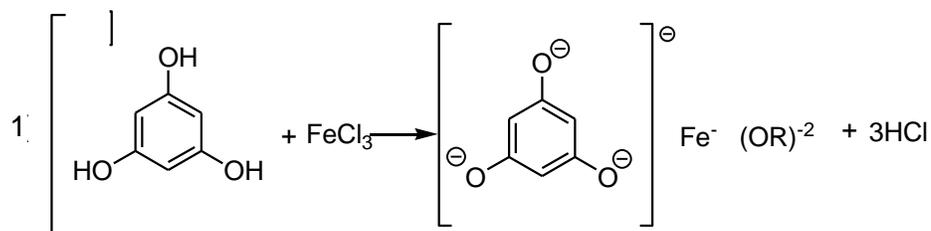
Permite identificar en los extractos la existencia en estas estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. La aparición de un color rojo a marrón en la fase amilca es indicativa de un ensayo positivo. La presencia de estructuras tipo polisacárido que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae, denota la presencia de mucílagos (Rivera, 2018).

- **Ensayo tricloruro de hierro y ácido fosfowolfrámico**

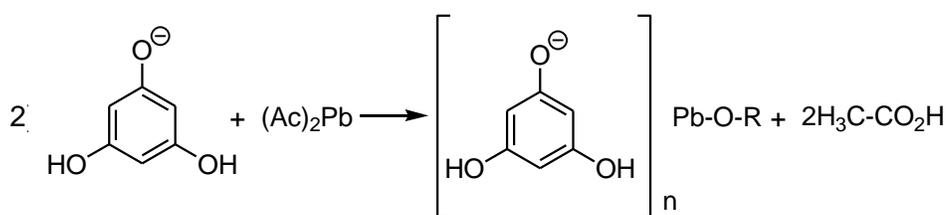
La identificación se realiza mediante reacciones de color (Cabrera, Torres, Saavedra y Morales, 2009). Estos ensayos se fundamentan mediante 3 reacciones, las cuales se explican a continuación: (Figura 24):

1. Cloruro férrico: la reacción de FeCl_3 con compuestos fenólicos que generan una coloración verde sugiere derivados del catecol.
2. Acetato de plomo: los taninos reaccionan con $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ generando turbidez o un precipitado blanco.
3. Gelatina- Sal: todos los taninos reaccionan con este reactivo precipitando las proteínas de sus soluciones ya que dentro de las características de estos compuestos está la precipitación de proteínas.

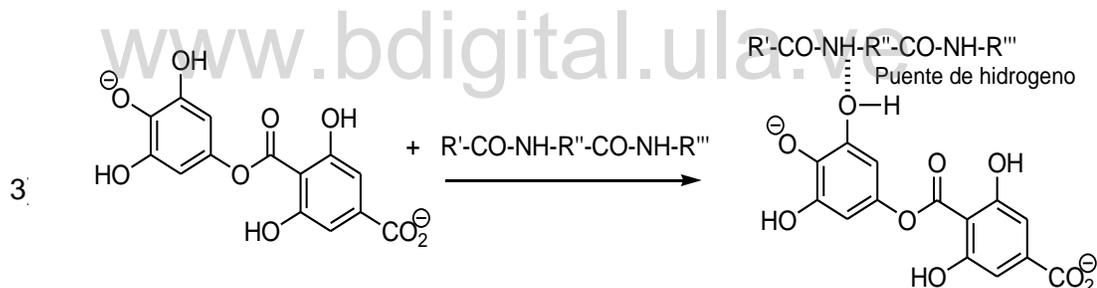
Figura 24. Reacción de compuestos fenólicos



Reacción de FeCl₃



Reacción de Ac₂Pb



Reacción de Gelatina- Sal

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

- **Ensayo de espuma**

Permite reconocer la presencia de saponinas tanto del tipo esteroidal como triterpénicas. Esto se fundamenta en que al agitar vigorosamente la mezcla de extracto etanólico con agua que contenga saponinas, se forma una

espuma inestable que desaparece tras pasar unos minutos (Cabrera, Torres, Saavedra y Morales, 2009; Parra, Castro y Aponte, 2016).

- **Ensayo de Fehling**

Permite reconocer la presencia de azúcares reductores. Este se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado rojo (Rivera, 2018).

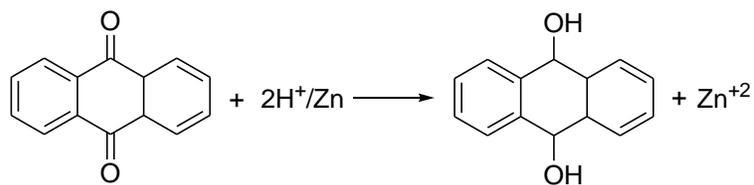
- **Ensayo de Baljet**

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico en particular cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar también positivo este ensayo. En estas condiciones se considera la presencia de esta familia de compuestos por la aparición de una coloración y un precipitado (Cabrera, Torres, Saavedra y Morales, 2009).

- **Ensayo de Bourntrager**

Permite identificar quinonas. Si la fase acuosa alcalina se colorea de rosado a rojo, el ensayo se considera positivo (Rivera, 2018). Su fundamento se basa en que las quinonas tienden a dar colores amarillos, rojos o púrpuras, en presencia de ácidos o álcalis concentrados (Figura 25) (Parra, Castro y Aponte, 2016).

Figura 25. Reacción de quinonas.

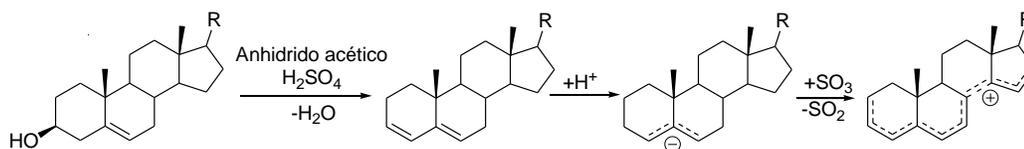


Tomado y modificado de Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011.

- **Ensayo Liebermann – Burchard**

Permite determinar la presencia de triterpenos o esteroides debido a que ambos tipos de productos poseen un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo β en la posición 5-6. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color violeta. Figura 26 (Rivera, 2018).

Figura 26: Reacción de triterpenos/esteroles.



Tomado y modificado de Domínguez, 1979.

www.bdigital.ula.ve

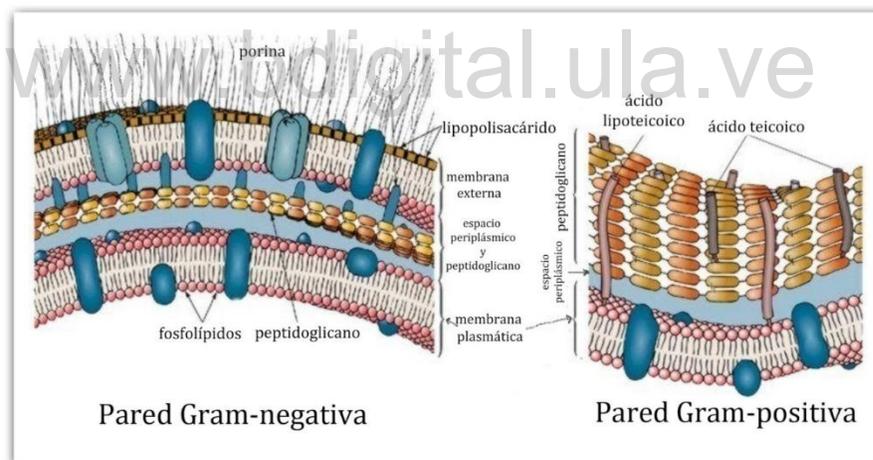
Bacterias

Son microorganismos procariontes que presentan un tamaño de unos pocos micrómetro, normalmente de 1 μm de diámetro, carece de membrana nuclear; el ADN de casi todas las bacterias es de forma circular con una longitud aproximada de 1 mm, siendo este el cromosoma procariótico. No tienen un núcleo definido, en general no tienen orgánulos membranosos internos, generalmente poseen una pared celular que le confiere resistencia. Esta capa está compuesta por sustancias tales como mureína, peptidoglicano, el cual es un polímero complejo que presenta tres partes: una estructura básica compuesta de moléculas alternadas de N-acetilglucosamina y de ácido N-acetilmurámico y un grupo idéntico de enlaces peptídicos cruzados. Muchas bacterias poseen flagelos, fimbrias o phili que le confieren movimiento (Brooks, Carroll, Morse, Mietzner y Butel, 2011).

Tinción Gram

Es una prueba potente y rápida que nos permite diferenciar dos clases de bacterias bien sea Gram positivas o las Gram negativas. Las Gram positivas se tiñen de morado debido a que el colorante cristal violeta se queda atrapado en la capa gruesa de peptidoglicanos (Figura 27) que rodea a la célula mientras que las Gram negativas tienen una capa de peptidoglicano mucho más delgada por tal motivo, el cristal violeta no es retenido y las células se tiñen con el colorante secundario (safranina), las observamos rosadas (Murray, 2006).

Figura 27. Paredes bacterianas de bacterias Gram positivas y Gram negativas.



Fuente: https://cursos-0-fc-ugr.github.io/Biologia/Tema5/bloqueII_parte2.html

Bacterias Gram positivas

Las bacterias Gram positivas cuentan con una envoltura celular que comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano que rodea el interior de la célula. La pared celular se une a la membrana citoplasmática mediante moléculas de ácido

lipoteicoico; la capa de peptidoglicano confiere una gran resistencia a estas bacterias y es responsable de retener el tinte durante la tinción de Gram (Murray, 2006).

Dentro de los microorganismos Gram positivos existen una gran variedad de géneros; sin embargo, solo se mencionarán: *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* ya que son las bacterias que se utilizaron en la presente investigación.

Enterococcus faecalis

Pertenece al Reino: Bacteria, Filo: Firmicutes, Clase: Bacili, Orden: Lactobacillales, Familia: Enterococcaceae, Genero: *Enterococcus*, Especie: *E. faecalis*. Es una bacteria inmóvil y anaerobio facultativo; son microorganismos relativamente resistentes, persisten como contaminantes en el ámbito hospitalario, en las manos, en la ropa de cama e incluso como aerosol fecal. En el espacio médico con frecuencia invaden el torrente sanguíneo a través de elementos invasivos como los catéteres permanentes (Murray, 2006).

Staphylococcus aureus

Pertenece al Reino: Bacteria, Filo: Firmicutes, Clase: Bacilli, Orden: Bacillales, Familia: Micrococcaceae, Género: *Staphylococcus*, Especie: *S. aureus*. Es un microorganismo que se caracteriza por demostrar una disposición típica en forma de racimos de uva, inmóviles, son anaerobios facultativos, miden aproximadamente 1 μm de diámetro, catalasa positivos. Estas bacterias progresan relativamente bien en condiciones de presión osmótica elevada y humedad reducida, lo que explica en parte que pueden desarrollarse y sobrevivir en las secreciones nasales y en la piel (Murray, 2006).

Bacterias Gram negativas

Son aquellas que no se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram, se observan de un color rosado tenue: de ahí el nombre de "gramnegativas" o también "Gram negativas". Esta característica está íntimamente ligada a la estructura didérmica dada por la envoltura celular, pues presenta doble membrana celular (una externa y la otra citoplasmática), lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana (Murray, 2006).

Escherichia coli

Pertenece al Reino: Bacteria, Filo: Proteobacteria, Clase: Gammaproteobacteria, Orden: Enterobacteriales, Familia: Enterobacteriaceae, Género: *Escherichia*, Especie: *E. coli*. Es un bacilo móvil por su flagelos peritricos, tiene forma de barra es un habitante común del intestino de los seres vivos. Es quizás el microorganismo procarionte más estudiado por el ser humano, es anaeróbico facultativo, mide entre 0,5 μm de ancho por 3 μm de largo (Koneman, 2009).

Pseudomonas aeruginosa

Pertenece al Reino: Bacteria, Filo: Proteobacteria, Clase: Grammaproteobacteria, Orden: Pseudomonadales, Familia: Pseudomonadaceae, Género: *Pseudomonas*, Especie: *P. aeruginosa*. Son bacilos aerobios, móviles por medio de flagelos polares, sean únicos o en mechones. Es muy común en el suelo y en otros ambientes naturales, produce un pigmento soluble de color azul verdoso, es causante de infecciones en el tracto urinario, en quemaduras y las heridas; pueden causar sepsis, abscesos y meningitis (Koneman, 2009).

Klebsiella pneumoniae

Perteneciente al Reino: Bacteria, Filo: Proteobacteria, Clase: Gammaproteobacteria, Orden: Enterobacteriales, Familia: Enterobacteriaceae, Género: *Klebsiella*, Especie: *K. pneumoniae*. Son bacilos no flagelados, por lo tanto son inmóviles. Se encuentra frecuentemente en el suelo o el agua. Esta especie puede producir una forma grave de neumonía en los seres humanos (Koneman, 2009).

Mecanismos de resistencia bacteriana

La resistencia antibiótica puede definirse como la capacidad de un microorganismo para sobrevivir en presencia de un compuesto tóxico (antibiótico o antiséptico), permitiendo que las bacterias se multipliquen en presencia del mismo. Las bacterias emplean varias estrategias para evadir los efectos de los antibióticos e, incluyen: la modificación enzimática y la inactivación de los agentes antimicrobianos, restricción de acceso a los medicamentos a los blancos celulares y la modificación o incluso la eliminación completa del blanco celular (Figura 28) (Bisso, 2018).

Las clases más importantes de enzimas de inactivación son las llamadas betalactamasas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, y las enzimas modificadoras de aminoglucósidos. La restricción del acceso de destino de las drogas puede ocurrir por alteraciones en la permeabilidad de la membrana para reducir la entrada del antibiótico a través de la inhabilitación de los canales porina, formación de bombas de expulsión y de eflujo o por mecanismos de atrapamiento del agente antimicrobiano antes de llegar a su punto de acción (Bisso, 2018).

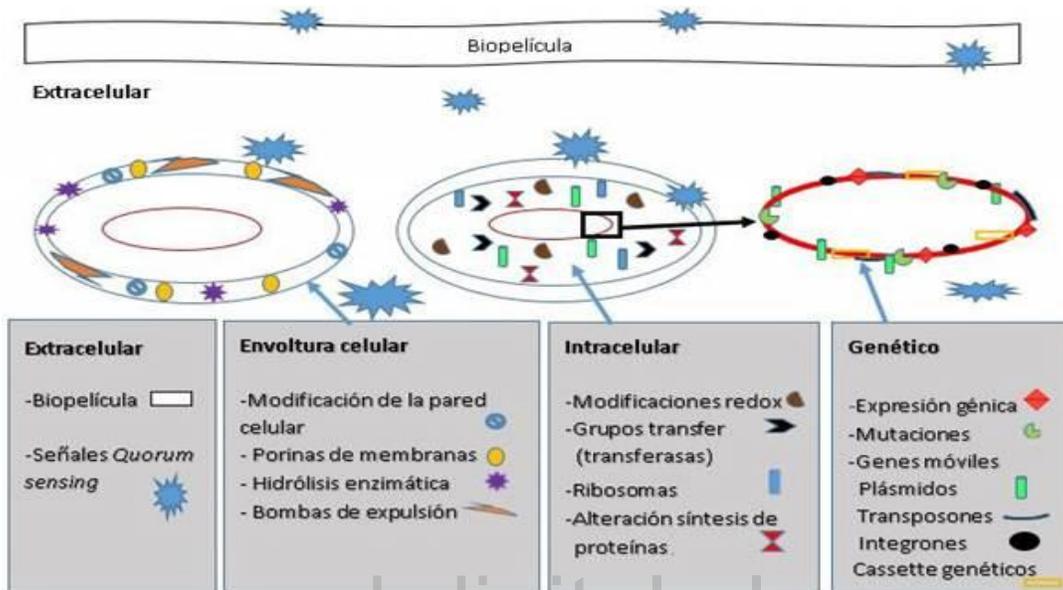
La modificación del blanco se produce a través de mutaciones en los genes diana, tales como la alteración de la girasa y las topoisomerasas, para generar resistencia contra las fluoroquinolonas. Los niveles de resistencia se

magnifican por la combinación de diferentes mecanismos, por ejemplo, cambios de permeabilidad y bombas de eflujo que disminuyen las concentraciones intracelulares de los agentes betalactámicos para mejorar la eficacia de las betalactamasas presentes en la periplasma de los Gram negativos (Bisso, 2018).

Los organismos que expresan rasgos de resistencia adquiridos por clonación pueden difundir o transmitir sus mecanismos de resistencia a sus múltiples descendientes; no obstante, como la adaptación de estos nuevos mecanismos significan una función “extra” para el microorganismo y resulta en la disminución de otras actividades, resistencia puede desaparecer en cuanto cesa el estímulo de la presión selectiva así las bacterias recuperan la sensibilidad contra una familia antibiótica cuando esta se deja de utilizar en un ambiente hospitalario; sin embargo, otros rasgos de resistencia sí pueden ser relativamente estables y persistir incluso en ausencia del antibiótico (Bisso, 2018).

Los genes de resistencia o grupos de genes, también pueden transmitirse horizontalmente entre los microorganismos así como también entre las especies. Los genes de resistencia son típicamente transmitidos por los transposones, elementos genéticos móviles que se pueden mover fuera y en el cromosoma bacteriano facilitando la transferencia horizontal de genes. La transferencia de la resistencia se produce con más frecuencia entre las bacterias Gram negativas de la flora gastrointestinal. El biofilm que se origina en las paredes de los catéteres es un medio favorable no solo para el crecimiento de una flora colonizante, sino también para la transferencia de los mecanismos de resistencia entre los microorganismos que ahí se desarrollan (Bisso, 2018).

Figura 28. Organización estructural y fisiológica de los mecanismos de resistencia bacteriana.



Tomado y modificado de Troncoso, Pavez, Santos, Salazar y Barrientos, 2017.

Antibióticos

Los antibióticos son metabolitos secundarios, capaces de inhibir a bajas concentraciones el crecimiento de organismos microbianos y destruirlos a través de un mecanismo antimetabólico. Hasta ahora se han descrito más de mil antibióticos, cuya mayoría, por razones diversas no han competido en el mercado con los antibióticos tradicionales conocidos por el gremio médico-farmacéutico. Los antibióticos son letales para ciertos tipos de bacterias pero inofensivo para otras; su clasificación puede enfocarse desde dos ángulos: según su origen taxonómico y de acuerdo al origen biogénico (Albornoz, 1980).

Actividad Antibacteriana

Se define como la habilidad específica o capacidad de un producto de lograr su efecto planeado y se basa en la medición de algún atributo del producto por ejemplo, su efecto inhibitorio frente a un determinado microorganismo (halo de inhibición). Se determina a través del método analítico más adecuado, normalmente métodos de análisis microbiológicos. La actividad de un antibiótico puede ser demostrada mediante el efecto inhibitorio de la sustancia en cuestión cuando es evaluado frente a un microorganismo. En los análisis de potencia o actividad, se compara cuantitativamente el efecto de una muestra sobre un sistema biológico con el sistema producido por una preparación estándar en las mismas condiciones y para la cual ya se ha determinado exactamente su actividad, obteniendo así un valor de actividad relativo al del estándar de referencia (Murray, 2006).

Mecanismos de Acción de los Antibióticos

Desde el punto de vista molecular los antibióticos de uso clínico ejercen su acción en algunas de las siguientes estructuras o funciones bacterianas: inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, alterando la integridad de la membrana citoplasmática, impidiendo la síntesis proteica o bloqueando la síntesis o las funciones de ácidos nucleicos. Hay también otros antimicrobianos cuya función es proteger otros compuestos de las enzimas hidrolíticas bacterianas, como es el caso de los inhibidores de b-lactamasas. Tabla (4-9) (Calvo y Martínez, 2009).

Tabla 4. Antibióticos que inhiben la síntesis proteica.

Grupos	Antimicrobianos representativos
Ácido fusídico	Ácido fusídico
Aminoglucosidos	Gentamicina, tobramicina, ampicacina, netilmicina
Anfenicoles	Cloranfenicol, Tiamfenicol
Estreptograminas	Quinupristina-Dalfopristina
Lincosamidas	Clindamicina, lincomicina
Macrólidos	Eritromicina, claritromicina, roxitromicina, azitromicina
Oxazolidinonas	Linezolid
Tetraciclina	Tetraciclina, doxiciclina, minociclina
Glicilciclinas	Tigeciclina

Tomado y modificado de Calvo y Martínez, 2009.

Tabla 5. Antibióticos que alteran la membrana citoplasmática

Grupos	Antimicrobianos representativos
Polimixinas	Polimixina B, polimixina E (colistin)
Lipopeptidos	Daptomicina
Ionóforos	Tiroidinas
Formador de poros	Gramicidinas

Tomado y modificado de Calvo y Martínez, 2009.

Tabla 6. Antibióticos que inhiben de la síntesis de la pared bacteriana.

Grupos		Antimicrobianos representativos
β-lactámicos	Penicilinas	Naturales: penicilina G, penicilina V Resistentes a penicilinas: cloxacilina, oxacilina, metilicina Aminopenicilinas: ampicilina, amoxicilina Carboxipenicilinas: carbenicilina, ticarcilina Ureidopenicilinas: piperacilina, mezlocilina.
	Cefalosporinas	1^{ra} generación: cefazolina, cefalotina 2^{da} generación: cefuroxima, cefoxitinaa , cefotetán a , cefaclor, cefamandol 3^{ra} generación: cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefixima, cefpodoxima 4^{ta} generación: cefepima, cefpiroma
	Monobactámicos	Aztreonam
	Carbapenemos	Imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem
	Glucopéptidos	Vancomicina Teicoplanina
	Bacitracina	Bacitracina
Fosfonopéptidos	Fosfomicina	

Tomado y modificado de Calvo y Martínez, 2009.

Tabla 7. Antibióticos que bloquean la síntesis de factores metabólicos

Grupos	Antimicrobianos representativos
Sulfonamidas, diaminopirimidinas	Trimetoprim-sulfametoxazol Crotrimoxazol

Tomado y modificado de Calvo y Martínez, 2009.

Tabla 8. Antibióticos que alteran el metabolismo o estructura de los ácidos nucleicos.

Grupos	Antimicrobianos representativos
Quinolonas	<p>1^{ra} generación: ácido nalidíxico, ácido pipemídico</p> <p>2^{da} generación: norfloxacin</p> <p>3^{ra} generación: ciprofloxacina, levofloxacina</p> <p>4^{ta} generación: moxifloxacino, gemifloxacina</p>
Rifamicinas	Rifampicina
Nitroimidazoles	Metronidazol, ornidazol, tinidazol
Nitrofuranos	Nitrofurantoina, furazolidona

Tomado y modificado de Calvo y Martínez, 2009.

Tabla 9. Inhibidores de β -lactamasas

Grupos	Antimicrobianos representativos
	Ácido clavulánico, sulbactám, tazobactam, ceftibutan

Tomado y modificado de Calvo y Martínez, 2009.

Metodologías para Determinar la Actividad Antibacteriana

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos pero estos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, haciendo que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos utilizados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado. Los problemas generales inherentes a los ensayos antimicrobianos han sido discutidos por varios autores de ahí la importancia de conocer los estándares para estas pruebas de actividad biológica (Hadacek y Greger, 2000).

Los métodos para la determinación de la actividad antibacteriana son aquellos que se emplean con el fin de determinar el efecto inhibitorio o la capacidad inhibitoria frente a agentes o microorganismo bacterianos. Algunos de los métodos más utilizados son: 1) método de difusión en agar del disco (Kirby-Bauer); 2) método modificado de pozo de agar; 3) método de la cinta o epsilómetro Etest^R (AB BIODISK) y 4) método de dilución (Velasco, Araque, Araujo, Longa, Nieves, Ramírez, Sánchez y Velazco, 2008).

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

El método de difusión en agar está apoyado por datos clínicos y de laboratorios, presenta la ventaja de que sus resultados son altamente

reproducibles. La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer y colaboradores (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS de Estados Unidos. El fundamento de esta determinación es establecer en forma cuantitativa el efecto de un conjunto de sustancias ensayadas individualmente sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre el cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (Ramírez y Castaño, 2009).

En el caso de evaluar varias sustancias, los discos de papel filtro o los pozos deben ponerse en forma equidistante y a continuación se procede a su incubación a la temperatura adecuada por 24 horas, luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos de las distintas sustancias sobre el microorganismo estudiado con el antibiótico control. La lectura de los resultados representa la actividad *in vitro* de la sustancia; es necesario señalar que el tamaño del halo de inhibición es influenciado por varios factores, entre ellos; medio de cultivo en que se realiza la prueba, capacidad de difusión del compuesto, cantidad de inóculo, tiempo de generación del microorganismo, sensibilidad al antibiótico y período de incubación. Cualquier variación de estos factores puede afectar el resultado de la prueba, sin embargo, al emplear un procedimiento estándar es posible obtener resultados confiables (Ramírez y Castaño, 2009).

2) Método de difusión modificado en agar en pozos

Se deposita el inóculo y se siembra sobre las superficies del agar selectivo estipulado para este método; seguido de ello se hacen los pozos sobre la superficie del agar con el apoyo de un sacabocados estéril de 6 milímetros (mm) de diámetro y en cada uno de ellos se deposita de 10 a 25 μ L de los extractos a evaluar, estándares (control positivo y negativo) y blanco por triplicado, se deja reposar por espacio de 30 minutos (para evaporar el líquido). Finalmente se incuba con la caja invertida a 35 ± 2 °C por 24 horas para bacterias y a 29 ± 2 °C por 48 horas en caso de levaduras, posteriormente se miden los halos de inhibición (Sánchez, Castillo y García, 2016).

3) Método del Epsilon test

El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. En el método E-test (AB Biodisk, Suecia) podemos mediante lectura directa determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Consiste en una tira de plástico no poroso de 6 centímetros de largo por 5 milímetro de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco. Siguiendo el método de difusión una vez inoculada la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de Etest sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica; después de la incubación la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira (Picazo, 2000).

4) Método de dilución

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución.

Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar). Las primeras determinaciones se realizan empleando baterías de tubos con caldo de cultivo con un rango determinado de antimicrobiano (macrodilución). Esta metodología es muy engorrosa por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización. La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de dilución en agar, en el que cada placa con una cierta concentración de antimicrobiano permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos. La utilización de micropipetas y de placas de 49 microtitulación facilitó la utilización del método de microdilución con caldo; en la actualidad se han popularizado los métodos automatizados comerciales de microdilución en caldo, fácilmente integrables en sistemas (semi) automáticos de lectura e interpretación de resultados pero con el grave inconveniente del incremento en el costo (Picazo, 2000).

Estándar de McFarland

La técnica de McFarland se basa en la estandarización de una serie de tubos que contienen un precipitado fino en suspensión similar a una suspensión bacteriana opaca. Las suspensiones bacterianas se comparan visualmente con los estándares hasta encontrar al más similar en turbiedad y se relaciona con el número de células de acuerdo con cada estándar (Fiallos, 2017). La escala va desde el 0,5 hasta el 10 y valores referenciales se detallan en la tabla 10:

Tabla 10. Escala de McFarland

Nº	Nº de células UFC/mL
0,5	1,5 x 10 ⁸
1	3 x 10 ⁸
2	6 x 10 ⁸
3	9 x 10 ⁸
4	12 x 10 ⁸
5	15 x 10 ⁸
6	18 x 10 ⁸
7	21 x 10 ⁸
8	24 x 10 ⁸
9	27 x 10 ⁸
10	30 x 10 ⁸

Tomado y modificado Chasín y Figueroa, 2016.

Definición Operacional de Términos

Actividad Bactericida

Significa un efecto realmente mortal. Las sustancias antibacterianas que trastornan la síntesis o la función de la pared de la célula microbiana suelen ser bactericidas. Los compuestos bactericidas siempre son bacteriostáticos (Albornoz, 1980).

Actividad Bacteriostática

Es la capacidad de una sustancia para inhibir la multiplicación de los microorganismo (Albornoz, 1980).

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).

Etnomedicina

Es el conjunto de conocimientos empíricos, inscritos dentro de un *corpus* variado de creencias médicas, procedimientos, técnicas y tratamientos, donde se encuentran muchos elementos de enfoque pragmático, eficaces para la restauración y la búsqueda del bienestar del organismo humano (Albornoz, 1992).

Fitoquímica

Es la ciencia que se encarga del estudio de las sustancias vegetales: extracción, separación, purificación y elucidación de estructuras moleculares (Albornoz, 1998).

Medicina tradicional

Se define como “la suma de todos los conocimientos teóricos y prácticos –explicables o no – utilizadas para el diagnóstico, prevención y supresión de trastornos físicos, mentales o sociales, basados exclusivamente en la experiencia y la observación, y transmitidos verbalmente o por escrito, de una generación a otra” (Albornoz, 1992).

Metabolitos Secundarios

Son todas aquellas moléculas activas o compuestos de naturaleza química generados por diversas especies vegetales, que no son indispensables para el crecimiento y reproducción de las mismas, pero presentan propiedades biológicas y cumplen roles fundamentales (Pérez y Ávalos, 2009).

Ruderal

La palabra ruderal proviene del latín *rudaris*, que significa suciedad y con ella se designa a las plantas que suelen aparecer en terrenos incultos o en hábitats muy alterados por la acción del ser humano (Radigales, 2019).

Cepas de Referencia Internacional ATCC

Son microorganismos definidos al menos a nivel de género y especie, catalogados y descritos de acuerdo a sus características e indicando preferiblemente su origen. Se obtienen normalmente de una colección nacional o internacional reconocida (OMS, 2013).

Espectro Antibacteriano

Es la amplitud de actividad de una sustancia frente a determinado microorganismo. Cuando el espectro es amplio se trata de un agente capaz de inhibir gran variedad de microorganismo, incluyendo bacterias Gram positivas, Gram negativas, virus y rickettsias (Albornoz, 1980).

Operacionalización de las Variables

Para operacionalizar el sistema de variables, es necesario la definición conceptual y la operacional de las mismas, este proceso le permite al investigador identificar aquellos aspectos perceptibles de un evento que hacen posible dar cuenta de la presencia o intensidad de este (Hurtado, 2010). Es así como las variables se operacionalizan con el propósito de identificar los elementos y datos empíricos que expresan su presencia. En esta investigación se tomarán en cuenta las variables que no admiten valores intermedios (discretas) y algunas continuas con dimensiones dicotómicas y politómicas. El nivel de medición será nominal y de intervalo, los indicadores derivarán de las bases teóricas. El proceso de la operacionalización de las variables garantizó que los objetivos propuestos sean alcanzados (Tabla 11 y 12).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 11. Operacionalización de la Variable Dependiente: Actividad Antibacteriana del extracto etanólico de la especie *Ruellia tuberosa*.

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana del extracto etanólico de la especie <i>Ruellia tuberosa</i> .	Dependiente Cuantitativa Discreta	La actividad antibacteriana es aquella que posee la capacidad de eliminar o inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias patógenas, haciendo su efecto sin dañar al organismo (Murray, 2006).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
La actividad antibacteriana se puede medir por: - Método de difusión en agar del disco (Kirby-Bauer) - Método de difusión modificado en agar de pozos	Cepas Gram positivas: - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> Cepas Gram negativas: - <i>Escherichia coli</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Klebsiella pneumoniae</i>	- Sensible - Intermedio - Resistente - Presencia o ausencia del halo de inhibición (mm) frente a cepas Gram positivas y Gram negativas

Fuente: Iacobellis y Obregón, 2022

Tabla 12. Operacionalización de la Variable Independiente: Composición química de los extractos de las hojas de la especie *Ruellia tuberosa* L.

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química de los extractos de las hojas de <i>Ruellia tuberosa</i> .	<ul style="list-style-type: none"> - Independiente - Cualitativa - Discreta 	Toda sustancia que es propia de una especie, también se le conoce como metabolitos secundarios y en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza (Marcano y Hasegawa, 2002).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
- Pruebas químicas cualitativas también conocidas como Tamizaje fitoquímico.	Para las pruebas químicas cualitativas puede haber presencia y ausencia de: <ul style="list-style-type: none"> - Alcaloides - Esteroles y/o triterpenos - Saponinas - Compuestos fenólicos simples - Taninos - Flavonoides - Quinonas y Antraquinonas - Glicósidos cardiotónicos - Cumarinas - Lactonas sesquiterpénicas 	<u>Alcaloides:</u> turbidez o precipitado <u>Esteroles o/y triterpenos:</u> coloración azul o verde para esteroides o violeta para triterpenos <u>Saponinas:</u> formación de abundante espuma <u>Compuestos fenólicos:</u> coloración de azul a negro <u>Taninos:</u> precipitado blanco <u>Flavonoides:</u> coloración naranja a rojo para flavonoles y magenta para flavononas <u>Antraquinonas y quinonas:</u> coloración roja <u>Glicósidos cardiotónicos:</u> coloración purpura o violácea <u>Lactonas sesquiterpénicas:</u> coloraciones roja, violeta o rosa

Fuente: Iacobellis y Obregón, 2022

Hipótesis

Estudios anteriores demuestran que especies de la familia Acanthaceae biosintetizan metabolitos secundarios que poseen diversas actividades biológicas; por lo cual, es de esperar que los extractos de las hojas de *Ruellia tuberosa* contengan compuestos relacionados y muestren actividad antibacteriana.

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 ejecutar, orienta acerca del propósito general del estudio y sobre la manera de recolectar los datos necesarios. En este orden de ideas, los tipos de investigación pueden ser: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa (Hurtado, 2010). Esta investigación es de tipo confirmatoria ya que se desea confirmar la relación entre la composición química de los extractos de las hojas de *Ruellia tuberosa* y la actividad antibacteriana frente a cepas de referencia internacional (ATCC) Gram positivas y Gram negativas.

Diseño de la Investigación

La presente investigación fue de tipo confirmatoria con un diseño de campo y de laboratorio, es decir, mixta, porque los datos se recolectaron en un ambiente natural en las adyacencias de la población de Santa Bárbara del Zulia, municipio Colón del estado Zulia, las cuales se procesaron en el Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis; por otra parte la investigación es 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 fue representada por la especie *Ruellia tuberosa* situada en las adyacencias de la población de Santa Bárbara del Zulia, municipio Colón del estado Zulia, que se analizaron en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

Selección del Tamaño de la Muestra

La “n” muestral estuvo representada por 880 gramos de las hojas frescas de la especie de *R. tuberosa* L.

Sistema de Variables

Las variables que poseen relación con el objetivo de la investigación son las siguientes; variable dependiente (VD): Actividad antibacteriana del extracto etanólico de la especie *Ruellia tuberosa* (VI): Composición química de los extractos de las hojas de *Ruellia tuberosa*.

Instrumentos de Recolección de Datos

Una vez realizado el plan de la investigación y resuelto los problemas que plantea el muestreo, empieza el contacto directo con la realidad objeto de la investigación o trabajo de campo. Es entonces cuando se hace uso de las técnicas de recolección de datos que son las distintas formas y maneras de obtener la información. Para el acopio de los datos se utilizaron técnicas como observación, entrevista, encuestas, pruebas, entre otras. En esta investigación se aplicó la técnica de observación, en donde se está a la expectativa frente al fenómeno, del cual se toma y se registra información para su posterior

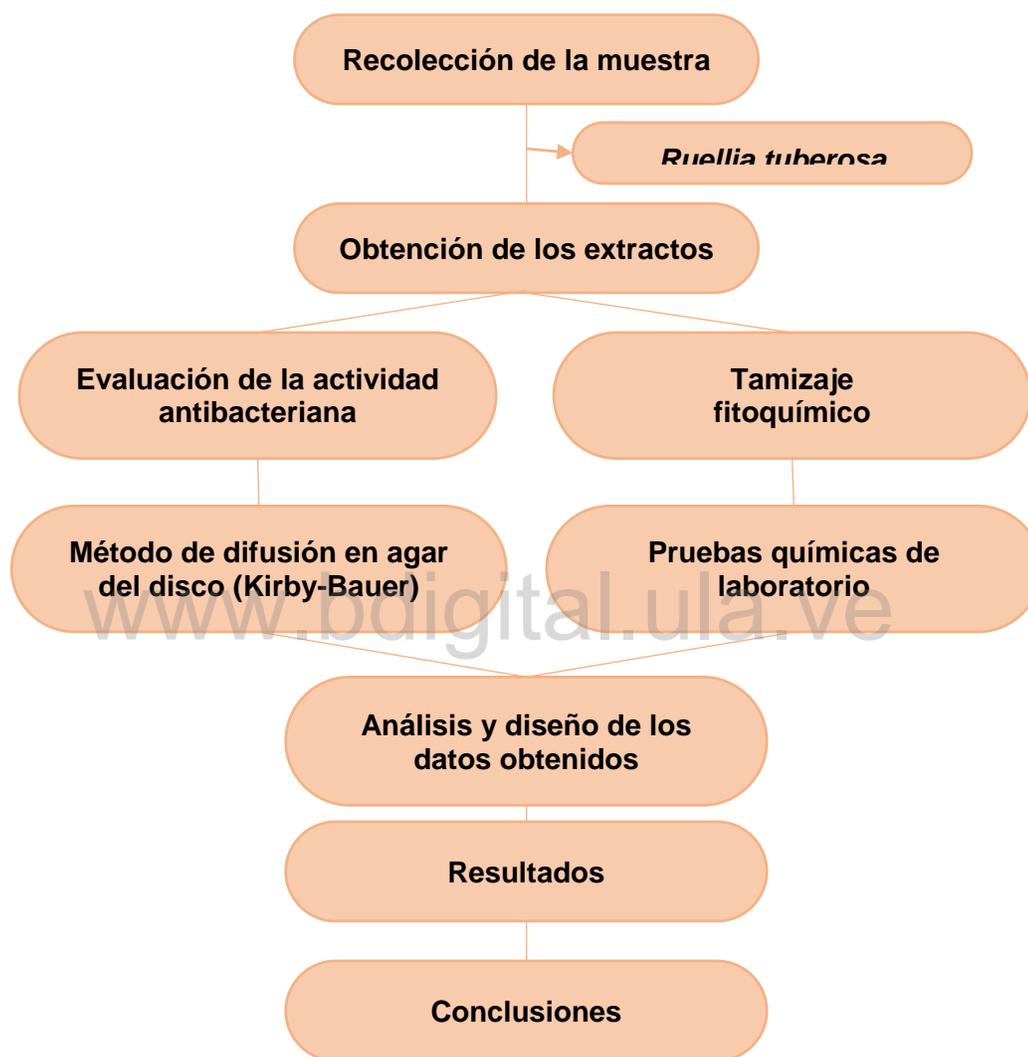
análisis; en ella se apoya el investigador para obtener el mayor número de dato (Palella y Martins, 2012).

Procedimientos de la Investigación

La descripción del procedimiento por lo general apunta al paso de la investigación por los diferentes estadios. Esta descripción permite, no solo verificar que el procedimiento manejado cumplió con los requerimientos metodológicos del procesos de investigación, sino además hará posible que otros investigadores puedan replicar la investigaciones caso de ser necesario o pueden apoyarse en la información para investigaciones similares en otros contexto (Esquema 2)(Hurtado, 2010).

www.bdigital.ula.ve

Esquema 2. Procedimiento general de la investigación



Elaborado por Iacobellis y Obregón, 2022.

Recolección de la Muestra

La planta de *Ruellia tuberosa* se recolectó en las adyacencias de la población de Santa Bárbara del Zulia, municipio Colón del estado Zulia y se llevó al Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis en la ciudad de Mérida para la selección de las partes botánicas deseadas.

Tratamiento del material vegetal

Se seleccionaron las hojas de la especie en estudio debido a que eran las partes botánicas de interés, se cortaron en trozos pequeños y se colocaron sobre papel periódico en un lugar fresco (25 °C) para llevar a cabo el secado; posteriormente para culminar con el proceso de secado se llevó a estufa por 48 horas a 40 °C. Se procedió a moler y a pesar en una balanza obteniendo 100 g de hojas secas y molidas.

Obtención de los extractos

El método empleado fue reflujo, el producto seco y molido (100 g) se colocó en un balón donde fue mezclado con 500 mL de solventes orgánicos (hexano y etanol). La temperatura que se utilizó en este procedimiento inicialmente fue de 60 °C, al momento de llegar a su estado de ebullición, la temperatura se ajustó a 50 °C; después de un tiempo comenzó a condensar una gota, punta de partida para establecer 1 hora que permitió obtener la mayor cantidad de metabolitos secundarios. Posteriormente fue filtrada la mezcla resultante a través de un papel poroso para eliminar los sólidos. El extracto se concentró a través de un rotavapor con presión controlada a una temperatura de 40 °C; a su vez se recuperó el solvente empleado. Culminado el proceso de concentrado, el extracto se colocó en un frasco estéril de color ámbar, se pesó y se almacenó en nevera. Este procedimiento general se realizó por separado para la obtención de ambos extractos (hexano y etanol)

El resultado final de recuperación fue 0,16 g y 1,85 g de extracto de hexano y etanol respectivamente.

Identificación de Metabolitos Secundarios

Para la determinación química de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de hexano y etanol de las hojas de *R. tuberosa*, se efectuó la evaluación cualitativa siguiendo la metodología descrita:

- **Ensayos de Dragendorff, Wagner y Mayer (alcaloides):** se realizaron las pruebas con los reactivos de Dragendorff, Wagner y Mayer, en un tubo de ensayo se disolvieron de 1-2 mg del extracto etanólico en 6 mL de ácido clorhídrico (HCl) al 10 %, se calentó en baño de María por quince minutos, se dejó enfriar y se filtró la muestra. Posteriormente se dividió el filtrado en 3 tubos de ensayo (2,0 mL c/u) identificados para cada reactivo. Luego se adicionaron al respectivo tubo 2 a 3 gotas de sales de metales pesados como el ioduro de potasio (reactivo de Dragendorff), el ioduro de potasio y mercurio (reactivo de Mayer) y la sal del reactivo de Wagner, la formación de precipitados de color naranja, blanco y rojo pardo respectivamente, indica la presencia de alcaloides básicos (Coy, Parra y Cuca, 2014).
- **Ensayo de Liebermann-Burchard (triterpenos y esteroides):** se colocaron en dos tubos de ensayo limpios y secos una pequeña cantidad de los extractos (hexanoico y etanólico), 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 del tubo 2 gotas de H₂SO₄ concentrado. Se considera positiva al observar una coloración azul o verde (Marcano y Hasewaga 2002).

- **Prueba de tricloruro férrico (compuestos fenólicos):** se disolvió una pequeña cantidad de la muestra en agua y se agregó unas gotas de solución de cloruro férrico al 5 %, la presencia de un complejo coloreado transitorio o permanente (púrpura, verde o azul) indica la presencia de fenol o enol (Marcano y Hasewaga 2002).
- **Prueba de altura y estabilidad de espuma (saponinas):** en un tubo se colocaron 2 mL de solución acuosa de los extractos, se agitó vigorosamente durante un minuto y se determinó la altura de espuma, en caso de que se presentara. Cuando se forma espuma abundante y persistente durante 2 minutos es indicativo de la presencia de saponinas en las muestras (Verde y cols., 2016).
- **Gelatina al 1 % (taninos):** a una pequeña cantidad del extracto se le adiciona 2 mL de agua destilada, al cual se le adicionó una solución de gelatina al 1 %; la formación de un precipitado blanco indica la presencia de taninos (Marcano y Hasewaga 2002).
- **Ensayo de Shinoda (flavonoides):** a 2 mL de los extractos, se le adicionó 2 gotas de HCl concentrado por las paredes del tubo, luego se agregan limaduras de magnesio metálico. La formación de una coloración naranja-roja indica la presencia de flavonas, si es rojo flavonoles y si es magenta flavononas (Marcano y Hasewaga, 2002).
- **Reacción con hidróxido de amonio concentrado (cumarinas):** se disolvió una alícuota de los extractos en 1 mL de etanol y se agregaron dos gotas de NH_4OH concentrado, luego se observaron en cámara de luz ultravioleta a 365 nm, se considera positiva la prueba cuando presenta una fluorescencia azul-violeta (Domínguez, 1973).

- **Reacción con hidróxido de amonio (antraquinonas):** se disolvió una alícuota de los extractos en 3 mL de etanol, se adicionó una gota de hidróxido de amonio concentrado, la presencia de una coloración roja en los dos primeros minutos indica la positividad de la prueba para antraquinonas (Marcano y Hasegawa, 2002).
- **Reacción con ácido sulfúrico (quinonas):** se disolvió una alícuota de los extractos en 3 mL de etanol, se agregó una gota de H₂SO₄ concentrado, la formación de una coloración roja revela la presencia de quinonas (Marcano y Hasegawa, 2002).
- **Ensayo de Kedde (glicósidos cardiotónicos):** se mezcló una alícuota de cada extracto con 1 mL del reactivo y se dejó reposar de 5 a 10 minutos. La positividad de esta prueba se considera con la presencia de una coloración violeta (Verde, Rivas y Oranday, 2016).
- **Ensayo de Baljet (Sesquiterpenolactonas):** a una alícuota de los extractos se le adiciona una gota de KOH al 2 N, se calienta la mezcla hasta ebullición de 1 a 2 minutos, se deja enfriar y se lleva a pH 1 con HCl al 0,5 N. Se adicionó una gota de FeCl₃ al 1 %; las coloración roja, violeta o rosa indica que la prueba es positiva para dicho metabolito (Verde, Rivas y Oranday, 2016).

Determinación de la actividad antibacteriana

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos. En este estudio se implementó el método difusión en disco debido a que dicha técnica ha sido ampliamente utilizada para evaluar los extractos polares provenientes de las plantas (Hadacek y Greger, 2000; Sánchez, Castillo y García, 2016).

Para la evaluación de la actividad antibacteriana, se emplearon cepas de referencial Internacional de Colección de Cultivos Americano (ATCC) (tabla 13), las cuales fueron proporcionadas por el cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de Mérida.

Tabla 13. Cepas de referencia internacional de Tipo Colección de Cultivos Americano (ATCC).

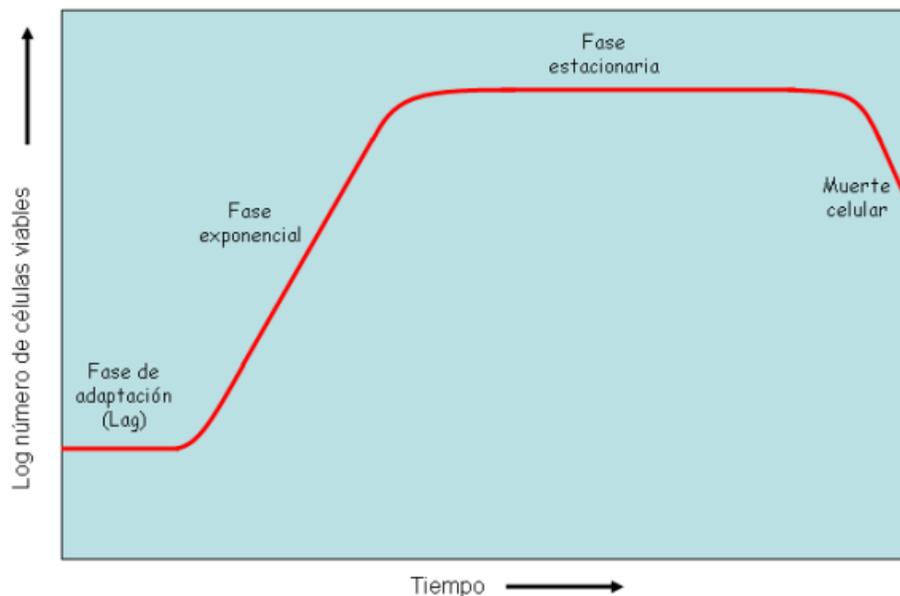
Bacteria	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923
<i>Escherichia coli</i>	25922
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23357
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212

Elaborado por Iacobellis y Obregón, 2022.

Preparación de placas: se utilizaron placas de Petri estériles las cuales contenían agar Müeller Hinton, se eligió este medio de cultivo porque sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas.

Preparación del pre-inóculo bacteriano: las cepas a ensayar se inocularon en el agar, seguidamente se incubaron las placas a 37 ° C entre 16 y 18 horas, en este tiempo las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano tal como se observa en la figura 29 (European Committee for Antimicrobial susceptibility Testing, 2003).

Figura 29. Fases de crecimiento bacteriano



Tomado y modificado de López, 2016.

Preparación del inóculo bacteriano estandarizado: a partir de los cultivos frescos y purificados que se obtuvieron, se preparó el inóculo estandarizado; con la ayuda de un asa en aro estéril se tomaron de una a dos colonias y se suspendieron en tubos estériles de 13x100 los cuales contenían 5 mL de cloruro de sodio (NaCl) al 0,9 %. La solución obtenida se comparó con la turbidez del patrón de McFarland hasta alcanzar el equivalente de 0,5 en la escala, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

Inoculación de las placas: se humedecieron aplicadores de algodón estériles con el inóculo bacteriano estandarizado correspondiente y se realizó la siembra sobre la superficie de las placas de forma homogénea. Se dejó en reposo por 5 minutos.

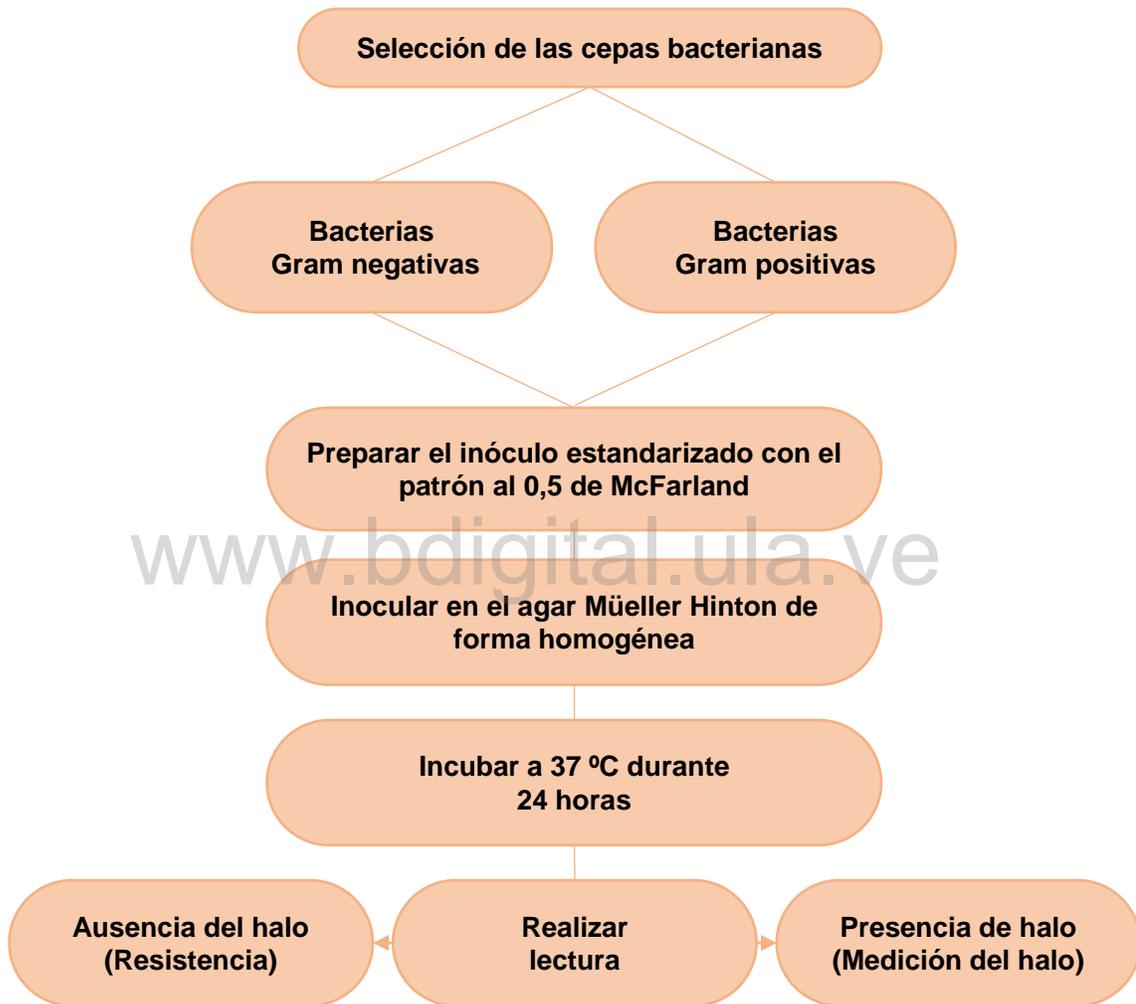
Preparación de los discos: se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro, los cuales fueron esterilizados con luz ultravioleta (UV). Se impregnaron con 10 μ L de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro, los cuales fueron impregnados previamente con extracto etanólico a una concentración de 1000 ppm. Se utilizó como control negativo discos impregnados con 10 μ L del solvente dimetilsulfóxido (DMSO) y como control positivo Ampicilina [10 μ g], Piperacilina [100 μ g] y Eritromicina [15 μ g].

Elaboración e incubación de la actividad antibacteriana: los discos se colocaron de forma equidistante sobre la superficie del agar previamente inoculado seguidamente, las placas son llevadas a la nevera (temperatura 4 °C) durante 30 minutos con la finalidad, de que las muestras impregnadas en los discos difundan a través del agar. Finalizado los 30 minutos las placas son incubadas en estufa (37 °C) con posición invertida durante 24 horas en anaerobiosis.

Lectura de los halos: culminado el tiempo de incubación, cada una de las placas fueron revisadas para realizar las medidas en mm de los halos correspondientes incluyendo el diámetro de los discos con la ayuda de una regla milimétrica.

Interpretación de los resultados: los datos obtenidos en la medición fueron interpretados como sensibles o resistente en cada caso (Esquema 2) (Sánchez, Castillo y García, 2016).

Esquema 3. Procedimiento para la determinación antibacteriana del extracto de etanol de la hojas de *R tuberosa* por el método de difusión en agar del disco (Kirby-Bauer)



Elaborado por Iacobellis y Obregón, 2022

Diseño de Análisis

Los datos recolectados en la fase interactiva del proceso de investigación se analizaron a través de un enfoque cuantitativo al expresar numéricamente los resultados, por otra parte tuvo un enfoque cualitativo al observar y describir los resultados obtenidos. Dentro de este orden de ideas se determinó la actividad antibacteriana a través de la medición de halos de inhibición obtenidos de los extractos (Pallela y Martins, 2004). Con relación al enfoque cualitativo el estudio fitoquímico permitió el conocimiento de la composición química de la planta a través de cambio de color, formación de espuma, precipitados, fluorescencia a través de rayos ultravioleta (UV).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Obtención de los extractos de las hojas de R. tuberosa.

Los extractos de las hojas de *Ruellia tuberosa* se obtuvieron a través de reflujos en caliente, recuperando 0,16 g de extracto de hexano y 1,85 g de extracto de etanol con un porcentaje (%) de rendimiento de 0,16 % y 1,85 % respectivamente. Ver tabla 14. Para conocer los metabolitos secundarios presentes en las hojas de la planta *Ruellia tuberosa*, los extractos se sometieron a diferentes pruebas químicas cualitativas. Los resultados se observaron a través de cambios de color, formación de precipitados, producción de espuma y fluorescencia por exposición a la luz UV. De esta manera se reveló la presencia o ausencia de dichos compuestos en la especie de estudio. Para la determinación del % de rendimientos de los extractos se utilizó la siguiente fórmula:

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

Tabla 14. Determinación del porcentaje (%) de rendimiento de los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Ruellia tuberosa*.

Peso	EH	EE
Peso inicial (g)	100	100
Peso final (g)	0,16	1,85
Rendimiento (%)	0,16	1,85

Leyenda: EH: extracto de hexano. EE: extracto de etanol.

Elaborado por Iacobellis y Obregón, 2022.

Análisis Fitoquímico de las Hojas de *Ruellia tuberosa*.

En el análisis cualitativo del extracto hexanoico de las hojas de *R. tuberosa* se evidenció en la prueba de Liebermann-Burchard un anillo color rojo en el fondo del tubo y un anillo de color verde confirmando la presencia de triterpenos y esteroides, mientras que en el extracto etanólico solo se evidenció la formación de un anillo verde comprobando así la presencia de esteroides; cabe mencionar que los compuestos como flavonoides, quinonas, taninos, cumarinas, compuestos fenólicos, lactonas y glicósidos se encuentran ausentes en ambos extractos (ver tabla 15; figura 30).

Tabla 15. Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos obtenidos de las hojas de *Ruellia tuberosa*.

Metabolito	Prueba	Extracto hexano	Extracto etanol
Alcaloides	Dragendorff	ND	-
	Wagner	ND	-
	Mayer	ND	-
Triterpenos/Esteroles	Liebermann/Burchard	Rojo/Verde ++	Verde +
Compuestos Fenólicos	FeCl ₃	ND	-
Saponinas	Espuma	ND	-
Taninos	Gelatina	ND	-
Flavonoides	Shinoda	-	-
	NaOH 10%	-	-
Cumarinas	NH ₄ OH	-	-
Antraquinonas	NH ₄ OH	ND	-
Quinonas	H ₂ SO ₄	-	-
Lactonas sesquiterpénicas	Baljet	-	-
Glicósido cardiotónicos	Kedde	-	-

Leyenda: Ausente: (-), Presente: (+), Moderado: (++) , No determinado: (ND).

Elaborado por Iacobellis y Obregón, 2022.

Figura 30. Reporte de resultados de acuerdo a las características fitoquímicas de los extractos de las hojas de *Ruellia tuberosa*.

Alcaloides



Extracto: Etanol.

Prueba: Reactivos de Dragendorff (D), Wagner (W) y Mayer (M).

Reporte: negativo.

Elaborado por Iacobellis y Obregón, 2022.

Figura 30. Reporte de resultados de acuerdo a las características fitoquímicas de los extractos de las hojas de *Ruellia tuberosa* (Continuación)



Extractos: hexano (EH) y etanol (EE)
Prueba: Liebermann-Burchard.
Reporte: positivo esteroides en ambos extractos (verde). Positivo triterpenos en extracto de hexano (rojo en el fondo del tubo)

Extracto: Etanol
Prueba: Espuma.
Reporte: negativo.

Elaborado por Iacobellis y Obregón, 2022.

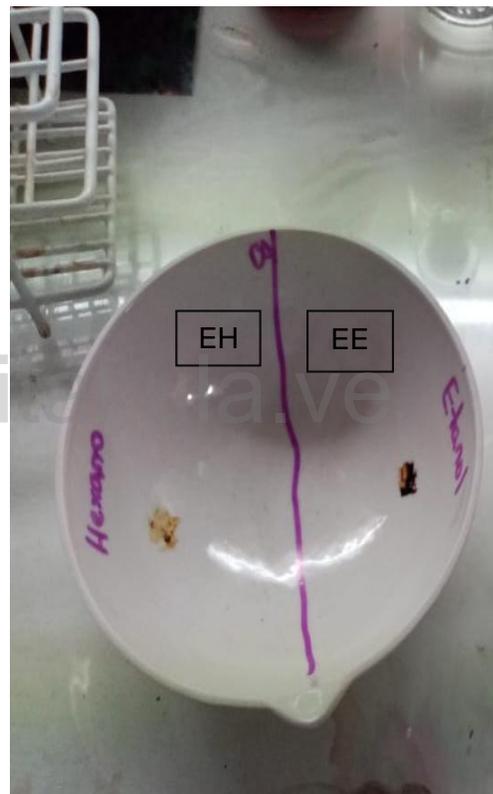
Figura 30. Reporte de resultados de acuerdo a las características fitoquímicas de los extractos de las hojas de *Ruellia tuberosa* (Continuación)

Antraquinonas



Extracto: etanol
Prueba: NH_4OH
Reporte: negativo.

Quinonas



Extractos: hexano (EH) y etanol (EE).
Prueba: H_2SO_4
Reporte: negativo para ambos extractos

Elaborado por Iacobellis y Obregón, 2022.

Figura 30. Reporte de resultados de acuerdo a las características fitoquímicas de los extractos de las hojas de *Ruellia tuberosa* (Continuación)

Flavonoides



Extractos: hexano (EH) y etanol (EE)

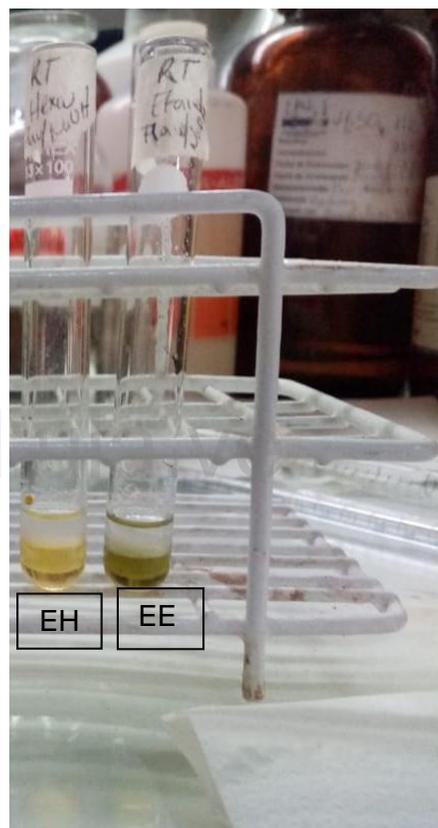
Prueba: Shinoda

Reporte:

Negativo en extracto de hexano.

Negativo en extracto de etanol.

Flavonoides



Extractos: hexano (EH) y etanol (EE).

Prueba: NaOH 10%

Reporte:

Negativo en extracto de hexano.

Negativo en extracto de etanol.

Elaborado por Iacobellis y Obregón, 2022.

Figura 30. Reporte de resultados de acuerdo a las características fitoquímicas de los extractos de las hojas de *Ruellia tuberosa* (Continuación)

Taninos



Control Positivo (CP)
Extractos: Etanol (EE)
Prueba: Ensayo de gelatina
Reporte: negativo.

Compuestos fenólicos



Extractos: Etanol
Prueba: Tricloruro Férrico (FeCl_3)
Reporte: negativo.

Elaborado por Iacobellis y Obregón, 2022.

Figura 30. Reporte de resultados de acuerdo a las características fitoquímicas de los extractos de las hojas de *Ruellia tuberosa* (Continuación)

Glicósidos cardiotónicos



Extractos: hexano (EH) y etanol (EE)
Prueba: Kedde
Reporte: negativo en ambos extractos.

Cumarinas



Control positivo (CP)
Extractos: hexano (EH) y etanol (EE)
Prueba: Fluorescencia con NH_4OH
Reporte: negativo en ambos extractos.

Elaborado por Iacobellis y Obregón, 2022.

Figura 30. Reporte de resultados de acuerdo a las características fitoquímicas de los extractos de las hojas de *Ruellia tuberosa* (Continuación)

Lactonas/ sesquiterpénicas



Extractos: hexano (EH) y etanol (EE).
Prueba: Baljet
Reporte: negativo en ambos extractos.

Elaborado por Iacobellis y Obregón, 2022.

Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de *R. tuberosa* se determinó por el método de difusión en agar del disco (Kirby-Bauer) como se observa en la figura 31. Se utilizaron cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterococcus faecalis*. Los cultivos bacterianos se extendieron con aplicadores de algodón estériles sobre distintas placas de agar Müller Hinton. Se colocaron de manera equidistante los discos impregnados con los diferentes extractos en el agar. Como control positivo se utilizaron discos de Piperacilina 100 µg, Ampicilina 10 µg y Eritromicina 15 µg. Las placas de cultivo bacteriano se incubaron a 37 °C. Después del período de incubación, las zonas de inhibición se midieron en milímetros (mm). Tabla 16.

Tabla 16: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Ruellia tuberosa*.

Bacteria	Halo de inhibición (mm)				
	EE	CP	CE	CA	CN
<i>Escherichia coli</i>	-	21	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	18	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	32	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	-	26	-	--
<i>Enterococcus faecalis</i>	ID	-	-	ID	ID

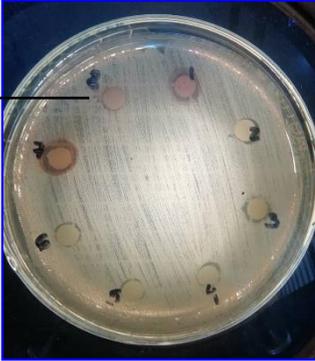
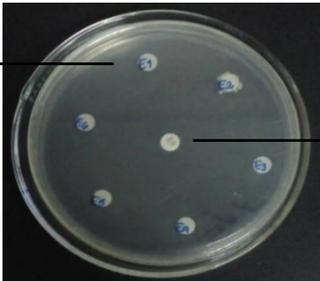
Leyenda: EE: extracto etanólico [1000 ppm]. CP: control Piperacilina [100 µg].

CE: control Eritromicina [15 µg] CA: control Ampicilina [10 µg]. mm: milímetros.

CN: control negativo. ID: indeterminado.

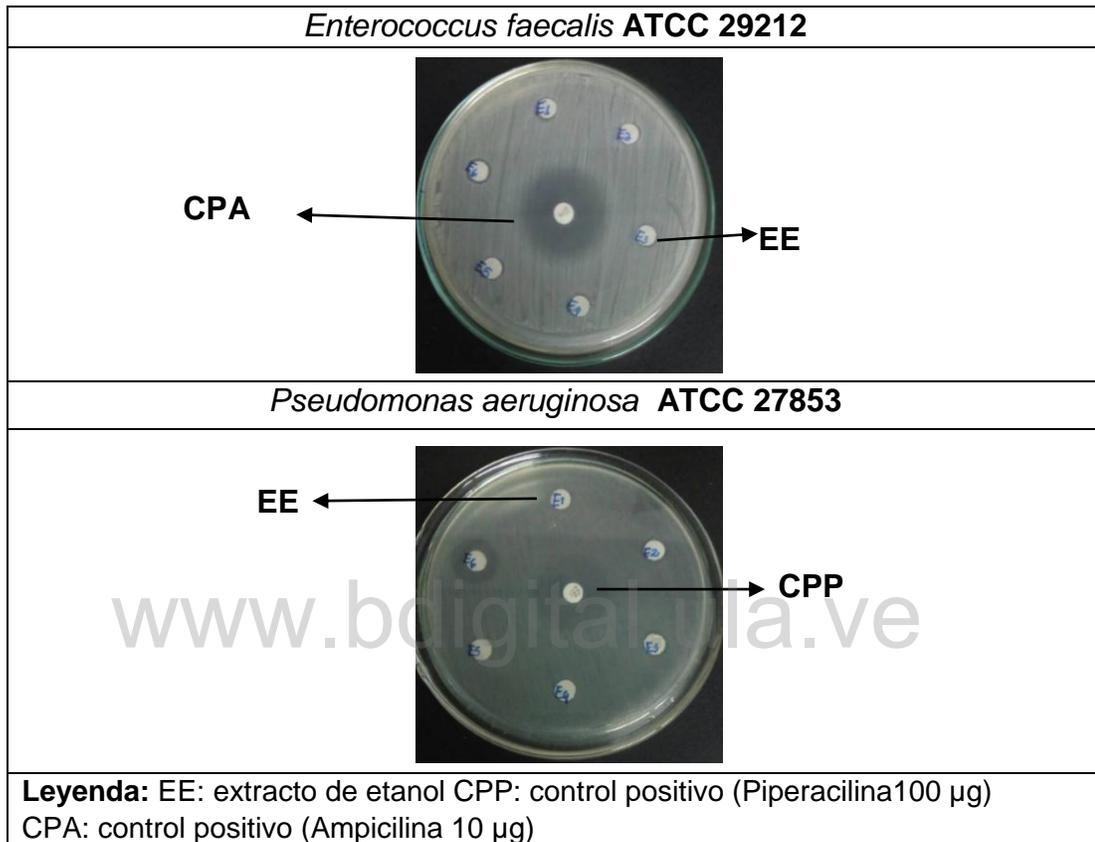
Elaborado por Iacobellis y Obregón, 2022.

Figura 31. Resultados de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de *Ruellia tuberosa*.

<p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p> 
<p><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357</p> 
<p><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p> 
<p>Leyenda: EE: extracto de etanol CN: control negativo</p>

Elaborado por Iacobellis y Obregón, 2022.

Figura 31. Resultados de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de *Ruellia tuberosa* (Continuación)



Elaborado por Iacobellis y Obregón, 2022.

Discusiones

Análisis Fitoquímico

El porcentaje de rendimiento del extracto de hexano fue de 0,16 % y de etanol 1,85%, al observar es evidente el bajo rendimiento en cada extracto y esto se debe a que los metabolitos que se encuentran retenidos son de polaridad intermedia y no se lograron extraer debido a que se implementaron solventes de baja y alta polaridad. A través del tamizaje fitoquímico se investigó la presencia de metabolitos secundarios tales como alcaloides, triterpenos/esteroles, compuestos fenólicos, saponinas, taninos, flavonoides, cumarinas, antraquinonas, quinonas, lactonas sesquiterpénicas y glicósidos en los extractos de las hojas de *Ruellia tuberosa*. Se identificaron triterpenos y esteroles en el extracto de hexano y esteroles en el extracto de etanol.

En Indonesia, investigadores identificaron metabolitos secundarios en extractos de hexano y etanol de las hojas de *Ruellia tuberosa*. Los resultados revelaron que el extracto de etanol contiene alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas y glucósidos, mientras que el extracto de hexano contiene solo terpenoides (Amajida, Purwoko y Susilowati, 2019). Lo reportado por Amajida y cols., coincide y difiere en ciertos puntos con nuestro estudio; coincide con lo estudiado en el extracto de hexano donde reportan terpenoides y en otro sentido difiere aun cuando se utilizaron las mismas partes de la planta y los mismos solventes se observa la ausencia de esteroles; a su vez, los resultados obtenidos en el extracto de etanol de esta investigación solo identificamos esteroles. Es importante mencionar que si una serie de plantas genéticamente idénticas se encuentran en regiones diferentes, hasta cierto punto, las características de las mismas se desarrollan de acuerdo con el hábitat particular en el cual crecen (Falconer y Mackay, 1996).

Por otra parte, estudios realizados en el extracto metanólico de las distintas partes de *Ruellia tuberosa*, revelan la presencia de alcaloides y lignanos en hojas y flores; taninos y alcaloides estuvieron presentes en los tallos y raíces (Ulah, Ibrar, Hamed y Hussain, 2016). La identificación de alcaloides y lignanos en el extracto las hojas de *R. tuberosa* puede deberse no solo a las condiciones climáticas sino también al uso de otro solvente.

Investigaciones previas acerca de la composición química de *Ruellia tuberosa* reportan en las raíces la presencia de esteroides, flavonoides, ácido fenólico y ascórbico en extractos hidroetanólicos (Ramadhan, Sabarudin y Safitri, 2018), de igual forma Riera y cols., 2014 estudiaron en Venezuela el extracto de etanol de las raíces de *R. tuberosa*, detectando fenoles totales, flavonoides y aceites esenciales. A pesar de estudiar partes diferentes de la planta *R. tuberosa* Ramandhan y cols., identificaron esteroides coincidiendo en este punto con los resultados de esta investigación, por el contrario, de acuerdo con los resultados obtenidos, no existe coincidencia con lo expuesto por Riera y cols.

Actividad Antibacteriana

A través del método difusión en agar del disco (Kirby-Bauer) se observó la actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de *R. tuberosa*. Los resultados obtenidos reflejaron acción antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (7 mm); en otro sentido, no se observaron efectos sobre las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Escherichia coli*. Es de importancia recordar que las bacterias Gram negativas son más complejas que las bacterias Gram positivas, ya que constan de dos membranas, una membrana citoplasmática o interna y la membrana externa compuesta por un complejo lipopolisacárido; una de las funciones de esta última es servir como barrera protectora, evitando o disminuyendo la entrada de antibióticos y otras

sustancias que podrían alterar la integridad de la bacteria; por tal motivo, es de suponer que debido a la estructura de la pared de las bacterias Gram positivas, en este caso, *S. aureus*, fue susceptible en comparación con las demás bacterias Gram negativas evaluadas.

En el 2012, Kader, Parvin, Chowduri y Haque realizaron estudios en el extracto metanólico de las raíces de *R. tuberosa* a una concentración de 500 µg/disco. Los resultados presentaron actividad antibacteriana sobre *Shigella dysenteriae* (23 mm), *Shigella sonnei* (22 mm), *Shigella flexneri* (21 mm), *Escherichia coli* (18 mm) y *Pseudomonas aeruginosa* (17 mm). El extracto de la planta fue menos eficaz contra bacterias Gram positivas presentando halos de inhibición de 13 mm en *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*. Dentro de los parámetros de la actividad antibacteriana de lo estudiado por Kader y cols., se podría decir que las concentraciones que analizaron fueron más elevadas que las empleadas en nuestra investigación, observando una diferencia en el halo de inhibición de 10 mm por encima en cepas de *S. aureus*; no obstante, la capacidad de inhibición del extracto metanólico frente a *Streptococcus pneumoniae* y cepas Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) difiere con lo reportado en nuestra investigación y esto puede deberse a la extracción de otros metabolitos secundarios durante el proceso debido al uso de otra parte de la planta (raíces) así como también al empleo de un solvente de diferente polaridad.

Ahora bien, un artículo titulado Evaluación farmacognóstica y farmacológica de *Ruellia tuberosa* L publicado en la Universidad de Pakistán mostró que el extracto metanólico de la planta entera presentó actividad antibacteriana a una concentración de 10 µg/mL frente a *Klebsiella pneumoniae* (26 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (12 mm), *Staphylococcus aureus* (17 mm), *Salmonella typhi* (6 mm) y *Escherichia coli* (9 mm). El uso de

la planta entera posiblemente es el factor más significativo, ya que se pueden extraer diversos los metabolitos secundarios y en conjunto causar un efecto de sinergismo, favoreciendo el aumento de la actividad antibacteriana tanto en cepas Gram positivas como en Cepas Gram negativas (Ulah, Ibrar, Hamed y Hussain, 2016).

Se constató por medio del método de difusión en agar del disco la actividad antibacteriana de los extractos de hexano y etanol de las hojas de *R. tuberosa* contra *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis* (Amajida, Purwoko y Susilowati, 2019). Los resultados se muestran a continuación en las tablas 17 y 18.

Tabla 17. Diámetro de inhibición del extracto de etanol de las hojas de *R. tuberosa* con las bacterias *E.coli* y *B. subtilis*

Concentración del extracto (mg/mL)	Diámetro de inhibición (mm)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
2000	13,706	6,696
1000	7,569	5,814
500	6,702	0
125	5,488	0

Leyenda: mm: milímetros

Tomado y modificado de Amajida, Purwoko y Susilowati, 2019.

Tabla 18. Diámetro de inhibición del extracto de hexano de las hojas de *R. tuberosa* con las bacterias *E.coli* y *B. subtilis*

Concentración del extracto (mg/mL)	Diámetro de inhibición (mm)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
2000	9,181	0
1000	0	0
500	0	0
125	0	0

Leyenda: mm: milímetros

Tomado y modificado de Amajida, Purwoko y Susilowati, 2019.

Como puede observarse, Amajida y cols., utilizaron concentraciones muy elevadas en comparación con nuestro estudio; al realizar una relación entre las concentraciones de los extractos y los halos de inhibición observados podemos concluir que nuestro extracto posee actividad antibacteriana significativa ya que esta fue estudiada a una concentración muy baja (1 mg/mL).

Castillo, 2021 estudió la actividad antibacteriana del extracto metanólico de cada una de las partes de *Ruellia nudiflora* así como también de la planta entera. Los resultados muestran actividad antibacteriana del extracto metanólico de las hojas de *R. nudiflora* en cepas de *Klebsiella pneumoniae* (7 mm); por otro lado, el extracto metanólico de la planta entera tuvo efecto inhibitorio frente a *Streptococcus pyogenes* (20 mm). En comparación con la especie estudiada en nuestra investigación, los metabolitos involucrados en el estudio en la actividad biológica empleada por Castillo, pueden ser de mediana a alta polaridad.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- El análisis fitoquímico preliminar de los extractos obtenidos de *Ruellia tuberosa* permitió identificar la presencia de triterpenos y esteroides. Los metabolitos secundarios: cumarinas, taninos, saponinas, alcaloides, compuestos fenólicos se encuentran ausentes.
- La determinación de la actividad antibacteriana por el método de difusión en agar del disco (Kirby Bauer) del extracto de etanol de las hojas de *R. tuberosa* frente a las cepas de referencial internacional estudiadas, reveló un halo de inhibición de 7 mm en *Staphylococcus aureus* mostrando actividad antibacteriana a pesar de la concentración implementada (1000 ppm).
- En el antibiograma de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* no se observaron halos de inhibición.
- El cultivo de *Enterococcus faecalis* no creció, por consiguiente no se pudo determinar la actividad antibacteriana del extracto de las hojas de *Ruellia tuberosa* frente a esta cepa.
-

Recomendaciones

- Estudiar los extractos de las flores, tallos y raíces.
- Realizar extractos de las hojas de *Ruellia tuberosa* con el uso de solventes con polaridad intermedia tales como: acetona, acetato de etilo, diclorometano o dimetil sulfóxido ya que podrían ser gran de utilidad para extraer otros metabolitos secundarios.
- Utilizar el método de difusión en pozo para observar el comportamiento de los extractos frente a cepas de referencia internacional.
- Estudiar la acción antibiótica de los extractos a diferentes concentraciones a través del método concentración inhibitoria mínima.
- Analizar otras actividades biológicas de los extractos de las hojas de *R. tuberosa*, tales como actividad antiinflamatoria, antiparasitaria y antioxidante.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOHEMROGRÁFICAS.

- Albornoz, A. (1998). Medicina Tradicional Herbaria. Guía de Fitoterapia Instituto Farmacoterápico Latino S.A. Venezuela - Caracas
- Albornoz, A. (1992). Medicina Tradicional Herbaria. Guía de Fitoterapia Instituto Farmacoterápico Latino S.A. Venezuela - Caracas.
- Albornoz, A. (1980). Productos Naturales. Estudios de las sustancias y drogas de las plantas. Universidad Central de Venezuela -Caracas.
- Amajida, H., Purwoko, T., y Susilowati, A. (2019). Antibacterial activity of ethanolic and *n*-hexane extracts of *Ruellia tuberosa* leaves against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* bacteria. *Biofarmasi*, 17 (2): 69-80. Recuperado de <https://smujo.id/jnpb/article/view/10514>
- Andhiwal, C., y Chandra, R. (1985). Phytochemical Investigation of *Ruellia tuberosa* L. *Indian drugs*, 23: 49.
- Arun, S., Giridharan, P., Suthar, A., Kulkarni, A., Naik, V., y Velmurugan, R. (2008). Isolation of Tylocrebrine from *Ruellia tuberosa* through bioassay directed column chromatography and elucidating its anti-cancer and antiinflammatory potential. Book of Abstracts. *7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSI & SIF, Athens, Greece*. 25
- Ávalos, A., y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA*, 2 (3): 119-145. Recuperado de <http://darwin.bio.ucm.es/revistas/index.php/reduca-biologia/issue/archive>
- Azcón, J., y Talón, M. (2000). Fundamentos de la fisiología vegetal. 2da edición. España. McGraw-Hill interamericana.
- Bermúdez, J. (2015). Estudio fitoquímico de plantas utilizadas en el control de la diabetes mellitus y evaluación de la actividad biológica sobre glucosa-6-fosfatasa de los metabolitos aislados y productos sintetizados.

Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias., Escuela de Química. Caracas-Venezuela. (Trabajo de Postgrado para la optar al título de Doctor en Ciencias, Mención Química).

- Bisso, A. (2018). Resistencia a antimicrobiano. *Revista sociedad Perú médica interna*, 31 (2): 50-59. Recuperado en https://medicinainterna.net.pe/sites/default/files/revista_vol_23_2/SPMI%202018-2%20%20Resistencia%20a%20los%20antimicrobianos.pdf
- Brooks, G., Carroll, K., Morse, S., Mietzner, T., y Butel, J. (2011). *Microbiología Médica*. 25va edición. Editorial Mcgraw-Hill 71 Interamericana: México.
- Cabrera, D., Torres, D., Saavedra, 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(1): 192-199.
- Calvo, J., y Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica*. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(1): 44-52. Recuperado de <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-mecanismos-accion-antimicrobianos-S0213005X08000177>
- Castillo, C. (2021). Actividad antibacteriana y antioxidante de *Cordia dodecandra*, *Melochia nodiflora* y *Ruellia nudiflora* y aislamiento de un metabolito secundario. Centro de Investigación Científica de Yucatán. (Trabajo que se presenta para la opción al título de Maestro en Ciencias) Mérida, México.
- Chasquibol, N., Lengua, L., Delmás, I., Rivera, D., Bazán. D., Aguirre, R., y Bravo M. (2003). Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia. *Revista. Peruana. Química. Ingeniería. Química*, 5 (2): 9-20. Recuperado en file:///C:/Users/Usuario/Downloads/descarga.pdf

- Chasin, J., y Figueroa, S. (2016). Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto de *Aphelandra guayasii* Wassh. (Trabajo para optar al Grado de Químico y Farmacéutico). Guayaquil, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/19407/1/BCIEQ-T-0178%20Chasin%20Balseca%20Juan%20Sebastian%3B%20Figueroa%20Astudillo%20Sandra%20Patricia.pdf>
- Chih-Yuan, K., Ru-Hai, L., Yangminig, M., Wen-Chang, C., Da-Wei, H., James, W., Yu-Fang, C., Wen-Chang, H. y Szu-Chuan, S. (2019). Efecto de *Ruellia tuberosa* L. sobre los factores asociados al daño endotelial de la aorta en la dieta alta en grasas y las ratas diabéticas tipo 2 inducidas por estreptozotocina. *Revista Food Science and Nutrition*, 7(11): 3742-3750.
- Chothani, D., Patel, M., Mishra S., y Vaghasiya H. (2010). Review on *Ruellia tuberosa* (Cracker plant). *Pharmacognosy Journal*, 2(12): 506-512.
- Ciangherotti, C., Maldonado, A., Orsini, G., Perdomo, L., Alvarez, M., Salazar, M., e Israel, A. (2013). Efecto protector de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre el daño renal inducido por la diabetes experimental. *Revista Red de Revistas Científicas*, 32(4): 57-66. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=55931091001>
- Colina, A. (2016). Análisis fitoquímico, determinación cualitativa y cuantitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de "*Muehlenbeckia hastulata* (J.E.Sm) I.M. Johnst" de la zona de Yucay (Cusco). Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Química e Ingeniería Química E.A.P. De Química. (Trabajo para optar por el título profesional de Químico). Lima- Perú.
- Correa, M., Galdames, C., y De Stapf, M. (2004). *Catálogo de Plantas Vasculares de Panamá*. Primera edición. Colombia

- Covo, E. (2017). Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de semillas de *Mammea americana* sobre *Enterococcus faecalis*. Universidad de Cartagena, Facultad de Odontología, Cartagena-Bolívar. (Trabajo de Grado para la obtención de título de Especialista en Endodoncia).
- Coy, C., y Acosta, G. (2013). Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero, tomillo y cúrcuma de Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(2): 237-246.
- Domingo, D. y López M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista española Quimioterapia*, 16(4):385-393.
- Domínguez, X. (1979). Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa, México.
- Domínguez, I. (2020). *Justicia secunda* Valh, especie utilizada en la Medicina Indígena colombiana. (Trabajo fin de grado de Farmacia). Universidad de Sevilla. Recuperado de <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/103953/DOMINGUEZ%20A%20RAGON%20ISABEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. (2003). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8): 9-15. Recuperado de [https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X\(14\)64063-5/fulltext](https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198-743X(14)64063-5/fulltext)
- Ezcurra, C., y Azkue, D. (1989). Validation and genetic and morphological relationships *Ruellia macrosolen* (Acanthaceae) from southern South America. *Revista Missouri Botanical Garden*, 14(3): 29-303.

- Falconer, D., y Mackay T. (1996) Introduction to quantitative genetics. 4ta edición. Longman.
- Ferraro, G., Martino, V., Bandoni, A., y Nadinic, J. (2015). Fitocosmética: fitoingredientes y otros productos naturales. Buenos Aires-Argentina. Editorial Eudeba. Recuperado de <https://books.google.co.ve/books?id=9uBDDAAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Fiallos, J. (2017). Determinación de la correlación entre métodos visuales, ópticos y difusión en placa en el crecimiento de *Escherichia coli*. (Trabajo de investigación para la obtención de título Ingeniera Bioquímica). Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/26334>
- Finch, R., Greenwood, D., Ragnar, S., y Whitjey, R. (2010). Antibiotic and Chemotherapy. Documento PDF, consultado en línea https://rumedo.ru/uploads/sites/2016/pdf/finch_r_g_greenwood_d_norr_by_s_r_whitley_r_j_eds_antibiotic.pdf
- Gutiérrez, A., y Estévez, A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el siglo XXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (España)*, 103(2):409-419. Recuperado de <https://rac.es/ficheros/doc/00899.pdf>
- Hadacek, F., y Greger, H. (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Revista Phytochemical Analysis*, 11(3):137.
- Hernández, R., Fernández, C. y Baptista, L. (2010). Metodología de la investigación. Quinta edición. Perú: McGrawHill
- Hurtado, J. (2010). El proyecto de Investigación. Sexta edición. Bogotá-Caracas: Ediciones Quirón.

- Hurtado, J. (2010). Guía para la comprensión holística de la ciencia. Tercera edición Caracas: Fundación Sypal.
- Kader, A., Parvin, S., Chowduri, A., y Haque, E. (2012). Antibacterial, antifungal and insecticidal activities of *Ruellia tuberosa* L root extract. *Journal of Bio-Science*, 20:91-97. Recuperado de <https://www.banglajol.info/index.php/JBS/article/view/17720>
- Koneman, E. (2009). *Diagnóstico Microbiológico*. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana.
- Lakshmanan, P., y Jothi, G. (2015). *In vitro* regeneration of *Ruellia tuberosa* L (Acanthaceae) through direct organogenesis. *International Journal of Recent Scientific Research Research*, 6(5): 3988-3990.
- Lamarque, A., Zygadlo, J., Iabuckas, D., López, L., Torres, M. y Maestri, D. (2008). *Fundamentos teórico-prácticos de Química orgánica*. Primera edición. Córdoba, Argentina: Editorial Encuentro.
- León, B. (2006). Acanthaceae endémicas del Perú. *Revista Peruana de biología*, 13(2): 23-29. Recuperado de <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/article/view/1787#:~:text=La%20familia%20Acanthaceae%20es%20reconocida,ta xones%20end%C3%A9micas%20en%2015%20g%C3%A9neros>.
- Lincoln, T. (2006). *Plant physiology*. Cuarta edición. Sinauer associates.
- López, L. (2016). Curva de crecimiento bacteriano en la producción de proteínas recombinantes. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción. México. Recuperado de https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/Transferencia_de_conocimientos_Liz_Lopez_2015.pdf
- Luján, M., Gutiérrez, N., Gaviria, J., y Aranguren, A. (2011). Estudio florístico preliminar en la ciudad de Mérida, Estado Mérida, Venezuela. *Revista Pittieria*, 35: 35-61. Recuperado de <http://www.ula.ve/ciencias->

- forestales-ambientales/indefor/wp-content/uploads/sites/9/2016/11/2011_Luj%C3%A1n-et-al.pdf
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Universidad Central de Venezuela: Caracas.
- McDade, L., Masta, S., Moddy, M., y Waters, E. (2000). Phylogenetic relationships among Achathaceae: evidence from two genomes. *Systematica Botany*, 25(1):106-121. Recuperado de <https://www.jstor.org/stable/2666677?origin=crossref>
- Meurer, B., McBeth, D., Hallihan, B., y Delph, S. (2008). Antimicrobial activity in medicinal plants of the Scrophulariaceae and Acanthaceae. *Journal of Pharmaceutical Biology*, 34(4):243-248. Recuperado de <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1076/phbi.34.4.243.13220>
- Mora, P., y Bustamante, K. (2017). Caracterización y estudio fitoquímico de *Justicia secunda* Valh (*sanguinaria*, *singamochila*, *insulina*). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 22(1): 1028-4796. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962017000100016
- Murray, P. (2006). *Microbiología Médica*. 5ta edición. España: Editor Elsevier Mosby.
- Organización Mundial de la Salud. (Octubre, 2016). Resistencia a los antibióticos. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/es/>
- Organización Mundial de la Salud. (Enero, 2013). Buenas prácticas de la OMS para laboratorios de microbiología farmacéutica. Recuperado de <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Red-PARF-No11Es.pdf>
- Organización Panamericana de la Salud. (Septiembre, 2004). Legislación sobre antibióticos en América Latina. Recuperado de http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/Pnadg083.pdf

- Palella, S., y Martins, F. (2012). Metodología de la investigación cuantitativa. Caracas: FEDUPEL.
- Parra, D., Castro, M., y Aponte, Y. (2016). Marcha fitoquímica preliminar. Corporación tecnológica de Bogotá. Tecnología en Regencia de Farmacia. Quinto Semestre. Bogotá D.C. Colombia.
- Phakeovila, S. y Disadee, W. (2013). Phenylethanoid and flavone glycosides from *Ruellia tuberosa* L. *Journal of natural medicines*, 67: 228–233. DOI: 10.1007/s11418-012-0658-7.
- Peña, R. (2002). Algunas consideraciones sobre el empleo de productos naturales en la medicina natural y tradicional. Monografía. Bayamo. 2-6.
- Picazo, J. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Sociedad 93 Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España.
- Radigales, E. (2019). Ruderales. *Dialnet*, 2(1):113-120.
- Ramadhan, M., Sabarudin, A., y Safitri, A. (2018). *In vitro* anti-microbial activity of hydroethanolic extracts of *Ruellia tuberosa* L.: eco-friendly based-product against selected pathogenic bacteria. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 239(1):1-9. Recuperado de <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/239/1/012028/pdf>
- Ramírez, L., y Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal *Scientia et Technica Año XV*, 42(1):263-268. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>
- Riera, M., Sanabria, M., Rodríguez, H., Escalante, R., y Valera, R. (2014). Extracto etanólico de las raíces de yuquilla (*Ruellia tuberosa* L.) para el control de *Sclerotium rolfsii* en pimentón (*Capsicum annum* L.). *Revista*

de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia, 1:435-444.

Recuperado de

https://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/suplemento_2014/fito/fitosupl1_2014435444.pdf

- Rivas P., y Alonso, G. (2011). Regulación de la dispensación de medicamentos y su efecto en el consumo de antibióticos en Venezuela. *Revista Panamericana Salud Pública*, 30(6):592–597.
- Rivera, F. (2018). Evaluación de la actividad antimicrobiana “*in vitro*” del extracto hidroetanólico de hojas de *Vernonanthura patens* (Laritaco) sobre *Escherichia coli*. Universidad Regional Autónoma de Los Andes. Facultad de Ciencias Médicas. (Trabajo para la obtención del grado académico de magister en Farmacia Clínica y Hospitalaria). Ambato-Ecuador
- Rodríguez, R. (1997). *Análisis fitoquímico preliminar*. Armenia-Colombia: Universidad del Quindío.
- Sánchez, F., y García, f. (2021). *Fitoquímica*. 1era Edición. Ciudad de México, México. Comité Editorial de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Recuperado de: <https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/2022/Publicaciones/libros/cbiologia/Fitoquimicia.pdf>
- Sánchez, E., Castillo S., y García, P. (2016). Actividad antimicrobiana investigación en plantas de importancia médica. Barcelona-España: *OmniaScience* p 100.
- Shanmugasundaram, P. (2006). Hepatoprotective and antioxidant effects of *Hygrophila auriculata* (K. Schum) Heine Acanthaceae root extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 104:124-128.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Santafé de Bogotá, Colombia: CYTED.

- Subramanian, S., y Nair, A. (1974). Apigenin glycoside from *Thunbergia fragrans* and *Ruellia tuberosa*. *Current science*: 480.
- Tamayo, R., Verdecia, A., y Mojera, I. (2011). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólicos, etéreo y acuosos de las hojas y tallo de la *Isocarpha cubana* B. *Red de Revistas Científicas*
- Troncoso, C., Pavez, M., Santos, A., Salazar, R., y Barrientos, L. (2017). Implicaciones estructurales y fisiológicas de la célula bacteriana en los mecanismos de resistencia antibiótica. *International journal of morphology*, 35(4). Recuperado de https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022017000401214
- Trópicos.org. Jardín botánico de Misuri. 13 de noviembre de 2022. <<https://tropicos.org>>
- Ulah, R., Ibrar, M., Hameed, I., y Hussain, F. (2016). *Pharmacognostic and pharmacological evaluation of Ruellia tuberosa* L. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(6):2099-2102. Recuperado de <http://www.pjps.pk/wp-content/uploads/pdfs/29/6/Paper-28.pdf>
- Urdaneta, J., y Páez, A. (2009). Determinación de la actividad antiletal *in vivo* del extracto acuoso de *Barleria lupulina* Lindl (Acanthaceae) sobre el veneno de *Crotalus durissus* cumanensis. *Revista Científica de la Universidad de Los Andes*, 10(3): 233-239. Recuperado de <https://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/14707>
- Valares, C. (2011). Variación del metabolismo secundario en plantas de billa al genotipo y al ambiente. (Trabajo para optar al grado de Doctora en Ciencias). Universidad de Extremadura Badajoz, México.
- Velasco, J., Araque, M., Araujo, E., Longa, A., Nieves, B., Ramírez, A., Sánchez, K., y Velazco, E. (2008). Manual práctico de bacteriología

clínica, Practica 2 prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Primera edición. Mérida, Venezuela. Editorial Venezolana, C.A.

Verde, M., García, S., y Rivas, C. (2016). Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. *Investigación en plantas de importancia médica* (pp 1-40). Barcelona-España: OmniaScience.

Vivot, P., Sánchez, C., Cacik, F., y Sequin, C. (2012). Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de entre ríos (Argentina). *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 23(45): 165-185.

www.bdigital.ula.ve