UNIVERSIDAD DE LOS ANDES

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES

"Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro"

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS DE LA CORTEZA DE *Centrolobium paraense* Tul.

www.bdigital.ula.ve

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

Autores:

Nailyn Eliany Plaza Arias

C.I: V- 26.587.552

Nelvis Daniel Araujo Bautista

C.I: V- 27.677.354

Tutor (a):

Dra. Rosa Aparicio

Mérida, Noviembre de 2023

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

DEDICATORIA

Este y todos mis logros se lo dedico con todo mi corazón a mi mami, María Arias en reconocimiento a todo ese esfuerzo que día a día haces para que yo continúe formándome, por ser mi pilar y ejemplo de constancia y humildad, por estar siempre cuando te necesito, por impulsarme desde pequeña a cumplir mis sueños y a superarme y por todo tu amor tan sincero e incondicional. Te amo mi mami, que mi Diosito te bendiga siempre.

A mis hermanas, Jackeline, Anyelin, Maribi, Frenesy y a mi hermano Cristhian porque a pesar de la distancia han formado parte de este camino expresándome su amor, consideración, palabras de aliento y apoyo incondicional.

A mis sobrinos Veronica Milanyela, Arianna Sofia, Oliver Alejandro, Sebastian Emmanuel y Ainhoa Amelie por su amor y aprecio. Y a mí angelito en el cielo Ángel Yohendri.

www.bdigital.ula.ve

A mi compañero de vida, Alvaro Ariza porque desde el primer día en que nos conocimos tu confianza en mí y en mis capacidades ha sido a ojos cerrados, por tu amor, consideración y por todo tu esfuerzo.

A Miguel Nuñez por ser como un padre para mí, por sus consejos, su apoyo incondicional y sus enseñanzas.

A mi abuela, María Parra que desde donde este, estoy segura que está orgullosa de mi.

A Nelvis Araujo y a su familia la señora Nelly Bautista y el señor Alexis Araujo por hacerme sentir como parte de ella.

A Dios y a todos ustedes dedico el presente trabajo, porque han fomentado en mí, el deseo de superación y de triunfo en la vida. Espero contar siempre con su valioso e incondicional apoyo.

Nailyn Plaza

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

DEDICATORIA

Detrás de alguien que llega lejos, hay una red de apoyo que motiva por esto y más este logro va dedicado a:

Dios Todopoderoso por su infinito amor, por haberme dado salud y todas las herramientas necesarias para cumplir esta meta, por bendecirme con la familia que me regalo. Por estar siempre conmigo, por cuidarme y protegerme, por guiar e iluminar mí camino. Gracias por todo lo que me das.

Mis Padres, por su apoyo incondicional y desinteresado, por todo su amor y cariño. A ti *Nelly*, por confiar y hacer de mí una mejor persona a través de tus consejos y enseñanzas. A ti *Alexis*, por desear lo mejor para mí y por todo tu sacrificio para que logremos nuestras metas, ustedes fueron y son mi fortaleza en todo momento los quiero y admiro mucho.

Mi hermano mayor *Jesús Alexis* por brindarme siempre su apoyo, y a pesar de la distancia nunca será un obstáculo para acompañarnos mutuamente, tu dedicación es un ejemplo a seguir. También a su esposa *Andrea* juntos han formado una excelente y admirable familia además que nos han dado el mejor regalo… nuestra amada sobrina.

www.bdigital.ula.ve

Mi hermano menor *Alex José* por ser un jovencito con mucha determinación y tener sus metas muy claras espero que el esfuerzo que se refleja en este trabajo sirva siempre como el mejor ejemplo de perseverancia y constancia en la vida. Espero poder ser un modelo a seguir para ti en lo que nos quede de camino.

Por ultimo a un gran regalo de Dios, a mi sobrina *Abby Sofia* que llegó a alegrar un poco más nuestras vidas y a ser un motivo por el cual trabajar para el cumplimiento de nuestros sueños y metas que esto sea un ejemplo en su futuro de que cuando se lucha y se trabaja con disciplina y dedicación de la mano de Dios los sueños se hacen realidad. Siempre contaras conmigo.

¡Los Amo! Este y todos mis logros son de ustedes… ***Nelvis Daniel Araujo***

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

AGRADECIMIENTOS

¡Gracias, Dios! por protegerme y darme fuerzas para superar obstáculos y dificultades a lo largo de este camino, por todas las bendiciones que llegan a mi vida y por este logro.

A mi familia, mami, Jacke, Anyi, Mari, Frene, Cris y Alvaro por todo su apoyo

A la ilustre Universidad de Los Andes y a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis por abrirme sus puertas para formarme como profesional de calidad y permitirme todos estos años vivir día a día las mejores experiencias.

A mi compañero y amigo, Nelvis Araujo por convertirte parte de mi familia desde el primer día, gracias por ser como un hermano para mí, y por toda tu ayuda y apoyo.

Al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga Del Hierro” y al personal que forma parte de el por permitirnos llevar a cabo nuestra investigación.

A nuestra tutora, la Dra. Rosa Aparicio por haberme aceptado como su tesista, por toda la dedicación, colaboración, apoyo y cariño de su parte.

A las Profesoras Alida Pérez, Ysbelia Obregón, Yndra Cordero, Clara Díaz y el Auxiliar de Laboratorio Emilio Salazar por toda su ayuda en nuestra investigación.

Al profesor Jesús Velázquez de la Universidad Experimental de Guayana, por su valioso aporte al donar la corteza de la especie *Centrolobium paraense* Tul., para la realización de este trabajo de grado.

A Nátaly Véliz, por tu forma de ser tan lógica y por ser mi hermanita del IIFFB.

A Soriany Pereira por tus palabras de aliento y por brindarme tu amistad.

Agradezco a Gladys Sánchez y a su familia por su colaboración y apoyo.

A mis queridas profesoras Ysheth Millán y Rima Bahsas por sus consejos y sabiduría, gracias totales. ***Nailyn Plaza***

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso, por su amor inagotable y por estar siempre conmigo en cada momento de mi vida.

A mí amado núcleo familiar, mis padres y hermanos por ser ese combustible de amor y apoyo incondicional en cada uno de nuestros sueños y metas.

A la Señora María Resurrección Arias por abrirme las puertas de su hogar y permitirme formar parte de su familia.

A mi alma mater, la Ilustre Universidad de Los Andes, por seguir formando profesionales de calidad. Orgulloso de ser Ulandino.

A la Facultad de Farmacia y Bioanálisis por todos estos años de formación tanto profesional como personal, han sido enriquecedores.

A mi amiga, compañera, hermana de vida, coautora de esta investigación y muy pronto colega Nailyn Eliany por todos estos años de apoyo, cariño, comprensión y sobretodo paciencia a lo largo de este caminar…

A la Dra. Rosa Aparicio, por su excelente trabajo como tutora siempre presente dispuesta a ayudarnos y apoyarnos, asesorándonos en todo momento para lograr una investigación de calidad.

Al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” y a su equipo de trabajo por permitirnos llevar a cabo esta investigación en sus instalaciones y aceptarnos como parte de sus investigadores. También a la Profesoras Ysbelia Obregón y Alida Pérez que hacen un excelente trabajo.

Al Profesor Jesús Velásquez, Profesora Yndra Cordero, Profesora Clara Díaz, Auxiliar de Laboratorio Emilio Salazar por ser parte fundamental en el desarrollo de esta investigación.

A Nátaly Véliz, por estar presente desde el primer día en el desarrollo de este trabajo bien que nos bautizamos como hermanitos del IIFFB.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

A los profesores, Ysheth Millán, Ana Carolina Ramírez y Julio Rojas por su tiempo y dedicación en nuestra formación académica pero más aún como seres humanos, ustedes marcan la diferencia.

A mi grupo de amigos "*los muchachos*" por cada momento compartido y palabras de aliento para seguir adelante.

Y a todos aquellos que de una u otra forma han estado presentes a lo largo de este caminar.

A lo largo de este camino, me ha tocado vencer muchos obstáculos, en los que he necesitado el apoyo de muchas personas, y en esta oportunidad les quiero decir ¡Muchas Gracias!

Nelvis Daniel Araujo

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla de Contenido

	Pág.
Índice de Tablas	xi
Índice de Figuras	xii
Índice de Esquemas	xiv
RESUMEN	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	4
Planteamiento del Problema	4
Justificación de la Investigación	5
Objetivos de la Investigación	7
Objetivo General	7
Objetivos Específicos	7
Alcances y Limitaciones de la Investigación	8
Alcances de la Investigación	8
Limitaciones de la Investigación	8
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	9
Trabajos Previos	9
Antecedentes Históricos	12
Bases Teóricas	14
Familia Fabaceae	14
Género *Centrolobium*	17
Especie *Centrolobium paraense* Tul.	20
Productos Naturales	24
Extractos Vegetales	34
Análisis fitoquímico preliminar	39
Bacterias	42
Antibióticos	51

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla de Contenido
(Continuación)

	Pág.
Actividad antibacteriana	57
Hongos	63
Antifúngicos	70
Actividad antifúngica	75
Definición Operacional de Términos	77
Operacionalización de las Variables	79
Hipótesis	82
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	83
Tipo de Investigación	83
Diseño de Investigación	83
Población y Muestra	84
Unidad de Investigación	84
Selección del Tamaño de la Muestra	84
Sistema de Variables	84
Instrumento de Recolección de Datos	85
Procedimientos de la Investigación	85
Recolección y Preparación del Material Vegetal	85
Obtención de los Extractos	87
Tamizaje Fitoquímico	89
Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., por el método de difusión en disco (Kirby - Bauer)	92
Preparación de las muestras	92
Preparación de los discos	93
Preparación de los inóculos	93

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla de Contenido
(Continuación)

	Pág.
Actividad antibacteriana	94
Actividad antifúngica	94
Concentración mínima inhibitoria (CMI)	95
Diseño de Análisis	96
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	97
Resultados	97
Tamizaje fitoquímico de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul.	97
Actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul.	103
Discusiones	107
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	113
Conclusiones	113
Recomendaciones	114
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	115

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Índice de Tablas

		Pág.
Tabla 1.	Antibióticos según su composición química	57
Tabla 2.	Clasificación simplificada de hongos y pseudohongos....	65
Tabla 3.	Clasificación de los antifúngicos por su estructura.....	71
Tabla 4.	Clasificación de los antifúngicos por su sitio de acción en el hongo.....	72
Tabla 5.	Operacionalización de la variable dependiente. Actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraens*e Tul.	80
Tabla 6.	Operacionalización de la variable independiente. Composición química de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraens*e Tul.	81
Tabla 7.	Cepas de referencia internacional.....	93
Tabla 8.	Características físicas de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul.	97
Tabla 9.	Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul.	99
Tabla 10.	Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., frente a cepas de referencia internacional.....	104

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Índice de Figuras

		Pág.
Figura 1.	Algunos compuestos aislados de la familia Fabaceae.	16
Figura 2.	Compuestos químicos aislados del género C*entrolobium*	19
Figura 3.	Compuestos químicos aislados de *Centrolobium paraense* Tul.	22
Figura 4.	Vías generales del metabolismo secundario de las plantas.....	26
Figura 5.	Estructura química de los ácidos ferúlico y caféico	29
Figura 6.	Estructura química de las saponinas.....	31
Figura 7.	Estructura de los glicósidos cardíacos	32
Figura 8.	Estructura química de los glicósidos cianogénicos	32
Figura 9.	Estructura de alcaloides derivados de reticulina	34
Figura 10.	Rotavapor.....	36
Figura 11.	Equipo Soxhlet	37
Figura 12.	Formas y agrupamientos de las bacterias.....	43
Figura 13.	Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos	51
Figura 14.	Sitio de acción de los antibióticos.....	56
Figura 15.	Alteraciones en el transporte de fármacos (sobreexpresión de bombas, transportadores ABC) .	70
Figura 16.	Especie vegetal *Centrolobium paraense* Tul.	86
Figura 17.	Ubicación geográfica de la Ciudad de Upata	86
Figura 18.	Proceso de extracción.....	87
Figura 19.	Extractos obtenidos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul.	88

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Índice de Figuras
(Continuación)

Pág.

Figura 20. Tamizaje fitoquímico de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul. 100

Figura 21. Actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., frente a cepas de referencia internacional..... 105

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Índice de Esquemas

		Pág.
Esquema 1.	Rutas de síntesis de compuestos fenólicos	28
Esquema 2.	Proceso para la obtención de extractos a partir del material vegetal.....	88

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

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

Actividad antimicrobiana y composición química de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul.

Autores:
Nailyn Eliany Plaza Arias
Nelvis Daniel Araujo Bautista
Tutor (a): Dra. Rosa Aparicio

RESUMEN

Centrolobium paraense Tul., (Fabaceae), es una especie forestal conocida con el nombre de Cartán, ampliamente distribuido en la costa caribeña, se caracteriza por su madera extremadamente ornamental. El objetivo de esta investigación fue confirmar la relación entre la actividad antimicrobiana y la composición química de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., en cepas de referencia internacional. Los extractos de la corteza de hexano, acetona y etanol se obtuvieron mediante la técnica de extracción continua a reflujo. La composición química se determinó mediante el tamizaje fitoquímico. La actividad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en agar con discos. El resultado del tamizaje fitoquímico reveló la presencia de alcaloides, triterpenos, esteroles, fenoles, flavonoides, quinonas, antraquinonas y lactonas sesquiterpenicas. La actividad antimicrobiana de los extractos evidenció sensibilidad a *Staphylococcus aureus* (11mm con acetona y 12 mm con etanol), *Klebsiella pneumoniae* (8mm con acetona y 9 mm con etanol), *Pseudomonas aeruginosa* (7 mm para ambos extractos) y *Candida albicans* (8 mm con etanol) a una concentración de 10 mg/mL y no presento actividad frente a *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Candida krusei*. La concentración mínima inhibitoria se evaluó en *Candida albicans* arrojando como resultado 9 mg/mL. Este es el primer reporte de composición química y actividad antimicrobiana de extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., del estado Bolívar.

Palabras claves: Fabaceae, *Centrolobium paraense* Tul., Tamizaje fitoquímico, Actividad antimicrobiana

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

INTRODUCCIÓN

El ser humano guarda estrecha relación con el medio ambiente que lo rodea, muy en particular con las plantas. Porque, inicialmente empleo su uso como mecanismo de supervivencia obteniendo innumerables beneficios: alimentación, vestimenta, materiales de construcción y salud (Domínguez, 1973). La aplicación de plantas medicinales en todo el mundo precede a la introducción de antibióticos y otras drogas modernas. Una planta medicinal se define como aquella que, en una o más de sus estructuras biológicas, contiene sustancias que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos, estas constituyen una fuente útil de medicinas tanto tradicionales como modernas y las hierbas medicinales tienen una utilidad genuina de la que depende aproximadamente el 80 % de la población rural como atención primaria de salud (Osungunna, 2020).

www.bdigital.ula.ve

Específicamente, ofrecen sustancias potencialmente útiles aplicables a enfermedades humanas, en concreto aquellas producidas por microorganismos (Domingo y López, 2003), por lo que se hace necesario evaluar su actividad antimicrobiana. A este respecto, la actividad antimicrobiana se define como la habilidad específica o capacidad de un antimicrobiano de inhibir el crecimiento de determinados organismos caracterizados por la sensibilidad o resistencia de los mismos y se basa en la medición de su efecto inhibitorio (halo de inhibición) (Betés, Duran, Mestres y Nogués, 2008; Pedraza y Castellanos, 2009).

Desde siglos pasados, se conocen plantas cuyos extractos han sido usados en pócimas o en curaciones (Marcano y Hasegawa, 2002). En tal sentido, estos son un concentrado obtenido por tratamientos de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, constituidos por una mezcla de principios activos como mono y sesquiterpenos incluyendo cetonas y aldehídos, los cuales actúan como biocidas. Además, de sustancias inertes

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

que se producen de la totalidad o de partes de un planta fresca o seca (Barreto, 1997; García, Martínez, Ortega y Castro, 2010).

Una investigación puede iniciarse al darse cuenta que una situación no se desarrolla según lo esperado o lo deseado. Además, de la existencia de vacíos, necesidades o carencias (Hurtado, 2012). Al respecto, los autores de esta investigación detectaron la ausencia de trabajos previos sobre actividades biológicas de *Centrolobium paraense* Tul., de allí la necesidad de analizar la actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza contra cepas de referencia internacional.

Centrolobium paraense Tul., es una especie forestal comercialmente conocida en el exterior (Morgado, Gutiérrez, García, Arrioja, Toro, Gómez y Velásquez, 2010). Son árboles de 4 a 30 metros de altura, los cuales tienen un crecimiento de un metro por año. Adicionalmente, se distinguen dos variedades *Centrolobium paraense* Tul. var. orinocense Benth, y *Centrolobium paraense* Tul. var. paraense (Aristeguieta, 2003; Pirie, Klitgaard y Pennington, 2009). Su distribución se extiende desde Panamá, Colombia, Venezuela, Trinidad y Tobago, Guyana y Brasil, creciendo mayormente en bosques siempre verdes de tierras bajas, parches de bosques alrededor de sabanas y sabanas entre 50 y 330 metros sobre el nivel del mar; en Venezuela, es conocida con el nombre común de Cartán, su distribución esta reportada en los estados Aragua, Bolívar, Cojedes, Guárico, Lara, Portuguesa y Zulia (Morgado y cols., 2010).

www.bdigital.ula.ve

El objetivo de esta investigación fue confirmar la relación entre la actividad antimicrobiana y composición química de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., en cepas de referencia internacional.

Finalmente, el presente trabajo esta sistematizado de acuerdo a las normas de la Asociación Americana de Psicología (APA) de la siguiente manera: En V Capítulos, el Capítulo I denominado El Problema, contiene los siguientes elementos: Planteamiento del Problema, Justificación, Objetivos, Alcances y

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II, llamado Marco Teórico comprende: Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las Variables e Hipótesis. El capítulo III, titulado Marco Metodológico comprende los siguientes puntos: Tipo y Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Sistemas de Variables, Instrumento de Recolección de Datos, Procedimientos de la Investigación y Diseño de Análisis. El capítulo IV denominado Resultados y Discusiones. El capítulo V, llamado Conclusiones y Recomendaciones. Por último, la Bibliohemerografía.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Las enfermedades infecciosas siguen siendo, a principios del siglo XXI, unas de las causas más importantes de muerte en la humanidad. La introducción de los antibióticos en la práctica clínica en la década de los cuarenta del siglo XX supuso una de las intervenciones más importantes para su control y aumentó en varios años la esperanza de vida de la población (Alós, 2014).

www.bdigital.ula.ve

Sin embargo, desde hace pocos años, una amenaza creciente deteriora la eficacia de estos fármacos por la aparición de la resistencia en los microorganismos a los antimicrobianos, esto es un problema multifactorial, con implicaciones microbiológicas, terapéuticas, epidemiológicas y de salud pública generado en los últimos 50 años (Avellaneda y Pecho, 2002; Martínez y Calvo, 2010).

En efecto, esta problemática es debido principalmente al uso inapropiado de los antimicrobianos; originando el incremento en número y diversidad de microorganismos resistentes y al mismo tiempo, la supresión de los susceptibles haciendo más difícil el tratamiento de las infecciones que causan. Las consecuencias negativas se ven tanto en términos de salud como en el costo económico (Avellaneda y Pecho, 2002).

Por esto, en los últimos años se ha incrementado el interés por desarrollar nuevos fármacos y estrategias terapéuticas encaminadas al control de agentes patógenos resistentes. A este respecto, la Organización Mundial de Salud (OMS, 2013), ha considerado a las plantas como una fuente alternativa

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

potencial para la obtención de nuevos agentes terapéuticos útiles en el tratamiento de enfermedades infecciosas (Gómez y cols., 2015).

Dentro de este marco, las plantas medicinales han sido fuente de una amplia variedad de compuestos biológicamente activos por muchos siglos y se ha utilizado sea como material crudo (extractos, infusiones, tinturas, entre otras) o compuestos puros para el tratamiento de enfermedades. Se estima que en la actualidad el 80 % de la población utiliza medicina alternativa herbolaria como tratamiento paralelo a la medicina tradicional y su uso ha estado siempre muy arraigado a la tradición (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

Debe señalarse que la familia Fabaceae cuenta con una amplia distribución universal, es la tercera de mayor riqueza natural comprende 730 géneros y 19400 especies. Algunas especies de esta familia se utilizan en la medicina tradicional debido a diversas propiedades terapéuticas, incluyendo propiedades antimicrobianas (Gómez y cols., 2015).

www.bdigital.ula.ve

En relación a lo antes expuesto sobre la situación actual del problema, los autores de esta investigación plantean el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál será la relación entre la actividad antimicrobiana y la composición química de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., en cepas de referencia internacional?

Justificación de la Investigación

Se puede afirmar que el uso de las plantas medicinales nació casi con el hombre, por ensayo y error, éste utilizó los elementos que la naturaleza le brindaba para curar sus enfermedades. Estos conocimientos terapéuticos pasaron y se perfeccionaron de generación en generación y consecuentemente surgieron las drogas medicinales. Más del 25 % de los medicamentos utilizados durante los últimos 20 años se derivan directamente

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

de las plantas, cabe mencionar que tan sólo entre el 5 % al 15 % de las aproximadamente 250000 plantas de uso medicinal, han sido investigadas para compuestos bioactivos. Esto subraya el gran potencial de las plantas en la búsqueda de nuevos medicamentos (Fonnegra y Jiménez, 2007; Rivas, Oranday y Verde, 2016).

Por otra parte, la resistencia a los antimicrobianos por parte de los microorganismos está aumentando cada vez más y la capacidad para tratar las enfermedades infecciosas está siendo afectada, lo anterior constituye un grave problema de salud pública. Por ello, en la Asamblea de la Organización Mundial de la Salud (OMS) llevada a cabo en 2015, se ha consensuado la necesidad de un plan de acción global para combatir la resistencia a antimicrobianos, que involucra la búsqueda de nuevos fármacos y agentes antimicrobianos que se caractericen por ser seguros, eficaces y que actúen frente a los microorganismos resistentes (Cires, 2002; Serra, 2017).

www.bdigital.ula.ve

En conjunto, esto lleva a la necesidad de estudiar la composición química de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., y determinar la actividad antimicrobiana frente a cepas de referencia internacional, ya que el uso de los productos naturales obtenidos de las plantas representa una de las más recientes estrategias para el tratamiento de las enfermedades infecciosas y así, contribuir con nuevas alternativas terapéuticas en el campo medicinal, farmacéutico e industrial.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la relación entre la actividad antimicrobiana y la composición química de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., en cepas de referencia internacional.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., mediante el método de reflujo utilizando solventes de distinta polaridad (hexano, acetona y etanol).
- Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en los extractos mencionados anteriormente mediante el tamizaje fitoquímico.
- Determinar la actividad antimicrobiana y la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., por el método de difusión en agar con discos contra microorganismos de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

El alcance de una investigación está relacionado con la profundidad y/o logro de la misma. De esta manera, el uso de prácticas de salud complementarias, es decir el uso de recursos naturales como las especies vegetales para el cuidado o restauración de la salud es tan antiguo como la aparición del ser humano, porque desde el principio de la civilización son parte de las prácticas de atención, de cuidado familiar y comunitario. En este sentido, esta investigación aporta desde el punto de vista científico, el uso de la medicina tradicional como alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades, específicamente las infecciosas ya que permitió confirmar la relación entre la actividad antimicrobiana y la composición química de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul.

www.bdigital.ula.ve

Limitaciones de la Investigación

Es importante considerar que esta investigación, aunque tenga un alcance concreto, tuvo limitaciones que obstaculizaron su desarrollo. En tal sentido, las limitaciones que se presentaron fueron las siguientes: la insuficiente información de trabajos previos que la sustenten con respecto a su actividad antimicrobiana. Por otra parte, la poca cantidad de cepas que ofrece el cepario. Además, los constantes cortes de electricidad, de agua, de gas y de internet. También, la escaza afluencia de transporte tanto público como privado. Así como también, la emergencia sanitaria por la COVID-19. Finalmente, el alto costo de reactivos y deterioro de la infraestructura de los laboratorios donde se llevó a cabo la investigación.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Mora, Serrano, Lira, Jiménez y Hernández (2021), publicaron un trabajo titulado: Evaluación de la actividad antimicrobiana de semillas de *Leucaena esculenta* y *Leucaena leucocephala* recolectadas en Tlayacapan, Morelos, México. El objetivo del estudio fue determinar la actividad antimicrobiana de los extractos de hexano, acetona y metanol de las semillas de *L. esculenta* y *L. leucocephala* presentes en la comunidad de Tlayacapan Morelos. Las semillas de ambas especies se recogieron en la localidad de Tlayacapan, Morelos en Julio de 2018. Los extractos fueron obtenidos mediante la técnica de maceración con hexano, acetona y metanol. La actividad antimicrobiana de los extractos se determinó, cualitativamente mediante el método de difusión en agar y cuantitativamente (concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) mediante el método de microdilución en caldo) en 20 cepas bacterianas, 3 cepas levaduriformes y 4 cepas de hongos filamentosos. En las pruebas cualitativas, se encontró actividad antimicrobiana en 6 cepas bacterianas (4 de *Staphylococcus aureus* y 2 de *Escherichia coli*), 1 cepa de hongos levaduriformes y 4 de hongos miceliados. Mediante la técnica de microdilución en caldo, *E. coli* CUSI (Laboratorio de Análisis de la Clínica Universitaria de Salud Integral) mostró valores de CMI de 2000 y 3000 µg/mL para *L. leucocephala* y *L. esculenta* respectivamente y para *S. aureus* CUSI, CMI: 4000 y 2000 µg/mL para *L. leucocephala* y *L. esculenta* respectivamente, ambas cepas sensibles a los extractos de metanol. Por su parte, *Candida glabrata* fue susceptible a los extractos de metanol con

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

valores de CFM (concentración fungicida mínima) de 4000 µg/mL (*L. leucocephala*) y 6000 µg/mL (*L. esculenta*). En los extractos de hexano, acetona y metanol, se evidenció mediante pruebas colorimétricas, la presencia de alcaloides, triterpenos, monoterpenos, esteroides, glucósidos, saponinas y compuestos fenólicos, los cuales reportan potencial antimicrobiano. Los extractos de acetona y metanol de semillas de ambas especies presentaron actividad antimicrobiana sobre diferentes cepas de bacterias y hongos, validando así, el uso medicinal de este recurso por parte de la comunidad de Tlayacapan para tratar algunas enfermedades infecciosas. Este trabajo se incluye como antecedente ya que guarda relación con el tema, en cuanto a actividades biológicas evaluadas a géneros pertenecientes a la familia de la especie en estudio.

Yusuf, Abdullahi y Abdulaziz (2021), publicaron un trabajo titulado: Cribado fitoquímico y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Albizia ferruginea* (Fabaceae). El objetivo del estudio fue determinar la actividad fitoquímica y antimicrobiana del extracto de metanol de las hojas de *Albizia ferruginea*. Las hojas de la especie *Albizia ferruginea* fueron recolectadas en el estado de Kaduna, Nigeria. El extracto fue obtenido mediante la técnica de percolación con metanol. La actividad antimicrobiana del extracto se determinó mediante el método de difusión en agar con pozos de 6 mm de diámetro en bacterias Gram positivas y Gram negativas y la concentración mínima inhibitoria a través del método microdilución en caldo para los organismos cuyo crecimiento fue inhibido. El análisis del extracto de metanol de *Albizia ferruginea* reveló la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas y triterpenos, por otro lado, las antraquinonas y los glucósidos cardíacos estaban ausentes en el extracto. Los resultados mostraron que los organismos de prueba fueron inhibidos por el extracto de metanol de *Albizia ferruginea* mostrando halos de inhibición para *Enterococcus faecalis* (28 mm), *Salmonella* Typhi (25 mm), *Salmonella* Paratyphi (27 mm), *Shigella dysenteriae* (28 mm)

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

y *Klebsiella pneumoniae* (25 mm). Sin embargo, no fue activo frente a *Streptococcus pyogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*. Además, el extracto tuvo una CMI de 3,25 mg/mL para *E. faecalis*, *S.* Typhi, *S.* Paratyphi, *S. dysenteriae* y *K. pneumoniae.* Se podría decir que el espectro de actividad del extracto es amplio y esto justifica el uso diverso de la planta en la medicina popular en el tratamiento de dolencias como diarrea, disentería, fiebre, tos, dolor e infecciones de la piel. Este trabajo se incluye como antecedente debido a que la especie estudiada pertenece a la misma familia que *Centrolobium paraense* Tul., lo que permite inferir que ésta presente una posible actividad biológica.

Pareja, Pardo, Jurado, Guillen, Romero y Meneses (2020), llevaron a cabo un trabajo titulado: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara”, Fabaceae sobre bacterias de la biopelícula bucal. El objetivo del estudio fue determinar la actividad antibacteriana *in vitro*, del extracto de etanol de las vainas de *Caesalpinia spinosa* “tara”, sobre cultivos de bacterias de la biopelícula bucal. Se obtuvieron las vainas secas de *C. spinosa* a través de un biólogo. El extracto se obtuvo mediante la técnica de maceración. Se realizó un estudio experimental *in vitro*, en el cual se comparó la actividad antibacteriana de un extracto de etanol de *C. spinosa* y controles (clorhexidina al 0,12 % (CHX 0,12 %), antiséptico bucal (AB), etanol y agua destilada), frente a cultivos de cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC® 25175), *Streptococcus sanguinis* (ATCC® 10556), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538) y *Porphyromonas gingivalis* (ATCC® 30277). Se utilizó el método de difusión de agar con pozos de 6 mm de diámetro, en el grupo experimental y controles. Se evidenció que el promedio del halo de inhibición formado por la aplicación del extracto de etanol de *C. spinosa* sobre el *S. aureus*, fue mucho mayor que el obtenido con la CHX 0,12 % o el AB. También se observó, que el promedio de halo de inhibición del extracto de *C. spinosa*

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

fue mayor que los controles, frente a las cepas de *S. sanguini*s. La *C. spinosa* demostró tener alta actividad antibacteriana *in vitro* frente a la presencia de *S. aureus* (37,7 mm), mediana actividad para *S. sanguinis* (14 mm) y *E. faecalis* (18 mm) y ligera actividad para *S. mutans* (13,8 mm). No mostró actividad sobre la *P. gingivalis*. En este estudio se aplicó la concentración total del extracto. Este trabajo se incluye como antecedente previo ya que los autores estudiaron un género parental a *Centrolobium paraense* Tul., mostrando como resultado una amplia actividad biológica.

Antecedentes Históricos

El ser humano guarda estrecha relación con el medio ambiente que lo rodea muy en particular con las plantas. Porque inicialmente empleo su uso como mecanismo de supervivencia obteniendo innumerables beneficios: alimentación, vestimenta, materiales de construcción, salud, entre otros. También, desde siglos pasados se conocen especies vegetales cuyos extractos han sido usados en pócimas o en curaciones. En tal sentido, las plantas fueron las primeras medicinas utilizadas por el hombre para la cura de las enfermedades que padecía, además, aun sin tratamiento se han empleado para los mismos fines. Esta práctica médica pasaba y se perfeccionaba de generación en generación, por lo cual se denominó medicina tradicional (Domínguez, 1973; Marcano y Hasegawa, 2002; Lizcano y Vergara, 2008).

www.bdigital.ula.ve

Las primeras evidencias de productos naturales se remontan a la Mesopotamia (2600 a.C). Porque se encontraron registros en tablas de arcilla sobre el uso de aceites de *Cupressus sempervirens* (Ciprés) y *Commiphora* (Mirra), los cuales se utilizaban para tratar resfríos e inflamaciones (Patiño, 2013).

Aproximadamente hasta el año 1800, apenas se había progresado en el campo de la fitoquímica. Solo se conocían unas cuantas sustancias como el

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

azúcar de caña, almidón, alcanfor y ácido benzoico, debido a que su preparación era sumamente sencilla. Mezclas complejas como grasas, aceites, esencias, breas y resinas, se habían utilizado y elaborado, aunque prácticamente no se sabía nada acerca de su composición. La expresión, la extracción acuosa y la evaporación se había empleado tiempo atrás en la obtención de azúcar a partir de la caña de azúcar. Nicolás Lémery (1645-1715) extendió el empleo de los procesos de extracción y utilizo alcohol como disolvente (Lizcano y Vergara, 2008).

Históricamente, los productos naturales han formado la base para el avance en la química medicinal; partiendo del ejemplo más famoso de un compuesto derivado de un producto natural, el ácido acetilsalicílico (aspirina). En el siglo XIX los progresos en este campo alcanzan mayor rapidez, en 1803 se aísla el primer alcaloide la narcotina y le siguieron muchos otros, como estricnina y emetina así como también, las investigaciones sobre *Papaver somniferum* L., que llevaron al aislamiento de varios alcaloides, incluida la morfina y posterior modificación para obtener la codeína. También, el descubrimiento de la droga antimalárica quinina, a partir de la brea de *Cinchona succirubra*, son solo algunos ejemplos de la importancia de los metabolitos secundarios en el tratamiento de enfermedades en los seres humanos (Lizcano y Vergara, 2008; Patiño, 2013).

www.bdigital.ula.ve

Por otro lado, en 1839 Bentham publicó el nombre genérico *Centrolobium* que fue propuesto por Martius basado en *Nissolia robusta* Vell. La taxonomía de *Centrolobium* fue revisado por Rudd (1954) quien reconoció seis especies: *C. minus* C. Presl, *C. ochroxylum* Rose ex Rudd, *C. paraense* Tul., *C. robustum* Mart. ex Benth., *C. tomentosum* Guill. ex Benth y *C. yavizanum* Pittier. Se reconocieron dos variedades dentro de *C. paraense* Tul. var. *orinocense* Benth. y var. *paraense.* El género comprende en su mayoría árboles grandes de hasta 30 m de altura, con un tronco recto y una copa ancha y redondeada de ramas terminales. Varias especies de *Centrolobium* se valoran en el

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

neotrópico por su madera, que es duradera y de colores intensos de color naranja amarillento con manchas de color rojo oscuro, púrpura o negro (Pirie, Klitgaard y Pennington, 2009).

Bases Teóricas

Familia Fabaceae

La familia Fabaceae forma parte del Orden Fabales (Leguminosales), Subclase Rosidae conjuntamente con las Caesalpiniaceae y las Mimosaceae, todas con numerosos representantes de la flora dendrológica del país (Aristeguieta, 2003). Fue descrita en el siglo XIX por John Lindley (1836), aunque previamente Antoine Laurent de Jussieu había descrito la familia con el nombre de Leguminosae (1789), este último es considerado un nombre valido para la familia, siendo Fabaceae su nombre alternativo (Llamas y Acedo, 2016). A nivel mundial se han reportado 770 géneros y 19500 especies razón por la cual es la tercera familia de plantas vasculares a nivel mundial inmediatamente después de la familia Asteraceae y Orchidaceae (Aguilar, León y Mejía, 2021) en Venezuela, la familia comprende alrededor de 151 géneros y 993 especies, incluyendo nueve endémicas (Rodríguez y Gámez, 2010).

www.bdigital.ula.ve

Las tres familias que forman el orden Fabales, presentan las siguientes características: árboles, arbustos, trepadoras hasta hierbas y se pueden encontrar en diferentes zonas de vida de nuestro país que van desde bosques secos tropófilos hasta de tipo pluvial (Aristeguieta, 2003; Rodríguez y Gámez, 2010). Su característica principal, y por la cual se reconoce fácilmente, es su fruto en legumbre, también por poseer hojas alternas, compuestas, con estípulas y generalmente pulvinuladas (Rodríguez y Gámez, 2010).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera (Llamas y Acedo, 2016):

- ✓ Reino: Plantae
- ✓ División: Embryophyta - Siphonogamae
- ✓ Subdivisión: Angiospermae
- ✓ Clase: Equisetopsida
- ✓ Orden: Fabales
- ✓ Familia: Fabaceae

Presentan una amplia distribución en el mundo, es cosmopolita. Los organismos de esta familia se encuentran prácticamente en todos los hábitats, y frecuentemente son dominantes en las comunidades en las que ocurren. La familia Fabaceae se encuentra mayormente representada en ambientes tropicales, sin embargo, muchas de ellas también se sitúan en llanuras templadas, bosques y desiertos. Muchas especies son encontradas en los neotrópicos, pero otras son extratropicales, en ambos hemisferios Norte y Sur. Algunos géneros y ocasionalmente algunas especies son encontradas tanto en Sudamérica como en África (Aguilar, León y Mejía, 2021).

www.bdigital.ula.ve

Compuestos químicos de la Familia Fabaceae

La familia Fabaceae se caracteriza por la presencia de numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química en corteza, hojas y raíz. De esta familia se han caracterizado y reportado flavonoides, compuestos fenólicos, glucósidos cianogénicos, terpenoides y alcaloides. La bioactividad de este tipo de metabolitos de plantas está asociada a su efecto antidiabético, antiinflamatorio y antimicrobiano (Martínez, Ocampo, Galvis y Valencia, 2011).

En tal sentido, los compuestos fenólicos tienen una amplia distribución en el reino vegetal y pueden encontrarse en cualquier parte de las plantas (hojas,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

flores, tallos, raíces). Las especies de esta familia acumulan alcaloides debido a que pueden fijar nitrógeno atmosférico, lo que favorece la producción de metabolitos secundarios nitrogenados. Por otra parte, producen menos compuestos terpenoides, en comparación con otras familias vegetales como Asteraceae, Lamiaceae y Rutaceae (Montes, Hernández, Orozco, García, Ávila, Ortiz y cols., 2017).

Entre los diversos componentes que han sido reportados se encuentran escoparona (6,7-dimetoxicumarina) **(1)**, 3,4-dimetoxicinamaldehído **(2)**, calicosina **(3)**, liquiritigenina **(4)**, cumarina **(5)** y el ácido vainílico **(6)**, entre otros (Figura 1) (Cuellar, Martínez, Rojano, Gil y Durango, 2018; De Sousa, Silva, Rodrigues, Siyadatpanah, Melo, Seifi y cols., 2022).

www.bdigital.ula.ve

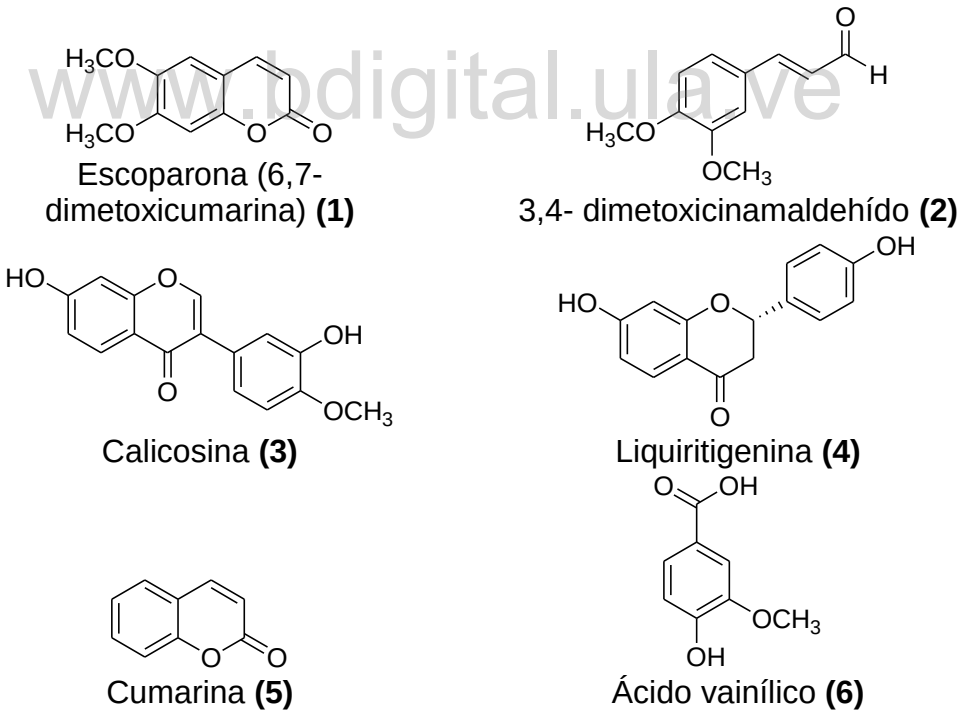


Figura 1. Algunos compuestos aislados de la familia Fabaceae. Tomado y modificado de Cuellar y cols., 2018; De Sousa y cols., 2022.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Usos etnobotánicos y actividades biológicas de la Familia Fabaceae

Algunas especies de esta familia se utilizan en la medicina tradicional debido a diversas propiedades terapéuticas empleando diferentes partes de la planta, como la corteza del tallo, las hojas y las semillas, en forma de infusiones, y decocciones para el tratamiento de afecciones del sistema respiratorio, como asma, sinusitis, bronquitis, gripe y otros propósitos (De Sousa y cols., 2022). Entre los usos etnobotánicos descritos para distintas especies de la familia Fabaceae se destaca el tratamiento de la ictericia, el control de procesos febriles, su empleo en procesos inflamatorios de distinta etiología y el tratamiento del cáncer, adicionalmente presentan diversas actividades biológicas incluyendo antimicrobianos, antioxidantes, neuroprotector y actividades miorrelajantes, entre otros (Gómez y cols., 2015; De Sousa y cols., 2022).

www.bdigital.ula.ve

También, la familia Fabaceae tiene gran importancia alimenticia siendo las leguminosas unas de los principales alimentos humanos del mundo. Las leguminosas han sido utilizadas por el hombre desde la más remota antigüedad, formando parte de la dieta debido, principalmente, a su alto contenido en proteínas y en algunos casos, por la adecuada proporción de grasas que presentan las semillas de muchas especies. Dada la buena producción de hidratos de carbono que presentan, no es de sorprender el atractivo que estas plantas tuvieron tanto para los cazadores o recolectores e igualmente para agricultores (Aguilar, León y Mejía, 2021).

Género *Centrolobium*

El género *Centrolobium* Mart. ex Benth (Fabaceae), es un género neotropical de siete especies de árboles: *C. robustum*, *C. microchaete, C. tomentosum*, *C. ochroxylum, C. esclerophyllum, C. paraense* y *C. yavizanum*.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Puede reconocerse fácilmente, incluso cuando está estéril, por la abundancia de glándulas peltadas de color naranja que cubren la mayor parte. El género comprende en su mayoría árboles grandes de hasta 30 m de altura, con un tronco recto y una copa ancha y redondeada de ramas terminales. Los frutos son grandes sámaras aladas de hasta 30 cm de largo, con una cámara de semillas basal espinosa conspicua. Varias especies de *Centrolobium* se valoran en el neotrópico por su madera, que es duradera y de colores intensos de color naranja amarillento con manchas de color rojo oscuro, púrpura o negro (Pirie, Klitgaard y Pennington, 2009).

El nombre genérico *Centrolobium* fue propuesto por Martius y publicado por Bentham en 1839 (Pirie y cols., 2009). Clasificándose taxonómicamente de la siguiente manera:

www.bdigital.ula.ve

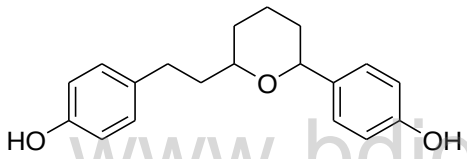
- ✓ Reino: Plantae
- ✓ División: Magnoliophyta
- ✓ Clase: Equisetopsida
- ✓ Orden: Fabales
- ✓ Familia: Fabaceae
- ✓ Tribu: Dalbergieae
- ✓ Género: *Centrolobium*

Las especies de *Centrolobium* crecen principalmente en áreas de bosque tropical estacionalmente seco, pero también en bosques más húmedos entre 50 y 350 metros sobre el nivel del mar. El género se encuentra en partes de Brasil, Bolivia, Ecuador, Perú, Colombia, Venezuela, Panamá y las Guayanas (Pirie y cols., 2009).

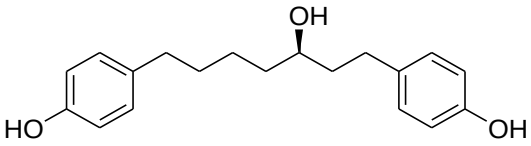
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Compuestos químicos del Género *Centrolobium*

Estudios previos sobre los metabolitos secundarios presentes en este género reportaron la presencia de diarilheptanoides (2-*β*-(*p*-hidroxifenil)-etil)-6-(*p*-hidroxifenil)-tetrahidropirano **(7)** y centrolobol **(8)** e isoflavonoides (7,3 dihidroxi-4-metoxi-isoflavona) **(9)**, al igual se encontró que contenían piceatannol, centrolobina **(10)** y metilcentrolobina **(11)** (Figura 2) (Aragao, Da Costa, Gottlieb y Welerson, 1970; Alegrio, Braz y Gottlieb, 1989; Araujo, Alegrio y León, 1998).

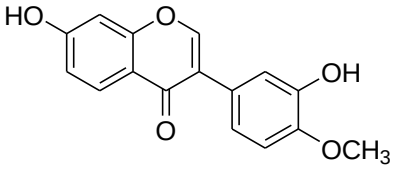


2-*β*-*(p*-hidroxifenil)-etil)-6-(p-hidroxifenil) tetrahidropirano **(7)**

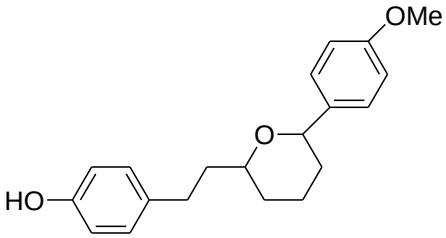


Centrolobol **(8)**

www.bdigital.ula.ve



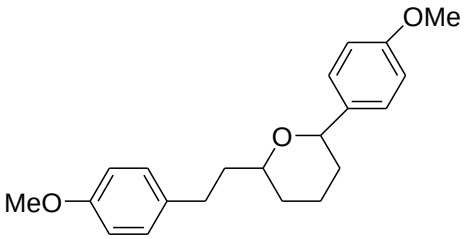
7,3 dihidroxi-4-metoxi-isoflavona **(9)**



Centrolobina **(10)**

Figura 2. Compuestos químicos aislados del género *Centrolobium*. Tomado y modificado de Aragao y cols., 1970; Alegrio y cols., 1989; Araujo y cols., 1998.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)



O –metilcentrolobina **(11)**

Figura 2. Compuestos químicos aislados del género *Centrolobium* (Continuación). Tomado y modificado de Aragao y cols., 1970; Alegrio y cols., 1989; Araujo y cols., 1998.

Usos etnobotánicos y actividades biológicas del Género *Centrolobium*

Al ser arboles grandes de hasta 30 metros de altura su madera es muy apreciada, generalmente han sido empleados para la ebanistería, elaboración de muebles, obras interiores, enchapados y construcción, también se han utilizado para restauración ecológica y para el embellecimiento de espacios públicos, por ejemplo, en parques, plazas, entre otros. La investigación sobre la composición química de este género es muy escasa, por lo tanto, no se han descrito ni reportado actividades biológicas (Aristeguieta, 2003; Pirie y cols., 2009; Morgado y cols., 2010).

www.bdigital.ula.ve

Especie *Centrolobium paraense* Tul.

Centrolobium paraense Tul., es una especie forestal comercialmente conocida en el exterior (Morgado y cols., 2010). Son árboles de 4 a 30 metros de altura, los cuales tienen un crecimiento de un metro por año; poseen un diámetro del tronco 15-100 centímetros; una corteza de color marrón rojizo con finas fisuras verticales, donde el corte exuda savia rojiza; ramitas jóvenes e inflorescencias que al secarse toman un color verde crema. Hojas folioladas,

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

con forma anchamente ovada, generalmente persistente, folíolos de 7-17 × 4-8 centímetros, de ovados a ampliamente ovados, la base generalmente simétrica, subcordada o redondeada, el ápice acuminado u obtuso, membranáceo, la superficie superior glabrada o con tricomas rizados densos, la nervadura de la superficie inferior cubierta con indumento similar a la de la superficie superior y la lámina superficial inferior con densas glándulas peltadas. Adicionalmente, se distinguen dos variedades *C. paraense* Tul. var. orinocense Benth, y *C. paraense* Tul. var. paraense (Aristeguieta, 2003; Pirie y cols., 2009).

Por otra parte, *Centrolobium paraense* Tul., se distingue fácilmente de todas las demás especies de *Centrolobium* por sus grandes estípulas frondosas que dejan una gran cicatriz cuando se caen y por las brácteas y bractéolas grandes, ampliamente ovadas (5-10 × 5-10 milímetros). La especie ha sido incluida en el "*Libro Rojo de la Flora Venezolana*" como vulnerable a la extinción, debido a la explotación selectiva de su madera y la destrucción de su hábitat natural, para el desarrollo de actividades agropecuarias (Pirie y cols., 2009; Morgado y cols., 2010). Taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera:

www.bdigital.ula.ve

- ✓ Reino: Plantae
- ✓ División: Magnoliophyta
- ✓ Clase: Equisetopsida
- ✓ Orden: Fabales
- ✓ Familia: Fabaceae
- ✓ Tribu: Dalbergieae
- ✓ Género: *Centrolobium*
- ✓ Especie: *paraense*
- ✓ Nombre científico: *Centrolobium paraense* Tul.

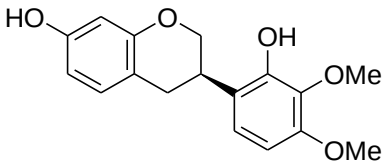
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Se distribuye a lo largo de la costa caribeña de Guyana, Trinidad y Tobago, Venezuela y las zonas adyacentes de Colombia y Panamá, extendiéndose hacia la Amazonía brasileña y llegando tan al sur como Río Branco en Roraima, creciendo mayormente en bosques siempre verdes de tierras bajas, parches de bosques alrededor de sabanas y sabanas entre 50 y 330 metros sobre el nivel del mar; en Venezuela, es conocida con el nombre común de Cartán, y se encuentra distribuida en los estados Aragua, Bolívar, Cojedes, Guárico, Lara, Portuguesa y Zulia (Pirie y cols., 2009; Morgado y cols., 2010).

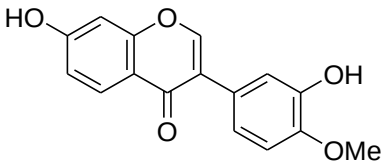
Compuestos químicos de la Especie *Centrolobium paraense* Tul.

Dentro de los compuestos químicos que se han reportado en esta especie, se encuentran diarilheptanoides como centrolobol **(8)** e isoflavonoides, representados por centrolobina **(10)** y metilcentrolobina **(11)**. Además, isoflavanos como mucronulatol **(12)**, isoflavonas representada por 3'-hidroxiformononetina **(13)**, isoflavonona como 7,4'-dihidroxi-3',5'-dimetoxiisoflavonona **(14)** e isoflavena como 7,2'-dihidroxi-8,4'-dimetoxiisoflaveno **(15)** (Figura 3). Es necesario mencionar que son pocas las investigaciones que se han realizado sobre la composición química de esta especie (Aragao y cols., 1970; Alegrio y cols., 1989; Ganapathy, Preethi, Moses y Anandharamakrishnany, 2019).

www.bdigital.ula.ve



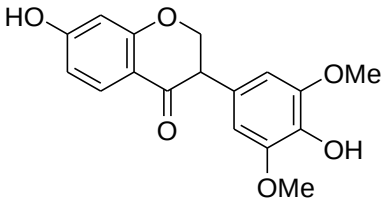
Mucronulatol **(12)**



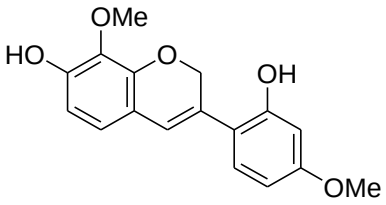
3'-hidroxiformononetina **(13)**

Figura 3. Compuestos químicos aislados de *Centrolobium. paraense* Tul., Tomado y modificado de Aragao y cols., 1970; Alegrio y cols., 1989; Ganapathy y cols., 2019.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)



7,4’-dihidroxi-3’,5’-dimetoxiisoflavonona **(14)**



7,2’-dihidroxi-8,4’-dimetoxiisoflaveno **(15)**

Figura 3. Compuestos químicos aislados de *Centrolobium. paraense* Tul., (Continuación). Tomado y modificado de Aragao y cols., 1970; Alegrio y cols., 1989; Ganapathy y cols., 2019.

Usos etnobotánicos y actividades biológicas de la Especie *Centrolobium paraense* Tul.

www.bdigital.ula.ve

Cartán, produce un tipo de madera extremadamente ornamental, que se caracteriza por su color amarillo o naranja, con franjas muy finas de color oscuro que varían entre rojas, moradas o negras. Por esto, la madera es ampliamente utilizada en la mueblería en general, elaboración de objetos artesanales, utensilios caseros, estantillos para cercas, la elaboración de pisos y construcción en general (Aristeguieta, 2003; Morgado y cols., 2010).

Adicionalmente, se ha reportado que el extracto de *Centrolobium paraense* Tul., contiene metabolitos secundarios demostrando que son una fuente importante de moléculas bioactivas para el tratamiento de maderas menos resistentes. Por lo tanto, los extractos de origen natural pueden ser una alternativa importante para la industria de la protección de la madera, proporcionando biomoléculas capaces de ofrecer resistencia a la descomposición contra hongos, así como baja toxicidad sobre los seres humanos y el ambiente (Velásquez, Rojas y Encinas, 2019). A pesar de la ausencia de investigaciones sobre actividades biológicas de esta especie

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Ganapathy y cols., en el año 2019, reportaron que el centrolobol tiene actividad citotóxica y anticarcinogénica.

Productos Naturales

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

Por otra parte, también son conocidos como productos químicos sintetizados por seres vivos en pequeñas cantidades y no de forma generalizada. Finalmente, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes (Albornoz, 1992; Ávalos y Pérez, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Clasificación de los productos naturales

La clasificación de los metabolitos secundarios puede hacerse de acuerdo a su estructura, bioformación, fuente de producción o a su acción biológica. En todos estos casos es inevitable la superposición. Por ejemplo, por ser moléculas generalmente polifuncionales es difícil ubicarlas en un determinado grupo químico, o dos compuestos totalmente diferentes tienen la misma acción, o la misma fuente de producción puede originar simultáneamente compuestos muy distintos, aparentemente el criterio más acertado es aquel

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

que usa la biosíntesis como denominador común, la cual, en su esquema básico, engloba la formación de los metabolitos primarios y secundarios (Marcano y Hasegawa, 2002).

Ávalos y Pérez en el 2009, los agrupan en cuatro clases principales:

- **Terpenos**: Entre los que se encuentran hormonas, pigmentos o aceites esenciales.
- **Compuestos fenólicos**: Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- **Glicósidos**: Saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos.
- **Alcaloides**

Biosíntesis de los productos naturales

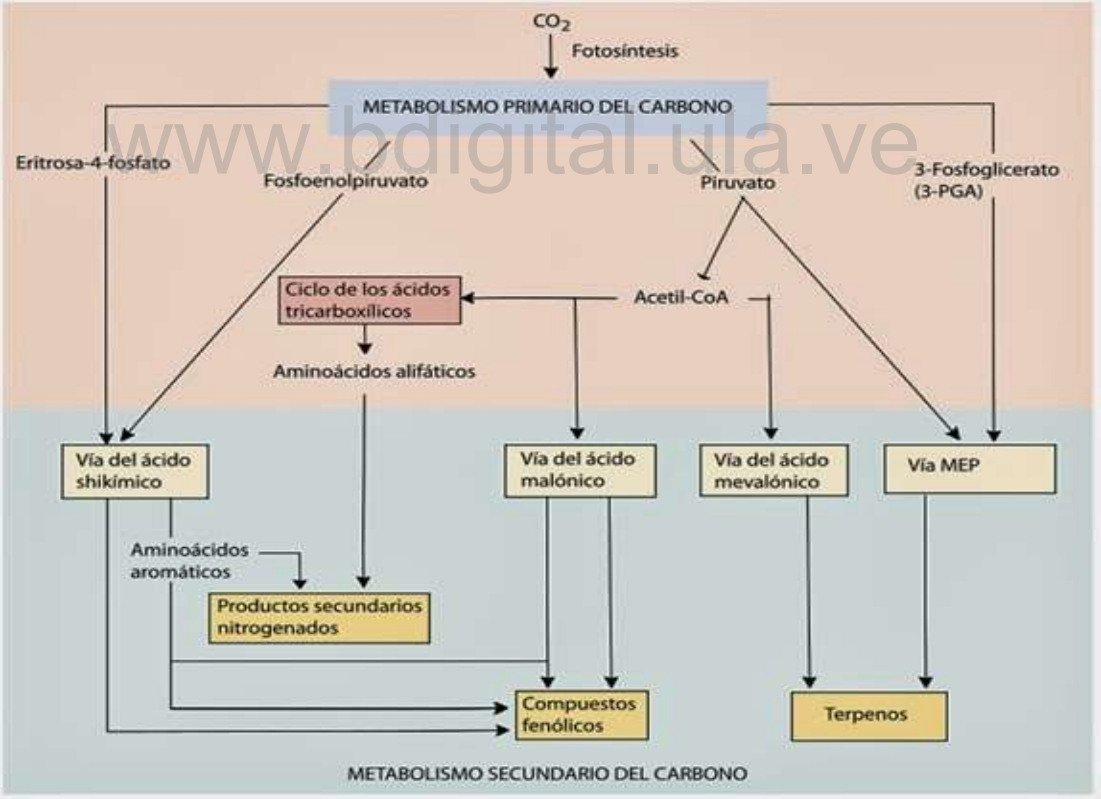
www.bdigital.ula.ve

Todos los compuestos orgánicos están constituidos por carbono e hidrógeno, a menudo contienen oxígeno y nitrógeno y menos frecuentemente, azufre, fósforo y halógenos. La formación de los productos naturales comienza con la fotosíntesis que tiene lugar en plantas superiores, algas y algunas bacterias. Es un proceso endotérmico que requiere de la luz solar. Aquellos organismos incapaces de absorber la luz obtienen su energía de la degradación de carbohidratos. Los fragmentos pequeños se recombinan para generar las grandes moléculas y de acuerdo a ese esquema, se observa cómo los metabolitos secundarios se forman por distintas vías y cómo, siguiendo el criterio biogenético, una misma clase de compuestos por ejemplo los alcaloides, puede tener varios orígenes (Marcano y Hasegawa, 2002). Las principales rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios derivan del metabolismo primario del carbono (Figura 4).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Terpenos

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios. La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas (giberelinas, ácido abscísico y citoquininas), carotenoides, clorofilas y plastoquinonas (fotosíntesis), ubiquinonas (respiración) y esteroles (de gran importancia en las estructuras de membranas). Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de Carbono, C5). (Bruneton, 2001; Ávalos y Pérez, 2009).



www.bdigital.ula.ve

Figura 4. Vías generales del metabolismo secundario de las plantas. Tomado y modificado de http://fisiolvegetal.blogspot.com/2012/11/introduccion-al-metabolismo-secundario.html.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C5) los que contienen 10 C o dos unidades C5 se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C5 y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno (Bruneton, 2001; Ávalos y Pérez, 2009).

Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP (Bruneton, 2001; Ávalos y Pérez, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Compuestos fenólicos

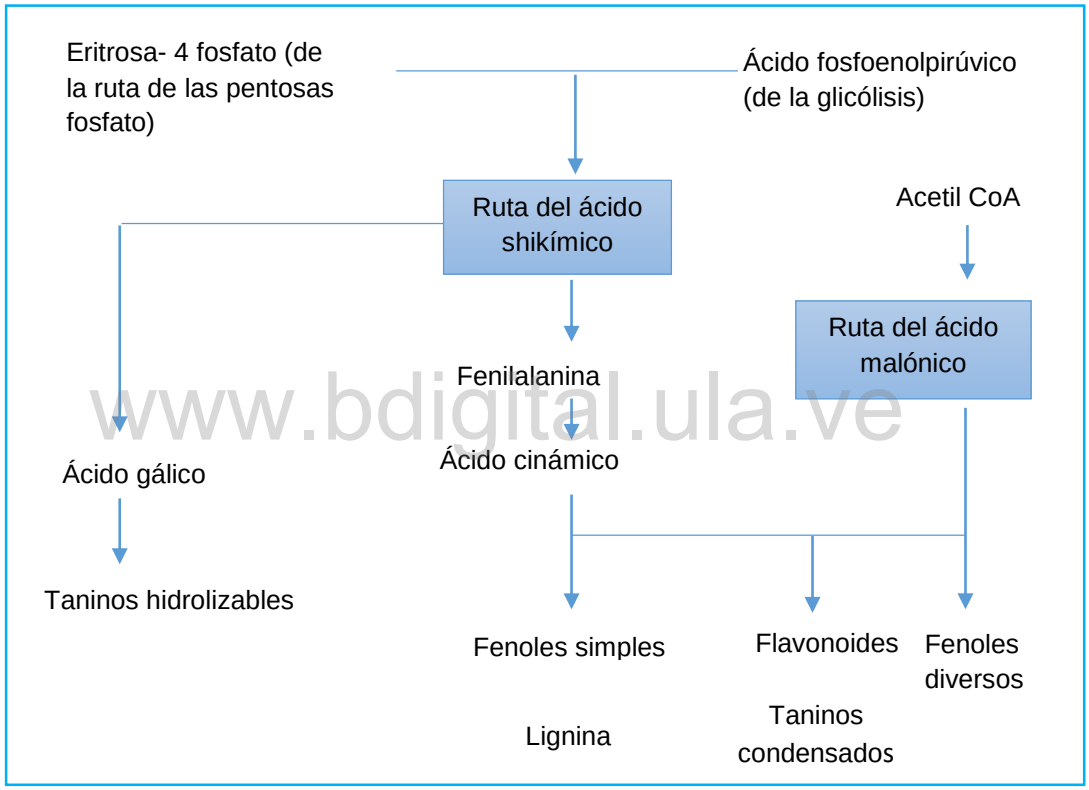
En el contexto del metabolismo, los aminoácidos aromáticos se pueden dirigir tanto al metabolismo primario como al metabolismo secundario. Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo (Domínguez, 1979; Ávalos y Pérez, 2009).

Desde el punto de vista de la estructura química, son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides muchos de estos productos están implicados en las interacciones planta-herbívoro (Domínguez, 1979; Ávalos y Pérez, 2009).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido shikímico y la ruta del ácido malónico (Ver esquema 1).

La ruta del ácido malónico es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores (Ávalos y Pérez, 2009).



www.bdigital.ula.ve

Esquema 1. Rutas de síntesis de compuestos fenólicos. Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

La ruta del ácido shikímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. A partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido shikímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). La mayoría de los compuestos fenólicos

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

derivan de la fenilalanina. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales (Ávalos y Pérez, 2009).

La enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cataliza la formación de ácido cinámico por eliminación de una molécula de amonio de su sustrato. Esta enzima está situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario por lo que la reacción que lleva a cabo es una importante etapa reguladora en la formación de muchos compuestos fenólicos. Las reacciones posteriores a la catalizada por PAL son básicamente adiciones de más grupos hidroxilo y otros sustituyentes. Los ácidos trans-cinámico y *p*-cumárico se metabolizan para formar ácido ferúlico **(16)** y ácido caféico **(17)** (Figura 5) cuya principal función es ser precursores de otros derivados más complejos: cumarinas, lignina, taninos, flavonoides e isoflavonoides (Domínguez, 1979; Ávalos y Pérez, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Ácido ferúlico **(16)** Ácido caféico **(17)**

Figura 5. Estructura química de los ácidos ferúlico y caféico. Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

Las **cumarinas** son una amplia familia de lactonas, que actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación. Algunas muestran fototoxicidad frente a insectos tras activarse por luz ultravioleta (UV), acción llevada a cabo por bloqueo de la transcripción y de la reparación de ADN, provocando la muerte celular (Domínguez, 1979; Ávalos y Pérez, 2009).

La **lignina** es un polímero altamente ramificado de fenilpropanoides. Después de la celulosa, es la sustancia orgánica más abundante en las

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

plantas. Se encuentra covalentemente unida a la celulosa y a otros polisacáridos de la pared celular. Es insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos lo que hace muy difícil su extracción sin degradarla. Se forma a partir de tres derivados fenilpropanoides: los alcoholes coniferílico, cumarílico y sinapílico, de manera que cada uno de ellos puede formar numerosos enlaces y ramificaciones haciendo que cada lignina pueda ser única. También tiene función protectora dado que su resistencia mecánica evita que las plantas sean alimento para animales y, además, su naturaleza química hace que sea difícil digerirla por los herbívoros (Domínguez, 1979; Ávalos y Pérez, 2009).

Entre los compuestos fenólicos también se encuentran los flavonoides. Su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Se clasifican en función del grado de oxidación del puente de tres carbonos, siendo las principales antocianinas (pigmentos), flavonas, flavonoles e isoflavonas. Entre sus funciones se encuentra la defensa y la pigmentación (Domínguez, 1979; Ávalos y Pérez, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Las antocianinas son flavonoides pigmentados responsables de la mayoría de los colores de las flores y los frutos. Por ello son importantes en la polinización y en la dispersión de semillas. Los taninos son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturalizándolas (Domínguez, 1979; Ávalos y Pérez, 2009).

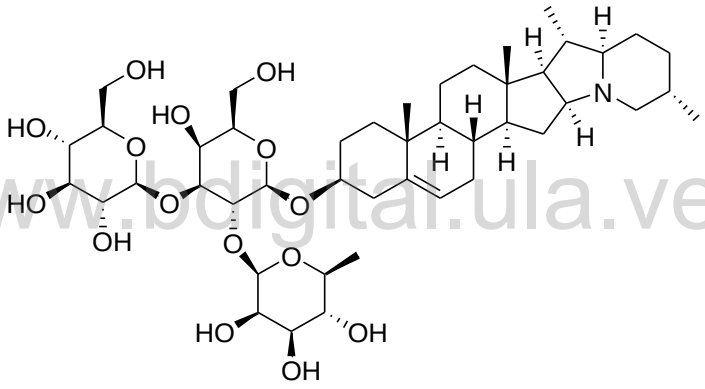
Glicósidos

Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos. Una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos (Bruneton, 2001; Marcano y Hasegawa, 2002).

Las **saponinas** como la *α*- solanina **(18)**, se encuentran como glicósidos esteroideos, glicósidos esteroideos alcaloides o bien glicósidos triterpénicos. Son por tanto triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura. Se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar, en cuyo caso se denominan sapogeninas. La adición de un grupo hidrofílico (azúcar) a un terpenoide hidrofóbico da lugar a las propiedades surfactantes o detergentes similares al jabón que presentan las saponinas (Figura 6) (Domínguez, 1979).



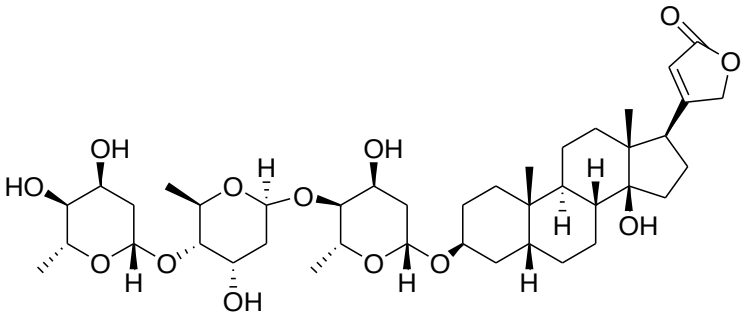
α- solanina **(18)**

www.bdigital.ula.ve

Figura 6. Estructura química de las saponinas. Tomado y modificado de Rivas, Oranday y Verde, 2016.

Los **glicósidos cardíacos o cardenólidos** son semejantes a las saponinas esteroideas, tienen también propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Se encuentran de forma natural en forma de glicósidos o de agliconas. Quizá el más conocido sea la digitoxina **(19)** (Figura 7), o su análogo digoxina, aislada de *Digitalis purpurea* y utilizada como medicamento en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva (Bruneton, 2001; Ávalos y Pérez, 2009).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

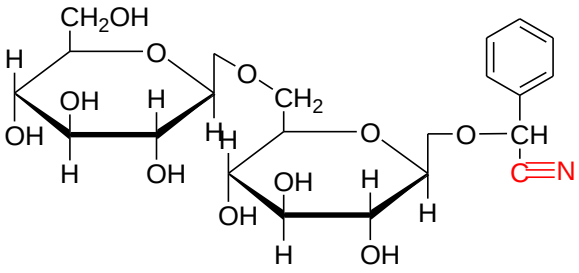


Digitoxina **(19)**

Figura 7. Estructura de los glicósidos cardíacos. Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

Los **glicósidos cianogénicos** son compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos, pero se degradan cuando la planta es aplastada liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno (HCN). Un ejemplo es la amigdalina **(20)** (Figura 8) que se encuentra en las semillas de almendra, albaricoque, cereza o melocotón (Bruneton, 2001; Ávalos y Pérez, 2009).

www.bdigital.ula.ve



Amigdalina **(20)**

Figura 8. Estructura química de los glicósidos cianogénicos. Tomado y modificado de https://quimicaencasa.com/la-quimica-de-las-cerezas/.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Alcaloides

Los alcaloides son una gran familia de más de 15000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos, aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina o la colchicina, por ejemplo. Se encuentran en el 20 % aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas. A los valores normales de pH del citosol y de la vacuola (7,2 y 5-6, respectivamente), el nitrógeno está protonado lo cual confiere el carácter básico o alcalino de estos compuestos en solución (Domínguez, 1979; Marcano y Hasegawa, 2002; Ávalos y Pérez, 2009).

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos. Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano; aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina (Domínguez, 1979; Ávalos y Pérez, 2009).

www.bdigital.ula.ve

El opio es quizá uno de los primeros alcaloides conocidos, el exudado (látex) de la cápsula inmadura de *Papaver somniferum*. Este exudado contiene una mezcla de más de 20 alcaloides diferentes entre los que se encuentran la codeína **(22)** y la papaverina **(23)** ambos alcaloides pertenecen a un grupo denominado alcaloides isoquinolínicos que se sintetizan a partir de la reticulina **(21)** (Figura 9) (Bruneton, 2001; Ávalos y Pérez, 2009).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

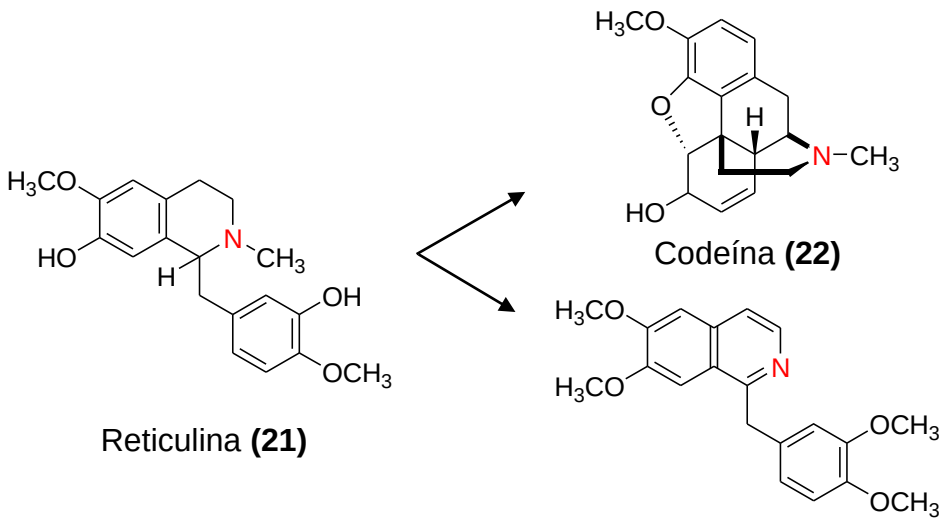


Figura 9. Estructura de alcaloides derivados de reticulina. Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

www.bdigital.ula.ve

Extractos Vegetales

Son vegetales son mezclas complejas de metabolitos secundarios, aislados de las plantas por diversos métodos como la destilación por arrastre de vapor, por expresión de los frutos o por medio de soxtlet. Además, cubren un amplio espectro de efectos farmacológicos mostrando diversas propiedades como antiinflamatorios, antioxidantes, y anticancerígenos. Otras actividades biológicas se reportan como biocidas en contra de una amplia gama de microorganismos como bacterias, hongos, virus, protozoarios e insectos (Bruneton, 2001).

Métodos de Extracción

A nivel popular basta muchas veces con extraer los principios activos de: raíz, hojas, flores, tallos, de acuerdo a los antecedentes encontrados, de la

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

manera más sencilla, como puede ser por medio de una infusión o decocción. En cambio, para analizar las propiedades medicinales de una droga vegetal, en muchos casos se recurrirá a métodos de extracción más complejos, que permitan obtener métodos reproducibles, con cuantificación de principios activos en lo posible (Albornoz, 2001; Rivas, Oranday y Verde, 2016). Los métodos extractivos más empleados son:

- **Extracción por Maceración**

Este es un método de extracción sólido-líquido donde el material vegetal que se pretende extraer contiene compuestos solubles en el líquido de extracción. Para realizar este proceso el material vegetal se corta en pequeños trozos o molido, fresco o seco se coloca en recipientes adecuados, añadiendo el solvente seleccionado por polaridad: hexano (o éter de petróleo), cloroformo y finalmente metanol o etanol en reposo o en un equipo con agitación continua, a temperatura ambiente durante 5 días cada extracción, otra opción es obtenerlo en una forma directa agregando una mezcla de solventes: metanol: cloroformo: hexano en la proporción 7:2:1, obteniendo un extracto en forma directa (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

www.bdigital.ula.ve

- **Extracción por Lixiviación**

En este método de extracción se produce el desplazamiento de sustancias solubles por medio de un disolvente líquido, este proceso se utiliza industrialmente para preparar elixires; el material vegetal fresco se coloca en un recipiente a temperatura ambiente, durante 3 días, con acetona o algún otro solvente o mezcla de solventes, sin ser necesario cortar en trozos dicho material. Después de este tiempo se decanta y se evapora la acetona en un rotavapor (Figura 10). Se puede emplear otro solvente o agua (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

www.bdigital.ula.ve

Figura 10. Rotavapor. Tomado y modificado de Rivas y cols., 2016.

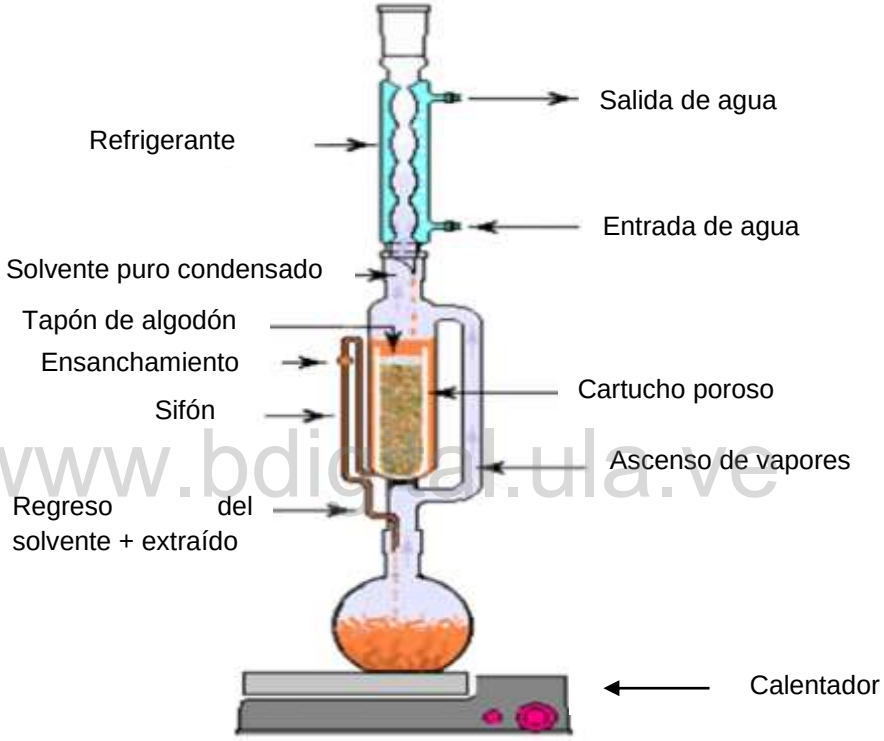
- **Extracción por Soxhlet**

Este es un proceso de extracción continua de un material sólido que contiene algunos de los compuestos deseados, se coloca dentro de un dedal de papel filtro grueso, que se carga en la cámara principal del extractor Soxhlet (Figura 11), donde se hace pasar el solvente, este ciclo puede repetirse muchas veces, durante horas o días. Para la extracción del material vegetal se puede dividir en: Parte aérea (flores, frutos, semillas, hojas, tallo) y raíz, el estudio fitoquímico puede ser de la planta completa o una de sus partes para un análisis especifico (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

La planta seca y molida se coloca en un Soxhlet con éter de petróleo o hexano durante 7 días a una temperatura de 20º-30º C. Al término de éste tiempo, observar si hay un precipitado, en caso de tenerlo, filtrar inmediatamente, evaporar el filtrado y con el mismo solvente recuperado

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

seguir lavando el precipitado, evaporando nuevamente los filtrados para recuperar y guardar el solvente. Los extractos que se obtienen respectivamente se recomienda concentrarlos en un rotavapor para la recuperación del solvente que puede volver a ser utilizado (Rivas, Oranday y Verde, 2016).



www.bdigital.ula.ve

Figura 11. Equipo Soxhlet. Tomado y modificado de Rivas y cols., 2016.

- **Extracción por Reflujo**

Es una técnica para extraer y preservar los compuestos esenciales en las especies vegetales, durante el reflujo, la evaporación de la mezcla que se hierve es seguida por la condensación de estos vapores sobre las paredes inferiores de un condensador, éste se refrigera con el agua que fluye por una camisa envolvente a su alrededor. (Lamarque y cols., 2008).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- **Decocción o cocimiento**

Consiste en colocar una parte de material vegetal fresco con 16 partes de agua y llevarlo a ebullición hasta reducir el volumen a ¼ parte del original. Se deja enfriar hasta unos 40 °C, se exprime y se cuela o filtra (Albornoz, 2001).

- **Infusión**

En un recipiente de porcelana, vidrio o barro (evitar los de aluminio u otro metal) se coloca la cantidad recomendada (cuando no hay instrucciones especificas, se usan 50 g para 1 litro) cortada o troceada, del material vegetal, y encima de él se vierte la cantidad de agua hirviente adecuada. Cubra y permita la acción extractiva por 10 a 15 minutos. Filtre y repose (Albornoz, 2001).

www.bdigital.ula.ve

- **Tintura**

Es un preparado liquido resultante de la acción del disolvente del alcohol, utilizado en cantidades determinadas y con titulos alcoholimetricos definidos sobre sustancias de origen vegetal o animal, muy raramente mineral. Las tinturas pueden ser: (Albornoz, 2001).

a) Simples: cuando se utiliza la accion disolvente del alcohol sobre una sola sustancia.
b) Compuestas: cuando la accion disolvente del alcohol se ejerce sobre varias sustancias

Para preparar tinturas debe tenerse muy en cuenta:

- La naturaleza de la sustancia a tratar. Por lo general la cantidad de droga cruda que contienen las tinturas varia entre el 10 % para plantas muy activas y 20 % para las menos potentes.
- Naturaleza del alcohol: se usa alcohol etilico de 96°, diluido de acuerdo a las necesidades (Albornoz, 2001).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Análisis Fitoquímico Preliminar

El tamizaje Fitoquímico o “Screening” Fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y, a partir de allí, orientar la extracción o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados (entre ellos, agua, acetona, alcohol, cloroformo y éter) y la aplicación de reacciones de coloración y precipitación. Estas son sensibles, reproducibles, de bajo costo y evalúan diversos grupos de sustancias (Salazar y Jaime, 2011; Prashant, Bimlesh, Mandeep, Gurpreet y Harleen, 2011).

Entre los ensayos más utilizados tenemos:

www.bdigital.ula.ve

Determinación de alcaloides: Ensayo Dragendorff, Wagner y Mayer

Los alcaloides son sustancias básicas que contienen nitrógeno en un anillo heterocíclico, son derivados de aminoácidos y se encuentran en las plantas superiores de un ácido orgánico. Este ensayo se basa generalmente en la combinación de los alcaloides con metales pesados. Se llevan a cabo en solución acuosa ácida. Los reactivos más utilizados para la precipitación de los alcaloides son ácidos de elevado peso molecular. Como el reactivo yodado de Dragendorff (yodo bismutato pótasico, precipitado rojo-naranja); el reactivo de Mayer (mercurio tetrayodado pótasico, precipitado blanco-amarillento) y el reactivo Wagner (yoduro de potasio, precipitado marrón) (Domínguez, 1979; Coy, Parra y Cuca, 2014).

En el análisis fitoquímico preliminar las técnicas de reconocimiento son basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y métales pesados formando precipitados

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

con reactivos como el mercuriyoduro de potasio (Mayer) y yoduro de bismuto (Dragendorff), estas reacciones se basan en los siguientes comportamientos:

El yoduro de potasio cuando reacciona con cloruro mercúrico, forma un precipitado rojo de yoduro mercúrico soluble en exceso de iones de yoduro con formación de un anión complejo incoloro. La solución alcalina de este complejo sirve para descubrir indicios de amoníaco. En esta reacción se forma el compuesto de color pardo oxiyoduro mercuriamoníaco, que es soluble en exceso de complejo, generando intenso color amarillo (Domínguez, 1979; Coy, Parra y Cuca, 2014).

Los alcaloides por su carácter nitrogenado pueden comportarse de forma similar al amoníaco, ante estos reactivos (Reactivo de Mayer); muchos alcaloides presentes en un material vegetal forman con el bismuto, yoduros dobles insolubles (Reactivo de Draggendorf) (Coy, Parra y Cuca, 2014).

www.bdigital.ula.ve

Determinación de Flavonoides: Ensayo de Shinoda

En la reacción de Shinoda, el magnesio metálico es oxidado por el ácido clorhídrico (HCl) concentrado, dando como productos al hidrogeno molecular (H_2), que es eliminado en forma de gas y el cloruro de magnesio ($MgCl_2$), que es el que forma complejos con los flavonoides dando coloraciones características. El magnesio divalente intensifica la coloración por estar doblemente coordinado y una coloración anaranjada, roja, verde, azul o violeta es prueba positiva (Vidaurre, Querevalú, De los Rios y Ruiz, 2007; Rengifo, 2013).

Determinación de compuestos fenólicos y taninos: Ensayo de Cloruro Férrico

El “ensayo del cloruro férrico” es una prueba colorimétrica tradicional para fenoles, que usa una disolución al 1 % de cloruro de hierro (III) que ha sido neutralizada con hidróxido sódico hasta que se forme un leve precipitado de

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

oxihidróxido de hierro FeO(OH). Químicamente los taninos son polímeros de polifenoles con 1 a 2 % de hidróxidos fenólicos libres, los flavonoides son compuestos polifenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en plantas verdes. Estos compuestos al igual que los compuestos fenólicos precipitan en presencia de cloruro férrico. Esta respuesta se debe al ataque producido por el ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (formación de complejo) (Rengifo, 2013; Coy, Parra y Cuca, 2014).

Determinación de cumarinas: Ensayo de Fluorescencia

Las cumarinas son compuestos derivados de la *α*-benzopirona. Dado que en su estructura presentan un gran número de insaturaciones, estos compuestos exhiben una fuerte fluorescencia azul o verde al ser irradiados con luz ultravioleta, propiedad que se aprovecha para su detección (Carvajal, Hata, Sierra y Rueda, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Determinación de saponinas: Ensayo de la Espuma

Las saponinas son glucósidos de esteroides o de triterpenoides, llamadas así por sus propiedades como las del jabón: cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el azúcar) (Salazar y Jaime, 2011). Las saponinas presentan un grupo de características generales que sirven de base para su identificación rápida: como producción de espuma al ser agitadas sus soluciones acuosas, lo cual es la base de la reacción empleada en el tamizaje fitoquímico (Hernández y Hermosilla, 2014).

Determinación de triterpenos y esteroles: Ensayo de Lieberman-Burchard

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

La reacción de Liebermann-Burchard es típica de los esteroides que contienen dos dobles enlaces conjugados en un mismo anillo, en dos anillos adyacentes o un doble enlace de un anillo adyacente con un grupo hidroxilo. La reacción debe realizarse en un medio absolutamente anhidro, ya que al existir moléculas de agua estas reaccionan con el anhídrido acético, anulando de esta manera la reacción con el núcleo esteroidal o triterpenoide. El diclorometano solubiliza a la muestra favoreciendo la captación de alguna molécula de agua presente y el ácido sulfúrico, favorece la deficiencia electrónica del anhídrido acético, el cual es estabilizado por los electrones de los dobles enlaces (dienos) conjugados, dando de esta manera la coloración respectiva (Vidaurre y cols., 2007).

Bacterias

www.bdigital.ula.ve

Son microorganismos con una célula única (unicelulares) relativamente simples dado que su material genético no esta encerrado por una membrana nuclear especial, las células bacterianas se denominan procariontes, de las palabras griegas que significan prenucleo. Las bacterias estan recubiertas por paredes celulares que en gran parte estan constituidas por un complejo de hidrato de carbono y proteina denominado peptidoglucano, al contrario de lo que sucede con las paredes celulares de las plantas y las algas, cuya sustancia principal es la celulosa. Las bacterias suelen reproducirse mediante la division en dos celulas iguales; este proceso se conoce como fision binaria. Para la nutrición la mayoria de las bacterias utilizan sustancias químicas orgánicas, que en la naturaleza pueden provenir de organismos muertos o vivos. Algunas bacterias pueden producir sus propios alimentos mediante la fotosíntesis y algunas pueden nutrirse a partir de sustancias inorgánicas. Varias bacterias pueden moverse mediante apéndices denominados flagelos (Tortora, Funke y Case, 2007; Willey, Sherwood y Woolverton, 2009).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Clasificación de las bacterias

Según su forma: (Willey, Sherwood y Woolverton, 2009; Castro, 2014).

Al microscopio óptico se pueden distinguir tres formas principales de bacterias:

a) Esféricas de 0,5 a 1 mm, denominadas **"cocos"** (del griego y latín "baya"). Los cocos, dependiendo de los planos de división que tengan y la separación que se logre entre cada célula, pueden aparecer al microscopio formando cadenas (estreptococos), racimos (estafilococos), pares (diplococos), tétradas, sarcinas (formas cúbicas).

b) Cilíndricas de 0,5 a 20 mm, denominadas **"bacilos"** (en latín "bastón"). Los bacilos en general no forman agrupaciones, pero su tamaño puede variar describiéndose como bacilos cortos o cocobacilos, delgados y alargados en forma fusiforme, en forma curva descritos como vibriones y formas helicoidales.

www.bdigital.ula.ve

c) Espirales de 1 a 100 mm, denominadas **"espiroquetas"** (Figura 12).

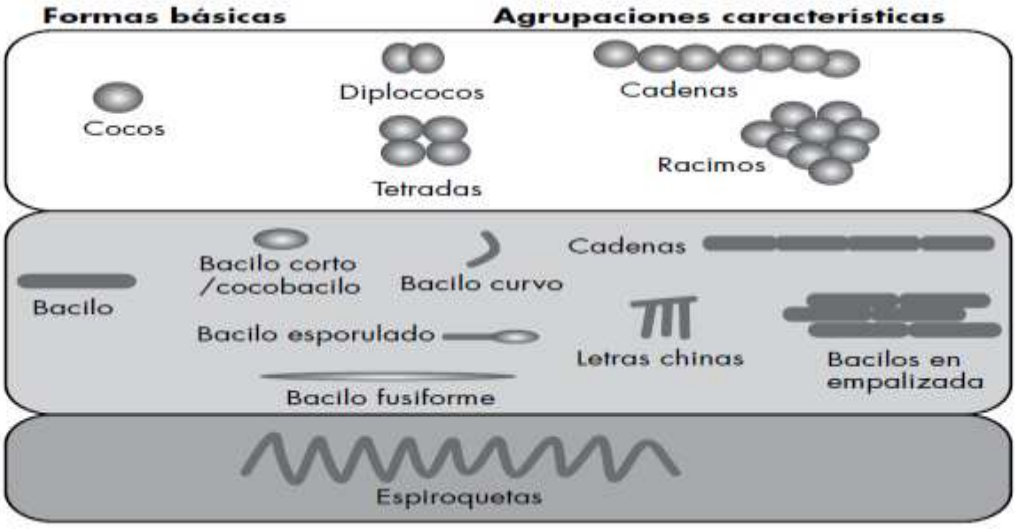


Figura 12. Formas y agrupamientos de las bacterias. Tomado y modificado de Castro, 2014.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Según su tinción: (Willey, Sherwood y Woolverton, 2009; Castro, 2014).

La tinción de Gram permite una rápida clasificación de la mayoría de las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas, de acuerdo a la afinidad que tengan a los colorantes utilizados, cuyo resultado está relacionado con la estructura de la pared celular bacteriana que las distingue:

- **Bacterias Gram positivas**

Estas presentan una pared celular compuesta principalmente por peptidoglicano (Willey, Sherwood y Woolverton, 2009; Castro, 2014). Entre algunas especies de importancia clínica tenemos:

a) *Enterococcus faecalis*

Son cocos Gram positivos, que se encuentran aislados, en pares, o formando cadenas cortas. Son catalasa negativa, anaerobios facultativos, capaces de crecer en condiciones un tanto extremas. Las características bioquímicas sobresalientes incluyen:

www.bdigital.ula.ve

- La habilidad de crecer en presencia de Cloruro de Sodio (NaCl) al 6,5 %, a temperaturas entre 10 °C y 45 °C, y hasta en un pH de 9,6.
- Tienen la capacidad de hidrolizar la esculina, crecer en presencia de bilis al 40 %.
- Sobrevivir 30 minutos a 60 °C.

Es el patógeno humano más frecuente representando el 60 % al 90 % de los aislamientos clínicos de enterococos (Girón y Pérez, 2003; Díaz, Rodríguez y Zhurbenko, 2010).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

b) *Staphylococcus aureus*

Son cocos Gram positivos, con un diámetro de 0,5 a 1,5 µm, agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, y anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos. Las colonias de *Staphylococcus aureus* son doradas como consecuencia de los pigmentos carotenoides que se forman durante su crecimiento y que dan el nombre a la especie. Es la única especie presente en las personas que produce la enzima coagulasa (Tortora, Funke y Case, 2007; Cervantes, García y Salazar, 2014).

www.bdigital.ula.ve

- **Bacterias Gram negativas:**

Se caracterizan por la composición de la membrana externa de la pared celular constituida principalmente por lípidos (Willey, Sherwood y Woolverton, 2009; Castro, 2014). Algunos ejemplos son:

a) *Escherichia coli*

Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae; capaz de producir indol a partir de triptófano, no utiliza el citrato como fuente de carbono y no produce acetoína. Además, fermenta la glucosa y la lactosa con producción de gas. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de la microbiota habitual, pero hay cepas que pueden ser

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea (Rodríguez, 2002; Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

b) *Klebsiella pneumoniae*

Es un bacilo Gram negativo, no móvil, de la familia Enterobacteriaceae. Es la especie de mayor importancia clínica y más estudiada dentro del género *Klebsiella*. Es un representante importante no sólo por su frecuencia como causa de infecciones asociadas al cuidado de la salud y de la comunidad, sino por los mecanismos patogénicos que posee, como la capacidad de producir cápsula, la presencia de estructuras especializadas que le permiten adherirse a las células del hospedero (pilis), y de sideróforos que le permiten obtener el hierro necesario para su desarrollo (Willey, Sherwood y Woolverton, 2009; López y Echeverri, 2010).

www.bdigital.ula.ve

c) *Pseudomonas aeruginosa*

Consiste en bacilos Gram negativos aerobios facultativos de 0,5-1,0 µm de diámetro y de 1,5-5,0 µm de largo que se mueve por medio de flagelos polares, sean únicos o en mechones. Estos microorganismos son muy comunes en el suelo y en otros ambientes naturales, produce un pigmento soluble de color azul verdoso y suelen crecer entre 23-43 °C lo que la diferencia del resto de las especies de *Pseudomonas.* En ciertas condiciones, en especial en huéspedes debilitados, este microorganismo puede infectar el tracto urinario, las quemaduras y las heridas y puede causar infecciones de la sangre (sepsis), abscesos y meningitis (Willey, Sherwood y Woolverton, 2009; Paz, Mangwani, Martínez, Álvarez, Solano y Vázquez, 2019).

- Dentro de las bacterias de interés médico, las micobacterias no se pueden observar por la tinción de Gram tradicional debido a que su pared celular

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

está constituida principalmente por un material grueso ceroso (Ácidos micólicos) estas son denominadas bacterias ácido alcohol resistente las cuales requieren una tinción especial denominada Zielh-Neelsen (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009; Ramírez y cols., 2010; Castro, 2014).

Según sus requerimientos atmosféricos para su crecimiento:

Se refiere a las condiciones atmosféricas (requerimiento de oxígeno) en las cuales una bacteria puede crecer (Ramírez y cols., 2010; Castro, 2014). De esta manera se tienen bacterias:

a) **Bacterias aerobias:** estas necesitan oxígeno para crecer ya que lo utilizan en ocasiones como aceptor final de electrones para la captación de energía química. En este grupo se encuentran bacterias aerobias obligadas y microaerofílicas (baja concentración de oxígeno e incremento de CO_2).

www.bdigital.ula.ve

a) **Bacterias anaerobias:** son aquellas que crecen en ausencia de oxígeno, debido a que pueden usar aceptores finales de electrones distintos del oxígeno o porque poseen un metabolismo estrictamente fermentativo para la producción de energía necesaria para su crecimiento. En este grupo encontramos bacterias **anaerobias estrictas** (a las cuales el oxígeno les resulta toxico, ya que carecen de enzimas eliminadoras de los productos nocivos del metabolismo del oxígeno), **anaerobias aerotolerantes** (las cuales pueden crecer en presencia de oxígeno, aun cuando no pueden utilizarlo, debido a que poseen enzimas detoxificadoras) y **anaerobias facultativas** (las cuales pueden realizar metabolismo energético aeróbico o anaeróbico, dependiendo del medio ambiente donde se encuentren y de la

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

disponibilidad de aceptores finales de electrones) (Ramírez y cols., 2010; Castro, 2014).

Según su reacción bioquímica:

Tiene su fundamento en la evaluación de las capacidades metabólicas demostradas por la utilización o rompimiento de diversos sustratos como carbohidratos, lípidos y proteínas, entre otros (Murray y cols., 2009; Ramírez y cols., 2010; Castro, 2014).

Mecanismos de resistencia de las bacterias

La resistencia bacteriana tanto natural (debido a que no cuentan con un sitio blanco o es impermeable para el antibiótico) como adquirida (que por naturaleza es sensible a un antibiótico pero que ha sido modificada genéticamente ya sea por mutación o por adquisición de genes de resistencia tales como, plásmidos, transposones e integrones). Se puede abordar desde el punto de vista molecular y bioquímico de tal forma que se pueden clasificar en tres mecanismos básicos, por medio de los cuales las cepas bacterianas pueden adquirir resistencia a los antibióticos de acuerdo al mecanismo expresado y el mecanismo de acción del antibiótico. Estos son: inactivación del antibiótico, alteración del sitio blanco del antibiótico y alteración de barreras de permeabilidad. Cabe resaltar que los tres mecanismos pueden ocurrir simultáneamente (Tortora, Funke y Case, 2007; Pérez y Robles, 2013).

www.bdigital.ula.ve

- **Inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química**

El fenotipo de resistencia antibiótica por destrucción o modificación de la estructura química es un proceso molecular caracterizado por la producción

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

de enzimas que van a llevar a cabo esta función (Figura 13). Las enzimas que destruyen la estructura química, más conocidas, son las β-lactamasas que se caracterizan por hidrolizar el núcleo β-lactámico rompiendo el enlace amida, otra enzima es la eritromicina esterasa que cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico. Entre las enzimas que se encargan de la modificación de la estructura podemos mencionar a la cloranfenicol acetiltransferasa y también a las enzimas que modifican a los aminoglucósidos, lincosamidas y estreptograminas (acetilasas, adenilasas y fosfatasas) (Tortora, Funke y Case, 2007; Pérez y Robles, 2013).

- **Alteración del sitio blanco del antibiótico**

La resistencia bacteriana conferida por la alteración del sitio en donde actúa el antibiótico consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana como la pared celular, la membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales, entre otras (Figura 13). Por ejemplo, la modificación por mutación de los genes *GyrA* y *GyrB* que codifican para las topoisomerasas II y IV respectivamente, ofrecen resistencia bacteriana a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* frente a las quinolonas. En cuanto a las modificaciones a nivel ribosomal podemos mencionar los cambios que ocurren en las subunidades 30S y 50S los cuales son los sitios de acción de aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y lincosamidas. Por ejemplo, la metilación del ARN ribosomal de la subunidad 50S confiere resistencia a *S. aureus* y *S. epidermidis* frente a tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos. La resistencia bacteriana contra gentamicina, tobramicina y amikacina consiste en una mutación de la subunidad ribosomal 30S (Tortora, Funke y Case, 2007; Pérez y Robles, 2013).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- **Alteración en las barreras de permeabilidad**

Este mecanismo se debe a los cambios que se dan en los receptores bacterianos específicos para los antimicrobianos o por alteraciones estructurales en los componentes de envoltura de la célula bacteriana (membrana o pared celular) que influyen en la permeabilidad, así como a la pérdida de la capacidad de transporte activo a través de la membrana celular o la expresión de bombas de eflujo las cuales se activan en el momento en que el antibiótico se introduce a la célula bacteriana (Figura 13) (Tortora, Funke y Case, 2007; Pérez y Robles, 2013).

La membrana celular de las bacterias Gram negativas contiene un alto contenido de lípidos con respecto a las Gram positivas, presenta una membrana externa con un 40 % de lipopolisacárido lo cuál le proporciona una barrera efectiva contra la entrada de antibióticos, dependiendo de la composición química de estos. La internalización de compuestos hidrófilicos se lleva a cabo por canales denominados porinas, que se encuentran en la membrana interna, estos canales están llenos de agua por lo que la penetración de los antibacterianos en este caso dependerá del tamaño de la molécula, hidrofobicidad y carga eléctrica (Tortora, Funke y Case, 2007; Pérez y Robles, 2013).

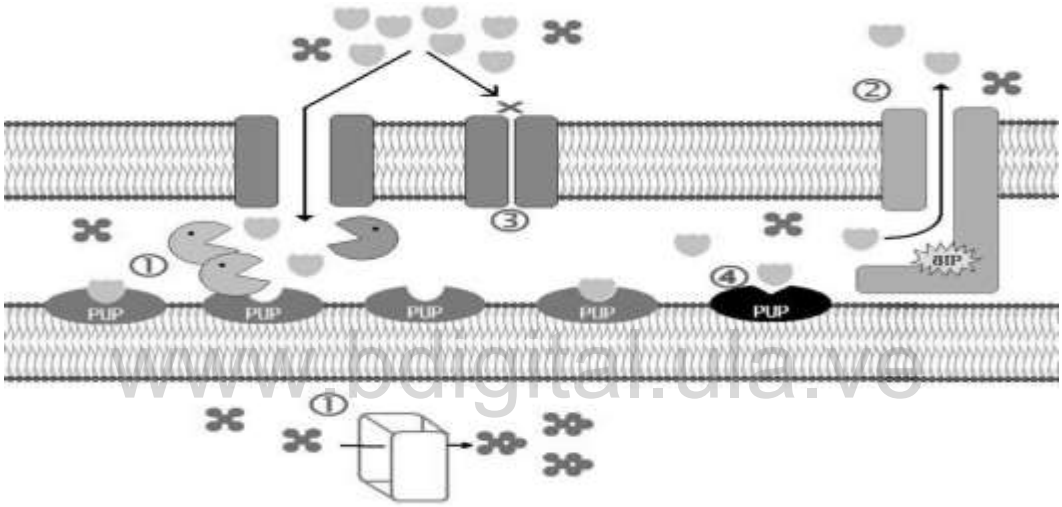
www.bdigital.ula.ve

- **Bombas de eflujo**

En la membrana celular se encuentran las llamadas bombas de eflujo que llevan a cabo la internalización y expulsión de los antimicrobianos. Una amplia variedad de bombas de eflujo provee resistencia antimicrobiana tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. El eflujo activo de antibióticos es mediado por proteínas transmembranales. En el caso de las bacterias Gram negativas involucra también componentes en la membrana externa y citoplasma. Estas proteínas forman canales que exportan

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

activamente a un agente antimicrobiano fuera de la célula tan rápido como entra (Figura 13). Este mecanismo confiere resistencia a tetraciclinas, quinolonas, cloranfenicol, β-lactámicos, así como a los antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario utilizado para la limpieza de superficies (Tortora, Funke y Case, 2007; Pérez y Robles, 2013).



www.bdigital.ula.ve

Figura 13. Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos.
1. Inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química 2. Bombas de eflujo 3. Alteración en las barreras de permeabilidad 4. Alteración del sitio blanco del antibiótico. Tomado y modificado de Tafur, Torres y Villegas, 2008.

Antibióticos

Son moléculas naturales (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintéticas o semisintéticas, capaces de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias (Basualdo, Coto y De Torres, 1996).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Clasificación de antibióticos

Los antibióticos se clasifican de acuerdo a diferentes aspectos, entre ellos tenemos:

Según su origen: (Basualdo, Coto y De Torres, 1996).

- **Naturales:** moléculas que se extraen de organismos vivos.
- **Sintéticos:** moléculas químicas que se han sintetizado en el laboratorio.
- **Semisintéticos:** son moléculas de origen natural modificadas en el laboratorio para mejorar su acción.

Según su tipo de acción: (Basualdo, Coto y De Torres, 1996).

www.bdigital.ula.ve

- **Bactericida:** su acción es letal, llevando a la lisis bacteriana.
- **Bacteriostático:** a las concentraciones que alcanzan en el suero o tejidos impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana, pero sin llegar a destruir las células. De hecho, cuando se retira el antibiótico, el microorganismo se puede multiplicar de nuevo.

Según su espectro de acción: (Basualdo, Coto y De Torres, 1996).

- **Antibióticos de amplio espectro:** actúan sobre una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas, y también contra *Chlamydia*, *Mycoplasma, Rickettsia, Espiroquetas* y *Actinomycetos*. Ejemplo: tetraciclinas y cloranfenicol.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- **Antibióticos de espectro intermedio:** actúan sólo contra cocos Gram positivos y Gram negativos, bacilos Gram positivos y espiroquetas. Ejemplo: penicilina.
- **Antibióticos de espectro reducido o limitado:** actúan sólo contra un solo grupo de microorganismo.

Según su mecanismo de acción: (Basualdo, Coto y De Torres, 1996)

Es el mecanismo por el cual un antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento o destruir una célula bacteriana. Se dividen en inhibidores de la biosíntesis de la pared bacteriana, inhibidores de la biosíntesis proteica, inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos, inhibidores de la membrana citoplasmática e inhibidores de vías metabólicas.

www.bdigital.ula.ve

- **Antibióticos que afectan la biosíntesis de la pared bacteriana**

La síntesis de la pared bacteriana se divide en 3 etapas:

1. La primera es intracitoplasmática y consiste en la síntesis de las unidades NAG (N-acetilglucosamina) y NAM (ácido N-acetilmurámico).
2. La segunda etapa es intramembranosa; las unidades NAM y NAG se acoplan mediante un lípido transportador que es el 1-decaprenilfosfato.
3. La última etapa es extramembranosa y consiste en la incorporación del nuevo peptidoglicano al ya existente, es decir se forman los puentes peptídicos extracitoplasmáticos.

Los antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana impiden los sucesivos pasos de la síntesis de la pared bacteriana; como consecuencia de esta interferencia, la célula bacteriana sin pared no resiste los cambios osmóticos, se hincha y estalla. Por eso, los antibioticos β-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas), bacitracina, vancomicina, teicoplanina y fosfomicina son

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

bactericidas pues matan a la célula bacteriana en el momento de la división por lo tanto no actúan cuando la célula está estática (Basualdo, Coto y De Torres, 1996).

- **Antibióticos que afectan la biosíntesis proteica**

Se pueden dividir en dos grupos, según inhiban la transcripción o la traducción proteica: (Basualdo, Coto y De Torres, 1996).

1. **Inhibición de la transcripción:** Consiste en la inhibición de la subunidad beta de la enzima ARN polimerasa ADN dependiente, que lleva a la inhibición de la síntesis del ARN mensajero; éste transmite la información del ADN, que es necesaria para la formación proteica normal
2. **Inhibición de la traducción:** Se logra mediante la unión de la molécula del antibiótico a la subunidad 30S (tetraciclina y aminoglucósidos) o 50S (macrolidos, cloranfenicol, lincosaminas, estreptograminas y oxazolidinonas) del ribosoma bacteriano.

www.bdigital.ula.ve

- **Antibióticos que afectan la síntesis de ácidos nucleicos**

La biosíntesis del ADN bacteriano es inhibida por dos mecanismos: (Basualdo, Coto y De Torres, 1996).

1. Mediante la inhibición de una topoisomerasa, llamada ADN girasa, enzima esencial para la replicación del ADN. La ADN girasa posee dos subunidades, A y B; la subunidad B cumple la función de enrollar las cadenas de ADN, paso necesario para acomodar el núcleo dentro de la bacteria mediante la reducción de su tamaño. Cuando este superenrollado ha finalizado, la subunidad A sella el corte en el ADN. Por ejemplo: las quinolonas inhiben la actividad de esta enzima.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

2. Mediante la formación de compuestos tóxicos para las bacterias, resultante del poder reductor de los anaerobios sobre el radical "nitro" de los antibióticos nitroimidazólicos. Los productos de reducción del grupo "nitro" se conjugan con el ADN, produciendo su desestabilización y por lo tanto provocando la muerte celular.

- **Antibióticos que afectan la membrana citoplasmática**

La membrana plasmática cumple funciones importantes para la vitalidad de la bacteria. Entre sus propiedades incluye el actuar como barrera de permeabilidad selectiva, controlando de esta forma la composición del medio interno celular. Los antibióticos utilizados en clínica, que actúan modificando la membrana celular, son las polimixinas y los polienos (nistatina y anfotericina B). Actúan como detergentes o tensioactivos catiónicos y provocan una grave alteración de la membrana celular, modificando la permeabilidad y permitiendo el escape de aminoácidos intracelulares, purinas, pirimidinas y otras moléculas fundamentales para la vida celular. Las polimixinas actúan de este modo, interactuando sobre los fosfolípidos de la membrana celular, mientras que la nistatina y la anfotericina B son activos frente a hongos, se unen a un grupo esterol de la membrana que solamente contienen los microorganismos contra los cuales se utilizan estos antibióticos (Basualdo, Coto y De Torres, 1996).

www.bdigital.ula.ve

Las bacterias más susceptibles son las que tienen en su membrana un mayor contenido de fosfolípidos (Gram negativas). La insensibilidad o resistencia está en relación con la impermeabilidad de la pared celular para estos fármacos, como el caso de las Gram positivas que tienen una pared celular muy gruesa. Todos estos antibióticos son líticos, incluso en bacterias en reposo y tienen cierto potencial tóxico, especialmente la anfotericina B, ya que son capaces de unirse con los lípidos de membranas citoplasmáticas de las células de los mamíferos (Basualdo, Coto y De Torres, 1996).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- **Antibióticos que inhiben vías metabólicas**

Ciertos antibióticos, como las sulfamidas y la trimetoprina, inhiben vías metabólicas que impiden el crecimiento bacteriano; tienen por lo tanto acción bacteriostática. Cuando ambas drogas se administran en forma conjunta, su acción es bactericida. Las sulfamidas inhiben competitivamente la incorporación de ácido paraaminobenzoico (PABA) por su semejanza química, impidiendo a partir de este precursor, la síntesis de ácido fólico bacteriano, factor esencial en el crecimiento de los microorganismos. Cuando la bacteria adquiere la capacidad de producir PABA o de inhibir las sulfamidas, se transforma en resistente. La trimetoprina (TMP) inhibe a la dihidrofolato reductasa (enzima reductora del ácido dihidrofólico), con lo cual obstruye la formación de ácido tetrahidrofólico, metabolito esencial para la síntesis de purinas por la bacteria (Basualdo, Coto y De Torres, 1996). En la Figura 14, se observan los sitios de acción de los antibióticos:

www.bdigital.ula.ve

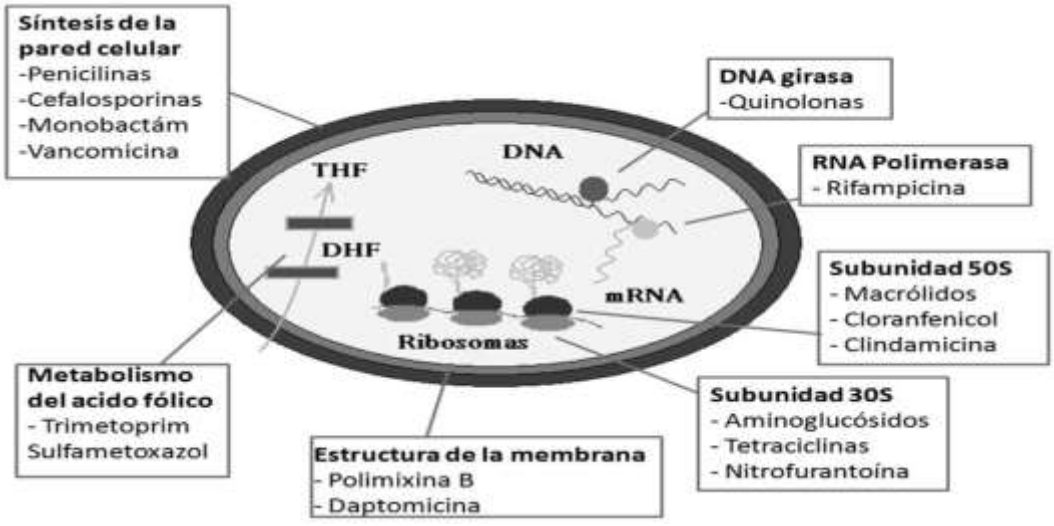


Figura 14. Sitio de acción de los antibióticos. Tomado y modificado de Tafur, Torres y Villegas, 2008.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Según su composición química: (Ver tabla 1).

Tabla 1. Antibióticos según su composición química

Clasificación	Sub-clasificación
β - lactámicos	Penicilinas, Cefalosporinas, β – lactámicos + inhibidores de β – lactamasa, Monobactamicos y Penemos
Aminoglucósidos	No aplica
Lincosaminas	No aplica
Macrólidos	No aplica
Quinolonas	Fluoroquinolonas
Ansamicinas	Rifamicinas
Anfenicoles	No aplica
Tetraciclinas	Glicilciclinas
Glicopéptidos	Lipoglicopéptidos
Estreptpgraminas	No aplica
Nitroheterociclicos	Nitrofuranos y Nitroimidazoles
Antagonistas de la vía de los folatos	Inhibidor de la dihidrofolato reductasa
Oxazolidinonas	No aplica
Lipopéptidos	Polimixinas

Tomado y modificado de Lopardo, 2020.

www.bdigital.ula.ve

Actividad Antibacteriana

Se define como la capacidad de matar, inhibir y/o inactivar microorganismos, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena (Flores, 2014).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Métodos para determinar actividad antibacteriana

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados, en tres grupos principales: métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía (Ramírez y Marín, 2009).

- **Métodos de difusión**

El método de difusión en agar, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles. La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer y cols. en 1966 (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), de Estados Unidos. El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (Ramírez y Marín, 2009; Ramírez y cols., 2010).

www.bdigital.ula.ve

En el caso de evaluar varias sustancias los discos de papel filtro o los pozos deben ponerse en forma equidistante. A continuación, se procede a su incubación a la temperatura adecuada por 24 horas luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos de las distintas sustancias sobre el microorganismo estudiado, con el antibiótico control. La lectura de los

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

resultados representa la actividad *in vitro* de la sustancia (Ramírez y Marín, 2009; Ramírez y cols., 2010).

Es necesario señalar que el tamaño del halo de inhibición es influenciado por varios factores, entre ellos; medio de cultivo en que se realiza la prueba, capacidad de difusión del compuesto, cantidad de inóculo, tiempo de generación del microorganismo, sensibilidad al antibiótico**,** y período de incubación. Cualquier variación de estos factores puede afectar el resultado de la prueba, sin embargo, al emplear un procedimiento estándar es posible obtener resultados confiables (Cona, 2002; Ramírez y Marín, 2009).

- **Métodos de dilución**

El método de **dilución en agar** o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima inhibitoria (CMI), 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 (CMB) como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado, estas variables son una herramienta para investigar nuevos antimicrobianos (Ramírez y Marín, 2009).

www.bdigital.ula.ve

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 CMI es determinada después de la incubación. En el método de **dilución en agar**, las placas 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 placas, la principal

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

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

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución. La CMI se ha establecido como "*Gold Standard*" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado (Ramírez y Marín, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Se puede realizar en microdilución para lo cual se escogen las placas que tienen 96 pocillos (12 mm x 8 mm), en las que se estudia en cada una de ellas, el mismo microorganismo, 8 antimicrobianos y 11 diluciones (la última columna se suele utilizar como control de crecimiento) o viceversa. Las placas de microdilución deben sellarse con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben. Tras la incubación se observa la turbidez o se procede a la adición del bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución a formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales violeta, evidenciando de esta forma actividad metabólica (Ramírez y Marín, 2009).

El MTT, ha sido usado para visualizar la actividad de la enzima deshidrogenada, esta enzima remueve el hidrógeno del sustrato y lo transfiere al aceptor de hidrógenos, usualmente una coenzima. De la coenzima es

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

transferido al MTT, el cual es reducido a un compuesto intensamente coloreado e insoluble en agua llamado formazán. El formazán absorbe a una longitud de onda de 550 a 570nm (Ramírez y Marín, 2009).

Estandarización del método para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Para las pruebas de actividad antimicrobiana en micro placa de 96 pozos, se preparan diferentes concentraciones de los aceites y /o extractos a ensayar, los cuales se mezclan con el medio de cultivo, el cual ha sido inoculado previamente con el microorganismo de prueba, se deja incubar y posteriormente se determina por turbidez o por cambio de color con MTT el crecimiento o no del microorganismo, el pozo que contenga la menor concentración del agente que inhibe completamente el crecimiento define la CMI. Como prueba confirmatoria se siembra por superficie en placa de Petri con agar nutritivo, 20 µL del contenido del pozo, dejando incubar por 24 horas a 37 °C; para posteriormente realizar la lectura (Ramírez y Marín, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Otro método muy utilizado es la determinación de la concentración mínima bactericida o CMB también conocido como concentración letal minina, la cual es definida como la concentración más baja del agente antimicrobiano necesaria para matar el 99 % del inoculo inicial después de incubación por 24 horas bajo condiciones estandarizadas. Este ensayo es una prueba que se realiza generalmente como dilución en caldo empleando diluciones dobles, y se realiza posterior a la determinación de la CMI. Se comprueba sembrando de cada una de las diluciones por difusión en agar y se determina el número de UFC (Unidades formadoras de colonias/mL), puede ser determinado usando un método de macrodilución (1 o 2 mL por tubo) o por microdilución (0,1 o 0,2 mL por tubo), sin embargo, el método por microdilución tiene más sensibilidad. El método estandarizado para alcanzar la CMB a través de microdilución en caldo se encuentra en el protocolo del CLSI. En los

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

bioensayos de actividad antibacteriana se deben tener en cuenta algunos aspectos: El panel de microorganismos a evaluar siempre debe tener dentro de la batería, microorganismos Gram positivos y Gram negativos. Las cepas ATCC son bien caracterizadas, aunque también se pueden utilizar aislamientos clínicos. El inoculo se recomienda que este en el rango de 10^5 y 10^6 UFC/mL. La concentración de los extractos a evaluar no debe exceder el rango de 1 mg/mL para extractos y 0,1 mg/mL para compuestos aislados (Ramírez y Marín, 2009).

- **Bioautografía**

Este ensayo puede representar una herramienta útil para la purificación de sustancias antibacterianas, o como una técnica de tamizaje fitoquímico preliminar, o un fraccionamiento bioguiado, realizando el ensayo a través de cromatogramas, que permitan la localización de los compuestos activos, incluso en matrices complejas como los derivados de productos naturales. Se puede definir como una variación de los métodos de difusión en agar, donde el analito es absorbido dentro de una placa de cromatografía en capa fina (CCF). El método consiste en colocar las muestras a evaluar en placas de CCF, seleccionar la fase móvil que de mejor separación, posteriormente esta placa es llevada y colocada en forma invertida sobre una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo a evaluar, se deja de 8 a 12 horas en la nevera para facilitar la difusión de los extractos en el medio, luego se retira la placa y se lleva a incubación según los requerimientos del microorganismo; luego se observa el halo de inhibición donde está el compuesto activo. Para visualizar mejor los resultados se puede utilizar alguna sal de tetrazolium (Colorado, Galeano y Martínez, 2007; Ramírez y Marín, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Es importante tener en cuenta que solventes ácidos o demasiado alcalinos pueden permanecer en las placas de CCF, después del secado, inhibiendo el crecimiento bacteriano (Colorado, Galeano y Martínez, 2007; Ramírez y Marín, 2009).

Hongos

Los hongos son eucariontes, es decir organismos cuyas celulas poseen un núcleo diferenciado que contiene el material genético (ADN) de la célula rodeado por una cubierta especial denominada membrana nuclear. Los organismos del reino Fungi pueden ser unicelulares o multicelulares. Los hongos multicelulares grandes, como las setas, pueden asemejarse a las plantas, pero a diferencia de estas, no tienen capacidad de fotosintesis. Los hongos verdaderos tienen paredes celulares compuestas sobretodo por una sustancia denominada *quitina*. Las formas unicelulares de los hongos, las levaduras, son microorganismos ovales mas grandes que las bacterias. Los mas típicos son los hongos filamentosos (mohos). Estos hongos forman una masa visible denominada micelio, que esta compuesta por filamentos largos (hifas) que se ramifican y entrelazan. Los hongos se reproducen de forma sexual o asexual. Obtienen su nutricion mediante la absorción de soluciones de materia orgánica de su entorno, sea del suelo, del agua salada, del agua dulce o de un huésped animal o vegetal (Casas, 1994; Tortora, Funke y Case 2007).

www.bdigital.ula.ve

Clasificación de los hongos

Dentro del superreino Eucarionte, se estudian los hongos en el reino Fungae (*Fungi*), separados de las plantas y los animales, mismo que comprende varios filos (*phylum*): Myxomycota y Oomycota, que ahora se

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

consideran seudohongos; Chytridiomycota y Zygomycota, que son hongos inferiores, Ascomycota y Basidiomycota que corresponden a hongos superiores o meiospóricos, que tienen una reproducción sexuada conocida (aunque los Zigomycetes también presentan reproducción sexuada por zigosporas). Los hongos sin reproducción sexuada o mitospóricos se denominan anamorfos; antes eran llamados deuteromicetos o *Fungi imperfecti* (ascomicetos anamorfos) (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009; Arenas, 2014).

La clasificación de los hongos genera confusión, ya que está en desarrollo permanente, pues cada día se descubren especies nuevas y algunas se han considerado como especies artificiales, de tal manera que las características fenotípicas y genotípicas hacen necesario el ajuste de las ramas del árbol filogenético. Por otra parte, no siempre existe un acuerdo unánime en la interpretación de los datos; por tal motivo, para facilitar su comprensión, en la Tabla 2, se presenta una clasificación simplificada de hongos y organismos cercanos o seudohongos (Arenas, 2014).

www.bdigital.ula.ve

Los **hongos inferiores** se caracterizan por presentar filamentos gruesos cenocíticos (o poco tabicados), multiplicación asexuada por esporas endógenas y reproducción sexuada por oosporas o zigosporas. Se conocen algunos hongos no clasificados que tienen ciclo de vida reducido con endosporulación, como *Pneumocystis jirovecii* (antes *P. carinii*) que se ha relacionado con zigomicetos, pero hoy día se coloca en el filo (*phylum*) Ascomycota, y *Rhinosporidium seeberii*, un protozoario acuático catalogado en el reino Protista dentro de Mesomycetozoa (Arenas, 2014).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 2. Clasificación simplificada de hongos y pseudohongos

Reino Protista (Protoctista)	**Reino Eumycota**
Filo (phylum)	**Filo (phylum)**
Acrasiomycota	Chytridiomycota
Myxomycota	Zygomycota
Oomycota	Ascomycota
Mesomycetozoa	Basidiomycota
Hyphocytriomycota	
Labyrinthulomycota	

Tomado y modificado de Arenas, 2014.

Los **hongos superiores** presentan filamentos tabicados y multiplicación asexuada por esporas externas (conidios), aisladas o en cadenas o dispuestas en conidióforos. La reproducción sexuada ocurre por fusión de dos esporas de sexos diferentes con formación de una fase binucleada o dicariota, por lo que este filo (*phylum*) también se denomina Dikaryomycota, y el estado anamorfo, Deuteromycota (*Fungi imperfecti*). Los núcleos del filamento binucleado se fusionan y dan lugar a un huevo que después de la reducción cromática produce basidios con cuatro basidiosporas, llamados también basidios tetrasporicos (Basidiomycota) o ascas que, a su vez, tienen 4 a 16 ascosporas (Ascomycota). En estos últimos, la germinación ocurre en un filamento haploide (talo o micelio) o en una célula gemante (levadura) (Arenas, 2014).

www.bdigital.ula.ve

De acuerdo con su modo de crecimiento o reproducción, los hongos se clasifican de la siguiente manera: levaduras (blastomicetos), hifomicetos o mohos (Hyphomycetes) y coelomicetos (Coelomycetes) (Arenas,2014).

- Las **levaduras** son blancas o rojas, generan enfermedades en humanos o viven como saprofitos en el organismo. Se identifican por sus características fisiológicas o morfológicas. Hay también hongos

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

levaduriformes con células melanizadas que se llaman levaduras negras, aunque casi siempre producen micelio verdadero y son hifomicetos.

- Los **hifomicetos** (Hyphomycetes) son mohos con micelio tabicado en cuyas hifas se forman las esporas asexuadas o conidios; a veces se presentan en conidióforos simples o coremios. Corresponden a la clase Evascomycetes y la mayor parte tiene afinidad por la clase Ascomycetes.
- Los **coelomicetos** (Coelomycetes) son hongos miceliales con tabiques y reproducción asexuada por conidios que se forman en un cuerpo fructifero constituido por un estroma en forma de saco o picnidio, o en agrupaciones micelianas de tipo acérvulo, mientras el resto micelio permanece estéril (Arenas, 2014).

www.bdigital.ula.ve

Entre algunas especies de hongos encontramos:

- *Candida albicans*

Es un hongo polimórfico, pudiendo crecer en forma de levadura, hifa y pseudohifa. La forma de hifa penetra en el epitelio y el endotelio, causando daño tisular y permitiendo el acceso al torrente sanguíneo. Es exquisitamente sensible a los múltiples ambientes que encuentra en el huésped humano y forma hifas en respuesta a señales como temperatura de 37 °C, suero, tensión de CO_2 y O_2 y pH neutro. Es un comensal, la mayor parte de las infecciones son endógenas y el episodio clave parece ser un cambio en la relación entre la levadura y el huésped. También es una causa frecuente de infecciones de las mucosas. En ciertos grupos de pacientes inmunocomprometidos, causa infecciones del torrente sanguíneo potencialmente mortales que se diseminan a los órganos internos (Sudbery, 2011; Arenas, 2014).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- *Candida krusei*

Las células de *Candida krusei* son generalmente alargadas y tienen la apariencia de “arroz de grano largo” con amplias variaciones en el largo y el ancho de los aislamientos, a diferencia de la mayoría de otras *Candida* spp. que son de forma ovoide. *Candida krusei* se encuentra generalmente en dos formas morfológicas básicas, como levadura y pseudohifa y crece a una temperatura máxima de 43-45 °C. Se describe el organismo como un aislado transitorio e infrecuente de importancia clínica menor que habita en las superficies mucosas. Más recientemente, ha surgido como un patógeno notable con un espectro de manifestaciones clínicas como fungemia, endoftalmitis, artritis y endocarditis, la mayoría de las cuales generalmente ocurren en grupos de pacientes comprometidos en un entorno nosocomial (Samaranayake y Samaranayake, 1994).

www.bdigital.ula.ve

Resistencia antifúngica

La resistencia es un cambio de sensibilidad o susceptibilidad al antifúngico que puede medirse *in vitro* por métodos de laboratorio apropiados. Los mecanismos de resistencia antifúngica se clasifican en dos categorías, resistencia microbiológica y resistencia clínica (López, Dzul, Lugo, Arias y Zavala, 2016).

- La resistencia microbiológica se define como el crecimiento del microorganismo a dosis normales del antifúngico, sin embargo, éste puede ser inhibido a una concentración más alta.
- La resistencia clínica se define como el crecimiento del microorganismo a pesar de la administración de un agente antifúngico lo que esto se asocia con una alta probabilidad de falla terapéutica. En otras palabras, el patógeno no se puede inhibir a dosificaciones normales, pero si a

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

concentraciones más altas las cuales podrían ser no seguras para el paciente (López, Dzul, Lugo, Arias y Zavala, 2016).

Mecanismos de resistencia de los hongos

Existen dos mecanismos por los que se puede adquirir resistencia a un azol. El primer mecanismo se debe a mutaciones moleculares de la enzima diana del antifúngico, como la alteración de las enzimas relacionadas en la síntesis del ergosterol; el segundo mecanismo se debe a la formación de barreras de permeabilidad o sistemas de bombeo del antifúngico fuera de la célula, como la alteración en las bombas de expulsión: *ATP-binding cassette* (*ABC*) y facilitadores mayores (MF) (Mellado Cuenca y Rodríguez, 2002; López, Dzul, Lugo, Arias y Zavala, 2016).

www.bdigital.ula.ve

- **Alteración de las enzimas relacionadas en la síntesis del ergosterol**

El análisis de los esteroles en una célula puede proporcionar gran información relacionada con las alteraciones que se han producido en una cepa resistente. Las modificaciones en la vía del ergosterol no solo generan resistencia al azol al cual está expuesto, sino también a otros fármacos con los que posteriormente pudiera entrar en contacto (Mellado Cuenca y Rodríguez, 2002; López, Dzul, Lugo, Arias y Zavala, 2016).

El otro mecanismo de resistencia estudiado y directamente relacionado con la resistencia a azoles, es la alteración estructural de la enzima 14-esterol desmetilasa (diana de los azoles y enzima clave en la síntesis del ergosterol). En la vía metabólica de la síntesis del ergosterol, el lanosterol y sus derivados son el sustrato para la enzima 14-lanosterol desmetilasa (producto del gen *CYP51/ERG11*) (Mellado Cuenca y Rodríguez, 2002; López, Dzul, Lugo, Arias y Zavala, 2016).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Se ha identificado una mutación puntual de *ERG11* en aislamientos clínicos resistentes, presentándose una sustitución de arginina por lisina en el aminoácido 467 del gen *ERG11*, que contribuye a la resistencia a los azoles. También la sobreexpresión del gen *ERG11* origina resistencia a los azoles, ya que se ha demostrado un aumento de la transcripción de este durante la exposición a los antifúngicos azólicos, incluso en células sensibles. Se piensa que este aumento se debe a la respuesta de la célula, a la disminución del ergosterol o a la acumulación de esteroles tóxicos. Así pues, parece claro que la resistencia a los azoles es producida por amplificación o hiperexpresión de la diana de los azoles (Mellado Cuenca y Rodríguez, 2002; López, Dzul, Lugo, Arias y Zavala, 2016).

- **Alteración en las bombas de expulsión**

www.bdigital.ula.ve

Los transportadores *ATP-binding cassette* (ABC) y facilitadores mayores (MF) son un sistema de bombeo activo mediado por ATP, se localizan en la membrana citoplasmática y contribuye a la resistencia de casi todos los azoles, expulsando el fármaco hacia el exterior de la célula. Los transportadores ABC son codificados por los genes *CDR (Candida Drug Resistance)* y los transportadores MF son codificados por los genes *MDR (Multidrug Resistance)*. La sobreexpresión de los transportadores es la causa más frecuente de resistencia a los antifúngicos (todos los azoles), mientras que la sobreexpresión por los genes MDR sólo confiere resistencia al fluconazol (López, Dzul, Lugo, Arias y Zavala, 2016)

En una célula susceptible, los antifúngicos azólicos entran por difusión pasiva actuando sobre la enzima lanosterol desmetilasa, que es producto del gen *ERG11*, lo cual inhibe la síntesis del ergosterol. Estas células sensibles presentan expresión de niveles bajos de los genes *CDR* y el gen *MDR*. En una célula resistente, los azoles son menos efectivos contra el lanosterol 14-alfa-

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

desmetilasa por la sobreexpresión de los genes *CDR* y *MDR*. Las células resistentes pueden tener uno o ambos mecanismos de resistencia, (Figura 15) (López, Dzul, Lugo, Arias y Zavala, 2016).

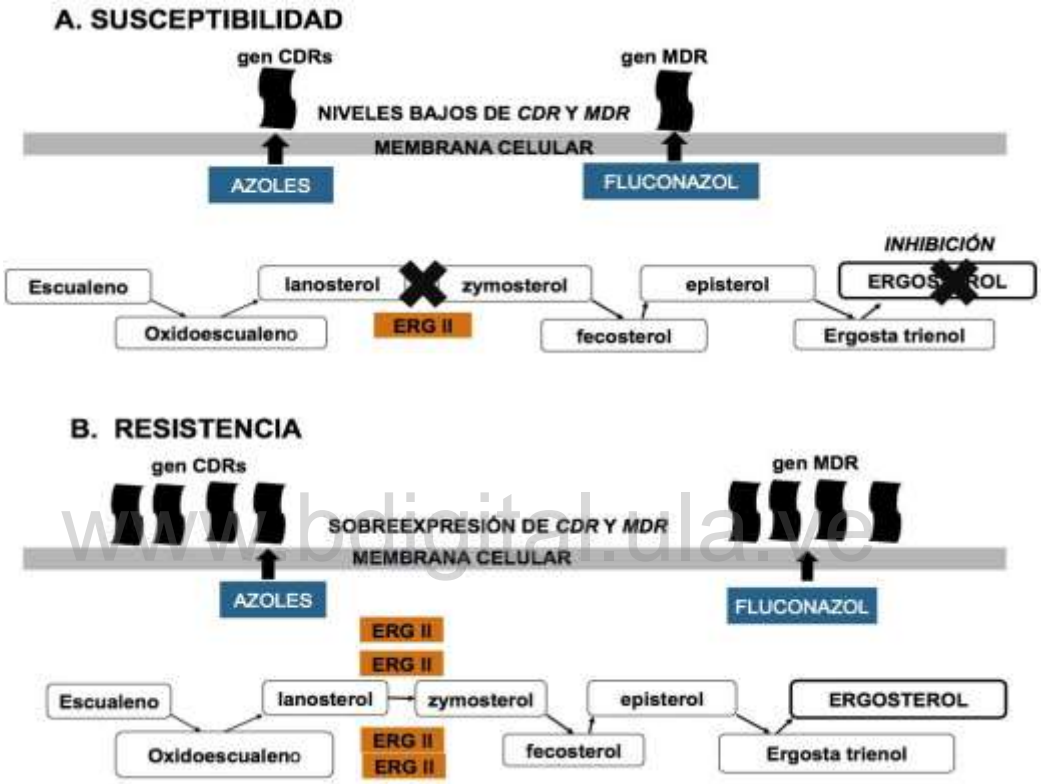


Figura 15. Alteraciones en el transporte de fármacos (sobreexpresión de bombas, transportadores ABC). Tomado y modificado de López, Dzul, Lugo, Arias y Zavala, 2016

Antifúngicos

Sustancias capaces de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped (Gregorí, 2005).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Clasificación de los antifúngicos

Los antimicóticos incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. La clasificación se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura en: polienos, azoles, alilaminas, entre otros (Tabla 3); de acuerdo con su origen en sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química; de acuerdo con su espectro de acción en: amplio o restringido y de acuerdo con el sitio de acción (Tabla 4) (Gregorí, 2005; Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

Tabla 3. Clasificación de los antifúngicos por su estructura

Polienos	Nistatina, Natamicina, Amfotericina B
Azoles	Imidazol: Miconazol, Clotrimazol
	Triazoles: Fluconazol, Itraconazol, Ketoconazol
	Triazoles de segunda generación: Voriconazol, Ravuconazol,Posaconazol
Alilaminas	Terbinafina, Naftifina
Lipopéptidos	Papulacandinas
	Triterpenos glicosilados
	Equinocandinas: Caspofungina, Anidulofungina, Micafungina
Pirimidinas fluoradas	Flucitosina
Otros	Yoduro de potasio, Ciclopirox, Tolnaftato, Griseofulvin

Tomado y modificado de Gregorí, 2005.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 4. Clasificación de los antifúngicos por su sitio de acción en el hongo

Antifúngicos interactuando en pared celular	Lipopéptidos
Antifúngicos interactuando en membrana celular	Polienos, Azoles, Alilaminas
Antifúngicos interactuando en núcleo	Pirimidinas fluoradas

Tomado y modificado de Gregorí,2005.

Mecanismo de acción de los antifúngicos

La gran similitud entre las células mamíferas y fúngicas resulta un problema a la hora de diseñar la molécula antifúngica, pues esta debe ser selectiva de la célula patógena y no de la célula humana sana. Los agentes antifúngicos comúnmente son utilizados ante infecciones de las mucosas de las cuales una de cuatro está relacionada con hongos patógenos. El mecanismo de acción de los medicamentos que inhiben el crecimiento de hongos, depende del lugar en el que actúen, lo cual está relacionado con la estructura química del antifúngico (Gregorí, 2005; Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

www.bdigital.ula.ve

- **Acción del antifúngico sobre la membrana celular del hongo**

La membrana celular de la célula humana, así como la de los hongos, desempeña una importante función en la división celular y en el metabolismo. Las complejas partículas lipídicas llamadas esterolatos, son aproximadamente el 25 % de la membrana celular. Sin embargo, el contenido de esterol de la célula fúngica y mamífera es diferente. En las células de los mamíferos el colesterol es el esterol que predomina y en las células fúngicas el primario es el ergosterol. La diferencia del contenido de esteroles ha sido explotada como blanco de acción en los medicamentos antifúngicos. Dentro de ellos se tiene a

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

los polienos, azoles y alilaminas (Gregorí, 2005; Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

1. **Polieno:** Los medicamentos que se encuentran en este grupo, se unen al ergosterol presente en la membrana celular fúngica, donde se forman poros que alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causas de la muerte celular.
2. **Azoles:** Estos inhiben a la citocromo P-450-3-A de la célula fúngica, a través de la inactivación de la enzima C-14-a-dimetilasa, con lo cual se interrumpe la síntesis del ergosterol en la membrana celular. Debido a la falta de ergosterol se comienzan a acumular esteroles tóxicos intermedios, aumenta la permeabilidad de la membrana y se interrumpe el crecimiento del hongo.
3. **Alilaminas.** Trabajan de forma similar a los azoles, conceptualmente ellas inhiben la síntesis del ergosterol. Sin embargo, este grupo actúa en un paso temprano de la síntesis del ergosterol. Las alilaminas inhiben a la enzima escualeno epoxidasa, de esta forma disminuye la concentración de ergosterol, aumentan los niveles de escualeno, aumenta la permeabilidad de la membrana celular, se interrumpe la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo (Gregorí, 2005; Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

www.bdigital.ula.ve

- **Antifúngicos que actúan sobre la pared celular del hongo**

1. **Lipopéptidos:** la pared celular del hongo es fundamental en su viabilidad y patogenicidad. Esta sirve como cubierta protectora, le provee morfología celular, facilita el intercambio de iones, la filtración

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

de proteínas y participa en metabolismo y catabolismo de nutrientes complejos. La ausencia de pared celular es otro de los blancos de acción en la terapia antifúngica. Desde el punto de vista estructural, la pared celular de los hongos está compuesta de un complejo protéico y polisacarídico cuya composición varía en dependencia de la especie de hongo. La distribución de estas proteínas y carbohidratos en la matriz está en relación con la función de la pared celular y los procesos de osmosis y lisis. Los antifúngicos que actúan sobre ella lo hacen inhibiendo la síntesis de los glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa. La falta de glucanos en la pared celular la vuelve débil e incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que muere (Gregorí, 2005; Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

- **Antifúngicos que actúan sobre el núcleo de la célula fúngica**

www.bdigital.ula.ve

1. **Antimetabolitos:** un clásico antimetabolito es la fluocitosina o 5-fluorocitosina. Este fármaco es transportado por la citosina permeasa en el citoplasma de la célula fúngica, donde se convierte en 5-fluorouracil (5-FU) por la citosina diaminasa. El 5-FU es fosforilado e incorporado dentro del ARN convirtiéndose en el dexosinucleótido, el cual inhibe a la timidilato sintetasa y de esta forma impide la síntesis de proteínas de la célula. También inhibe la síntesis de la proteína fúngica, reemplazando el uracil con 5-FU en el ARN fúngico (Gregorí, 2005; Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).
2. **Agentes misceláneos:** En esta clase se encuentra el griseofulvin, el cual inhibe la mitosis, al destruir el huso mitótico, necesario para efectuar la división celular (Gregorí, 2005; Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Actividad Antifúngica

Es la habilidad de cualquier agente antifúngico o antimicótico capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped (Gregorí, 2005).

Métodos para determinar actividad antifúngica

Para determinar la actividad biológica sobre hongos se siguen procedimientos estandarizados por la Clinical and Laboratory Standars Institute (CLSI, 2015) disponible en las principales bases de datos científicas (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

www.bdigital.ula.ve

- **Método para dermatofitos**

Para el estudio *in vitro* de dermatofitos se debe tener en cuenta que estos microorganismos tienen un lento crecimiento y los métodos de propagación para los hongos filamentosos se deben de modificar según cada microorganismo; el CLSI (2015) recomienda utilizar medio de cultivo sólido para la propagación y el ensayo de fármacos potenciales. Se prepara el inoculo de la cepa a evaluar por picadura en medio Lactrimel, se incuba por 7-15 días a 25 °C para la formación de micro y macroconidias. Se cosechan las conidias en tubo cónico estéril con agua destilada estéril; se cuentan las conidias en un hematocitómetro y se ajusta la densidad a $1x10^6$ conidias/mL. Se inoculan placas de medio sólido Müeller-Hinton con ayuda de un hisopo, se espera a que se seque la superficie del medio, se adicionan 10 µL del agente a evaluar sobre un disco de papel filtro estéril de 6 mm de diámetro;

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

una vez seco el disco, con ayuda de pinzas se coloca sobre la superficie del agar, se incuba bajo las condiciones antes mencionadas. Al concluir el período de incubación se observa la presencia de un halo de inhibición alrededor del disco y se mide su diámetro (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

- **Método para levaduras**

Se sigue la metodología del CLSI (2015) para la preparación del inóculo se realiza un subcultivo en agar dextrosa Sabouraud o agar papa dextrosa, se incuba a una temperatura 35 °C, por un período de tiempo dependiendo del microorganismo a prueba. Posteriormente se prepara una suspensión en solución salina 0,85 % o agua estéril con 0,5-2,5 × 10^2 UFC/mL. Se preparan placas con medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) adicionado con ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico (MOPS) 0,165 M a pH 7,0 ± 0,1; los agentes antimicrobianos a evaluar, se preparan a diferentes concentraciones y se agregan 0,1 mL de estas soluciones en medio a tubos de ensayo estériles; después se agregan 0,9 mL de la solución de dilución, se incuba bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Para la interpretación de los resultados se observa la turbidez de los tubos contrastándolos con los controles (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

www.bdigital.ula.ve

- **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF) para dermatofitos**

Para la determinación de la CMI se sigue el método de microdilución establecido por la CLSI (2015) para hongos filamentosos. Se prepara un inóculo de conidias a una densidad óptica de 0,08-0,1 UA (Unidades de Absorbancia), se realiza la lectura en un espectrofotómetro a 625 nm, de esta solución se toma una alícuota y se hace una dilución 1:50 en medio RPMI-1640, por otra parte, se preparan una serie de diluciones del fármaco a evaluar.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

En una placa de 96 pocillos se colocan 100 µL de la solución diluida de conidias más 100 µL de la dilución de los fármacos y controles. Posteriormente se incuban a las mismas condiciones antes mencionadas por 7 días al término de éste se observan los pocillos para verificar el crecimiento de los microorganismos, la CMI es la última concentración donde hay inhibición del crecimiento; de éstos pocillos se toma una asada y se inocula en medio sólido Müeller-Hinton y se incuba bajo las mismas condiciones por 7 días; la CMF corresponde a la concentración donde no hay crecimiento (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

Definición Operacional de Términos

Metabolitos primarios

www.bdigital.ula.ve

Son moléculas comunes en todas las células, necesarias para su funcionamiento y el de los organismos. Se trata de aminoácidos, nucleótidos, azúcares y lípidos, presentes en todas las plantas y desempeñando las mismas funciones. Los metabolitos primarios se caracterizan por: tener una actividad metabólica directa y ser compuestos esenciales intermedios en las vías catabólicas y anabólicas (Ávalos y Pérez, 2009; Salazar y Jaime, 2011).

Planta medicinal

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1979), una planta medicinal es definida como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos (Oliveira, Velázquez y Bermúdez, 2005).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Medicina Tradicional

La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2013), considera a la Medicina Natural y Tradicional, donde se incluye el tratamiento con plantas medicinales, como la medicina más natural, inocua, efectiva, además de tener un costo racional, ser asequible y aceptada por la población (Soria, 2018).

Fitoquímica

Es la rama de la botánica que se encarga del estudio de los constituyentes activos de los vegetales, que han sido obtenidos mediante un proceso de extracción, derivados de la concentración de los mismos, de sustancias complejas a sustancias más simples (Lizcano y Vergara, 2008).

www.bdigital.ula.ve

Solvente

Es una sustancia química en la que se disuelve un soluto, resultando en una disolución. Se aplica a la sustancia que puede disolver o producir una mezcla homogénea con otra. Además, es la sustancia que se encuentra en mayor cantidad (Rodríguez, 2017).

Medio de cultivo

Es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes, que proveen condiciones bioquímicas y biofísicas apropiadas para el aislamiento, desarrollo y mantenimiento de los microorganismos (Ramírez y cols., 2010).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Célula

Es la unidad más pequeña capaz de manifestar las propiedades del ser vivo. La célula sintetiza el conjunto, o casi, de sus constituyentes, utilizando elementos del medio extracelular. Crece y se multiplica. Está limitada por la membrana plasmática, que encierra un cierto número de orgánulos. Es la unidad fundamental de la vida, es decir, la vida comienza en las células. Todos los organismos vivos están formados por células, de tal manera que ningún organismo puede ser considerado un ser vivo, si no contiene al menos una célula (Angulo, Galindo, Avendaño y Pérez, 2012).

Operacionalización de las Variables

www.bdigital.ula.ve

Según Palella y Martins (2012), las variables son conceptos abstractos y de este modo no se pueden medir. Por eso, las variables se operacionalizaron con el fin de medirlas. Al respecto, es necesario transformarlas en empíricas. En tal sentido, se definen y categorizan para identificar el indicador específico que nos permitirán medirlas. A continuación, se presenta el cuadro de operacionalización de las variables (Tabla 5 y 6).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 5. Operacionalización de la variable dependiente. Actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraens*e Tul.

1. Variable	**2.Tipo de variable**	**3. Definición Conceptual ¿Qué es?**
Actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraens*e Tul.	Dependiente	Se define como la habilidad o capacidad de un antimicrobiano de inhibir el crecimiento de determinados microorganismos, como bacterias y hongos (Pedraza y Castellanos, 2009).
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	**5. Dimensiones**	**6. Indicador**
Se mide a través del método de difusión en disco (Kirby- Bauer).	**Bacterias** ✓ *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) ✓ *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) ✓ *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) ✓ *Escherichia coli* (ATCC 25922) ✓ *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) **Hongos** ✓ *Candida albicans* (ATCC 14053) ✓ *Candida krusei* (ATCC 6258)	Tamaño del halo de inhibición de crecimiento microbiano (mm).

Fuente: Araujo, Plaza y Aparicio, 2023.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 6. Operacionalización de la variable independiente. Composición química de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraens*e Tul.

1. Variable	**2.Tipo de variable**	**3. Definición Conceptual ¿Qué es?**
Composición química de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraens*e Tul	Independiente	Los extractos vegetales son mezclas complejas de metabolitos secundarios aislados por diversos métodos, los cuales son los responsables de las actividades biológicas. También, actúan como biocidas en contra de una amplia gama de microorganismos (García y cols., 2010).
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	**5. Dimensiones**	**6. Indicador**
A través de un tamizaje fitoquímico empleando pruebas químicas cualitativas preliminares.	✓ Alcaloides ✓ Saponinas ✓ Fenoles ✓ Taninos ✓ Flavonoides ✓ Cumarinas ✓ Quinonas ✓ Antraquinonas ✓ Glucósidos cardiotónicos ✓ Terpenos	✓ Color ✓ Precipitado ✓ Espuma ✓ Fluorescencia

Fuente: Araujo, Plaza y Aparicio, 2023.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Hipótesis

Investigaciones previas han demostrado que géneros pertenecientes a la familia Fabaceae se caracterizan por la presencia de numerosas sustancias bioactivas de diversa naturaleza química en corteza, hojas y raíz asociadas con amplia actividad biológica; por lo que, nos permite inferir que los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., poseen compuestos con actividad antimicrobiana.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

El tipo de investigación señala el grado de profundidad y el tipo de resultado, está en concordancia con el objetivo general. Además, existen 10 tipos de investigación, tales como: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. Entre ellos, la investigación confirmatoria tiene como propósito verificar hipótesis (Hurtado, 2012). En tal sentido, la investigación que se realizó tuvo como finalidad establecer la relación entre la composición química de los extractos obtenidos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., y la actividad antimicrobiana frente a cepas de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

Diseño de la Investigación

Hurtado en el 2012, refiere, que el diseño de investigación tiene que ver con los procedimientos específicos para recoger los datos. Esta investigación tuvo un diseño de campo, porque la muestra fue recolectada en fuentes vivas. Además, de laboratorio ya que la especie fue tratada en un ambiente creado como el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (IIFFB). También, fue transeccional porque la muestra se recolectó una sola vez. Adicionalmente, contemporáneo porque el estudio se llevó a cabo en el presente.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Finalmente, fue experimental debido a que los extractos se sometieron a determinadas condiciones para observar los efectos de la actividad antimicrobiana en cepas de referencia internacional.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

La población estuvo representada por la especie *Centrolobium paraense* Tul*.,* ubicada en los alrededores de la Ciudad de Upata, al nor-este del Estado Bolívar (7º 96´ N y 62º 31´ O), a una altura promedio de 350 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.)

www.bdigital.ula.ve

Selección del Tamaño de la Muestra

La “n” muestral en esta investigación estuvo representada por la corteza de la especie vegetal *Centrolobium paraense* Tul., que pertenece a la familia Fabaceae.

Sistema de Variables

Las variables de esta investigación guardaron relación con:

- **Variable dependiente**: Actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul.
- **Variable independiente**: Composición química de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraens*e Tul.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Instrumento de Recolección de Datos

Los instrumentos que se utilizaron para la recolección de datos de esta investigación estuvieron representados mediante el uso de tablas, esquemas y fotos, en las cuales se registraron los resultados de la composición química y actividad antimicrobiana de los extractos estudiados. También, las diversas reacciones observadas durante el tamizaje fitoquímico.

Procedimientos de la Investigación

Recolección y Preparación del Material Vegetal

La muestra de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., (Figura 16) fue recolectada y donada por el Prof. Jesús Velásquez (Laboratorio de Anatomía de la Madera. Universidad Nacional Experimental de Guayana, UNEG) en los alrededores de la Ciudad de Upata, al nor-este del Estado Bolívar (7º 96´ N y 62º 31´ O), a una altura promedio de 350 m.s.n.m. con una temperatura media anual de 33 ºC, una evapotranspiración media anual de 1127 mm y 1695 mm de precipitación media anual (Figura 17). La corteza se retiró en la base del árbol a una altura no mayor de 1 m sobre el nivel del suelo. Posteriormente se colocó en la estufa a 40 °C hasta completa sequedad obteniéndose 2500 g.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Figura 16. Especie vegetal *Centrolobium paraense* Tul. Tomado y modificado de www.botanicagarden.com

www.bdigital.ula.ve

Figura 17. Ubicación geográfica de la ciudad de Upata. Tomado y modificado de Berroterán, 2003; MARN, 2006.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Obtención de los Extractos

La obtención de los extractos fue realizada en el laboratorio “A” de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (IIFFB) bajo la asesoría de la Dra. Rosa Aparicio y el auxiliar de laboratorio Emilio Salazar.

El material vegetal seco (2500 g), fue molido utilizando un equipo especial de carpintería, luego se tomaron 200 g y se realizó un proceso de extracción mediante la técnica de reflujo (Figura 18), usando como solventes hexano, acetona y etanol en cada caso, se filtró y el solvente se evaporó hasta completa sequedad en un rotavapor, para obtener los correspondientes extractos de hexano, acetona y etanol (Figura 19). Finalmente, se llevaron a secar a la estufa a 40 °C, almacenados en frascos color ámbar para su posterior análisis (Ver esquema 2).

www.bdigital.ula.ve

Figura 18. Proceso de extracción.

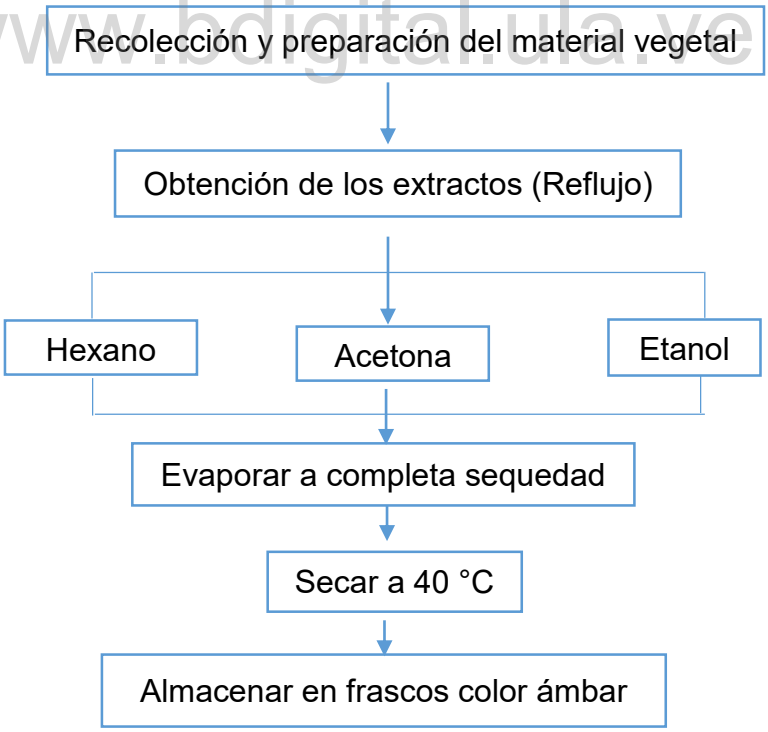
Fuente: Araujo, Plaza y Aparicio, 2023

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Extracto de Hexano Extracto de Acetona Extracto de Etanol

Figura 19. Extractos obtenidos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul.
Fuente: Araujo, Plaza y Aparicio, 2023.

www.bdigital.ula.ve



Esquema 2. Proceso para la obtención de extractos a partir del material vegetal.

Fuente: Araujo, Plaza y Aparicio, 2023.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tamizaje Fitoquímico

Para la identificación de metabolitos secundarios de manera cualitativa en los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., se llevaron a cabo una serie de pruebas químicas. Entre estas pruebas se encuentran:

Detección de alcaloides

Los extractos se disolvieron individualmente en ácido clorhídrico (10 %) diluido (HCl), se calentaron en baño de maría, y se filtraron. Luego se trataron de la siguiente manera:

- *Prueba de Wagner*: Se adicionó el reactivo de Wagner (yodo en yoduro de potasio) a los filtrados de los extractos lo que condujo a la formación de un precipitado marrón/ rojizo que confirma la presencia de alcaloides.
- *Prueba de Mayer*: Consistió en tratar los filtrados de los extractos con el reactivo de Mayer (yoduro de potasio y mercurio). La presencia de alcaloides se confirma por la formación de un precipitado de color amarillo.
- *Prueba de Dragendorff*: Al tratar los filtrados de los extractos con el reactivo de Dragendorff (solución de yoduro de bismuto y potasio) la formación de un precipitado rojo confirma la presencia de alcaloides (Osungunna, 2020).

www.bdigital.ula.ve

Detección de esteroles y triterpenos:

- *Prueba de Lieberman-Burchard*: Los extractos se disolvieron en cloroformo y se agregó 0,25 mL de anhídrido acético, luego 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado por las paredes del tubo. La formación de diferentes colores indica la presencia de esteroles o terpenos. El color

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

verde indica la presencia de esteroles y el rosa a morado indica la presencia de terpenos y triterpenos (Bulugahapitiya, 2013).

Detección de saponinas

- *Prueba de Espuma*: En cada tubo de ensayo se colocó una porción de cada extracto con 2 mL de agua y se agitó vigorosamente. La presencia de saponinas se indica por la formación de espuma persistente durante 10 minutos (Osungunna, 2020).

Detección de fenoles

- *Prueba de Cloruro Férrico*: Se añadieron a los extractos entre 3 y 4 gotas de solución de cloruro férrico ($FeCl_3$) al 10 %. La formación de un color negro azulado indica la presencia de fenoles (Osungunna, 2020).

www.bdigital.ula.ve

Detección de taninos

- *Prueba de Gelatina*: Se añadieron a los extractos una solución de gelatina al 1 %. La presencia de taninos se confirma por la formación de un precipitado blanco (Osungunna, 2020).

Detección de flavonoides:

- *Prueba de Shinoda*: Implicó la disolución de aproximadamente 1 g del extracto en 5 mL de etanol (98 %), seguido de la adición de un pequeño trozo de lámina metálica de magnesio y una adición gota a gota de ácido clorhídrico concentrado. Dicho proceso se realizó de la misma manera para los diferentes extractos. La formación de un color rojo intenso, magenta, fucsia o amarillo indica la presencia de flavonoides (Osungunna, 2020).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

- *Prueba de Reactivo Alcalino NaOH 10 % (confirmatoria)*: Una pequeña porción de los extractos fueron tratados con unas gotas de solución diluida de hidróxido de sodio (NaOH 10 %). La formación de un color amarillo intenso a rojo, confirma la presencia de flavonoides (Bulugahapitiya, 2013).

Detección de quinonas y antraquinonas:

- *Prueba de Ácido Sulfúrico*: En una cápsula de porcelana se colocó una pequeña porción de cada extracto y se añadió 1 gota de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado a cada porción bajo la campana de extracción. La observación de una coloración rojo purpura es significativa de quinonas (Rodríguez, Hernández y Méndez 2020).
- *Prueba de Hidróxido de Amonio*: En un tubo de ensayo se colocaron pequeñas porciones de los extractos con dos gotas del hidróxido de amonio (NH_4OH). La presencia de un color rojo es indicativa de antraquinonas (Rodríguez, Hernández y Méndez 2020).

www.bdigital.ula.ve

Detección de glucósidos cardiotónicos:

- *Prueba de Keller-Kilani*: Se colocó en un tubo 0,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado; en otro tubo se colocó una porción del extracto con 2,5 mL de agua, y se le adicionó 1 mL de ácido acético glacial y una gota de tricloruro férrico, se mezcló y se adicionó al tubo con ácido sulfúrico previamente preparado. Dicho proceso se realizó de la misma manera para los diferentes extractos. La formación de un anillo marrón en la interfase indica la presencia de glucósidos cardiotónicos (García, Cruz, Alarcón, Nieto y Gallegos, 2019).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Detección de cumarinas:

- *Prueba de Fluorescencia (NH_4OH concentrado)*: Se colocó alrededor de 1 g del extracto en un tubo de ensayo y se le adicionó 0,5 mL de etanol y 2 gotas de hidróxido de amonio (NH_4OH) concentrado. Dicho proceso se realizó de la misma manera para los diferentes extractos. La fluorescencia azul-violeta intensa bajo la luz ultravioleta indica la presencia de cumarinas (Rodríguez, Hernández y Méndez 2020; Osungunna, 2020).

Detección de lactonas sesquiterpénicas:

- *Prueba de Hidróxido de Sodio*: Se disolvió una pequeña porción de cada extracto con hidróxido de sodio al 10 %. La presencia de una coloración amarilla que desaparece al acidular con 1 gota de HCl se considera positiva para este metabolito (Espinosa, Treviño, Garza, Verde, Rivas y Morales, 2015).

www.bdigital.uia.ve

Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza de Centrolobium paraense* Tul*., por el método de difusión en disco (Kirby- Bauer)

Preparación de las muestras:

Los extractos obtenidos (acetona y etanol) se llevaron a una concentración de 10 mg/mL. El solvente utilizado fue dimetilsulfóxido (DMSO).

Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos:

La investigación se realizó por el método cuali-cuantitativo de difusión en agar con discos descrita por Ramírez y Marín (2009) frente cepas de referencia internacional (Tabla 7). En los laboratorios de Actinomicetos “Dr. José A.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Serrano R.” y de Micología “Dr Corrado Capretti” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo la asesoría de las Profesoras Yndra Cordero y Clara Díaz.

Tabla 7. Cepas de referencia internacional

Bacterianas	
Gram positivas	**Gram negativas**
Staphylococcus aureus ATCC 25923	*Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357
Enterococcus faecalis ATCC 29212	*Escherichia coli* ATCC 25922
	Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
Fúngicas	
Candida albicans ATCC 14053	*Candida krusei* ATCC 6258

Fuente: Araujo, Plaza y Aparicio, 2023

www.bdigital.ula.ve

Preparación de los discos:

Los discos de papel de filtro de 2 mm de grosor por 6 mm de diámetro se organizaron en placas de Petri y se esterilizaron bajo luz ultravioleta (LUV), durante 12 horas para el ensayo antibacteriano y 90 minutos previos para el ensayo antifúngico. Posteriormente se impregnaron con 10 µL de los extractos para el ensayo antibacteriano y 20 µL de los extractos para el ensayo antifúngico. Se incubaron los discos a 4 °C previamente a la inoculación.

Preparación de los inóculos:

Los inóculos se prepararon a partir de un cultivo fresco de 24 h, luego en un tubo con solución salina, las cepas de referencia internacional se llevaron a una turbidez correspondiente al del patrón de McFarland Nº 0,5 ($1,5 \times 10^{6-8}$ UFC/mL, UFC: unidades formadoras de colonias) para las cepas bacterianas y en el caso de las levaduras al patrón de McFarland Nº 1 (3×10^{8} UFC/mL) (Narváez, Gómez y Martínez, 2008).

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Actividad Antibacteriana

Preparación de las placas de Petri:

Se depositaron aproximadamente 20 mL de agar Müeller-Hinton (HIMEDIA®) en placas de Petri (CLSI, 2020). Posteriormente las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente, luego se realizó el control de esterilidad y se conservaron a 4 ºC hasta su uso.

Inoculación:

Una vez preparado el inoculo de cada cepa bacteriana de referencia, se realizó un hisopado en forma de colchón sobre el agar Müeller-Hinton (HIMEDIA®). Luego se colocaron en la superficie del agar inoculado, los discos de papel de filtro previamente impregnados con el extracto, además, se ubicaron los discos de los antibióticos de referencia (Piperacilina® 100 μg para las cepas Gram negativas, Ampicilina® 10 μg y Eritromicina® 15 μg para las Gram positivas) como controles positivos y como control negativo DMSO.

www.bdigital.ula.ve

Determinación de la actividad antibacteriana:

El agar Müeller-Hinton (HIMEDIA®) previamente inoculado se llevó a incubación en una estufa por 24 horas a 37 °C en presencia de oxígeno. Más adelante, se midieron los halos de inhibición alrededor de los discos, expresando los datos en milímetros (mm).

Actividad Antifúngica

Preparación de las placas de Petri e inoculación:

Se agregaron 20 mL de agar Müeller-Hinton modificado (HIMEDIA®) suplementado con 2 % p/v de glucosa y azul de metileno (0,05 µg/mL) y se les

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

añadió el inoculo preparado anteriormente de cada cepa fúngica de referencia, se mezcló de forma envolvente y se dejó solidificar 15 min a temperatura ambiente, luego se le colocaron en la superficie del agar los discos impregnados con el extracto (20 µL) y los antifúngicos de referencia como controles positivos (Fluconazol® 25 µg para *Candida albicans* ATCC 14053 y Voriconazol® 25 µg para *Candida krusei* ATCC 6258) y DMSO, Acetona y Etanol como controles negativos (Martín, Péman y Rubio, 2001).

Determinación de la actividad antifúngica:

El agar Müeller-Hinton (HIMEDIA®) modificado previamente inoculado se incubo en una estufa por 24 - 48 horas a 37 °C en presencia de oxígeno. Posteriormente, se procedió a la medición de los halos de inhibición alrededor de los discos, expresando los datos en mm.

www.bdigital.ula.ve

Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI):

Se realizó en aquellas cepas fúngicas cuyo crecimiento fue inhibido en el ensayo anterior, utilizando el mismo método de difusión en agar con discos. Para ello se hicieron distintas diluciones de los extractos a fin de obtener diferentes concentraciones, luego se impregnaron los discos con cada dilución y se colocaron en la superficie del agar Müeller-Hinton (HIMEDIA®) modificado previamente inoculado, se incubo en una estufa por 24 - 48 horas a 37 °C en presencia de oxígeno. Posteriormente, se procedió a la medición de los halos de inhibición alrededor de los discos, expresando los datos en mg/mL.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Diseño de Análisis

Los datos que se recolectaron fueron analizados a través del enfoque cualicuantitativo. Tal como lo refieren Palella y Martins (2012), el dato fue medido numéricamente con el fin de ser analizado mediante operaciones matemáticas. Las variables medidas tuvieron como punto de partida su naturaleza cualitativa o cuantitativa. En relación con eso, las variables cuantitativas pueden ser discretas y tienen una escala de medida de razón. En cambio, las variables cualitativas tienen una escala de medida nominal.

El universo de esta investigación estuvo representado por las plantas. A su vez, la población de estudio fue la especie *Centrolobium paraense* Tul*.,* la muestra fue representada por la corteza de la especie a estudiar.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Los extractos obtenidos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., con los solventes de distinta polaridad (hexano, acetona, etanol) mediante el método de reflujo presentaron las siguientes características físicas (Tabla 8).

Tabla 8. Características físicas de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul.

CARACTERÍSTICAS	Extractos de la corteza		
	Hexano	Acetona	Etanol
Aspecto	Sólido	Polvo suelto	Sirope
Color	Beige	Rojo intenso	Rojo intenso
Olor	Característico	Característico	Característico
Peso del material seco	200 g	200 g	200 g
Peso del extracto	1,21 g	9,49 g	10,45 g
Rendimiento	0,61 %	4,75 %	5,23 %

Fuente: Araujo, Plaza y Aparicio, 2023.

www.bdigital.ula.ve

Tamizaje fitoquímico de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul.

El tamizaje fitoquímico de los extractos obtenidos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., se realizó cualitativamente mediante reacciones y análisis químicos bien descritos. Los mismos se colocaron en contacto con

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

diversos reactivos químicos y se observaron las reacciones de coloración, precipitación, fluorescencia y formación de espuma que determinaron la presencia de ciertos metabolitos secundarios.

Los resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos (hexano, acetona y etanol) de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., se muestran en la tabla 9 y figura 20.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 9. Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul.

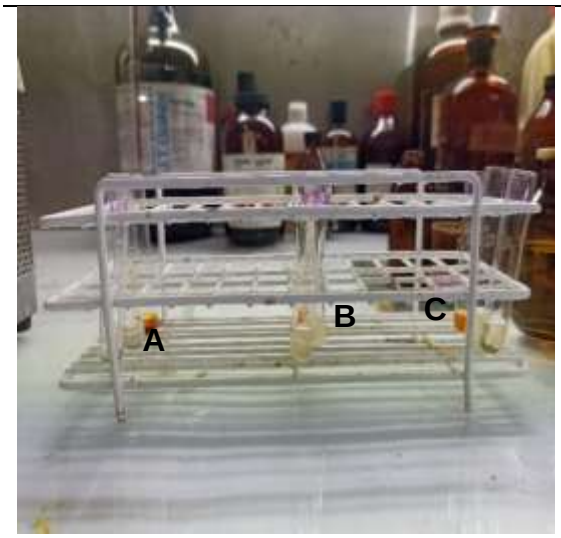
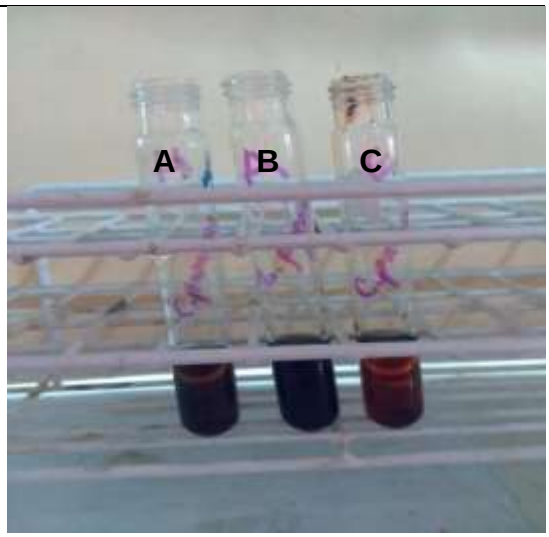
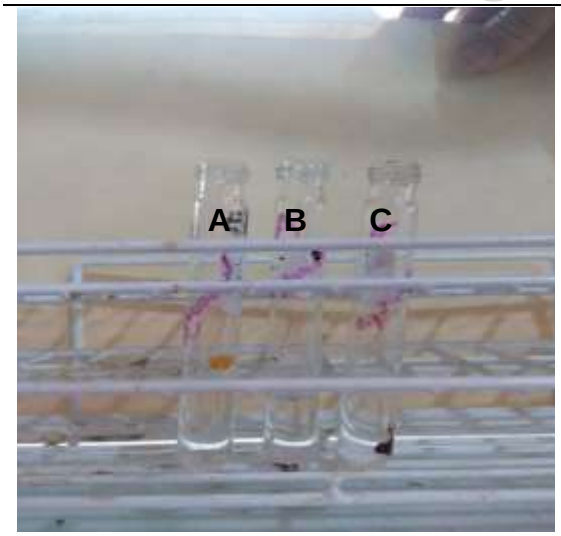
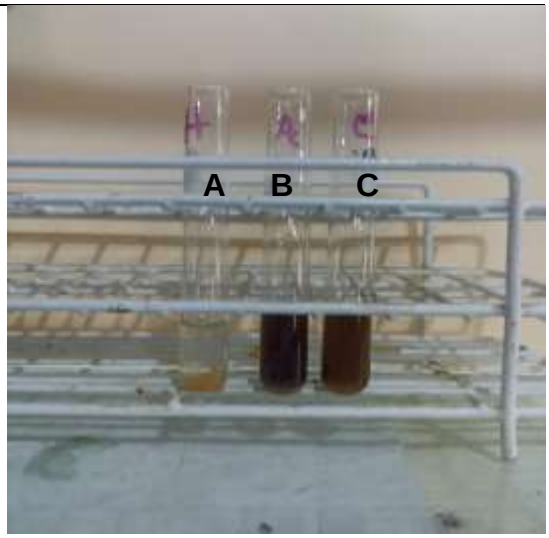
Metabolito	Prueba	Indicador	Extractos de la corteza		
			Hexano	Acetona	Etanol
Alcaloides	Wagner	Precipitado	-	-	+
	Mayer	Precipitado	-	-	+
	Dragendorff	Precipitado	-	+	++
Esteroles y triterpenos	Reacción de Lieberman- Burchard	Color verde	+	-	-
		Color Rojo	+	+++	+++
Saponinas	Reacción de Espuma	Espuma	-	-	-
Fenoles	Reacción con Cloruro férrico 10 %	Color Negro azulado	-	+++	+++
Taninos	Reacción de Gelatina 1 %	Precipitado	-	-	-
Flavonoides	Reacción de Shinoda	Color Rojo	-	+++	+
	Reactivo alcalino NaOH 10% (Confirmatoria)	Color Rojo intenso	-	+++	+++
Quinonas y/o	Reacción con Ácido Sulfúrico	Color Rojo purpura	+	+++	+++
Antraquinonas	Reacción con Hidróxido de amonio	Color Rojo	-	+	+
Glucósidos cardiotónicos	Reacción de Keller-Kilani	Anillo Marrón	-	-	-
Cumarinas	Reacción de Fluorescencia NH_4OH[ ]	Fluorescencia azul-violeta	-	-	-
Lactonas sesquiterpénicas	Reacción con Hidróxido de sodio	Coloración amarilla que desaparece al acidular	-	+++	+++

+++ Muy abundante; ++ Abundante; + Presente; - Ausente

Fuente: Araujo, Plaza y Aparicio, 2023.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Alcaloides (Wagner, Mayer, Dragendorff)	**Esteroles y triterpenos** (Reacción de Lieberman-Burchard)
	
Saponinas (Reacción de Espuma)	**Fenoles** (Reacción con Cloruro Férrico 10 %)
	

A: Extracto de Hexano; **B**: Extracto de Acetona; **C**: Extracto de Etanol.

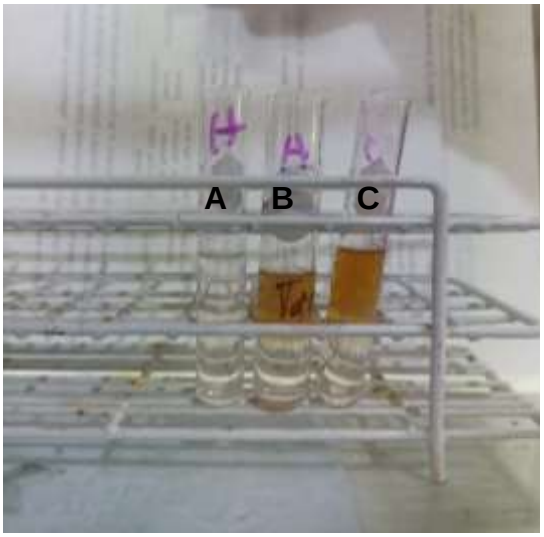
Figura 20. Tamizaje fitoquímico de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul.

Fuente: Araujo, Plaza y Aparicio, 2023

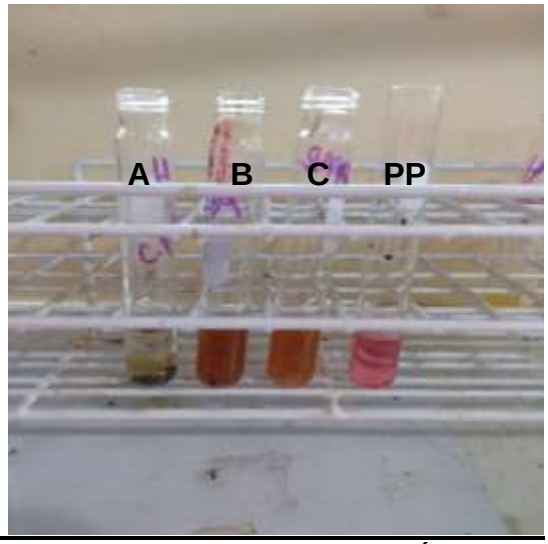
www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

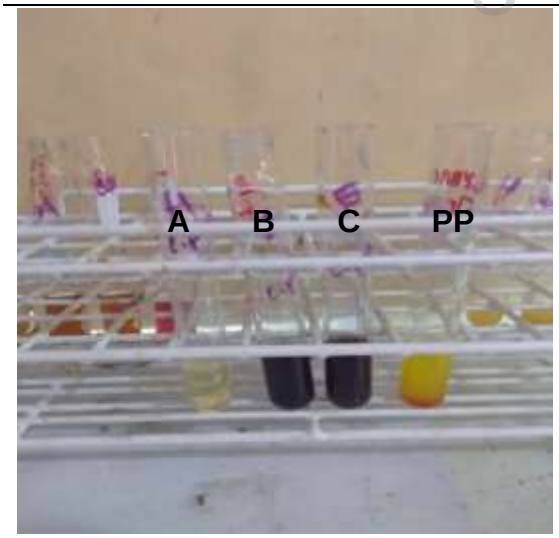
Taninos (Reacción de Gelatina 1%)



Flavonoides (Reacción de Shinoda)



Flavonoides (Prueba de Reactivo Alcalino NaOH 10 %) *Confirmatoria*



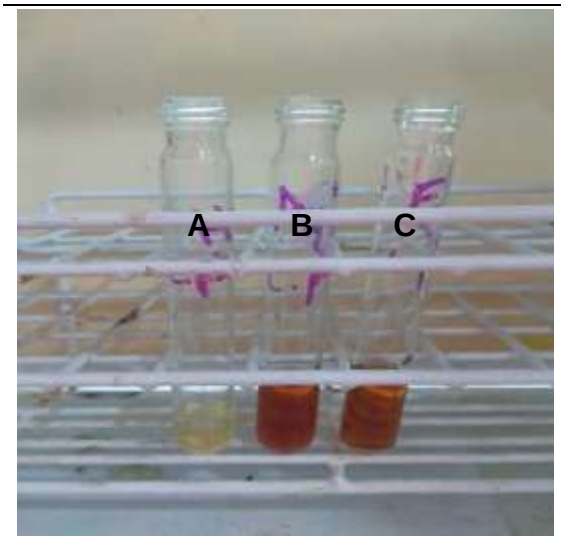
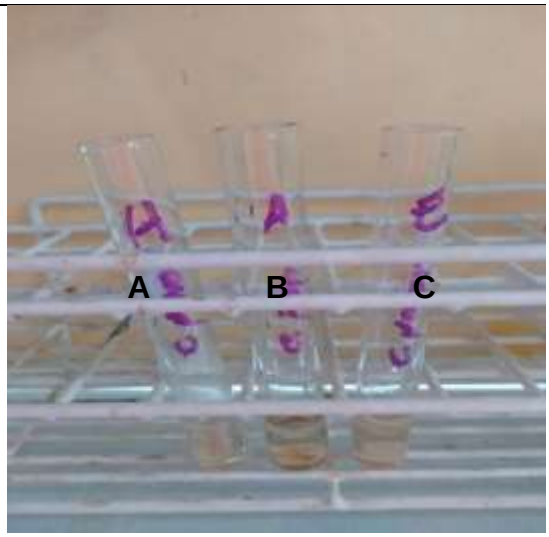
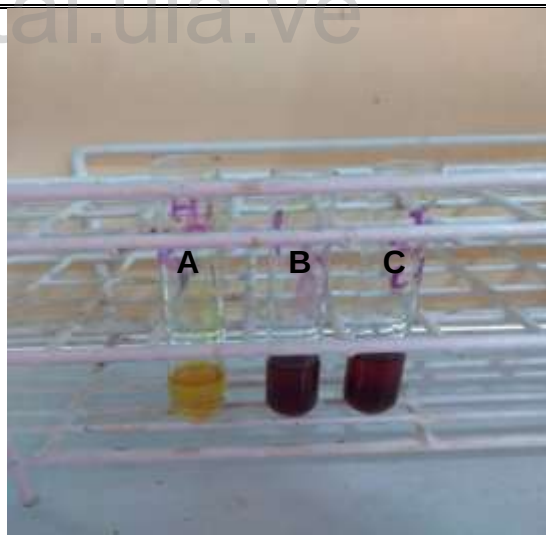
Quinonas (Reacción con Ácido Sulfúrico)

www.bdigital.ula.ve

A: Extracto de Hexano; **B**: Extracto de Acetona; **C**: Extracto de Etanol; **PP**: Patrón positivo.

Figura 20. Tamizaje fitoquímico de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul. (Continuación).
Fuente: Araujo, Plaza y Aparicio, 2023

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Antraquinonas (Reacción con Hidróxido de Amonio)	**Glucósidos cardiotónicos** (Reacción de Keller-Kilani)
	
Cumarinas (Reacción de Fluorescencia $NH_4OH_{[]}$)	**Lactonas sesquiterpénicas** (Reacción con Hidróxido de Sodio)
	

A: Extracto de Hexano; **B**: Extracto de Acetona; **C**: Extracto de Etanol; **PP**: Patrón positivo.

Figura 20. Tamizaje fitoquímico de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul. (Continuación).
Fuente: Araujo, Plaza y Aparicio, 2023

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul.

La determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos (acetona y etanol) de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., se llevó a cabo a través del método de difusión en agar con discos (Kirby-Bauer) descrita por Ramírez y Marín en el 2009 frente cepas de referencia internacional utilizando agar Müeller-Hinton (HIMEDIA®) y Müeller-Hinton modificado (HIMEDIA®) para la actividad antibacteriana y antifúngica respectivamente siguiendo los procedimientos descritos previamente. Es importante destacar que al extracto de hexano no se le evaluó la actividad antimicrobiana debido a su alto contenido de compuestos apolares lo que dificulta su solubilización en dimetilsulfóxido (DMSO). Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 10 y figura 21.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Tabla 10. Resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., frente a cepas de referencia internacional

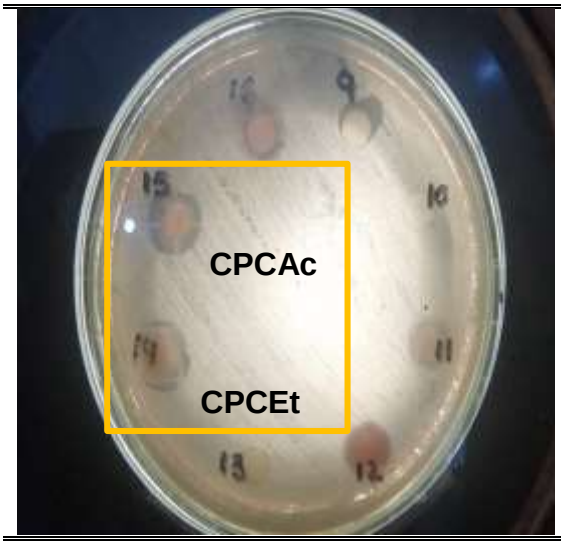
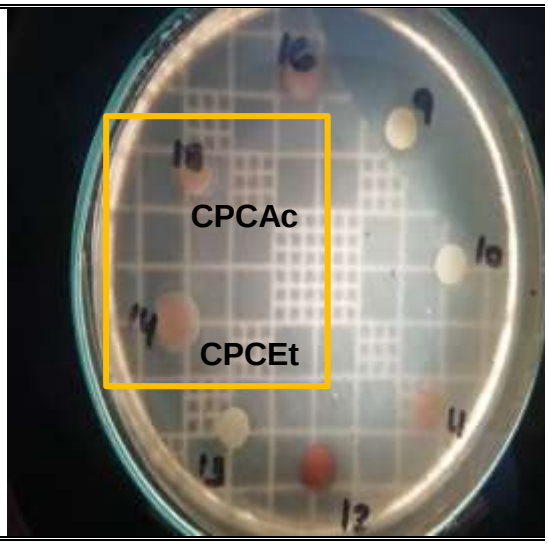
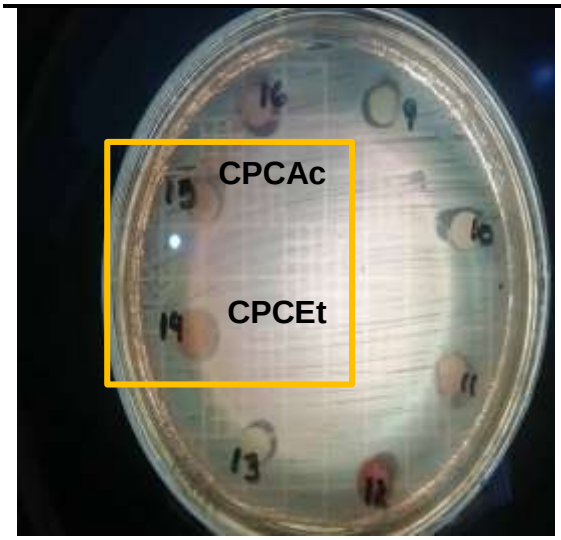
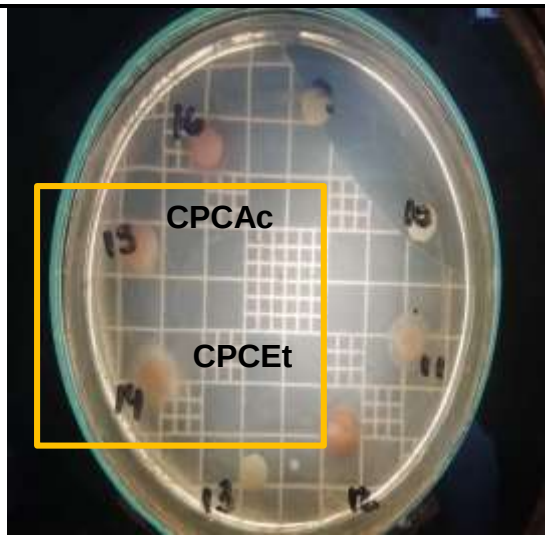
Microorganismos	Halo de inhibición (mm*)										
	Extractos (10 mg/mL)		Antibióticos			Antifúngicos		Solventes			
	CPCAc	CPCEt	PIP	AMP	ERI	FLO	VOR	DMSO	Ac	Et	CMI (mg/mL)
Staphylococcus aureus ATCC 25923	11*	12*			26*			-			ND
Enterococcus faecalis ATCC 29212	-	-		17*				-			ND
Klebsiella pneumoniae ATCC 23357	8*	9*	18*					-			ND
Escherichia coli ATCC 25922	-	-	21*					-			ND
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	7*	7*	32*					-			ND
Candida albicans ATCC 14053	-	8*				50*		-	-	-	9
Candida krusei ATCC 6258	-	-					20*	-	-	-	ND

Leyenda: **CPCAc**: *Centrolobium paraense* Tul. corteza acetona. **CPCEt**: *Centrolobium paraense* Tul. corteza etanol. **PIP**: Piperacilina® 100 μg; **AMP**: Ampicilina® 10 μg; **ERI**: Eritromicina® 15 μg; **FLO**: Fluconazol® 25 μg; **VOR**: Voriconazol® 25 μg; **DMSO**: Dimetilsulfóxido; **Ac**: Acetona; **Et**: Etanol; **CMI**: Concentración mínima inhibitoria; **mm***: Milímetros; **ND**: No determinado.

Fuente: Araujo, Plaza y Aparicio, 2023.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Cepas Bacterianas	
Gram positivas	
Staphylococcus aureus ATCC 25923	*Enterococcus faecalis* ATCC 29212
	
Gram negativas	
Klebsiella pneumoniae ATCC 23357	*Escherichia coli* ATCC 25922
	

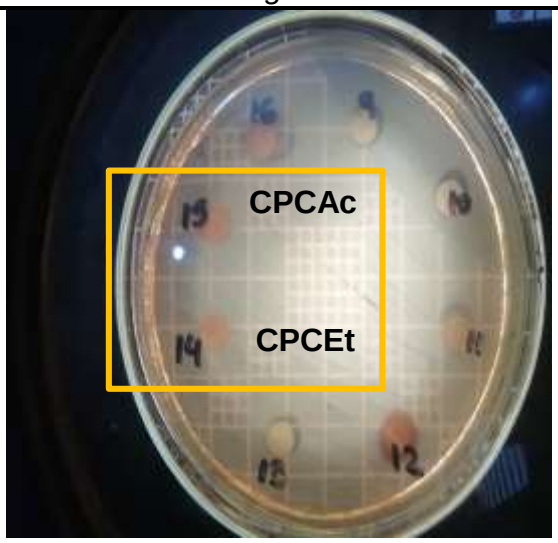
CPCAc: *Centrolobium paraense* Tul. corteza acetona; **CPCEt**: *Centrolobium paraense* Tul. corteza etanol

Figura 21. Actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., frente a cepas de referencia internacional.
Fuente: Araujo, Plaza y Aparicio, 2023

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

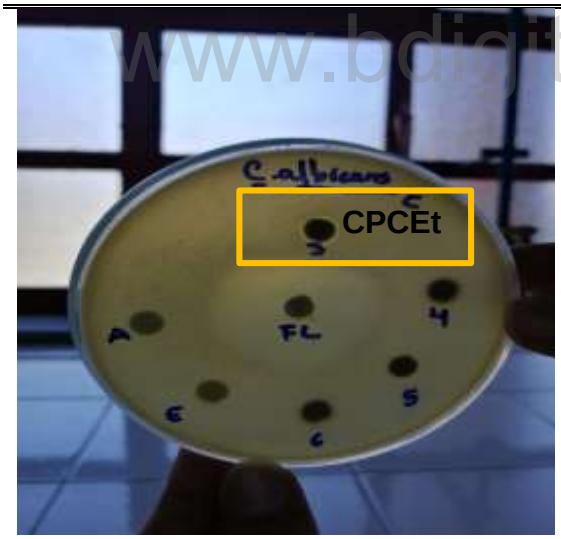
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

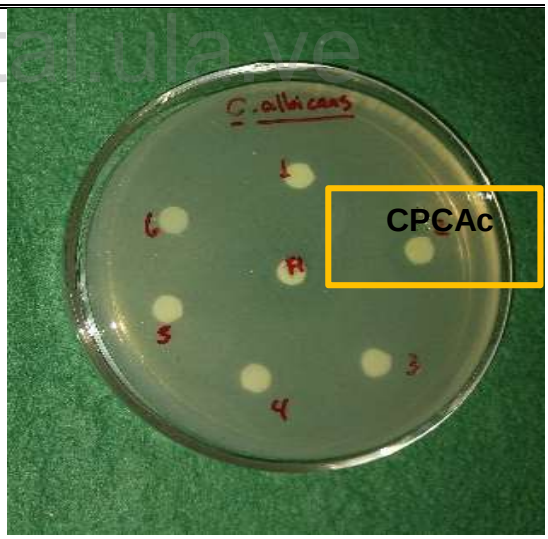


Cepas fúngicas

Candida albicans
ATCC 14053

www.bdigital.ula.ve

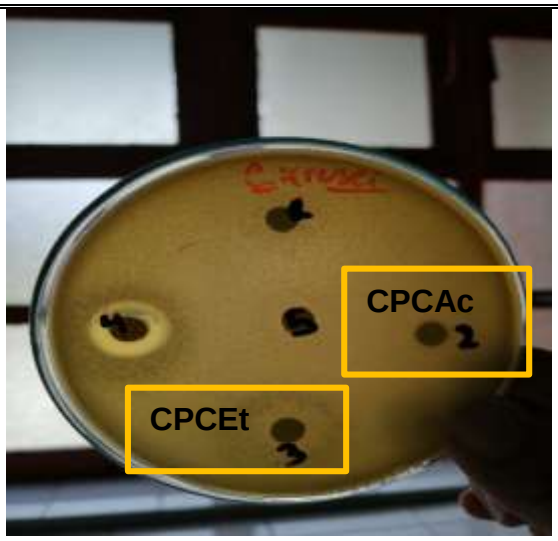




CPCAc: *Centrolobium paraense* Tul. corteza acetona; **CPCEt**: *Centrolobium paraense* Tul. corteza etanol

Figura 21. Actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., frente a cepas de referencia internacional (Continuación).
Fuente: Araujo, Plaza y Aparicio, 2023.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Candida krusei ATCC 6258

CPCAc: *Centrolobium paraense* Tul. corteza acetona; **CPCEt**: *Centrolobium paraense* Tul. corteza etanol

www.bdigital.ula.ve

Figura 21. Actividad antimicrobiana de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., frente a cepas de referencia internacional (Continuación).
Fuente: Araujo, Plaza y Aparicio, 2023.

Discusiones

Son pocas las investigaciones realizadas sobre la especie *Centrolobium paraense* Tul., sin embargo, en la familia Fabaceae se ha reportado la presencia de compuestos fenólicos, glucósidos cianogénicos, terpenoides y alcaloides (Wink, 2013) así como una amplia actividad biológica, por lo que los resultados se comparan con géneros pertenecientes a dicha familia.

Mediante las pruebas de tamizaje fitoquímico realizadas en la presente investigación se comprobó la presencia de alcaloides, triterpernos, fenoles, flavonoides, quinonas, antraquinonas y lactonas sesquiterpenicas en los

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

extractos de acetona y etanol mientras que en el extracto de hexano solo se encontró la presencia de esteroles, triterpenos y quinonas (Tabla 9). Estos resultados son comparados con los realizados por Mora y cols., en el 2021 donde en este trabajo obtuvieron por maceración extractos con solventes de distinta polaridad (hexano, acetona y metanol) de semillas de *L. leucocephala* y *L. esculenta* cuya composición química tiene similitud en cuanto a la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, triterpenos y esteroles y a la ausencia de cumarinas y taninos, sin embargo, mostraron mayor diversidad de metabolitos secundarios como glucósidos y saponinas. En ese mismo año Yusuf, Abdullahi y Abdulaziz por percolación obtuvieron un extracto de metanol de las hojas de *Albizia ferruginea* en la que su composición química concuerda con la de los extractos de *Centrolobium paraense* Tul., por la presencia de alcaloides, flavonoides y triterpenos y en la ausencia de glucósidos cardiacos, además, reportaron la presencia de saponinas y taninos los cuales no están presentes en los extractos estudiados.

www.bdigital.ula.ve

Por otro lado, De la Cruz y Ulloa (2020), mediante el método de extracción asistida por ultrasonido prepararon una solución hidroalcohólica (etanol absoluto en agua destilada) de las flores de *Dalea coerulea* donde se demostró la presencia de abundantes fenoles y flavonoides totales. No obstante, no investigaron otros metabolitos secundarios. Otro estudio propuesto por Montes de Oca y cols., en el 2017, logro determinar la composición química de los extractos de hexano, acetona y metanol de flores y tallos de *Dalea carthagenensis* obtenidos por maceración, cuyos resultados al ser correlacionados con los de esta investigación muestran concordancia tanto en la presencia de alcaloides y fenoles como en la ausencia de glucósidos y cumarinas, en cambio, en los extractos de *Dalea carthagenensis* reportaron terpenos, saponinas y taninos difiriendo así en la composición química de la especie investigada ya que en esta no están presentes dichos fitoquimicos; pero, si muestran flavonoides, quinonas, antraquinonas y lactonas

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

sesquiterpénicas, sin embargo, estos últimos no fueron investigados por Montes de Oca en el 2017, adicionalmente, la especie estudiada muestra esteroles y triterpenos mientras que en *Dalea carthagenensis* están ausentes.

Las diferencias mencionadas anteriormente se deben a que los metabolitos secundarios se distribuyen de manera heterogénea en las distintas partes de las plantas, ya que son producidos y almacenados en células especializadas y distintos compartimentos celulares, que incluyen vacuolas, tricomas y ductos de resina (Huber y cols., 2015).

Por otro lado, es común el empleo popular de partes vegetales con la finalidad de obtener diversos efectos terapéuticos. Varios estudios han validado científicamente la eficacia de numerosos usos de la medicina tradicional utilizada por la gente. Entre las variadas aplicaciones terapéuticas de los vegetales, se incluyen aquellas con finalidad antimicrobiana (Barreto, 1997).

www.bdigital.ula.ve

En cuanto a la actividad antimicrobiana, los extractos de acetona y etanol de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., fueron evaluados para medir su actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar con discos impregnados con 10 µL y 20 µL de cada extracto para el ensayo antibacteriano y antifúngico respectivamente, con una concentración de 10 mg/mL, logrando la inhibición del crecimiento de *S. aureus* (11 mm con acetona y 12 mm con etanol), *K. pneumoniae* (8 mm con acetona y 9 mm con etanol), *P. aeruginosa* (7 mm para ambos extractos) y *C. albicans* (8 mm con etanol) con una concentración mínima inhibitoria de 9 mg/mL pero no mostraron actividad frente a *E. coli*, *E. faecalis* y *C. krusei* así como el extracto de acetona no inhibió el crecimiento de *C. albicans*, estos resultados son comparables con los del trabajo de Mora y cols., en el 2021 ya que reportaron que los extractos obtenidos (hexano, acetona y metanol) de *L. leucocephala* y *L. esculenta* mostraron actividad antimicrobiana frente a cepas de referencia como *S. aureus* y *E. coli* siendo el extracto de metanol el que logro mayor actividad

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

obteniendo los halos de inhibición más grandes (9,33 y 6,67 mm, respectivamente), al igual que en esta investigación no hubo actividad frente a *C. albicans*, sin embargo, frente a *C. glabrata* con el extracto de metanol se logró una inhibición de 7,33 mm y una CMI de 4 mg/mL para *L. leucocephala* y 6 mg/mL para *L. esculenta* estos emplearon el método de difusión en agar con discos de 5 mm de diámetro impregnados con 2 mg de extracto cada disco y para la CMI microdilución en caldo.

Entre tanto, Yusuf y cols., en el 2021 evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto de metanol de *A. ferruginea* mediante el método de difusión en agar en pocillos con 100 µL de la solución del extracto a una concentración de 30 mg/mL se logró la inhibición del crecimiento de distintos microorganismos entre ellos *E. faecalis* y *K. pneumoniae* formando halos de 28 mm y 25 mm respectivamente mientras que no fue activo frente a *P. aeruginosa.*

Por su parte, Pareja y cols., en el 2020 utilizando el método de difusión en agar con pocillos de 6 mm de diámetro y 50 µL del extracto de etanol de *C. spinosa* lograron la inhibición del crecimiento de bacterias de la biopelícula bucal donde destacan *S. aureus* (37,7 mm) y *E. faecalis* (18 mm), en este estudio se aplicó la concentración total del extracto. En ese mismo año, De la Cruz y Ulloa demostraron que el extracto hidroalcohólico de *D. coerulea* mediante el método de microdilucion en pocillo tiene actividad antimicrobiana frente a patógenos causantes de enfermedades del sistema respiratorio entre ellas *S. aureus* subsp. *aureus*, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* y *P. aeruginosa*.

Montes de Oca y cols., en el 2017 utilizando el mismo método de difusión en agar con discos empleado en esta investigación a excepción de que usaron discos de 5 mm de diámetro impregnados con 2 mg de extracto (hexano, acetona y metanol de flores y tallos de *D. carthagenensis*) por disco, reportaron actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas y Gram negativas, siendo los extractos de hexano y acetona de las flores quienes mostraron los

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

mayores halos de inhibición para *S. aureus* (14 mm con hexano y 11,66 mm con acetona) y *P. aeruginosa* (10,66 mm con hexano y 13 mm con acetona). Por otra parte, en la evaluación de la actividad antifúngica se evidenció que el extracto de hexano de las flores fue el más activo al inhibir el crecimiento de las cepas fúngicas evaluadas: *C. albicans* (13,25 mm), *C. tropicalis* (7,89 mm) ambas con una CMI de 0,125 mg/mL y *C. glabrata* (9,4 mm) con CMI de 0,250 mg/mL. Al comparar estos resultados se observa que el extracto con mayor actividad es el de hexano mientras que en nuestra investigación no se logró evaluar dicho extracto ya que este no se pudo solubilizar en el solvente utilizado siendo entonces el extracto de etanol el que mostró mayor actividad contrario a lo reportado por Montes de Oca y cols.

Los resultados sugieren que la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., si posee actividad antimicrobiana siendo los metabolitos secundarios presentes en los extractos los responsables de dicho efecto biológico lo que concuerda con lo expresado por Gómez y cols., en el 2015 donde muestran las distintas actividades biológicas de diferentes géneros y especies vegetales pertenecientes a la familia Fabaceae.

www.bdigital.ula.ve

La actividad antimicrobiana que presentaron los extractos se presume que es debido a la presencia de diversos metabolitos secundarios siendo estos compuestos biológicamente activos, puesto que provocan una alteración considerable en las diversas funciones biológicas de la célula que conducen a un deterioro de los procesos celulares vitales necesarios para la supervivencia del microorganismo, entre ellos: cambios en la morfología celular, alteración de la membrana asociada con la fuga de iones, reducción del potencial de membrana, inhibición de la actividad ATP-asa, de las reacciones enzimáticas, de la biosíntesis de toxinas, de la síntesis de ácidos nucleicos y la formación de biopelículas, así como también la supresión de factores de virulencia, alteración de la composición del perfil lipídico, disfunción mitocondrial y

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

deterioro en la utilización de la fuente de carbono (Prakash, Kumar, Pratap y Songachan, 2020; Kuzhuppillymyal, Martínez y Cruz, 2023).

Por otro lado, al comparar nuestros resultados con los de otros investigadores se observaron algunas diferencias que pueden estar relacionadas con el método empleado para determinar la actividad antimicrobiana. A este respecto, la técnica con sensidiscos presenta varias desventajas; una de ellas es la composición del papel filtro, el cual se compone de celulosa que presentan muchos grupos hidroxilos libres, haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica, interviniendo directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión de estos en el agar. Esto puede explicar en parte la más alta sensibilidad detectada cuando el método que se utiliza es directamente en pozo (Ramírez y Marín, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Los extractos obtenidos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., mediante el método de reflujo mostraron un rendimiento de 0,61 %, 4,75 % y 5,23 % para hexano, acetona y etanol, respectivamente.

En el tamizaje fitoquímico de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., se determinó la presencia de alcaloides, triterpenos, fenoles, flavonoides, quinonas, antraquinonas y lactonas sesquiterpénicas en los extractos de acetona y etanol mientras que en el extracto de hexano solo se observó la presencia de esteroles, triterpenos y quinonas

www.bdigital.ula.ve

Los extractos de acetona y etanol de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul., a una concentración de 10 mg/mL mostraron actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* (11 mm y 12 mm), *K. pneumoniae* (8 mm y 9 mm), *P. aeruginosa* (7 mm para ambos) y *C. albicans* (8 mm con Etanol) con una CMI de 9 mg/mL y no mostraron actividad frente a *E. coli*, *E. faecalis* y *C. krusei*.

La corteza de *Centrolobium paraense* Tul., contiene una variedad de metabolitos secundarios de interés, además de una amplia actividad antimicrobiana, por lo que se considera una especie vegetal de interés en la medicina tradicional.

La relevancia de esta investigación se debe a que no existen trabajos previos sobre la composición química y actividad antimicrobiana de extractos de la corteza *Centrolobium paraense* Tul., siendo este el primer reporte que puede servir de base para futuras investigaciones sobre otras actividades biológicas.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Recomendaciones

- Realizar un tamizaje fitoquímico más profundo con otros solventes para la identificación de otros metabolitos secundarios que puedan estar presentes, así como su cuantificación.
- Estudiar la actividad antimicrobiana de cada uno de los compuestos presentes en los extractos para determinar el responsable de dicha actividad, así como definir la existencia de sinergismo entre los componentes presentes o no.
- Evaluar otras actividades biológicas, como antiinflamatoria, citotóxica, antioxidante, anticancerígena y neuroprotectora de los extractos de la corteza de *Centrolobium paraense* Tul.
- Ampliar la investigación aquí descrita efectuando el estudio en hojas y frutos de *Centrolobium paraense* Tul., en busca de otros metabolitos secundarios útiles.
- Aplicar diferentes concentraciones de los extractos sobre las cepas bacterianas de referencia internacional con el objetivo de determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos y si al aumentar la concentración se amplía el diámetro del halo de inhibición.
- Continuar el estudio de especies vegetales de las cuales no haya información bibliográfica y con ello tener un conocimiento más amplio de la misma para así incorporar estos recursos naturales en el campo de la fitoquímica, medicina y farmacología.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

Aguilar, M., León, A., y Mejía, D. (2021). Botánica Aplicada: Fabaceae. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de estudios superiores Iztacala, 1-4.

Albornoz, A. (1992). Medicina tradicional herbaria. Instituto Farmacoterápico Latino. División de Fitoterapia y Productos Naturales: Caracas, Venezuela.

Albornoz, A. (2001). Medicina tradicional herbaria. Instituto Farmacoterapico Latino. División de Fitoterapia y Productos Naturales: Caracas, Venezuela.

Alegrio, L., Braz, R., y Gottlieb, O. (1989). Diarylheptanoids and Isoflavonoids from *Centrolobium* Species. Phytochemistry, 28, 2359-2362.

Alós, J. (2014). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 33, 692-699.

Angulo, A., Galindo, A., Avendaño, R., y Pérez, C. (2012). Biología Celular. Universidad Autónoma de Sinaloa, Dirección General de Escuelas Preparatorias: México.

Aragao, A., Da Costa, A., Gottlieb, O., y Welerson, P. (1970). Diarylheptanoids of *Centrolobium* Species. Phytochemistry, 9, 1869-1875.

Araujo, C., Alegrio, L., y León, L. (1998). Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophillum*. Phytochemistry, 49, 751-754.

Arenas, R. (2014). Micología medica ilustrada. Mc Graw Hill Education: México.

Aristeguieta, L. (2003). Estudio dendrológico de la flora de Venezuela. Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales: Caracas, Venezuela.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Ávalos, A., y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca, 2, 119-145.

Avellaneda, J., y Pecho, E. (2001). Estudio de la resistencia a los antibacterianos en el Centro Médico Naval de Enero a Diciembre del 2000 (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Barreto, J. (1997). Efectos antimicrobianos del diente de león (*Taxaxacum officinale*) y el guandalay (*Jacaranda obtusifolia*) sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* causantes de enfermedades de la piel. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia.

Basualdo, J., Coto, C., y De Torres, R. (1996). Microbiología Biomédica. Atlante: Buenos Aires, Argentina.

Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. American Journal of Clinical Pathology, 45, 493-496.

www.bdigital.ula.ve

Berroterán, J. (2003). Ordenamiento Territorial de la Reserva Forestal Imataca y sus Áreas Adyacentes (Bases del Plan de Ordenamiento). Ministerio del Ambiente y de los Recursos Naturales, Dirección General de Planificación y Ordenación del Ambiente Dirección General del Recurso Forestal.

Betés, M., Duran, M., Mestres, C., y Nogués. (2008). Farmacología para fisioterapeutas. Editorial Médica Panamericana: Madrid, España

Bruneton, J. (2001). Farmacognosia. Fitoquimica. Plantas medicinales. Acribia: España.

Bulugahapitiya, V. (2013). Plants Based Natural Products Extraction, Isolation and Phytochemical screening methods. Indika Graphic: Sri Lanka.

Carvajal, L., Hata, Y., Sierra, N., y Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). Revista Colombiana Forestal, 12, 161-170.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Casas, G. (1994). Micología General. Ediciones de la Biblioteca, Universidad Central de Venezuela: Caracas.

Castro, A. (2014). Bacteriología médica basada en problemas. Manual Moderno: México.

Cervantes, E., Garcia, R., y Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio, 61, 28-40.

Cires, M. (2002). La resistencia a los antimicrobianos, un problema mundial. Revista Cubana de Medicina General Integral, 18, 35-39.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2015. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2020. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 30th ed.

Colorado, J., Galeano, E., y Martínez, A. (2007). Desarrollo de la Bioautografía Directa como Método de Referencia para evaluar la Actividad Antimicrobiana de la gentamicina contra *Escherichia coli*. Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica Universidad de Antioquia, 14, 67-71.

Cona, E. (2002). Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. Revista Chilena de Infectología, 19, 77-81.

Coy, C., Parra, J., y Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (Rutaceae). Revista Elementos, 4, 31-39

Cuellar, J., Martínez, J., Rojano, B., Gil, J., y Durango, D. (2018). Chemical composition and antioxidant and antibacterial activity of *Platymiscium gracile* Benth: A species threatened by extinction. Journal of King Saud University- Science, 32, 1-6.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

De la Cruz, M., y Ulloa, N. (2020). Evaluación de la actividad antimicrobiana y antiinflamatoria de flavonoides en las flores de *Dalea coerulea (L.f.)* Schinz & Thell (Trabajo de investigación). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.

De Sousa, Z., Silva, N., Rodrigues, S., Siyadatpanah, A., Melo, H., Seifi, Z., Kim, B., Bezerra, F., y De Queiroz, V. (2022). Phytochemistry and Biological Activities of *Amburana cearensis* (Allemão) ACSm. Molecules, 27, 1-19.

Díaz, M., Rodríguez, C., y Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, 48, 147-161.

Domingo, D., y López, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia, 16, 385-393.

www.bdigital.ula.ve

Domínguez, X. (1973). Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa: México.

Domínguez, X. (1979). Métodos de investigación fitoquímica. Editorial Limusa: México.

Espinosa, C., Treviño, J., Garza, R., Verde, M., Rivas, C., y Morales, M. (2015). Contenido de fenoles totales y actividad anti-radical de extractos metanólicos de la planta silvestre y cultivada *in vitro* de *Leucophyllum frutescens*. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 46, 52-56.

Flores, J. (2014). Determinacion de la actividad antibacteriana *in vitro* del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “arrayan” frente a *Streptococcus mutans* (Tesis de pregrado), Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Fonnegra, R., y Jiménez, S. (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Editorial Universidad de Antioquia: Colombia.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Ganapathy, G., Preethi, R., Moses, J., y Anandharamakrishnany, C. (2019). Diarylheptanoids as nutraceutical: A review. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 19, 1-14.

García, R., Cruz, F., Alarcón, F., Nieto, A., y Gallegos, M. (2019). Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos de *Thalassia testudinum* banks ex köning *et* sims de la localidad de Champotón, Campeche, México, durante el ciclo anual 2016-2017. Polibotánica, 48, 151-168.

García, C., Martínez, A., Ortega, J., y Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. Química viva, 9, 86-96.

Girón, J., y Pérez, R. (2003). Tratamiento de las infecciones por enterococo. Revista Clínica Española, 203, 482-485.

Gómez, L., Espino, C., Guerrero, E., Moran, J., López, J., Montenegro, G., Olmedo, D., y Gupta, M. (2015). Cribado de la actividad antimicrobiana de plantas panameñas de la familia Fabaceae. Revista Médica de la Universidad de Costa Rica, 8, 13-20.

www.bdigital.ula.ve

Gregorí, B. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. Revista Cubana de Farmacia, 39, 1-15.

Hernández, A., y Hermosilla, V. (2014). Efecto de la concentración de saponina en la actividad hemolítica de los extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala (Seminario de investigación de pregrado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.

Huber, M., Triebwasser, D., Reichelt, M., Heiling, S., Paetz, C., Chandran, J., Bartram, S., Schneider, B., Gershenzon, J., y Erb, M. (2015). Identification, quantification, spatiotemporal distribution and genetic variation of major latex secondary metabolites in the common dandelion (*Taraxacum officinale agg*.) Phytochemistry, 115, 89-98.

Hurtado, J. (2012). Metodología de la investigación. Guía para una comprensión holística de la ciencia. Quirón Ediciones: Colombia.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Kuzhuppillymyal, L., Martínez, A., y Cruz, F. (2023). Los metabolitos secundarios como agentes antimicrobianos. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, 6, 33-38.

Lamarque, A., Zygadlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M., y Maestri, D. (2008). Fundamentos Teórico-Prácticos de Química Orgánica. Editorial Encuentro: Córdoba, Argentina.

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 (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia.

Llamas, F., y Acedo, C. (2016). Las Leguminosas (Leguminosae o Fabaceae): una síntesis de los usos y de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la familia a lo largo del tiempo. AmbioCiencias, Revista de divulgación científica, 14, 5-18.

Lopardo, H. (2020). Antibióticos: Clasificación, estructura, mecanismos de acción y resistencia. Editorial de la Universidad Nacional de la Plata: Argentina.

López, J., y Echeverry, L. (2010). *K. pneumoniae*: ¿la nueva “superbacteria”? Patogenicidad, epidemiologia y mecanismos de resistencia. Revista Médica IATREIA, 23, 157-165.

López, K., Dzul, K., Lugo, C., Arias, L., y Zavala, J. (2016). Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en *Candida albicans*. Una revisión. Revista biomédica, 3, 145-159.

Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica Orgánica. Consejo de desarrollo científico y humanístico, Universidad Central de Venezuela: Venezuela.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

MARN. (2006). Datos climatológicos de la localidad de Upata, Estado Bolívar, Venezuela. Dirección de Hidrometeorología del Ministerio del Ambiente, Seccional Upata.

Martín, E., Péman, F., y Rubio, M. (2001). Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. Editorial Revista Iberoamericana de Micología – Asociación Española de Micología: Bilbao, España.

Martínez, L., y Calvo, J. (2010). Desarrollo de las resistencias a los antibióticos: causas, consecuencias y su importancia para la salud pública. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 28, 4-9.

Martínez, M., Ocampo, D., Galvis, J., y Valencia, A. (2011). Actividad antibacteriana y citotoxicidad *in vivo* de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 16, 313-323.

Mellado, E., Cuenca, M., y Rodríguez, J. (2002). Importancia clínica de los mecanismos de resistencia de los hongos filamentosos a los antifúngicos. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 20, 523-530.

Montes de Oca, C., Hernández, C., Orozco, J., García, A., Ávila, J., Ortiz, M., Peñalosa, I., López, G., y Serrano, R. (2017). Actividad antibacteriana y antifúngica de *Dalea carthagenensis* (Jacq). J. F. MACBR. Revista Fitotecnia Mexicana, 40, 161-168.

Mora, A., Serrano, R., Lira, R., Jiménez, M., y Hernández, T. (2021). Evaluación de la actividad antimicrobiana de semillas de *Leucaena esculenta* y *Leucaena leucocephala* recolectas en Tlayacapan, Morelos, México. Polibotánica, 52, 175-191.

Morgado, R., Gutiérrez, L., García, P., Arrioja, T., Toro, M., Gómez, L., y Velásquez, J. (2010). Variación longitudinal del peso específico en la madera de *Centrolobium paraense* Tul. (Fabaceae). Revista Forestal Venezolana, 54, 227-234.

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Murray, P., Rosenthal, K., y Pfaller, M. (2009). Microbiología Médica. Elsevier: España.

Narváez, S., Gómez, L., Martínez, M. (2008). Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aislados a partir de sedimentos del Caribe Colombiano. Boletín Invemar, 37, 61-75.

Oliveira, M., Velázquez, D., y Bermúdez, A. (2005). La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales, una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. Revista de Ciencia y Tecnología de América, 30, 453-459.

Organización Mundial de la Salud (OMS, 1979). Atención primaria de salud, incluida la medicina tradicional. Ginebra, Suiza.

Organización Mundial de la Salud (OMS, 2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014–2023. Ginebra, Suiza.

Osungunna, M. (2020). Screening of medicinal plants for antimicrobial activity: pharmacognosy and microbiological perspectives. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 9, 727-735.

Palella, S., y Martins, F. (2012). Metodología de la investigación cualitativa. FEDUPEL: Caracas, Venezuela.

Pareja, M., Pardo, K., Jurado, B., Guillen, A., Romero, A., y Meneses, L. (2020). Actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara”, Fabaceae sobre bacterias de la biopelícula bucal. Diagnóstico, 59, 5-11.

Patiño, L. (2013). Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios a partir de esponjas, corales, tunicados y briozoos del Atlántico Sur y la Antártida (Tesis Doctoral). Universidad de Bueno Aires, Argentina.

Paz, V., Mangwani, S., Martínez, A., Álvarez, D., Solano, S., y Vázquez, R. (2019). *Pseudomonas aeruginosa*: Patogenicidad y resistencia

www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

antimicrobiana en la infección urinaria. Revista Chilena de Infectología, 36, 180-189.

Pedraza, P., y Castellanos, H. (2009). Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos *in vitro* (Trabajo de investigación). Universidad Javeriana de Bogotá, Colombia.

Pérez, H. y Robles, A. (2013). Aspectos basicos de los mecanismos de resistencia bcteriana. Revista Médica MD, 4, 186,191.

Pirie, M., Klitgaard, B., y Pennington, R. (2009). Revision and Biogeography of *Centrolobium* (Leguminosae - Papilionoideae). Systematic Botany, 34, 345-359.

Prakash, B., Kumar, A., Pratap, P., y Songachan, L. (2020). Antimicrobial and antioxidant properties of phytochemicals: current status and future perspective. Functional and Preservative Properties of Phytochemicals, 1-45.

www.bdigital.uia.ve

Prashant, T., Bimlesh, K., Mandeep, K., Gurpreet, K., y Harleen, K. (2011). Phytochemical Screening and Extraction: a Review. Internationale Pharmaceutica Sciencia, 1, 98-106.

Ramírez, A., García. E., Longa, A., Sánchez, K., Nieves, M., Velasco, J., Araque, M. y Mosqueda, N. (2010). Manual práctico de bacteriología general. Universidad de los Andes: Vicerrectorado Académico, Venezuela.

Ramírez, L., y Marin, D. (2009). Metodología para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Scientia Et Technica, 15, 263-268.

Rengifo, R. (2013). Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico de propóleos. Revista Pharmaciencia, 1, 51-56.

Rivas, C., Oranday, M., y Verde, M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. OmniaScience: México.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Rodríguez, A. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. Salud Pública de México, 44, 464-475.

Rodríguez, J., Hernández, M., y Méndez, L. (2020). Manual de prácticas de Farmacognosia. Universidad Veracruzana. Facultad de Química Farmacéutica Biológica, México.

Rodríguez, R. (2017). Fundamentos de Química General: disoluciones, propiedades coligativas y gases ideales. Editorial UPSE: Ecuador.

Rodríguez, S., y Gámez, L. (2010). Clave vegetativa para la identificación de árboles de la familia Fabaceae de la ciudad de Mérida, Venezuela. Pittieria, 34, 89-111.

Salazar, F., y Jaime, M. (2011). Tamizaje Fitoquímico en las hojas frescas de laurelillo [*Cordia inermis* (Mill.) I. M. Johnst.]. Laboratorio de Control de Calidad de Medicamentos. UNAN-León. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de Managua, Nicaragua.

www.bdigital.ula.ve

Samaranayake, Y., y Samaranayake, L. (1994). *Candida krusei*: biology, epidemiology, pathogenicity and clinical manifestations of an emerging pathogen. Journal of Medical Microbiology, 41, 295-310.

Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. Revista Habanera de Ciencias Médicas, 16, 402-419.

Soria, N. (2018). Las plantas medicinales y su aplicación en la salud pública. Revista de Salud Pública del Paraguay, 8, 7-8.

Sudbery, P. (2011). Grouth of *Candida albicans* hyphae. Nature Reviews Microbiology, 9, 737-748.

Tafur, J., Torres, J., y Villegas, M. (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias gramnegativas. Asociación Colombiana de Infectología, 12, 223-233.

Tortora. G., Funke, B., y Case, C. (2007). Introducción a la Microbiologia. Editorial Médica Panamericana: Argentina.

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Velásquez, J., Rojas, L., y Encinas, O. (2019). Extractivos del duramen de especies latífoliadas como preservantes en la madera de *Pinus caribaea* Morelet. Colombia Forestal, 22, 44-54.

Vidaurre, M., Querevalú, L., De los Ríos, E., y Ruiz, S. (2007). Características farmacognosticas de las hojas de *Capparis avicennifolia*. Revista Médica Vallejiana, 4, 121-131.

Willey, J., Sherwood, L., y Woolverton, C. (2009). Microbiología de Prescott, Harley y Klein. Mc Graw Hill: Madrid, España

Wink, M. (2013). Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). South African Journal of Botany, 89, 164-175.

Yusuf, A., Abdullahi. B., y Abdulaziz, I. (2021). Cribado fitoquímico y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Albizia ferruginea* (Fabaceae). Revista Bayero de Ciencias Puras y Aplicadas, 14,189-192

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS ONLINE

Introducción al Metabolismo Secundario. Apuntes de Fisiología Vegetal. Disponible en http://fisiolvegetal.blogspot.com/2012/11/introduccion-al-metabolismo-secundario.html

La Química de las Cerezas. Disponible en https://quimicaencasa.com/la-quimica-de-las-cerezas/

Kartán, Cartan, Balaústre (*Centrolobium paraense* var. orinocense) un patrimonio natural del Estado Portuguesa. Llano extremo. Disponible en www.botanicagarden.com

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)