



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



**TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS
EXTRACTOS OBTENIDOS DE *Anacardium excelsum***

Trabajo de grado requisito parcial para optar al título de licenciada en Bioanálisis

Autores:

Live's Wreistler's Pernía Moncada
Yuleisy Katherine Ríos Colmenares

Tutora:

Prof. Yndra Cordero

Mérida, noviembre de 2022

DEDICATORIA

A Dios, porque me ha dado la oportunidad de vivir y me ha mostrado su amor y bondad infinita, dándome fortaleza para continuar aún en los días grises, también porque ha puesto en mi camino a las personas indicadas para contribuir a la realización de este sueño, sin él nada sería posible.

A mis padres, Maritza Moncada y Ramón Pernía porque gracias a ellos soy quien soy, me han inculcado valores y principios que han forjado mi carácter, me han enseñado e inspirado a ir tras mis sueños y cumplir mis objetivos.

A mis hermanos Jhonathan y Johandra que aún en la distancia siempre han estado presentes, al igual que a mis sobrinos Alissón, Nicol, Framberth y demás familiares, todo lo que hago es por y para ustedes familia.

A José Luis Sanabria Ramírez por creer en mí y ser partícipe de este sueño, por estar en las buenas y no tan buenas dándome todo su apoyo.

Live's Pernía

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios, porque dentro de sus tiempos y voluntades me han permitido alcanzar uno de mis objetivos, aunque ha sido un largo camino no me ha dejado desfallecer.

A mi familia, porque desde siempre me han apoyado, han compartido y vivido cada uno de mis triunfos, pero también han estado en mis caídas ayudándome a levantar.

A José Luis Sanabria Ramírez por el apoyo incondicional brindado a lo largo de mi carrera.

A Daniela Bolívar, la hermana que la Universidad me regaló, con la que he contado desde el primer día y espero seguir haciéndolo.

A Jesús Rodríguez gran ser humano, quien me ha brindado su amistad y apoyo en los últimos años de mi carrera.

A mis compañeras Katherine, Teresa, Loris, Annelsy, Gavi, Florely, compañeras de sueños, trasnochos, alegrías, contar con ustedes ha sido una bendición.

A la Universidad de Los Andes, por darme la oportunidad de formarme con los mejores profesionales, con gran vocación y llenos de pasión por instruir a la generación de relevo.

A mi tutora Yndra Cordero, por asumir la responsabilidad de tenernos como sus tesis, por la paciencia y dedicación en la realización de este trabajo.

A todos los profesores y trabajadores de la Universidad, que han sido parte importante en la materialización de este sueño, en especial a la Profesora Sarai Dugarte, Profesor Juan Carlos Yépez, Profesora Rosa Aparicio,

Profesora Ysbelia Obregón, Técnico Emilio Salazar, Licenciado Alexander Moreno y demás, que son ejemplo a seguir por su dedicación y vocación.

Al Profesor Luis Rojas quien en vida fue nuestro tutor, pero se nos adelantó al encuentro con Dios, gran profesional y gran ser humano que nos dio su apoyo incondicional en la realización de esta tesis.

Fueron muchas las personas con las que conté en el transcurso de mi paso por la Universidad y con las que estoy inmensamente agradecida, porque nada sería posible sin su intervención en mi vida.

www.bdigital.ula.ve

Live's Pernía

DEDICATORIA

A Dios, por regalarme el privilegio de la vida, por ser mi protector y guía, a pesar de las dificultades, complejidades y retos me ha enseñado que siempre al final todo tiene un propósito si confiamos en su misericordia y amor.

A mis padres Haydee y Onecimo, que son mi motor y mi razón de ser. Por forjar en mí una mujer con valores y principios. Por enseñarme que con humildad, sencillez y disciplina puedo alcanzar cualquier meta que me proponga

A mis hermanos Kleiver y Gabriel Ríos, por demostrarme el amor de la hermandad, ese amor puro e incondicional.

A mi abuela Rita Romero, por ser mi mayor inspiración, porque en vida me regaló su amor verdadero, noble y bueno. Hoy desde el cielo, me ve alcanzar una de las metas por las que tantas noches soñábamos juntas.

www.bdigital.ula.ve

Yuleisy Ríos

AGRADECIMIENTOS

Primeramente A Dios, porque sin el nada hubiera sido posible.

A mis padres, Haydee Colmenares y Onecimo Ríos. Por ser pilar fundamental en el alcance de este logro

A mis hermanos, Kleiver y Gabriel Ríos. Por los consejos, las sonrisas, el cariño y el amor.

A mi abuela Rita. Por protegerme, cuidarme y guiarme desde el cielo.

A mi ahijado, Juan Diego Colmenares. Por ser motivo de querer superarme cada día, y ser un ejemplo para él, demostrarle que los sueños si se hacen realidad.

A mi primo, Jordán Colmenares. Por apoyarme y creer en mí en todo momento, por motivarme a alcanzar esta meta.

A mis tíos, Juan Carlos y Yohan Colmenares. Por el apoyo que me han brindado en la vida.

A mi familia Ríos y Colmenares, por ser parte de este sueño.

A mis compañeras y amigas, Live's, Teresa, Gavi, Daniela, Loris y Annelsy. Por estar en los momentos buenos y no tan buenos, por el cariño incondicional.

A la Ilustre Universidad de Los Andes, por darme la oportunidad de estudiar en esta prestigiosa casa de estudio

A la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, a sus profesores que forjaron en mi Ética y valores esenciales para el ejercicio de mi carrera.

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por la oportunidad de llevar a cabo este grandioso proyecto de investigación.

Al profesor Luis Rojas, que en los planes de Dios se encuentra desde el cielo aplaudiendo este logro, que con la mejor disposición desde el primer día, emprendimos este trabajo.

A la profesora Yndra Cordero, por asumir la tutoría de nuestro trabajo. Gracias por su inalcanzable lucha y ejemplo en todos los sentidos de la vida.

Al jurado evaluador, profesora Ysbelia Obregón y profesora Rosa Aparicio. Por su constante vocación de servicio, siempre dispuestas a ayudarnos.

Al Sr. Emilio Salazar, por apoyarnos en la ejecución de los procedimientos de la parte experimental de este trabajo.

www.bdigital.ula.ve

Yuleisy Ríos

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE ESQUEMAS	xv
RESUMEN	xvi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	3
Planteamiento del Problema.....	3
Justificación de la Investigación.....	4
Objetivos de la Investigación.....	5
<i>Objetivo General</i>	5
<i>Objetivos Específicos</i>	5
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	6
<i>Alcances de la Investigación</i>	6
<i>Limitaciones de la Investigación</i>	6
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	7
Trabajos Previos.....	7
Antecedentes históricos o Epistemológicos de la Especie.....	11
<i>Anacardium excelsum</i> (Bertero ex Kunth) Skeels.....	
Bases teóricas.....	12
Familia Anacardiaceae.	12
Género <i>Anacardium</i>	17
Especie <i>Anacardium excelsum</i> (Bertero ex Kunth) Skeels.....	20
Productos Naturales.....	25
Extractos Vegetales.....	33
Tamizaje fitoquímico o “screening” fitoquímico.....	35
Bacterias.....	38

ÍNDICE DE CONTENIDO

(Continuación)

Actividad antibacteriana.....	44
Definición operacional de términos.....	47
Hipótesis.....	51
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO.....	52
Tipo de Investigación.....	52
Diseño de Investigación.....	52
Población y Muestra.....	53
<i>Unidad de Investigación.....</i>	<i>53</i>
<i>Selección del Tamaño de la Muestra.....</i>	<i>53</i>
Sistema de variables.....	53
Instrumento de recolección de datos.....	54
Procedimiento de la Investigación.....	54
Diseño de análisis.....	63
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	64
Resultados.....	64
Discusiones.....	77
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	80
Conclusiones.....	80
Recomendaciones.....	82
BIBLIOHEMEROGRAFÍA.....	84

ÍNDICE DE TABLAS

Nº		Pág.
1	Taxonomía de la familia Anacardiaceae.....	15
2	Taxonomía del género <i>Anacardium</i>	18
3	Taxonomía de la especie <i>Anacardium excelsum</i> (Bertero ex Kunth).. Skeels.....	23
4	Operacionalización de la Variable Dependiente.....	49
5	Operacionalización de la Variable Independiente.....	50
6	Resultados obtenidos del porcentaje de rendimiento.....	64
7	Tamizaje Fitoquímico de los Extractos Hexano y Etanol de las Hojas de la especie <i>Anacardium excelsum</i> (Bertero ex Kunth) Skeels.....	66
8	Resultados de la actividad antibacteriana del Extracto de etanol de... las Hojas de la Especie <i>Anacardium excelsum</i> (Bertero ex Kunth).... Skeels.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº		Pág.
1	Compuesto polifenólico aislado de la familia Anacardiaceae.....	16
2	Compuestos fenólicos aislados de la familia Anacardiaceae.....	16
3	Compuestos químicos aislados del género <i>Anacardium</i>	19
4	Hojas de la especie <i>Anacardium excelsum</i> (Bertero ex Kunth)..... Skeels.....	20
5	Flores de la especie <i>Anacardium excelsum</i> (Bertero ex Kunth)..... Skeels.....	21
6	Fruto de la especie <i>Anacardium excelsum</i> (Bertero ex Kunth)..... Skeels.....	21
7	Compuestos químicos aislados de la especie <i>Anacardium excelsum</i> . (Bertero ex Kunth) Skeels.....	24
8	Estructura química de un alcaloide.....	26
9	Estructura química de una saponina.....	27
10	Estructura química de un fenol.....	27
11	Estructura química de un flavonoide.....	28
12	Estructura química de un esteroide.....	29
13	Estructura química de un tanino.....	30
14	Estructura química de una cumarina.....	30
15	Estructura química de un terpeno.....	31
16	Estructura química de una quinona.....	31
17	Estructura química de una lactona sesquiterpénica.....	32
18	Estructura química de un tiol.....	32
19	Pared celular de las bacterias grampositivas.....	39
20	<i>Staphylococcus aureus</i>	40
21	<i>Enterococcus faecalis</i>	41

ÍNDICE DE FIGURAS

(Continuación)

Nº		Pág.
22	Pared celular de las bacterias gramnegativas.....	42
23	<i>Escherichia coli</i>	43
24	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	43
25	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	44
26	Váucher de la muestra de <i>Anacardium excelsum</i>	54
27	Determinación de alcaloides en el extracto de etanol.....	67
28	Determinación de triterpenos y esteroides en los extractos de hexano y etanol.....	67
29	Determinación de compuestos fenólicos en los extractos de hexano y etanol.....	68
30	Determinación de saponinas en los extractos de hexano y etanol.....	68
31	Determinación de taninos en los extractos de hexano y etanol.....	69
32	Determinación de flavonoides en los extractos de hexano y etanol....	69
33	Determinación de cumarinas en los extractos de hexano y etanol....	70
34	Determinación de antraquinonas en los extractos de hexano y etanol.....	70
35	Determinación de quinonas en los extractos de hexano y etanol.....	71
36	Determinación de lactonas sesquiterpénicas en los extractos de hexano y etanol.....	71
37	Determinación de glicósidos cardiotónicos en los extractos de hexano y etanol.....	72
38	Ensayo del extracto de etanol en <i>S. aureus</i>	73
39	Ensayo del extracto de etanol en <i>E. faecalis</i>	73
40	Ensayo del extracto de etanol en <i>K. pneumoniae</i>	74
41	Ensayo del extracto de etanol en <i>E. coli</i>	74

ÍNDICE DE FIGURAS
(Continuación)

Nº		Pág.
42	Ensayo del extracto de etanol en <i>P. aeuginosa</i>	75

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Nº		Pág.
1	Procedimiento de la investigación.....	61

www.bdigital.ula.ve



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



**TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS
EXTRACTOS OBTENIDOS DE *Anacardium excelsum***
Trabajo de Grado II

Autor:

Live's Wreistler's Pernía Moncada
Yuleisy Katherine Ríos Colmenares

Tutora:

Prof. Yndra Cordero

RESUMEN

Anacardium excelsum es una especie botánica de árboles americanos de la familia *Anacardiaceae*. La presente investigación tuvo como objetivo confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos obtenidos de *Anacardium excelsum*. Los extractos se obtuvieron mediante la técnica de extracción por reflujo en caliente, se realizaron pruebas de tipo cualitativas para detectar los metabolitos secundarios, presentes en los extractos (hexano y etanol) de las hojas de la especie *Anacardium excelsum* y la determinación de la actividad antibacteriana se llevó a cabo empleando la técnica de difusión de disco en agar o método de Kirby-Bauer. Los resultados de las pruebas de tamizaje fitoquímico revelaron la presencia de compuestos químicos como triterpenos y esteroides, fenoles, taninos, flavonoides, lactonas sesquiterpénicas y glicósidos cardiotónicos. Las autoras concluyeron que el extracto de etanol a la concentración de 10.000 ppm mostró actividad inhibitoria en las cepas ensayadas, en las bacterias grampositivas: *Staphylococcus aureus* (15 mm) y *Enterococcus faecalis* (7 mm); y 3 cepas de bacterias gramnegativas *Klebsiella pneumoniae* (9 mm), *Escherichia coli* (7 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (9 mm).

Palabras Clave: *Anacardium excelsum*, extracto, actividad antibacteriana, cepas.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por bacterias son comunes en muchas situaciones en heridas, mala higiene, y hasta en las operaciones hospitalarias. Hay ciertos sitios o lugares donde las infecciones se pueden extender a pandemias. El uso indiscriminado de antibióticos deprime el sistema inmunológico, favorece las reacciones alérgicas, daña diversos órganos y a su vez también puede producir resistencia bacteriana creando bacterias multirresistente (Ingraham e Ingraham, 1998). Es por esto que se ha hecho necesario, indagar sobre la propiedad antibacteriana de algunas plantas, con el fin de producir antibióticos naturales como alternativa terapéutica (Cabrera, Fradagas y Guerrero, 2005).

Tal es el caso de la especie *Anacardium excelsum*, la cual está formada por componentes químicos como isoprenos, monoterpenos, sesquiterpenos y alcoholes, estos le confieren a la planta diversas propiedades como antioxidante, antitumoral, inmunoestimulante y actividad antibacteriana, esta última tiene como función producir sustancias que eliminan las bacterias o inhiben su crecimiento (Martínez, Soto, Saveedra, Espinosa, y Martínez. 2012). Forma parte de árboles americanos de la zona intertropical de la familia de las Anacardiaceae. En la misma se ha reportado metabolitos secundarios, principalmente, compuestos fenólicos con actividad biológica como antibacteriana (Martínez, De Ferrer, Ojeda, Ferrer y Nava. 2003).

El objetivo de la presente investigación fue confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos obtenidos de *Anacardium excelsum*.

Esta investigación está estructurada de la siguiente manera: El Capítulo I, denominado El Problema, formado por los siguientes subtítulos: Planteamiento del Problema, Justificación de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones del proyecto a llevar a cabo. El Capítulo II, llamado Marco Teórico, donde se describen los Trabajos Previos,

Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición 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, Población y Muestra, Sistema de Variables, Procedimientos o Metodología de la Investigación y Diseño de análisis. El Capítulo IV describe los Resultados y la Discusión, finalmente el Capítulo V menciona las Conclusiones y las Recomendaciones.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

En la Región de las Américas, los microorganismos multirresistentes son la causa principal de las infecciones asociadas con la atención de la salud. Los datos de vigilancia procedentes de la Red de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos (RELAVRA) demuestran una tendencia creciente de la resistencia de patógenos hospitalarios como *Klebsiella pneumoniae*, cuyo porcentaje de no sensibilidad a los antibióticos carbapenémicos está aumentando significativamente en Latinoamérica desde 2014, hasta alcanzar el 21 % en promedio. Las consecuencias en términos de mortalidad, discapacidad y costos económicos son significativas para los sistemas de salud. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* ocasiona un amplio rango de infecciones y es uno de los microorganismos aislado con mayor frecuencia en infecciones asociadas con la atención de la salud; en Latinoamérica, más del 25 % de los aislamientos de *S. aureus* son resistentes a la Metililina®. Las consecuencias son un exceso de mortalidad (atribuible a la resistencia a la Metililina®) del 45,2 % en comparación con las cepas sensibles, y el aumento de los costos del tratamiento antibiótico y de la hospitalización en 6,7 veces y en casi 3 veces, respectivamente (Primo, Guilarde, Martelli, Batista y Turchi, 2012).

En particular, la resistencia de las enterobacterias es de gran importancia en la Región, especialmente por la gran difusión de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE) de tipo CTX-M, algunas de las cuales se

originaron en América Latina. En cuanto a los bacilos gramnegativos no fermentadores, si bien las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* siguen siendo la causa principal de bacteriemias, la proliferación de infecciones por cepas de *Acinetobacter* spp., tiene en algunas partes gran magnitud. En lo referente a los antibióticos, existen varias opciones para tratar infecciones por bacterias grampositivas. La situación terapéutica no es igual para las infecciones por enterobacterias y por bacilos gramnegativos no fermentadores, donde las opciones resultan aún insuficientes para el tratamiento adecuado de los pacientes (Casellas, 2011; Gérvas, 2000).

Según lo antes expuesto, es probable que sin la atención pública y la acción urgente, la resistencia a los antibacterianos amenaza con hacer que el mundo retroceda a la era pre-antimicrobiana, cuando no existía tratamiento eficaz para la neumonía, meningitis, malaria o tuberculosis (Organización Panamericana de la Salud, 2014).

Después de describir la situación actual del problema las autoras de esta investigación presentan el enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos obtenidos de *Anacardium excelsum*?

Justificación e Importancia de la Investigación

El uso indiscriminado de los antibióticos además de suprimir las bacterias que causan enfermedades producen alteraciones en la microbiota habitual del organismo, incluso puede generar resistencia bacteriana. Por ello, es de vital importancia encontrar opciones terapéuticas que permitan contrarrestar dichas infecciones, entre estas opciones se encuentran las plantas, consideradas laboratorios naturales donde se biosintetiza una gran cantidad de sustancias químicas; de hecho, son la fuente de compuestos químicos más importante que existe. Un gran porcentaje de los principios activos está comprendido dentro de los llamados productos naturales o metabolitos

secundarios. Se agrupan en clases de acuerdo con sus características y funciones principales como terpenos, fenoles, flavonoides, taninos, carotenos, índoles, entre otros; estos compuestos bioactivos le atribuyen a la planta diversas propiedades como actividad antibacteriana, antifúngica, antioxidante, antitumorales, inmunoestimulante y otras (Chaquisbol, Lengua, Dolores, Bazán y Bravo, 2003; Gudesblat, 2007).

De acuerdo con lo antes descrito, en la presente investigación se intentó confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos obtenidos de *Anacardium excelsum*, siendo esta una posible alternativa natural de fácil acceso para el tratamiento de las enfermedades infecciosas causadas por bacterias patógenas.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos obtenidos de *Anacardium excelsum* en cepas de bacterias grampositivas y gramnegativas.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Anacardium excelsum*, mediante la técnica de reflujo en caliente.
- Determinar la presencia de metabolitos secundarios en los extractos (hexano y etanol) de *Anacardium excelsum* mediante tamizaje fitoquímico.
- Evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Anacardium excelsum*, mediante el método Kirby-Bauer.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

Según Hernández-Sampieri, Fernández, Batista (2010), “los alcances de una investigación se refieren a la amplitud de lo que se quiere saber, es decir, el conocimiento a adquirir durante el proceso de indagación” (p. 150). En tal sentido, el verbo del objetivo general, indica cuanto se quiere conocer, pues, refiere el nivel de complejidad, es decir; la profundidad del proceso de conocer. En cuanto a la profundidad del conocimiento que se adquirió, se puede decir que representa el primer estudio sobre la especie *Anacardium excelsum* en Venezuela, específicamente en el estado Mérida y se encontró sensibilidad antibacteriana en el extracto de etanol de las hojas de la especie *A. excelsum*, frente a las bacterias grampositivas y gramnegativas ensayadas.

Limitaciones de la Investigación

Se considera la disponibilidad de recursos financieros, humanos y materiales, que harán posible, en última instancia los alcances de la investigación (Hernández-Sampieri y cols., 2010). Por lo tanto, se valoró la viabilidad de este proyecto al realizar la revisión de los recursos económicos, materiales y técnicas a utilizar requeridas para llevar a cabo esta investigación.

En el desarrollo de esta investigación se hallaron limitantes con respecto a los trabajos previos, puesto que se encontraron pocos estudios relacionados con este manucristo, así como los elevados costos en los materiales y reactivos, problemas eléctricos, internet, transporte y dificultad para la recolección del material vegetal, ya que se debió hacer el traslado hasta Municipio Sucre (ciudad de Lagunillas), situado a 30 km del estado Mérida.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos previos

Tasayco y Zamallo (2021), publicaron un estudio intitulado: “Jarabe con extracto hidroalcohólico de hojas *Anacardium occidentale* L. (marañón) y su actividad antibacteriana frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*”. El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón) en cultivos de cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*. Para el desarrollo de la evaluación microbiológica, se utilizó el método de difusión en disco; en el cual se usó el extracto hidroalcohólico a las siguientes concentraciones: 10 %, 20 % y 30 %, comparado con el antibiótico Amoxicilina® (25 µg) como control positivo.

Al ser evaluado el efecto inhibitorio mediante la medida de halos de inhibición, los autores lograron mostrar que los extractos a la concentración de 10%, 20% y 30% presentaron efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus*. En conclusión, el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón), presenta efecto antibacteriano sobre la cepa ensayada. Asimismo, se determinó la presencia de metabolitos bioactivos, cuya acción antibacteriano se relaciona con los flavonoides, alcaloides y compuestos fenólicos.

Salehi, Ösgüven, Kirtin, Özcelik, Morais, Pereira, Fonseca, Goncalves, Melo,, Amina, Armstrong, Selamoglu, Sevindik, Yousaf, Sharifi, Muddathir, Prasad, Martorell, Kumar, Cho y Martins (2020), publicaron una revisión

denominada “Efectos antioxidantes, antimicrobianos y anticancerígenos de las plantas de *Anacardium*: una perspectiva etnofarmacológica”. El objetivo fue revisar las actividades antioxidantes, antimicrobianas y anticancerígenas de las plantas de *Anacardium*. Los autores enfocaron el análisis principalmente en la especie *A. occidentale*, indicaron que el extracto seco obtenido del polvo de hoja de dicha especie a la concentración de 200 mg/mL, mostró efecto contra *S. aureus* con un halo de inhibición de 12 mm; además el extracto etanólico de la hoja seca de *A. occidentale* en un rango de concentración inhibitoria mínima (CIM) de 250 µg/mL- 500 µg/mL, mostró halos de inhibición de 15 mm para *E. coli* y 13 mm para *P. aeruginosa*. Los extractos metanólico (MeOH) y n-hexano de las partes aéreas de *A. occidentale* mostraron efectos inhibidores contra las bacterias estudiadas (*S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *Mycobacterium smegmatis*) con CIM que oscilaron entre 62,5 µg/mL y 250 µg/mL (n-hexano) y 7,5 a >250 µg/mL (MeOH).

Asimismo, el ensayo de los extractos acuoso y el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *A. occidentale* contra cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, mediante la técnica de difusión en agar demostró inhibición sobre *S. aureus* a 75 mg/mL y 150 mg/mL, en el extracto acuoso: 9,5 mm e hidroalcohólico: 10 mm. Según lo revisado, concluyeron que tales resultados son prometedores, por lo tanto; las plantas de *Anacardium* deben estudiarse más a fondo para dilucidar mejor su potencial terapéutico, no solo en los estudios *in vitro* e *in vivo*, sino también en su aplicación clínica.

Rojas, Durango, García, Peláez, García y Gamboa (2021), llevaron a cabo un trabajo llamado “Análisis fitoquímico y actividad antimicrobiana *in vitro* de *Anacardium excelsum* contra microorganismos de la cavidad oral”. El objetivo fue determinar los compuestos fitoquímicos y el efecto antimicrobiano de los extractos de hojas y tallos de *A. excelsum*, y de fracciones derivadas del extracto de las hojas, contra *S. mutans*, *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecalis* y *C. albicans*. Los extractos y las fracciones se obtuvieron por extracción por

percolación, los compuestos fueron identificados por cromatografía en capa fina; la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones se realizó mediante la técnica de difusión en pozo sobre Agar Müeller-Hinton (a concentraciones de 2 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL, 20 mg/mL y 40 mg/mL) frente a las cinco cepas de referencia ATCC.

Los resultados indicaron que las fracciones (acetato de etilo y acetona) contenían compuestos de tipo fenólico, taninos, terpenos de tipo triterpenos y terpenos de tipo esteroide, responsables de la actividad antimicrobiana en casi todos los microorganismos evaluados: *S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *C. albicans* excepto en *E. coli*, a una concentración de 10 mg/mL, con halos de inhibición de 9 mm a 11 mm. Los investigadores, lograron concluir que la mayor actividad antimicrobiana estuvo en la fracciones de los extractos de las hojas de *A. excelsum*.

Jaramillo, Ocampo, Cruz y Galvis (2019), realizaron un trabajo de investigación denominado “Actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de diferente polaridad de *Anacardium occidentale*”. El objetivo estuvo basado en evaluar la actividad antimicótica y antibacteriana de los extractos de diferente polaridad de *Anacardium occidentale* (Anacardiaceae). La metodología consistió en realizar un seguimiento de los extractos de butanol y acetona de diferente polaridad mediante pruebas cualitativas, espectrofotometría UV-Vis y cromatografía de capa fina (CCF). Además, se evaluó el potencial antibacteriano mediante antibiogramas de difusión en el organismo de prueba *Staphylococcus aureus*, como control antibacteriano se utilizó Ampicilina/Sulbactam® 1.000 µg/mL y el potencial antimicótico mediante macrodiluciones en caldo para las especies *Aspergillus niger* y *Trichophyton rubrum*, como control antimicótico se usó Anfotericina B®.

Según los resultados obtenidos, lograron identificar que el extracto de butanol posee compuestos de naturaleza fenólica, los cuales presentan actividad antibacteriana y antimicótica, presumiblemente por la presencia de estos compuestos o por la sinergia entre ellos, y sobresale que algunos de

los extractos evidenciaron mayor inhibición para los microorganismos evaluados *S. aureus* específicamente la fracción de butanol indicó un halo de inhibición de 4 mm, procedente del extracto de hexano fraccionado del extracto crudo de acetona y la fracción de butanol indicó un halo de inhibición de 6 mm, obtenida directamente del extracto crudo de acetona; en comparación con los medicamentos utilizados convencionalmente para combatirlos. Las mismas fracciones de los extractos, al igual que el medicamento utilizado como control positivo, también presentaron potencial antifúngico frente a *Aspergillus niger* y *Trichophytum rubrum*.

Concluyeron que de acuerdo con los análisis, se observó la presencia de compuestos de tipo fenólico, flavonoides y en algunos casos de tipo alcaloidal. Los resultados permitieron determinar que los metabolitos secundarios de tipo fenólico presentan un alto potencial antibacteriano contra *Staphylococcus aureus* y antimicótico contra *Aspergillus niger* y *Trichophytum rubrum*.

Farias, Amaral y Borges (2018), realizaron un estudio llamado “Actividad antibacteriana de extractos de *Anacardium occidentale* L., irradiados sobre cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*”. El objetivo fue evaluar la actividad antibacteriana de extractos crudos y fraccionados de las hojas de *A. occidentale* L., luego de recibir una irradiación de 10 Kilogray (kGy) de Cobalto (Co), contra cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus in vitro*. La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue evaluada mediante la técnica de microdilución seriada en placas y la concentración bacterioestática mínima (CBM) mediante placas de Petri, frente a aislados clínicos de *S. aureus* multirresistente.

Los resultados señalaron que la irradiación en dichos extractos provocó cambios en la composición química y por ende un aumento significativo de la actividad antibacteriana. Los autores llegaron a la conclusión que la radiación gamma sobre extractos de hojas de *A. occidentale* permitió

mejorar las sustancias bioactivas e inhibir las cepas multirresistentes de *S. aureus*.

Antecedentes Históricos o Epistemológicos de la Especie *Anacardium excelsum* (Bertero ex Kunth) Skeels

Anacardium excelsum (Bertero ex Kunth) Skeels, fue descrita por Carlos Linneo. Etilógicamente su nombre *Anacardium* deriva de la palabra procedente del griego kardia = corazón, por la forma de su fruto. Y *excelsum* es un epíteto latino que significa "alta". Aunque se conoce muy pocas investigaciones para la especie *Anacardium excelsum*, de la familia Anacardiaceae existe una gran serie de investigaciones (Pell, Mitchell, Miller y Lobova; 2011).

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempo inmemorial. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso del que disponían los médicos. Esto hizo que se profundizara en el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar sus experiencias en el empleo de los productos que de ellas se extraen. Muchas de las especies vegetales utilizadas por sus virtudes curativas entre los antiguos egipcios, griegos y romanos pasaron a formar parte de la farmacopea medieval, que más tarde se vió enriquecida por el aporte de los conocimientos del Nuevo Mundo. Dichas plantas medicinales y los remedios que entonces utilizaban se siguen usando hoy en día (Bruneton, 2001).

Los productos naturales y uso con poder curativo han sido ejercidos desde hace tiempo por personas de todo el mundo contra diversas dolencias. Varias indicaciones fitoterapias son de conocimiento popular y son de fácil acceso por la población en general. A principio de este siglo, el desarrollo de la química y el descubrimiento de complejos procesos de síntesis orgánica

desembocaron en la puesta en marcha, por parte de la industria farmacéutica, de una nueva producción de medicamentos. Para la fabricación de muchos de ellos utilizaron los principios activos de determinadas plantas medicinales, creyendo que las acciones imputables a tales sustancias, se verían incrementadas, al poder realizar terapias donde la cantidad de principio activo es superior al que posee la planta. Nada más lejos de la realidad, ya que se comprobó que las propiedades de dichas sustancias, eran menos eficaces y existía peligro de producir intoxicaciones e intolerancias, cosa que no ocurría con la utilización de la planta entera (Bruneton, 2001)

Son numerosos los estudios acerca de las plantas de la familia Anacardiaceae en los cuales se ha evaluado tanto actividades biológicas, antiinflamatoria, antidiabética, antihipertensiva y otras (Ojewole, Mawoza, Chiwororo y Owira, 2010). A partir del extracto de etanol floral de *Anacardium excelsum* se han identificado compuestos activos para combatir microorganismos patógenos, útiles en la preservación de alimentos (Urrea y Sequeda, 2012). Además, se han reportado metabolitos secundarios, principalmente, compuestos fenólicos con actividad antibacteriana y antioxidante (Sequeda-Castañeda, 2008; Celis, García, Sequeda, Méndez y Torrenegra, 2011). La corteza de la planta ha sido utilizada frecuentemente como materia prima en la industria forestal (León, 2003).

Bases Teóricas

Familia Anacardiaceae

Descripción botánica de la familia Anacardiaceae

La familia de las Anacardiaceae está formada principalmente por árboles y arbustos perennifolios o caducifolios, aunque también contiene algunos subarbustos, árboles trepadores y lianas. Las hojas pueden ser caducas o

perennes, con estípulas y normalmente alternas. La mayor parte de los géneros tienen hojas imparipinnadas con los folíolos opuestos, aunque a veces los podemos encontrar alternos; otros tienen hojas trifoliadas, pero también hay hojas simples o unifoliadas, como ocurre en especies de *Anacardium*, *Cotinus*, *Heeria*, *Lithrea*, *Malosma* o *Rhus* (Pell y cols., 2011).

Las inflorescencias en esta familia son muy diversas, en general son axilares y muy ramificadas. Las inflorescencias de la mayor parte de los géneros son panículas, aunque también podemos encontrar racimos o tirsos. En esta familia las flores son sésiles, es decir, no tienen un pedúnculo por el cual se unen al tallo principal; pero también pueden ser pedunculadas. El pedúnculo es articulado y glabro (liso, brillante, sin pelo), aunque a veces puede ser pubescente (con pelos finos y cortos). Las flores son generalmente hermafroditas, sin embargo en muchas especies son unisexuales, actinomorfas, pentámeras, con 5 sépalos soldados en la base, 5 pétalos libres y 10 o más estambres (Pell y cols., 2011).

En casi todos los géneros de esta familia el perianto (corola + pétalos) es biseriado, en algunos a veces que no hay corola, y en casos muy extraños no hay perianto. El cáliz suele ser verde, en ocasiones adopta el mismo color que la corola. La corola normalmente es imbricada o valvar, y puede tener colores variados como verde, amarillo, rosa, púrpura, rojo. Generalmente es campanulada, pocas veces presenta forma de trompeta como ocurre en *Anacardium*. Los pétalos son reflejos (dobladados hacia atrás) o patentes (en ángulo recto respecto al tubo de la corola). La venación es normalmente discreta. El ápice de los pétalos suele ser apiculado (Pell y cols., 2011).

El ovario normalmente es súpero, de 1 a 5 carpelos libres, muchas veces también soldados, pocas veces se subtiende por el ginóforo. El estilo normalmente es apical, pero también puede ser subapical o lateral. Los estigmas son capitados, aunque en *Anacardium* son puntiformes y en *Camposperma* dicoides (circulares), hay algunos que son lobulados, también suelen ser papilosos. Los frutos son drupas o sámaras. Las semillas

tienen un tamaño variado desde 2 mm hasta más de 10 cm, estas pueden ser elipsoides, ovoides, falcadas (curvatura similar a una hoz), lenticulares (similar a una lenteja) o reniformes (Pell y cols., 2011).

Distribución Geográfica de la familia Anacardiaceae

Esta familia se extiende desde el sur de Canadá hasta la Patagonia, también por África, el sur de Europa, climas tropicales y subtropicales de Asia y Australia, y la mayoría de las islas del Pacífico. Los centros de diversidad más importantes de esta familia se encuentran en México, América del Sur, África sur y ecuatorial, Madagascar, Indochina y Malasia. En el Paleotrópico, es decir, en África y Asia, hay mayor número de especies que en el Neotrópico (centro y sur de América) (Pell y cols., 2011).

Taxonomía de la familia Anacardiaceae

Basándose en la filogenia combinada, Terrazas (1994) sugirió dividir la familia en dos subfamilias, Anacardioideae y Spondioideae.

Engler (1892) dividió la familia en cinco tribus Dobineae, Mangifereae (=Anacardieae), Rhoideae, Semecarpeae y Spondieae. Más adelante Wannan y Quinn (1990, 1991), utilizaron la estructura floral así como del pericarpo y la anatomía de la madera para investigar la clasificación de esta familia; identificaron dos grupos (A y B), los cuales se dividían en dos subgrupos (1 y 2). El grupo A estaba formado por Dobineae, Mangifereae (=Anacardieae), Rhoideae y Semecarpeae, excepto los géneros y el grupo B estaba compuesto por la tribu Spondieae y por estos cuatro géneros: *Androtium*, *Buchanania*, *Camposperma* y *Pentaspadon*.

En la actualidad, la investigación más completa corresponde a la tesis doctoral de carácter filogenético realizada por Pell (2004) quien empleó los marcadores moleculares plastidiales TrnLTrnLF, Rps16 y matK, en el se

distinguen dos grandes clados que corresponden a las subfamilias Anacardioideae y Spondioideae, tal como fue planteado por Bentham y Hooker (1862); dentro de Anacardioideae se distinguen a su vez las tribus Rhoeeae, Anacardieae y Semecarpeae, siendo estas dos últimas de estrecha relación y hermanas de la primera (Tabla 1).

Tabla 1. Taxonomía de la familia Anacardiaceae

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida
Orden	Sapindales
Familia	Anacardiaceae
Subfamilias	Anacardioideae, Spondioideae
Tribu	Rhoeeae, Anacardieae y Semecarpeae

Tomado y modificado de Terrazas, 1994; Engler, 1892; Wannan y Quinn, (1990, 1991); Pell, 2004.

Compuestos químicos o metabolitos secundarios aislados de la familia Anacardiaceae

A nivel bioquímico, la familia Anacardiaceae presenta fenoles, ésteres y taninos con actividad antimicrobiana (Saxena, McCutcheon, Farmer, Towers y Hancock; 1994) y polifenoles principalmente ácido gálico (**1**) (Figura 1) y catequina. Además, es conocida por contener sustancias tóxicas como fenoles, entre ellos catecoles (**2**) y resorcinoles (**3**) los cuales se acumulan en los canales de resina y sus ácidos fenólicos que causan serias irritaciones en la piel como: cardol (**4**), ácido anacárdico (**5**) (Figura 2) un derivado del ácido salicílico y sus derivados; también es común en la familia la presencia de

terpenos y politerpenos; igualmente se ha descrito la presencia de varias toxinas (Pell y cols., 2011; Urrea y Sequeda, 2012).

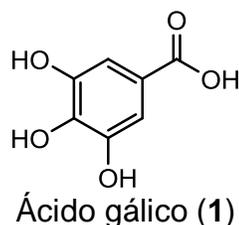


Figura 1. Compuesto polifenólico aislado de la familia Anacardiaceae
Tomado y modificado de La Camera, Bisignano, Crisafi, Smeriglio, Denaro,
Trombetta y Mandali; 2018.

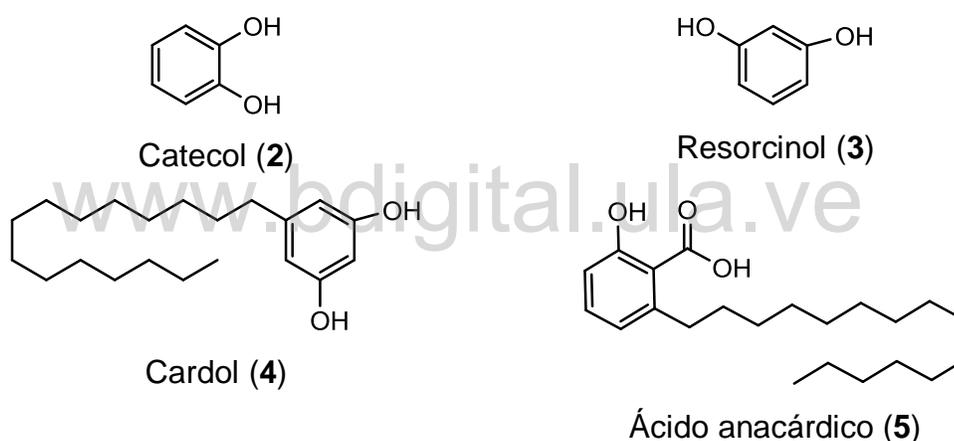


Figura 2. Compuestos fenólicos aislados de la familia Anacardiaceae
Tomado y modificado de Pell y cols., 2011; Urrea y Sequeda, 2012

Actividad farmacológica y/o biológica de la familia Anacardiaceae

En la familia de las Anacardiaceae podemos encontrar varias sustancias químicas, entre ellas tóxicas que causan dermatitis de contacto. Algunas sustancias han demostrado tener actividad defensiva, como antimicrobiana (Saxena y cols., 1994), antifúngica, repelente de insectos y herbívoros (Chen y Wiemer, 1984). Aunado a ello, se ha reportado actividad antihelmíntica

atribuida al ácido anacárdico, gran capacidad antioxidante y actividad antibacteriana, por lo que estos se podrían utilizar para el tratamiento de infecciones de la piel causadas por *Staphylococcus aureus* (Urrea y Sequeda, 2012; La Camera y cols., 2018).

Género *Anacardium*

Descripción botánica del género *Anacardium*

Es un árbol grande perennifolio de hasta 45 m de altura, con un tronco recto y de color claro, a veces rosado, de hasta 3 m de diámetro. Tiene un tronco espeso y tortuoso con ramas tan serpenteantes que con frecuencia llegan al suelo. Hojas simples, alternadas, ovales, de 15-30 cm de largo y 5-12 cm de ancho. Flores en panícula de 35 cm de largo, cada pequeña flor es verde pálido a blanco. Las flores viejas tornan a rosa y desarrollan una fragancia fuerte. Árboles con especies de tamaños variables, caracterizados por sus hojas obovadas a espatuladas y agrupadas al final de las ramas (Urrea y col., 2012; Morales, 2020).

Distribución geográfica del género *Anacardium*

Es un género neotropical con 11 especies, 1 de las cuales está cultivada en los trópicos; nativa desde Honduras hasta Paraguay y el sureste de Brasil; 2 especies se encuentran en Nicaragua (Mitchell y Mori, 1987).

Taxonomía del género *Anacardium*

En la investigación realizada por Pell (2004), se menciona a Anacardioideae como la subfamilia del género *Anacardium*, así como la tribu:

Anacardieae (Tabla 2) (Engler, 1892; Wannan y Quinn, 1990-1991; Terrazas, 1994).

Tabla 2. Taxonomía del género *Anacardium*

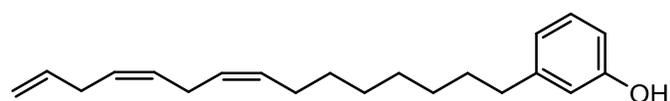
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida
Orden	Sapindales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Anacardioideae
Tribu	Mangifereae (=Anacardieae)
Género	<i>Anacardium</i>

Tomado y modificado de Engler, 1892; Wannan y Quinn, (1990, 1991);
Terrazas, 1994; Pell, 2004.

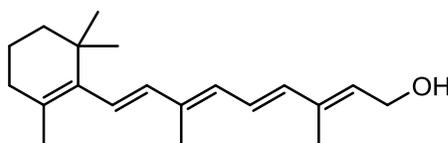
www.bdigital.ula.ve

Compuestos químicos o metabolitos secundarios aislados del género *Anacardium*

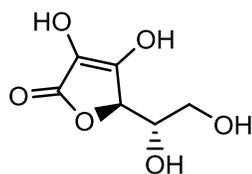
En el género se han aislado fenoles de cadena larga (FCL). La principal fuente de FCL reportada hasta el momento es el aceite obtenido del pericarpio de la nuez de la especie *Anacardium occidentale*, el cual es una mezcla de ácidos anacárdicos (ácido anacárdico), cardoles y cardanoles (**6**); este género y en particular dicha especie también contiene flavonoides, carotenoides, vitamina A (**7**) y vitamina C (ácido ascórbico) (**8**) (Figura 3) (Suresh y Raj, 1990; Hemshekhar, Santhosh, Kemparaju y Girish; 2012; González, Sánchez, Cortes, Soto, Maceda y Castillo; 2019).



Cardanol (6)



Vitamina A (7)



Ácido ascórbico (8)

Figura 3. Compuestos químicos aislados del género *Anacardium*

Tomado y modificado de Hemshekhar, Santhosh, Kemparaju y Girish; 2012; Cabral, Medeiros de Oliveira, Da Silva, D'Oliveira, Medeiros, Da Silva, Zucolotto, Daniel, Fonseca, Siqueira y De Bittencourt, 2017.

Usos etnobotánicos del género *Anacardium*

Actualmente todos sus componentes han sido utilizados en diferentes áreas, desde la elaboración de dulces y cosméticos, hasta la creación de medicamentos para tratar diferentes enfermedades (Urrea y Sequeda, 2012).

Actividad farmacológica y/o biológica del género *Anacardium*

Se ha encontrado actividad antihelmíntica y potente actividad antibacteriana contra *Streptococcus mutans*, así como propiedades anestésicas, e insecticidas; debido a la presencia de ácido anacárdico y actividad antifilárica, gracias al cardol. Además se ha estudiado que el

extracto de las hojas posee actividad antioxidante y antiinflamatoria (Suresh y col., 1990; Urrea y col., 2012; Cabral y cols., 2017; González y cols., 2019).

Especie *Anacardium excelsum* (Bertero ex Kunth) Skeels

Descripción botánica de la especie *Anacardium excelsum* (Bertero ex Kunth) Skeels

La especie es uno de los denominados árboles gigantes de América Tropical, alcanzando los 40 metros de altura y 3 metros de diámetro. La corteza exterior es de color gris a negro agrietada verticalmente. La corteza interior es gruesa, de color rosado y algo resinosa, con olor parecido a trementina, típico de la familia. Presenta hojas simples, coriáceas, alternas y obovadas de 14 a 30 centímetros de largo y de 5 a 12 cm de ancho, con peciolo 0,7 a 2,1 cm de largo, se presentan en manojos en los extremos de las ramas (Figura 4) (Morales, 2020).



Figura 4. Hojas de la especie *Anacardium excelsum* (Bertero ex Kunth) Skeels

Tomado y modificado de Morales, 2020.

Presenta flores pequeñas, en panículas terminales de 15 a 35 cm de largo, inconspicuas (poco notorias), abiertas, de color crema o blancas

(Figura 5), agrupadas en panículas terminales de aproximadamente 40 centímetros de largo (Morales, 2020).



Figura 5. Flores de la especie *Anacardium excelsum* (Bertero ex Kunth)

Skeels

Tomado y modificado de Morales, 2020.

Fruto subreniforme, 2,3–3,4 cm de largo, frecuentemente verde cuando maduro (Figura 6). Su madera es blanda, liviana, de color marrón claro muy lustroso y de textura media; poco durable y de fácil trabajo, con densidad de 0,30 a 0,40 g/cm³ y poder calórico de 3600 Kcal/kg. Es utilizada en construcción (interiores), utensilios, muebles (estructura) y cajas o guacales (Mitchell y Mori, 1987; Morales, 2020).



Figura 6. Fruto de la especie *Anacardium excelsum* (Bertero ex Kunth)

Skeels

Tomado y modificado de Morales, 2020.

Distribución geográfica de la especie *Anacardium excelsum* (Bertero ex Kunth) Skeels

Es común en áreas de suelos profundos de origen aluvial, bien sean de sabanas o de selva, específicamente en los bordes de la misma, ya que en su interior carecería del sol necesario para crecer. Copa redondeada y con follaje denso. Tronco recto y cilíndrico. Distribuido desde Ecuador y las Guyanas, toda la parte norte de América del Sur hasta Honduras (Mitchell y Mori, 1987).

Distribución geográfica en Venezuela

Distribuida en los estados Apure, Aragua, Barinas, Delta Amacuro, Lara, Mérida, Nueva Esparta, Trujillo, Yaracuy y Zulia (Mitchell y Mori, 1987).

Taxonomía de la especie *Anacardium excelsum* (Bertero ex Kunth) Skeels

La subfamilia en la cual se clasifica dicha especie es Anacardioideae, (Tabla 3) (Engler, 1892; Wannan y Quinn, 1990-1991; Terrazas, 1994).

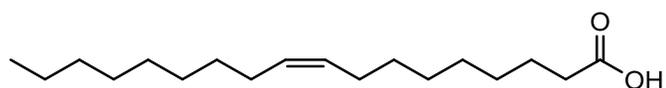
Tabla 3. Taxonomía de la especie *Anacardium excelsum* (Bertero ex Kunth) Skeels

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida
Orden	Sapindales
Familia	Asteraceae
Subfamilia	Anacardioideae
Tribu	Mangifereae (=Anacardieae)
Género	<i>Anacardium</i>
Especie	<i>A. excelsum</i> (Bertero ex Kunth) Skeels

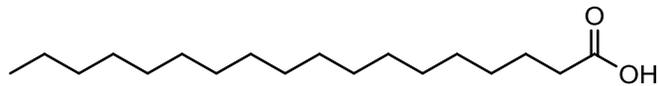
Tomado y modificado de Engler, 1892; Wannan y Quinn (1990, 1991); Terrazas, 1994; Pell, 2004.

Compuestos químicos o metabolitos secundarios aislados de la especie *Anacardium excelsum* (Bertero ex Kunth) Skeels

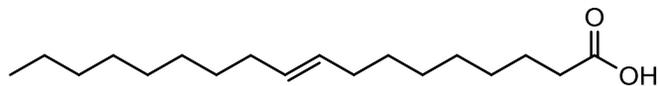
En esta especie se han identificado compuestos tales como ácido oleico (ácido graso monoinsaturado de la familia de los ácidos grasos omega 9) (**9**); ácido octadecanoico (ácido graso saturado) (**10**); ácido 9-octadecenoico (ácido graso monoinsaturado de la serie omega 9) (**11**); 2-hidroxi-1-(hidroximetil)etil-9(Z),12(Z)-octadecadienoato (**12**); ácido 6(Z)-octadecenoico (**13**); 9(Z)-octadecenal (**14**); 1-isopropil-4-metil-benceno (**15**); 4-isopropenil-1-metilciclohexil acetato (**16**) y 3-pentadecilfenol (**17**) (Figura 7), cuyas propiedades químicas generan un potencial antimicrobiano (Urrea y Sequeda, 2012).



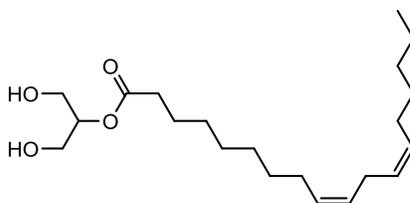
Ácido oleico (9)



Ácido octadecanoico (10)



Ácido 9-octadecenoico (11)

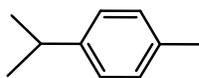


2-hidroxi-1-(hidroximetil)etil-9(Z),12(Z)-octadecadienoato (12)

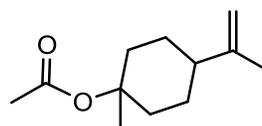


Ácido 6(Z)-octadecenoico (13)

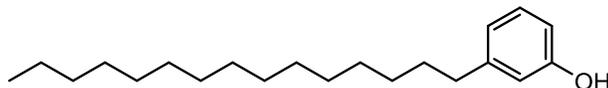
9(Z)-octadecenal (14)



1-isopropil-4-metil-benceno (15)



4-isopropenil-1-metilciclohexil acetato (16)



3-pentadecilfenol (17)

Continuación Figura 7. Compuestos químicos aislados de la especie

Anacardium excelsum (Bertero ex Kunth) Skeels

Tomado y modificado de Urrea y Sequeda, 2012.

Actividad farmacológica y/o biológica de la especie *Anacardium excelsum* (Bertero ex Kunth) Skeels

Se ha reportado metabolitos secundarios, principalmente, compuestos fenólicos con actividad biológica como antioxidante, actividad antimicrobiana, también como fuente potencial para controlar el deterioro de los alimentos al combatir microorganismos patógenos (Sequeda-Castañeda, 2008; Celis y cols., 2011; Urrea y Sequeda, 2012).

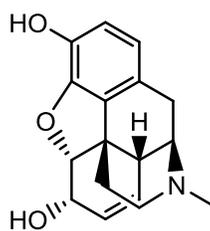
Productos Naturales

Los productos naturales o metabolitos secundarios, son compuestos químicos de estructuras relativamente complejas y distribución restringida. Los metabolitos secundarios no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos. Además de no presentar función definida en los procesos mencionados estos metabolitos difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Ávalos y Pérez, 2009; Martínez y cols., 2012).

Los compuestos presentes en una planta pueden ser muy diversos, pero para su análisis fitoquímico se agrupan en alcaloides, carbohidratos, glucósidos, saponinas, flavonoides, esteroides, fenoles, taninos, cumarinas, diterpenos, proteínas y quinonas, entre otros. A continuación se describen algunos de ellos:

Alcaloides

Los alcaloides abundan en los tejidos de intensa actividad celular, hojas, raíces, semillas, pero hay variaciones de acuerdo a su concentración y naturaleza. Este grupo de biomoléculas se caracteriza porque tiene nitrógeno en su estructura y contiene uno o más átomos de nitrógeno en un anillo heterocíclico, un ejemplo es la morfina (**18**) (Figura 8). Son derivados de aminoácidos y manifiestan una significativa actividad farmacológica (Martínez, Valencia y Jiménez, 2008; García, 2011).



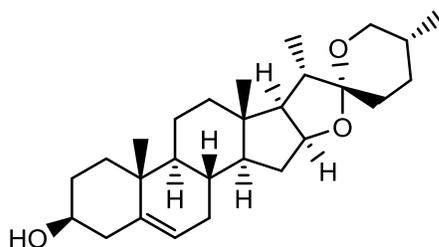
Morfina (**18**)

Figura 8. Estructura química de un alcaloide

Tomado y modificado de Martínez y cols., 2008.

Saponinas

Son un grupo de glicósidos solubles en agua que tienen las propiedades de hemolizar la sangre y disminuir la tensión superficial del agua formando espuma abundante. Las saponinas por hidrólisis se desdoblán en carbohidratos y una aglicona llamada sapogenina, puede tener el sistema anular esteroidal de un triterpeno pentacíclico. Los anillos E y F de la saponina esteroidal conforman el llamado sistema espirostanal. El enlace glicósídico siempre se forma con el oxígeno del carbono 3. La Figura 9, muestra un ejemplo de una saponina (diosgenina) (**19**) (Martínez y cols., 2008).



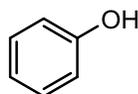
Diosgenina (19)

Figura 9. Estructura química de una saponina

Tomado y modificado de Martínez y cols., 2008.

Fenoles

Los fenoles se dividen en una subclase donde se incluyen los lignanos, isoflavonas, flavonoides, antocianina, catequinas y taninos, estos compuestos poseen diferentes funciones como disminuir el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, previenen el cáncer de mama, endometrio y próstata, también previene la degeneración de la células de varios órganos, asimismo poseen propiedades antiartríticas, antiinflamatorias, antiulcéricas, antiagregantes, inmunoestimulantes o hepatoprotectoras, antidiarreicas y vasoconstrictoras, la Figura 10 muestra un ejemplo de un fenol (20) (Martínez y cols., 2012).



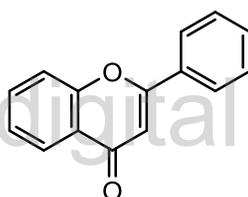
Fenol (20)

Figura 10. Estructura química de un fenol

Tomado y modificado de Martínez y cols., 2012.

Flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos con quince átomos de carbono cuya estructura consta de dos anillos de benceno unidos por una cadena lineal de tres carbonos. El esqueleto se representa por el sistema C6-C3-C6, en el cual tienen dos anillos aromáticos llamados A y B que están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden formar un tercer anillo. Se encuentran generalmente en mezclas como agliconas y glicósidos, siendo las más comunes las flavonas (**21**) (Figura 11), flavonoles y más restringidas las isoflavonas, las chalconas y auronas, algunos de ellos como la quercetina son más activos que otros (Lock, 1988).



Flavona (**21**)

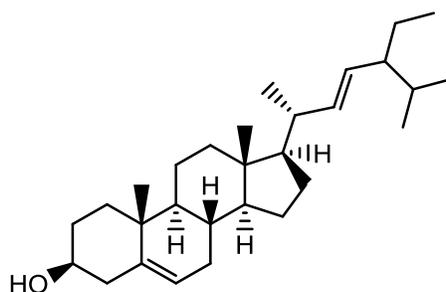
Figura 11. Estructura química de un flavonoide

Tomado y modificado de Lock, 1988.

Esteroles

Los esteroides son compuestos cuya estructura presenta el sistema anular del ciclopentano perhidrofenantreno, metilos en los carbonos 10 y 13 y un radical lineal en el carbono 17 (Martínez y cols., 2008). Se clasifican en fitoesteroides y fitoestanoles, presentan una estructura semejante al colesterol de origen vegetal, considerados triterpenos insaturados, los más comunes son los β -sitoesteroides, campesterol, estigmasterol (**22**) (Figura 12); éstos pueden transformarse en ácidos grasos, ácidos fenólicos y hexosas; los

fitoestanoles tienen un anillo sencillo (enlaces tipo σ) y son menos abundantes en la naturaleza (Drago-Serrano, López-López y Sáinz-Espuñes; 2006).



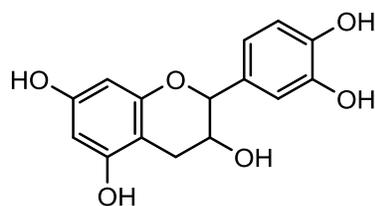
Estigmasterol (22)

Figura 12. Estructura química de un esteroide

Tomado y modificado de Drago-Serrano y cols., 2006.

Taninos www.bdigital.ula.ve

Se encuentran en las hojas, ramas y debajo de la corteza; químicamente son polímeros de polifenoles, sustancias con alto peso molecular. Se clasifican en taninos hidrosolubles, que son ésteres fácilmente hidrolizables formados por una molécula de azúcar unida a un variable de moléculas de ácidos fenólicos; y los taninos no hidrosolubles que tienen una estructura química similar a la de los flavonoides, por hidrólisis dan azúcar y ácido elálgico. En la Figura 13 se indica un ejemplo de estos, como la catequina (23), algunos son conocidos como pro-antocinidinas porque por hidrólisis ácida producen antocinidinas y leucocinidinas (Martínez y cols., 2008).

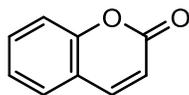


Catequina (**23**)

Figura 13. Estructura química de un tanino
Tomado y modificado de Martínez y cols., 2008.

Cumarinas

Son compuestos derivados de la benzo- α -pirona, como la cumarina (**24**) (Figura 14) , la esculetina, umbeliferona y la escopoletina, son un grupo muy amplio de principios activos fenólicos y tienen en común la estructura química de 1-benzopirano-2-ona, se caracterizan porque presentan fluorescencia bajo la luz ultravioleta a 365 nm (Martínez y cols., 2008).



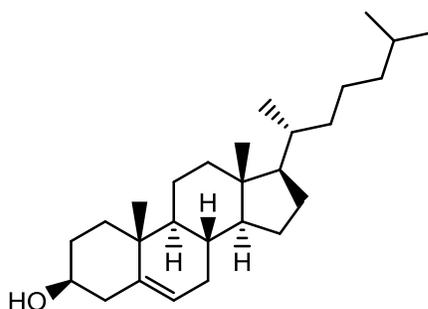
Cumarina (**24**)

Figura 14. Estructura química de una cumarina
Tomado y modificado de Martínez y cols., 2008.

Terpenos

Dentro de los terpenos existe una subclase en donde se encuentran los carotenoides, fitoesteroles, capsaicina, saponinas, en la Figura 15, se menciona un ejemplo: el colesterol (**25**); estos son importantes en el sistema inmunológico, reduce el riesgo de enfermedades cardiovasculares, favorecen a la producción de endorfinas, provocan efectos analgésico, antiinflamatorio,

expectorante, antiviral, citotóxico y protector contra cáncer de estómago e intestino (Aponte, Calderón, Delgado, Herrera, Jiménez, Ramírez, Rojas y Toro. 2008).

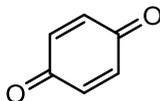


Colesterol (25)

Figura 15. Estructura química de un terpeno
Tomado y modificado de Aponte y cols., 2008.

Quinonas

Son dicetonas cíclicas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles, siendo reversible esta reacción. Derivan su nombre de la *p*-benzoquinona como producto de oxidación del ácido quínico. Se pueden clasificar de acuerdo con el sistema aromático en benzoquinonas (26), naftoquinonas, antraquinonas y fenantraquinonas (Figura 16) (Martínez y cols., 2008).

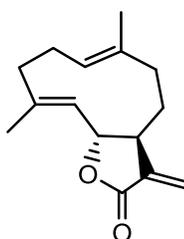


Benzoquinona (26)

Figura 16. Estructura química de una quinona
Tomado y modificado de Martínez y cols., 2008.

Lactonas sesquiterpénicas

Son sustancias amargas que se encuentran en todas partes de las plantas, se derivan de los sesquiterpenos, compuestos lactónicos que se clasifican con base en su esqueleto carbocíclico como germacranólidos (**27**) (Figura 17), guaianólidos, eudesmanólidos y pseudo-guaianólidos entre otros (el sufijo ólido se refiere a la función lactona) (Lock, 1988).



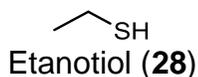
Germacranólidos (**27**)

Figura 17. Estructura química de una lactona sesquiterpénica

Tomado y modificado de Lock, 1988.

Tioles

Los tioles son un grupo de fitoquímicos que comprende los compuestos organosulfurados, entre los cuales está el etanotiol (**28**). Su función se relaciona con una menor incidencia de cáncer, especialmente de pulmón, estómago, colon y recto, también parecen prevenir la activación de carcinógenos (Figura 18) (Aponte y cols., 2008).



Etanotiol (**28**)

Figura 18. Estructura química de un tiol

Tomado y modificado de Aponte y cols., 2008.

Extractos vegetales

Son compuestos producidos de la obtención de sustancias biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, por el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado. De una misma planta, dependiendo de la parte de ella utilizada, del solvente y de la técnica de extracción, podremos obtener una diferente gama de sustancias (Sharapin, 2000).

Métodos de obtención de los extractos vegetales

Extracción por Reflujo: es una técnica para extraer y preservar los compuestos químicos en las especies vegetales; está formado por un condensador que se usa para condensar los mismos. Durante el reflujo, la evaporación de la mezcla que se hierve es seguida por la condensación de estos vapores sobre las paredes interiores de un condensador, éste se refrigera con el agua que fluye por una camisa envolvente a su alrededor (Sharapin, 2000).

Maceración

Es un procedimiento en el que se coloca el material vegetal, desecado o no, en un recipiente adecuado con tapa. Se agrega suficiente cantidad de disolvente o mezcla de disolventes, hasta tapar totalmente el material vegetal. Se deja en reposo a temperatura ambiente o en un sitio tibio durante un tiempo indicado (3 a 7 días aproximadamente), hasta que el material soluble se disuelva. Se agita con frecuencia durante el tiempo de maceración. Seguidamente se filtra y estruja el marco para retirar el disolvente. Para completar a volumen se hace pasar disolvente hasta alcanzar el volumen deseado (Nadinic, Bandoni, Martino y Ferraro; 2016).

Percolación

Se humedece 1 Kg del material vegetal con una cantidad adecuada del disolvente indicado para humectarla y embeberla bien. Se deja en maceración en un recipiente por un tiempo determinado. Luego se empaca un percolador de tamaño adecuado con el material vegetal. Se agrega suficiente disolvente hasta obtener una columna en el percolador. Se tapa el orificio inferior, se cubre el percolador y se lo deja macerar durante 48 horas. Pasado este tiempo se abre la canilla inferior y se comienza a colectar el percolado, reservando las primeras fracciones. Se continúa la percolación agregando más cantidad de disolvente hasta el agotamiento del material vegetal (Nadinic y cols., 2016).

Decocción

Se obtiene por calentamiento a ebullición del material vegetal con el disolvente o con agua. Por lo general, se emplea para materiales vegetales cuyas partes usadas sean duras como cortezas, tallos, raíces, y que contengan principios solubles en el disolvente (Nadinic y cols., 2016).

Infusión

Se utiliza para materiales vegetales con principios solubles en agua. Se prepara en una proporción de 50 g de material vegetal por litro de agua. Primero se embebe el material vegetal con agua caliente y se deja reposar por 15 minutos, luego se agrega el resto de agua hirviendo y se deja reposar por 30 minutos. Se filtra y se exprime bien el marco. Se hace pasar agua hirviendo por el marco hasta completar los 1.000 mL. Esta preparación al igual que la decocción debe ser refrigerada, ya que se conserva por pocos

días; a menos que se congele o se agregue algún conservante (Nadinic y cols., 2016).

Análisis fitoquímico preliminar o Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico es una herramienta en la investigación del potencial biológico y farmacológico que poseen las plantas. Consiste en la obtención de extractos de plantas con solventes apropiados, tales como agua, acetona, alcohol, cloroformo y éter. Otro solvente, el diclorometano, se usa específicamente para la extracción de terpenoides (Prashant, Bimlesh, Mandeep, Gurpreet y Harleen; 2011). Posterior a la extracción, se llevan a cabo reacciones de coloración (pruebas cualitativas) las cuales son reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Algunas de las reacciones evalúan grupos de sustancias y otros la presencia de otros compuestos como ácidos grasos, azúcares reductores, polisacáridos y mucílagos. Los resultados de las reacciones son reportados como (+) o (-) para el metabolito de que se trate (Sharapin, 2000). A continuación se describen los fundamentos solo de las pruebas que se llevaron a cabo en el presente estudio:

Pruebas para determinar alcaloides

- ✓ **Ensayo de Wagner, Mayer y Dragendorff:** Se basa generalmente en la combinación de los alcaloides con metales pesados. El reactivo de Dragendorff es una mezcla de yoduro de potasio y nitrato de bismuto, detectándose el alcaloide al producirse un precipitado rojo-naranja; en la reacción de Mayer el yoduro de potasio y el bicloruro de mercurio junto con el alcaloide arrojan un precipitado de color blanco (Marcano y Hasewaga, 2002). Para el reactivo Wagner, el yoduro de potasio se

evidencia con un precipitado marrón (Domínguez, 1973; Bruneton, 2001).

Prueba para determinar triterpenos/esteroles

- ✓ **Ensayo de Lieberman-Bouchard:** Está compuesta por una mezcla de ácido sulfúrico y anhídrido acético que producen sustancias cromóforas con el ciclopentano perhidrofenantreno. La positividad de la prueba se observa por la aparición de un color rojo, verde o azul (Domínguez, 1973; Bruneton, 2001).

Prueba para determinar compuestos fenólicos

- ✓ **Prueba de tricloruro férrico (FeCl_3):** Las sustancias precipitan en presencia de cloruro férrico. Esta respuesta se debe al efecto producido por el ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo, provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (Coy, Parra y Cuca, 2014; Domínguez, 1973).

Prueba para determinar saponinas

- ✓ **Prueba de la espuma:** El extracto disuelto en agua se agita vigorosamente, la aparición de espuma es indicio de la presencia de saponinas (Marcano y Hasegawa, 2002).

Prueba para determinar taninos

- ✓ **Ensayo de la gelatina:** Permite reconocer la presencia de taninos, la positividad de este ensayo se evidencia con la aparición de un precipitado blanco (Alayo y Guevara, 2012).

Pruebas para determinar flavonoides

- ✓ **Ensayo de Shinoda:** El magnesio en polvo reacciona con ácido clorhídrico concentrado. El hidrógeno generado produce por reducción el ión flavilio, observándose un color rojo escarlata (varía desde rosa muy débil hasta el rojo escarlata) (Domínguez, 1973; Bruneton, 2001).
- ✓ **Prueba de NaOH al 10 %:** La aparición de amarillo a rojo (xantonas y/o flavonas), café a púrpura rojizo (chalconas) y azul (antocianinas) (Domínguez, 1973; Bruneton, 2001).

Prueba para determinar cumarinas

- ✓ **Prueba de Hidróxido de Amonio concentrado (NH₄OH):** Las cumarinas al ser examinadas en luz ultravioleta presentan coloración exaltada (fluorescencia azul-violeta) en presencia de amoniaco (Bruneton, 2001).

www.bdigital.ula.ve

Prueba para determinar antraquinonas

- ✓ **Ensayo de Borntrager:** La naftoquinonas y antraquinonas libres al ser tratadas con la solución de hidróxido amónico concentrado (NH₄OH []) forman complejos de color rojo cereza (Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011).

Prueba para determinar quinonas

- ✓ **Prueba de Ácido Sulfúrico concentrado (H₂SO₄ []):** una pequeña cantidad de muestra se disuelve en H₂SO₄ []. La prueba es positiva al aparecer una coloración roja-púrpura (Bucay, 2009).

Prueba para determinar lactonas sesquiterpénicas

- ✓ **Ensayo de Baljet:** Es útil para reconocer la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico. La prueba es positiva, cuando aparece una coloración o precipitado de color rojo (Bucay, 2009).

Prueba para determinar glucósidos cardiotónicos

- ✓ **Ensayo de Keller's:** El desarrollo de una coloración violácea, persistente durante 1 a 2 horas, indica la presencia de glucósidos cardiotónicos (Alayo y Guevara, 2012).

Bacterias

Las bacterias están presentes constantemente en los seres vivos y, en los humanos, ellas viven en piel, en la capa externa, en el tracto digestivo, y algunas son eliminadas en la evacuación. Las bacterias son los microorganismos sobre los que se trabaja habitualmente y de los que se tienen mayores reportes de resistencia a antibióticos. Los microorganismos evaluados en el presente estudio se encuentran en el grupo de los procariotas, teniendo en cuenta los microorganismos de diferentes características, grampositivas y gramnegativas, fermentadoras y no fermentadoras de glucosa, de forma bacilar, cocobacilar y cocos (Romero, 2007).

Bacterias grampositivas

Son aquellas que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. Esta característica química está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Son grupos principales de bacterias y, cuando se tratan como

taxón, se utiliza también el nombre de Posibacteria y las que restan son las bacterias gramnegativas (Montoya, 2008).

Composición de su pared celular

La pared celular de las bacterias grampositivas está formada en un 90 % por peptidoglicano (Figura 19), siendo éste el principal componente que permite diferenciarlas con la pared de las gramnegativas, pues al teñirlas, es gracias a él, al grosor que éste le proporciona, que se logra mantener la coloración del cristal violeta en el interior de la célula al teñirla con la tinción Gram. Además del peptidoglicano, ésta se encuentra compuesta de ácidos teicoicos, los cuales están presentes en pequeñas cantidades, se presentan embebidos en la pared de la bacteria como polisacáridos ácidos (Montoya, 2008).

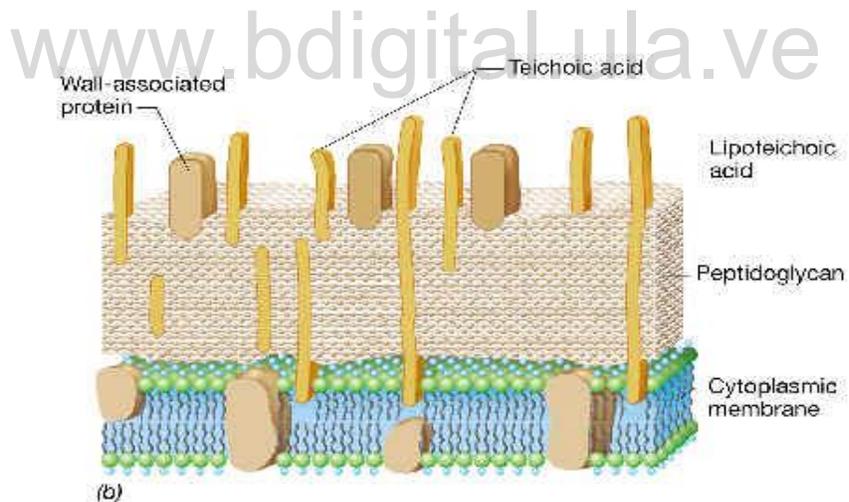


Figura 19. Pared celular de las bacterias grampositivas
Tomado y modificado de Tortora, Funke y Case, 2007.

A continuación se describen las bacterias grampositivas evaluadas:

Staphylococcus aureus

Son cocos grampositivos, caracterizados por su agrupación en forma de racimo (Figura 20), inmóviles, son anaerobios facultativos, miden aproximadamente 1µm de diámetro, catalasa positivo. Crecen a una temperatura óptima de 37 °C y se desarrollan en un pH ligeramente alcalino de 7,6 (Tortora, Funke y Case, 2007; Konemam, 2008).

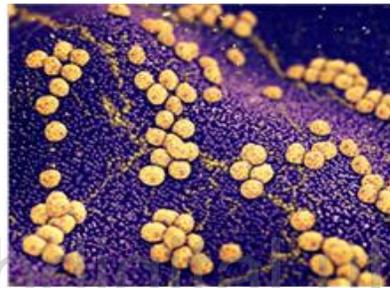


Figura 20. *Staphylococcus aureus*

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

Enterococcus faecalis

Es una bacteria inmóvil y anaerobio facultativo (Figura 21), son microbios relativamente resistentes; persisten como contaminantes en el ámbito hospitalario, en las manos, en la ropa de cama e incluso como aerosol fecal (Tortora, Funke y Case, 2007).

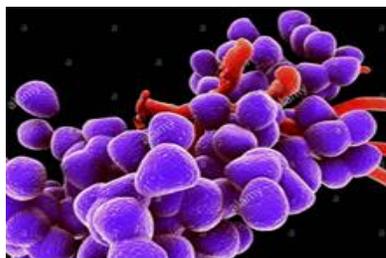


Figura 21. *Enterococcus faecalis*

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

Bacterias gramnegativas

Son aquellas que no se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura didérmica dada por la envoltura celular, pues presenta doble membrana celular (una externa y la otra citoplasmática), lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana (Romero, 2007).

www.bdigital.ula.ve

Composición de su pared celular

La envoltura celular de las bacterias gramnegativas está compuesta por una membrana citoplasmática (membrana interna), una pared celular delgada de peptidoglicano, que rodea a la anterior, y una membrana externa que recubre la pared celular de estas bacterias. Entre la membrana citoplasmática interna y la membrana externa se localiza el espacio periplásmico (Figura 22), relleno de una sustancia denominada periplasma, la cual contiene enzimas importantes para la nutrición en estas bacterias (Romero, 2007).

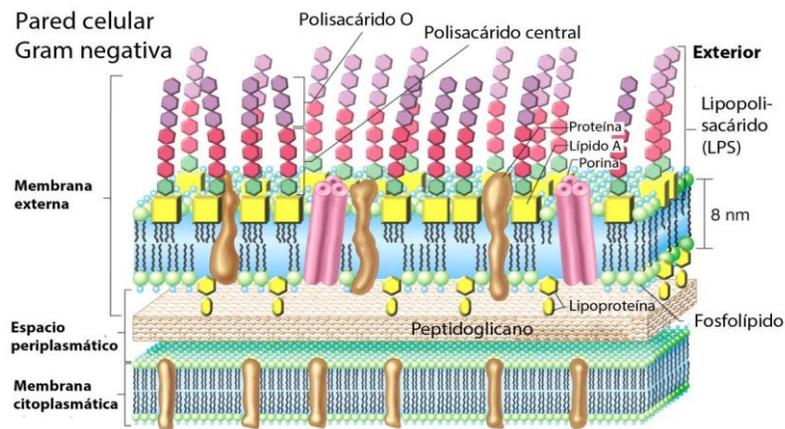


Figura 22. Pared celular de las bacterias gramnegativas
Tomado y modificado de Tortora, Funke y Case, 2007.

La membrana externa contiene diversas proteínas; entre ellas, las porinas o canales proteicos que permiten el paso de ciertas sustancias. También presenta unas estructuras llamadas lipopolisacáridos (LPS), que están formados por tres regiones: el polisacárido O (antígeno), una estructura polisacárida central (KDO) y el lípido A (endotoxina). El lipopolisacárido contiene una toxina termoestable que se libera al romperse la bacteria, pudiendo resistir a la esterilización en autoclave (Romero, 2007). Las bacterias gramnegativas estudiadas en el presente estudio fueron las siguientes:

Escherichia coli

Es un bacilo que mide de 1-3 μm de largo por 0,5 μm de ancho, se presenta sólo en pares, en cortas cadenas o formando grupos. Es móvil, no forma esporas y por lo general es no capsulado (Figura 23). En agar forma colonias circulares de 3 a 5 mm convexas y de coloración blanca un poco amarillenta. Este bacilo es aerobio y anaerobio facultativo; su temperatura óptima de crecimiento es de 37 $^{\circ}\text{C}$, el pH favorable es de 7. Es un habitante común del intestino de los seres vivos (Koneman, 2008).

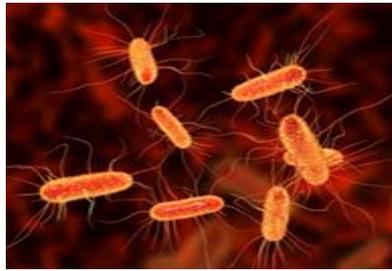


Figura 23. *Escherichia coli*

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

Klebsiella pneumoniae

Son bacilos no flagelados, por lo tanto, son inmóviles (Figura 24). Se encuentra frecuentemente en el suelo o el agua. Esta especie puede producir una forma grave de neumonía en los seres humanos (Tortora, Funke y Case, 2007).

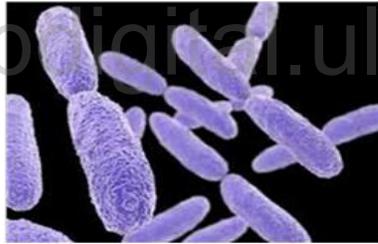


Figura 24. *Klebsiella pneumoniae*

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

Pseudomonas aeruginosa

Es un bacilo aerobio, móvil por medio de flagelos polares, sean únicos o en mechones (Figura 25). Esta bacteria es muy común en el suelo, produce un pigmento soluble de color azul verdoso. Puede infectar el tracto urinario, las quemaduras y las heridas, así como causar sepsis, abscesos y meningitis (Tortora, Funke y Case, 2007).



Figura 25. *Pseudomonas aeruginosa*

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

Diferencias entre bacterias grampositivas y gramnegativas

- ✓ Las bacterias grampositivas poseen una pared celular interna y una pared de peptidoglicano. En cambio, las negativas poseen una pared celular más completa.
- ✓ Las positivas no cuentan con una membrana externa. Las negativas tienen membrana externa que forma un saco rígido alrededor de la bacteria.
- ✓ Las grampositivas no tienen espacio periplasmático, mientras que las gramnegativas sí tienen, entre la superficie externa de la membrana citoplasmática y la interna de la membrana externa (Romero, 2007).

Actividad antibacteriana

Consiste en la medición de algún atributo de un producto, es decir; su efecto inhibitorio frente a microorganismos (tal efecto, se observa por la formación de un halo de inhibición), se determina por métodos microbiológicos (Rea, 2012).

Técnicas para la determinación de la actividad antibacteriana

Entre los métodos más usados para evaluar la actividad antibacteriana se encuentran el método de difusión y el método de dilución.

Las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar extractos de plantas con actividad antibacteriana (Salie, Eagles y Lens, 1996; Freixa, Vila, Vargas, Lozano, Adzet y Caniguera, 1998). En general se propone usar los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares, y los métodos de dilución para sustancias polares y no polares. Las metodologías aplicadas siempre consideran la estandarización de la concentración bacteriana a utilizar, con el ánimo de evitar un crecimiento exhaustivo, que impida el análisis de los resultados o proporcione resultados errados lo cual puede variar significativamente la respuesta del extracto vegetal o aceite, indicando la necesidad de utilizar concentraciones mayores de éste para inhibir el crecimiento del microorganismo. La concentración de bacterias usada para el estudio de susceptibilidad en el laboratorio ha sido estandarizado en 5×10^8 unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, lo cual equivale a un patrón de 0,5 en la escala de McFarland. Es recomendable tomar el inóculo de cultivos en la fase exponencial de crecimiento y siempre tomar 4 o 5 colonias de un cultivo puro para evitar seleccionar variantes atípicas (Anon, 2003).

Método de difusión o Kirby-Bauer

El método Kirby-Bauer (método de difusión en agar) es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. Este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas (Pedrique de Aulacio, 1992).

En este método, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35-37 °C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo con tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos, por ejemplo, el Comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (National Committee for Clinical Laboratories Standards, 2022) (Pedrique de Aulacio, 1992; Lizcano y Vergara, 2008).

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**) (Anon, 2003), y la concentración inhibitoria mínima (**CIM**) (Aberg, Goldman, Gray y Long; 2001; McDermott, Bodeis-Jones, Fritsche, Jones y Walker, 2005), 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 (Andrews, 2001).

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 (Wilkinson, 2007). 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 (Langfield, Scarano, Heitzman, Kondo, Hammond y Neto; 2004).

Definición Operacional de Términos

Metabolitos secundarios

No son fundamental en la vida del organismo, de manera que luego de los procesos de crecimiento, se llevan a cabo procesos adicionales de los que se generan compuestos usados como ventajas frente a los demás seres en el ecosistema para su supervivencia en el entorno, y algunos son de interés en el uso de productos naturales (Taiz y Zeige, 2006; Bonilla 2011).

Antibióticos

Son agentes terapéuticos de acción bactericida o bacteriostática sobre un espectro más o menos amplio de gérmenes patógenos (Plasencia, 2003).

Antibacterianos

El término antibacteriano, se refiere a un agente que interfiera con el crecimiento y la actividad de las bacterias (Montoya, 2008).

Bactericida

Es entendida como la acción mediante la cual se eliminan los microorganismos de una matriz (Montoya, 2008).

Bacteriostático

Se refiere únicamente a la supresión del crecimiento y desarrollo bacteriano, de tal modo que mientras el agente antibacteriano esté en contacto con la bacteria se impide la proliferación (Montoya, 2008).

Fitoterapia

Es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con una finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, atenuar o curar un estado patológico (Cañigüeral, Dellacassa y Bandoni, 2003).

Operacionalización de las Variables

En las Tablas 4 y 5, se describen las variables de esta investigación; una variable dependiente: Actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de *Anacardium excelsum* y una variable independiente: Composición química de los extractos obtenidos de *Anacardium excelsum*.

Tabla 4. Operacionalización de la Variable Dependiente: Actividad Antibacteriana

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Actividad Antibacteriana	Dependiente Cuantitativa	Se define como la propiedad de las plantas de producir una sustancia capaz de eliminar los microorganismos o inhibir su crecimiento, se debe a los constituyentes activos presentes en los extractos obtenidos de las plantas (Martínez y cols., 2012).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
La actividad antibacteriana se puede medir mediante el Método de difusión en disco (Kirby-Bauer).	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Cepas grampositivas: <ul style="list-style-type: none"> *<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 *<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29219 ➤ Cepas gramnegativas: <ul style="list-style-type: none"> * <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 * <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357 *<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 	Presencia o ausencia del halo de inhibición.

Elaborado por: Cordero, Pernía y Ríos, 2022.

Tabla 5. Operacionalización de la Variable Independiente: Composición química de los Extractos Obtenidos de *Anacardium excelsum*

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química de los Extractos Obtenidos de <i>Anacardium excelsum</i>	Independiente Cualitativa	Son compuestos producidos de la obtención de sustancias biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, por el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado (Cruz y Vela, 2011).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
Pruebas químicas como Tamizaje Fitoquímico	Compuestos químicos presentes como	Precipitado color rojo
	Alcaloides Ensayo de Wagner, Mayer y Dragendorff	
	Triterpenos/esteroles Ensayo de Lieberman-Bouchard	Aparición de un color rojo, verde o azul
	Compuestos fenólicos Prueba de tricloruro férrico (FeCl ₃)	Formación de un precipitado
	Saponinas Prueba de la espuma	Formación de espuma
	Taninos Ensayo de la gelatina	Precipitado blanco
	Flavonoides Ensayo de Shinoda Prueba de NaOH al 10%	Aparición de un color rojo escarlata Cambio de color café a naranja
	Cumarinas Prueba de Hidróxido de Amonio (NH ₄ OH)	Fluorescencia azul-violeta
	Antraquinonas Ensayo de Borntrager	Color rojo cereza
	Quinonas Prueba de H ₂ SO ₄ []	Coloración roja
	Lactonas sesquiterpenos Ensayo de Baljet	Coloración o precipitado de color rojo
	Glucósidos cardiotónicos Ensayo de Keller's	Coloración violácea

Elaborado por: Cordero, Pernía y Ríos, 2022.

Hipótesis

En estudios anteriores sobre el género *Anacardium* se han aislado compuestos químicos con propiedad antibacteriana, por tal motivo se podría deducir que los extractos de las hojas de la especie *Anacardium excelsum*; contengan compuestos similares con posible actividad antibacteriana en cepas de bacterias grampositivas y gramnegativas.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

El tipo de investigación tiene relación con la interrogante de estudio, en el cual se resalta lo que se quiere saber. Pues, esto marca el logro general que se desea conseguir durante el proceso de la investigación. En consecuencia, el verbo a utilizar en el objetivo tiene que implicar un logro (Hurtado 2010). En este estudio la investigación fue de tipo confirmatoria, la cual tuvo como propósito confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos obtenidos de *Anacardium excelsum*.

Diseño de Investigación

Según Hurtado (2010), “el diseño de la investigación se debe precisar por medio de las estrategias que se implementan para recolectar la información en una fuente determinada, en un tiempo determinado y en una cantidad o amplitud asociada a lo que se quiere saber”. Por lo cual, la presente investigación se llevó a cabo mediante un diseño de campo y experimental, ya que las muestras se recolectaron en su hábitat natural y además, un diseño de laboratorio.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

Una vez definido el tipo y diseño de la investigación, se describe a continuación la población o universo objeto de este estudio. Según lo señala Arias (2006) por población se entiende:

La población, o en términos más precisos *población objetivo*, es un conjunto finito o infinito de elementos con características comunes para los cuales serán extensivas las conclusiones de la investigación. Esta queda delimitada por el problema y por los objetivos del estudio (p.81).

Es decir, la población está constituida por el conjunto de entes en los cuales se va a estudiar el evento, y que además comparten características comunes. Por lo tanto, se tiene que el grupo de estudio estuvo representado por la especie *Anacardium excelsum* recolectada en el Jardín Botánico "Ing. Carlos Liscano", San Juan de Lagunillas.

Selección del Tamaño Muestral

La "n" muestral estuvo representada por 710 g de las hojas frescas de la especie *Anacardium excelsum*.

Sistema de variables

Las variables relacionadas con el objetivo de esta investigación son las siguientes: Variable dependiente (VD): Actividad antibacteriana, variable independiente (VI): Composición química de los extractos (hexano y etanol) de las hojas de la especie *Anacardium excelsum*.

Instrumentos de Recolección de Datos

Un instrumento de recolección de datos es cualquier recurso, dispositivo o formato (en papel o digital), que se utiliza para obtener, registrar o almacenar información (Arias, 2006). Por esto, los datos encontrados en los extractos de *Anacardium excelsum* fueron registrados mediante tablas, fotos, entre otros.

Procedimiento de la Investigación

- 1. Recolección de las muestras vegetales:** La muestra vegetal fue recolectada por Pernía, Live's y Ríos, Katherine; en el Jardín Botánico "Ing. Carlos Liscano", San Juan de Lagunillas de la Universidad de Los Andes. Fue procesada e identificada taxonómicamente por el Dr. Pablo Meléndez Director-Curador del Herbario MERF. Asimismo, se depositó una muestra para el váucher colección # 01 en el herbario MERF "Dr. Luis Enrique Ruiz Terán" de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes (Figura 26).



Figura 26. Váucher de la muestra de *Anacardium excelsum*

Elaborado por: Meléndez, 2022.

- **Selección de la materia prima y de la especie:** Se seleccionó las hojas verdes, frescas en buen estado de la especie *Anacardium excelsum*.

2. Tratamiento de la materia prima

- **Secado:** Se procedió al secado de las hojas a temperatura ambiente por un tiempo determinado.
- **Triturado y pesada:** Seguidamente se realizó el triturado de las hojas con la ayuda de una licuadora. Posteriormente se pesó con una balanza analítica para conocer su peso final (532 g).

3. Obtención del extracto de la especie *Anacardium excelsum*

- La muestra fue sometida a extracción por reflujo, utilizando como solventes hexano (60 °C) y etanol (40 °C).
- Concentración de los extractos en un rotavapor: una vez obtenido los extractos (hexano y etanol), se concentraron, utilizando un rotavapor a la temperatura de 40 °C. El producto seco se pesó: el extracto de hexano registró un peso de 74,29 g y el extracto de etanol 136,15 g y se colocaron en un envase de color ámbar.
- Almacenamiento y posterior refrigeración de los extractos a 4°C.

4. Tamizaje fitoquímico de la especie *Anacardium excelsum*

Las pruebas cualitativas llevadas a cabo para determinar los metabolitos secundarios, presentes en los extractos (hexano y etanol) de las hojas de la especie *Anacardium excelsum* fueron las siguientes:

Pruebas para determinar alcaloides

- ✓ **Wagner/Mayer/Dragendorff:** Se disolvió una porción de los extractos (hexano y etanol) en 2 mL de HCl al 5 %, luego se agitó, filtró y se tomó una alícuota a la que se le añadió gotas de los diferentes reactivos (Wagner, Mayer y Dragendorff).

Prueba para determinar triterpenos/esteroles

- ✓ **Lieberman-Bouchard:** A una pequeña porción de los extractos concentrados (etanol y hexano) se le añadió 1 mL de anhídrido acético y luego se estratificó con 2-3 gotas de H₂SO₄ concentrado, se dejó en reposo por 5 minutos.

Prueba para determinar compuestos fenólicos

- ✓ **Prueba de tricloruro férrico (FeCl₃):** Al extracto (etanol) se le adicionó, algunas gotas de tricloruro férrico al 1 %.

Prueba para determinar saponinas

- ✓ **Prueba de la Espuma:** Se preparó una solución acuosa del extracto de etanol y se colocó 1 mL de cada uno en un tubo de ensayo, se agitaron vigorosamente durante 1 minuto y se midió con una regla, la altura de la espuma.

Prueba para determinar taninos

- ✓ **Ensayo de la Gelatina:** Se disolvió 10 mg del extracto (etanol) en 10 mL de una solución de gelatina (1 %) y cloruro de sodio (10 %).

Pruebas para determinar flavonoides

- ✓ **Ensayo de Shinoda:** A 1 mL de los extractos (hexano y etanol) diluidos, se le adicionó una pequeña cantidad de magnesio metálico y 3 gotas de HCl concentrado.
- ✓ **Prueba de NaOH al 10 %:** Las soluciones de los extractos (hexano y etanol) acuosos se trataron con 1 mL de una solución de hidróxido de sodio al 10%.

Prueba para determinar cumarinas

- ✓ **Prueba de Hidróxido de Amonio (NH₄OH):** La boca del tubo de ensayo conteniendo la solución del extracto (etanol), se cubrió con un círculo de papel de filtro previamente tratado con solución de hidróxido de amonio 1 N. Se colocó durante unos minutos en agua hirviendo, posteriormente se retiró el papel filtro y se examinó bajo la luz ultravioleta.

Prueba para determinar antraquinonas

- ✓ **Ensayo de Borntrager:** A 10 mg del extracto (etanol), se le agregó 1 gota de hidróxido de amonio concentrado (NH₄OH).

Prueba para determinar quinonas

- ✓ **Prueba de H₂SO₄ []:** A 10 mg de cada extracto (hexano y etanol) contenido en una capsula de cerámica, se le adicionó 1 gota de ácido sulfúrico concentrado.

Prueba para determinar lactonas sesquiterpenos

- ✓ **Ensayo de Baljet:** Se disolvió 10 mg de los extractos (hexano y etanol), en 2 mL de HCl concentrado y se le adicionó de 3 a 4 gotas del reactivo de Baljet.

Prueba para determinar glicósidos cardiotónicos

- ✓ **Ensayo de Keller's:** Se disolvió 10 mg de cada extracto (hexano y etanol) en el reactivo de Keller's, al mismo se le adicionó unas gotas de H₂SO₄ concentrado.

5. Actividad antibacteriana del extracto (etanol) de las hojas de la especie *Anacardium excelsum* (Bertero ex Kunth) Skeels en cepas de bacterias grampositivas y gramnegativas

Los microorganismos evaluados se obtuvieron del Cepario del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de La Universidad de Los Andes. Estos fueron los siguientes:

➤ Cepas grampositivas:

* *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

* *Enterococcus faecalis* ATCC 29219

➤ Cepas gramnegativas:

* *Escherichia coli* ATCC 25922

* *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357

* *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

- **Preparación del preinóculo bacteriano:** Empleando las cepas de referencias internacional pertenecientes a la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), se realizó un repique bacteriano en medio de cultivo agar nutritivo.
- **Preparación de las placas para el antibiograma:** Se preparó el agar Müller-Hinton bajo estrictas condiciones de esterilidad, se colocó el medio de cultivo, aproximadamente 20 mL en cada placa y se dejaron solidificar a temperatura ambiente para luego ser inoculadas.
- **Preparación del inóculo:** Luego de haber preparado los preinóculos bacterianos se procedió a preparar los inóculos tomando una asada de las colonias bacterianas para ser resuspendidas en los tubos de ensayo con solución salina estéril (0,85 %), hasta que la turbidez fue igual a la del patrón de MacFarland 0,5 que contiene aproximadamente 10^8 unidad formadora de colonia (UFC) por mililitros.
- **Preparación de los discos:** Los discos de papel de filtro con un diámetro de 6 mm, se impregnaron con 10 μ L del extracto, los cuales fueron preparados con el solvente de extracción (etanol) a la concentración de 10.000 ppm.

5.1. Ensayo microbiológico: La determinación de la actividad antibacteriana se llevó a cabo empleando la técnica de difusión de disco en agar o método de Kirby-Bauer, el cual se fundamenta por la difusión radial del material impregnado en los discos de papel de filtro, que al absorber agua difunde a través del espesor del agar formando un gradiente de concentración.

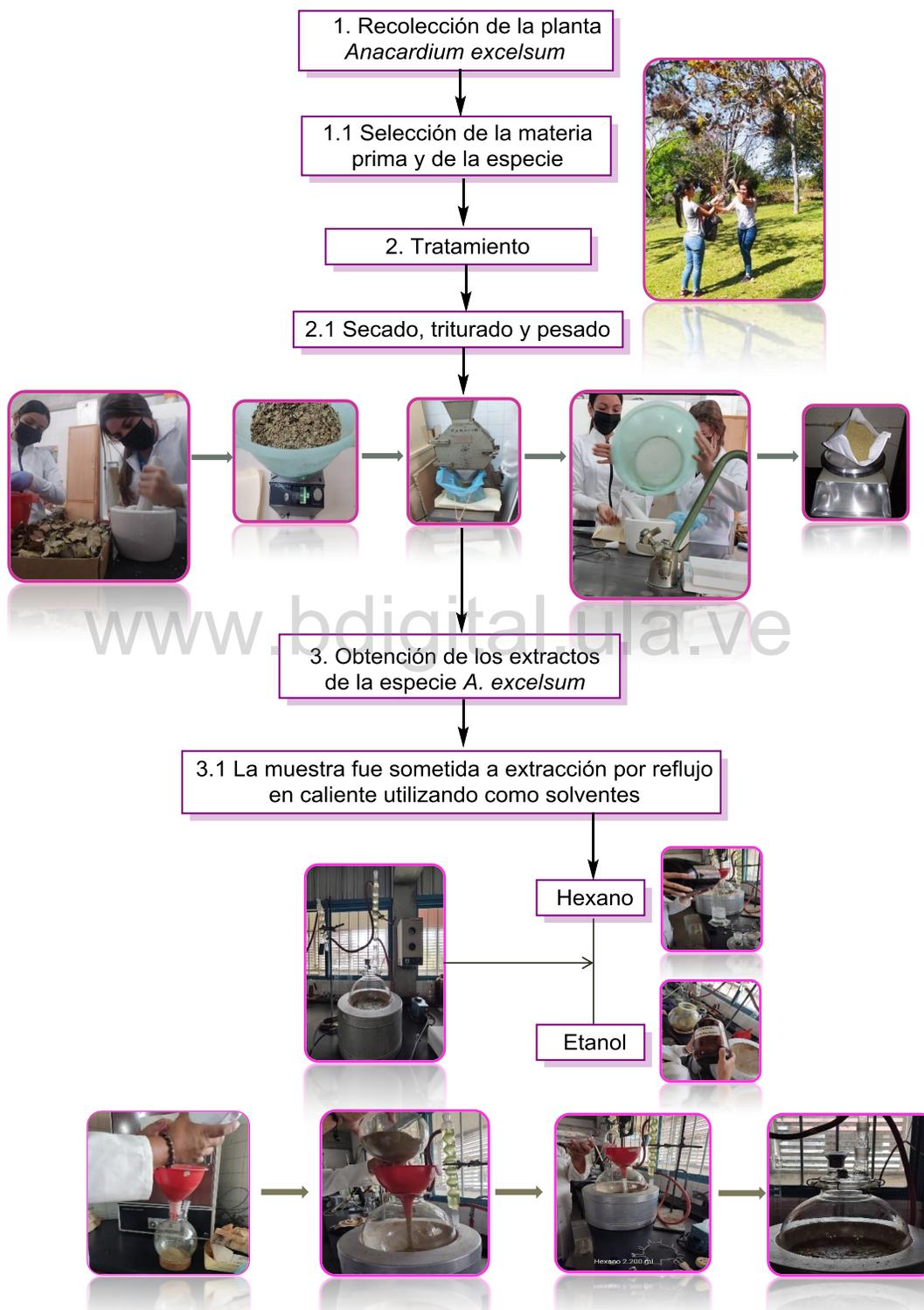
- **Inoculación de las placas:** El inóculo previamente preparado fue tomado con ayuda de un hisopo estéril evitando los excesos de humedad rotando el mismo por las paredes del tubo de

ensayo, luego se sembró la muestra en la placa de agar Müller-Hinton.

- **Colocación de los discos:** Una vez sembradas todas las placas con los diferentes microorganismos a ensayar, se colocaron los discos de papel filtro previamente impregnados con una concentración determinada del extracto de etanol de las hojas de la especie *Anacardium excelsum* de manera equidistante, también se ubicaron los discos de antibióticos de referencia (controles positivos) para cada microorganismo (Eritromicina® 15 µg/*Staphylococcus aureus* ATCC 25923; Ampicilina® 10 µg/*Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y Piperacilina® 100 µg/*Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), como control negativo se usó el dimetilsulfóxido (DMSO).
- Seguidamente, las placas de agar Müller-Hinton se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos, luego se incubaron a 37 °C durante 24 horas, en atmósfera aeróbica (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2020).

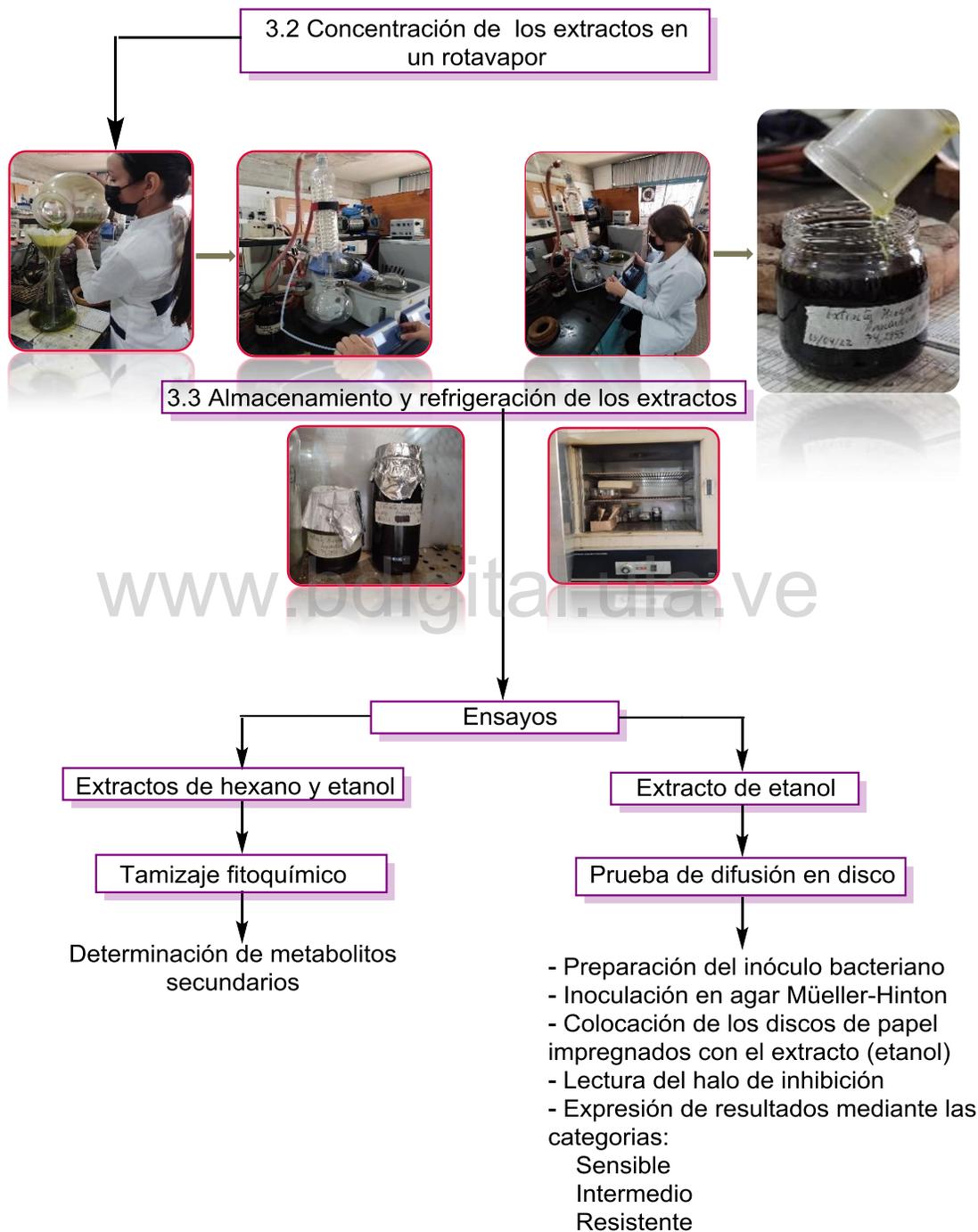
5.2. Lectura de las placas: Las lecturas se realizaron a través de la medición de los halos de inhibición en milímetros (mm). Se tomó como resultado sensible (actividad antibacteriana) la observación de un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco, la ausencia del halo; se interpretó como negativo o resistente (sin actividad antibacteriana) (Esquema 1).

Esquema 1. Procedimiento de la investigación



Elaborado por: Cordero, Pernía y Ríos, 2022.

Esquema 1. Procedimiento de la investigación (Continuación)



Elaborado por: Cordero, Pernía y Ríos, 2022.

Diseño de análisis

Los resultados de la investigación en curso fueron analizados mediante un enfoque cuantitativo. Donde se relacionó el crecimiento bacteriano *in vitro* de cada una de las cepas en estudio, contra la acción antibacteriana que presentó el extracto obtenido para dicho análisis; tal como lo proponen Palella y Martins, 2009. Los datos se analizaron, según el diseño cuali-cuantitativo.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

RESULTADOS

Determinación del % de rendimiento de los extractos hexano y etanol

En la determinación del % de rendimiento se utilizó la siguiente fórmula:

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

www.bdigital.ula.ve

Tabla 6. Resultados obtenidos del porcentaje de rendimiento

	EH	EE
Peso inicial (g)	532	532
Peso final (g)	74,29	136,15
% R	13,96	25,59

Leyenda: EH: extracto de hexano, EE: extracto de etanol, % R: porcentaje de rendimiento.

Tamizaje Fitoquímico

Las pruebas químicas realizadas a los extractos de hexano y etanol de las hojas de la especie *A. excelsum*, mediante tamizaje fitoquímico, revelaron la presencia de compuestos tales como: Triterpenos y esteroides con la reacción de Liebermann-Burchard (en el extracto de hexano y etanol), fenoles con la reacción de FeCl₃ (solo en extracto de etanol), taninos con el ensayo de la gelatina (solo en extracto de etanol), flavonoides con el ensayo de Shinoda

siendo positivo solo con el extracto de etanol y con la prueba de NaOH al 10 %, positivo con el extracto de etanol, específicamente del tipo xantonas y/o flavonas; lactonas sesquiterpenos con el ensayo de Baljet (extracto de hexano y etanol) y glicósidos cardiotónicos con el ensayo de Keller's, positivo solo con extracto de etanol.

Mientras que, no se identificaron alcaloides, saponinas, cumarinas, antraquinonas y quinonas, por tanto se podría inducir que dichos compuestos no se encuentran en las hojas de la especie *A. excelsum* o sus concentraciones son tan bajas que no se lograron detectar (Tabla 6).

www.bdigital.ula.ve

Tabla N° 7. Tamizaje Fitoquímico de los Extractos hexano y etanol de las hojas de la especie *Anacardium excelsum* (Bertero ex Kunth) Skeels

Metabolito	Prueba	Extracto Hexano Hojas	Extracto Etanol Hojas
Alcaloides	Dragendorff	ND	+
	Mayer	ND	-
	Wagner	ND	-
Triterpenos y Esteroles	Reacción de Liebermann-Burchard	++ (Verde/esteroles)	+ (Verde/esteroles)
Compuestos fenólicos	Reacción con FeCl ₃ al 1 %	ND	++ (Verde-negro)
Saponinas	Reacción de Espuma	ND	-
Taninos	Reactivo Gelatina	ND	+++ (Precipitado blanco)
	Reacción de Shinoda	-	++ (Rojo)
Flavonoides	Prueba con NaOH al 10 %	-	++ (Naranja) (Xantonas y/o flavonas)
Cumarinas	Prueba con NH ₄ OH []	ND	-
Antraquinonas	Prueba con NH ₄ OH []	ND	-
Quinonas	Prueba con H ₂ SO ₄ []	-	-
Lactonas sesquiterpenos	Ensayo de Baljet	++ (Amarillo)	++ (Color café)
Glicósidos cardiotónicos	Ensayo de Keller's	-	++ (Anillo color marrón)

Leyenda: ND: No detectado +++: Abundante; ++: Moderado +: Presente; -: Ausente

- ✓ **Alcaloides:** Al agregar el reactivo de Drangendorff, se observó la formación de un precipitado, se trató de un falso positivo; ya que en los reactivos de Mayer y Wagner, no se formó el precipitado, lo que indica que fue negativo (Figura 27).



Figura 27. Determinación de alcaloides del extracto etanol

Foto tomada por Pernía y Ríos, 2022.

- ✓ **Triterpenos/esteroles:** Al realizar la estratificación con el H_2SO_4 y dejado en reposo el tiempo correspondiente, se visualizó la aparición del color verde, indicativo de un ensayo positivo para esteroides (Figura 28).

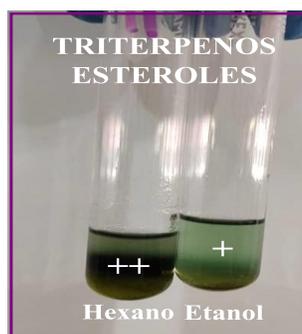


Figura 28. Determinación de triterpenos y esteroides del extracto hexano y etanol

Foto tomada por Pernía y Ríos, 2022.

Compuestos fenólicos: Esta prueba fue positiva, debido a que al adicionar el reactivo, se formó un cambio de color (verde-negro) (Figura 29).



Figura 29. Determinación de compuestos fenólicos del extracto etanol

Foto tomada por Pernía y Ríos, 2022.

- ✓ **Saponinas:** No se observó la formación de espuma en el extracto de etanol de las hojas, siendo esta prueba negativa (Figura 30).



Foto tomada por

Figura 30. Determinación de saponinas del extracto etanol

Foto tomada por Pernía y Ríos, 2022.

- ✓ **Taninos:** Su positividad se evidenció tras la aparición de un precipitado blanco (Figura 31).



Figura 31. Determinación de taninos del extracto etanol

Foto tomada por Pernía y Ríos, 2022.

- ✓ **Flavonoides:** El ensayo de Shinoda y la prueba de NaOH al 10 %, resultaron positivas en el extracto de etanol; en virtud de que en el primero se formó una coloración roja y en la segunda una coloración naranja (presencia de flavonoides del tipo xantonas y/o flavonas) (Figura 32).

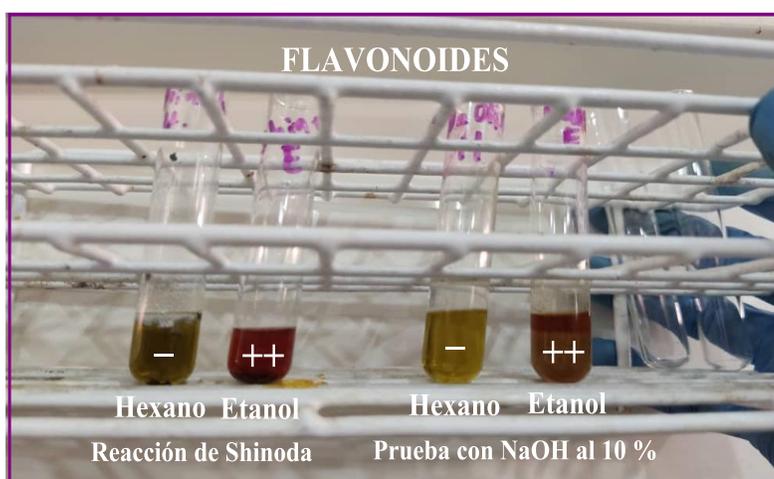


Figura 32. Determinación de flavonoides de los extractos de hexano y etanol

Foto tomada por Pernía y Ríos, 2022.

- ✓ **Cumarinas:** Al examinar el extracto de etanol tratado con el hidróxido de amonio concentrado (NH_4OH []) bajo la luz ultravioleta, no se

observó la coloración exaltada característica (fluorescencia azul-violeta) (Figura 33).



Figura 33. Determinación de cumarinas del extracto etanol

Foto tomada por Pernía y Ríos, 2022.

- ✓ **Antraquinonas:** No se formó el complejo rojo-cereza, lo que quiere decir que el ensayo fue negativo (Figura 34).

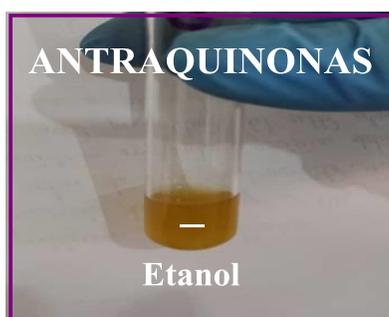


Figura 34. Determinación de antraquinonas del extracto etanol

Foto tomada por Pernía y Ríos, 2022.

- ✓ **Quinonas:** Al disolver los extractos de hexano y etanol con el H_2SO_4 [], no se percibió la coloración roja-púrpura, lo cual denota a la prueba como negativa (Figura 35).



Figura 35. Determinación de quinonas de los extractos de hexano y etanol

Foto tomada por Pernía y Ríos, 2022.

- ✓ **Lactonas sesquiterpenos:** La aparición del color café en el extracto de etanol y el color amarillo en el extracto de hexano, fue indicativo de un ensayo positivo (Figura 36).



Figura 36. Determinación de lactonas sesquiterpenos de los extractos de hexano y etanol

Foto tomada por Pernía y Ríos, 2022.

- ✓ **Glicósidos cardiotónicos:** El ensayo fue positivo para el extracto de etanol, ya que se desarrolló un anillo muy marcado, color marrón (Figura 37).

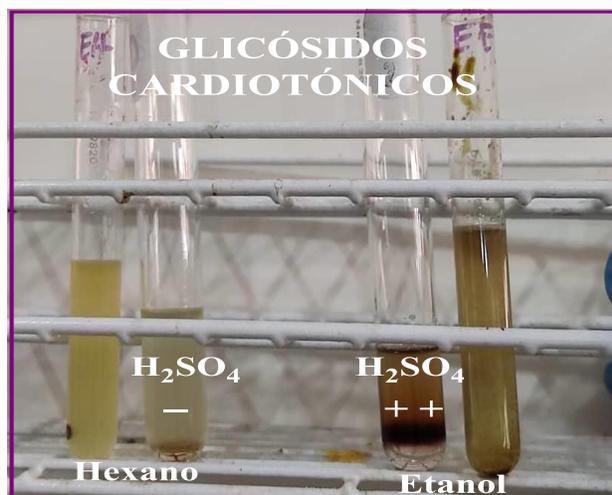


Figura 37. Determinación de glicósidos cardiotónicos de los extractos de hexano y etanol

Foto tomada por Pernía y Ríos, 2022.

Actividad Antibacteriana del Extracto Etanólico Obtenido de la Especie

A. excelsum

www.bdigital.ula.ve

Los resultados obtenidos del extracto de etanol de las hojas de la especie *A. excelsum*, evaluados mediante la técnica de difusión de disco en agar, se encuentran reflejados en la Tabla 7. El mencionado extracto, mostró actividad frente a las cepas de bacterias grampositivas como *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) con un halo de inhibición de 15 mm (Figura 38) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) con un halo de inhibición de 7 mm (Figura 39), así como también; en las bacterias gramnegativas *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) con un halo de inhibición de 9 mm (Figura 40), *Escherichia coli* (ATCC 25922) con un halo de inhibición de 7 mm (Figura 41) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) con un halo de inhibición de 9 mm (Figura 42).

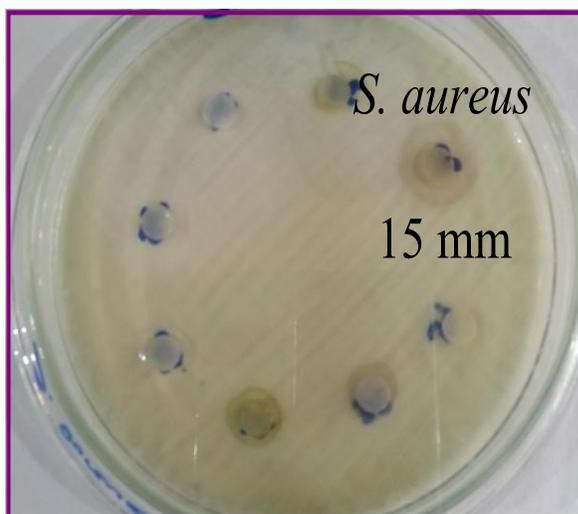


Figura 38. Ensayo del extracto de etanol en *S. aureus*

Foto tomada por Cordero, 2022.

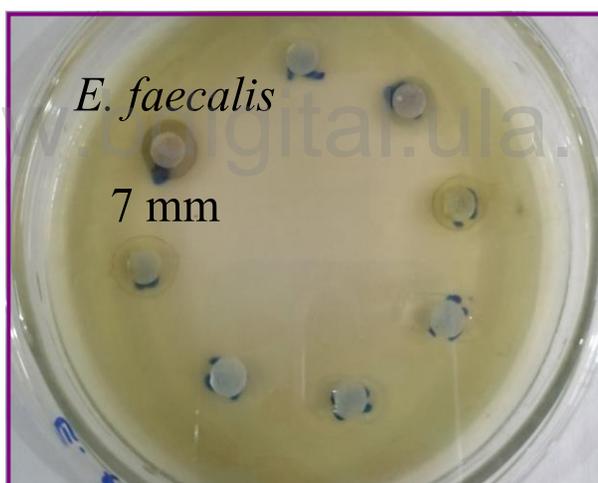


Figura 39. Ensayo del extracto de etanol en *E. faecalis*

Foto tomada por Cordero, 2022.

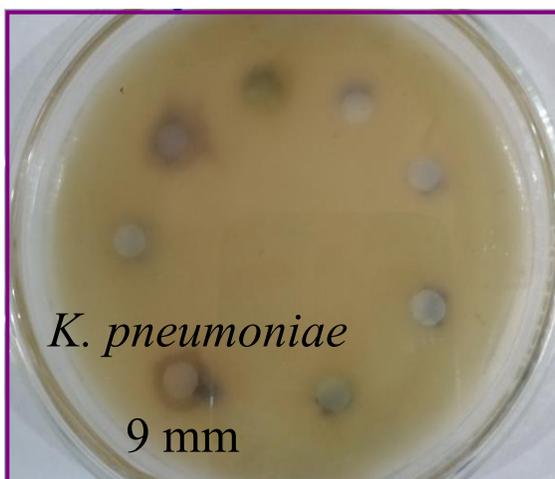


Figura 40. Ensayo del extracto de etanol en *K. pneumoniae*

Foto tomada por Cordero, 2022.

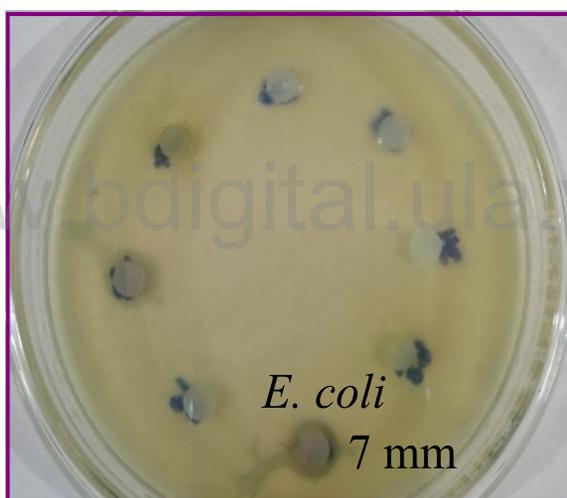


Figura 41. Ensayo del extracto de etanol en *E. coli*

Foto tomada por Cordero, 2022.

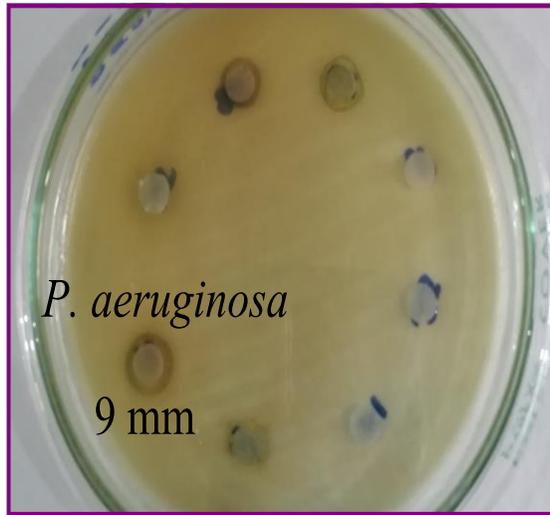


Figura 42. Ensayo del extracto de etanol en *P. aeruginosa*

Foto tomada por Cordero, 2022.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 8. Resultados de la Actividad Antibacteriana del Extracto de etanol de las Hojas de la Especie *Anacardium excelsum* (Bertero ex Kunth) Skeels

Halos de inhibición en mm					
Microorganismos	Concentración (ppm)	EHE	Antibióticos de referencia		
			PIP	AM	ERI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10.000	15	-	-	26
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	10.000	7	-	17	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	10.000	9	18	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10.000	7	21	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10.000	9	32	-	-

Leyenda: EHE: Extracto de hojas de etanol, PIP: Piperacilina® 100 µg; AM: Ampicilina® 10 µg; ERI: Eritromicina® 15 µg; 10.000 ppm: partes por millón; mm: Milímetros.

Elaborada por: Codero, Pernía y Ríos, 2022.

Discusiones

Los ensayos realizados a los extractos de hexano y etanol de las hojas de la especie *Anacardium excelsum* mediante tamizaje fitoquímico demostraron la presencia de compuestos químicos como triterpenos y esteroides con la reacción de Liebermann-Burchard, fenoles con la reacción de FeCl_3 , taninos con el ensayo de la gelatina, flavonoides con el ensayo de Shinoda y con la prueba de NaOH al 10 %, lactonas sesquiterpenos con el ensayo de Baljet y glicósidos cardiotónicos con el ensayo de Keller's. Con el reactivo de Dragendorff, se presentó un caso muy particular: positivo para alcaloides, sin embargo; se trató de un falso positivo, debido a la presencia de interferentes como lactonas, esteroides y triterpenos, los cuales reaccionan al ensayo produciendo un precipitado (Miranda y Cuéllar, 2012).

Lo descrito anteriormente, coincide con lo reportado por Tasayco y Zamallo (2021), estos autores determinaron en el extracto hidroalcohólico de hojas *Anacardium occidentale* L., la presencia de metabolitos bioactivos, como flavonoides, alcaloides y compuestos fenólicos. Además Jaramillo y cols (2019), analizaron los extractos butanólicos de *A. occidentale* y observaron la presencia de compuestos de tipo fenólico, flavonoides y en algunos casos de tipo alcaloidal. Aunado a ello, concuerda con el estudio realizado por Rojas y cols (2021), estos señalaron que las fracciones (acetato de etilo y acetona) derivadas del extracto de las hojas de *A. excelsum* contenían compuestos de tipo fenólico, taninos, terpenos de tipo triterpenos y terpenos de tipo esteroide.

En lo que respecta a la actividad antibacteriana, el extracto de etanol de las hojas de la especie *Anacardium excelsum* a la concentración de 10 mg/mL, inhibió las bacterias grampositivas: *Staphylococcus aureus* (15 mm) y *Enterococcus faecalis* (7 mm) y las bacterias gramnegativas: *Klebsiella pneumoniae* (9 mm), *Escherichia coli* (7 mm) y *Pseudomonas aeruginosa* (9 mm); tal aseveración guarda relación con el estudio realizado por Tasayco y

Zamallo (2021), los cuales evaluaron la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de hojas de *Anacardium occidentale* L., resultando positiva dicha actividad frente a *Staphylococcus aureus*. Además coincide, por lo descrito por Rojas y cols (2021), quienes encontraron que las fracciones de los extractos de *A. excelsum*, presentaron actividad antimicrobiana en casi todos los microorganismos evaluados: *S. mutans*, *S. aureus*, *E. faecalis* y *C. albicans* excepto en *E. coli*; a una concentración de 10 mg/mL, con halos de inhibición de 9 mm a 11 mm.

En el mismo orden de ideas, Salehi y cols (2020), mediante una revisión comentaron que el extracto seco obtenido de la hoja de la especie *A. occidentale* (concentración de 200 mg/mL), demostró actividad contra *S. aureus* con un halo de inhibición de 12 mm; seguidamente el extracto etanólico de la hoja seca de *A. occidentale* en un rango de concentración inhibitoria mínima (CIM) de 250 µg/mL-500 µg/mL, mostró halos de inhibición de 15 mm para *E. coli* y 13 mm para *P. aeruginosa*. De igual forma el ensayo de los extractos acuoso y el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *A. occidentale* contra cepas de *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, evidenciaron inhibición sobre *S. aureus* a 75 mg/mL y 150 mg/mL, con el extracto acuoso un halo de inhibición de 9,5 mm e hidroalcohólico un halo de inhibición de 10 mm.

Así también, Jaramillo y cols (2019), encontraron sensibilidad en los microorganismos evaluados: *S. aureus* con la fracción de butanol, el halo de inhibición fue de 4 mm, procedente del extracto de hexano fraccionado del extracto crudo de acetona y, la fracción de butanol un halo de inhibición de 6 mm, obtenida directamente del extracto crudo de acetona; las mismas fracciones de los extractos, mostraron potencial antifúngico frente a *Aspergillus niger* y *Trichophytum rubrum*. Farias y cols (2018), detectaron en extractos crudos y fraccionados de las hojas de *A. occidentale* L., después de ser irradiados con 10 kilogray (kGy) de Cobalto (Co); un aumento significativo

en la actividad antibacteriana sobre cepas multirresistentes de *Staphylococcus aureus*.

Finalmente, guardó similitud con los resultados obtenidos por Urrea y Sequeda (2012), los cuales a partir del extracto etanólico floral de *Anacardium excelsum* identificaron compuestos activos para combatir microorganismos patógenos, útiles en la preservación de alimentos; incluso se han reportado metabolitos secundarios, principalmente, compuestos fenólicos con actividad antibacteriana y antioxidante (Sequeda-Castañeda, 2008; Celis y cols., 2011).

Es de hacer notar, que las diferencias del trabajo en cuestión con respecto a los trabajos citados como: alcaloides positivos, halos de inhibición en mm; pueden deberse a la especie estudiada, su distribución geográfica, el solvente y técnica utilizada para obtener los extractos.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Efectivamente existe relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos de *Anacardium excelsum* en cepas de bacterias grampositivas y gramnegativas.
- En el presente estudio, las pruebas de tamizaje fitoquímico llevadas a cabo en los extractos de etanol y hexano de las hojas de la especie *A. excelsum* revelaron la presencia de metabolitos secundarios como triterpenos y esteroides con la reacción de Liebermann-Burchard (extracto de hexano y etanol), fenoles con la reacción de FeCl_3 (extracto de etanol), taninos con el ensayo de la gelatina (extracto de etanol), flavonoides con el ensayo de Shinoda y con la prueba de NaOH al 10% (extracto de etanol), específicamente del tipo xantonas y/o flavonas; lactonas sesquiterpenos con el ensayo de Baljet (extracto de hexano y etanol) y glicósidos cardiotónicos con el ensayo de Keller's (extracto de etanol).
- El método para determinar la sensibilidad antibacteriana (Kirby-Bauer), ensayado en el extracto de etanol de las hojas de la especie *A. excelsum* a la concentración de 10.000 ppm develó una susceptibilidad en las bacterias grampositivas: *Staphylococcus aureus* (15 mm) y *Enterococcus faecalis* (7 mm); además en las bacterias gramnegativas: *Klebsiella pneumoniae* (9 mm), *Escherichia coli* (7 mm) y *Pseudomonas aeruginosa* (9 mm).

- Estos resultados abren nuevos horizontes en cuanto terapia alternativa se refiere, ya que podría utilizarse para elaborar fármacos capaces de tratar afecciones de tipo antibacteriano.
- Además, representa un aporte significativo para futuras investigaciones puesto que, es uno de los pocos estudios que hay, más recientes y actualizados sobre la especie *A. excelsum*

www.bdigital.ula.ve

RECOMENDACIONES

- Determinar la concentración más baja (**CIM**) del extracto de etanol de las hojas de la especie *A. excelsum*, que puede inhibir el crecimiento de las bacterias ensayadas.
- Debido a que, tal especie posee abundantes taninos, responsables en gran medida de la actividad antiinflamatoria y antioxidante, sería preciso evaluar su efecto *in vivo*, en modelos de animales experimentales (ratones, ratas).
- Realizar un estudio de tamizaje fitoquímico y actividad antimicrobiana de la especie *A. excelsum*, utilizando otras partes de la planta (raíces, flores, tallos) e incluir cepas fúngicas, mediante el método de difusión y dilución.
- Llevar a cabo una investigación sobre la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *A. excelsum*, mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM).

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Aberg, M., Goldman, M., Gray, L.; y Long, J. (2001). *"Infectious Diseases Handbook including Antimicrobial Therapy & Diagnostic Test/Procedures"*. (6a Ed.). Lexi-Comp Inc.
- Andrews, J. (2001). "Determination of Minimum Inhibitory Concentration" of antibacterial agents by broth dilution". *Clinical Microbiology and Infection*. **Revista Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 48 (31), 5-16.
- Alayo, N., y Guevara, L. (2012). *Identificación preliminar de fitoconstituyentes en las inflorescencias de Bejaria aestuans L* (Trabajo de grado para optar por el título de bachiller en Farmacia y Bioquímica). Universidad Nacional de Trujillo, Perú-Trujillo.
- Aponte, M., Calderón, M., Delgado, A., Herrera, I., Jiménez, Y., Ramírez, Z., Rojas, J., y Toro, Y. (2008). *Fitoquímicos*. División de Nutrición en Salud Pública. Caracas, Venezuela.
- Arias, F. (2006). *El Proyecto de Investigación: Introducción a la Metodología Científica*. (5a Ed). Caracas-Venezuela: Editorial Episteme.
- Ávalos, A., y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Serie Fisiología Vegetal*, 2(3): 119-145.
- Bandoni, A. (2000). *Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica*. Argentina: Editorial Universidad Nacional de la Plata.
- Bentham, G., y Hooker, J. (1862). Anacardiaceae. In *Genera Plantarum*, **Revista Brittonia**, 45(2), 115-129.
- Bonilla, C. (2011). *Romero, Rosmarinus officinalis L*. Bogotá, Colombia: Editorial Universidad Nacional.

- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*. (2ª Ed.) Zaragoza: Acribia S. A.
- Bucay, L. (2009). *Estudio farmacognóstico y actividad antimicrobiana de la Violetilla (Hynbanthus parviflorus)* (Trabajo de investigación). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba.
- Cabral, N., Medeiros de Oliveira, J., Da Silva, M., D'Oliveira, R., Medeiros, M., Da Silva, C., Zucolotto, S., Daniel, B., Fonseca, J., Siqueira, R., y De Bittencourt, M. (2017). Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of *Anacardium occidentale* Leaf Extract. ***Revista Evidence-based Complementary and Alternative Medicine***, 2 (7), 1-4.
- Cabrera, Y., Fadragas, A., y Guerrero, L. (2005). Antibióticos naturales. Mito o Realidad. ***Revista Cubana de Medicina General Integral***, 21(3-4).
- Cañigüeral, S., Dellacassa, E., y Bandoni, A. (2003). Plantas medicinales y fitoterapia: ¿Indicadores de dependencia o factores de desarrollo?. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 22(3): 265-278. [en línea]. Recuperado de: http://www.latamjpharm.org/trabajos/22/3/LAJOP_22_3_6_1_S966J_S548J.pdf. [2017, 14 diciembre].
- Casellas, J. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: Consecuencias para la infectología. ***Revista Panamericana de Salud Pública***, 30(6), 519–528.
- Celis, C., García, A., Sequeda, G., Méndez, G., y Torrenegra, R. (2011). Antimicrobial activity of extracts obtained from *Anacardium excelsum* against some pathogenic microorganisms. ***Revista The Emirates Journal of Food and Agriculture***, 23(3), 249-257.

- Cerpa, MG. (2007). *Hidrodestilación de aceites esenciales: Modelado y caracterización* (Tesis de Doctorado). Universidad de Valladolid, Facultad de Ciencias, España.
- Chaquisbol, N., Lengua, L., Dolores, I., Bazán, R., y Bravo, M. (2003). Alimentos funcionales fitoquímicos, clasificación e importancia. ***Revista Peruana de Química e Ingeniería Química***, 5(2), 9-20.
- Chen, T., y Wiemer, D. (1984). A volatile leafcutter ant repellent from *Astronium graveolens*. *Naturwissenschaften*, 71(2): 97-98.
- CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute. (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 28th Edition. [Wayne, PA]. Recuperado de: https://www.clsi.org/media/1930/m100ed28_sample
- 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 Fundación Dialnet***, 4(4): 31-39.
- Domínguez, X. (1973). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. México: Editorial Limusa.
- Drago-Serrano, M., López-López, M., y Sáinz-Espuñes, T. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. ***Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas***, 37(4): 58-68.
- Engler, A. (1892). *Anacardiaceae*. In: Engler A, Prantl K (editors). Die natürlichen Pflanzenfamilien III: Leipzig.
- Farias, G., Amaral, A., y Borges, E. (2018). Antibacterial activity of irradiated extracts of *Anacardium occidentale* L., on multiresistant strains of

Staphylococcus aureus. **Revista Elsevier**, 140(7), 327-332.
<https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2018.07.035>

Freixa, B., Vila, R., Vargas, L., Lozano, N., Adzet, T., y Caniguera, S. (1998). "Screening for antifungal activity of nineteen Latin American plants". **Revista Phytotherapy Research**, 12(6), 427-430.

García, P. (2011). *Evaluación de Las Propiedades Acaricidas de Piper crassinervium Kunth. Piper aequale Vahl. (Piperaceae) Sobre Larvas de Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Trabajo de Grado para optar El Título de Magister En Ciencias Agrarias). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Colombia-Palmira.

García, O. (2017). Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Revista de la Universidad Veracruzana*, 15(32), 11-15.

Gérvás J. (2000). *La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública*. (2da ed.). España: Aten Primaria.

González, V., Sánchez, R., Cortes, H., Soto, M., Maceda, A., y Castillo, I. (2019). Evaluación del efecto antivirulencia de fenoles de cadena larga presentes en dos especies de anacardiaceae. **Revista Fitotecnía Mexicana**, 42(3), 227-234.

Gudesblat, G. (2007). Señalización en la interacción entre bacterias fitopatógenas y su hospedador. **Revista Química Viva**, 2(6), 36-47.

Hemsherkhar M., Santhosh, M., Kemparaju, K., y Girish, K. (2012). Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 110-132. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2011.00833.x>

- Hernández-Sampieri, Fernández, C., Batista, L. (2010). *Capítulo III. Planteamiento del problema cuantitativo. En: Metodología de la Investigación.* (5ta ed.). México: Mc Graw Hill.
- Hurtado, J. (2010). *Guía para la comprensión holística de la ciencia.* (3a ed.). Caracas: Fundación Sypal.
- Ingraham, J., y Ingraham, C. (1998). *Introducción a la Microbiología.* (Vol. 2). Barcelona-España: Editorial Reverté, S.A.
- Jaramillo, M., Ocampo, D., Cruz, B., y Galvis, J. (2019). Actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de diferente polaridad de *Anacardium occidentale*. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, 24(2), 677-681.
- Khattak, U., Ullah, R., Khan, S., Barkatullah, Ullah, S., y Saima. (2017). Pharmacognostic evaluation and analgesic efficacy of ethanolic extract of *Euphorbia dracunculoides* L. **Revista Pharmacognosy Journal**, 9(5): 644-653. doi:10.5530/pj.2017.5.102.
- Koneman, W. (2008). *Diagnostico microbiológico.* (6° ed.). Buenos Aires-Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Koteich, S., Vivas, J., Bahsas, A., Rosales, Y., y Bullón, J. (2019) Caracterización por RMN y actividad antibacteriana de los componentes del aceite de la semilla de merey (*Anacardium occidentale* L.). *Avances en Química*, 14 (1): 31-40.
- La Camera, E., Bisignano, C., Crisafi, G., Smeriglio, A., Denaro, M., Trombetta, D., Mandali, G. (2018). Biochemical Characterization of Clinical Strains of *Staphylococcus* spp., and Their Sensitivity to Polyphenols-Rich Extracts from Pistachio (*Pistacia vera* L.). **Revista Pathogens**, 7(4), 82-84.

- Langfield, R., Scarano, F., Heitzman, M., Kondo, M., Hammond, G., y Neto, C. (2004). "Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galiodes*". **Revista Journal of Ethnopharmacology** 94(2-3), 279-281.
- Leon, W. (2003). Estudio anatómico del xilema secundario de 17 especies de la familia Anacardiaceae en Venezuela. **Revista Acta Botánica de Venezuela**, 26(1), 1-15.
- Lizcano, A., y Vergara, J. (2008). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos* (Trabajo de pregrado). Universidad Javeriana, Bogotá.
- Lock, D. (1988). "Investigación Fitoquímica" *Métodos En El Estudio De Productos Naturales*. Perú: Pontificia Universidad Católica del Perú.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Productos naturales. En D. Marcano y Hasegawa. M (Eds.), Fitoquímica orgánica*. Venezuela: Torino.
- Márquez, O. (2010). *El Proceso de la Investigación en las Ciencias Sociales*. Ediciones de la Universidad Ezequiel Zamora colección Docencia Universitaria. [en línea]. Recuperado de: <https://es.slideshare.net/jaldanam/metodologa-de-la-investigacion> [2017, 11 diciembre].
- Martínez, J. De Ferrer, B. Ojeda, G., Ferrer, A., y Nava, R. (2003). Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. **Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia**, 20(4), 502-512.

- Martínez, A., Valencia, G., y Jimenez, U. (2008). *Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica*. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica. Medellín.
- Martínez, Y. Soto, F., Saveedra, M., Espinosa., R., y Martínez, O. (2012). Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de hojas de *Anacardium occidentale* L. (marañón). ***Revista Cubana de Plantas Medicinales***, 17(4), 320-329.
- McDermott, P., Bodeis-Jones, S., Fritsche, T., Jones, R., y Walker, R. (2005). "Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents", ***Revista The Journal of Clinical Microbiology***, 43(12), 6136–6138.
- Miranda, M. y Cuéllar, A. (2012). *Farmacognosia y productos naturales*. (2a ed.). La Habana: Editorial Félix Varela.
- Mitchell, D., y Mori, S. (1987). El anacardo y sus parientes (*Anacardium: Anacardiaceae*). ***Revista Memoirs of the New York Botanical Garden***, 42 (1), 1–76.
- Montoya, H. (2008). *Microbiología Básica para áreas de la salud y afines*. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia.
- Morales, G. (2020). *Plan de Manejo y Conservación del Caracoli (*Anacardium excelsum* (Bertero ex Kunth) Skeels) en la jurisdicción CAR*. Bogotá, Colombia: Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca–CAR.
- Nadinic, J., Bandoni, A., Martino, V., y Ferraro, G. (2016). *Fitocosmética: Fitoingredientes y otros productos naturales*. Buenos Aires: EUDEBA.

- NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2020). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing. Fourteenth informational supplement*. Wayne, Pa: NCCLS document M100-S14.
- Nor, A., Mohd, M., Razali, M. (2016). Potencia antimicrobiana del aceite esencial de Anacardo (*Anacardium occidentale*) clones. **Revista Journal of Tropical Agriculture and Food Science**, 44(1): 73-80.
- Ojewole, J., Mawoza, T., Chiwororo, W., y Owira, P. (2010). *Sclerocarya birrea* (A. Rich) Hochst. [ëMarulaí] (Anacardiaceae): a review of its phytochemistry, pharmacology and toxicology and its ethnomedicinal uses. **Revista Phytotherapy Research**, 24(5), 633-639.
- Organización Panamericana de la Salud. (2014). *Magnitud y tendencias de la resistencia a los antimicrobianos en Latinoamérica*. RELAVRA.
- Palavecino, E. (1997). *Boletín Escuela de Medicina*. Pontificia Universidad Católica de Chile. 26(1), 156-160. [en línea]. Chile. Recuperado de: http://www.britanialab.com.ar/k07_04.html. [2017, 11 diciembre].
- Parella, S. y Martins, F. (2012). *Metodología de la Investigación Cuantitativa*. Caracas-Venezuela. FEDUPEL.
- Pedrique de Aulacio, M. (1992). *Microbiología. Manual de Métodos Generales*. (2° ed.). Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.
- Pell, S. (2004). *"Molecular systematics of the cashew family (Anacardiaceae)"*. LSU Doctoral Dissertations. 1472. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College.

Recuperado

de:

https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_dissertations/1472.

- Pell, S., Mitchell, J., Miller, A., y Lobova, T. (2011). *Anacardiaceae*. In: Kubitzki K, editor. *The Families and Genera of Vascular Plants*. Flowering Plants Eudicots: Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae. Springer.
- Periago, M. (2011). La resistencia a los antimicrobianos: un factor de riesgo para las enfermedades infecciosas. ***Revista Panameña de Salud Pública***, 30(6), 1-2.
- Pontón, J., Moragues, M., Gené, J., Guarro, J. Quindós, G. (2002). Hongos y actinomicetos alergénicos. ***Revista Iberoamericana de Micología***, 2(699), 1-4.
- Prashant, T., Bimlesh, K., Mandeep, K., Gurpreet, K. y Harleen, K. (2011). Phytochemical Screening and Extraction: a Review. ***Revista Pharmaceutica Scientia***, 1(1): 98-106.
- Primo, M., Guilarde, A., Martelli, C., Batista, L., y Turchi, M. (2012). Healthcare-associated *Staphylococcus aureus* bloodstream infection: Length of stay, attributable mortality, and additional direct costs. ***Revista The Brazilian Society of Infectious Diseases***, 16(6), 503–509.
- 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)* (Trabajo de grado para la obtención del título de Bioquímico Farmacéutico). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias. Riobamba-Ecuador.

- Roldan, S., Vargas, C., Mejía, M., Zapata, J., Moncada, M. (2016). *Ingeniería de tejidos y aplicaciones*. Medellín: Fondo editorial.
- Romero R. (2007). *Microbiología y parasitología humana*. (1a. ed.). España: Médica Panamericana.
- Rojas. A., Durango, C., García, S., Peláez, D., García, D., y Gamboa, F. (2021). *Anacardium excelsum* phytochemical analysis and *in vitro* antimicrobial activity against oral cavity microorganisms. **Revista Acta Odontológica de Latinoamérica**, 34(2), 127-135.
- Salehi, B., Ösgüven, M., Kirtin, C., Özcelik, B., Morais, M., Pereira, J., Fonseca, C., Goncalves, T., Melo, H., Amina, B., Armstrong, L., Selamoglu, Z., Sevindik, M., Yousaf, Z., Sharifi, J., Muddathir, A., Prasad, H., Martorell, M., Kumar, A., Cho, W., y Martins, N. (2020). Antioxidant, Antimicrobial, and Anticancer Effects of *Anacardium* Plants: An Ethnopharmacological Perspective. **Revista Frontiers in Endocrinology**, 11(295), 3389-3391.
- Salie, F., Eagles, P., y Lens, H. (1996). "Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species". **Revista Journal of Ethnopharmacology**, 52(1), 27-33.
- Sánchez, F. (2009). *Hidrodestilación técnicas de extracción de aceites esenciales*. Fitoquímica. Argentina: Avibert.
- Saxena, G., McCutcheon, A., Farmer, S., Towers, G., y Hancock, R. (1994). Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*. **Revista Journal of Ethnopharmacology**, 42(2), 95-99.
- Sequeda, C. (2008). *Actividad antioxidante de extractos totales y fracciones de la especie vegetal Anacardium excelsum (Bert. & Balb. ex Kunth) Skeels por métodos espectrofotométricos y composición de*

la fracción activa por CG-EM (Tesis de Maestría). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá-Colombia.

Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Colombia: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.

Skoog A. (2001). *Química Analítica*. (7a ed.). México: Editorial McGraw-Hill. 8

Spencer, J. Bodner G. y Rickard L. (2006). *Química estructura y dinámica*. (4a ed.). [en línea]. Estados Unidos: Cecs. Recuperado de: <http://www.qfa.uam.es/fqf/material/l3.pdf>.

Struthers, J. Westram, R. (2005). *Bacteriología Clínica*. [en línea]. España: Masson. Recuperado de: [https://books.google.co.ve/books?id=Z6onofK2ToEC&printsec=frontcover&dq=Struthers,+J.+\(2005\).+Bacteriologia+Clinica.+Espa%C%B1a:+Masson.&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwjohoOS5vXXAhWGQt8KHeoMBD0Q6AEIJjAA#v=onepage&q=Struthers%2C%20J.%20\(2005\).%20Bacteriologia%20Clinica.%20Espa%C3%B1a%3A%20Masson.&f=false](https://books.google.co.ve/books?id=Z6onofK2ToEC&printsec=frontcover&dq=Struthers,+J.+(2005).+Bacteriologia+Clinica.+Espa%C%B1a:+Masson.&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwjohoOS5vXXAhWGQt8KHeoMBD0Q6AEIJjAA#v=onepage&q=Struthers%2C%20J.%20(2005).%20Bacteriologia%20Clinica.%20Espa%C3%B1a%3A%20Masson.&f=false). [2017, 11 de diciembre].

Suresh, M., y Raj, R. (1990). Cardol: the antifilarial principle from *Anacardium occidentale*. **Revista Current Science**, 59(9), 477-479.

Taiz, L., y Zeiger, E. (2006). *Plant physiology Sinauer*. USA: Associates inc Sunderland.

Tamayo, R., Verdecia, A., y Mojera, I. (2011). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólicos, etéreo y acuosos de las hojas y tallo de la *Isocarpha cubana* B. **Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal**, 15(3), 322-347.

- Tasayco, E., y Zamallo, P. (2021). “*Jarabe con extracto hidroalcohólico de hojas Anacardium occidentale L. (marañon) y su actividad antibacteriana frente a cepas ATCC de Staphylococcus aureus*” (Tesis de pregrado). Universidad Inca Garcilaso de La Vega, Perú.
- Terrazas, T. (1994). Wood anatomy of the Anacardiaceae: ecological and phylogenetic interpretation. University of North Carolina: Chapel Hill, NC.
- Tortora, G., Funke, B., y Case, C. (2007). *Introducción a la Microbiología*. (9a ed.). Buenos Aires-Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Urrea, V., y Sequeda, I. (2012). Evaluación de los extractos de *Anacardium excelsum* (Anacardiaceae) como alternativa hacia la preservación de alimentos. **Revista Universidad de Antioquia Medellín Vitae**, 19(1), 394-396.
- Wannan, B., y Quinn, C. (1991). Floral structure and evolution in the Anacardiaceae, **Revista Botanical Journal of the Linnean Society**, 107(4), 349-385.
- Wannan, B., y Quinn, C. (1990). Pericarp structure and generic affinities in the Anacardiaceae, **Revista Botanical Journal of the Linnean Society**, 102(3), 225-252.
- Wilkinson, M. (2007). "Methods for Testing the Antimicrobial Activity of Extracts". **Revista Modern Phytomedicine**, 1(2), 157-171. doi.org/10.1002/9783527609987.ch8
- Zamalloa, P., y Tasayco, E. (2021). *Jarabe con extracto hidroalcohólico de hojas Anacardium occidentale L. (marañon) y su actividad antibacteriana frente a cepas ATCC de Staphylococcus aureus* (Tesis de Pregrado). Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Perú.