



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



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS  
EXTRACTOS DE LAS FLORES DE *Cassia alata* L. EN CEPAS DE  
REFERENCIA INTERNACIONAL (ATCC)**

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

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Autor (a):**

Ana E. García C.

C.I. V-25.628.838

**Tutor (a):**

Prof. Ysbelia M. Obregón D.

Mérida, Noviembre de 2022

## DEDICATORIAS

Todo viaje hacia lo desconocido comienza dando el primer paso, paso que di con miedo a lo que pudiese pasar, enfrentándome a un mundo lleno de incertidumbres. Innumerables obstáculos y tropiezos fueron los que atravesé los cuales me hicieron crecer personal e intelectual dejando consigo enseñanzas y conocimientos.

Este trabajo de tesis ha sido el fruto del esfuerzo, dedicación y valentía que por hoy le dedico a Dios por ser mi guía espiritual, por haberme permitido llegar a este punto, por darme la vida, mantenerme con salud para lograr mis objetivos y por su infinita bondad, amor y protección.

Los éxitos en mis años de estudios son producto de todas las personas que me han apoyado a lo largo de este camino, en especial a mis padres Daglee y María por darme no solo la vida, ser pilar fundamental de lucha y perseverancia sino también por no dejarme flaquear, darme su apoyo, ánimos, fuerzas para seguir avanzando y por el trabajo y el esfuerzo abnegado de su parte para hacerme una mujer de bien logrando mis metas.

A mis hermanos Alines, Evelin y Dagles por su amor, apoyo y compañía siempre. También a mis queridos sobrinos por reiniciarme la vida con sus ocurrencias.

A todos mis compañeros de estudios que me apoyaron y creyeron en mí, a los buenos y malos elementos, a los que hablaron bien o mal en mi ausencia.

*Ana García*

## AGRADECIMIENTOS

Al momento de escribir estas líneas pensé en todo lo que ha quedado en el pasado, un pasado con experiencias que han forjado mi presente y me han hecho ser la mujer que hoy soy.

Ante todo agradecida de corazón con Dios por brindarme sabiduría, entusiasmo y fortaleza para sobreponerme a las dificultades del camino.

Agradezco enormemente a mis padres Dagle y María por ser mis consejeros, mis acompañantes sinceros, mi paño de lágrimas, por darme todo lo mejor de ellos y hasta más.

A mi copiloto de vida Emigdio, aunque nuestro viaje comenzó finalizando mi historia académica para formarme como licenciada te doy gracias por extenderme tu apoyo y comprensión alentándome a ser cada vez mejor.

Gratitud a mi alma mater Universidad de Los Andes especialmente a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por acogerme durante mi formación en sus aulas de clases dejándome enseñanzas y divertidas anécdotas en sus transcurridos pasillos que me vieron reír, soñar, llorar y gritar de felicidad.

A mi querida Profesora Ysbelia Obregón, a quien considero mi madre académica por haberme abierto los brazos con amor para llevar a cabo la presente investigación bajo su tutoría, no hubiese sido del todo posible sin su apoyo, respeto, consejos, sugerencias, paciencia y buenas energías. Sin duda, Dios pone personas buenas en el camino y una de ellas es usted que con dulzura me acompañó y guió para lograr culminar este trabajo.

A los miembros del jurado evaluador las profesoras Alida Pérez y Rosa Aparicio por haber contribuido en el enriquecimiento y sugerencias en la elaboración del trabajo de tesis.

Mi gratitud eterna al Profesor Luis Rojas, quien en vida fue importante durante la realización de mi trabajo de grado no solo por formar parte del jurado principal sino por la ayuda recibida de su persona al recomendarme como Tesista y darle forma a este manuscrito con sus valiosos consejos; gracias, gracias por confiar en mí. Siempre será recordado ¡Te Pasaste!

Al Laboratorio de Productos Naturales y el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, a todo su personal que labora con dedicación y entusiasmo en especial al Señor Emilio Salazar y a la Profesora Yndra Cordero por ayudarme con la parte experimental durante la realización de esta tesis.

Al Laboratorio de Microbiología de la facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes a cargo de las Licenciadas María Eugenia Nieves y Yacneli Infante de Rey.

A todos los profesores de los diferentes semestres por compartir con esmero y dedicación todos sus conocimientos para mi formación como Licenciada en Bioanálisis.

Por último, agradezco a todos mis compañeros de Universidad en especial a mis amigas Francy, Francis, Lauren y Nairelys por su compañerismo, apoyo y amistad durante los años compartidos en este maravilloso proceso que iniciamos juntas.

*Ana García*

## TABLA DE CONTENIDO

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b>  | ix          |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>   | x           |
| <b>ÍNDICE DE ESQUEMAS</b>  | xi          |
| <b>RESUMEN</b>   | xii         |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>  | 1           |
| <b>CAPÍTULO I. EL PROBLEMA</b>                                     |             |
| Planteamiento del Problema   | 4           |
| Justificación e Importancia del Problema                           | 7           |
| Objetivos de la Investigación                                      | 9           |
| <i>Objetivo General</i>  | 9           |
| <i>Objetivos Específicos</i>                                       | 9           |
| Alcances y Limitaciones de la Investigación                        | 10          |
| <i>Alcances y de la Investigación</i>                              | 10          |
| <i>Limitaciones de la Investigación</i>                            | 10          |
| <b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO</b>                                  |             |
| Trabajos Previos   | 11          |
| Antecedentes Históricos o Epistemológicos del Género <i>Cassia</i> | 14          |
| Bases Teóricas   | 15          |
| <i>Familia Fabacea</i>   | 15          |
| <i>Género Cassia</i>   | 17          |
| <i>Especie Cassia alata</i>  | 21          |
| <i>Producto Natural</i>  | 25          |
| <i>Estudio Fitoquímico</i>   | 30          |
| <i>Extractos Vegetales</i>   | 34          |
| <i>Métodos de Extracción</i>                                       | 35          |

## TABLA DE CONTENIDO (Continuación)

|  | Pág. |
|--|------|
| <i>Generalidades de las Bacterias</i>  | 37   |
| <i>Actividad Antibacteriana</i>  | 45   |
| <i>Métodos para la Determinación de la Actividad Antibacteriana</i>                                  | 46   |
| Definición Operacional de Términos   | 56   |
| Operacionalización de las Variables  | 58   |
| Hipótesis  | 61   |
| <b>CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO</b>  |      |
| Tipo de Investigación  | 62   |
| Diseño de la Investigación   | 62   |
| Población y Muestra  | 63   |
| Unidad de Investigación  | 63   |
| Selección del Tamaño de la Muestra   | 63   |
| Sistema de Variables   | 64   |
| Instrumento de Recolección   | 65   |
| Procedimientos de la Investigación   | 65   |
| <i>Preparación de los Extractos</i>  | 67   |
| <i>Identificación de Metabolitos Secundarios</i>   | 70   |
| <i>Determinación de la Actividad Antibacteriana por el Método de Difusión en Disco (Kirby-Baüer)</i> | 75   |
| Diseño de Análisis   | 80   |
| <b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b>   |      |
| Resultados   | 81   |
| <i>Análisis Fitoquímico Preliminar</i>   | 81   |
| <i>Evaluación de la Actividad Antibacteriana</i>   | 87   |
| Discusión  | 89   |

**TABLA DE CONTENIDO (Continuación)**

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| <b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> |             |
| Conclusiones                                      | 95          |
| Recomendaciones                                   | 96          |
| <b>BIBLOHEMEROGRAFÍA</b>                          | 97          |
| <b>ANEXOS</b>                                     | 109         |

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE TABLAS

| N° |  | Pág. |
|----|--|------|
| 1  | Clasificación Taxonomía del Género <i>Cassia</i>   | 18   |
| 2  | Operacionalización de la Variable Dependiente: Actividad Antibacteriana del Extracto Etanólico de las Flores de <i>Cassia alata</i> L. | 59   |
| 3  | Operacionalización de la Variable Independiente: Composición Química de los Extractos de las Flores de <i>Cassia alata</i> L.          | 60   |
| 4  | Cepas de Referencia Internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC)  | 76   |
| 5  | Halos de Inhibición de los Controles Positivos Usados Como Referencia en las Cepas Bacterianas   | 77   |
| 6  | Porcentaje de Rendimiento de los Extractos Vegetales de Hexano y Etanol de las Flores de <i>Cassia alata</i> L.                        | 81   |
| 7  | Resultados del Tamizaje Fitoquímico Realizado a los Extractos Obtenidos de las Flores de <i>Cassia alata</i> L.                        | 83   |
| 8  | Reporte de Resultados Ilustrados del Tamizaje Fitoquímico de los Extractos de las Flores de <i>Cassia alata</i> L.                     | 84   |
| 9  | Resultados Obtenidos para la Determinación de la Actividad Antibacteriana de los Extractos de las Hojas de <i>Cassia alata</i> L.      | 87   |

## ÍNDICE DE FIGURAS

| N° |  | Pág. |
|----|--|------|
| 1  | Especies Estudiadas del Género <i>Cassia</i>   | 19   |
| 2  | Algunos Metabolitos Aislados del Género <i>Cassia</i>  | 20   |
| 3  | Otros Metabolitos Secundarios Aislados del Género <i>Cassia</i>  | 21   |
| 4  | Follaje e Inflorescencia de <i>Cassia alata</i>  | 22   |
| 5  | Principales Metabolitos Secundarios Aislados de <i>C. alata</i>  | 23   |
| 6  | Antraquinonas Aisladas de la <i>C. alata</i>   | 24   |
| 7  | Ejemplos de Compuestos Alifáticos  | 26   |
| 8  | Estructura Molecular de Algunos Compuestos Aromáticos  | 27   |
| 9  | Diversidad Estructural de los Terpenos   | 28   |
| 10 | Estructura Química de la Morfina   | 29   |
| 11 | Técnica para la Extracción con Reflujo   | 36   |
| 12 | Equipo de Rotavapor Utilizado para la Destilación al Vacío   | 37   |
| 13 | Pared Celular de las Bacterias grampositivas   | 40   |
| 14 | Pared Celular de las Bacterias gramnegativas   | 41   |
| 15 | Colonias Amarillas de <i>S. aureus</i>   | 42   |
| 16 | Vista desde el Microscopio del <i>Enterococcus faecalis</i>  | 43   |
| 17 | Bacilo de <i>Escherichia coli</i>  | 44   |
| 18 | Bacilos no Flagelados de <i>K. pneumoniae</i>  | 44   |
| 19 | Bacilos Aerobios Flagelados de <i>P. aeruginosa</i>  | 45   |
| 20 | Procedimiento para la Obtención de los Extractos de Hexano y Etanol de las Flores de <i>Cassia alata</i> L.                        | 69   |
| 21 | Reporte de los Resultados Ilustrados de la Actividad Antibacteriana del Extracto de Etanol de las Flores de <i>Cassia alata</i> L. | 88   |

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

| N° |   | Pág. |
|----|---|------|
| 1  | Procedimiento General de la Investigación   | 66   |
| 2  | Procedimiento para Determinar la Actividad Antibacteriana de los Extractos de Hexano y Etanol de las Flores de <i>Cassia alata</i> L. por el Método de Difusión en Agar (Kirby-Baüer) | 74   |

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



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



## ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS DE LAS FLORES DE *Cassia alata* L. EN CEPAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL (ATCC)

### Trabajo de Grado

**Autor (a):**

Ana E. García C.  
C.I. V- 25.628.838

**Tutor (a):**

Prof. Ysbelia M. Obregón D.

### RESUMEN

Los extractos de plantas proveen oportunidades ilimitadas para el desarrollo de nuevas drogas que puedan ser utilizadas para el control microbiano, la especie *Cassia alata* L., es una planta considerada de alto valor debido a sus usos etnomedicinales en múltiples trastornos de salud. El objetivo de esta investigación fue confirmar la relación que existe entre la composición química de los extractos de las flores de *C. alata* y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional (ATCC). La obtención de los extractos de etanol y hexano a partir de las flores secas de la especie *C. alata*, fueron preparados por el método de reflujo en caliente. La composición química de los extractos de las flores se determinó mediante el tamizaje fitoquímico, a través de pruebas químicas de laboratorio cualitativas lográndose identificar en el extracto de hexano triterpenos, esteroides, flavonoides, quinonas y sesquiterpenolactonas, y en el de etanol esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides y sesquiterpenolactonas. Para la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto de etanol se empleó la técnica de difusión en agar (Kirby-Baüer), determinándose que el extracto es activo a una concentración de 1.000 ppm con halos de inhibición para las cepas de *Staphylococcus aureus* de 8 mm, en *Escherichia coli* de 7 mm, *Pseudomonas aeruginosa* de 7 mm y *Klebsiella pneumoniae* no se evidenció crecimiento.

**Palabras clave:** *Cassia alata*, extracto de flores, tamizaje fitoquímico, actividad antibacteriana.

## INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos se acelera con el uso indebido y abusivo de estos, por lo cual se ha convertido en un problema serio y generalizado en los países en desarrollo, tanto en hospitales como en la comunidad, causando una alta mortalidad cada año (Wikaningtyas y Sukandar, 2016). El uso inapropiado de antimicrobianos es el factor más influyente de la resistencia a estos fármacos y la aparición mundial de bacterias resistentes a múltiples medicamentos, que ha limitado cada vez más la efectividad de las drogas actuales causando un fracaso terapéutico significativo (Djeussi, Noumedem, Seukep, Fankam, Voukeng y Tankeo, 2013).

Dicha resistencia reduce la eficacia de los fármacos antibacterianos, por lo que el tratamiento de los pacientes es difícil, costoso o incluso imposible, resultando en una enfermedad prolongada (World Health Organization, 2014). En el siglo XX hubo gran interés por encontrar sustancias dotadas de efecto selectivo en contra de microorganismos, sin que se lesionaran los tejidos orgánicos debido a esto, las nuevas clases de antibióticos se han convertido en una opción popular para reducir la oposición por parte de los microorganismos bacterianos hacia estos. Sin embargo, dicha resistencia es difícil de reducir. La utilización de las hierbas aromáticas tiene sus orígenes en lo más remoto de la historia en la medicina natural cuyas cualidades han sido destacadas a lo largo de los tiempo, siendo una estrategia para evitar la aparición de bacterias fármacorresistentes mediante el uso de agentes terapéuticos alternativos de plantas que sean eficaces, seguros y de bajo costo (Domínguez, 1973; Diastuti, Sya, Juliawaty y Singgih, 2014).

En este mismo orden de ideas, el uso de agentes antimicrobianos de origen natural ha sido estudiado en modelos *in vitro* demostrando que diversos extractos de plantas tienen la capacidad de ejercer un efecto biológico sobre

el crecimiento y/o producción de factores de virulencia de diferentes microorganismos. Es así, que la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana, dentro de la medicina herbolaria tradicional, representa un factor determinante para el tratamiento de las infecciones producidas por bacterias. No obstante, es necesario categorizar este tipo de estudios, porque la actividad antibacteriana de los extractos vegetales puede diferir entre cepas de una misma especie. Adicionalmente, sus propiedades pueden variar en función de los órganos vegetales empleados, los métodos de extracción, las estaciones o periodos de recolecta y las diferentes condiciones fisicoquímicas del terreno (Domínguez, 1973; Martínez, Betancourt, Alonso, y Jauregui, 1996; Jain, Bansal, y Bhasin, 2009).

En general, las plantas y sus constituyentes ocupan una posición importante en el conocimiento de nuevas sustancias y principios activos, en el mundo se han desarrollado numerosas investigaciones enfocadas a la búsqueda de nuevos compuestos con propiedades antibacterianas (Baharudin, Hamid, y Susanti, 2015). Es por ello que la especie *Cassia alata* L. se utiliza como una opción terapéutica, especialmente para tratar infecciones bacterianas, fúngicas, virales y parasitarias por tener la capacidad de impedir la proliferación de microorganismos que pueden provocar infecciones graves o incluso la muerte de los seres humanos (García, 2015; Kumar, Divya, Lavanya, Navya, Apparao, Kumar y Satyanarayana, 2016).

Este proyecto de investigación ha sido sistematizado de la siguiente manera. El *Capítulo I*, denominado El Problema, formado por los siguientes subtítulos: Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El *Capítulo II*, llamado Marco Teórico, en cual se describen los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos o Epistemológico, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las Variables e Hipótesis. El *Capítulo III*, titulado Marco Metodológico, consta de los siguientes

subtítulos: Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Unidad de Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Procedimientos o Metodología de la Investigación y Diseño de Análisis. El *Capítulo IV*, nombrado Resultados y Discusión. El *Capítulo V*, designado Conclusiones y Recomendaciones.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPÍTULO I

### EL PROBLEMA

#### Planteamiento del Problema

El uso excesivo de medicamentos bactericidas y bacteriostáticos es el mayor contribuyente individual a la resistencia microbiana a dichos fármacos y al surgimiento de bacterias con múltiples mecanismos de defensa, limitando y provocando fallas importantes en el tratamiento del paciente. El efecto en personas particularmente susceptibles es más pronunciado, lo que lleva a una enfermedad prolongada y una mayor mortalidad. Una táctica utilizada cada vez más para evitar esto es usar terapias de reemplazo de plantas que sean efectivas contra las bacterias resistentes a los antibióticos, que sean seguras y eficaz (World Health Organization, 2014).

Debido a la ineficacia de muchos fármacos convencionales, la búsqueda de nuevos fármacos de origen natural ha cobrado impulso en los últimos años, por ello la medicina natural de origen vegetal se usa como una opción terapéutica, especialmente para tratar infecciones bacterianas, fúngicas y virales, así como aquellas enfermedades causadas por parásitos (Kumar y cols., 2016). Existen reportes en la literatura que evidencian la gran variedad de géneros que poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas, entre las plantas con tales actividades está *Cassia alata* L. (Okooboh y Gambo, 2013). Las plantas medicinales son ampliamente utilizada en todo el mundo en dos áreas diferentes de gestión de la salud: sistema moderno de

medicina y sistema de medicina tradicional, ya que potencialmente podrían tratar muchas enfermedades modernas (Kumar y cols., 2016).

Hoy en día, la práctica del uso de remedios caseros hechos a base de plantas medicinales, todavía es considerablemente activa dentro de la comunidad, donde se usan para tratar enfermedades conocidas como una alternativa a la medicina moderna. Hay un mayor interés en volver al conocimiento de la medicina tradicional, con la esperanza de descubrir nuevas actividades biológicas dentro de estas plantas; un ejemplo de esto es la especie *C. alata* L., que es considerada de alto valor medicinal debido a sus usos etnomedicinales en múltiples trastornos de salud, que incluyen gastroenteritis, diarrea, estreñimiento e intoxicación alimentaria, anemia de células falciformes, diabetes, hipertensión, hepatitis, enfermedades e infecciones de la piel, ictericia, eccema y tiña, quemaduras, heridas, asma e infección del tracto respiratorio superior (Goh, Basri, Yasin, Taha y Ahmad, 2017).

De acuerdo con los estudios realizados durante el último quinquenio, varios autores han realizado diversas investigaciones en búsqueda de la actividad biológica que poseen las plantas. De esta manera estudios realizados han concluido que el tamizado antimicrobiano dio alguna justificación para el uso de las hojas de *C. alata* en la medicina tradicional debido a la presencia de compuestos bioactivos tales como saponinas, alcaloides, esteroides, taninos, alta presencia de flavonoides, entre otros los cuales confieren actividad biológica para ejercer efectos tales como antibacteriano y antifúngico que permiten la utilización de esta planta como alternativa terapéutica (Carpio y Ambida, 2019). Los resultados también han demostrado que solventes como el hexano y el etanol son buenos disolventes para la extracción de fitoquímicos de las hojas y los tallos de *C. alata*, exhibiendo actividad antibacteriana contra cepas de *Escherichia coli* y *Bacillus*

sp., mostrando en la evaluación un mejor resultado el extracto de hexano de hojas sobre *Pseudomonas aeruginosa* (Vivekanandan y Ajeesh, 2018).

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

¿Cuál es la relación que existe entre la composición química de los extractos de las flores de *C. alata* y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional (ATCC)?

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## **Justificación e Importancia de la Investigación**

Actualmente el problema más importante de salud pública que afecta a la población a nivel mundial, es el incremento de la resistencia antibacteriana debido al uso masivo de los antibióticos durante las últimas décadas está ejerciendo una presión selectiva en el mundo de las bacterias, desencadenando, de modo alarmante resistencias a numerosos antibióticos. Como resultado, tratamientos terapéuticos que en un principio fueron eficaces ahora resultan inocuos en enfermedades infecciosas. Notablemente la consecuencia más grave de la resistencia bacteriana es el compromiso del éxito de dichos tratamiento, obviamente, aquellos pacientes infectados por bacterias resistentes a los fármacos, tienen un mayor riesgo de muerte por la dificultad de dar con un tratamiento eficaz, lo cual eleva a su vez el coste económico al consumir más recursos sanitarios que los pacientes infectados por cepas no resistentes a los antibióticos, lo que ha creado la necesidad de buscar nuevas sustancias que permitan controlar enfermedades asociadas a microorganismos para mejorar la salud de la población (Torrades, 2001; Tomás, 2015).

Las plantas medicinales tienen una gran variedad de metabolitos secundarios, con diferentes propiedades terapéuticas para el tratamiento de infecciones bacterianas y micóticas. En la actualidad se está dando un uso muy importante a dichas plantas por el hecho de que no generen resistencia por parte de las bacterias ya es suficiente para plantearse su empleo regular, estimulan los mecanismos naturales de eliminación, inhiben el crecimiento de los gérmenes patógenos y aumentan las defensas del organismo, mientras que los antibióticos sintéticos suelen bajarlas. Es por ello que la población prefiere consumir cada vez más productos de origen natural de forma de infusiones o ungüentos, principalmente por la falta de indicaciones de los

efectos colaterales que pueden producir los medicamentos sintéticos y por los altos costos de los antibióticos convencionales hoy en día (Domínguez, 2002).

Los estudios fitoquímicos realizados a la especie *Cassia alata* L., han revelado la presencia de ciertos metabolitos secundarios con propiedades bioactivas como las saponinas que poseen actividad antiinflamatoria y antibacteriana, los compuestos fenólicos siendo buenos antioxidantes, las antraquinonas con propiedades purgantes y flavonoides cuyas propiedades antitumorales, antibacteriales y antifúngicas son ampliamente conocidas, las cuales pueden ser de gran utilidad en la medicina alternativa para el tratamiento de muchas enfermedades (Okooboh y Gambo, 2013). Debido a las variadas estrategias de defensa de las plantas que les confieren propiedades biológicas les permiten desarrollar diferentes actividades que les posibilita eliminar patógenos (Croteau, Kutchan y Lewis, 2000). Por esta razón, muchas especies del reino Plantae han sido consideradas importantes en la medicina de hoy en día que representan una potencialidad que motivó la realización de esta investigación.

## Objetivos de la Investigación

### Objetivo General

- Confirmar la relación entre la composición química de los extractos de las flores de *Cassia alata* L. y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional (ATCC).

### Objetivos Específicos

- Obtener los extractos de hexano y etanol de las flores de *Cassia alata* L., mediante la técnica de reflujo en caliente.
- Identificar cualitativamente la composición química de los extractos de las flores de *C. alata* L., por medio de pruebas químicas preliminares.
- Comprobar la actividad antibacteriana del extracto de etanol de *C. alata* L. en cepas de referencia internacional ATCC, utilizando la técnica de difusión del disco en agar (Kirby-Baüer).

## **Alcances y Limitaciones de la Investigación**

### **Alcances de la Investigación**

La presente investigación tiene como alcance aportar nuevos datos relacionados con la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de las flores de *Cassia alata*, así como también, confirmar que dicha actividad esté relacionada con la composición química de los extractos. Además pretende ampliar los conocimientos de la autora en cuanto al tema de estudio.

### **Limitaciones de la Investigación**

Durante el desarrollo de este trabajo de investigación las limitaciones técnicas están relacionadas con la escasez del material y altos costos de reactivos para elaborar la parte experimental de dicha investigación, aunado a esto, se presentaron fallas en cuanto al servicio eléctrico, agua, gas e internet durante la realización del mismo, así como también, la dificultad para encontrar trabajos previos sobre dicho tema de investigación.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Trabajos previos

Mahdi, Zamzani y Nashihah (2022). Realizaron un trabajo de investigación titulado: Actividad antibacteriana del extracto de etanol de los tallos de *Cassia alata* contra *Staphylococcus aureus*. Para la elaboración de los extractos se recolectaron tallos de la planta los cuales fueron clasificados, lavados, cortados y secados para su posterior utilización, la extracción se llevó a cabo mediante el método de extracción asistida por ultrasonido (UAE), el polvo de *C. alata* se mezcló con etanol al 96 % en una proporción de 4:1, posteriormente se determinó la presencia de metabolitos secundarios tales como saponinas, flavonoides, taninos y alcaloides. En las pruebas microbiológicas realizadas para evaluar la actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión del disco en agar, los resultados obtenidos de los halos de inhibición del extracto contra cepas de *S. aureus* a concentraciones de 25 %, 50 % y 75 % fueron de 17,6 mm, 21 mm y 22,6 mm respectivamente con el mayor halo de inhibición a 100 % de concentración a 25 mm, concluyendo que el extracto preparados de los tallos de esta planta tiene un fuerte efecto inhibitorio sobre la cepa bacteriana ensayada.

Fotso, Tcho, Tekapi, Ndjakou, Nguéfeu, Duplex y Toze (2021). Realizaron un trabajo de investigación llamado: Constituyentes químicos y actividades antimicrobianas de algunos compuestos aislados de la especie camerunesa de *Cassia alata*. La caracterización fitoquímica a partir de los

extractos de metanol crudos de las hojas y tallos se obtuvieron diversos compuestos mediante una cromatografía en gel de sílice y sus estructuras se elucidaron por medio de la técnica de resonancia magnética nuclear identificando los siguientes metabolitos secundarios: triterpenos, esteroides, flavonoides y antraquinonas que tienen importancia antiinfecciosa. En el presente trabajo se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* utilizando el método de microdilución en caldo frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, cepas aisladas intrahospitalarias como *Salmonella typhi* y *Enterobacter cloacae*. Los resultados demuestran que los extractos de los tallos presentan una fuerte actividad en casi todas las cepas utilizadas con valor de CIM que variaron de 15,6 a 62,5 µg/mL mientras que los extractos de las hojas presentaron actividad antibacteriana en la mayoría de los microorganismos probados con una fuerte actividad exhibida en *Pseudomonas aeruginosa* con un CIM de 7,8 µg/mL. Los resultados obtenidos en esta investigación son importantes para la realización de la propuesta del presente trabajo.

Oladeji, Adelowo, Oluyori y Bankole (2020). Realizaron un trabajo de investigación denominado: Descripción etnobotánica y actividades biológicas de *Cassia alata* en diferentes partes de la planta. Las evaluaciones fitoquímicas a partir de la técnica de cromatografía líquida al vacío, revelaron que existe una variación en algunos metabolitos investigados debido a factores geográficos y climáticos. Los metabolitos secundarios presentes en *C. alata* contribuyeron a la pronunciada cicatrización de heridas y actividades antibacterianas. Los potenciales antibacterianos de las hierbas medicinales se evaluaron por el método de dilución en caldo, determinándose la zona de inhibición (ZOI) o la concentración inhibitoria mínima (CIM). El potencial antibacteriano *in vivo* de los extractos de metanol de las hojas, tallos y flores de *C. alata* se evaluaron a una concentración de 512 mg/mL frente a diferentes cepas bacterianas. Los glucósidos de antraquinona y flavonoides detectados

en extractos del arbusto inhibieron significativamente el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con ZOI entre 9,7 y 14,8 mm. Los compuestos aislados obtenidos a partir de fracciones purificadas del extracto de flor de *C. alata* (glucósidos de antraquinona, esteroides, taninos y aceites volátiles) se evaluaron en aislados bacterianos seleccionados. Se mostraron fuertes actividades inhibitorias a CIM de 500 mg/mL contra los aislados clínicos de *S. faecalis*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *Pseudomonas putida* a 500 mg/mL se observó un ZOI de 10 a 25 mm. Por otra parte los extractos de metanol de *C. alata* se evaluaron contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* (grampositivo), *Shigella boydii*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aureus*, *Vibrio mimicus*, *Salmonella paratyphi*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Salmonella typhi* (gramnegativas) mediante el ensayo de difusión en disco. Las fracciones exhibieron actividades inhibitorias significativas contra bacterias aisladas a 100 µg/mL. Los investigadores del presente trabajo revelaron resultados y datos de interés que han motivado la realización de este manuscrito.

Carpio y Ambida (2019), realizaron un trabajo de investigación que se tituló: Actividad antibacteriana de los extractos crudos de las raíces y la corteza de *Cassia alata* Linn. Para la elaboración de los extractos vegetales se trituraron 250 g de raíces y 300 g de corteza a partir de las muestras frescas las cuales fueron recolectadas en Filipinas. La determinación de dicha actividad se realizó frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante el método de difusión del disco en agar. Los resultados revelan que los preparados crudos de la planta tuvieron actividad antibacteriana contra los organismos de prueba según lo indicado por los halos de inhibición alrededor de los discos de papel de filtro. El extracto crudo de la raíz de *C. alata* tuvo un halo de inhibición de 9,3 mm en *S. aureus* y 6,3 mm para *E. coli*., por su parte el obtenido a partir de la corteza fue más efectivo que los de raíz, ya que los primeros tenían una zona de inhibición de 7,3 mm en *S. aureus*

y 12,3 mm *E. coli* en adelante. El análisis estadístico de los resultados muestra una diferencia significativa en las actividades de las muestras crudas de las raíces, la de corteza y los antibióticos comerciales. Esto implica que los extractos no son comparables en su efecto sobre los organismos de prueba con el fármaco antibacteriano comercial. Este trabajo es de gran importancia, pues de los resultados obtenidos del mismo surge la proposición de investigación del proyecto a elaborar.

### **Antecedentes Históricos o Epistemológico**

El género *Cassia* fue descrito por primera vez en el año 1753 por el médico y botánico escocés William Roxburgh y publicado en *Flora indica; or, descriptions of Indian Plants* 2: 349. En el año 1762, también fue descrito por el científico y botánico sueco Carlos Linneo y publicado en *Species Plantarum* 1: 376. (Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). El Códice Florentino, en el siglo XVI menciona sobre la planta *Cassia*: “que las hojas y las raíces molidas en agua son de utilidad para los apostemas también conocidas como aftas bucales”. En el mismo siglo, Francisco Hernández comenta “que el machacado y untado de las hojas de este género son utilizadas en la cura de las dermatitis”. Para el siglo XX, Maximino Martínez la reporta como anticrotálico, antipirético, antisifilítico, catártico, contra dermatosis, diaforético, diurético y para curar enfermedades venéreas (Bravo, 1977; Otto, Ameso y Onegi, 2014).

Los primeros trabajos importantes sobre este género fue realizado por Colladon, quién en 1816 publicó en “*Histoire Médicale et Systématique des Casses*”, en el cual hizo gran énfasis en la utilización farmacéutica de la esta especie. En 1837, doce años más tarde Vogel, efectúa un trabajo sobre este género al realizar el estudio de las Leguminosas del Brasil, en él enumera 278

especies, de las cuales sería confirmada posteriormente 200 de ellas (Bravo, 1977).

En el año 1871, George Bentham hace una revisión del género, donde pudo identificar y describir 338 especies. Posterior a la revisión del género realizada por Bentham y hasta nuestros días, se han publicado innumerables trabajos sobre estudios taxonómicos, químicos, anatómicos y morfológicos de esta planta en distintos países (Bravo, 1977).

## **Bases Teóricas**

### **Familia Fabaceae**

La familia Fabaceae Lindl. (Leguminosae Juss.), para muchos científicos es una familia con abundantes e importantes especies. Es la tercera familia más grande de las angiospermas después de Orchidaceae y Asteraceae, y la segunda después de las Poaceae (gramíneas) en términos de importancia agrícola y económica; taxonómicamente la familia Fabaceae pertenece al reino Plantae, se divide en 3 subfamilias: Faboideae Rudd (o Papilionoideae Juss.), Caesalpinioideae DC y Mimosoideae DC (Rodríguez y Gámez, 2010). Esta familia también conocida como Leguminosae, término que fue propuesto por Jussieu en el año 1789, en el que se incluyen todos los géneros de leguminosas y se diferencian los distintos tipos de flores (Llamas y Acedo, 2016).

Presentan una amplia distribución en el mundo, donde se han reportado 730 géneros y 19400 especies, representando el 9,4 % de las eucotiledóneas y se ha estimado que aproximadamente el 16 % de las plantas leñosas de los bosques lluviosos neotropicales pertenecen a esta familia. En Venezuela, esta familia comprende alrededor de 151 géneros y 993 especies, incluyendo 9 endémicas, ampliamente distribuidas en todas las zonas de vida, siendo la

más abundante la Faboideae con 489 especies, seguida por las Caesalpionioideae y Mimosoideae con 278 y 229 especies respectivamente (Rodríguez y Gámez, 2010; Llamas y Acedo, 2016).

Esta familia muestra una gran variedad de hábitos, desde hierbas (algunas acuáticas), bejucos, hasta árboles gigantes y se pueden encontrar en diferentes zonas de vida, van desde bosques secos tropófilos hasta de tipo pluvial. Se reconoce fácilmente, por su fruto en legumbre, también por poseer hojas alternas, compuestas, con estípulas, generalmente pulvinuladas y flores llamativas (Rodríguez y Gámez, 2010). Además, poseen granos de polen que se caracterizan por ser tricolporados, exina gruesa, semitectada y reticulada (Mercado, Jiménez y Sánchez, 2011). En cuanto a los componentes químicos presentes en dicha familia, esta es rica en metabolitos secundarios y propiedades organolépticas, como terpenoides, alcaloides y taninos, de reconocido aroma y sabor (Morales y Ladio, 2008).

Dentro de los usos y aplicación en la medicina tradicional para los que se emplean las especies pertenecientes a la familia Fabaceae se encuentran como los más frecuentes en los tratamientos asociados a enfermedades del sistema gastrointestinal y sistema respiratorio, así como para otras afecciones como manchas en la piel, fiebre, dolor de cabeza, entre otros (Zambrano, Buenaño, Mancera y Jiménez, 2015). Posee propiedades farmacológicas como astringentes, hipoglicemiantes, diuréticas, antiasmático, antisépticas, entre otros (Del Vitto, Petenatti y Petenatti, 1997).

Desde el punto de vista sistemático y nomenclatura tiene gran interés, existen otros criterios biológicos que le dan aún mayor importancia al estudio de las leguminosas venezolanas. A pesar de ello, en el ámbito regional o local, como ocurre en la ciudad de Mérida, es poco el material o información botánica, y escasos los estudios sobre la identificación de especies de dicha familia. En la ciudad de Mérida existen especies arbóreas de singular importancia económica y ornamental, siendo estas bastante comunes en

parques, avenidas, plazas y áreas boscosas encontradas del casco urbano. Se reportan 42 especies, distribuidas en 25 géneros y tres subfamilias, siendo la mejor representada la Mimosoideae con 17 especies de la familia Fabaceae, seguida de la subfamilia Faboideae con 13 especies y la Caesalpinioideae con 12 especies presentes en la ciudad de Mérida (Rodríguez y Gámez, 2010).

Los géneros más estudiados en Venezuela y el mundo pertenecientes a esta familia son *Astragalus* y *Ormosia* de la subfamilia Faboideae, seguidas de *Cassia* y *Caesalpinia* que se encuentran dentro de la subfamilia Caesalpionioideae, por últimos las especies de los géneros de *Acacia* y *Mimosa* de las subfamilia Mimosoideae (Castañeda, Gutiérrez, Carrillo y Sotelo, 2017; Llamas y Acedo, 2016).

### **Género *Cassia***

Es un género cosmopolita, con aproximadamente 1396 especies descritas, la mayoría en América, otras en África tropical, Madagascar, Sur de Asia y Australia, muchas de ellas crecen cerca de los trópicos pero ocupan también regiones cálidas, excepcionalmente habitan zonas frías, algunas por su excelente floración son cultivadas como ornamentales, otras son medicinales debido a la presencia de glicósidos cianogénicos, alcaloides y glicósidos antraquinónicos (Bianco y Kraus, 1997).

Este comprende alrededor de mil especies de árboles, arbustos y plantas herbáceas de hojas paripinnadas y flores zigomorfas, solitarias o dispuestas en racimos simples o compuestos, poseen 5 pétalos, por lo general de color amarillo y a menudo unguiculado. El fruto es una legumbre dehiscente o indehiscente, de forma y tamaño variable (Sánchez, 2003). La clasificación taxonómicamente de este género se encuentra descrita en la Tabla 1.

| <b>Tabla 1. Clasificación Taxonomía del Género <i>Cassia</i></b> |                        |
|--|------------------------|
| Reino:   | Plantae                |
| Clase:   | Equisetopsida C. Agard |
| Subclase:  | Magnoliidae            |
| Orden:   | Fabales                |
| Familia:   | Fabaceae               |
| Género:  | <i>Cassia</i> L.       |
| Sinonimia:   | <i>Senna</i> L.        |

Tomado y modificado de trópicos.org

Las especies pertenecientes a este género se emplean como ornamentales y enormemente en el sistema medicinal tradicional para el tratamiento de muchas enfermedades tales como *Cassia fistula* **(a)**, *Cassia occidentalis* **(b)**, *Cassia tora* **(c)** y *Cassia auriculata* **(d)** (Figura 1). En la historia de la medicina popular, estas plantas se utilizan como laxante y purgante (Deshpande y Bhalsing, 2013; Hennebelle, Weniger, Joseph, Sahpaz y Bailleul, 2009), para curar dolores de cabeza y fiebre (Singh, Singh y Yadav, 2013), también son usadas para tratar heridas, infecciones en la piel como eccema, sarna y tiña, ictericia, anorexia, reumatismo y problemas gastrointestinales (Khurm, Wang, Zhang, Nawaz, Naeem, Hayat, Saqib, Zhang, Zhan y Guo, 2020). Además de reportar múltiples acciones biológicas y farmacológicas importantes tales como antiinflamatoria, hipoglucemiante y antimutagénico (Somchit, Reezal, Nur y Mutalib, 2003), antitumoral (Prasanna, Harish, Pichal, Sakthisekaran y Gunasekaran, 2009), antiplasmodial (Iwalewa, Oguntoye, Rai y Iyaniwura, 1997), antioxidante (Yen y Chuang, 2000) y antibacteriana y antifúngica (Khurm y cols., 2020).

**Figura 1.** Especies Estudiadas del Género *Cassia*



*Cassia fistula* (a)



*Cassia occidentalis* (b)



*Cassia tora* (c)



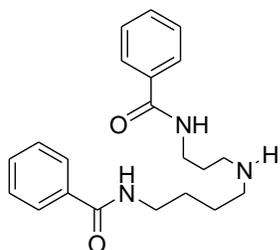
*Cassia auriculata* (d)

Tomado y modificado de <https://es.dreamstime.com/cassia-es-un-g%C3%A9nero-de-plantas-florecientes-en-la-familia-las-leguminosas-fabaceae-especies>

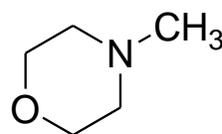
Del cribado fitoquímico de los diferentes extractos de las hojas, flores, tallos y raíces de las plantas del género *Cassia* se han aislado e identificado metabolitos secundarios pertenecientes a los alcaloides tales como  $n^1, n^8$ -dibenzoilespermidina **(1)** y *N*-metil-morfolina **(2)**, varias antraquinonas como

emodina **(3)** y obtusina **(4)** y derivados de los flavonoides luteolina **(5)** y naringenina **(6)** (Figura 1) (Khurm et al; 2020).

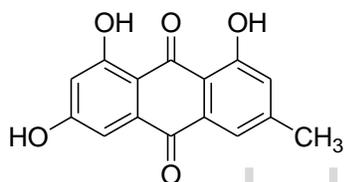
**Figura 2.** Algunos Metabolitos Aislados del Género *Cassia*



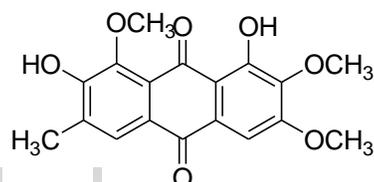
*n*<sup>1</sup>,*n*<sup>8</sup>-dibenzoispermidina **(1)**



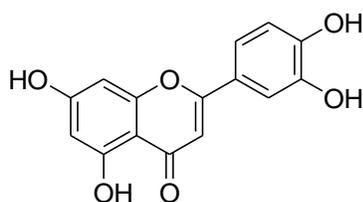
*n*-metil-morfolina **(2)**



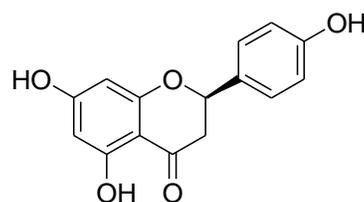
Emodina **(3)**



Obtusina **(4)**



Luteolina **(5)**

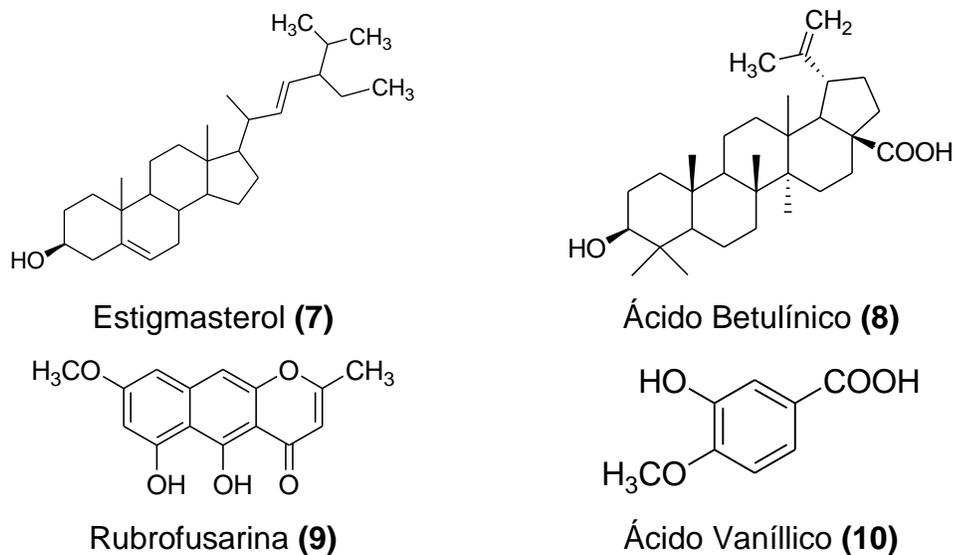


Naringenina **(6)**

Tomado y modificado de Khurm y cols.,2020

También se han aislados fitoesteroles como estigmasterol **(7)**, triterpenos pentacíclicos como el ácido betulínico **(8)**, rubrofusarina **(9)** perteneciente a  $\gamma$ -naftopironas y ácido vanílico **(10)** derivado del ácido benzoico (Figura 3) (Khurm y cols., 2020).

**Figura 3.** Otros Metabolitos Secundarios Aislados del Género *Cassia*



Tomado y modificado de Khurm y cols., 2020

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve) **Especie *Cassia alata* L.**

Es originaria de México, se puede encontrar en diversos hábitats, en los trópicos crecen hasta una altitud de 1.200 metros en Brasil, Colombia, Guyana, Guayana Francesa, Surinam y Venezuela, donde crece preferentemente sobre las riberas de los ríos y de los lagos, comúnmente conocida como guacamaya francesa, mucoteno o mocote. Es un arbusto perenne, que crece rápidamente a pleno sol en una amplia gama de suelos desde una altura de 3 m hasta 4,5 m con tallos rectos de madera. Las hojas son grandes, bilaterales, simétricas opuestas y pliegues juntos en la noche. Las inflorescencias son racimos terminales erectos, largos 2-5 cm, con numerosas flores cercanas entre sí, de color amarillo brillante de cerca 3 cm de diámetro (Figura 4). La fruta es una vaina con una concha marrón leñosa de unos 12 cm de largo y difícil de tocar (Okooboh y Nanbol, 2013).

**Figura 4.** Follajes e Inflorescencias de *Cassia alata*



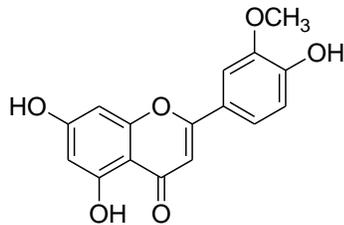
Tomado y modificado de

<https://www.monaconatureencyclopedia.com/senna-alata/?lang=es>.

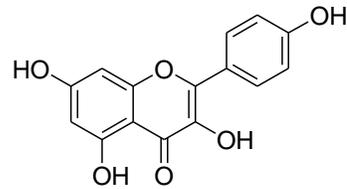
De los extractos de las hojas de esta especie han reportados diversas propiedades farmacológicas, tales como actividades antimicrobianas y antifúngicas (Crockett, Guede-Guina, Pugh, Vangah-Manda, Robinson, Olubadewo y Ochillao, 1992; Ibrahim y Osman, 1995; Khan, Kihira y Omoloso, 2001; Villasenor, Canlas, Pascua, Sabando y Soliven, 2002; Somchit, Reezal, Elysha y Mutalib, 2003), antiséptico (Esimone, Nworu, Ekong y Okereke, 2008), antiinflamatorio y analgésico (Palanichamy y Nagarajan, 1990), y antihiperglucémico (Palanichamy, Nagarajan y Devasagayam, 1988). También ha mostrado actividades terapéuticas (Damodaran y Venkataraman, 1994) y antienvjecimiento (Pauly, Danoux y Contet, 2002). Esta planta presenta dentro de sus principales metabolitos secundarios varios flavonoides como crisoeriol (**11**), kaempferol (**12**), quercetina (**13**), 5,7,4'-trihidroflavanona (**14**), kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido (**15**), algunos hidrocarburos saturados como tetratriacontano (**16**), *n*-dotriacontanol (**17**), *n*-triacontanol (**18**), además

de los ácidos palmítico **(19)** esteárico **(20)** (Figura 5) (Gupta y Singh,1991; Liu, Xu, Zou y Yang, 2009).

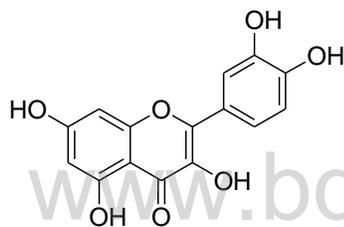
**Figura 5.** Principales Metabolitos Secundarios Aislados de *C. alata*



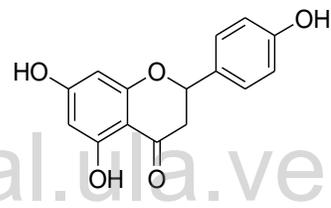
**Crisoeriol (11)**



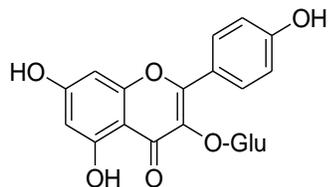
**Kaempferol (12)**



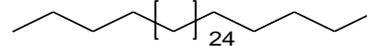
**Quercetina (13)**



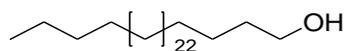
**5,7,4'-trihidroflavanona (14)**



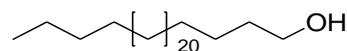
**Kaempferol-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido (15)**



**Tetratriacontano (16)**



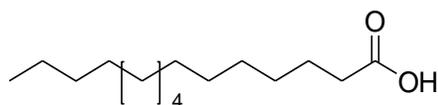
***n*-dotriacontanol (17)**



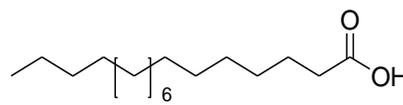
***n*-triacontanol (18)**

Tomado y modificado de Ogunwande y cols., 2010

**Figura 5.** Principales Metabolitos Secundarios Aislados de *C. alata*  
(Continuación)



Ácido Palmítico **(19)**

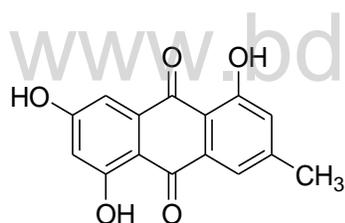


Ácido Estearico **(20)**

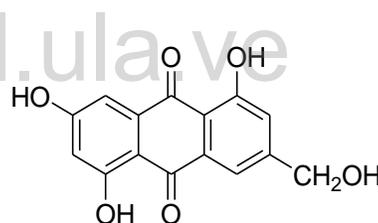
Tomado y modificado de Ogunwande y cols., 2010

También se han aislado las siguientes antraquinonas: alatinona **(21)**, alatinol **(22)** y alquinona **(23)** (Figura 6) (Hemlata y Kalidhar, 1993; Hemlata y Kalidhar, 1994; Yadav y Kalidhar, 1994).

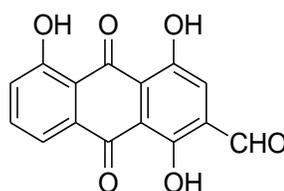
**Figura 6.** Antraquinonas Aisladas de *C. alata*



Alatinona **(21)**



Alatinol **(22)**



Alquinona **(23)**

Tomado y modificado de Ogunwande y cols., 2010

## **Producto Natural**

Los seres vivos son capaces de sintetizar una gran variedad de compuestos que se define como “producto natural” o “metabolito secundario”, que se usa como sinónimo, aquél que es propio de una especie, se le conoce también como producto químico y en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza, a diferencia de los metabolitos primarios o productos bioquímicos que presentan una utilidad definida y que son comunes a todos los seres vivos: carbohidratos, lípidos, proteínas, entre otros (Marcano y Hasegawa, 2002).

### ***Metabolitos Secundarios***

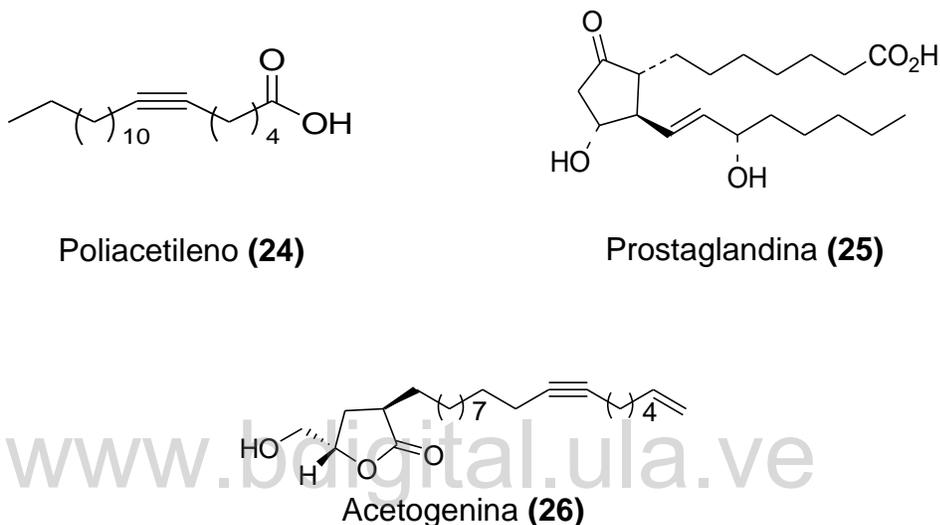
Las plantas, al igual que los animales, las algas, los hongos y las bacterias, realizan funciones fisiológicas en las que están implicadas rutas metabólicas tales como la respiración y síntesis de proteínas. Sin embargo, las plantas son poseedoras casi exclusivas de otras rutas metabólicas por las que sintetizan una gama extremadamente amplia de sustancias llamadas metabolitos secundarios (Ávalos y Pérez, 2009). Los metabolitos secundarios se agrupan en 4 clases principales:

- ***Compuestos Alifáticos***

En la naturaleza son muy frecuentes y se presentan tanto en animales como vegetales, sus estructuras son más sencillas que la mayoría de los metabolitos secundarios. Pueden agruparse en: ácidos grasos y sus derivados, poliacetileno **(24)**, prostaglandinas **(25)** y sus análogos, acetogeninas alifáticas **(26)** y otros compuestos (Figura 7). Presentan en su

mayoría, estructuras acíclicas poco ramificadas, las cuales se forman por condensaciones sucesivas de unidades de acetato-malonato (Marcano y Hasegawa, 2002).

**Figura 7.** Ejemplos de Compuestos Alifáticos



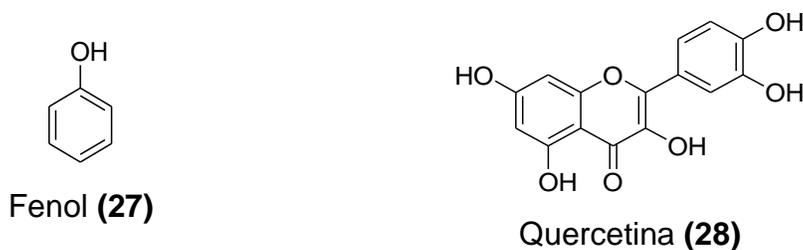
Tomado y modificado de Marcano y Hasegawa, 2002

- **Compuestos Aromáticos**

Los compuestos aromáticos naturales incluyen derivados simples de benceno, anillos bencénicos condensados, monómeros, dímeros o polímeros de alto peso molecular, como lo son las ligninas y taninos, que se encuentran prácticamente en todas las plantas superiores y por ello se les considera productos universales. Generalmente presentan grupos funcionales oxigenados que en la mayoría de los casos son fenoles (27) (Figura 8) y por lo que se les conoce con el nombre genérico de compuestos fenólicos. Esta expresión engloba una amplia gama de estructuras de las cuales los flavonoides y sus derivados son los más abundantes, entre los compuestos de

bajo peso molecular como por ejemplo la quercetina **(28)** (Figura 8). Algunos poseen cadenas alifáticas de origen terpénico o policétido, frecuentemente se encuentran asociados con azúcares y están presentes tanto en el reino vegetal como en el animal (Marcano y Hasegawa, 2002).

**Figura 8.** Estructura Molecular de Algunos Compuestos Aromáticos

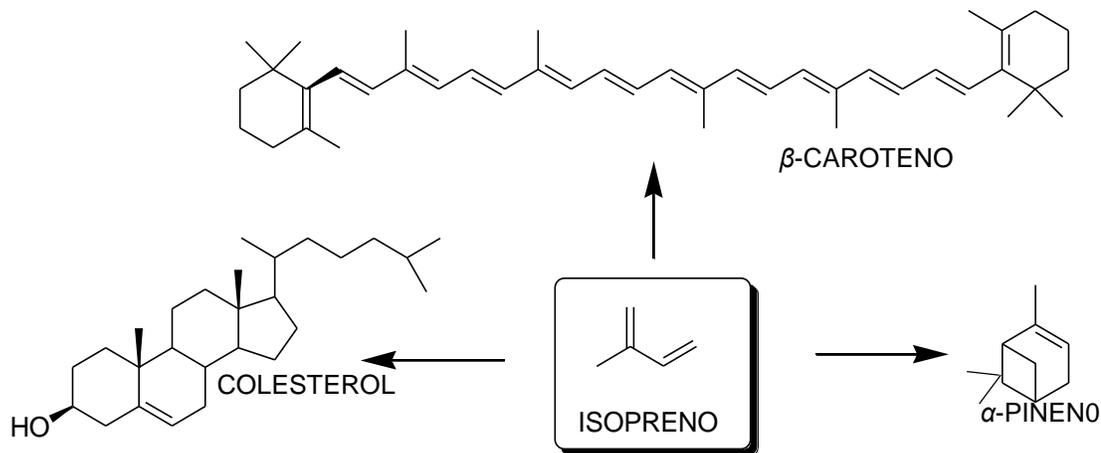


Tomado y modificado de Marcano y Hasegawa, 2002

• **Terpenos**

La gran diversidad estructural de los terpenos (Figura 9) dificulta el resumen de las características comunes de estos compuestos, pues no solo se trata de la variedad en los grupos funcionales, sino además del número de átomos de carbono que conforman el esqueleto. Entre los primeros, los oxigenados ocupan un lugar prioritario (alcoholes, ésteres, éteres, ácidos carboxílicos, aldehídos, cetonas, cetales, entre otros) y le siguen funciones con azufre, halógenos (principalmente encontrados en compuestos de origen marino) y nitrógeno, en cuyo caso la molécula se clasifica como alcaloide. Los terpenos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal, su frecuencia y abundancia están íntimamente ligados a factores genéticos y climáticos (Marcano y Hasegawa, 2002).

**Figura 9.** Diversidad Estructural de los Terpenos

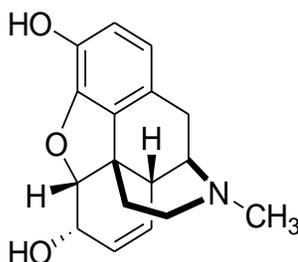


Tomado y modificado de Marcano y Hasegawa, 2002

- **Alcaloides**

Son bases orgánicas que se aíslan principalmente de las plantas superiores y se han encontrado en más de 100 familias de Fanerógamas, en menor proporción en Criptógamas (licopodios), microorganismos (ergot) y animales (peces y sapos). Su actividad fisiológica, principalmente a nivel del sistema nervioso. Algunos se han manifestado como altamente tóxicos, y otros en dosis apropiadas son drogas comúnmente usadas en medicina, por ejemplo, la morfina (Figura 10). Estos compuestos son casi siempre incoloros (berberina es amarillo y sanguinaria es rojo), sólidos cristalinos (los alcaloides de tabaco son líquidos), ópticamente activos, generalmente levorrotatorios (cinconina y laudanosina son dextrorrotatorios) y el nitrógeno, caso siempre forma parte de uno o varios ciclos. La variedad estructural es muy grande, tanto en su esqueleto carbonado como en el tipo y número de sustituyentes (Marcano y Hasegawa, 2002).

**Figura 10.** Estructura Química de la Morfina



Tomado y modificado de Marcano y Hasegawa, 2002

### ***Plantas Medicinales***

Las condiciones que defienden el uso de las plantas medicinales y sus extractos o derivados en terapéutica, pueden afianzarse en las siguientes premisas: trabajan en la reactivación de funciones o procesos orgánicos alterados, estimulan las defensas de los organismos, no los reemplazan ni las fuerzan a actuar, ajustan el flujo armónico de la energía vital, refuerzan el funcionamiento óptico de órganos y tejidos en funciones nutritivas, regenerativas, pueden contribuir a la remineralización, en los casos necesarios, eliminan toxinas o sustancias indeseables (depuración y limpieza) favoreciendo la circulación sanguínea, son útiles en terapias de prevención, de conservación y regeneración, ya como terapia de primer orden, o como medicación auxiliar o complementaria de otras, por lo general, no causan reacciones alérgicas, de acumulación o de habituación (Albornoz, 1992).

### ***Modalidades de Uso de las Plantas Medicinales***

a) Directamente como yerbas, en su forma natural, para tratar síntomas específicos (indigestión, dolor de cabeza, fiebre, tos, entre otros). La manera

de administrarlas es como: infusiones, decocciones, cataplasmas, compresas, emplastos, baños (Albornoz, 1992).

b) Como droga cruda mejorada, preparadas en formas de extractos fluidos, extractos blandos, tinturas, jarabes, vinos, polvos, lociones, capsulas, etc. Son elaboradas con fines directos e inmediatos, de utilidad social y requiere de una tecnología menor, manejada por farmacéuticos o especialistas expertos (Albornoz, 1992).

Aquí, las sustancias contenidas en una o más drogas crudas, se asocian por sinergización para producir un efecto terapéutico determinado, suave, confiable y nula toxicidad (Albornoz, 1992).

c) Industrializadas por una alta tecnología farmacéutica. Así se logran aislar sustancias de alta potencia farmacológicas, moléculas puras de una estructura química conocidas que ejercen acciones definidas y mensurables sobre las células del organismo (Albornoz, 1992).

Generalmente dados los costos elevados de siembra, recolección y procesamiento de las plantas medicinales, la industria procede a estudiar las técnicas conducentes a la síntesis química de las moléculas aisladas con fines de comercialización (Albornoz, 1992).

### **Estudio Fitoquímico**

La fitoquímica comprende el estudio de los metabolitos secundarios de origen vegetal y la metodología que se sigue depende de los objetivos de tales estudios. Sin embargo, existen etapas comunes, que no necesariamente ocurren al mismo tiempo, las cuales son, la selección del material que depende del interés particular que se tenga de determinado compuesto químico, si posee cierta actividad biológica o de una determinada familia o género de alguna planta; pruebas de la actividad biológica que se refiere al efecto que ejerce la muestra botánica sobre los seres vivos; examen químico de la

muestra que pueden ser pruebas químicas de campo o de laboratorio y por último la parte de material que se analizara, generalmente las plantas herbáceas se utilizan en su totalidad (Marcano y Hasegawa, 2002).

### ***Tamizaje Fitoquímico***

El tamizaje fitoquímico permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de ahí, orientar la extracción o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Este tamizaje consiste en la extracción de las sustancias provenientes del metabolismo secundario con solventes apropiados, la aplicación de reacciones de color y precipitación (Sharapin, 2000). Dentro de las principales pruebas químicas para la identificación de metabolitos secundarios tenemos:

- **Ensayo de Dragendorff, Mayer y Wagner:** permite identificar la presencia de alcaloides, con la solución acuosa ácida del extracto se realiza el ensayo, agregando 3 gotas del reactivo de Dragendorff. Se considera (+) cuando se presenta opalescencia, (++) cuando presenta turbidez definida y (+++) cuando presenta precipitado. Para el ensayo con Mayer y Wagner se añade 2 o 3 gotas de la solución reactiva respectivamente, si se observa opalescencia, turbidez definida, precipitado coposo, entonces se considera positiva la presencia de este tipo de metabolito. En el caso de alcaloides cuaternarios y/o aminoácidos libres, estos sólo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia debe observarse la aparición de turbidez definida o precipitado coposo en todos los casos, ya que la aparición de opalescencia puede dar un resultado falso, pues puede provenir de una

extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias (Pereira, Vega, Almeida y Morales, 2009).

- **Ensayo de Liebermann–Burchard:** se utiliza para identificar triterpenos y esteroides debido a que ambos tipos de productos poseen un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6. Un ensayo positivo se reconoce por un cambio rápido de coloración: rosado-azul, verde intenso o verde oscuro-negro; muy pocas veces se puede observar el primer cambio, el tercer cambio generalmente se observa cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos (Rivas, Oranday y Verde, 2016).
- **Ensayo del Cloruro Férrico:** esta permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos en un extracto vegetal, el cloruro de hierro (III) como catalizador de reacciones de alquilación de benceno, siendo este una prueba colorimétrica tradicional para fenoles, que usa una disolución al 1 % de cloruro de hierro (III) que ha sido neutralizada con hidróxido sódico hasta que se forme un leve precipitado de  $\text{FeO}(\text{OH})$ . Un ensayo positivo da la siguiente información general: 1) desarrollo de una coloración rojo-vino: compuestos fenólicos en general, 2) desarrollo de una coloración verde intensa: taninos del tipo pirocatecólicos y 3) desarrollo de una coloración azul: taninos del tipo pirogalotánicos (Coy, Parra y Cuca, 2014).
- **Ensayo de Espuma:** permite reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénicas, el ensayo se considera positivo al aparecer una espuma en la superficie del líquido de más de

2 mm de espesor que persistió por más de 2 min (Pereira, Vega, Almeida y Morales, 2009).

- **Ensayo de la Gelatina:** los taninos tienen la propiedad de unirse a las proteínas y precipitarlas, es por ello que este ensayo es el más utilizado para reconocer la presencia de los mismos, la formación de un precipitado blanco indica la positividad (Carvajal, Uribe, Sierra y Rueda, 2009).
- **Ensayo de Shinoda:** permite reconocer la presencia de flavonoides, los cuales son compuesto polifenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en plantas. El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos (Marcano y Hasewaga, 2002).
- **Ensayo con Hidróxido de Amonio:** las cumarinas son compuestos derivados de la  $\alpha$ -benzopirona. Dado que en su estructura presentan un gran número de instauraciones, estos compuestos exhiben una fuerte fluorescencia azul o verde al ser irradiados con luz ultravioleta, propiedad que se aprovecha para su detección al adicionar hidróxido de amonio concentrado, observándose una fluorescencia características de estas al ser llevada la muestra a la cámara de luz ultravioleta (Carvajal, Uribe, Sierra y Rueda, 2009).
- **Ensayo con Hidróxido de Amonio:** las antraquinonas, son quinonas tricíclicas derivadas del antraceno, para su determinación se emplean soluciones de hidróxido de amonio concentrado siendo esta prueba positiva al evidenciarse una coloración que va del rosado al rojo intenso,

dependiendo de la concentración de estos compuestos en la muestra en los dos primeros minutos (Carvajal, Uribe, Sierra y Rueda, 2009).

- **Ensayo con Ácido Sulfúrico:** permite la identificación de quinonas, ya que estas tienden a dar colores rojos o púrpuras con álcalis concentrados y con ácido sulfúrico, por lo que se usa para identificarlas ácido sulfúrico concentrado, reaccionando al agregar gotas de este compuesto a pequeñas cantidades del extracto etanólico en estudio (Verde, García y Rivas, 2016).
- **Ensayo de Baljet:** permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas, aunque hay otros compuestos lactónicos que pueden dar también positivo en este ensayo. La presencia de esta familia de compuestos se considera positiva por la aparición de una coloración y un precipitado anaranjado o rojo oscuro (Rivas, Oranday y Verde, 2016).
- **Ensayo de Kedde:** permite identificar la presencia de glucósidos cardiotónicos. En un ensayo positivo se desarrolla una coloración violácea, persistente durante 1 a 2 horas (Verde, García y Rivas, 2016).

### **Extractos Vegetales**

Se define como extracto vegetal el producto líquido obtenido a partir de plantas o parte de ellas con varios procedimientos y con varios solventes. Dependiendo del grado de concentración de los extractivos, los extractos pueden clasificarse en: extractos fluidos o líquidos en los que el volumen de líquido del extracto es igual al volumen de la planta seca que se haya usado,

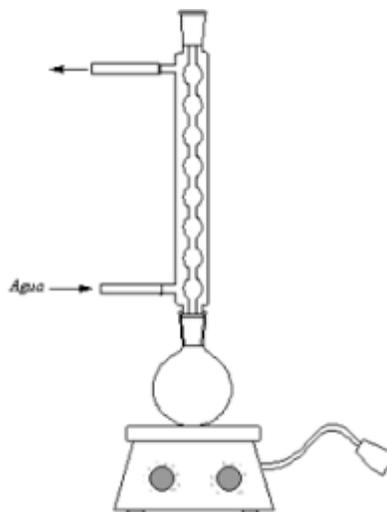
extractos semisólidos o blandos son a los que se les ha retirado el agua parcialmente hasta tener una consistencia de unguento y extractos secos son aquellos a los que se les ha retirado en su totalidad el agua y su apariencia es la de un polvo muy fino (Bonatti, 1991).

### ***Métodos de Extracción***

Los métodos de extracción implican el tratamiento del material vegetal con el disolvente adecuado, que solubilice dentro de lo posible, únicamente el principio activo deseado, permitiendo involucrar la división de la mezcla en un número discreto de fracciones. El proceso de extracción se puede realizar de forma discontinua en frío como la maceración, semi-continuo en caliente por medio de la destilación de arrastre por vapor, de forma continua por medio del soxhlet, entre otros (Verde, García y Rivas, 2016).

- ***Extracción por Reflujo:*** en este proceso, el material fragmentado disuelto en un disolvente convenientemente escogido, se somete a ebullición. Debido a que un calentamiento prolongado de la solución podría conducir a la evaporación total del disolvente, se utiliza un equipo de reflujo que consta de un balón de destilación (que contiene el material a extraer más el disolvente) y un refrigerante (Figura 11). La temperatura elevada del disolvente permite una mejor extracción de los componentes deseados ya que la solubilidad de la mayoría de las sustancias aumenta con la temperatura. Este método presenta el inconveniente de que muchos compuestos termolábiles se alteran o descomponen a la temperatura de ebullición del disolvente (Lamarque, Zygodlo, Labuckas, López, Torres y Maestri, 2008).

**Figura 11.** Técnica para la Extracción con Reflujo



Tomado y modificado de <https://quimica.laguia2000.com/quimica-organica/reflujo>

- **Maceración:** este es un método de extracción sólido-líquido donde el material vegetal que se pretende extraer contiene compuestos solubles en el líquido de extracción. Para realizar este proceso el material vegetal se corta en pequeños trozos o molido, fresco o seco se coloca en recipientes adecuados, añadiendo el solvente seleccionado por polaridad: hexano (o éter de petróleo), cloroformo y finalmente metanol o etanol en reposo o en un equipo con agitación continua, a temperatura ambiente durante 5 días cada extracción. Otra opción es obtenerlo en una forma directa agregando una mezcla de solventes: metanol: cloroformo: hexano en la proporción 7:2:1, obteniendo un extracto en forma directa (Bonatti, 1991).
- **Percolación:** la percolación es el flujo del agua o de otro líquido a través de los poros o intersticios de una capa permeable, pudiendo o no llenar el líquido los poros de los materiales granulosos más o menos finos, que rellenan el medio filtrante (Torres, Vega y Garibaldi, 2006).

- **Extracción Continua (Soxhlet):** la extracción Soxhlet se realiza en las siguientes etapas: 1) colocación del solvente en un balón. 2) ebullición del solvente que se evapora hasta un condensador a reflujo. 3) el condensado cae sobre un recipiente que contiene un cartucho poroso con la muestra en su interior. 4) ascenso del nivel del solvente cubriendo el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujo que vuelve el solvente con el material extraído al balón. 5) Se vuelve a producir este proceso la cantidad de veces necesaria para que la muestra quede agotada. Lo extraído se va concentrando en el balón del solvente. Después de terminado el proceso se decanta y se evapora el solvente en un rotavapor (Figura 12) (Núñez, 2008; Verde, García y Rivas, 2016).

**Figura 12.** Equipo de Rotavapor Utilizado para la Destilación al Vacío



Tomado y modificado de Verde, García y Rivas, 2016

### **Generalidades de las Bacterias**

Las bacterias son microorganismos unicelulares relativamente simples. Dado que su material genético no está encerrado por una membrana nuclear especial, las células bacterianas se denominan procariontes, de las palabras

griegas que significan prenúcleo. Estas suelen presentar diversas formas; la forma de bastón de los bacilos, la forma esférica u oval de los cocos y la forma de tirabuzón o curva de los espirilos son las más comunes, pero algunas bacterias presentan formas estrelladas o cuadradas. Las bacterias individuales pueden formar pares, cadenas, racimos u otros agrupamientos; estas formaciones suelen ser características de un género o especie de bacteria en particular (Tortora, Funke y Case 2007).

Las bacterias están recubiertas por paredes celulares que en gran parte están constituidas por un complejo de hidrato de carbono y proteína denominado peptidoglucano. Las bacterias suelen reproducirse mediante la división en dos células iguales; este proceso se conoce como fisión binaria. Para la nutrición de la mayoría de las bacterias utilizan sustancias químicas orgánicas, que en la naturaleza pueden provenir de organismos muertos o vivos. Algunas bacterias pueden producir sus propios alimentos mediante la fotosíntesis y algunas pueden nutrirse de sustancias inorgánicas (Tortora, Funke y Case, 2007).

### ***Tinción de Gram***

La tinción de gram es útil porque permite clasificar a las bacterias en dos grandes grupos: grampositivas y gramnegativas (Tortora, Funke y Case, 2007).

En este procedimiento se realiza un extendido fijado con calor se cubre con violeta de genciana como el colorante violeta de genciana imparte su color a todas las células, se le denomina colorante primario. Después de un breve lapso, se escurre el colorante primario, se lava el extendido y se cubre con yodo, un mordiente. Cuando se lava el yodo, tanto las bacterias grampositivas como las gramnegativas aparecen de color violeta oscuro o púrpura. A continuación, se lava el portaobjetos con una solución de alcohol- acetona.

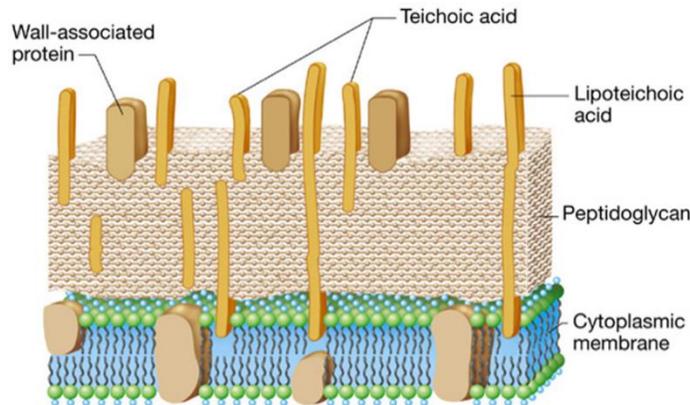
Esta solución es un agente decolorante que elimina el color violeta de las células de algunas especies, pero de otras no. Se elimina el alcohol con agua y se tiñe el portaobjetos con safranina, un colorante básico. Luego se vuelve a lavar el extendido, se lo seca con papel absorbente y se le examina en el microscopio (Tortora, Funke y Case, 2007).

Las bacterias que conservan el color violeta o púrpura después de agregarles el alcohol para decolorarlas se clasifican como grampositivas; las bacterias que pierden el color violeta oscuro después de la decoloración y toman el color rosado de la safranina se clasifican como gramnegativas (Tortora, Funke y Case, 2007).

### ***Bacterias Gram positivas***

Las bacterias grampositivas poseen una pared que está constituida por varias capas de peptidoglucano que conforma una estructura rígida y gruesa. Además, la pared celular de estas bacterias contiene ácidos teicoicos, que están compuestos principalmente por un alcohol y fosfato (Figura 13). Existen dos clases de ácidos teicoicos: el *ácido lipoteicoico*, que abarca toda la capa de peptidoglucano y está unida a la membrana plasmática, y el *ácido teicoico mural*, que está unido a la capa de peptidoglucano (Tortora, Funke y Case, 2007).

**Figura 13.** Pared Celular de las Bacterias grampositivas

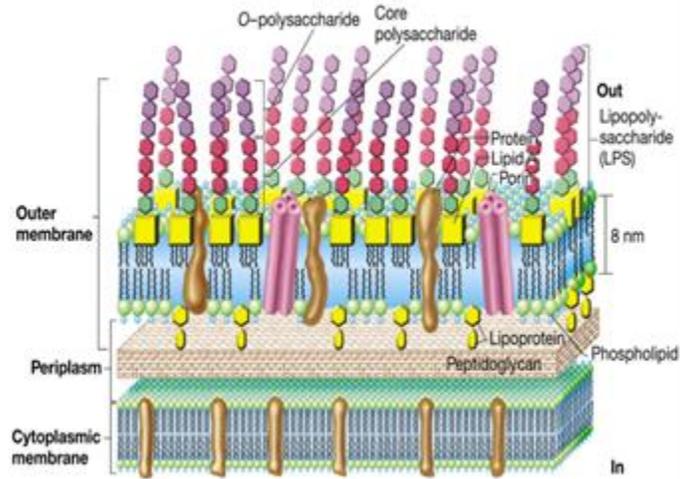


Tomado y modificado de Tortora, Funke y Case, 2007

### ***Bacterias Gram negativas***

Las bacterias gramnegativas poseen una pared celular compuesta por pocas capas de peptidoglucano y una membrana externa, compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos (Figura 14). El peptidoglucano está unido a lipoproteínas de la membrana externa y se encuentra en el periplasma, una sustancia gelatinosa localizada entre la membrana externa y la membrana plasmática, que contiene una concentración elevada de enzimas degradantes y proteínas de transporte. La pared de las bacterias gramnegativas no posee ácido teicoico (Tortora, Funke y Case, 2007).

**Figura 14.** Pared Celular de las Bacterias gramnegativas



Tomado y modificado de Tortora, Funke y Case, 2007

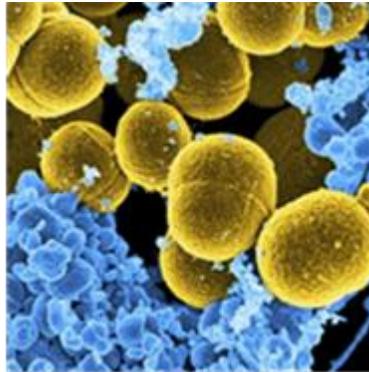
### Descripción de las Bacterias Utilizadas en este Estudio

Dentro de los microorganismos grampositivos existen una gran variedad de géneros y especies, de los cuales solo hablaremos de: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

- ***Staphylococcus aureus***: pertenece al Reino: Bacteria, al Filo: Firmicutes, a la Clase: Bacilli, al Orden: Bacillales, a la Familia: Micrococcaceae, al Género: *Staphylococcus* y a la Especie: *aureus*, estas bacterias se denominan así por sus colonias amarillas (*aureus*= oro, dorado) (Figura 15). Este microorganismo se caracteriza por presentar una disposición típica en forma de racimos de uva, inmóviles, son anaerobios facultativos, miden aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, catalasa positivos. Estas bacterias crecen relativamente bien en condiciones de presión osmótica elevada y humedad reducida, lo que explica en parte que pueden

desarrollarse y sobrevivir en las secreciones nasales y en la piel (Tortora, Funke y Case, 2007; Konemam, 2008).

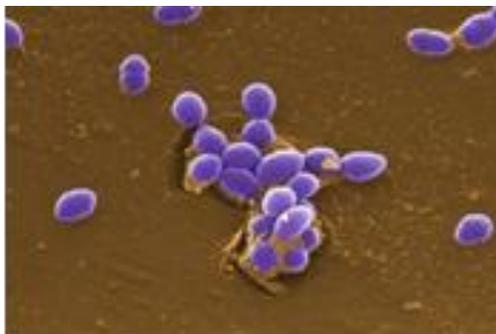
**Figura 15.** Colonias Amarillas de *S. aureus*



Tomado y modificado de [https://apic.org/monthly\\_alerts/staphylococcus-aureus/](https://apic.org/monthly_alerts/staphylococcus-aureus/)

- ***Enterococcus faecalis*** pertenece al Reino: Bacteria, al Filo: Firmicutes, a la Clase: Bacili, al Orden: Lactobacillales, a la Familia: Enterococcaceae, al Género: *Enterococcus* y la Especie: *faecalis* (Figura 16). Es una bacteria inmóvil y anaerobio facultativo; son microbios relativamente resistentes, persisten como contaminantes en el ámbito hospitalario, en las manos, en la ropa de cama e incluso como aerosol fecal. En el ámbito médico con frecuencia invaden el torrente sanguíneo a través de elementos invasivos como los catéteres permanentes (Tortora, Funke y Case, 2007).

**Figura 16.** Vista desde el Microscopio del *Enterococcus faecalis*



Tomado y modificado de <https://www.theatlantic.com/science/archive/2019/04/gut-bacteria-outbreak/586780/>

Existe una amplia variedad de microorganismos gramnegativos, pero en esta investigación solo nos enfocaremos en las bacterias: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

- ***Escherichia coli***: es un bacilo móvil por flagelos peritricos, tiene forma de barra (Figura 17), es un habitante común del intestino de los seres vivos, el cual se clasifica taxonómicamente en: Reino: Bacteria, Filo: Proteobacteria, Clase: Gammaproteobacteria, Orden: Enterobacteriales, Familia: Enterobacteriaceae, Género: *Escherichia* y Especie: *coli*. Es quizás el microorganismo procarionte más estudiado por el ser humano, es anaeróbico facultativo, mide entre 0,5  $\mu\text{m}$  de ancho por 3  $\mu\text{m}$  de largo (Koneman, 2008; Rea, 2012).

**Figura 17.** Bacilo de *Escherichia coli*



Tomado y modificado de

<https://hospital.vallhebron.com/es/enfermedades/infeccion-por-escherichia-coli>

- ***Klebsiella pneumoniae***: son bacilos no flagelados (Figura 18), por lo tanto, son inmóviles. Se encuentra frecuentemente en el suelo o el agua. Esta especie puede producir una forma grave de neumonía en los seres humanos y se clasifica taxonómicamente en Reino: Bacteria, Filo: Proteobacteria, Clase: Grammaproteobacteria, Orden: Enterobacteriales, Familia: Enterobacteriaceae, Genero: *Klebsiella* y Especie: *pneumoniae* (Tortora, Funke y Case, 2007; Rea, 2012).

**Figura 18.** Bacilos no Flagelados de *K. pneumoniae*



Tomado y modificado de <https://solucionesdesinfeccion.com/tag/klebsiella-pneumoniae/>

- ***Pseudomonas aeruginosa***: son bacilos aerobios, móviles por medio de flagelos polares, sean únicos o en mechones (Figura 19). Este

microorganismo se clasifica en: Reino: Bacteria, Filo: Proteobacteria, Clase: Gammaproteobacteria, Familia: Pseudomonadaceae, Género: *Pseudomonas* y Especie: *aeruginosa*. Estas bacterias son muy comunes en el suelo y en otros ambientes naturales, la cual produce un pigmento soluble de color azul verdoso, este microorganismo puede infectar el tracto urinario, las quemaduras y las heridas y pueden causar sepsis, abscesos y meningitis (Tortora, Funke y Case, 2007).

**Figura 19.** Bacilos Aerobios Flagelados de *P. aeruginosa*



Tomado y modificado de <https://www.dzif.de/en/could-green-tea-hold-key-reducing-antibiotic-resistance>

### **Actividad Antibacteriana**

Se define como la habilidad específica o capacidad de un producto de lograr su efecto y se basa en la medición de algún atributo del producto, por ejemplo, su efecto inhibitorio frente a un determinado microorganismo (Halo de inhibición) se determina por el método analítico más adecuado, normalmente métodos de análisis microbiológicos. La actividad de un antibiótico puede ser demostrada mediante el efecto inhibitorio de la sustancia en cuestión cuando es evaluado frente a un microorganismo. En los análisis de potencia o actividad, se compara cuantitativamente el efecto de una muestra sobre un sistema biológico con el sistema producido por una

preparación estándar en las mismas condiciones y para la cual ya se ha determinado exactamente su actividad, obteniendo así un valor de actividad relativo al del estándar de referencia (Rea, 2012).

### ***Métodos para la Determinación de la Actividad Antibacteriana***

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos, los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados, en tres grupos principales: métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía, un cuarto método es el análisis conductimétrico, el cual detecta el crecimiento microbiano como un cambio en la conductividad eléctrica o impedancia del medio de cultivo. De estos dos últimos no se profundizará en este trabajo (Ramírez y Marín, 2009).

- ***Métodos de Difusión:*** método de difusión en disco, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles. Este se basa en el método de Kirby-Baüer. El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (Ramírez y Marín, 2009).

La técnica con sensidiscos presenta varias desventajas; una de ellas es la composición del papel filtro Whatman el cual se compone de celulosa (uniones  $\beta$ -(1-4) de monómeros de glucosa), los cuales tienen muchos grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa, haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica, interviniendo directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión de estos en el agar, los compuestos apolares pueden no ser influenciados por dichos grupos hidroxilos y difundir fácilmente en el agar. Esto puede explicar en parte la más alta sensibilidad detectada cuando el método se utiliza directamente en pozo. En el caso de evaluar varias sustancias los discos de papel filtro o los pozos deben ponerse en forma equidistante. A continuación, se procede a su incubación a la temperatura adecuada por 24 horas luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos de las distintas sustancias sobre el microorganismo estudiado, con el antibiótico control. La lectura de los resultados representa la actividad *in vitro* de la sustancia (Ramírez y Marín, 2009).

- **Métodos de Dilución:** el método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración bactericida mínima (CBM) y la concentración inhibitoria mínima (CIM), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas, y la (CBM) como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado, estas variables son una herramienta para investigar nuevos antimicrobianos (Ramírez y Marín, 2009).

En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la CIM es determinada después de la incubación (Ramírez y Marín, 2009).

En el método de dilución en agar, las cajas se siembran por profundidad con una determinada concentración de extracto vegetal, luego se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas, después de ésta, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas, la principal desventaja de este método es la cantidad necesaria de muestra a evaluar (Ramírez y Marín, 2009).

Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar CIM, en un gran número de muestras. La ventaja sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales, además permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático (Ramírez y Marín, 2009).

## **Antimicrobianos**

Los antimicrobianos son sustancias producidas por microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetes) que suprimen el crecimiento o que destruyen a otros microorganismos. De manera práctica, el concepto también se aplica a fármacos sintéticos como la sulfonamida y las quinolonas y a semisintéticos como algunas penicilinas y cefalosporinas (Rodríguez, Vidrio y Campos, 2009).

Los antimicrobianos son eficaces en el manejo de las enfermedades infecciosas debido a su toxicidad selectiva, que implica efectos tóxicos en

microorganismos invasores sin dañar a las células del hospedero (Rodríguez, Vidrio y Campos, 2009).

### ***Agentes Antimicrobianos Bactericidas***

Tienen efectos tóxicos directos sobre las bacterias y las destruyen (Rodríguez, Vidrio y Campos, 2009). La actividad bactericida es el valor de la actividad antimicrobiana que destruye a un microorganismo determinado. Se determina *in vitro* enfrentando una concentración estándar de microorganismo con una serie de diluciones de antimicrobianos. La concentración más baja que destruye el 99,9 % de la población se denomina concentración bactericida mínima (CBM) (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009; Rodríguez, Vidrio y Campos, 2009).

### ***Agentes Antimicrobianos Bacteriostáticos***

Inhiben la síntesis de proteínas o interfieren con el metabolismo, alterando su función o inhibiendo su crecimiento (Rodríguez, Vidrio y Campos, 2009). La actividad bacteriostática es el valor de la actividad antimicrobiana que inhibe el crecimiento de un microorganismo. Se determina *in vitro* enfrentando una concentración estándar de microorganismo con una serie de diluciones de antimicrobianos. La concentración más baja que destruye el 99,9 % de la población se denomina concentración inhibitoria mínima (CIM) (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

## ***Mecanismos de Acción del Antibiótico***

Los mecanismos por los que los antibióticos antibacterianos utilizados alteran la biología de los microorganismos son los que a continuación detallamos a continuación:

- Inhibición de la síntesis de la pared celular: la mayoría de los antibióticos activos sobre la pared se clasifican en antibióticos beta lactámicos (por ejemplo, penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenems, monobactámicos, inhibidores de  $\beta$ -lactamasas) los cuales previene la inactivación enzimática del beta lactámico, así denominados porque comparten una estructura de anillo beta lactámico común. Otros antibióticos que interfieren en la construcción de la pared celular bacteriana son la vancomicina, la daptomicina y la bacitracina por inhibir la síntesis del peptidoglucano y la despolarización de la membrana citoplasmática (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).
- Desorganización de la membrana externa de la pared: las polimixinas son un grupo de polipéptidos cíclicos. Estos antibióticos se insertan en membranas bacterianas como detergentes, interactuando con los lipopolisacáridos y los fosfolípidos de la membrana externa, lo que produce una mayor permeabilidad de la célula y en último término su muerte. Las polimixinas B y E (colistina) son capaces de causar una importante nefrotoxicidad (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).
- Inhibición de la síntesis de proteínas mediada por aminoglucósidos: tetraciclinas y glicilciclinas. Este grupo de antibióticos ejercen su acción al pasar a través de la membrana externa bacteriana, la pared celular y la

membrana citoplasmática al citoplasma, en donde inhiben la síntesis de proteínas, la elongación polipeptídica y la liberación prematura de cadenas aberrantes al unirse de modo reversible o irreversible a las proteínas ribosómicas 30S. Por otra parte, antibióticos como macrólidos, fenicoles, lincosamidas, entre otros la iniciación de la síntesis de proteínas y la elongación polipeptídica al unirse a las proteínas ribosómicas 50S (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

- Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos: las quinolonas son agentes quimioterapéuticos sintéticos que inhiben la topoisomerasa de tipo II (girasa) en el ADN bacteriano o la topoisomerasa de tipo IV, que se requieren para la replicación, recombinación y reparación del ADN y las rifampicinas se une a la ARN polimerasa dependiente del ADN e inhibe la iniciación de la síntesis de ARN (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).
- Inhibición en la síntesis de cofactores metabólicos: tales como las diaminopirimidinas que inhiben la dihidrofolato reductasa e impiden el paso de ácido fólico afolínico (paso necesario para la síntesis de bases púricas y pirimidínicas) y las sulfonamidas inhiben la incorporación de dihidropteroato sintasa desestructurando la síntesis del ácido fólico (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

### ***Resistencia a los Antimicrobianos***

Algunos microorganismos son intrínsecamente resistentes a un antibiótico o a un grupo de antibióticos denominándose resistencia natural cuyo carácter constante es observado en cepas de una misma especie bacteriana y es un mecanismo permanente, determinado genéticamente y sin

correlación con la dosis de antibiótico un claro ejemplo de esto es la especie bacteriana *Klebsiella pneumoniae* que por su producción natural de beta lactamasas es resistente a las penicilinas; sin embargo, la resistencia adquirida es una característica propia de una especie bacteriana, que por naturaleza es sensible a un antibiótico pero que ha sido modificada genéticamente ya sea por mutación o por adquisición de genes de resistencia (plásmidos, transposones e integrones). Son evolutivas y su frecuencia depende de la utilización, al abuso y a la prescripción inapropiada e irracional de los antibióticos (Pérez y Roble, 2013; Rodríguez, Vidrio y Campos, 2009).

La resistencia bacteriana a un antibiótico ocurre cuando la bacteria evoluciona para combatir el mecanismo de acción del fármaco y se atribuye a la capacidad del ADN de: 1) sufrir mutación espontánea que le confiere resistencia (inserción, delección o sustitución de unos o más nucleótidos dentro de un genoma); 2) trasladarse de un organismo a otro (clínicamente más común; el ADN que confiere resistencia está integrado en un plásmido que se transfiere a otras especies bacterianas en el proceso de conjugación) (Pérez y Roble, 2013; Rodríguez, Vidrio y Campos, 2009).

Finalmente, los cuatro mecanismos básicos por medio de los cuales los microorganismos expresan su resistencia son:

a) Cambios en la estructura del sitio blanco (proteínas de unión, ribosomas, topoisomerasas).

b) Disminución de la permeabilidad al antibiótico o su expulsión del medio intracelular.

c) Producción de enzimas inactivadoras.

d) Cambios en la vía metabólica. Cuando la resistencia a un antibiótico particular confiere resistencia a todos los antibióticos de ese grupo se le denomina resistencia cruzada (Rodríguez, Vidrio y Campos, 2009).

## ***Mecanismos de Resistencia***

- Destrucción o inactivación enzimática: es la perduración de beta lactamasas, que son enzimas que actúan rompiendo la unión amiga, hidrolizando los agentes antimicrobianos (Rea, 2012).
- Alteración de la membrana bacteriana: las bacterias gramnegativas pueden volverse resistentes a los antibióticos beta-lactámicos mediante el desarrollo de barreras de permeabilidad. Esto es usualmente provocado por porinas alteradas en la membrana externa que ya no permiten la entrada y el tránsito de las moléculas del antibiótico dentro de la célula. Cuando los beta-lactámicos no pueden alcanzar las PBPs, la célula es resistente (Rea, 2012).
- Cambios en la permeabilidad de la membrana interna: es la alteración de la producción energética que no permite el paso del antibiótico de la capa externa a la interna de la membrana; este tránsito consume energía y se efectúa mediante un transportador aniónico; al alterar la bacteria este mecanismo se defiende del ataque del antibiótico (Rea, 2012).
- Alteración del blanco ribosomal: las PBPs tanto en bacterias grampositivas y gramnegativas pueden ser alteradas mediante mutación de manera que los  $\beta$ -lactámicos no puedan unirse a ellas; por tanto la célula es resistente a agentes antimicrobianos. Los ribosomas, la metilación del ARN ribosómico confiere resistencia a los macrólidos. ADN girasa y topoisomerasa IV, mutaciones en los genes

cromosómicos de ADN girasa y topoisomerasa IV confieren resistencia a las quinolonas (Rea, 2012).

- **Modificación enzimática:** modifica los antibióticos aminoglucósidos; esta resistencia de las bacterias aeróbicas es debida al cambio enzimático codificado por el gen del plásmido o del cromosoma. Las bacterias gramnegativas pueden producir enzimas adenilantes, fosforilantes o acetilantes que modifican un aminoglucósido para inactivarlo (Rea, 2012).
- **Extracción activa del antibiótico:** este mecanismo altera la producción de energía y disminuye así no solamente la entrada del antibiótico sino que a su vez las bacterias reducen la concentración del antibiótico y promueve la extracción activa del mismo y su efecto se reduce. Alteraciones de los precursores de la pared (Rea, 2012).
- **Por este mecanismo de resistencia mediado por un gen cromosomal:** el peptidoglucano precursor es cambiado al modificar la terminación D-alanina por D-alanina -D-lactato y de esta manera se logra que el antibiótico no se pueda unir al precursor de la membrana. Este mecanismo se ha estudiado con vancomicina y antibióticos glicopeptídicos (Rea, 2012).

### **Quorum Sensing (QS)**

La detección de quórum es un proceso de comunicación célula-célula en el que las bacterias utilizan la producción y detección de sustancias químicas extracelulares llamadas autoinductores para controlar la densidad de

población celular. La detección de quórum permite que las bacterias sincronicen la expresión génica del grupo y por lo tanto, actúen al mismo tiempo. Los procesos bacterianos como la formación de biopelículas, la secreción de factores de virulencia, la bioluminiscencia, la producción de antibióticos, la esporulación y la competencia para la captación de ADN suelen ser críticos para la supervivencia. Sin embargo, estos comportamientos son aparentemente inútiles si los realiza una sola bacteria actuando sola. Por ello, a través de un proceso llamado “quórum sensing (QS)” o “detección de quórum”, las bacterias controlan sincrónicamente la expresión génica en respuesta a los cambios en la densidad celular y la complejidad de las especies, en definitiva, se puede definir el quórum sensing como el mecanismo bacteriano de comunicación intracelular que controla la expresión génica en función de la densidad celular (Wai y Bassler, 2015).

La detección de quórum permite que las bacterias cambien entre dos programas distintos de expresión génica: uno que se favorece en baja densidad celular (LCD) para comportamientos individuales y asociales, y otro, que se favorece en alta densidad celular (HCD) para comportamientos sociales, comportamientos de grupo. Los pasos fundamentales involucrados en la detección y respuesta a las fluctuaciones en el número de células son análogos en todos los sistemas de detección de quórum conocidos. Primero, las moléculas de bajo peso molecular llamadas autoinductores se sintetizan intracelularmente. En segundo lugar, estas moléculas se liberan pasivamente o se secretan activamente fuera de las células. A medida que aumenta el número de células en una población, también aumenta la concentración extracelular de autoinductor. En tercer lugar, cuando los autoinductores se acumulan por encima del nivel de umbral mínimo requerido para la detección, los receptores afines se unen a los autoinductores y desencadenan cascadas de transducción de señales que dan como resultado cambios en la expresión génica en toda la población. Por lo tanto, la detección de quórum permite que

las células de una población funcionen al unísono y, al hacerlo, se comportan como un colectivo (Wai y Bassler, 2015).

## **Definición Operacional de Términos**

### ***Antibióticos***

Los antibióticos son metabolitos secundarios, capaces de inhibir a bajas concentraciones el crecimiento de organismos microbianos y aun de destruirlos, a través de un mecanismo antimetabólico (Albornoz, 1980).

### ***Etnobotánica***

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

### ***Etnomedicina***

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

### ***Espectro Antibacteriano***

Rango de actividad de una sustancia contra los microorganismos. Un fármaco antibacteriano de amplio espectro puede inhibir una gran variedad de bacterias grampositivas y gramnegativas, mientras que un fármaco de espectro reducido solo es activo contra determinados géneros (Murray,

Rosenthal y Pfaller, 2009). Estos tienen el inconveniente de que su administración altera drásticamente a la flora bacteriana normal y puede favorecer una sobreinfección (Rodríguez, Vidrio y Campos, 2009).

### ***Fitoquímica***

Este vocablo proviene del griego *Phyton* (planta o vegetal), literalmente significa química de las plantas. La fitoquímica se encarga del estudio de las sustancias vegetales: extracción, separación, purificación y elucidación de estructuras moleculares (Albornoz, 1980).

### ***Fitoterapia***

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

### ***Potencia de un Agente Antibacteriano***

Es la actividad por miligramo, de un agente quimioterápico. Se expresa según la mínima concentración en la cual es capaz de inhibir la multiplicación de un tipo de microorganismo susceptible a su acción (Albornoz, 1980).

### ***Operacionalización de las Variables***

Para operacionalizar el sistema de variables, es necesario la definición conceptual y la operacional de las mismas, este proceso le permite al investigador identificar aquellos aspectos perceptibles de un evento que hacen posible dar cuenta de la presencia o intensidad de este (Hurtado, 2010). En tal sentido, las variables se operacionalizan con el fin de identificar los elementos y datos empíricos que expresan su presencia. En esta investigación se medirán las variables que no admiten valores intermedios (discretas) y algunas continuas con dimensiones dicotómicas y politómicas. El nivel de medición será nominal y de intervalo, los indicadores derivarán de las bases teóricas. La sistematización de la variable dependiente e independiente se muestra en las Tablas 2 y 3 respectivamente.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Tabla 2.** Operacionalización de la Variable Dependiente: Actividad Antibacteriana de los Extractos de las Flores de *Cassia alata* L.

| 1.Variable  | 2.Tipo de variable   | 3.Definición Conceptual<br>¿Qué es?  |
|---|--|--|
| <b>Actividad antibacteriana de los extractos de la especie <i>Cassia alata</i> L.</b>                     | Dependiente<br><br>Cuantitativa<br><br>Discreta  | La actividad antibacteriana se define como la habilidad específica o capacidad de un producto de lograr su efecto planeado y se basa en la medición de algún atributo del producto, por ejemplo, su efecto inhibitorio frente a un determinado microorganismo (Koneman, 2008). |
| 4.Definición operacional<br>¿Cómo se mide?  | 5.Dimensiones  | 6.Indicador  |
| La actividad antibacteriana se puede medir por:<br><br>- <b>Método de Difusión en Disco (Kirby-Baüer)</b> | Cepas grampositivas:<br><br>- <i>Staphylococcus aureus</i><br>- <i>Enterococcus faecalis</i><br><br>Cepas gramnegativas:<br><br>- <i>Escherichia coli</i><br>- <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>- <i>Klebsiella pneumoniae</i> | - Sensible<br>- Intermedio<br>- Resistente<br><br>- Presencia o ausencia del halo de inhibición frente a cepas grampositivas y gramnegativas   |

**Fuente:** García y Obregón, 2022

**Tabla 3.** Operacionalización de la Variable Independiente: Composición Química de los Extractos de las Flores de *Cassia alata* L.

| 1.Variable  | 2.Tipo de variable  | 3.Definición Conceptual<br>¿Qué es?   |
|---|---|---|
| <b>Composición química de los extractos de las flores de <i>Cassia alata</i> L.</b> | Independiente<br><br>Cualitativa<br><br>Discreta  | Metabolito secundario o producto natural que se usa como sinónimo, aquel que es propio de una especie, se le conoce también como producto químico y en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza (Marcano y Hasegawa, 2002).  |
| 4.Definición operacional<br>¿Cómo se mide?  | 5.Dimensiones   | 6.Indicador   |
| <b>Pruebas químicas preliminares de tipo cualitativas</b>                           | Las pruebas químicas cualitativas a realizar para:<br><ul style="list-style-type: none"> <li>- Alcaloides : prueba de Dragendorff, Wagner y Mayer</li> <li>- Esteroles y/o triterpenos: prueba de Liebermann Burchard</li> <li>- Saponinas: prueba de espuma</li> <li>- Compuestos fenólicos simples: prueba con tricloruro férrico</li> <li>- Taninos: prueba con gelatina al 1 %</li> <li>- Flavonoides: prueba Shinoda y NaOH al 10 %</li> <li>- Quinonas: prueba con ácido sulfúrico concentrado</li> <li>- Antraquinonas: prueba con hidróxido de amonio</li> <li>- Glicósidos cardiotónicos: ensayo de Kedde</li> <li>- Cumarinas: prueba con hidróxido de amonio</li> <li>- Lactonas sesquiterpénicas: ensayo de Baljet</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alcaloides: aparición de turbidez o precipitado</li> <li>- Esteroles/triterpenos: coloración azul o verde y rojizas para triterpenos</li> <li>- Saponinas: formación de abundante espuma</li> <li>- Compuestos fenólicos: coloración de azul a negro</li> <li>- Taninos: precipitado blanco</li> <li>- Flavonoides: coloración naranja a rojo para flavonas; si es rojo para flavonoles y magenta para flavononas</li> <li>- Antraquinonas y quinonas: coloración roja</li> <li>- Glicósidos cardiotónicos: coloración púrpura o violácea</li> <li>- Lactonas sesquiterpénicas: coloraciones roja, violeta o rosa</li> </ul> |

**Fuente:** García y Obregón, 2022

## Hipótesis

Estudios previos reportan la presencia de diversos metabolitos secundarios biológicamente activos en el género *Cassia* por lo cual es de esperar que los extractos de las flores de *Cassia alata* L., posean actividad antibacteriana frente a cepas grampositivas y gramnegativas.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## **CAPÍTULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **Tipo de Investigación**

El tipo de investigación alude al grado de profundidad, complejidad y la clase de resultado a lograr en la investigación. Una investigación confirmatoria requiere de una explicación previa o una hipótesis, la cual se desea confirmar (Hurtado, 2010). Es por ello, que en esta investigación se requiere confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y el tamizaje fitoquímico de las flores de *Cassia alata* L.

#### **Diseño de la Investigación**

El diseño de investigación se basa en el procedimiento, el cual además, alude a las decisiones que se toman en cuanto al proceso de recolección de datos, por lo que la presente investigación es de tipo confirmatoria, con un diseño de campo y de laboratorio, es decir, mixta porque los datos se recolectaron en un ambiente natural en zonas aledañas a la población de Santa Cruz de Zulia del Municipio Colón, Estado Zulia. Por otra parte, es contemporánea ya que la recolección se realizó durante el desarrollo de la investigación y transversal porque las muestras fueron recolectadas una vez. Además, la amplitud de la información recolectada es multivariable, ya que este trabajo estará orientado al estudio de varios eventos por cada tipo de evento (Hurtado, 2010b).

## **Población y Muestra**

### ***Unidad de Investigación***

La población en una investigación es el conjunto de unidades de las que se desea obtener información y sobre las que se van a generar conclusiones. La población puede ser definida como el conjunto finito o infinito de elementos, personas o cosas pertinentes a una investigación y que generalmente suele ser inaccesible. El establecimiento de la población estará íntimamente asociado al tema del estudio (Palella y Martins, 2012). La unidad de investigación está representada por la especie *Cassia alata* L. situada en zonas aledañas a la población de Santa Cruz de Zulia del Municipio Colón, Estado Zulia, la cual se analizó en el Laboratorio del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Los Andes.

### ***Selección del Tamaño de la Muestra***

La “n” muestral estará representada por las flores recolectadas de la especie *C. alata*. El tipo de muestra utilizada es no probabilística, respecto a que la elección de los elementos no depende de la probabilidad, sino de causas relacionadas con las características de la investigación o de quien hace la muestra. Aquí el procedimiento no es mecánico ni con base en fórmulas de probabilidad, sino que depende del proceso de toma de decisiones de un investigador o de un grupo de investigadores y desde luego, las muestras seleccionadas obedecen a otros criterios de investigación. Elegir entre una muestra probabilística y una no probabilística depende de los objetivos del estudio, del esquema de investigación y la contribución que se piense realizar con ella (Hernández, Fernández y Baptista, 2010).

## Sistema de Variables

Las variables son elementos o factores que pueden ser clasificados en una o más categorías. Es posible medirlas o cuantificarlas, según sus propiedades o características. Por la relación que guardan con el propósito de la investigación las variables pueden ser: dependiente, independiente e interviniente (Palella y Martins, 2012). Las variables que tienen relación con el objetivo de la investigación son las siguientes:

- Variable dependiente (VD): Actividad antibacteriana del extracto de etanol de las flores de *Cassia alata* L (Tabla 2).
- Variable independiente (VI): Composición química de los extractos de las flores de *Cassia alata* L (Tabla 3).

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

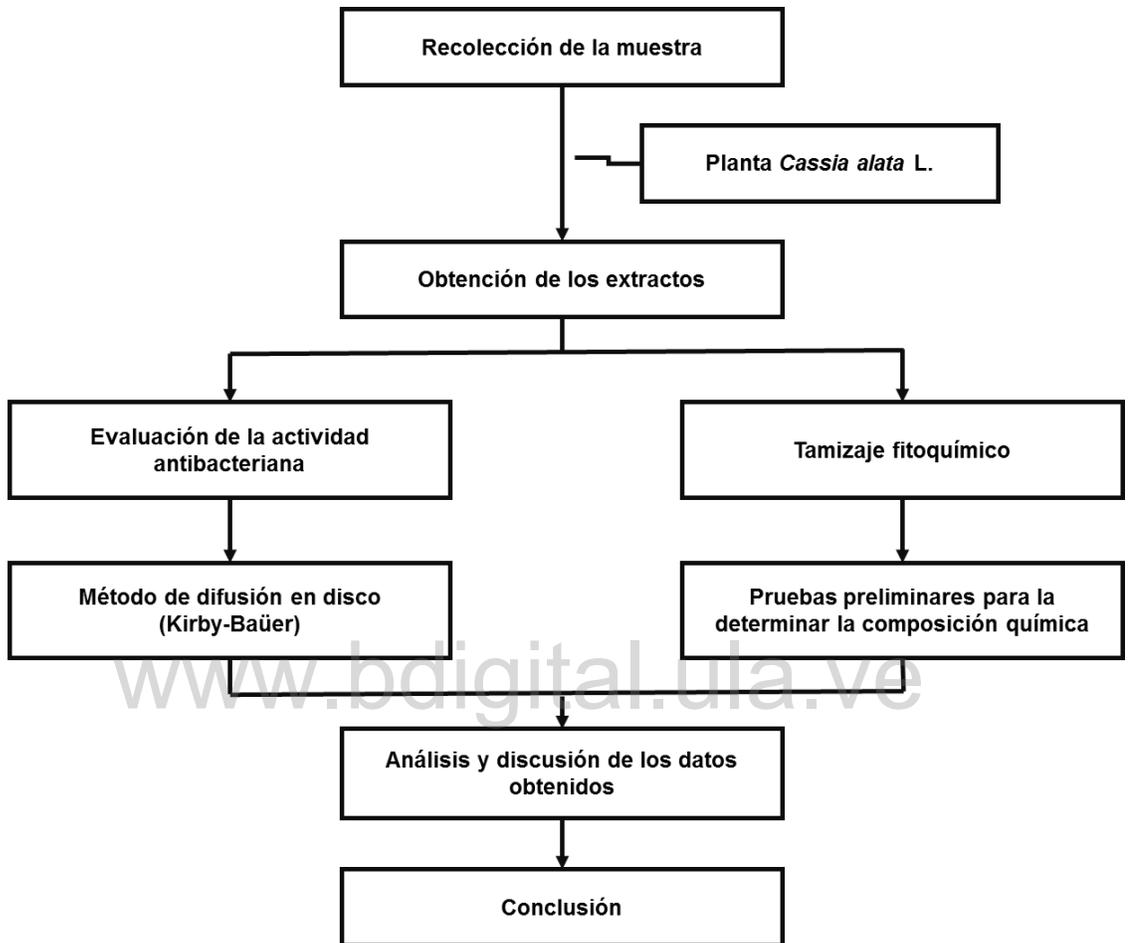
## **Instrumento de Recolección**

Una vez realizado el plan de la investigación y resueltos los problemas que plantea el muestreo, se hace uso de las técnicas de recolección de datos, que son las distintas formas o maneras de obtener la información. Esta investigación está enfocada en la técnica de observación, que consiste en estar a la expectativa frente al fenómeno, del cual se tomó y se registró la información para su posterior análisis que se realizó por medio de la utilización de tablas para recopilar de manera cualitativa de los datos obtenidos de las pruebas preliminares para la identificación de los metabolitos presentes en la planta en estudio, de igual forma se registraron los datos recopilados arrojados por el método empleado para la determinación de la actividad antibacteriana; en ella se apoyó el investigador para obtener el mayor número de datos (Palella y Martins, 2012).

## **Procedimientos de la Investigación**

La descripción del procedimiento de la investigación se describe en el Esquema 1, los diferentes estadios que se realizaron durante la realización de este proyecto.

### Esquema 1. Procedimiento General de la Investigación



Fuente: García y Obregón, 2022

#### **Recolección de la muestra**

Las flores de *C. alata* fue recolectada en zonas aledañas a la población de Santa Cruz de Zulia del Municipio Colón, Estado Zulia y transportada al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, fue identificada botánicamente en el herbario M.E.R.F. "Dr. Luis Ruiz Terán" de dicha institución.

### ***Secado del Material Vegetal***

Se pesaron 492 gramos de flores frescas, las cuales se colocaron en cestas hechas a base de papel periódico, en un lugar fresco y seco, al cabo de un tiempo se procedió a completar el secado en estufa a una temperatura de 40 °C por 24 horas. El material seco se pesó y trituró con la ayuda de un molino obteniendo 74,49 gramos de muestra, luego se almacenó en sobres de papel a temperatura ambiente para su posterior uso y elaboración de los extractos vegetales.

### ***Preparación de los Extractos***

Para analizar las propiedades medicinales de una droga vegetal, en muchos casos se recurre a métodos de extracción más complejos, que permitan obtener métodos reproducibles, con cuantificación de principios activos en lo posible (Verde, García y Rivas, 2016). El método extractivo empleado para la elaboración de nuestros extractos fue reflujo en caliente, eliminando el exceso de los solventes con la ayuda de un rotavapor como se muestra en la Figura 20.

- **Preparación del Extracto de Hexano:** para la preparación de este extracto vegetal se colocaron 74,49 g de las flores previamente secadas y molidas en un balón aforado con 400 mL de hexano destilado (solvente orgánico no polar), esta preparación se conectó a un equipo de reflujo el cual se está conectado a una manta caliente a una temperatura de 60 °C, una vez la mezcla comienza a hervir la temperatura se ajusta a 50 °C, esto consigue un mayor rendimiento de la extracción; transcurrido un tiempo se observó caer la primera gota,

desde ese momento se comienza a contar 1 hora para luego filtrar la mezcla con la ayuda de un embudo cubierto con papel de filtro.

- **Preparación del Extracto de Etanol:** en la elaboración del extracto de etanol se utilizaron las flores molidas empleadas en el anterior proceso, mezclamos el material con 400 mL del solvente polar al 96 % y realizamos los procesos de calentamiento y filtración que empleamos para el extracto de hexano.

Luego de realizadas las filtraciones de la mezcla obtenida con las flores de *Cassia* y los líquidos fueron llevados al rotaevaporador a baja presión y temperatura de aire controlada de 50 °C, estos se concentraron por separado hasta sequedad para la eliminación de los solventes y concentración de los extractos. Finalmente los extractos fueron envasados en frascos ámbar y debidamente identificados para luego ser llevados a secar a la estufa a 40 °C hasta peso constante (Tabla 6), para su posterior determinación antibacteriana y la caracterización fitoquímica.

**Figura 20.** Procedimiento para la Obtención de los Extractos de Hexano y Etanol de las Flores de *Cassia alata* L.



Fuente: García y Obregón, 2022

### ***Identificación de Metabolitos Secundarios***

Para el fraccionamiento e identificación de los compuestos químicos presentes en la planta una vez ya realizados los extractos vegetales se requiere de la utilización de pruebas preliminares, la cual es una técnica que demuestra de forma cualitativa la presencia o ausencia de los compuestos secundarios de una planta mediante la observación de reacciones coloreadas y/o precipitación (Domínguez, 1973). A continuación, se describen las pruebas realizadas para la determinación fitoquímica utilizadas en ese manuscrito:

- **Determinación de Alcaloides (Ensayos de Dragendorff, Wagner y Mayer):** se realizaron las pruebas con los reactivos de Dragendorff, Wagner y Mayer, en tres tubos de ensayos se disolvieron de 1-2 mg del extracto etanólico en 6 mL de ácido clorhídrico (HCl) al 10 %, se calentó en baño de María por quince minutos, se dejó enfriar y se filtró la muestra. Posteriormente se dividió el filtrado en 3 tubos de ensayo (2,0 mL c/u) identificados para cada reactivo. Luego se adicionaron al respectivo tubo 2 a 3 gotas de sales de metales pesados como el ioduro de potasio (reactivo de Dragendorff), el ioduro de potasio y mercurio (reactivo de Mayer) y la sal del reactivo de Wagner, la formación de precipitados de color naranja, blanco y rojo pardo respectivamente, indica la presencia de alcaloides básicos (Coy, Parra y Cuca, 2014).
- **Determinación de Triterpenos y Esteroles (Ensayo de Lieberman-Burchard):** se colocaron en dos tubos de ensayo secos, limpios y con la respectiva identificación pequeñas cantidades de extracto seco (flores) con 5 mL de diclorometano hasta disolver para adicionarle 0,5 mL de solución clorofórmica anhidra, luego se añadió 0,5 mL de

anhídrido acético y cuidadosamente por la pared del tubo una gota de ácido sulfúrico concentrado. Se consideró positiva la prueba cuando aparecieron coloraciones azules o verdes para esteroides y coloraciones rojizas para triterpenos (Verde, García y Rivas, 2016).

- **Determinación de Compuestos Fenólicos (Prueba de Tricloruro Férrico):** se disolvió una pequeña cantidad de la muestra en agua y se agregó unas gotas de solución de cloruro férrico al 5 %, la formación de un complejo coloreado transitorio o permanente púrpura, verde o azul indica la presencia de fenol o enol (Coy, Parra y Cuca, 2014).
- **Determinación de Saponinas (Prueba de Altura y Estabilidad de Espuma):** en un tubo de ensayo se colocaron 1-2 mg de muestra disuelta en 2 mL de agua destilada, se agitó vigorosamente durante 1 minuto, se determinó la altura de espuma en caso de que se presentara. Cuando se forma espuma abundante y persistente durante 1 hora es indicativo de la presencia de saponinas en las muestras (Verde, García y Rivas, 2016).
- **Determinación de Taninos (Gelatina al 1 %):** en un tubo de ensayo se colocaron de 1-2 mg de muestra y disolvieron con 3 mL de agua, luego se adicionaron 2 mL de solución de gelatina al 1 %, la formación de un precipitado blanco indica la presencia de taninos (Domínguez, 1973; Marcano y Hasewaga, 2002).
- **Determinación de Flavonoides (Ensayo de Shinoda):** se disolvieron 2 mL del extracto etanólico y hexanoico se adiciono 2 gotas de HCl concentrado por las paredes del tubo, luego se colocaron trozos de

magnesio metálico cuidadosamente, la formación de una coloración naranja a rojo indica la presencia de flavonas, si es rojo flavonoles y si es magenta flavononas (Marcano y Hasewaga, 2002).

- **Determinación de Cumarinas (Reacción con Hidróxido de Amonio):** se disolvió una alícuota de las muestras en 1 mL de etanol y se agregaron dos gotas de hidróxido de amonio concentrado ( $[\text{NH}_4\text{OH}]$ ), luego se observaron en cámara de luz ultravioleta a 365 nm, se considera positiva la prueba cuando presenta una fluorescencia azul-violeta y la ausencia de la misma indica la negatividad (Domínguez, 1973; Marcano y Hasewaga, 2002).
- **Determinación de Antraquinonas (Reacción con Hidróxido de Amonio):** se disolvió una alícuota de los extractos en 3 mL de etanol, se adicionó una gota de hidróxido de amonio concentrado, la presencia de una coloración roja en los dos primeros minutos indica la positividad de la prueba para antraquinonas (Marcano y Hasegawa, 2002).
- **Determinación de Quinonas (Reacción con Ácido Sulfúrico):** se colocó de 1-2 mg de los extractos vegetales en una capsula de porcelana, se agregó 1 gota de ácido sulfúrico concentrado, la formación de una coloración roja revela la presencia de quinonas (Marcano y Hasegawa, 2002).
- **Determinación de Lactonas Sesquiterpénicas (Prueba de Baljet):** se agregó una porción del extracto a una cápsula de porcelana o en tubo de ensayo disolver una porción del extracto en etanol, luego se le adicionan una gota de hidróxido de potasio 2 N en metanol. Calentar la

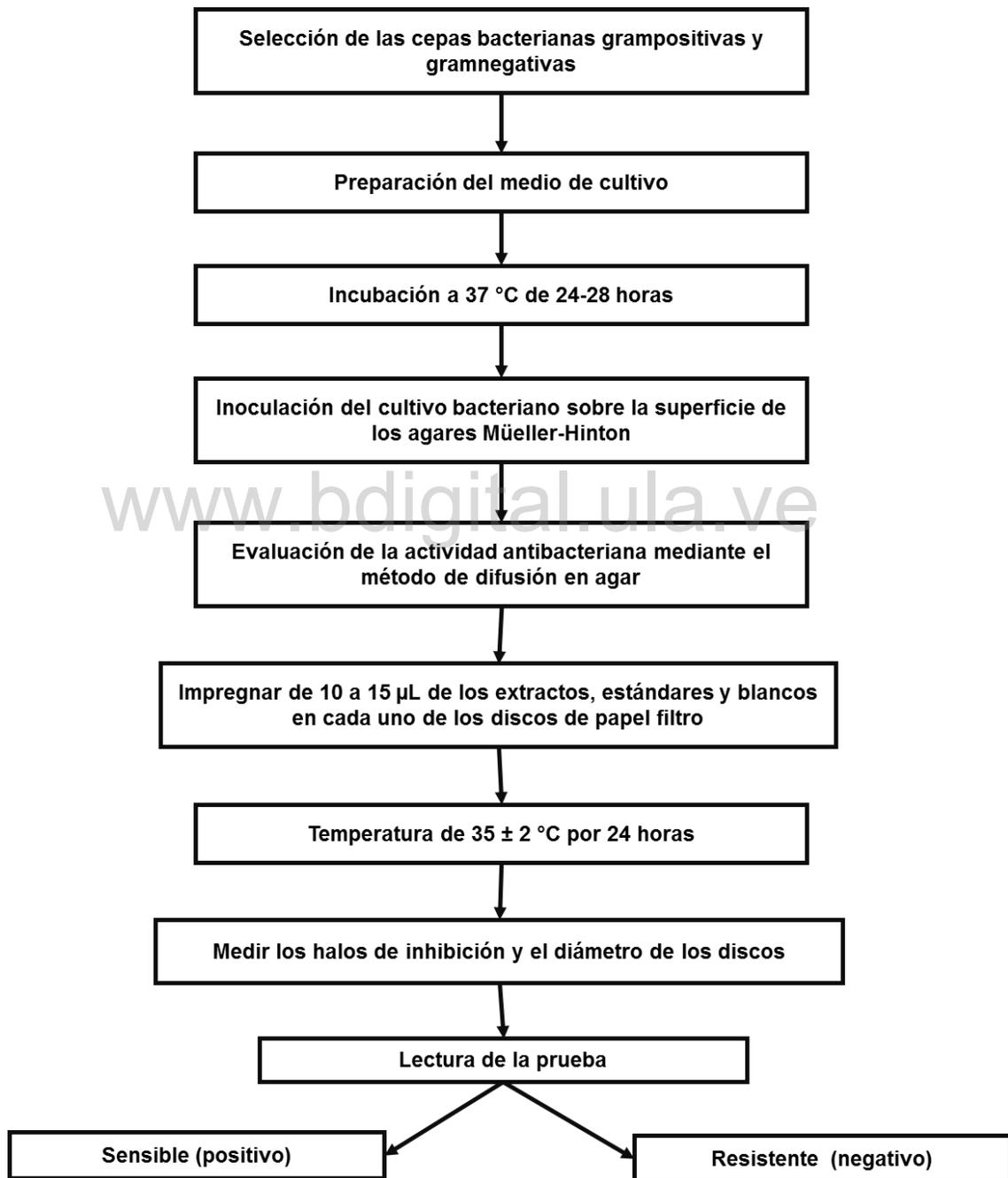
mezcla a ebullición de 1 a 2 minutos, enfriar y llevar a pH de 1 con ácido clorhídrico 0,5 N. Se adicionó una gota de cloruro férrico 1 %. Las coloraciones roja, violeta o rosa indican que la prueba es positiva para este metabolito (Verde, García y Rivas, 2016).

- **Determinación de Glicósidos Cardiotónicos (Ensayo de Kedde):** permitió reconocer en el extracto etanólico la presencia de glucósidos cardiotónicos. Una alícuota del extracto en etanol se mezcló con 1 mL de reactivo y se dejó reposar de 5 a 10 minutos. La positividad de la prueba se consideró con la presencia de una coloración violácea (Verde, García y Rivas, 2016).

#### **Determinación de la Actividad Antibacteriana**

Para la determinación de la actividad antibacteriana de del extracto de etanol se procedió a preparar el medio de cultivo sólido (Müller Hinton), las temperaturas de incubación, varían dependiendo del microorganismo en cuestión, siendo la temperatura de 37 °C para la mayoría de las bacterias; el tiempo de incubación también puede variar de 24-48 horas. Una vez cultivadas las cepas en el medio, se debe realizar la preparación del inóculo según la escala de Mc Farland y se verifica con la absorbancia a 580 nm cercana al 25 %, luego se siembran las bacterias en estudio para determinar la actividad antibacteriana de los extractos, posteriormente medir los halos de inhibición y determinar si el microorganismos es sensible o no (Esquema 2) (Sánchez, Castillo y García, 2016).

**Esquema 2.** Procedimiento para Determinar la Actividad Antibacteriana de los Extractos de Hexano y Etanol de las Flores de *Cassia alata* L. por el Método de Difusión en Disco (Kirby-Baüer)



**Fuente:** García y Obregón, 2022

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

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Baüer y cols. 1966 (método de Kirby-Baüer), es un método cuantitativo, que se caracteriza por ser fácilmente estandarizable y que está indicado para microorganismos no exigentes de crecimiento rápido (Taroco, Seija y Vignoli, 2008). Esta prueba se desarrolló en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA), bajo la asesoría de las Profesoras Yndra Cordero e Ysbelia Obregón (Esquema 2).

### **Bacterias Estudiadas**

Para este estudio se seleccionaron cinco especies de bacterias: dos especies pertenecen a las bacterias grampositivas y tres pertenecientes a las bacteria gramnegativas de referencia internacional de la 58 Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), estas bacterias fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes a cargo de la Licenciada María Eugenia Nieves (Tabla 4).

**Tabla 4.** Cepas de Referencia Internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC)

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

Tomado y modificado de CLSI, 2021

### **Controles Positivos**

Para el estudio de la actividad antibacteriana de las bacterias ATCC ensayadas, se tomó en cuenta para la elección de los grupos controles positivos, las recomendaciones que establece el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos por sus siglas en inglés CLSI 2021, lo que permitió determinar qué tipo de antibiótico debe usarse con cada especie de las cepas (Tabla 5).

**Tabla 5.** Halos de Inhibición de los Controles Positivos Usados Como Referencia en las Cepas Bacterianas

| Cepas Bacterianas<br>ATCC                   | Halos de Inhibición en mm |    |                |    |                 |    |
|---|---------------------------|----|----------------|----|-----------------|----|
|   | E<br>(15 µg)              |    | AMP<br>(10 µg) |    | PIP<br>(100 µg) |    |
|   | CLSI                      | CE | CLSI           | CE | CLSI            | CE |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25923  | ≥ 23                      | 26 | -              | -  | -               | -  |
| <i>Enterococcus faecalis</i><br>ATCC 29212  | -                         | -  | ≥ 17           | 10 | -               | -  |
| <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922       | -                         | -  | -              | -  | ≥ 21            | 20 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853 | -                         | -  | -              | -  | ≥ 21            | 18 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i><br>ATCC 23357  | -                         | -  | -              | -  | ≥ 21            | 18 |

**Leyenda:** Lectura de los halos de la inhibición de los antibióticos realizados en el laboratorio frente a cepas ATCC: Eritromicina 15 µg (**E**), Ampicilina 10 µg (**AMP**), Piperacilina 100 µg (**PIP**), Milímetros (**mm**), Lectura de los halos de inhibición recomendados por el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínicos (**CLSI**), Halos de Cepas ensayadas obtenidos (**CE**).

**Fuente:** García y Obregón, 2022

### Preparación de las Muestras

El extracto vegetal realizado con etanol (solvente polar) de las flores de *C. alata* fue evaluado inicialmente en una concentración de 1.000 ppm.

### Preparación de Placas

Las placas de Petri se prepararon colocando aproximadamente 18 mL de Agar Müeller Hinton (Merck ®) estéril, dejándose solidificar a temperatura ambiente.

## **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 hacer el ensayo microbiano, debido a que en ese tiempo las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano (Anon, 2003).

## **Preparación de los Inóculos Bacterianos**

Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas, se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa estéril, tomándose de esta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en tubos 13x100 previamente estéril que contenían 5 mL de una solución de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0,9 % hasta que alcanzó una turbidez equivalente al patrón de Mac Farlán ( $10^{6-8}$  UFC/mL).

## **Inoculación de las Placas**

Luego de preparar las placas, se inocularon en forma homogénea en la superficie de cada una de ellas con cada uno de los inóculos bacterianos utilizando para ello un hisopo de algodón estéril.

## **Preparación de los Discos**

Se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los cuales se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), durante toda una noche.

## **Colocación de los Discos Impregnados**

En las placas de Petri con Agar Müller-Hinton previamente inóculados con cada cepa en estudio, se colocaron los discos impregnados con 10 µL de la dilución preparada a una concentración de 1.000 ppm del extracto a ensayar, además de los discos de antibióticos comerciales como control positivo con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar (Tabla 5) y como control negativo discos impregnados con 10 µL del solvente dimetil sulfóxido (DMSO); usando una pinza metálica previamente esterilizada.

## **Pre-incubación e Incubación de las Placas**

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

## **Lectura de las Placas**

Luego de ser incubadas cada una de las placas por un lapso de tiempo de 24 horas estas fueron revisadas para realizar la lectura de las mismas con una regla milimétrica. Donde se consideró un resultado positivo o sensible (presencia de actividad antibacteriana) cuando se observó un halo de inhibición alrededor del disco, y se tomó como resultado negativo o resistente (sin actividad antibacteriana) la ausencia de dicho halo. El diámetro de la zona de inhibición producto de la actividad antibacteriana de las muestras en estudio

se expresó en milímetros (mm) (Rodríguez, Gamboa, Hernández y García, 2005).

### **Diseño de Análisis**

Los datos recolectados en la fase interactiva del proceso de investigación fueron analizados a través de un enfoque cuantitativo, al expresar numéricamente los resultados de la actividad antibacteriana mediante la medición de halos de inhibición en milímetros (mm) relacionada al crecimiento bacteriano *in vitro* de cada una de las cepas en estudio contra la acción antibacteriana que pueda tener el extracto de la especie *C. alata*, de igual manera tendrán un enfoque cualitativo, al observar y describir los resultados obtenidos en las pruebas preliminares de identificación, que se llevan a cabo en el tamizaje fitoquímico (Palella y Martins, 2010).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### Resultados

Las flores de *Cassia alata* L. fueron sometidas a un proceso de reflujo en caliente realizando extractos con solventes de polaridad creciente (hexano y etanol) que fueron concentrados hasta la sequedad con la implementación de un rotavapor a presión y temperatura controlada obteniéndose extractos de hexano con un peso de 0,52 g y etanol con un peso constante de 2,88 g, los porcentajes de rendimiento se presenta en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Porcentajes de Rendimiento de los Extractos Vegetales de Hexano y Etanol de las Flores de *Cassia alata* L.

| Extractos de las Flores de <i>Cassia alata</i> | Rendimiento (%) |        |
|--|-----------------|--------|
|  | Hexano          | Etanol |
|  | 0,68            | 3,85   |

Fuente: García y Obregón, 2022

#### Análisis Fitoquímico Preliminar

Los extractos obtenidos a partir de las flores de la planta *Cassia alata* L., fueron sometidos a las distintas pruebas químicas preestablecidas para

conocer el grupo de metabolitos secundarios presentes en la muestra; siendo de forma cualitativa la revelación de cada uno de los componentes por fenómenos químicos de reacción como: viraje de color, precipitados, turbidez del medio, 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 de la planta en estudio (Tabla 8).

Las pruebas cualitativas demostraron que el extracto de hexano de las flores de *C. alata* poseen triterpenos y esteroides, siendo los últimos más abundantes, reflejándose por la aparición de un anillo de color verde intenso característico, a su vez se observó la aparición de un anillo rojo por la presencia de triterpenos en la muestra; sin embargo, para este mismo ensayo realizado al extracto de etanol se pudo evidenciar la positividad para triterpenos. Por otra parte, los compuestos fenólicos fueron estudiados en el extracto etanólico visualizando un ligero color verde, los flavonoides fueron reconocidos en ambos extractos, evidenciándose su presencia por la formación de un color rojo, siendo este más intenso en la evaluación del extracto de hexano que determina la presencia de flavonoides. De igual modo, las quinonas también fueron observadas debido a la aparición de un precipitado característico ligeramente rojo, mostrando así la positividad de estos metabolitos en las flores de la especie; finalmente, se muestra la positividad de las lactonas sesquiterpénicas al observar la rápida desaparición de un color rosa durante el ensayo. Por el contrario, los compuestos como alcaloides, saponinas, taninos, cumarinas, antraquinonas y glicósidos cardiotónicos se encuentran ausentes en los extractos ensayados (Tabla 7).

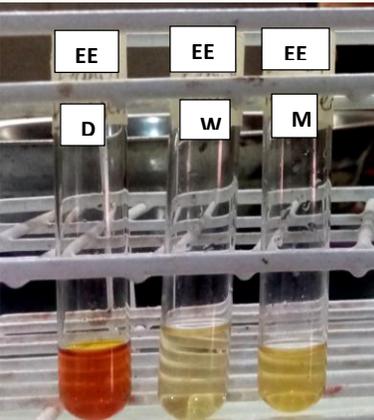
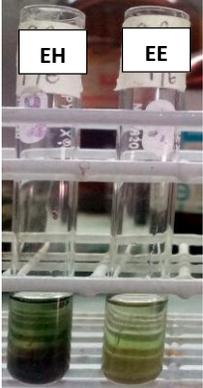
**Tabla 7.** Resultados del Tamizaje Fitoquímico Realizado a los Extractos Obtenidos de las Flores de *Cassia alata* L.

| Prueba Química                   | Extractos               |                          |
|----------------------------------|-------------------------|--------------------------|
|                                  | Hexano                  | Etanol                   |
| <b>Alcaloides</b>                |                         |                          |
| Dragendorff                      | ND                      | -                        |
| Wagner                           |                         | -                        |
| Mayer                            |                         | -                        |
| <b>Triterpenos/Esteroles</b>     |                         |                          |
| Liebermann Burchard              | ++<br>(Verde/ Rojo)     | +<br>(Verde)             |
| <b>Compuestos Fenólicos</b>      |                         |                          |
| FeCl <sub>3</sub>                | ND                      | +<br>(Ligeramente Verde) |
| <b>Saponinas</b>                 |                         |                          |
| Espuma                           | ND                      | -                        |
| <b>Taninos</b>                   |                         |                          |
| Gelatina al 1%                   | ND                      | -                        |
| <b>Flavonoides</b>               |                         |                          |
| Shinoda                          | -                       | -                        |
| NaOH al 10%                      | ++ (Rojo)               | + (Rojo)                 |
| <b>Cumarinas</b>                 |                         |                          |
| NH <sub>4</sub> OH               | ND                      | -                        |
| <b>Antraquinonas</b>             |                         |                          |
| NH <sub>4</sub> OH               | ND                      | -                        |
| <b>Quinonas</b>                  |                         |                          |
| H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>   | +<br>(Ligeramente Rojo) | -                        |
| <b>Lactonas Sesquiterpénicas</b> |                         |                          |
| Baljet                           | +<br>(Rosa)             | +<br>(Rosa)              |
| <b>Glicósidos Cardiotónicos</b>  |                         |                          |
| Kedde                            | -                       | -                        |

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

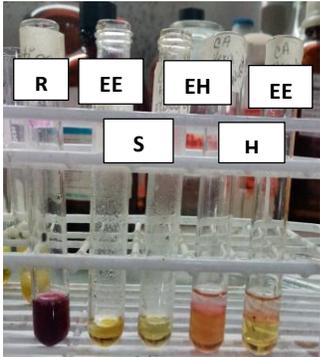
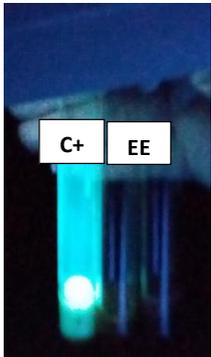
**Fuente:** García y Obregón, 2022

**Tabla 8.** Reporte de Resultados Ilustrados del Tamizaje Fitoquímico de los Extractos de las Flores de *Cassia alata* L.

|  |   |
|--|---|
| <p><b>Fotos de los Resultados para Alcaloides</b></p>   | <p><b>Fotos de los Resultados para Triterpenos/Esteroles</b></p>   |
| <p><b>Interpretación de los resultados</b><br/> <b>Metabolitos Determinados:</b> Alcaloides<br/> <b>Prueba:</b> Dragendorff (D), reactivo de Wagner (W) y reactivo de Mayer (M)<br/> <b>Reporte:</b> negativo para el extracto de etanol (EE) con los tres reactivos</p> | <p><b>Interpretación de los resultados</b><br/> <b>Metabolitos Determinados:</b> Triterpenos/ Esteroles<br/> <b>Prueba:</b> Liebermann-Burchard<br/> <b>Reporte:</b> positivo para el extracto de hexano (EH) (verde/violeta) y etanol (EE) (verde)</p> |
| <p><b>Fotos de los Resultados para Compuestos Fenólicos</b></p>   | <p><b>Fotos de los Resultados para Saponinas</b></p>   |
| <p><b>Interpretación de los resultados</b><br/> <b>Metabolitos Determinados:</b> Compuestos Fenólicos<br/> <b>Prueba:</b> Tricloruro Férrico<br/> <b>Reporte:</b> positivo para el extracto de etanol (EE) (ligeramente verde)</p>                                       | <p><b>Interpretación de los resultados</b><br/> <b>Metabolitos Determinados:</b> Saponinas<br/> <b>Prueba:</b> Altura y Estabilidad De Espuma<br/> <b>Reporte:</b> negativo para el extracto de etanol (EE)</p>   |

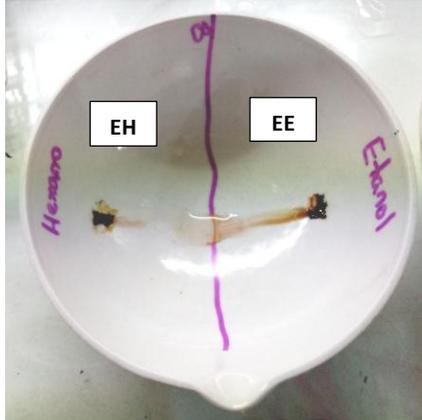
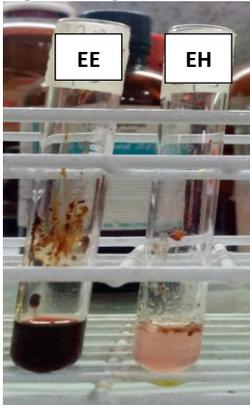
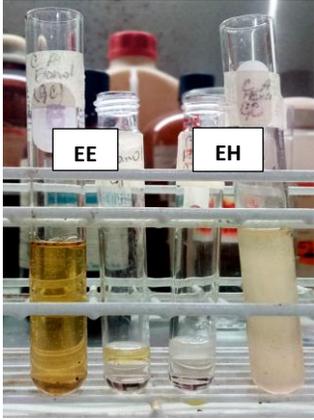
Fuente: García y Obregón, 2022

**Tabla 8.** Reporte de Resultados Ilustrados del Tamizaje Fitoquímico de los Extractos de las Flores de *Cassia alata* L. (Continuación)

|   |  |
|---|--|
| <p><b>Fotos de los Resultados para Taninos</b></p>   | <p><b>Fotos de los Resultados para Flavonoides</b></p>   |
| <p><b>Interpretación de los resultados</b><br/> <b>Metabolitos Determinados:</b> Taninos<br/> <b>Prueba:</b> Gelatina al 1 %<br/> <b>Reporte:</b> negativo para el extracto de etanol (EE)<br/>           Nota: Control positivo (C+)</p>                   | <p><b>Interpretación de los resultados</b><br/> <b>Metabolitos Determinados:</b> Flavonoides<br/> <b>Prueba:</b> Shinoda e Hidróxido de Sodio al 10 %<br/> <b>Reporte:</b> positivo para los extracto de hexano (EH) (rojo intenso) y etanol (EE) (rojo) en el ensayo de NaOH(H) al 10 % y negativo para ambos extractos en la prueba de Shinoda (S)<br/>           Nota: Rutina (R)</p> |
| <p><b>Fotos de los Resultados para Cumarinas</b></p>   | <p><b>Fotos de los Resultados para Antraquinonas</b></p>    |
| <p><b>Interpretación de los resultados</b><br/> <b>Metabolitos Determinados:</b> Cumarinas<br/> <b>Prueba:</b> Hidróxido de Amonio Concentrado<br/> <b>Reporte:</b> negativo para el extracto de etanol (EE)<br/>           Nota: Control positivo (C+)</p> | <p><b>Interpretación de los resultados</b><br/> <b>Metabolitos Determinados:</b> Antraquinonas<br/> <b>Prueba:</b> Hidróxido de Amonio Concentrado<br/> <b>Reporte:</b> negativo para el extracto de etanol (EE)</p>   |

**Fuente:** García y Obregón, 2022

**Tabla 8.** Reporte de Resultados Ilustrados del Tamizaje Fitoquímico de los Extractos de las Flores de *Cassia alata* L.

|   |   |
|---|---|
| <p>Fotos de los Resultados para Quinonas</p>   | <p>Fotos de los Resultados para Sesquiterpenolactonas</p>    |
| <p><b>Interpretación de los resultados</b><br/> <b>Metabolitos Determinados:</b> Quinonas<br/> <b>Prueba:</b> Ácido Sulfúrico Concentrado<br/> <b>Reporte:</b> positivo para el extracto de hexano (EH) (ligeramente rojo) y negativo para el extracto de etanol (EE)</p> | <p><b>Interpretación de los resultados</b><br/> <b>Metabolitos Determinados:</b> Lactonas Sesquiterpénicas<br/> <b>Prueba:</b> Baljet<br/> <b>Reporte:</b> positivo para los extracto de hexano (EH) y etanol (EE) (rosa)</p> |
| <p>Fotos de los Resultados para Glicósidos Cardiotónicos</p>   |   |
| <p><b>Interpretación de los resultados</b><br/> <b>Metabolitos Determinados:</b> Glicósidos Cardiotónicos<br/> <b>Prueba:</b> Kedde<br/> <b>Reporte:</b> negativo para ambos extractos</p>  |   |

**Fuente:** García y Obregón, 2022

## Evaluación de la Actividad Antibacteriana

En cuanto a la determinación de la actividad antibacteriana de la especie vegetal en estudio se realizó por medio del método de difusión en disco (Kirby-Baüer), evaluando el extracto de etanol realizado a partir de las flores de la planta, probado a una concentración madre de 1.000 ppm de solución, frente a diferentes cepas de referencia internacional como lo son *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 (Tabla 4), para ello se aplicaron controles positivos de antibióticos comerciales (Tabla 5). Los resultados obtenidos del extracto ensayado frente a los microorganismos de prueba se muestran en la Tabla 9 y la Figura 21.

**Tabla 9.** Resultados Obtenidos para la Determinación de la Actividad Antibacteriana de los Extractos de las Hojas de *Cassia alata* L.

| Muestra ensayada        | Bacterias ATCC (mm)         |                               |                           |                                 |                                 |
|-------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
|                         | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 |
| Concentración 1.000 ppm |                             |                               |                           |                                 |                                 |
| EE                      | 8                           | ID                            | 7                         | 0                               | 7                               |
| DMSO (C-)               | 0                           | ID                            | 0                         | 0                               | 0                               |

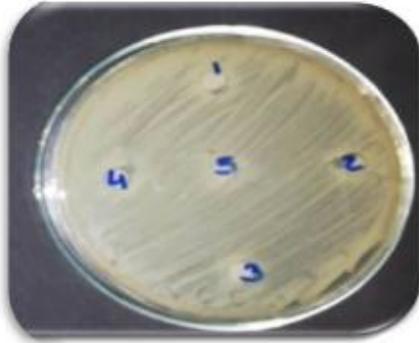
**Legenda:** EE: Extracto de Etanol. mm: Milímetros. DMSO: Dimetil Sulfoxido.

**C-:** Control negativo. **ID:** Indeterminado.

**Fuente:** García y Obregón, 2022

**Figura 21.** Reporte de los Resultados Ilustrados de la Actividad Antibacteriana del Extracto de Etanol de las Flores de *Cassia alata* L.

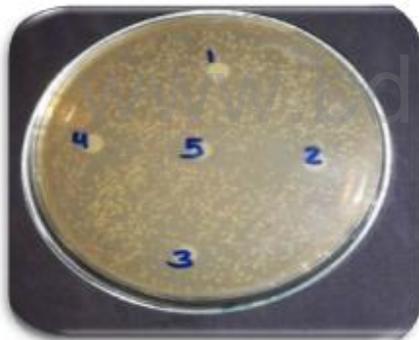
***Pseudomonas aeruginosa***



***Staphylococcus aureus***



***Escherichia coli***



***Klebsiella pneumoniae***



**Leyenda:** Extracto de Etanol (2), Dimetil Sulfóxido (5)

**Fuente:** García y Obregón, 2022

## Discusiones

Este trabajo fue enfocado a la determinación de la actividad antibacteriana y el tamizaje fitoquímico de los extractos de las flores de *Cassia alata*, en tal sentido por medio del reflujo en caliente y su respectiva concentración en un rotaevaporador se obtuvieron extractos vegetales de hexano y etanol de las flores de la especie estudiada, a los cuales se les realizó un screening preliminar por medio de reacciones químicas cualitativas en las que se demostraron la presencia de metabolitos secundarios. En la evaluación del extracto de hexano pudimos evidenciar la presencia de triterpenos y esteroides, además de observar reacciones positivas para los ensayos de hidróxido de sodio, ácido sulfúrico y la prueba de baljet siendo estos usados para la identificación de metabolitos como lo son flavonoides, quinonas y lactonas sesquiterpénicas respectivamente, además de observar la ausencia de glicósidos cardiotónicos en mencionado extracto.

Así mismo, el extracto de etanol presentó positividad en compuestos fenólicos, esteroides, flavonoides y lactonas sesquiterpénicas, en igual forma al evaluar compuestos tales como alcaloides, saponinas, taninos, cumarinas, antraquinonas, quinonas y glicósidos cardiotónicos pudimos notar la ausencia de estos al aplicar el tamizaje fitoquímico correspondiente. En cuanto al análisis antibacteriano posteriormente realizado, implementamos el método de difusión en disco (Kirby-Baüer) permitiéndonos conocer la actividad presentada por el extracto de etanol en cepas bacterianas de referencia internacional (ATCC), arrojando resultados indicativos de tener actividad biológica activa frente a *Staphylococcus aureus* con resultado de 8 mm de diámetro en el halo de inhibición, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con 7 mm en la inhibición resultante a una concentración de 1.000 ppm, sin embargo, se observó que el extracto ensayado fue inactivo contra cepas de *Klebsiella pneumoniae*.

El cribado fitoquímico elaborado por Khurm, Wang, Zhang, Nawaz, Naeem, Hayat, Saqib, Zhang, Zhan y Guo, en el 2020, a partir de todos los órganos vegetales (hojas, tallos, raíces, flores y frutos) de las especies pertenecientes al género *Cassia* se aislaron e identificaron grupos destacados de metabolitos secundarios de los extractos de hexano, cloroformo, éter de petróleo, acetato de etilo, etanol y metanol que incluyen flavonoides, alcaloides, antraquinonas esteroides, fenilpropanoides y  $\gamma$ -naftopironas; los investigadores realizaron la actividad antibacteriana por el método de dilución en caldo de los ejemplares botánicos de dicho género comprobando que los extractos de metanol de la planta entera de *C. alata* presenta acción inhibitorios del 100 % en el crecimiento de *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium diphtheriae* a una concentración de 400 ppm. El presente estudio se correlaciona con los resultados de esta investigación ya que demostraron la presencia de flavonoides y esteroides las cuales se determinaron en las pruebas cualitativas de laboratorio ensayadas, además de comprobar que los extractos de dicha especie son activos frente a *S. aureus*.

Dentro de este orden de ideas, Hakim, Yulizar y Apriandanu en el año 2020, implementaron la extracción con solventes como hexano y agua para evaluar la presencia de metabolitos secundarios arrojando positividad para alcaloides, esteroides, flavonoides y saponinas mediante pruebas estándares de laboratorio; para los extractos se utilizaron las hojas de *C. alata* las cuales fueron secadas a temperatura ambiente bajo sombra, para ser molidas y sometidas a maceración por 10 días para preparar el extracto crudo de hexano y ser sometido a reacciones cualitativas. Esta investigación se correlaciona con la nuestra aunque los investigadores demostraron la existencia de alcaloides y saponinas, esto podría deberse a la parte de la planta sometida a estudios. Por otro lado, la investigación fitoquímica de los extractos de etanol, hidroalcohol y agua de las flores y hojas secas a través de pruebas

cualitativas de laboratorio del género botánico en estudio elaborada por Kumar, Anburaj y Vasantha en el distrito Thanjavur-India en el año 2016 confirma la alta presencia de flavonoides, compuestos fenólicos y terpenos presente en las flores de color amarillo oro, dando también a conocer que los metabolitos que más abundan en las hojas son los alcaloides, antraquinonas, taninos coincidiendo con nuestros resultados.

Somchit, Reezal, Elysha y Mutalib (2003) en Malasia, determinaron la actividad antibacteriana *in vitro* por el método de difusión en disco realizado en los extractos de etanol y agua de las hojas y la corteza de *C. alata*, la extracción a partir de las muestras secas se realizó utilizando un aparato de soxhlet llevándolos hasta sequedad por congelación durante 48 horas, los investigadores revelaron que estos inhibían el crecimiento de *Staphylococcus aureus* de manera dependiente de la concentración; la actividad antibacteriana se detectó a una concentración de 15 ppm para el extracto etanólico de las hojas y a una concentración de 10 ppm para los extractos de agua, mostrando zonas de inhibición de 13 mm y 10 mm respectivamente, no hubo actividad por parte de los extractos (etanol y agua) realizados de la corteza de la planta; lo anteriormente expuesto ratifica el potencial medicinal por parte de nuestro objeto de exploración.

En el año 2015 (India); Raji, Sreenidhi, Sugithra, Renugadevi y Samrot, realizaron un trabajo de investigación con el objetivo de detectar compuestos fitoquímicos y estudiar la bioactividad de las hojas de *C. alata*, llevándose a cabo la extracción con cloroformo, éter de petróleo, etanol y agua con 10 g de la muestra previamente seca y molida con 100 mL de cada solvente, identificándose en la evaluación preliminar fitoconstituyentes inherentes presentes en la planta, identificando del solvente etanólico: flavonoides, terpenoides, esteroides, fenoles y alcaloides, mientras que los extractos acuosos, el de éter de petróleo y cloroformo exhibieron los compuestos ya mencionados más la presencia de glicósidos, saponinas, carbohidratos y

proteínas. Los extractos de cloroformo y etanol evaluados por el método de difusión en pozo a concentraciones de 1.000 ppm, presentaron buena actividad antibacteriana frente a cepas de *S. aureus*, *Bacillus* sp. y *Salmonella* sp., demostrando que este último es más vulnerable a mencionados extractos mostrando halos de inhibición que oscilan alrededor de 20 mm, cabe resaltar que todos los extractos fueron capaces de inhibir los microorganismos probados. Finalmente estos hechos hacen alusión a la buena acción antibacteriana y posiblemente anticancerígena por la cual se decidió determinar dicha actividad.

Sin embargo, Essiett y Bassey (2013), plantearon la realización de cribado fitoquímico y comparación nutricional de 3 géneros e pertenecientes a la familia Fabaceae en Nigeria entre las cuales destaca *Senna alata*, para la determinación de los metabolitos secundarios el material vegetal de elección en este caso fueron las flores de las especies vegetales para la elaboración de los extractos, para ello usaron una mezcla de 50 % de etanol más agua destilada, los pétalos se secaron al aire libre siendo molidos hasta polvo con ayuda de un mortero, luego fueron puestos en maceración en frío a temperatura ambiente durante 72 horas, pasado ese tiempo se filtraron y concentraron al vacío a 40 °C para realizar las pruebas cualitativas. Los resultados demuestran la presencia de glucósidos cardiotónicos, saponinas, taninos y flavonoides siendo este último compuesto responsable de una amplia variedad de actividades terapéuticas como antihipertensivo, antirreumático, antioxidante y antimicrobiano. Los investigadores pautaron requisitos mínimos que aseguraran la presencia de importantes compuestos del metabolismo de la planta con actividad biológica que ayudase a la determinación de otros estudios, siendo este la humedad que no debería sobrepasar el valor de 14 %, determinando así la utilización no solo de las flores de esta familia sino que también las demás partes del arbusto en el alivio de distintas afecciones; este trabajo a pesar que difiere en cuanto a la metodología para la elaboración de

los extractos vegetales y los resultados recolectados para la elaboración de este manuscrito se correlaciona con la importancia de detectar compuestos que ayuden a la población en cuanto enfermedades infecciosas en las que se dificulta la eliminación del agente causante del malestar.

Adentrándose en la búsqueda de la citotoxicidad provocada por los extractos de las hojas de *Cassia alata*, en Malasia Fadzureena, Mazura, Adiana y Hani (2013), secaron el material vegetal en estufa a 45 °C para proceder a la respectiva maceración en frío con hexano y cloroformo por 3 días con cada solvente, al paso de este tiempo se concentraron con la ayuda de un evaporador rotatorio para luego ser envasados y almacenados a -20 °C para después ser utilizados en las pruebas químicas, mismas que en los resultados se evidenciaron la presencia de significativos fitoquímicos como flavonoides y esteroides. Todos los extractos y compuestos aislados exhibieron muy bajo efecto citotóxico hacia las líneas celulares normales indicando seguridad para el tratamiento de condiciones asociados a la inflamación; los datos evidenciados por estos investigadores se correlacionan con los recolectados por parte de nuestro extracto de hexano de las flores de *C. alata*.

Según, Rekha, Vasavi, Vipin, Saptami y Arun en el año 2016 (India), demostraron que la actividad inhibidora de quórum sensing (QS) de los metabolitos de *Cassia alata*, teniendo especial interés en combatir la resistencia a los medicamentos, esta hierba medicinal es importante en todo el mundo siendo utilizada para combatir infecciones causadas por microorganismos. Se preparó un extracto de etanol por cromatografía en capa fina a partir de las hojas de la planta, además de la extracción de una fracción purificada rica en flavonoides, la cual fue probada por el método de difusión en pozo mostrando actividad contra la detección de quórum en *Chromobacterium violaceum* y también fue eficaz contra la atenuación de los factores de virulencia controlados por QS en *Pseudomonas aeruginosa*. La actividad se atribuye a la rica composición de flavonoides de la planta, mostrando

resultados de inhibición de un 50 % de la producción de violaceína en *C. violaceum* con zonas de inhibición de 20 mm a una concentración de 50 ppm de la fracción purificada del metabolito y por consiguiente una inhibición significativa de los factores de virulencia de *P. aeruginosa* mostrando zonas de inhibición de 12 mm; formulando así la posibilidad de desarrollar fármacos a partir de los compuestos aislados de la planta contra infecciones causadas por la patogenicidad de bacterias mediada por detección de quórum; confirmando la actividad antibacteriana frente a *P. aeruginosa* la cual fue previamente ensayada.

Finalmente en Nigeria, Okooboh y Gambo (2013) realizaron una caracterización fitoquímica de las hojas de *C. alata* en las que se extrajeron sucesivamente con hexano y acetato de etilo con extractor soxhlet, cada extracto se concentró al vacío, se purificó las fracciones con la utilización de cromatografía, posteriormente se mantuvieron en desecadores durante 3 días antes de realizar las pruebas químicas, demostrando por medio de la evaluación fitoquímica preliminar del extracto de hexano la presencia de antraquinonas libres, flavonoides, esteroides y saponinas las cuales confieren propiedades biológicas a la especie botánica en estudio.

Las evaluaciones fitoquímicas realizadas por los investigadores anteriormente mencionados revelara que existe una variación de los metabolitos secundarios presentes en la especie en estudio a pesar de ser la misma planta con la que se realizaron los trabajos, debido a los factores geográficos y climáticos presentes en la zona de recolección del material botánico, por consiguiente es de esperar que la actividad antibacteriana de los extractos vegetales varíe en los estudios microbiológicos (Marinez y cols., 1996; Oladeji y cols., 2020).

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

Los extractos de hexano y etanol de las flores de *Cassia alata* L. evidenciaron la presencia de triterpenos, esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides y lactonas sesquiterpénicas, demostrándose la ausencia de alcaloides, saponinas, taninos, cumarinas, antraquinonas, quinonas y glicósidos cardiotónicos.

La actividad antibacteriana de los extractos de las flores de *C. alata* determinada frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* indica que las muestras analizadas presentan actividad antibacteriana, con halos de inhibición entre 7-8 mm, con una concentración de 1.000 ppm, siendo las bacterias grampositivas las que presentaron mayor sensibilidad.

La composición química de los extractos realizados con las flores de la especie ensayada según los resultados obtenidos y las referencias consultadas son similares.

## Recomendaciones

Estudiar los tallos y raíces de la especie botánica *Cassia alata* para identificar los metabolitos secundarios y determinar la actividad antibacteriana.

Realizar estudios fitoquímicos a los extractos elaborados a partir de solventes polares.

Ensayar la actividad antibacteriana que puedan presentar los extractos obtenidos con hexano.

Utilizar el método de difusión en pozo para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de las de *C. alata*.

Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) para establecer la concentración más baja del extracto a la que puede inhibir el crecimiento bacteriano.

Implementar técnicas cromatográficas para separar e identificar los metabolitos secundarios que se encuentren presentes en mayor cantidad en los extractos de las flores de *C. alata* L.

Evaluar la actividad antioxidante, anticancerígena y antiparasitaria de los extractos de las flores de la especie en estudio.

## BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Albornoz, A. (1980). *Productos naturales: estudio de sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Caracas: Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela.
- Albornoz, A. (1992). *Medicina Tradicional Herbaria. Guía de Fitoterapia*. Caracas-Venezuela: Instituto Farmacoterápico Latino S.A.
- Anon, C. (2003). Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*; 9 (1):11-25.
- Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). México. [Online] Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Cassia%20alata&id=7835>
- Ávalos, A., y Pérez, E. (2009). Metabolitos secundarios de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*; 2 (3): 119-145.
- Bianco, C., y Kraus, T. (1997). Observaciones sobre las especies de *Senna* (Leguminosae-Caesalpinioideae) del sur de la provincia de Córdoba. *Multequina*; 6: 33-47.
- Bonatti, A. (1991). Formulation of plant extracts into dosage form. En R. O. B. Wijesekera (Ed.), *The Medicinal Plant Industry London: CRC Press*; 4:106-107.
- Baharudin, M., Hamid, S., and Susanti, D. (2015). Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from Three Aromatic Plants of the Zingiberaceae Family in Malaysia. *Journal of Physical Science*; 26(1): 71-81.
- Bravo, L. (1977). Estudio morfológico y taxonómico del género *Cassia* (Leguminosae) en la Argentina: Sección *Chamaesenna*, serie *Aphyllae* y serie *Pachycarpae*. Universidad de Buenos Aires., Facultad de

Ciencias Exactas y Naturales., Argentina. Trabajo de tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Biológicas.

- Carpio, J., and Ambida, (2019). Antibacterial activity of *Cassia alata* Linn (Acapulco) roots and barks crude extracts. *Advance Pharmaceutical Journal*; 4(1):15-19.
- Carvajal, L., Uribe, Y., Sierra, N. y Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos Schultesiana krukoff*). *Revista Colombia Forestal*; 12: 161-170.
- Castañeda, R., Gutiérrez, H., Carrillo, E. y Sotelo, A. (2017). Leguminosas (Fabaceae) silvestres de uso medicinal del distrito de Lircay, provincia de Angaraes (Huancavelica, Perú). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*; 16(2):136-149.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2021). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Global Laboratory Standards for a Healthier World; 6(1):1-12.
- Coy, C., Parra, J., y Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (Rutaceae). *Revista Elementos*; 4: 31-39.
- Croteau, R., Kutchan, T., y Lewis, N. (2000). Natural products (Secondary metabolites). pp. 1250-1318. In: B. Buchanan., W. Gruissem., and R. Jones R. (eds.). Bioquímica y biología molecular de plantas. *American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA*; 24:13-67.
- Crockett, C., Guede, F., Pugh, D., Vangah, M., Robinson, T., Olubadewo, J. and Ochillao, R. (1992). *Cassia alata* and the preclinical search for therapeutic agents for the treatment of opportunistic infections in AIDS patients. *Cellular Molecular Biology*; 38: 799-803.

- Damodaran, S. and Venkataraman, S. (1994). A study on the therapeutic extract against *Pityriasis versicolor*, *Journal of Ethnopharmacology*; 42: 19-23.
- Del Vitto, L., Petenatti, E., y Petenatti, M. (1997). Recursos herbolarios de San Luis (República Argentina) Primera parte: plantas nativas. *Multequina*; 6: 49-66.
- Deshpande, H. and Bhalsing, S. (2013). Recent advances in the phytochemistry of some medicinally important *Cassia* species: A review. *International Journal of Pharma Medicine and Biological Sciences*; 2(3):60-78.
- Diastuti, H., Syah, Y., Juliawaty, L. and Singgih, M. (2014). Antibacterial *Curcuma xanthorrhiza* extract and fractions. *Journal of Mathematical and Fundamental Sciences*; 46(3): 224-34.
- Domínguez, M. (2002). Elucidación estructural y actividad antimicrobiana de los metabolitos presentes *Rhoeo discolor* L Her Hance. Universidad de Colima., Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. México-Colima. Trabajo de grado para la obtención del título de Doctor en Ciencias en el Área de Biología.
- Domínguez, X. (1973). *Método de investigación fitoquímica*. Primera edición. México: Editorial Limusa.
- Djeussi, D., Noumedem, J., Seukep, J., Fankam, A., Voukeng, I. and Tankeo, S. (2013). Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *BMC Complementary Alternative Medicine*; 13: 164.
- Esimone, C., Nworu, C., Ekong, U. and Okereke, B. (2008). Evaluation of the antiseptic properties of *Cassia alata*-based herbal soap. *International Journal of Modern and Alternative Medicine Research*. 6: 23-32.
- Essiett, U. and Basse, I. (2013). Comparative Phytochemical Screening and Nutritional Potentials of the Flowers (petals) of *Senna alata* (L) roxb,

- Senna hirsuta* (L.) Irwin and barneby, and *Senna obtusifolia* (L.) Irwin and barneby (Fabaceae). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*; 3 (08): 97-100.
- Fadzureena, J., Mazura, M., Adiana, M., and Hani, I. (2013). An Investigation into the Inhibitory Effects of *Senna alata* L. Leaf Extract As well As Its Isolated Compound on Xanthine Oxidase Assay. *Forest Research Institute Malaysia (Conference on Forestry and Forest Products Research)*; 5: 262-264.
- Fotso, S., Tcho, A., Tekapi, W, Ndjakou, B., Nguéfeu, C., Duplex, J., and Toze, F. (2021). Chemical constituents and antimicrobial activities of some isolated compounds from the Cameroonian species of *Senna alata*. *Trends in Phytochemical Research*; 5(1):37-43.
- García., D. (2015). Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de dos especies de plantas del género *Amaranthus* aplicado sobre cepas de interés clínico. Universidad Nacional de Chimborazo., Facultad de Ciencias de la Salud. Riobama-Ecuador. Tesina de grado previa a la obtención del título de Licenciada en Laboratorio Clínico e Histopatológico.
- Goh, M., Basri, A., Yasin, H., Taha, H. and Ahmad, N. (2017). Ethnobotanical review and pharmacological properties of selected medicinal plants in Brunei Darussalam: *Litsea elliptica*, *Dillenia suffruticosa*, *Dillenia excelsa*, *Aidia racemosa*, *Vitex pinnata* and *Senna alata*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*; 7(2): 173–180.
- Gupta, D. and Singh, J. (1991). Flavonoid glycosides from *Cassia alata*. *Phytochemistry*; 30: 2761-2763.
- Hakim, F., Yulizar, Y. and Apriandanu, D. (2020). Phase system of hexane-water for SnO<sub>2</sub> nanoparticles preparation using *Cassia alata* leaf extract and its photocatalytic activity. *Materials Science and Engineering*; 902: 1-6. doi:10.1088/1757-899X/902/1/012016

- Hemlata, B. and Kalidhar, S. (1993). Alatinone, an anthraquinone from *Cassia alata*. *Phytochemistry*; 32:1616-1617.
- Hemlata, B. and Kalidhar, S. (1994). Alatinol, an anthraquinone from *Cassia alata*. *Indian Journal of Chemistry*; 33B: 92-93.
- Hennebelle, T., Weniger, B., Joseph, H., Sahpaz, S. and Bailleul, F. (2009). *Senna alata*. *Phytochemistry*; 80(7):385-393.
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, L. (2010). *Metodología de la investigación*. Quinta edición. Perú: McGrawHill.
- Hurtado, J. (2010). *El proyecto de investigación. Comprensión holística de la metodología y la investigación*. Sexta edición. Caracas: Ediciones Quirón.
- Hurtado, J. (2010). *Guía para la comprensión holística de la ciencia*. Tercera edición. Caracas: Fundación Sypal.
- Ibrahim, D. and H. Osman, H. (1995). Antimicrobial activity of *Cassia alata* from Malaysia, *Journal of Ethnopharmacology*; 45: 151-156.
- Iwalewa, E., Oguntoye, L., Rai, P. and Iyaniwura, T. (1997). *In vivo* and *in vitro* antimalarial activity of two crude extracts of *Cassia occidentalis* leaf. *Nigeria Journal of Pharmaceutical Sciences*; 5:23-28.
- Jain, P., Bansal, D. and Bhasin, P. (2009). Antibacterial activity of aqueous plant extracts against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Drug Invention Today*; 2(4): 220-222.
- Khan, M., Kihira, M. and Omoloso, A. (2001). Antimicrobial activity of *Cassia alata*, *Fitoterapia*; 75: 561-564.
- Koneman, W. (2008). *Diagnostico microbiológico*. 6° edición. Buenos Aires-Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Kumar, A., Divya, B., Lavanya, G., Navya, K., Apparaon, K., Santhosh, P., Kumar, P. and Satyanarayana, T. (2016). Formulation and evaluation of the antibacterial activity of a topical antifungal herbal gel containing

- ethanolic extracts of *Cassia alata* Linn. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 6 (4):1-16.
- Kumar, S., Anburaj, G. and Vasantha, V. (2016). Phytochemical Investigation of Ethanol, Methanol, Hydro-Alcoholic and Aqueous Flower Extracts of *Cassia* Species. *Asian Journal of Innovative Research*; 1(3):32-35.
- Lamarque, A., Zygadlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M. y Maestri, D. (2008). *Fundamentos Teórico-Prácticos de Química Orgánica*. 1° edición. Córdoba, Argentina: Editorial Encuentro.
- Liu, A., Xu, L., Zou, Z. and Yang, S. (2009). Studies on chemical constituents from leaves of *Cassia alata*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*; 34: 861-863.
- Llamas, F. y Acedo, C. (2016). Las leguminosas (Leguminosae o Fabaceae): una síntesis de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la familia a lo largo del tiempo. *AmbioCiencias*; 14: 5-18.
- Mahdi, A., Zamzani, I. and Nashihah, S. (2022). Antibacterial activity of *Cassia alata* stems ethanol extract against *Staphylococcus aureus*. *Acta Pharmaciae Indonesia: Acta Pharmaceutica Indonesia*; 10 (1): 1-5. Doi: <https://doi.org/10.20884/1.api.2022.10.1.5462>
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Universidad Central de Venezuela: Caracas.
- Martínez, M., Betancourt, J., Alonso, N. and Jauregui, A. (1996). Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*; 52(3): 171-174.
- Mercado, J., Jiménez, L. y Sánchez, L. (2011). Polen de las Magnoliopsida en el Volcán (Pamplona, Colombia) I: familias Apiaceae, Asteraceae, Cunoniaceae, Ericaceae, Fabaceae y Gentianaceae. *Caldasía*; 33 (2): 619-635.
- Morales, S. y Ladio, A. (2008). Plantas medicinales en una comunidad Mapuche del NO de la Patagonia Argentina: clasificación y percepciones organolépticas relacionadas con su valoración. *Boletín*

- Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*; 7: (3), 149 – 155.
- Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2009). *Microbiología médica*. 6° edición. España-Barcelona: Elsevier Mosby.
- Núñez, C. (2008). Extracción con Soxhlet. Texto libre y gratis para usos no lucrativos nombrando la fuente: [www.cenunez.com.ar](http://www.cenunez.com.ar).
- Ogunwande, I., Flamini, G., Cioni, P., Omikorede, O., Azeez, A., Ayodele, A. and Kamil, Y. (2010). Aromatic Plants growing in Nigeria: Essential Oil Constituents of *Cassia alata* (Linn.) Roxb. and *Helianthus annuus* L. *Records of Natural Products*; 4(4):211-217.
- Okooboh, M. and Gambo, N. (2013). Fitoquímica y actividad antimicrobiana de las hojas de *Cassia alata* Linn. *Chemistry and Materials Research*; 3 (3): 20-31.
- Oladeji, O., Adelowo, F., Oluyori, A. and Bankole, D. (2020). Ethnobotanical Description and Biological Activities of *Senna alata*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*; 20:1-12. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/2580259>
- Otto, R., Ameso, S. and Onegi, B. (2014). Evaluation of the antibacterial activity of the crude extracts of the leaves and roots of *Cassia alata* against *Neisseria gonorrhoea*. *African Health Sciences*; 14 (4):1-8.
- Palanichamy, S. and Nagarajan, S. (1990). Analgesic activity of *Cassia alata* leaf extract and kaempferol 3-Osophoroside. *Journal of Ethnopharmacology*; 29: 73-78.
- Palanichamy, S., Nagarajan, S. and Devasagayam, M. (1988). Effect of *Cassia alata* leaf extract on hyperglycemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*; 22: 81-90.
- Parella, S., y Martins, F. (2012). *Metodología de la investigación cuantitativa*. 3° ed. Caracas: FEDUPEL.

- Pauly, G., Danoux, L. and Contet, J. (2002). Method for analysing the ageing of the skin by inducing apoptosis in cell cultures and screening the effects of cosmetic substances. *The International Patent System, International Applications*; 2:8 Coden: PIXXD2WO 0221127 A2 20020314.
- Pereira, S., Vega, D., Almeida, M. y Morales, G. (2009). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas de la *Trichilia hirta* L. *Revista Química Viva*; 3 (8): 1-6. [Página Web]. Disponible en: [www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar](http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar)
- Pérez, H. y Robles, A. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*; 4(3):186-191.
- Prasanna, R., Harish, C., Pichai, R., Sakthisekaran, V. and Gunasekaran, P. (2009). Anti-cancer effect of *Cassia alata* L., *Cassia fistula* L. and *Cassia tora* L. *Songklanakarín Journal of Science and Technology*; 26(5):741-748.
- Raji, P., Sreenidhi, J., Sugithra, M., Renugadevi, K. and Samrot, A. (2015). Phytochemical Screening and Bioactivity Study of *Cassia alata* Leaves. *Biosciences Biotechnology Research Asia*; 2 (12):291-296.
- Ramírez, L. y Marín, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*. 15 (42): 110-117.
- Rea, J. (2012). Determinación de la Actividad Antimicrobiana del Extracto Etanólico y Subextractos Etéreo y Clorofórmico de (*Drymaria ovata*), (*Senna macrophylla*) y (*Tagetes filifolia* Lag). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo., Facultad de Ciencias., Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba-Ecuador., Trabajo de grado para la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico.
- Rekha, P., Vasavi, H., Vipin, C., Saptami, K. and Arun, A. (2016). A medicinal herb *Cassia alata* attenuates quorum sensing in *Chromobacterium*

- violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiology*; 64:231-238. doi:10.1111/lam.12710.
- Rivas, C., Oranday, M. y Verde, M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. *Omnia Science (Omnia Publisher SL)*; 1:452.
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F. y García, J. (2005). *Bacteriología general: Principios y Prácticas de Laboratorio*. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.
- Rodríguez, R., Vidrio, H. y Campos, A. (2009). *Guía de farmacología y terapéutica*. 2° edición. México: Mc Graw Hill.
- Rodríguez, S. y Gámez, L. (2010). Clave vegetativa para la identificación de árboles de la familia Fabaceae de la Ciudad de Mérida, Venezuela. *Pittieria*; 34: 89-111.
- Sánchez, E., Castillo, S. y García, P. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: Omnia Science. 77-100.
- Sánchez, J. (2003). *Flora ornamental de la región de Murcia*. Madrid-España. Mundi-Prensa.
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. 1° Edición. Área de Ciencia y Tecnología de Convenio Andrés Bello. Bogotá-Colombia. *CYTED*; 2(3):198.
- Singh, S., Singh, S., and Yadav, A. (2013). A review on *Cassia* species: Pharmacological, traditional and medicinal aspects in various countries. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*; 1(3); 291-312.
- Somchit, M., Reezal, I., Elysha I. and Mutalib A. (2003). *In vitro* antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. *Journal of Ethnopharmacology*; 84(1): 1-4.
- Tomás, L. (2015). Caracterización analítica y funcional de extractos con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas del género *Citrus*.

Universidad Miguel Hernández de Elche., Instituto de Biología Molecular y Celular. España-Alicante. Trabajo de postgrado para la obtención del título Doctora en Biología.

- Taroco, R., Seija, V. y Vignoli, R. (2008). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Editorial UdelaR. Departamento de Bacteriología y Virología. Facultad de Medicina. Oficina del Libro. 3ª Edición. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Montevideo-Uruguay. Oficina del Libro FEFMUR.
- Torrades, S. (2001). Uso y abuso de los antibióticos. *ELSEVIER*; 20(8):82-93.
- Torres C., Vega D. y Garibaldi, O. (2006). Procedimiento para la Prueba de Percolación. Centro de Investigaciones Hidráulicas e Hidrotécnicas Área de Hidráulica, Universidad Tecnológica de Panamá.
- Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología*. 9º edición. Buenos Aires-Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Verde, M., García, S. y Rivas, C. (2016). Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. Investigación en plantas de importancia médica. Barcelona-España. *Omnia Science*; 5:1-40.
- Villasenor, I., Canlas, A., Pascua, M., Sabando, M. and Soliven, L. (2002). Bioactivity studies on *Cassia alata* L. leaf extracts, *Phytotherapy Research*; 16: 93-96.
- Vivekanandan, K. and Ajeesh, P. (2018). Phytochemical Screening and Antibacterial Evaluation of the Leaf and Root Extracts of *Cassia alata*. *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology*; 6(3):820-826.
- Wai, L. and Bassler, B. (2015). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual Review of Genetics*; 43:197-222. Doi: [10.1146/annurev-genet-102108-134304](https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134304)

- Walton, N. and Brown, D. (1999). Chemicals from Plants: Perspectives on Plant Secondary Products. *Imperial College Press*; 1:1-9. [Online]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1142/3203>
- Wikaningtyas, P. and Sukandar, E. (2016). The antibacterial activity of selected plants towards resistant bacteria isolated from clinical specimens. *Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine*; 6(1):16-19.
- World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva: World Health Organization. [Online]. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112647/1/WHO\\_HSE\\_PED\\_AIP\\_2014.2\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112647/1/WHO_HSE_PED_AIP_2014.2_eng.pdf)
- Yadav, S. and Kalidhar, S (1994). Alquinone: an anthraquinone from *Cassia alata*. *Planta Médica*; 60:601.
- Yen, G. and Chuang, D. (2000). Antioxidant properties of water extracts from *Cassia tora* L. in relation to the degree of roasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 48(7):2760-2765.
- Zambrano, L., Buenaño, M., Mancera, N. y Jiménez, E. (2015). Estudio etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la Parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador. *Revista Universidad y Salud*; 17(1): 97-111.

# ANEXOS

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



CAESALPINIACEAE

Senna - alata

