



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



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ENSAYO FITOQUÍMICO DE LOS
EXTRACTOS OBTENIDOS EN TALLOS Y HOJAS DE *Moringa oleífera* EN
BACTERIAS GRAMPOSITIVAS Y GRAMNEGATIVAS**

www.bdigital.ula.ve

Autor:

Fernández Sánchez José Alfredo

C.I: 23.547.072

Tutora:

Prof. Johanna Hernández

Mérida, noviembre de 2022

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen de la Consolación de Táriba; por ser mis guías espirituales durante el camino de este sueño, y por brindarme la sabiduría y entendimiento necesario para la realización de este proyecto.

A mis padres, Esperanza Sánchez y Richard Vivas por ser el apoyo incondicional en este largo camino, gracias a ustedes, culmino esta meta y este sueño académico. A mi padre, Jesús Fernández que desde el cielo me sigue acompañando en este gran logro. Gracias a ustedes por tanto esfuerzo que han hecho hacia mí, los Amo.

A mis hermanos, Jesús, Camila y Camelia por sentirse orgullosos de mí, por darme el ánimo y apoyo necesario para continuar con esta meta. Gracias por recorrer conmigo este camino de aprendizaje.

Este triunfo también es parte de ustedes. LOS AMO.

www.bdigital.ula.ve

José Alfredo Fernández Sánchez.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a la Virgen por brindarme la fortaleza espiritual y mental para atravesar este camino, gracias por ayudarme a canalizar todo obstáculo que se me presento en el transcurso del tiempo.

A mis Padres, por ser personas trabajadora, luchadora y por siempre querer lo mejor para sus hijos. Gracias por brindarme la oportunidad de tener una educación de calidad y por inculcarme valores que hoy día me representan como persona.

A toda mi Familia (Hermanos, Tíos, Primos, Padrinos y Amigos) por su apoyo y ánimo para culminar esta etapa de mi vida. En especial; a mi Nona, Carmen Rosales por siempre brindarme su amor y tenerme en sus oraciones para el éxito y logro de todos mis objetivos.

A mi prima, Paola Fernández por recorrer gran parte de este triunfo conmigo; este logro también es tuyo, hoy en día la distancia nos separa, pero el cariño y el amor nos une para continuar celebrando cada una de nuestras metas.

A mi tutora, la profesora Johanna Hernández, por su dedicación y paciencia, sin sus palabras y correcciones precisas no hubiese podido llegar a esta instancia tan anhelada.

Son muchos los docentes que han sido parte de mi camino universitario, a todos ellos les quiero agradecer por transmitirme los conocimientos necesarios para hoy estar aquí. En especial a mis profesoras del Instituto de Investigaciones: Rosa Aparicio, Ysbelia Obregón, e Yndra Cordero, gracias por la dedicación hacia mí en todo momento.

Agradezco inmensamente al Profesor Luis Rojas, por su dedicación y apoyo que me brindo en la realización de este proyecto. Desde el cielo nos seguirá guiando para el éxito de toda investigación que se plantee. Dios lo tenga en la Gloria.

Agradezco a todos mis compañeros Ulandinos, los cuales muchos de ellos se han convertido en mis amigos, cómplices y hermanos. Gracias por las horas compartidas, los trabajos realizados en conjunto y las historias vividas.

A mi casa de estudio, la ilustre Universidad de los Andes, en especial a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por brindarme sus espacios e inculcar valores académicos, profesionales y humanos para mi formación, siempre me sentiré orgullosos de ser Ulandino.

www.bdigital.ula.ve

José Alfredo Fernández Sánchez.

ÍNDICE DE CONTENIDO

VEREDICTO	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	3
Planteamiento del Problema	3
Justificación de la Investigación	5
Objetivos de la Investigación	6
<i>Objetivo General</i>	6
<i>Objetivos Específicos</i>	6
Alcances y Limitaciones de la Investigación	7
<i>Alcances de la Investigación</i>	7
<i>Limitaciones de la Investigación</i>	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	8
Trabajos Previos	8
Antecedentes Históricos	11
Bases Teóricas	12
<i>Familia Moringaceae</i>	12
<i>Género Moringa</i>	13
<i>Moringa oleífera</i>	14
<i>Metabolismo secundario de las plantas</i>	20
<i>Alcaloides</i>	21
<i>Saponinas</i>	22
<i>Terpenos</i>	22

<i>Flavonoides</i>	23
<i>Fenoles</i>	23
<i>Taninos</i>	24
<i>Triterpenos</i>	25
<i>Extractos</i>	25
<i>Métodos de extracción</i>	26
<i>Maceración</i>	26
<i>Lixiviación</i>	26
<i>Digestión</i>	26
<i>Infusión</i>	26
<i>Decocción</i>	27
<i>Ensayo Fitoquímico</i>	27
<i>Generalidades de las Bacterias</i>	29
<i>Distinción macroscópica</i>	30
<i>Distinción microscópica</i>	30
<i>Tinción de Gram</i>	30
<i>Bacterias Grampositivas</i>	31
<i>Bacterias Gramnegativas</i>	31
<i>Microorganismos Patógenos</i>	32
<i>Staphylococcus aureus</i>	32
<i>Enterococcus faecalis</i>	32
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33
<i>Escherichia coli</i>	33
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33
<i>Antibióticos</i>	34
<i>Inhibición de la síntesis de la pared celular</i>	34
<i>Inhibición de la síntesis de proteínas</i>	34
<i>Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos</i>	34
<i>Inhibición de la membrana externa</i>	34
<i>Actividad Antibacteriana</i>	35

<i>Método de difusión en agar por disco (Kirby.Bauer)</i>	35
<i>Método modificado de pozos de agar</i>	35
Definición Operacional de Términos	37
Operacionalización de las Variables	38
Hipótesis	41
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	42
Tipo de investigación	42
Diseño de investigación	42
Población y muestra	43
<i>Unidad de investigación</i>	43
<i>Selección del tamaño de la muestra</i>	43
Sistema de variables	43
Instrumento de recolección de datos	44
Procedimiento de la investigación	44
<i>Determinación de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de Moringa oleífera</i>	45
<i>Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos en tallos y hojas de Moringa oleífera</i>	48
<i>Bacterias de ensayo</i>	48
<i>Preparación de pre-inóculos bacterianos</i>	49
<i>Preparación del inóculo bacteriano</i>	49
<i>Preparación de las placas</i>	49
<i>Preparación de los discos</i>	49
Diseño de Análisis	50
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	51
Resultados	51
Ensayo Fitoquímico Preliminar	52
Evaluación de la Actividad Antibacteriana	54
Discusiones	56
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	58

Conclusiones	58
Recomendaciones	59
BIBLIOHEMEROGRAFIA	60
ANEXOS	66

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Partes de la <i>Moringa oleífera</i>	15
Figura 2.	Estructura química de la sacarosa	16
Figura 3.	Estructura química de la ramnosa	16
Figura 4.	Estructura química del glucosinolatos	17
Figura 5.	Estructura química del β -sitosterol	17
Figura 6.	Estructura química del bencil-isotiocianatos	17
Figura 7.	Estructura química del indol	22
Figura 8.	Estructura química de la saponina	22
Figura 9.	Estructura química del isopreno	23
Figura 10.	Estructura química de flavonoides	23
Figura 11.	Estructura química del fenol	24
Figura 12.	Estructura química de los taninos condensados	24
Figura 13.	Estructura química del estigmasterol	25
Figura 14.	Pared celular de las bacterias grampositivas y gramnegativas	32
Figura 15.	Concentración del extracto en rotavaporador	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Descripción taxonómica de la Familia <i>Moringaceae</i>	13
Tabla 2.	Composición química de la <i>Moringa</i>	18
Tabla 3.	Usos medicinales de la <i>Moringa</i>	19
Tabla 4.	Operacionalización de la variable dependiente	39
Tabla 5.	Operacionalización de la variable independiente	40
Tabla 6.	Ensayo fitoquímico para la determinación de metabolitos secundarios del extracto de tallos y hojas de <i>Moringa oleífera</i>	46
Tabla 7.	Cepas de Referencia Internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC)	48
Tabla 8.	Peso de las partes de la planta, junto al peso de los extractos, para obtener el porcentaje de rendimiento de cada extracto	51
Tabla 9.	Reporte de los resultados del ensayo fitoquímico de los extractos de tallos y hojas de <i>Moringa oleífera</i>	52
Tabla 10.	Reporte ilustrado de los resultados positivos del ensayo fitoquímico de los extractos en tallos y hojas de <i>Moringa oleífera</i>	54
Tabla 11.	Resultados obtenidos en la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos en tallos y hojas de <i>Moringa oleífera</i>	55



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”
LINEA DE INVESTIGACIÓN: PRODUCTOS NATURALES



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ENSAYO FITOQUÍMICO DE LOS
EXTRACTOS OBTENIDOS EN TALLOS Y HOJAS DE *Moringa oleífera* EN
BACTERIAS GRAMPOSITIVAS Y GRAMNEGATIVAS**

Autor:

Fernández Sánchez José Alfredo

C.I: 23.547.072

Tutora:

Prof. Johanna Hernández

RESUMEN

Moringa pertenece a la familia Moringaceae, un árbol originario de determinadas regiones de Asia y África; este género comprende 13 especies, las cuales son arboles de climas tropicales y subtropicales siendo la especie más popular *Moringa oleífera*. Las diferentes estructuras de la planta recogen numerosos efectos saludables; tales como, antioxidantes, antiinflamatorios, bactericidas, entre otros. El objetivo de esta investigación fue; Evaluar la actividad antibacteriana y ensayo fitoquímico de los extractos obtenidos en tallos y hojas de *Moringa oleífera* en cepas de referencia internacional. Los extractos de tallos y hojas fueron obtenidos mediante la técnica de maceración con disolventes orgánicos como hexano, diclorometano y etanol; en una concentración de 10.000ppm, posteriormente su composición química preliminar fue analizada cualitativamente mediante el ensayo fitoquímico, logrando la identificación de: esterol y compuestos fenólicos; derivados del pirocatecol. La actividad antibacteriana se determinó mediante el método de difusión en agar por disco (Kirby-Bauer) donde se demostró que todos los extractos fueron activos frente a: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo, *Escherichia coli* no presento actividad alguna.

Palabras claves: *Moringa oleífera*, actividad antibacteriana, ensayo fitoquímico.

INTRODUCCIÓN

En el antiguo Egipto *Moringa oleífera*, era considerada como un producto exótico, de lujo que se regalaba a reyes para incluirlo en sus tesoros que han de llevar en las tumbas funerarias para la otra vida. Sin embargo, para el año 1746 fue nombrado en un fragmento anónimo del Jardín Botánico de Madrid. Durante gran parte del siglo XX ha sido conocida en Europa y Norte América por la buena calidad de su aceite como lubricante industrial, ignorándose sus propiedades alimenticias y curativas. No obstante, en 1946 apareció en la revista científica *Nature* el hallazgo y aislamiento de las raíces de una molécula de carácter antibiótico (López, 2016).

Moringa, es un árbol caducifolio, de crecimiento rápido, con raíces tuberosas y gruesas, hojas verdes claro, de floración abundante, con frutos en capsulas colgantes que contienen semillas oscuras. Es originario de la India, perteneciente a la familia: Moringaceae, el gran reconocimiento que ha adquirido este árbol se debe a su carácter medicinal, ornamental, a sus utilidades dentro de la naturaleza y a su extraordinaria facilidad de cultivo. Está arraigado en la cultura popular debido a sus propiedades curativas que se le atribuyen para el tratamiento de diferentes afecciones (Doménech, Durango y Ros, 2017).

Por esta razón, los productos naturales han sido aliados de la medicina desde tiempos inmemoriales. Siendo la naturaleza una pieza clave para la creación de nuevos tratamientos, para ayudar a promover, mantener y garantizar la vida y el bienestar de las personas. Por ello, la química permite aislar el principio activo del compuesto y mejorar sus aplicaciones. En la actualidad, la mayoría de los fármacos originados a partir de las plantas siguen teniendo una posición destacada pese a los avances que se han producido en la materia, como en el desarrollo de la síntesis, la química combinatoria o los procesos biotecnológicos de fermentación microbiana (Instituto de Productos Naturales y Agrobiología IPNA, 2019).

En tal sentido, los extractos de *Moringa* podrían ayudar a tratar trastornos estomacales, prevenir y tratar el cáncer, luchar contra enfermedades bacterianas, proteger el sistema cardiovascular, entre otras enfermedades. Sus propiedades antibióticas y antibacterianas ayudan a inhibir el crecimiento de varios patógenos y contribuir con la salud pública. Este panorama impulsa al hombre para la búsqueda y descubrimiento de nuevas drogas con eficacia terapéutica (Cadman, 2020).

Este trabajo está estructurado siguiendo las normas APA, a través de cinco capítulos, el capítulo I esta titulado como El Problema, subtítulo, Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El capítulo II esta titulado como, Marco Teórico y subtítulo por, los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las Variables e Hipótesis. El capítulo III titulado, Marco Metodológico y subtítulo, Tipo de Investigación, Diseño de Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Instrumento de Recolección de Datos, Procedimiento o Metodología de la Investigación y Diseño de Análisis. El capítulo IV esta titulado como Resultados y Discusiones, y el capítulo V esta titulado y compuesto por, Conclusiones y Recomendaciones.

Finalmente, esta investigación tiene como objetivo general: Evaluar la actividad antibacteriana y ensayo fitoquímico de los extractos obtenidos en tallos y hojas de *Moringa oleífera* en cepas de referencia internacional, con el fin de proporcionar un aporte científico para el uso de la especie en la prevención y tratamiento de enfermedades.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

La resistencia a los antibióticos es una de las mayores amenazas para la salud, la seguridad alimentaria y el desarrollo. Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar infecciones bacterianas; sin embargo, su resistencia ha ido aumentando día tras día, y propagándose en todo el planeta, afectando a cualquier persona, independientemente de la edad, sexo, o distribución geográfica (Organización Mundial de la Salud, 2020). En tal sentido, debemos iniciar por adquirir métodos alternativos que no perjudiquen de manera radical al ser humano.

El uso de *M. oleífera* para el control de diversas infecciones provocadas por microorganismos es bien conocido, y en años recientes se han generado resultados científicos que confirman su efectividad. Estudios *in vitro* han comprobado la actividad de diferentes partes de la planta sobre los microorganismos patógenos. La acumulación de radicales libres está asociada a la patogénesis de muchas enfermedades humanas. Además, los antioxidantes son sustancias capaces de retardar o prevenir la formación de radicales libres, y su uso es estudiado de forma intensiva, particularmente como tratamiento para accidentes cerebro vasculares, enfermedades neurodegenerativas, así como la prevención del cáncer y la cardiopatía isquémica (Walter y Espinoza, 2011).

Los antimicrobianos son sustancias naturales o sintéticas capaces de detener el crecimiento o directamente matar microorganismos. Una mezcla de componentes antimicrobianos está formada por la aparición de diversos

niveles de resistencias bacterianas. Esto dio lugar a una competencia entre los microorganismos, generando resistencias y seleccionándose en pro de éstas y el hombre. Por su parte, imaginando, diseñando, en la búsqueda de nuevos compuestos más eficaces y más seguros para la lucha antimicrobiana (Erracalde, 1996).

De tal forma, el árbol de *Moringa* es una buena fuente de proteínas, grasas, vitaminas, minerales, que ayudan a combatir una serie enfermedades; siendo comprobado su poco efecto de toxicidad. Por ello, la investigación científica ha demostrado que los extractos de *Moringa* ejercen un amplio espectro de actividad protectora contra microorganismos patógenos. Asimismo, ayuda a controlar los niveles de azúcar en sangre, proteger la salud ocular, reforzar el sistema cardiovascular y favorecer el bienestar de los huesos (Gowrishankar, 2010).

De manera que, la especie *M. oleífera* se utilizó como objeto de estudio para evaluar si sus extractos poseen actividad antibacteriana que luchen con bacterias grampositivas y gramnegativas, y ayuden a afrontar la inminente amenaza que representa la resistencia bacteriana. Una vez descrita la situación actual del problema; el autor de la investigación formula el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación que existe entre la composición química de los extractos en tallos y hojas de la especie *M. oleífera* y la actividad antibacteriana frente a cepas de referencia internacional?

Justificación de la Investigación

En los últimos años se ha impulsado el interés en terapias alternativas y el uso terapéutico de productos naturales, los cuales requieren de estudios para comprobar su efectividad y establecer su toxicidad, dando de base científica el uso terapéutico de las plantas medicinales; ya que los antibióticos tradicionales se están volviendo ineficaces, ya sea por; la existencia de cepas multirresistentes, el abuso y uso incorrecto de fármacos sintéticos, y la aparición de nuevas enfermedades. En conjunto, esto lleva a la necesidad de aumentar el conocimiento de los productos naturales, a fin de conocer las propiedades de cada planta medicinal ampliando su uso y logrando un mejor aprovechamiento de estos recursos naturales. (Flores, 2014).

Sin embargo, se estima que globalmente, la mitad de los medicamentos se prescriben, se dispensan y se consumen de forma inadecuada. Por lo que su uso tiene importantes consecuencias adversas tanto para la salud de los individuos como para la economía de sus familiares y los servicios de salud. En tal sentido, otro factor que impulsa el desarrollo de investigaciones se encuentra el hecho de que un gran porcentaje de la población mundial no tiene acceso a tratamientos farmacológicos. (Flores, 2014).

Por lo tanto, la evaluación de la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos de *M. oleífera* generaron una respuesta a dicha resistencia bacteria, ofreciendo así un método alternativo.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana y ensayo fitoquímico de los extractos obtenidos en tallos y hojas de *Moringa oleífera* en cepas de referencia internacional.

Objetivos Específicos

- Obtener los diferentes extractos de los tallos y hojas de la especie *M. oleífera*, mediante el método de maceración utilizando disolventes en orden de polaridad creciente.
- Determinar la composición química de los diferentes extractos en tallos y hojas de la especie *M. oleífera* mediante pruebas cualitativas del ensayo fitoquímico.
- Comprobar la actividad antibacteriana de los extractos en tallos y hojas de la especie *M. oleífera* mediante el método de difusión en agar con discos (Kirby-Bauer) en cepas de referencia internacional.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

Se encuentra relacionado con la profundidad que se adquirirá sobre la problemática de estudio, durante el proceso de investigación. Además, es un evento de estudio que se puede investigar desde varios grados de elaboración, tales como; exploratorio, descriptivo, analítico, comparativo, explicativo, predictivo, proyectivo, interactivo, confirmatorio y evaluativo (Hurtado, 2010). En este sentido, la investigación tiene como alcance evaluar la acción antibacteriana de los diferentes extractos obtenidos de tallos y hojas de la especie *M. oleífera* frente a cepas de referencia internacional para promover estrategias terapéuticas de origen vegetal como alternativa al creciente problema de resistencia bacteriana.

www.bdigital.ula.ve

Limitaciones de la Investigación

Para desarrollar este proyecto de investigación se presentaron como limitante la evaluación sistemática relacionadas con aspectos teóricos, técnicos y económicos. Por esta razón, una de las limitaciones que se presentaron fue la dificultad de acceder a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis; consecuencia a la pandemia del Covid-19, además, la carencia de algunos servicios básicos como el servicio eléctrico, el agua, el gas, e internet; que impidió la continuidad aplicada al desarrollo del estudio. Sin dejar atrás las limitaciones económicas donde hubo déficit para la obtención de materiales de laboratorio, papelería, y algunos reactivos necesarios para la realización de la parte experimental y presentación del trabajo

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

La Rosa y Zarate (2021), en su trabajo de investigación: Elaboración de un jarabe del extracto hidroalcohólico de las hojas de *M. oleífera* para evaluar su actividad antibacteriana frente a cepas clínicas de *Escherichia coli*, tuvieron como objetivo principal: determinar la actividad antibacteriana del jarabe del extracto hidroalcohólico de las hojas de *M. oleífera* frente a cepas clínicas de *Escherichia coli*. El método que utilizaron fue: la preparación del extracto hidroalcohólico de las hojas de *M. oleífera*, realizaron el tamizaje fitoquímico para comprobar la presencia de metabolitos secundarios; a través de la técnica de maceración. Para el ensayo microbiológico, emplearon el método de difusión en disco, para evaluar el efecto inhibitorio mediante la medida de los halos de inhibición generada por el jarabe del extracto hidroalcohólico, donde el control positivo fue la Azitromicina. Obtuvieron como resultados; que el jarabe del extracto hidroalcohólico de las hojas de *M. oleífera* presenta efecto antibacteriano frente a las cepas de *E. coli* con aproximación cercana al control positivo del fármaco Azitromicina, sometidos a una concentración de 10.000 ppm. Asimismo, observaron la presencia de metabolitos bioactivos flavonoides, alcaloides y compuestos fenólicos quienes tienen relación con el efecto antibacteriano frente a *E. coli*. Llegaron a la conclusión; donde comprobaron que el jarabe del extracto hidroalcohólico de las hojas de *M. oleífera* tiene efecto antibacteriano frente a cepas clínicas de *E. coli*.

Con respecto a, Zamata y Milagro (2020), en su trabajo de investigación titulado: Avances en el conocimiento del efecto terapéutico de la *Moringa oleífera*, obtuvieron como objetivo principal: investigar el avance del efecto terapéutico de la planta *M. oleífera*; donde, para su desarrollo llevaron a cabo una recopilación y revisión de varias publicaciones científicas. De los estudios revisados; confirmaron, que distintas partes de la planta; hoja, semilla, flor y raíz presentaban componentes fitoquímico como flavonoides, fenoles, alcaloides, taninos, saponinas, oxalatos, proteínas y vitaminas; posibles responsables de su acción terapéutica, dependiendo además, su eficacia en los tratamientos. De esta manera, actualmente los resultados de los estudios revisados *in vitro*, demostraron que los flavonoides de las hojas de *M. oleífera* tienen efecto antiinflamatorio, hepatoprotector, antioxidante, antidiabético, neuroprotector. Por otra parte, afirman que la cantidad que se obtiene de los principios activos varían de acuerdo a los factores climáticos y métodos empleados de extracción.

En otro estudio realizado por Borjas y Sarasti (2018), titulado: Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante la extracción de la fracción activa presente en las hojas de la especie *Moringa oleífera* frente a microorganismos patógenos. En este estudio, obtuvieron extractos etanólicos por el método de Soxhlet a partir de las hojas frescas y hojas secas de la especie vegetal; con una concentración de 90,24 mg Quercetina/mL. Por otro lado, evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto total y de la fracción activa mediante el método del pozo en agar frente a microorganismos patógenos, donde obtuvieron como resultado que el extracto total y la fracción extraída, exhiben patrones de sensibilidad eficaces frente a enterobacterias (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) debido a que los halos de inhibición obtenidos son ≥ 23 mm, superando los valores de referencia, un patrón de sensibilidad aceptable para *Staphylococcus aureus* ya que los halos de inhibición obtenidos son ≥ 14 mm, por lo tanto, lograron determinar que estas cepas son sensibles a los extractos obtenidos, y una

susceptibilidad antimicrobiana intermedia frente a *Pseudomonas aeruginosa* ya que el patrón de sensibilidad es ≥ 21 mm, por lo tanto, con los halos de inhibición experimentales obtenidos pudieron deducir que esta cepa no es totalmente sensible a este tipo de extracto, ya que sus valores son menores que los de referencia.

Por otra parte, Arévalo (2017), efectuó el trabajo: Efecto antibacteriano y citotóxico de los extractos metanólicos a base de *Moringa oleífera* y *Azadirachta indica* sobre cepas de *Enterococcus faecalis*; cuyo objetivo fue: Evaluar *in vitro* el efecto antibacteriano y citotóxico de dos extractos metanólicos *Moringa oleífera* y *Azadirachta indica* sobre cepas de *Enterococcus faecalis*, el método utilizado para la preparación de los extractos metanólicos fue *in vitro* a través de la técnica de maceración; y el efecto antibacteriano de los extractos frente a cepas de *Enterococcus faecalis* fueron evaluados por medio de la técnica de difusión en agar (perforación en gel). La concentración mínima inhibitoria (CMI) la determino por el método de microdilución y la citotoxicidad usando la línea celular MDCK a bajas concentraciones de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$. De esta manera, el resultado que logro obtener fue el siguiente; el extracto metanólico que obtuvo mayor efecto antibacteriano en 24 y 48 horas frente a *Enterococcus faecalis* fue la *M. oleífera* obteniendo un halo de 35.5 ± 1.05 . En definitiva, logro demostrar que los extractos metanólicos de *Moringa oleífera* y *Azadirachta indica* tienen efecto antibacteriano contra cepas de *Enterococcus faecalis* a las 24 y 48 horas, y manifestó, que ninguno de los dos extractos resultó ser tóxico sobre líneas celulares a bajas concentraciones.

Antecedentes Históricos

El uso de los agentes antimicrobianos en la terapia de las enfermedades infecciosas, ha constituido un acontecimiento sin precedentes, porque la curación y control de las infecciones permitió modificar favorablemente el panorama de la morbilidad y mortalidad del adulto. La llamada “Edad de Oro” de los antibióticos comienza en 1941 con la producción de la Penicilina a gran escala y su utilización con buenos resultados en ensayos clínicos. Sin embargo, se calcula que la mayoría de los pacientes hospitalizados reciben tratamiento antimicrobiano, por lo que en las últimas décadas se han obtenido numerosos compuestos de esta índole. Por esta razón, su amplio uso fomenta el aumento de la resistencia de las bacterias, lo que crea una gran necesidad para la elaboración de nuevos tratamientos (Sande, 1982).

En tal sentido, fue a mediados del siglo XX que los extractos se volvieron populares como método para mejorar la salud. Este movimiento tomó mucha fuerza por dos razones principales: la popularidad de los tratamientos naturales provenientes de la medicina alternativa y por las nuevas tecnologías: la refrigeración y el desarrollo de los extractores. El hombre, ha usado los productos naturales desde tiempos inmemorables, no solo para satisfacer su hambre, sino con el fin de sanar sus enfermedades y cicatrizar sus heridas. Por tal motivo, Hipócrates considerado el padre de la medicina, otorga extrema importancia a la medicina preventiva. Durante la edad media, el estudio de las plantas medicinales estaba en manos de los monjes; quienes experimentaban sus conocimientos para emplear tratamientos contra una serie de enfermedades (Batei, 2007).

Posteriormente, desde su origen, el hombre ha mantenido una estrecha relación con los recursos naturales; de éstos, las plantas han sido para el ser humano una de las más importantes y utilizadas principalmente por su disponibilidad. A la fecha, se han reportado alrededor de 50.000 especies de plantas con algún uso medicinal. Aunque su uso nunca ha dejado de ser

vigente, el avance de la ciencia y la tecnología ayudo a que los principios activos contenidos en estas plantas sean sintetizados químicamente, haciéndolos disponibles en dosis adecuadas para cada tratamiento (Muñoz, 2000).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud, en el año 1979; una planta medicinal fue definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos. Por ello, estas plantas también tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna. Entre otras, son fuente directa de agentes terapéuticos, ya que se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos pueden servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Oliveira y Velázquez, 2005).

www.bdigital.ula.ve

Bases Teóricas

Familia Moringaceae

Las Moringaceae son una familia de árboles de hojas caediza y corteza gomosa, hojas compuestas alternas, doble o triplemente pinnadas; con foliolos opuestos y sin estípulas. Este tipo de familia, es un pequeño grupo dentro del orden de las *Brassicales*, donde se encuentran especies como el rábano y las alcaparras. La *Moringa* es el único género dentro de Moringaceae. Este género comprende 13 especies, todas las cuales son arboles de climas tropicales y subtropicales. (Berendsonhn y Monterrosa, 2012).

El área de distribución geográfica, corresponde al continente Africano y parte de Asia, incluyendo la Península de Arábica y la India. Diferentes

estudios han demostrado la presencia de compuestos químicos tales como; glucosinolatos, isotiocianatos, flavonoides, y antocianinas. (Berendsonhn y Monterrosa, 2012).

Tabla 1. Descripción taxonómica de la familia Moringaceae

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Brassicales
Familia	Moringaceae
Género	<i>Moringa</i>
Especie	<i>Moringa oleífera</i>

Tomado y modificado de Berendsonhn y Monterrosa, 2012.

www.bdigital.ula.ve

Género *Moringa*

El género *Moringa*, se valora principalmente por ser rico en proteínas, minerales, beta-caroteno, tiamina, riboflavina, y otras vitaminas. Es un género de arbustos y árboles con múltiples usos: sus hojas, raíces y vainas no maduras se consumen como hortaliza. Este árbol caducifolio suele medir entre 5 y 10 metros de altura, con una copa por lo general en forma de cono y unas flores de color blanco y pétalos alargados. Además, de ser rico en proteínas, vitaminas y minerales; sus semillas han permitido la purificación del agua, actuando como elementos bioabsorbentes y con capacidad antimicrobiana, así como coagulante en la potabilización de aguas crudas (Castillero, 2019). Entre las especies más reconocidas a nivel industrial y de uso tradicional que conforman el género *Moringa* se encuentran las siguientes (Colmeiro, 1995):

- *Moringa oleífera*
- *Moringa ovalifolia*
- *Moringa peregrina*
- *Moringa arbórea*
- *Moringa borziana*
- *Moringa concanensis*
- *Moringa drouhardii*
- *Moringa longituba*
- *Moringa pygmaea*
- *Moringa rivae*
- *Moringa ruspoliana*
- *Moringa stenopelata*
- *Moringa hildebrandtii*

www.bdigital.ula.ve *Moringa oleífera*

La *Moringa* es un árbol que proviene del sur de Himalaya, que se ha extendido a otras partes de India, Bangladesh, Afganistán, Pakistán, Sudeste Asiático, El Caribe, Centroamérica y gran parte de Suramérica. Se cree que fue trasladada de la India a África por los ingleses para luego ser introducida al Caribe por los franceses y de allí fue llevada a Centroamérica. Prospera preferiblemente en zonas tropicales con temperaturas por encima de 15 °C, con una precipitación menor a los 1000 mm. Detallando un poco más las condiciones agronómicas se conoce que la *M. oleífera* se ha extendido desde su zona natural, un estado silvestre, como una planta cultivada a lo largo de la franja tropical, tanto hacia el pacífico como hacia África y América (Agudelo y Álvarez, 2020).

Evidentemente, crece hasta 12 metros de altura y sus especies se caracterizan por tener hojas pinnadas grandes, y cada hoja dividida en

muchos folíolos, que se disponen sobre un armazón al cual llaman raquis. Los frutos forman una capsula larga y leñosa que al alcanzar la madurez se abre en 3 valvas que son separadas la una de la otra por su longitud, quedando unidas solo en la base. En la mayoría de las especies, las semillas tienen 3 alas longitudinales. En la Figura 1, se especifican las partes de la planta y la forma de sus frutos y semillas (Agudelo y Álvarez, 2020).

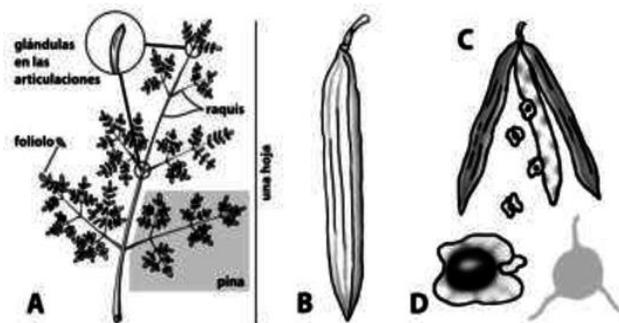


Figura 1. Partes de la moringa

- A. Corresponde a toda la planta B. Fruto cerrado C. Fruto abierto
D. Semilla. Tomado y modificado de Olso y Fahey, 2011.

Por una parte, la *Moringa* es un árbol de alta plasticidad biológica y su área de cultivo puede extenderse fuera de sus límites naturales, tolerando casi todo tipo de suelos. Además, su pH varía entre 4.5 y 8, se puede plantar en zonas marginales y puede llegar a crecer en suelos ligeramente salinos, sueltos, arenosos y cerca de cauces de agua. Sin embargo, no resiste a los suelos arcillosos. Dentro de las condiciones de temperatura se adapta al calor del trópico, húmedo y seco. Por esta razón, su temperatura óptima es de 25 a 35 °C. En temperaturas menores a 14 °C no florece y no resiste a temperaturas por debajo de 8 °C durante varios días consecutivos. Su crecimiento es rápido, y las podas se hacen necesarias para aumentar el número de ramas y hojas, la moringa, en condiciones óptimas fructifica dos

veces al año y en cuanto a su longevidad vive durante 20 años como tiempo máximo (Agudelo y Álvarez, 2020).

Se conoce por diferentes nombres vernáculos, tales como: Acacia, Árbol de las Perlas, Arango, Caragua, Flor de Jacinto, Palo Jeringa, Paraíso Blanco, Perla de la India, Murunga, Murinna, Moringo, Árbol de la Vida. Este último nombre es una medida de la importancia de esta planta para solucionar problemas de salud que, de otra manera, podrían considerarse incurables. Desde hace milenios, prácticamente todas las partes de *M. oleífera* han sido utilizadas por el hombre. Las hojas, las flores, los frutos y las raíces son apreciados por su valor nutritivo y pueden ser usados tanto en la alimentación humana como en la animal (González, 2013).

Moringa oleífera es rica en sacarosa (Figura 2), ramnosa (Figura 3), glucosinolatos (Figura 4), β -sitosterol (Figura 5), bencil isotiocianato (Figura 6). A continuación se detalla la composición química presente en las diferentes partes de la especie (Tabla 2) (Pérez, Jaramillo y Márquez, 2013).

www.bdigital.ula.ve

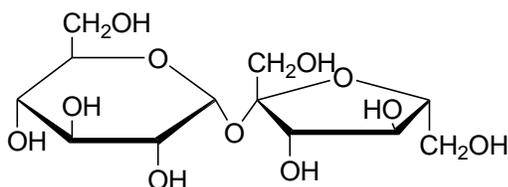


Figura 2. Estructura química de la sacarosa

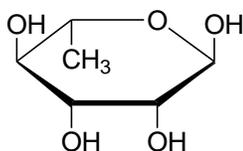


Figura 3. Estructura química de la Ramnosa

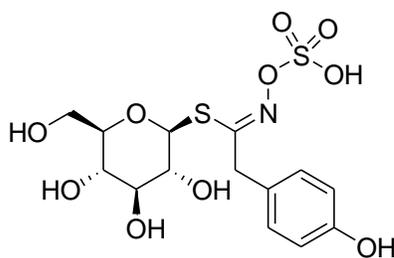


Figura 4. Estructura química de los Glucosinolatos

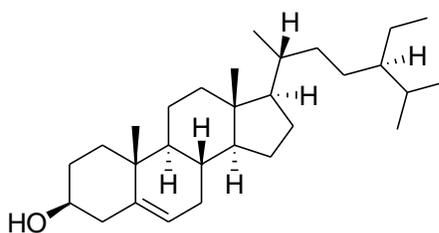


Figura 5. Estructura química del β -sitosterol

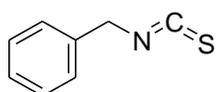


Figura 6. Estructura química del Bencil isotiocianato

Tabla 2. Composición química de la *Moringa*

Órgano Empleado	Composición química
Raíces	Contienen alcaloides, triterpenos y esteroides, azúcares reductores, mucilagos y compuestos fenólicos
Tallo	Se han encontrado dos alcaloides: moringina y moringinina. Por otro lado, se han aislado β -sitosterol y β -sitostenona
Hojas	Contienen flavonoides, compuestos fenólicos y carotenoides
Flores	Sacarosa, D-glucosa, trazas de alcaloides, cera, quercetina, y flavonoides.
Semillas	Bencilcarbamato, bencil isotiocianato, niazimicina, β -sitosterol.

Nota: tomado y modificado de Pérez, Jaramillo, y Márquez, (2017).

Entre los usos más frecuentes de la *Moringa* se puede mencionar:

- Alimentación humana y animal, obteniendo buenos resultados en la producción avícola, porcina, ovina, y caprina.
- Se emplea para la purificación del agua al reducir su turbidez y la contaminación por bacterias.
- Como fertilizante, agente de limpieza, pesticida, la pulpa se utiliza para hacer papel de prensa y papel celofán.
- La flor es una importante fuente de polen y néctar para las abejas.
- De la corteza se obtienen fibras con las que se elaboran cuerdas y sogas.
- Extracción de taninos aptos para el curtido de pieles.
- La *Moringa* evita la erosión del suelo por lo que se recomienda para zonas áridas y semiáridas.
- Es una planta con gran cantidad de propiedades nutritivas y terapéuticas.

- Se puede considerar como uno de los alimentos que contribuyen a lograr bienestar y prevenir enfermedades debido a sus efectos antioxidantes (Bonaf, Rivera y Bolívar, 2012).

La *M. oleífera* ha formado parte de la alimentación y medicina tradicional por miles de años, pero su auge reciente en el mundo se debe a dos descubrimientos; uno de ellos fue, la administración de polvo de hoja seca de *Moringa* a madres en lactancia en situación de inanición extrema, aumentando la producción de leche. El segundo descubrimiento se realizó en laboratorio confirmando sus propiedades anticancerígenas en animales (Olso y Cárdenas, 2016). En la tabla 3, se puede reflejar una recopilación de los usos medicinales que están asociados a la *Moringa*.

Tabla 3. Usos medicinales de la *Moringa*

Órgano Empleado	Uso Medicinal
Raíces	Abortivo, analgésico, antiinflamatorio, antituberculosa, asma, fertilidad, laxante, lumbalgia, odontalgias, picadura de serpiente
Tallo	Antipirético, abortivo, antihelmíntico, antifúngico, antipalúdico, antituberculoso, antitumoral, confusión mental, enfermedades oculares, hepatitis.
Hojas	Antigripal, antidiabético, antihipertensivo, ansiolítico, bronquitis, cataratas, conjuntivitis, disfunción sexual, diurético, faringitis, hemorroides, hinchazones glandulares, VIH.
Flores	Abortivo, afrodisiaco, antiinflamatorio, antipsicótico, antitumoral, esplenomegalias, mialgias.
Semillas	Antipirético, antituberculoso, antitumoral, enfermedades venéreas, histeria, hepatoprotector, purgante.

Nota: Tomado y modificado de López, (2016).

Metabolismo secundario de las Plantas

El metabolismo es el conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples. Las plantas, organismos autótrofos, 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. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario, se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. Además, reciben también la denominación de productos naturales (Bruneton, 2001).

Estos productos naturales pueden clasificarse de distintas maneras:

1. Según su biosíntesis: la mayoría de ellos provienen de reacciones enzimáticas, utilizando la glucosa como fuente de carbono; la cual es fotosintetizada en las plantas verdes y obtenidas a partir del entorno en los organismos heterótrofos. Hoy día, existen tres rutas principales para la formación de metabolitos secundarios:
 - Ruta del ácido mevalónico: a partir de él se forman enlaces de prenilo que tras uniones sucesivas conducen a isoprenoides (terpenoides, carotenoides, esteroides).
 - Ruta del acetato-malonato: a partir del malonato y acetato se forman los policétidos y ácidos grasos
 - Ruta del ácido shikímico: a partir de él se forman los aminoácidos y desde ellos los otros compuestos aromáticos más complejos (flavonoides y alcaloides).

2. Según su actividad fisiológica: esta clasificación es independiente de su estructura y biosíntesis ocasionalmente se encuentra correlacionados entre su aspecto y actividad.
3. Según su estructura química: se trata de una clasificación formal basada en el tipo de esqueleto molecular:
 - Compuestos grasos o alifáticos de cadenas abiertas como los ácidos grasos, azúcares y gran cantidad de aminoácidos.
 - Compuestos ciclo alifáticos como terpenoides, esteroides y algunos alcaloides.
 - Compuestos aromáticos o benzoicos como fenoles, quinonas.
 - Compuestos heterocíclicos como alcaloides, flavonoides, bases de ácidos nucleídos (Carey, 2003).

Alcaloides: son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos). Los alcaloides se pueden dividir en los siguientes grupos: alcaloides isoquinoléicos, alcaloides quinolizidínicos, alcaloides pirrolizidínicos, alcaloides tropánicos y alcaloides indólicos (Figura 7). En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante y analgésico. Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina (Ávalos y Pérez, 2009).

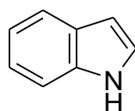


Figura 7. Estructura química del indol

Saponinas: se encuentra como glucósidos esteroideos, o bien glucósidos triterpenos. Son por tanto triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. Se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar (el terpeno sin el azúcar), en cuyo caso se denomina sapogenina. Las saponinas (Figura 8) ofrecen una alta actividad superficial debido a la combinación estructurada de un grupo polar (azúcar) y uno no polar (esteroide o triterpeno), propiedad que permite su uso como un detergente natural, agente estabilizante, emulsificador en productos de limpieza y cosméticos (Ávalos y Pérez, 2009).

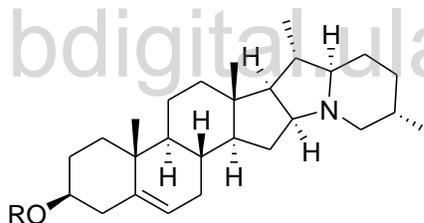


Figura 8. Estructura química de la Saponina

Terpenos: constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios. La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Suelen ser insolubles en agua y derivan de la unión de unidades de isoprenos; (5 átomos de Carbono) (Figura 9). En las plantas, los isoprenos básicos para la síntesis de los terpenos son el isopentenil pirofosfato (IPP) o su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Los sesquiterpenos, triterpenos y politerpenos se producen en el citosol y en el retículo endoplásmico; mientras que los monoterpenos, diterpenos,

tetraterpenos y algunas quinonas preniladas se originan en los plásmidos. Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso, como aromas y fragancias, en alimentación y cosmética o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Además, tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas (Ávalos y Pérez, 2009).

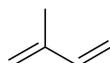


Figura 9. Estructura química del Isopreno

Flavonoides: su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos (Figura 10). Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo las principales antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles, e isoflavonas. En las plantas, algunos flavonoides confieren resistencia contra la fotooxidación de la luz ultravioleta del sol. Asimismo, la resistencia a las infecciones fúngicas y virales (Ávalos y Pérez, 2009).

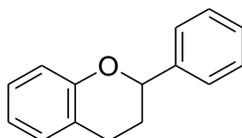


Figura 10. Estructura química de Flavonoides

Fenoles: las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles, o fenilpropanoides y todas ellas derivan del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Figura 11). Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta

polímeros complejos como los taninos y la lignina. Poseen características asépticas y citotóxicas; ya que aquellos que son clorados pueden atravesar la membrana celular (Ávalos y Pérez, 2009).

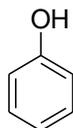


Figura 11. Estructura química del Fenol

Taninos: son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturizándolas. El nombre de tanino procede de la antigua práctica de utilizar extractos vegetales para convertir la piel animal en cuero. Comprende dos clasificaciones estructurales: taninos condensados (Figura 12); los cuales son polímeros de unidades de flavonoides unidas por enlaces C-C, no pueden ser hidrolizados pero si oxidados por un ácido fuerte, y los taninos hidrolizables; los cuales son polímeros heterogéneos que contienen ácidos fenólicos, sobre todo ácido gálico y azúcares simples; son más pequeños que los condensados y se hidrolizan más fácilmente (Ávalos y Pérez, 2009).

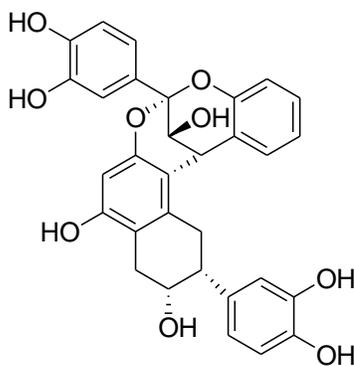


Figura 12. Estructura química de los taninos condensados

Triterpenos: entre los triterpenos se encuentran los esteroides derivados del escualeno, una molécula de cadena lineal de 30 carbonos de la que derivan todos los triterpenos cíclicos. Los esteroides que contienen un grupo alcohol, el cual es el caso de casi todos los esteroides vegetales, se denominan esteroides. Los más abundantes en las plantas son el estigmasterol (Figura 13) y el sitosterol. De esta manera, los esteroides poseen propiedades terapéuticas como: antivirales, analgésicos, anticonceptivos y antiinflamatorios. Además, poseen importancia farmacológica ya que comprenden sustancias como: hormonas sexuales, vitamina D, y antibióticos (Ávalos y Pérez, 2009).

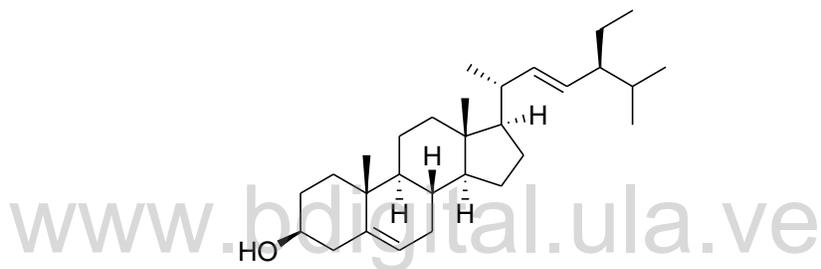


Figura 13. Estructura química del Estigmasterol

Extractos

Un extracto de plantas, son preparados a base del resultado de la maceración de la planta escogida junto a un disolvente. Pueden presentarse como extractos líquidos: obtenidos sin la eliminación del solvente o eliminándolo de forma parcial y extractos secos: obtenidos con la eliminación del solvente. Es una solución alcohólica que extrae las propiedades de las plantas; y se realiza para obtener un concentrado de principios activos (Jawetz, 2012).

Métodos de Extracción

La extracción puede realizarse a partir de plantas frescas, secas, semi-secas o fermentadas; consiste en separar las sustancias obteniendo dos componentes: el extracto en sí y el residuo (llamado bagazo).

- **Maceración:** es un proceso de extracción sólido-líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretende extraer. El proceso de maceración genera dos productos que puede ser empleados dependiendo de las necesidades de uso, el sólido ausente de esencias o el propio extracto. Es el procedimiento de extracción más simple, al conjunto de droga más solvente se le protege de la luz, para evitar posibles reacciones y debe agitarse continuamente; el tiempo de maceración es diverso, las distintas Farmacopeas prescriben tiempos que oscilan entre cuatro y diez días (Carrión y García, 2010).
- **Lixiviación:** el material vegetal pulverizado se coloca en un percolador, haciendo pasar continuamente el solvente. 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 (Carrión y García, 2010).
- **Digestión:** consiste en el aumento progresivo de la temperatura consiguiendo un mayor rendimiento de la extracción, disminuyendo la viscosidad del solvente lo que hace éste pueda ingresar más rápidamente al interior de las células y así extraer los principios activos (Carrión y García, 2010).
- **Infusión:** proceso mediante el cual se somete a la droga previamente humedecida al contacto con el solvente a una temperatura igual a la de ebullición del agua por cinco minutos, se deja enfriar a temperatura ambiente y se prepara al 5 % (Carrión y García, 2010).

- **Decocción:** consiste en llevar a la mezcla de droga más disolvente a la temperatura de ebullición del agua, manteniendo esta temperatura durante un periodo de tiempo que oscila entre 15 a 20 minutos (Carrión y García, 2010).

Ensayo Fitoquímico

El ensayo fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El estudio fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados, tales como: agua, acetona, alcohol, cloroformo, hexano y éter. Otro solvente, el diclorometano, se usa específicamente para la extracción de terpenoides. Posterior a la extracción, se llevan a cabo reacciones de coloración y precipitación. Permitiendo una evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo (Palacios, 2008).

De esta manera, los resultados del estudio fitoquímico constituyen únicamente una orientación la cual deberá ser interpretada en conjunto con los resultados del screening farmacológico. Así cuando una planta revela acción sobre el sistema nervioso central durante el tamizaje farmacológico y presencia de alcaloides en el screening fitoquímico, es bastante probable que la acción farmacológica se deba a la fracción alcaloidal. Por otro lado, el hecho de evidenciarse acción antiinflamatoria en el tamizaje farmacológico y la presencia de flavonoides en el ensayo fitoquímico, puede dar lugar a procesos de aislamiento y sometiendo a pruebas más específicas de estos compuestos (Palacios, 2008). Entre las distintas pruebas químicas de identificación tenemos:

1. Determinación de Alcaloides; mediante la prueba de Wagner; Mayer y Dragendorff; se fundamenta en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal de combinarse con el yodo y metales pesados formando precipitados (Domínguez, 1979).
2. Determinación de Saponinas; mediante la prueba de Altura de la Espuma; se basa en la presencia de un núcleo esteroidal o triterpénico; esta característica les confiere un carácter anfótero que les permite actuar como tensoactivos (Carvajal, Hata, Sierra y Rueda, 2009).
3. Determinación de Flavonoides; mediante la prueba de Shinoda; se fundamenta en la reacción del magnesio con el HCL conc, y el hidrogeno generado produce la reducción del ion flavilio al color rojo escarlata (Domínguez, 1979).
4. Determinación de Fenoles; mediante la prueba de Tricloruro Férrico; esta respuesta se debe al ataque producido por el ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro, provocando una precipitación (Domínguez, 1979).
5. Determinación de Triterpenos; mediante la prueba de Lieberman-Burchard, la presencia de color es debido al grupo hidroxilo (-OH) del colesterol lo que genera un aumento en la conjugación de la instauración del anillo, fusión adyacente (Domínguez, 1979).
6. Determinación de Taninos: mediante la prueba de la gelatina al 1 %, son polifenoles que tienen la propiedad de unirse a las proteínas y precipitarlas; la presencia de taninos se observa mediante un precipitado blanco (Carvajal, Hata, Sierra y Rueda, 2009).
7. Determinación de Quinonas: mediante la prueba de H_2SO_4 ; las quinonas son dicetonas insaturadas, que por reducción se convierten en polifenoles los que fácilmente las regenera por oxidación. Esta

reacción da como resultado una coloración de amarilla a roja (Domínguez, 1979).

8. Determinación de Cumarinas: mediante la prueba de NH_4OH (Hidróxido de amonio concentrado), se basa en la apertura y solubilización en medio básico, se caracteriza por su intensa absorción en la región ultravioleta del espectro, las cuales al ser examinadas a la luz ultravioleta presentan una coloración en presencia de amoniaco (Domínguez, 1979).

Generalidades de las Bacterias

Las bacterias son organismos procariotas unicelulares, se reproducen por fisión binaria siendo la mayoría de ellas de vida libre, y se encuentran en casi todas las partes de la Tierra. Son vitales para los ecosistemas del planeta. Algunas especies pueden vivir en condiciones realmente extremas de temperatura y presión. Por ello, el cuerpo humano está lleno de bacterias, de hecho se estima que contiene más bacterias que células humanas. La mayoría de estas que se encuentran en el organismo no producen ningún daño, al contrario, algunas son beneficiosas. No obstante, una cantidad relativamente pequeña de especies son las que causan enfermedades (Pírez y Mota, 2006).

Como característica principal, las procariotas no poseen compartimientos intracelulares delimitados por membranas, por lo que carecen de membrana nuclear. Además, es importante destacar que su ADN es circular y cerrado, posee una pared celular compuesta por peptidoglicano, así como, la presencia de fimbrias; logrando tener flagelos para impulsar la célula bacteriana. Por esta razón, la clasificación más sencilla de las bacterias se deben a las características de su pared celular, sus propiedades genotípicas y fenotípicas (Pírez y Mota, 2006). De esta manera, se dividen en:

Distinción macroscópica

Se realiza en función de las características de crecimiento en distintos medios de cultivo selectivos con diferentes nutrientes. Por esta razón, mediante el uso de los medios de cultivo adecuados se puede determinar también la capacidad de resistir frente a determinados antibióticos, de fermentar azúcares específicos, de lisar los eritrocitos o de hidrolizar los lípidos. Las bacterias crecen en colonias, y pueden ser definidas por la suma de sus características, como su olor, color, tamaño y forma (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

Distinción microscópica

Este aspecto incluye el tamaño, la forma y la configuración de las bacterias (cocos, bacilos, curvos, espirales), y la capacidad de captar el colorante Gram (grampositivos o gramnegativos) es el modo más frecuente de distinguir las bacterias (Murray y cols., 2009).

Tinción de Gram

Es una prueba rápida, potente y sencilla que permite reunir las bacterias en dos grandes grupos principales; de esta manera, permite establecer un diagnóstico inicial y así, iniciar un tratamiento adecuado, basándose en las diferencias que presentan las bacterias. Estas bacterias son fijadas con calor, o se dejan secar sobre el portaobjeto, se tiñen con violeta cristal, que es un colorante que se precipita con yodo, luego se elimina el exceso de colorante, después se lava portaobjeto con un decolorante cuya base es la acetona y en seguida, se lava con agua. Más adelante, se añade un contraste, la safranina, para teñir las células decoloradas; cabe destacar, que todo el proceso se realiza en menos de 10 minutos (Murray y cols., 2009).

De este modo, las bacterias grampositivas se tiñen de color morado porque el colorante queda atrapado en una gruesa capa de peptidoglicano en forma de malla entrelazada, que rodea a la célula. Mientras las bacterias gramnegativas tienen una capa de peptidoglicano más delgada, que no retiene el violeta cristal, ocasionando que las células se tiñan con la safranina y se observen de color rojo o fucsia (Murray y cols., 2009).

Bacterias Grampositivas

La pared celular bacteriana de las grampositivas, es más gruesa y de estructura más sencilla, que de las gramnegativas, están constituidas por un 60 % aproximadamente de peptidoglicano y un porcentaje relativamente bajo de ácidos teicoico y teicuronicos (Figura 14) (Barrios, 1996).

Bacterias Gramnegativas

Estructuralmente son más complejas que las grampositivas. Se encuentran formadas por una capa fina de peptidoglicano por un espacio periplasmico o zona intermedia, la membrana externa se basa en una doble capa de fosfolípidos y lipopolisacáridos. Además, poseen paredes celulares más complejas, desde el punto de vista estructural, la pared celular contiene dos capas situadas en el exterior de la membrana citoplasmática y por fuera de esta membrana se encuentra una delgada capa de peptidoglicano que representa tan solo un 5 % al 10 % del peso de la pared celular (Figura 14) (Barrios, 1996).

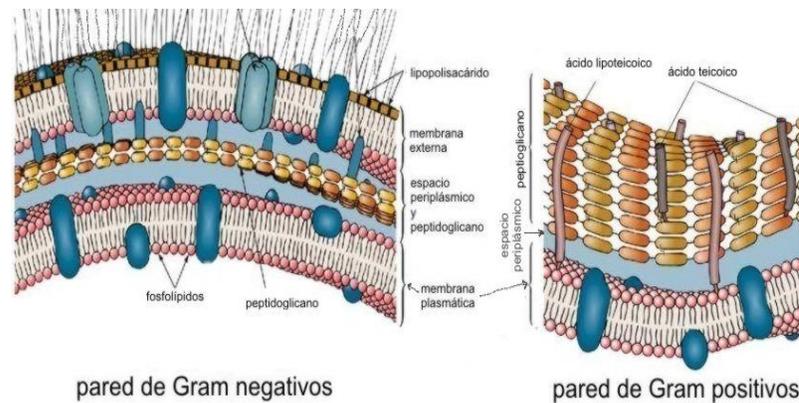


Figura 14. Pared celular de las bacterias grampositivas y gramnegativas. Tomado y modificado de Sánchez, 2006.

Microorganismos patógenos

Staphylococcus aureus: es un microorganismo que se encuentra en la piel y fosas nasales de las personas sanas. Sin embargo, causa gran variedad de infecciones, desde pequeñas en la piel, como ampollas, forúnculos, vejigas y abscesos cutáneos; hasta enfermedades como neumonía, meningitis, endocarditis, síndrome del shock tóxico y sepsis. Es un coco inmóvil, de 0,8 a 1 micrómetro de diámetro, que se divide en tres planos para formar racimos de uvas, respondiendo positivamente a la tinción de Gram, es un aerobio y anaerobio facultativo por lo que puede crecer tanto en una atmosfera con o sin oxígeno, no presenta movilidad ni forma capsula. Por ello, es capaz de crecer hasta en un 10 % de sal común y logrando así un crecimiento en el agua del mar (Morcillon, 2005).

Enterococcus faecalis: es un tipo de bacteria anaerobia conocido como cocos, que puede ocurrir singularmente, en parejas o en pequeñas cadenas. Es grampositiva en su estructura bioquímica, el *E. faecalis* ha ganado notoriedad por ser una de las principales causas de infecciones nosocomiales (infecciones adquiridas en el hospital), que se caracterizan por

fiebre y confusión. No obstante, los tipos más comunes son las infecciones del tracto urinario, que pueden estar acompañadas de síntomas; como dolor y sangrado al orinar (Ryan, 2004).

Klebsiella pneumoniae: es un microorganismo bacteriano responsable de causar neumonía, sepsis e infección del tracto urinario. Este microorganismo vive en el tracto respiratorio superior y gastrointestinal de los individuos sanos. Son bacterias gramnegativas, la asimilación y fermentación de la lactosa se puede observar en el agar MacConkey donde las colonias son de color rosado y en el medio Kligler (Garity, 2004).

Escherichia coli: es el microorganismo procarionta más estudiado por el ser humano. Se trata de una enterobacteria que se encuentra generalmente en los intestinos animales y por ende en las aguas negras, pero se le puede encontrar en diversos ambientes, dado que es un organismo cosmopolita. Esta y otras bacterias son necesarias para el funcionamiento correcto del proceso digestivo, además de producir las vitaminas B y K. Es un bacilo que reacciona negativamente a la tinción del Gram, es anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forman esporas y es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa (Rivas y Callejo, 1999).

Pseudomonas aeruginosa: es una bacteria flagelada con forma de bastoncillo, gramnegativas que produce pigmentos fluorescentes de colores que pueden variar desde el rojo hasta el negro. Es un microorganismo muy extendido y puede encontrarse en el agua, la tierra, animales y plantas. En cambio, en los seres humanos suele encontrarse en las zonas más húmedas del cuerpo, como son las axilas, los oídos y la zona alrededor del ano. De esta manera, las infecciones por *P. aeruginosa* son graves, especialmente en pacientes con enfermedades de base, larga estancia hospitalaria y uso previo de antibióticos (Murray, 2006).

Antibióticos

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferentes comportamientos farmacocinética y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo. El objetivo de la antibioticoterapia es controlar y disminuir el número de microorganismos viables, de modo que el sistema inmunológico sea capaz de eliminar la totalidad de los mismos. Los mecanismos por el cual un antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento o destruir una célula bacteriana, se divide en (Taroco, Seija y Vignoli, 2008):

- **Inhibición de la síntesis de la pared celular:** inhibiendo la síntesis del peptidoglicano, los β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos, y monobactámicos) actúan a nivel de las PBP, los glucopéptidos interfieren en la síntesis del peptidoglicano, y la bacitracina que actúa en la síntesis y transporte de los precursores del peptidoglicano (Taroco y cols., 2008).
- **Inhibición de la síntesis de proteínas:** la estructura de las bacterias está conformada por diversas proteínas, que al no sintetizarse su estructura se debilita ocasionando muerte de la bacteria, este proceso es llevado a cabo por un gran grupo de antibióticos; los aminoglucósidos, tetraciclinas, cloranfenicoles, macrólidos, clindamicina, oxazolidinonas y streptograminas (Taroco y cols., 2008).
- **Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos:** las rifamicinas actúan a nivel de las ARN polimerasas y las quinolonas a nivel de las ADN topoisomerasa (Taroco y cols., 2008).
- **Inhibición de la membrana externa:** polimixinas, como la colistina alteran la permeabilidad de la membrana, produciendo la pérdida de

componentes esenciales y por lo tanto la muerte de la bacteria (Taroco y cols., 2008).

Actividad Antibacteriana

La actividad antibacteriana se define por la capacidad que poseen los antibióticos de inhibir el crecimiento de determinadas bacterias en un medio de cultivo frente a un antibiótico específico, caracterizados por la sensibilidad o resistencia ante los mismos (Betés, Durán, Mestres y Nogués, 2008).

Por esta razón, existen distintas pruebas de sensibilidad las cuales son sumamente importantes, ya que se pueden obtener distintos beneficios, como establecer una terapia alternativa para combatir las bacterias, y estas deben provenir de pacientes aislados o de cepas de la American Type Culture Collection (ATCC) (Castillo, García y Sánchez, 2016). Los métodos más utilizados para evaluar la sensibilidad antibacteriana son los siguientes:

- ***Método de difusión en agar por disco (Kirby-Bauer):*** es un método cualitativo, caracterizado por su fácil estandarización, indicado para microorganismos no exigentes de rápido crecimiento. Se basa en la inhibición del crecimiento de la bacteria alrededor de un disco cargado con un antimicrobiano que difunde en un medio sólido. Esta técnica consiste en la siembra de la bacteria en una superficie de placa con un medio de cultivo, sobre el que se deposita unos discos de papel cargados con una cantidad de antibiótico, que se difunde instantáneamente a través del agar, formándose un gradiente de concentración del mismo, alrededor del disco. Posteriormente se lleva a incubar a 37 °C durante 18 horas (Prats, 2012).
- ***Método modificado de pozos de agar:*** 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 mm de diámetro y

en cada uno de ellos se deposita de 10 a 25 μL de los extractos a evaluar, estándares (control positivo y control 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 (Ríos, Recio y Villar, 1988).

El antibiograma está indicado en las siguientes situaciones:

- Aislamiento de una bacteria patógena sin predecir su sensibilidad
- En estudios epidemiológicos, aunque no se hallan descrito mecanismos de resistencia para dicho organismo
- Cuando al conocer la sensibilidad del microorganismo a drogas altamente efectivas, el paciente no pueda recibir dicha medicación (hipersensibilidad frente a algunos antibióticos como la penicilina)
- En el estudio de nuevos antibióticos (Taroco y cols, 2008).

www.bdigital.ula.ve

Definición Operacional de Términos

- **Taxonomía:** se trata de la ciencia de la clasificación que se aplica en la biología para la ordenación sistemática y jerarquizada de los grupos de animales y vegetales (Rodríguez, 2011).
- **Caducifolio:** se refiere a los árboles y arbustos cuyas hojas se desprenden durante la época del año más crítica (Treviño, 2007).
- **Resistencia bacteriana:** la resistencia bacteriana a los antibióticos es un aspecto particular de su evolución natural, seleccionada bajo la presión de los productos antibacterianos, tanto si se trata de antibióticos como de antisépticos o desinfectantes. Este fenómeno mundial incluye todos los gérmenes patógenos para el ser humano y las diversas clases de antibióticos (Oromí, 2000).
- **Espectro de acción:** es el espectro de cada sustancia antimicrobiana típicamente activa frente a los microorganismos. Los espectros se superponen, pero en general son característicos para cada clase amplia de antimicrobianos (Ryan y Ray, 2010).
- **Sustancias de amplio espectro:** inhiben un amplio rango de bacterias tanto grampositivas como gramnegativas (Ryan y Ray, 2010).
- **Sustancia de reducido espectro:** son conocidas porque tienen actividad antibacteriana contra un grupo selecto y reducido de bacterias (Ryan y Ray, 2010).

Operacionalización de las Variables

Las variables son una característica, cualidad o medida que puede sufrir cambios y que es objeto de análisis, medición o control en una investigación. De esta manera, pueden clasificarse según su función en; dependiente e independiente. La variable dependiente (Tabla 4), son aquellas que se modifican por acción de la variable independiente, constituyen los efectos o consecuencias que se miden y que dan origen a los resultados de una investigación. Mientras que la variable independiente (Tabla 5), son las causas que generan y explican los cambios de la variable dependiente (Arias, 2004).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 4. Operacionalización de la Variable Dependiente.

1.Variable	2.Tipo	3.Definición conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana de los extractos de la especie <i>M. oleífera</i> .	Dependiente	Se define por la capacidad que poseen algunas sustancias de inhibir el crecimiento de determinadas bacterias en un medio de cultivo frente a un antibiótico específico (Betés y cols., 2008).
4.Definición Operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
La actividad antibacteriana se mide por la técnica del Método de difusión en agar por disco (Kirby-Bauer).	Bacterias grampositivas: <ul style="list-style-type: none"> • <i>S. aureus</i> • <i>E. faecalis</i> Bacterias gramnegativas: <ul style="list-style-type: none"> • <i>K. pneumoniae</i> • <i>E. coli</i> • <i>P. aeruginosa</i> 	Presencia o ausencia del halo de inhibición (en mm) frente a cepas grampositivas y gramnegativas

Fuente: Fernández y Hernández, (2022).

Tabla 5. Operacionalización de la Variable Independiente.

1.Variable	2.Tipo	3.Definición conceptual ¿Qué es?
Composición química de los extractos de tallos y hojas de <i>M. oleífera</i> .	Independiente Cualitativa	Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que se sintetizan y acumulan por las plantas, como parte de la defensa química contra daños en los tejidos y el ataque de microorganismos patógenos (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2003).
4.Definición Operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
Mediante pruebas químicas cualitativas, reacciones de coloración, y precipitación.	<ul style="list-style-type: none"> • Alcaloides • Saponinas • Flavonoides • Fenoles • Taninos polifenoles • Esteroles triterpenos • Quinonas • Antraquinonas 	<ul style="list-style-type: none"> • Prueba de Wagner, Mayer y Dragendorff: presencia de precipitado. • Prueba de altura de la espuma: espuma que perdura en tiempo y tamaño. • Prueba de Shinoda: presencia de color • Prueba de Tricloruro Férrico: cambio de color. • Prueba de la gelatina 1 %: precipitado blanco • Prueba de Lieberman-Burchard: cambio de color • Prueba de H₂SO₄: coloración de amarillo a rojo • Prueba Hidróxido de amonio: presencia de un color rosado

Fuente: Fernández y Hernández, (2022)

Hipótesis

Desde la antigüedad la especie *Moringa oleífera* ha sido utilizada de manera medicinal para tratar una serie de enfermedades, en consideración, a los diferentes reportes sobre los metabolitos secundarios presentes, incluso en distintas partes de la planta; es de esperar que los metabolitos secundarios encontrados en los tallos y hojas de la especie *M. oleífera* en estudio presenten actividad antibacteriana frente a las diferentes cepas bacterianas grampositivas y gramnegativas.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Según Hurtado (2010), los tipos de investigación están relacionados con el logro esperado durante el proceso de investigación. De esta manera, orienta el propósito general de estudio y la forma de recolectar los datos necesarios. En tal sentido, un tipo de investigación confirmatoria requiere de una explicación previa o una serie de supuestos o hipótesis. Su objetivo es verificar una o más hipótesis derivadas de una teoría, a partir de la experiencia directa. Por lo tanto, esta investigación es de tipo confirmatoria, ya que desea confirmar la actividad antibacteriana y el ensayo fitoquímico de los extractos obtenidos en tallos y hojas de *M. oleífera*, en cepas bacterianas de referencia internacional.

Diseño de la Investigación

El diseño de una investigación se debe determinar a través de las estrategias que se implementan para recolectar la información en una fuente determinada, en un tiempo específico y en una cantidad o amplitud asociada a lo que se quiere saber. En tal sentido, el diseño de esta investigación es experimental, de campo y de laboratorio; ya que las muestras se recolectaron en un ambiente natural del municipio Fernández Feo del estado Táchira, las cuales fueron procesadas en el laboratorio del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Respecto al tiempo de recolección de los datos, este estudio fue

contemporáneo ya que, la recolección sucedió durante el desarrollo de la investigación y transversal; porque la muestra se tomará en un solo momento (Hurtado, 2010).

Población y muestra

Unidad de investigación

La unidad de investigación o población objetivo, es un conjunto finito o infinito de elementos con características comunes para los cuales serán extensivas las conclusiones de la investigación (Arias, 2004). La unidad de estudio de esta investigación estuvo representada por las hojas y tallos de la especie *Moringa oleífera*, situada en el municipio Fernández Feo, parroquia Alberto Adriani, capital Naranjales del estado Táchira.

Selección del tamaño de la muestra

La muestra es, un subgrupo de la población, un subconjunto de elementos representativo y finito que se extrae de la población accesible (Arias, 2004). Por esta razón, y en este orden de ideas; la investigación se fundamentó en el estudio de los tallos (184 g) y hojas (233 g) de la especie *Moringa oleífera*.

Sistema de Variables

Arias (2004) define las variables como una característica o cualidad; magnitud o cantidad, que pueden sufrir cambios, y que es objeto de análisis, medición, manipulación o control de una investigación. Estas a su vez se clasifican en variables dependientes e independientes. En un estudio experimental; la variable dependiente es la característica que se investiga y

que siempre debe ser evaluada: mientras que, la variable independiente es la característica que se puede medir por separado y que puede ser causa de la variable dependiente. Asimismo, las variables que tienen relación con el objetivo de la investigación son las siguientes: Variable dependiente: Actividad antibacteriana de los extractos de la especie *M. oleífera*. Variable independiente: Ensayo fitoquímico de los extractos en tallos y hojas de *M. oleífera*.

Instrumento de Recolección de Datos

En relación con Arias (2004); un instrumento de recolección de datos es cualquier recurso, dispositivo o formato; que se utiliza para obtener, registrar o almacenar información. En efecto, en este proyecto de investigación es empleada la observación estructurada como técnica, donde su propósito es observar la presencia o ausencia de los diferentes compuestos químicos presentes en los extractos de la planta; a través de reacciones químicas cualitativas. Además, de describir la presencia o ausencia de los halos de inhibición frente a las concentraciones de los extractos de *Moringa oleífera*.

Procedimiento de la Investigación

- 1. Recolección del material vegetal:** se recolectaron 450 gramos entre tallos y hojas de la planta en el sector Naranjales, capital del municipio Fernández Feo del estado Táchira.
- 2. Obtención de los extractos de la especie vegetal:** los tallos y hojas seleccionados se llevaron a estufa donde se secaron a 40 °C y posteriormente se molieron por separado; obteniendo 65 gramos en tallos y 73 gramos en hojas; para la elaboración de los extractos se colocó el material vegetal a macerar por 48 horas, cabe destacar que este procedimiento se realizó tres veces con cada solvente (hexano,

diclorometano y etanol). Después de las 48 horas cada uno de los extractos que se encontraban macerando se filtraron con papel filtro, para luego llevar a cabo la concentración en el rotavaporador (Figura 15) a presión reducida y temperatura controlada no mayor a 45 °C. Finalmente, los extractos se colocaron en frascos color ámbar y se llevaron a secar en la estufa por 40 °C.



Figura 15. Concentración del extracto en rotavaporador IKA RV10.

Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de Moringa oleífera

Una vez obtenidos los extractos se realiza el respectivo ensayo fitoquímico cualitativo para determinar los metabolitos secundarios presentes en la planta; en el cual utilizamos diferentes técnicas, tales como (Tabla 6):

Tabla 6. Ensayo fitoquímico para la determinación de metabolitos secundarios del extracto de tallos y hojas de *M. oleífera*.

Metabolitos secundarios	Prueba	Procedimiento	Referencia
Alcaloides	Wagner, Mayer & Dragendorff	<p>Se tomó una porción del extracto etanólico, y se adiciono 5 mL del HCl al 10 %, se calentó en baño de maría por 10 min, se dejó enfriar y luego se filtró. Luego, se toma un alícuota de filtrado para cada ensayo con los reactivos para alcaloides: Wagner, Mayer & Dragendorff.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se considera como positiva las pruebas que formen un precipitado de naranja a rojo (Wagner), precipitado de blanco a naranja (Mayer & Dragendorff). 	Domínguez (1979).
Saponinas	Altura de la espuma	<p>Una porción del extracto se agrega a un tubo de ensayo y se disuelve agregando agua caliente, se deja reposar durante 15 min y se agita por 2 min.</p> <ul style="list-style-type: none"> • La formación de espuma con apariencia de panal de abejas se considera positivo. 	Domínguez (1979).

Tabla 6. Ensayo fitoquímico para la determinación de metabolitos secundarios del extracto de tallos y hojas de *M. oleífera*. (Continuación).

Metabolitos secundarios	Prueba	Procedimiento	Referencia
Flavonoides	Shinoda	Se mezclaron birutas de magnesio, HCl concentrado y el extracto de la planta <ul style="list-style-type: none"> • La formación de una coloración naranja a rojo indica la presencia de flavonas, si es rojo flavonoles y si es magenta flavononas. 	Domínguez (1979).
Fenoles	FeCl ₃	Se disolvió la muestra (1-2 mg) en 1 mL de disolvente añadiendo unas gotas de cloruro férrico al 5 %. <ul style="list-style-type: none"> • La coloración verde oscura o negra indica la positividad de la prueba 	Domínguez (1979).
Taninos y polifenoles	Gelatina 1%	Se disuelven 100 mg del extracto, se filtra y se toma alícuota de 1 mL y se mezclan 4 gotas de dilución acuosa de gelatina al 1 %. <ul style="list-style-type: none"> • Se considera positiva la aparición de un precipitado 	Domínguez (1979).
Esteroles y triterpenos	Lieberman-Burchard	Se agregó 2 mL de anhídrido acético y 2 mL de cloroformo junto al extracto de la planta. La mezcla se enfrió y se le añadió H ₂ SO ₄ concentrado. <ul style="list-style-type: none"> • El color verde, azul, violeta o rosa indica la presencia de esteroles. • Color rojo o pardo indica la presencia de triterpenos. 	Domínguez (1979).

Determinación de la Actividad Antibacteriana de los extractos en tallos y hojas de *Moringa oleífera*.

La actividad antibacteriana se llevó a cabo por el método de difusión en agar con discos, de acuerdo a la metodología descrita por Velasco y cols (2007). Cada inóculo se diseminó con un hisopo estéril en la superficie de las placas que contenían Agar Müller-Hinton, luego se colocó un disco de papel filtro, impregnado con 10 µL del extracto, además de colocar los discos de control positivo y el disco de control negativo (DMSO) según el microorganismo en estudio. Las placas se dejaron 30 minutos a temperatura ambiente y luego se incubaron a 37 °C durante 24 horas. La actividad antibacteriana se evidencia por halos de inhibición alrededor del disco.

Bacterias de ensayo: se seleccionaron cinco cepas de la Colección Tipo Americano (ATCC); de las cuales dos de ellas fueron cepas bacterianas grampositivas y tres especies bacterianas gramnegativas; estas bacterias fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (Tabla 7).

Tabla 7. Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).

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

Nota: CLSI, 2020.

Preparación de pre-inóculos bacterianos: las cepas a ensayar se incubaron en agar Müeller-Hinton a 37 °C por 16 a 18 horas antes de realizar el ensayo microbiano, ya que es en ese tiempo que las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano (Anon, 2003).

Preparación del inóculo bacteriano: una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de una asa en aro estéril, tomándose una pequeña cantidad de colonias para preparar una suspensión en solución salina fisiológica esteril (0,85 %) hasta obtener una turbidez visualmente comparable al patrón Mc Farland N° 0,5 ($1,6 \times 10^8$ UFC/mL) (Anon, 2003).

Preparación de las placas: a cada placa se le colocó 20 mL de Müeller-Hinton previamente preparado y esterilizado a una temperatura no superior a los 40 °C, luego de esto, se deja solidificar a temperatura ambiente (Anon, 2003).

Preparación de los discos: se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los cuales se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV) durante toda la noche. Previo a la preparación del inóculo se impregnaron los discos de papel con 10 µL de la muestra en estudio en una concentración comprendida en 10.000 ppm. Por consiguiente, se utilizaron discos de antibióticos comerciales (Eritromicina, Ampicilina, Piperacilina) como control positivo con la finalidad de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar, y como control negativo discos impregnados con 10 µL del solvente dimetilsulfóxido (DMSO) (Anon, 2003).

Diseño de Análisis

Los enfoques que se utilizaron para el análisis de los datos fueron cuantitativos y cualitativos. El enfoque cuantitativo utiliza la recolección y el análisis de datos para contestar preguntas de investigación y probar hipótesis establecidas previamente; en el presente estudio este tipo de datos está dado por la actividad antibacteriana, en cuanto, a la medición, y a la ausencia y presencia de los halos de inhibición. Sin embargo, en el análisis de los datos de la investigación no se utilizaron métodos estadísticos, estos datos obtenidos en las pruebas preliminares serán recopilados de manera cualitativa. Por otro lado, el enfoque cualitativo se basa en métodos de recolección de datos sin medición numérica, sin conteo, utiliza las descripciones y observaciones; este enfoque está dado por el ensayo fitoquímico y sus diferentes pruebas. En efecto, se utiliza para descubrir y refinar preguntas de investigación. En ciertas ocasiones se plantean hipótesis que surgen como parte del proceso de investigación siendo flexible entre los eventos, su interpretación y entre las respuestas y desarrollo de la teoría.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Los tallos y hojas de *Moringa oleífera* fueron sometidas a un proceso de maceración con tres solventes orgánicos: hexano, diclorometano y etanol, por separado obteniéndose seis extractos (Tabla 8). Los extractos de los tallos presentaron un color verde claro, olor característico y aspecto condensado; mientras que los extractos de las hojas presentaron un color verde oscuro.

Tabla 8. *Peso de las partes de la planta, junto al peso de los extractos, para obtener el porcentaje de rendimiento de cada extracto.*

Partes de la Planta	Peso	Peso del Extracto	Rendimiento de los Extractos
Tallos Molidos	65 g	Extracto Hexano: 17 g	26,15 %
		Extracto Diclorometano: 10 g	15,38 %
		Extracto Etanol: 11 g	17,38 %
Hojas Molidas	73 g	Extracto Hexano: 12 g	16,56 %
		Extracto Diclorometano: 11 g	15,47 %
		Extracto Etanol: 12 g	16,43 %

Nota: Elaborado por Fernández (2022).

Ensayo fitoquímico preliminar

Todos los extractos de *Moringa oleífera* fueron sometidos a las pruebas químicas preestablecidas para conocer el grupo de metabolitos secundarios presentes en la muestra; siendo de forma cualitativa la revelación de cada uno de los componentes por fenómenos químicos de reacción como: viraje de color, precipitados, turbidez del medio, producción de espuma y fluorescencia por exposición a la luz ultravioleta (UV). Estos fenómenos fueron los indicativos primordiales para la presencia de los metabolitos presentes en la especie (Tabla 9).

Tabla 9. Reporte de los resultados del ensayo fitoquímico de los extractos de tallos y hojas de *M. oleífera*.

Metabolitos y prueba	EHT	EHH	EDT	EDH	EET	EEH
Alcaloides						
Wagner	-	-	-	-	-	-
Mayer	-	-	-	-	-	-
Dragendorff	-	-	-	-	-	-
Saponinas						
Altura de la espuma	-	-	-	-	-	-
Flavonoides						
Shinoda	-	-	-	-	-	-

Tabla 9. Reporte de los resultados del ensayo fitoquímico de los extractos de tallos y hojas de *M. oleífera* (Continuación).

Metabolitos y prueba	EHT	EHH	EDT	EDH	EET	EEH
Fenoles Tricloruro férrico	-	-	-	+ Verde intenso Compuestos fenólicos	-	+ Verde intenso Compuestos fenólicos
Esteroles y Triterpenos Lieberman-Burchard	+ Interface azul Esterol	+ Interface azul Esterol	-	+ interface azul Esterol	-	-

Leyenda: (+): Positivo, (++): Moderado, (+++): Abundante, (-): Ausente
 EHT: Extracto Hexano Tallo, EHH: Extracto Hexano Hojas, EDT: Extracto Diclorometano Tallo, EDH: Extracto Diclorometano Hojas, EET: Extracto Etanol Tallo, EEH: Extracto Etanol Hojas.
 Nota: Elaborado por Fernández (2022).

Tabla 10. Reporte ilustrado de los resultados positivos del ensayo fitoquímico de los extractos en tallos y hojas de *Moringa oleífera*.

Prueba	Reporte
	<p>Prueba: Tricloruro Férrico (FeCl_3)</p> <p>Metabolito determinado: Compuestos fenólicos.</p> <p>Reporte: Positivo, formación de coloración verde intenso.</p> <p>Tubo: Hojas de Diclorometano y Etanol.</p>
	<p>Prueba: Lieberman Burchard</p> <p>Metabolito determinado: Esterol.</p> <p>Reporte: Positivo, formación interface azul</p> <p>Tubo: Tallo y Hojas de Hexano</p> <p>Tubo: Hojas de Diclorometano</p>

Nota: Elaborado por Fernández (2022).

Evaluación de la Actividad Antibacteriana

Se determinó a través del método de difusión en disco en agar (Kirby-Bauer), en cuatro extractos de tallos y hojas comprendidos con Diclorometano y Etanol, en concentraciones madres de 10.000 ppm, frente a las diferentes cepas bacterianas ATCC: dos especies grampositivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), dos especies gramnegativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357,

Escherichia coli ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Los resultados de esta actividad antibacteriana se muestran en la Tabla 12 (ver anexos 1, 2 y 3).

Tabla 11. Resultados obtenidos en la determinación de la Actividad Antibacteriana de los extractos de los tallos y hojas de *Moringa oleífera*.

Muestras ensayadas [] 10.000ppm	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
EDT	7*	0*	8*	0*	8*
EDH	7*	7*	7*	0*	7*
EET	7*	7*	7*	0*	7*
EEH	8*	11*	7*	0*	8*
Controles Positivos					
Eritromicina (E)	32*	-	-	-	-
Ampicilina (AMP)	-	32*	-	-	-
Piperacilina (PIP)	-	-	27*	27*	27*

Leyenda: EDT: Extracto Diclorometano Tallo, EDH: Extracto Diclorometano Hojas, EET: Extracto Etanol Tallo, EEH: Extracto Etanol Hojas, *: Halos de inhibición en mm.

Nota: Elaborado por: Cordero (2022).

Discusiones

En la presente investigación se obtuvieron por maceración extractos de hexano, diclorometano y etanol de los tallos y hojas de *Moringa oleífera*; dichos extractos evidenciaron a través de las pruebas químicas cualitativas la presencia de algunos metabolitos secundarios como: fenoles para las hojas y esteroides para los tallos y hojas (Tabla 9). Al comparar los resultados obtenidos con los estudios anteriores con respecto a la caracterización fitoquímica de los extractos de la especie, recolectadas de diferentes países; se demuestra que esta investigación refleja tener una composición química similar.

El estudio realizado por La Rosa y Zarate (2021), demostró que el extracto de las hojas de *M. oleífera* contiene la presencia de metabolitos bioactivos como flavonoides, alcaloides y compuestos fenólicos. Asimismo, nuestra investigación refleja la presencia de compuestos fenólicos; derivados del pirocatecol, en el extracto de las hojas de diclorometano y etanol, observándose una coloración verde intenso y afirmando así la positividad del compuesto.

Por otra parte, Zamata y Milagro (2020), confirmaron la presencia de compuestos químicos, tales como: flavonoides, fenoles, alcaloides, taninos, saponinas, oxalatos y vitaminas, en diferentes partes de la planta, posibles responsables de la acción terapéutica. Esto conlleva a una relación estrecha con nuestra investigación, ya que se logró identificar compuestos fenólicos y esteroles en los extractos obtenidos de los tallos y hojas. Además, estos autores afirmaron que la presencia de flavonoides en las hojas de *M. oleífera* (el cual no se evidenció en esta investigación), tienen un efecto antiinflamatorio, hepatoprotector, antioxidante, antidiabético y neuroprotector.

Sin embargo, Borjas y Sarasti (2018), Evaluaron la actividad antimicrobiana presente en las hojas de la especie *M. oleífera* frente a microorganismos patógenos; donde obtuvieron como resultado patrones de

sensibilidad eficaces respecto a Enterobacterias como *E. coli* y *K. pneumoniae*, una sensibilidad aceptable frente a *S. aureus* y una susceptibilidad antimicrobiana intermedia frente a *P. aeruginosa*; logrando deducir que los halos de inhibición no son totalmente sensibles al extracto etanólico, ya que sus valores fueron menores que los de referencia. Por otro lado, nuestra actividad antibacteriana arrojó cierta sensibilidad en los diferentes extractos ensayados contra a los microorganismos patógenos; siendo el extracto de las hojas de etanol con mayor sensibilidad (11 mm de diámetro) específicamente en el microorganismo de *E. faecalis*.

No obstante, este mismo microorganismo fue resistente al extracto de los tallos de diclorometano, presentando un halo de inhibición de 0 mm de diámetro para *E. faecalis*. Asimismo, Arévalo (2017) demostró en su investigación que los extractos metanólicos de *M. oleífera* tienen un efecto antibacteriano contra cepas de *E. faecalis*. De esta manera, ratificamos la sensibilidad que ocasiona este patógeno; y lograr obtener opción terapéutica frente a este tipo de microorganismos.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. La composición química preliminar de los extractos fue analizada cualitativamente mediante el ensayo fitoquímico logrando la identificación de compuestos fenólicos, derivados del pirocatecol en las hojas de diclorometano.
2. En el extracto hexano de los tallos y hojas se identificaron el compuesto esterol. De igual forma, en el extracto diclorometano, específicamente en las hojas se demostró nuevamente este compuesto.
3. En los extractos de las hojas de etanol y diclorometano se presentaron actividad antibacteriana contra las cepas de *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* con halos de inhibición que varían entre 7-11 mm de diámetro a una concentración de 10.000 ppm.
4. En los extractos de los tallos de etanol y diclorometano arrojaron actividad antibacteriana frente a las cepas estudiadas con halos de inhibición de 7-8 mm de diámetro, con una concentración de 10.000 ppm. Sin embargo, el extracto de los tallos de diclorometano en la cepa de *E. faecalis*, no presentaron actividad alguna.
5. Con respecto a la cepa de *E. coli*, no hubo crecimiento en ninguno de los extractos de la especie. Por lo tanto, no se logró demostrar la actividad antibacteriana frente a este microorganismo patógeno.

Recomendaciones

1. Realizar estudios antibacterianos frente a otras cepas patógenas
2. Utilizar técnicas cromatográficas para separar los metabolitos secundarios presentes en los extractos de los tallos y hojas de la especie *M. oleífera*
3. Realizar estudios antimicrobianos frente a otros microorganismos como parásitos y hongos.
4. Analizar si los extractos de los tallos y hojas de *M. oleífera* presentan otro tipo de actividad biológica como antifúngica o antioxidante.

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOHEMEROGRAFIA

- Agudelo, L., Álvarez, M. (2020). *Empleo del polvo de hojas de Moringa oleífera como fortificante en un alimento enfocado a la población infantil colombiana menor de 4 años*. Corporación Universitaria Lasallista. Facultad de Ingeniería. Caldas, Antioquia.
- Anon. (2003). Determination of minimum inhibitory concentration (MIC_s) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9, 1.
- Arévalo, O. (2017). Efecto antibacteriano y citotóxico de dos extractos metanólicos a base de *Moringa oleífera* y *Azadirachta indica* sobre cepas de *Enterococcus faecalis*. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas UPC. Perú.
- Arias, F. (2004). *El proyecto de la investigación. Introducción a la metodología científica*. Caracas, Venezuela: Editorial Episteme.
- Avalos, A., Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. *Departamento de Biología Vegetal*. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. España.
- Barrios, A. (1996). *Microbiología*. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, 1, 60-61.
- Batei, A. (2007). *La historia de los extractos*. Bogotá, Colombia.
- Berendsohn, W., Monterrosa, S. (2012). *Árboles Nativos e Introducidos del Salvador*. *Englera* 29 (2), 369-390.
- Betés, M., Duran, M., Mestres, C., Wogues, R. (2008). *Farmacología para fisioterapeutas*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Bonal, R., Rivera, O., Bolívar, C. (2012). *Moringa oleífera una opción saludable para el Bienestar*. *Medisan*, 16 (10), 1596-1599.
- Borjas, D., Sarasti, M. (2018). *Evaluación de la actividad antimicrobiana mediante la extracción de la fracción activa presente en las hojas de la especie vegetal Moringa oleífera frente a microorganismos patógenos*.

- Quito, Ecuador. Disponible:
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15167>.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica. Plantas medicinales*. Segunda Edición. Acribia, Zaragoza.
- Cadman, B. (2020). *Medical news today*. Beneficios, riesgos y efectos secundarios. Disponible:
<https://www.medicalnewstoday.com/articles/es/moringa#efectos-secundarios>. [Consultado: 2022, agosto 01].
- Carey, F. (2003). *Química Orgánica*. Quinta Edición. Editorial Mc. Graw- Hill.
- Carrion, J., García, C. (2010). *Preparación de extractos vegetales. Determinación de Eficiencia Metódica*. Universidad de Cuenca. Cuenca, Ecuador.
- Carvajal, L., Hata, Y., Sierra, N., Rueda, N. (2009). *Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (Strychnos schultesiana krukoff)*. *Revista Colombiana Forestal*, 12,161-170.
- Castillero, O. (2019). *Moringa: características, beneficios y propiedades de esta planta*. Universidad Europea Miguel de Cervantes. España.
- Castillo, L., García, P., Sánchez, E. (2016). *Actividad antimicrobiana*. Universidad Autónoma de Nuevo León, México: Editorial OmniaScience.
- Colmeiro, M. (1995). *Diccionario de los diversos nombres vulgares de las plantas usuales o notables del Antiguo y Nuevo Mundo*. Madrid, España.
- Doménech, G., Durango, A., Ros, G. (2017). *Moringa oleífera. Aplicaciones y usos en alimentos*. [Trabajo en línea]. Trabajo de investigación. Universidad de Murcia, España. Disponible:
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06222017000200003. [Consultado: 2022, agosto 01].
- Domínguez, X. (1979). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. México: Editorial Limusa.

- Erracalde, J. (1996). *Antimicrobiano en leche: Su importancia en Salud Pública*. Boehringer Ingelheim S.A. Buenos Aires, Argentina.
- Flores, B. (2014). *Uso de Antibióticos en Adultos Hospitalizados*. Instituto Mexicano del Seguro Social. Ciudad de México. Pág. 18.
- Garity, G. (2004). *Bacteriology. Klebsiella spp.* Washington DC. Second edition. United States.
- González, A. (2013). *Moringa oleífera. Herbal safety. The University of Texas at EL PASO*. 12 (9), 91-106.
- Gowrishankar, R. (2010). *Trace element studies on Tinospora cordifolia, Ocimum sanctum, Moringa oleífera*. Biological trace element research. 21 (10), 357-363.
- Hurtado, J. (2010). *El Proyecto de la Investigación. Comprensión holística de la metodología de la investigación*. Caracas, Venezuela: Ediciones Quirón.
- Instituto de productos Naturales y Agrobiología. (2019). Santa Cruz de Tenerife, España. Disponible: <https://www.ipna.csic.es/blog/la-naturaleza-que-inspiro-los-farmacos>. [Consultado: 2022, agosto 01].
- Jawetz, E. (2012). *Quimioterapia Antimicrobiana*. Manual de Microbiología Médica. México, DF. Editorial del Manual Moderno.
- La Rosa, J., Zarate, O. (2021). *Elaboración de un jarabe del extracto hidroalcohólico de las hojas de Moringa oleífera para evaluar su actividad antibacteriana frente a cepas clínicas de Escherichia coli*. Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Perú. Disponible: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/5311>.
- López, J. (2016). *Moringa oleífera Lam: Biología Botánica, Propiedades Nutricionales y Medicinales*. Universidad de Sevilla, España.
- López, J. (2016). *Moringa oleífera Lam: Biología Botánica. Propiedades Nutricionales y Medicinales*. [Trabajo en Línea]. Trabajo de investigación. Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla. España. Disponible:

<https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/80558/MoringaF.pdf>.

[Consultado: 2022, agosto 01].

- Morcillon, P. (2005). *Staphylococcus aureus*. In mandell GL, Bennett JE, Olin R, Principles and practice of infections diseases. Philadelphia. Churchill Livingston. 6 edition. United States.
- Muñoz, A. (2000). *Evolución de los extractos de las plantas*. Evolución de las plantas medicinales. Buenos Aires, Argentina.
- Murray, P. (2006). *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiología medica. España. Quinta edición.
- Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M. (2009). *Microbiología Médica*. Barcelona, España: Editorial ELSEVIER.
- Oliveira, M., Velázquez, D. (2005). La investigación etnobotánica sobre las plantas medicinales. *Revista de Ciencia y Tecnología de América*, 30, 450,453.
- Olso, M., Cárdenas, A. (2016). Donde cultivar el árbol milagroso *Moringa oleífera* en México. Un análisis de su distribución potencial. *Revista mexicana de biodiversidad*, 87 (3), 1089-1102.
- Olso, M., Fahey, J. (2011). *Moringa oleífera: a multipurpose tree for the dry tropics*. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 82 (4). 1071-1082.
- Organización Mundial de la Salud. (2020). Resistencia a los antibióticos. Disponible: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>. [Consultado: 2022, agosto 01].
- Oromi, J. (2000). *Resistencia bacteriana a los antibióticos*. Medicina Integral. ELSEVIER. Pág. 367.
- Palacios, M. (2008). *Curso de Farmacognosia y Fitoquímica*. Escuela de Farmacia y Bioquímica. Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. Lima, Perú.

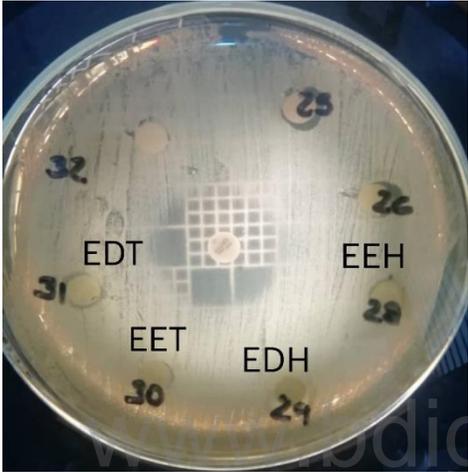
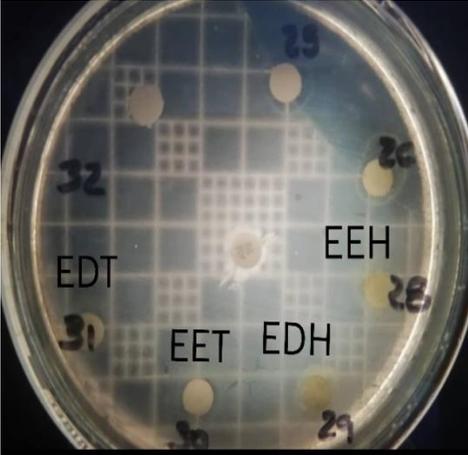
- Pérez, N., Jaramillo, C., Márquez, I. (2017). *Estudios farmacognósticos y toxicológicos preliminares de hojas, tallos y raíz de Moringa oleífera*. Revista Científica Unemi, 10 (22), 60-68.
- Pérez, M., Mota, M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Academia.edu.
- Prats, G. (2012). *Microbiología Clínica*. Barcelona, España: Editorial Médica Panamericana.
- Ríos, J., Recio, M., Villar, A. (1988). *Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature*. Journal of Ethnopharmacology, 23 (2), 127-149.
- Rivas, M., Callejo, R. (1999). *Identificación de E. coli*. Departamento de Bacteriología. Universidad Nacional de la Plata. Buenos Aires, Argentina.
- Rodríguez, A. (2011). Taxonomía de Bloom. Universidad Cesar Vallejo, Perú. Academia.edu.
- Ryan, K. (2004). *Sheris medical microbiology*. Washington DC, 4th ed. United States.
- Ryan., Ray. (2010). Microbiología médica. México: editorial McGrawHill
- Sánchez, C. (2006). Antibióticos, ayer, hoy y mañana. *Departamento de Química Biológica*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Sande, M. (1982). Quimioterapia de la Enfermedad. *Agentes Antimicrobianos*. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. La Habana Cuba. Editorial Científica.
- Sepúlveda, G., Porta, H., Rocha, M. (2003). *La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas*. Revista mexicana de fisiopatología, 12 (21), 355-363.
- Taroco, R., Seija, V., Vignoli, R. (2008). Métodos de Estudio de la sensibilidad antimicrobiana. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Oficina del Libro FEFMUR, Uruguay, 36, 663-671.

- Treviño, J. (2007). *Definiciones*. Etimología de Caducifolio. Chile.
- Velasco, J., Rojas, J., Salazar, P., Rodriguez, M., Diaz, T., Morales, A., Rondon, M. (2007). *Actibacterial activity of the essential oil of Lippia oreganoides against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin*. Natural Product Communications, 2, 85-88.
- Walter, P., Espinoza, J. (2011). Actividad Antimicrobiana de plantas en la medicina tradicional. Revista de la Sociedad Química de Perú. 93 (10), 75-79.
- Zamata, C., Milagro, M. (2020). Avances en el conocimiento del efecto terapéutico de la *Moringa oleífera*. Universidad Privada Autónoma del Sur. Arequipa, Perú.

www.bdigital.ula.ve

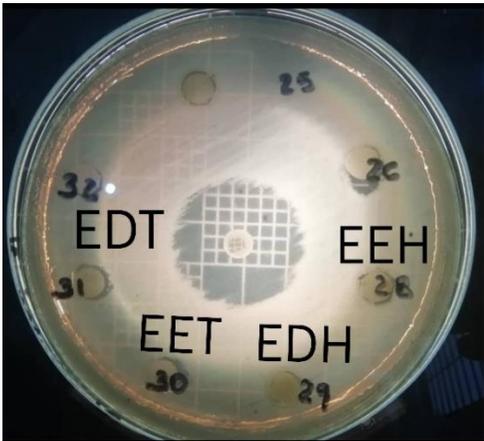
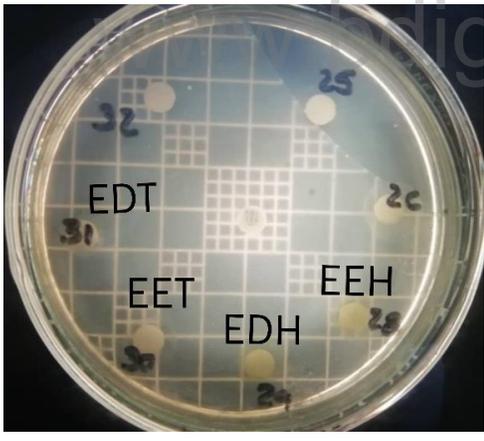
ANEXOS

Tabla 12. Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de tallos y hojas de *Moringa oleifera*.

Prueba	Reporte
	<p>Prueba: Kirby-Bauer</p> <p>Especie en estudio: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.</p> <p>Reporte:</p> <p>EEH: sensible EDH: sensible EET: sensible EDT: sensible</p>
	<p>Prueba: Kirby-Bauer</p> <p>Especie en estudio: <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212.</p> <p>Reporte:</p> <p>EEH: sensible EDH: sensible EET: sensible EDT: resistente</p>

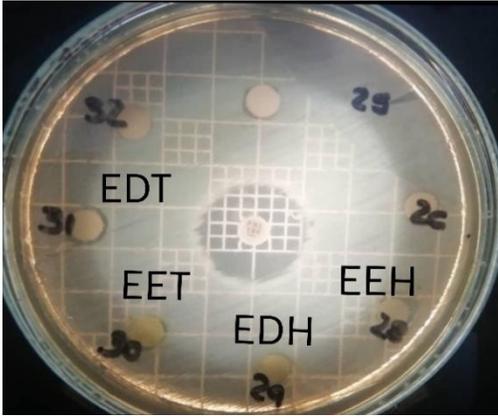
Leyenda: EEH: Extracto de Etanol de las Hojas, EDH: Extracto de Diclorometano de las Hojas, EET: Extracto de Etanol de los Tallos, EDT: Extracto de Diclorometano de los Tallos

Tabla 12. Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de tallos y hojas de *Moringa oleífera*. (Continuación).

Prueba	Reporte
	<p>Prueba: Kirby-Bauer Especie en estudio: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357. Reporte: EEH: sensible EDH: sensible EET: sensible EDT: sensible</p>
	<p>Prueba: Kirby-Bauer Especie en estudio: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. Reporte: En ninguno de los extractos hubo crecimiento bacteriano, por lo tanto no se logró determinar su actividad antibacteriana.</p>

Leyenda: EEH: Extracto de Etanol de las Hojas, EDH: Extracto de Diclorometano de las Hojas, EET: Extracto de Etanol de los Tallos, EDT: Extracto de Diclorometano de los Tallos

Tabla 12. Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de tallos y hojas de *Moringa oleífera*. (Continuación).

Prueba	Reporte
	<p>Prueba: Kirby-Bauer</p> <p>Especie en estudio: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.</p> <p>Reporte: EEH: sensible EDH: sensible EET: sensible EDT: sensible</p>

Leyenda: EEH: Extracto de Etanol de las Hojas, EDH: Extracto de Diclorometano de las Hojas, EET: Extracto de Etanol de los Tallos, EDT: Extracto de Diclorometano de los Tallos