UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
MÉRIDA EDO. MÉRIDA

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA ASOCIADA A LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE EXTRACTOS VEGETALES DE *Centratherum punctatum* CASS (ASTERACEAE) EN CEPAS DE REFERENCIA

www.bdigital.ula.ve

Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de Licenciada en Bioanálisis

Autora: Leybeth del V. Peralta M.
Tutora: M. Sc. Silvana B. Villarreal R.

JUNIO, 2023

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

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación está dedicado principalmente:

A Dios, por darme la determinación para cumplir mis objetivos, resiliencia necesaria para culminar esta meta tan importante en mi vida, por cuidarme y bendecirme todos los días.

A mi madre Leyda, por ser la fuente de mi inspiración en todo lo que emprendo. Me faltara vida para agradecerte todo lo que has hecho por mí, eres la dueña de este triunfo, solo me queda decirte ¡lo logramos! mami. Te amo.

A mi padre Juan, porque me enseñaste el valor de la verdad, justicia, honestidad y la paciencia. Gracias por tu apoyo incondicional.

www.bdigital.ula.ve

A mi hermana Arlenis, que este logro sea un buen ejemplo a seguir para ti, por muchas adversidades que tengas en el camino los sueños se cumplen, deseo que seas persistente y nunca te rindas. Te amo gordita.

A la memoria de tío Luis, aunque no estas físicamente conmigo sé que día a día me proteges y me acompañas. Gracias por tu infinito amor.

A todos mis familiares, que siempre me brindan apoyo incondicional, que con consejos sabios y reconfortantes en el momento exacto me llenaron de valentía y fortaleza para continuar.

¡Gracias a ustedes!, sin su ayuda no hubiera podido continuar en los momentos de agotamiento, me acompañaron, guiaron, y motivaron constantemente. Se los agradezco desde el fondo de mi alma.

Leybeth del V. Peralta M.

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

AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar, A Dios Todopoderoso, me has dado la oportunidad de lograr grandes cosas y todos los recursos necesarios para cumplir mis metas.
- A mis padres Leyda y Juan, por ser los principales promotores de mis sueños, por confiar en mí y darme la oportunidad de tener una excelente educación.
- A mis tíos Eugenio y Silvana, por brindarme apoyo, cariño y estadía en los inicios de mi carrera, por incluirme como un miembro más de su familia.
- A mi mejor amigo Miguel, por ser mi apoyo moral, darme palabras de aliento en los momentos más difíciles de mi carrera, por enseñarme, ayudarme, aconsejarme y creer en mi e incluso cuando yo no era capaz de hacerlo.

www.bdigital.ula.ve

- A mi tutora Prof. Silvana Villarreal, por su paciencia, dedicación y guía en la realización de este trabajo, mi más especial agradecimiento.
- A mi cotutor Prof. Luis B. Rojas Fermín (QEPD) por todo su apoyo incondicional. Gracias por ser parte fundamental en esta investigación.
- A mis amigos que me demostraron lo divertida y especial que puede ser la etapa universitaria, con cada uno de ustedes guardo muy bonitos recuerdos.
- Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, por ser una casa en aquellos largos periodos de trabajo.
- A la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y la Ilustre Universidad de Los Andes (ULA) por ser la cuna de nuestros conocimientos, darnos las herramientas necesarias para formarnos como profesionales.

A todos ustedes, y a los que me faltó nombrar, les digo ¡gracias!”

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

ÍNDICE GENERAL

	pp.
LISTA DE CUADROS……..	vii
LISTA DE TABLAS……	viii
LISTA DE FIGURAS…….	ix
LISTA DE ESQUEMAS…….	x
RESUMEN……..	xi
INTRODUCCIÓN……..	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA…….	4
Planteamiento del Problema……	4
Objetivos de la Investigación……...	8
Objetivo General……..	8
Objetivos Específicos……..	8
Justificación de la Investigación……..	9
Alcances y Limitaciones de la Investigación…….	11
Alcances de la Investigación……..	11
Limitaciones de la Investigación……	12
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL…….	13
Trabajos Previos……...	13
Antecedentes Históricos……...	17
Bases Teóricas……..	19
Generalidades de la Familia Asteraceae…….	19
Características Botánicas de la Familia Asteraceae…….	19
Distribución Geográfica de la Familia Asteraceae…….	21
Composición Química y Actividad Biológica de la Familia Asteraceae……	22
Género *Centratherum* Cass……	23
Características Botánicas y Clasificación Taxonómica del Género *Centratherum* Cass……...	23
Distribución Geográfica del Género *Centratherum* Cass…….	24

www.bdigital.ula.ve

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

Especie *Centratherum punctatum* Cass……. 25
Características Botánicas de *Centratherum punctatum* Cass. 25
Clasificación Taxonómica de *Centratherum punctatum* Cass. 26
Distribución Geográfica de *Centratherum punctatum* Cass… 27
Composición Química de *Centratherum punctatum* Cass….. 28
Usos Etnobotánicos de *Centratherum punctatum* Cass…….. 30
Productos Naturales……... 31
Clasificación de los Productos Naturales……..…… 31
Alcaloides……... 33
Triterpenos……. 33
Esteroles……. 33
Saponinas…….. 34
Taninos……... 35
Flavonoides…… 35
Cumarinas…….. 36
Quinonas…… 36
Lactonas Sesquiterpénicas……. 36
Extractos Vegetales…….. 38
Consistencia de los Extractos……..…… 38
Métodos de Obtención de los Extractos Vegetales…….. 39
Tamizaje Fitoquímico de los Extractos Vegetales…… 40
Generalidades de las Bacterias…… 42
Bacterias Gram positivas…….. 43
Bacterias Gram negativas…… 44
Resistencia Bacteriana…….…… 46
Tipos de Resistencia Bacteriana…….…… 46
Generalidades de los Hongos…….. 49
Género *Candida*…….. 50
Mecanismos de Resistencia de los Hongos…….. 50
Mecanismos de Acción Antifúngicos…….. 51
Actividad Antimicrobiana…….. 52

www.bdigital.ula.ve

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

Métodos para Determinar la Actividad Antimicrobiana…… 52
Método de Difusión en Agar……..… 52
Método de Dilución en Caldo……. 53
Método de Dilución en Agar……... 53
Definición Operacional de Términos…….. 55
Sistema de Hipótesis……. 57
Operacionalización de las Variables…….. 58
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO…….. 60
Enfoque de la Investigación…… 60
Tipo y Diseño de Investigación……..…… 60
Población y Muestra…….…. 62
Procedimiento de la Investigación…….. 63
Obtención de los Extractos de *Centratherum punctatum* Cass…. 63
Screening Fitoquímico de los Extractos Hexano y Etanol de Hojas y Flores de *Centratherum punctatum* Cass (Asteraceae)…….. 66
Determinación de la Actividad Antimicrobiana de *Centratherum punctatum* Cass ……..…….. 68
Organización de la Información…….. 73
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN……. 74
Screening Fitoquímico de los Extractos de Hexano y Etanol de las Hojas y Flores de *Centratherum punctatum* Cass……..... 74
Actividad Antimicrobiana de los Extractos Vegetales de *Centratherum punctatum* Cass (Asteraceae)…..……. 76
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES……. 82
Conclusiones…….. 82
Recomendaciones……. 84
BIBLIOHEMEROGRAFÍA……..…… 85
ANEXOS……. 99

www.bdigital.ula.ve

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

LISTA DE CUADROS

Cuadro N°		pp.
1	Lactonas Sesquiterpénicas Aisladas de *Centratherum punctatum* Cass……	15
2	Flavonoides Aislados de *Centratherum punctatum* Cass.	16
3	Lactonas Sesquiterpénicas del Tipo Goyazensolida e Isogoyazensolida Aislados del *Centratherum punctatum* Cass.....	28
4	Compuestos Químicos Identificados en el Extracto Acuoso del *Centratherum punctatum* Cass……	29
5	Alcaloides del Género *Senecio* (Asteraceae)…….	33
6	Triterpenos del Género *Baccharis* (Asteraceae)……	34
7	Esteroles de *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae)……..	35
8	Ejemplo de Saponina en Géneros de las Asteraceae…...	35
9	Flavonoides Aislados de Especies de Asteraceae…….	36
10	Cumarinas de *Pterocaulon interruptum* (Asteraceae)……	36
11	Ejemplo de Naftoquinonas de Naturaleza Isoprénica……	36

www.bdigital.ula.ve

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

LISTA DE TABLAS

Tabla N°		pp.
1	Clasificación Taxonómica de la Familia Asteraceae……	21
2	Clasificación Taxonómica del Género *Centratherum* Cass	24
3	Clasificación Taxonómica de la Especie *Centratherum punctatum* Cass…….	26
4	Operacionalización de las Variables……..	59
5	Antibióticos Empleados como Control Positivo para el Estudio de la Actividad Antibacteriana……...	71
6	Tamizaje Fitoquímico de los Extractos de Hexano y Etanol de Hojas y Flores de *Centratherum punctatum* Cass (Asteraceae).....	75
7	Actividad Antimicrobiana de los Extractos de Etanol de Hojas y Flores de *Centratherum punctatum* Cass……	78

www.bdigital.ula.ve

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

LISTA DE FIGURAS

Figura N°		pp.
1	Partes de la Inflorescencia de la Familia Asteraceae……	20
2	Distribución Geográfica de la Familia Asteraceae…….	22
3	Distribución Geográfica del Género *Centratherum* Cass.	24
4	Hojas (A) e Inflorescencias (B) de *Centratherum punctatum* Cass……...	26
5	Distribución Geográfica de *Centratherum punctatum* Cass……..	27
6	Métodos de Obtención de los Extractos Vegetales……...	40
7	Estructura Bacteriana de Gram positivas y Gram negativas……..	43
8	Mecanismos de Resistencia Bacteriana……..	48
9	Mecanismos de Acción de las Diferentes Familias de Antifúngicos en Uso Clínico…….....	52
10	Diferentes Métodos para la Determinación de la Actividad Antimicrobiana……	54
11	Planta *Centratherum punctatum* Cass Cultivada en el Jardín Botánico de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis…….	62
12	Resultados con la Cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)……...	78
13	Resultados con la Cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)……...	79
14	Resultados con la Cepa *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357)……...	79
15	Resultados con la Cepa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)……..	79
16	Resultados del Ensayo con las Cepas *Candida albicans* (ATCC 14053) y *Candida krusei* (ATCC 6258)……..	80

www.bdigital.ula.ve

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

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema N°		pp.
1	Biosíntesis de los Principales Metabolitos……	32
2	Preparación de los Extractos Crudos de *Centratherum punctatum* Cass……	65
3	Preparación de los Inóculos……	70
4	Análisis Microbiológico y Lectura de los Halos de Inhibición….....	72
5	Camino Metodológico……..	73

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
ESCUELA DE BIOANÁLISIS

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA ASOCIADA A LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE EXTRACTOS VEGETALES DE *Centratherum punctatum* CASS (ASTERACEAE) EN CEPAS DE REFERENCIA

Autora: Leybeth del V. Peralta M.
Tutora: M Sc. Silvana B. Villarreal R.

RESUMEN

En la presente investigación se estudió la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos vegetales de las hojas y flores de *C. punctatum* Cass., contra cepas de referencia ATCC, en Mérida –Venezuela. En la cual se obtuvo los extractos de hexano y etanol a través del método de extracción en reflujo. La identificación de los metabolitos secundarios se realizó mediante el tamizaje fitoquímico. La actividad antimicrobiana se determinó a través del método de difusión en agar con discos frente a cepas de *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans* y *Candida krusei*. En la caracterización cualitativa, se evidenció la presencia de esteroles con mayor abundancia en los extractos de las hojas. En el caso de las flores, la presencia de triterpenos, flavonoides y alcaloides fueron los mayoritarios. Asimismo, la presencia de taninos, quinonas, lactonas y lactonas sesquiterpénicas, poco abundantes en las flores de *C. punctatum*. En los ensayos antimicrobianos se observó resultados positivos frente a la bacteria Gram positiva *E. faecalis*, con un halo de 11 mm de diámetro a una concentración de 10 mg/mL, siendo el máximo halo de inhibición del extracto de etanol de las flores. De igual forma, hubo inhibición para *S. aureus* en el extracto de hojas y flores, con un halo de 7 y 9 mm de diámetro respectivamente. En relación a las bacterias Gram negativas se observó inhibición para *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa.* Además, el extracto de etanol de las flores inhibieron el crecimiento de *C. albicans* y *C. krusei* presentando un halo de inhibición de 9 y 10 mm, respectivamente y una CIM de 7 mg/mL.

www.bdigital.ula.ve

Palabras Clave: Asteraceas, *Centratherum punctatum,* actividad antimicrobiana, extractos vegetales, metabolitos secundarios.

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

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales han constituido y siguen constituyendo la materia prima fundamental para la obtención de medicamentos. Existen especies de plantas reconocidas por sus propiedades biológicas demostradas, ricas en metabolitos secundarios que ejercen su función ante diversas patologías, como antiinflamatoria, anticancerígena, antioxidante, antiespasmódica, antirreumática, antiulcerogénica (Gutiérrez y Estévez, 2009), analgésica, cicatrizante y antimicrobiana (Lock de Ugaz, 1994).

Algunos de estos compuestos químicos sintetizados por las plantas ejercen mecanismos de defensa importantes contra agentes patógenos, tales como microorganismos bacterianos y fúngicos (Samiul, Nachiketa, Sayeed, Masnoon y Mohammad, 2016), por lo tanto, han sido usado como compuestos principales en algunos antibióticos. De manera que la era de los antibióticos ha marcado un gran paso para la humanidad, la vida de millones ha sido salvada gracias al descubrimiento de los mismos (Crespo, 2002).

www.bdigital.ula.ve

No obstante, el uso inadecuado e indiscriminado de antibióticos en el control y prevención de enfermedades ha provocado la aparición de nuevas formas clínicas, así como localizaciones no habituales y diseminación de nuevos mecanismos de resistencia antimicrobiana, esto conlleva a un problema que va cada vez en aumento y que plantea una grave amenaza a la salud pública (Céspedes, Ávila, Martínez, Calderón y Salgado, 2006). De modo que muchas investigaciones han sido dirigidas a la obtención de estas sustancias para su aislamiento y posterior estudio de la actividad antimicrobiana que ejercen sobre diferentes especies de bacterias y hongos patógenos para el ser humano y así aportar

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

soluciones a los problemas de resistencia antimicrobiana (Fabri, Noguera, Dutra, Bouzada y Scio, 2011).

Llama la atención a los investigadores estudiar las plantas de la familia Asteraceae no sólo por su gran diversidad botánica, su abundante y amplia distribución en todo el mundo, sino también por sus variables usos medicinales. Ya que al observar la enorme variedad de efectos terapéuticos de distintas especies de la familia Asteraceae es lógico pensar que existan algunas propiedades medicinales que aún faltan por conocer (Castillo, Pascual, Cunhanune, Lorente y Cañete, 2014).

Por lo tanto, es importante para el país conocer y estudiar esta diversidad para desarrollar su potencial por medio de diferentes disciplinas científicas, cuyo motivo nace del proceso científico desarrollado en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes por medio del Instituto de Investigaciones, bajo la línea de investigación de actividad biológica y estudio fitoquímico de plantas medicinales. Es por ello que se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos vegetales de la especie botánica *Centratherum punctatum* Cass., recolectada en la ciudad de Mérida-Venezuela.

www.bdigital.ula.ve

Con respecto, a la especie *Centratherum punctatum* Cass, es una planta perteneciente a esta familia, que por su popularidad tradicional, se considera como una hierba perenne cosmopolita, que posee propiedades bioactivas de interés (Puccio, 2018). De este modo, a partir de diferentes extractos de partes de la planta se han obtenido e identificado presencia de metabolitos secundarios como lactonas sesquiterpénicas, flavonas, glucósidos y compuestos fenólicos. Esta clase de fitoquímicos posee actividades biológicas muy diversas responsables de un amplio espectro de actividad contra la inflamación, la depresión, la hipertensión, el cáncer,

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

enfermedades infecciosas, entre otras (Chukwujekwu, Van Heerden y Van Staden, 2018).

Además, algunos investigadores han reportado importante actividad antimicrobiana de extractos vegetales de las hojas de *C. punctatum*, estos mostraron actividad contra una serie de cepas bacterianas que incluyen *Acinetobacter baumanii* y *Staphylococcus aureus.* Asimismo, extractos de acetona y acetato de etilo exhibieron actividad antifúngica (Pawar y Arumugam, 2011). Del mismo modo, se comprobó que el extracto metanólico de las flores de *C. punctatum* tiene actividad antibacteriana contra *Escherichia coli y Pseudomonas* (Chitra y Benno, 2018). Sin embargo, actualmente, existen pocas divulgaciones referentes al estudio de la actividad antimicrobiana y composición química de los extractos de la especie *Centratherum punctatum* Cass.

www.bdigital.ula.ve

Por consiguiente, estas evidencias permitieron recabar sobre el interés de estudiar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales de la especie a través del método de difusión en agar con discos y el tamizaje fitoquímico para analizar la composición química de dichos extractos. Debido a lo anteriormente descrito, en la presente investigación se planteó como objetivo general estudiar la composición química y la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos vegetales de las hojas y flores de *Centratherum punctatum* Cass., perteneciente a la familia botánica Asteraceae contra cepas de referencia ATCC, en Mérida-Venezuela.

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

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Las plantas debido a sus múltiples beneficios, poseen numerosas potencialidades, gracias a la producción de una gran cantidad de compuestos no implicados directamente en su crecimiento y desarrollo, conocidos como metabolitos secundarios. Atendiendo a ello, el hombre ha dirigido sus investigaciones a la identificación y aislamiento de estas sustancias que tienen actividad antimicrobiana y ha logrado probar que un gran número de especies vegetales inhiben el crecimiento de bacterias resistentes a numerosos antibióticos y hongos patógenos para el hombre (Miranda y Cuellar, 2012).

www.bdigital.ula.ve

En tal sentido, la actividad antimicrobiana de fuentes naturales ha sido objeto de estudio tanto en extractos como en sus metabolitos secundarios aislados, conociéndose esta como la capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de una población bacteriana o para eliminarla (Tortora, Funke y Case, 2007). Sin embargo, la resistencia de los microorganismos a gran variedad de antimicrobianos, ha sido originada por el uso excesivo e inadecuado de los mismos (Cespedes *y cols.*, 2006).

En efecto, la resistencia de algunas bacterias y sus complicaciones, es uno de los problemas que se han estudiado, debido a que cada vez son más las bacterias que desarrollan resistencia a los antibióticos, lo cual

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

hace más difícil tratar y por supuesto curar una enfermedad de origen infeccioso (Samiul *y cols.*, 2016).

Además, para tratar las infecciones micóticas, a diferencia de los antibacterianos, son muy pocos los agentes antifúngicos usados, ya que algunas sustancias con esta actividad pueden ser inestables o tóxicas para los seres humanos. Aunado a esto, los hongos son organismos que se caracterizan por presentar una gran plasticidad ante los cambios ambientales, al igual que las bacterias también han desarrollado mecanismos de resistencia a los principales grupos antifúngicos. Como consecuencia, la incidencia de las infecciones fúngicas va en ascenso, particularmente entre individuos inmunocomprometidos (Cordero, Ustáriz, Araujo, Usubillaga, Rojas y Moujir, 2017).

www.bdigital.ula.ve

Debido a esta multiresistencia que han desarrollado muchos de los microorganismos, se ha tratado de crear nuevos antibióticos y antifúngicos que puedan combatirlos. Es por ello que la Organización Mundial de la Salud (OMS) promueve la búsqueda constante de nuevas terapias antimicrobianas que contrarresten la resistencia de los microorganismos ya existentes y los reemergentes, por lo que se ha incrementado el interés de las plantas medicinales (Cespedes *y cols.*, 2006).

De acuerdo a esto, al observar la enorme variedad de efectos terapéuticos de distintas especies de la familia Asteraceae es lógico pensar que existan algunas propiedades medicinales que aún faltan por conocer y esto apertura el interés hacia potenciales aplicaciones que tendría *Centratherum punctatum* Cass*.* En este caso, ya se han realizados estudios que confirman que esta especie presenta cierto efecto contra algunos agentes causantes de infecciones (Sivasubramanian y

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

Brindha, 2013; Chitra y Benno, 2018; Chukwujekwu *y cols.*, 2018; Madhumitha, Anbumalarmathi, Aruna, Nandhini y Shanmuga, 2020).

Cabe señalar que la especie *Centratherum punctatum* Cass., conocida como la flor de botón brasileña, es una especie herbácea que pertenece a la familia Asteraceae. Es nativa de América tropical y de Australia, la cual se ha difundido en varios países de clima cálido, transformándose a menudo en maleza. Aunque se cultiva por sus propiedades ornamentales, esta especie es valorada como planta medicinal ya que es eficaz contra numerosas patologías como el cáncer, la inflamación, los trastornos intestinales, la fiebre y el dolor. Es rica en moléculas bioactivas que son útiles como anticancerígenos, antiantiinflamatorios, antipiréticos, antimicrobianos, analgésicos, cicatrizantes, antioxidantes y antiproliferativas (Chitra y Benno, 2018).

www.bdigital.ula.ve

Actualmente, la actividad antimicrobiana de *C. punctatum* Cass., ha sido estudiada y divulgada por diferentes investigadores, quienes han reportado efectividad frente a diversas cepas bacterianas y fúngicas. Asimismo, algunos estudios han revelado que esta planta es rica en una clase de fitoquímicos que posee actividades biológicas muy diversas, como son las lactonas sesquiterpénicas, a las cuales se les atribuye dicha actividad (Chitra y Benno, 2018; Chukwujekwu *y cols.*, 2018; Madhumitha *y cols.*, 2020).

Por consiguiente, una vez planteada la situación actual del problema, se formularon las siguientes interrogantes:

¿Qué actividad antimicrobiana *in vitro* presentarán los extractos crudos de (hexano y etanol) de las hojas y flores de la especie *Centratherum punctatum* Cass., (Asteraceae) en cepas ATCC a través del método de difusión en agar con discos?

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

¿Cuál es la composición química de los extractos de hexano y etanol de las hojas y flores de *Centratherum punctatum* Cass., (Asteraceae), a través del tamizaje fitoquímico?

¿Cuál es la relación causal entre la actividad antimicrobiana en cepas de referencia y la composición química de los extractos vegetales de *Centratherum punctatum* Cass., (Asteraceae) recolectada en la ciudad de Mérida-Venezuela?

www.bdigital.ula.ve

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

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Estudiar la composición química y la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos vegetales de las hojas y flores de *Centratherum punctatum* Cass., perteneciente a la familia botánica Asteraceae contra cepas de referencia ATCC, en Mérida-Venezuela.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos de hexano y etanol de las hojas y flores de *Centratherum punctatum* Cass., por el método de extracción de reflujo.

www.bdigital.ula.ve

- Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios que se encuentran en los extractos de hojas y flores de *Centratherum punctatum* Cass., a través del tamizaje fitoquímico.

- Analizar la actividad antimicrobiana de los extractos de hexano y etanol de las hojas y flores de *Centratherum punctatum* Cass., frente a cepas de referencia ATCC a través del método de difusión en agar con discos.

- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos crudos con actividad antimicrobiana sobre cepas ATCC a través del método de difusión en agar con discos.

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

Justificación de la Investigación

Los problemas de salud y el elevado costo de los medicamentos sintéticos han llevado al aumento del uso de la medicina tradicional para tratar enfermedades principalmente en países en vías de desarrollo; es así, como el conocimiento de las plantas medicinales ocupa un lugar preponderante como una de las medicinas alternativas del futuro que garantiza eficacia, seguridad y bajos costos, siempre y cuando sean usadas en forma adecuada y por personal calificado (Pascual, Pérez, Morales, Castellanos y González, 2014).

Así pues, las plantas medicinales están siendo usadas como fuente exclusiva de algunas drogas que se emplean en tratamientos médicos nuevos, puede decirse que alrededor del 25 % de las drogas en la farmacopea moderna son derivadas de plantas y muchas otras son sintéticos análogos construidos de componentes prototipos aislados de plantas; se emplean, además, como suplementos nutricionales, lo que ha aumentado su valor en años recientes (Gallegos, 2016).

www.bdigital.ula.ve

En la actualidad, debido a la carencia de estudios profundos que avalen la acción biológica de las plantas que emplea la población como medicamentos, incrementa la necesidad de estudiar de manera sistemática la bioactividad y/o toxicidad de las mismas, para lo cual es necesario, mediante la investigación, contribuir con resultados científicos que validen la utilización de los fitofármacos y como recursos terapéuticos en la medicina (Gallegos, 2016).

Aproximadamente el 80 % de la población mundial utiliza productos naturales con fines medicinales. Es por ello que a nivel mundial se viene explorando el uso de los productos naturales como fuente de nuevos

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

agentes antimicrobianos; sus derivados podrían proporcionar metabolitos bioactivos como una alternativa de tratamiento o prevención a las infecciones causadas por bacterias y hongos. Además, los extractos de plantas son una fuente atractiva de nuevos medicamentos (Pascual y *cols.,* 2014).

Por lo tanto, la oportunidad de investigar el uso de *C. punctatum* Cass., como tratamiento antimicrobiano, permite aportar conocimiento comprobable sobre el empleo de nuevas alternativas y protocolos de atención, lo cual incrementa el interés científico en el área Farmacológica (Pawar y Arumugam, 2011). Así pues, se planteó determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de dicha especie, que pertenece a los Andes Venezolanos. Debido, a que especies de su misma familia como es la Asteraceae han sido estudiadas preliminarmente por tener principios activos de importancia médica, con la finalidad de conseguir una opción terapéutica ante alguna afección posiblemente causada por bacterias y hongos patógenos.

www.bdigital.ula.ve

Por consiguiente, la actividad antimicrobiana de *Centratherum punctatum* Cass., asociada a su composición química, se estudió desde un punto de vista evaluativo por diversas razones. Primeramente, la poca información divulgada sobre la actividad antimicrobiana de esta planta y los diversos extractos usados para dichos estudios recabaron sobre el interés de la presente investigación. En segundo lugar, los diferentes microorganismos que pudieron presentar sensibilidad o resistencia frente a los extractos evaluados; y finalmente, la potencialidad de aportar información para próximas investigaciones sobre dicha especie.

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 desarrollo de la presente investigación permitió aplicar los conocimientos teóricos y conocer los protocolos de las técnicas de laboratorio.

- Aportar información sobre la especie en estudio a la línea de investigación del Grupo de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, que estudian la flora de la región desde un punto de vista fitoquímico y biológico.

- Encontrar datos farmacológicos que validen el uso en la medicina tradicional de la especie vegetal estudiada, con la finalidad de aportar otra alternativa para tratar las bacterias resistentes. Además, formar parte del desarrollo científico de la sociedad y del país.

- Finalmente, se espera reportar y presentar los resultados en un congreso o jornada nacional científica. Asimismo, divulgar los hallazgos encontrados, mediante la publicación en una revista científica nacional o internacional.

www.bdigital.ula.ve

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

Limitaciones de la Investigación

- Durante esta investigación se encontraron limitaciones de tipo académico, debido a los escasos trabajos previos actualizados y poco acceso a la información de interés.

- Además, se presentaron limitaciones técnicas a la hora de ejecutar la parte experimental, debido a las fallas de los servicios públicos como eléctricos y suministro de agua en la zona.

- Asimismo, limitaciones del acceso a los recursos para ejecutar la parte experimental, extendiendo el tiempo de desarrollo de los ensayos requeridos.

www.bdigital.ula.ve

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

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

Trabajos Previos

La investigación realizada por Madhumitha *y cols.*, (2020) titulada: Estudio comparativo de plantas *in vivo* y extractos de callos *in vitro* de *Centratherum punctatum* Cass. El cual tuvo por objetivo comparar la planta y el extracto de callo, con respecto al análisis de los constituyentes fitoquímicos, la actividad antioxidante, antibacteriana y las propiedades citotóxicas de *C. punctatum* Cass., en medio acuoso y diferentes solventes como metanol y acetato de etilo. El análisis fitoquímico de los extractos acuoso, metanol y acetato de etilo de la planta *in vivo* e *in vitro* mostró la presencia de alcaloides, flavonoides, fenoles y carbohidratos. Particularmente, en el extracto acuoso tanto de planta como de callo mostró presencia de taninos, proteínas y esteroides mientras que el extracto metanólico mostró presencia de taninos, aminoácidos y terpenoides. Asimismo, el extracto de acetato de etilo mostró terpenoides y proteína. En el estudio antibacteriano se observó un máximo halo de inhibición del extracto metanólico de la planta *in vivo* e *in vitro* (15 mm y 14 mm respectivamente) contra *Bacillus subtilis*. El extracto de acetato de etilo de planta *in vivo* e *in vitro* presentó una zona de 14 mm y 12 mm frente a *Escherichia coli.* Además, se observó una zona máxima de inhibición (12 mm y 11 mm respectivamente) tanto en metanol como en acetato de etilo de plantas *in vivo* y callos *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*. Todos los extractos ensayados fueron a una concentración de 1 mg/mL. Este trabajo se correlaciona con la presente investigación en

www.bdigital.ula.ve

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

cuanto a la evaluación de la propiedad antibacteriana de los componentes fitoquímicos de la misma especie vegetal en estudio.

Asimismo, la investigación realizada por Chukwujekwu *y cols.*, (2018) titulada: Propiedades sinérgicas de lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Centratherum punctatum* Cass., en combinación con ampicilina contra bacterias Gram negativas resistentes a betalactámicos, donde su objetivo fue informar los efectos potenciadores de las lactonas sesquiterpénicas aisladas en presencia de ampicilina con respecto a la actividad antibacteriana contra cepas bacterianas resistentes a los medicamentos que expresan betalactamasas Gram negativas. Los investigadores, aislaron tres lactonas sesquiterpénicas: centraterina **(1)**, isocentraterina **(2)** y 5-*epi*-isocentraterina **(3)** (ver Cuadro 1) conocidas del extracto de las hojas de *C. punctatum* en donde individualmente, mostraron niveles variables de actividad antibacteriana contra *E. coli y K. pneumoniae*, con CMI en el rango de 5000 y 500 µg/mL. Sin embargo, cuando se combinaron con ampicilina, la centraterina **(1)** mostró una interacción sinérgica contra las cepas bacterianas. En ambos casos, la CIM de ampicilina disminuyó al menos 16 veces. Esta investigación se relaciona con el presente estudio en cuanto a la identificación de metabolitos secundarios con propiedad antibacterianas aisladas de *C. punctatum* Cass.

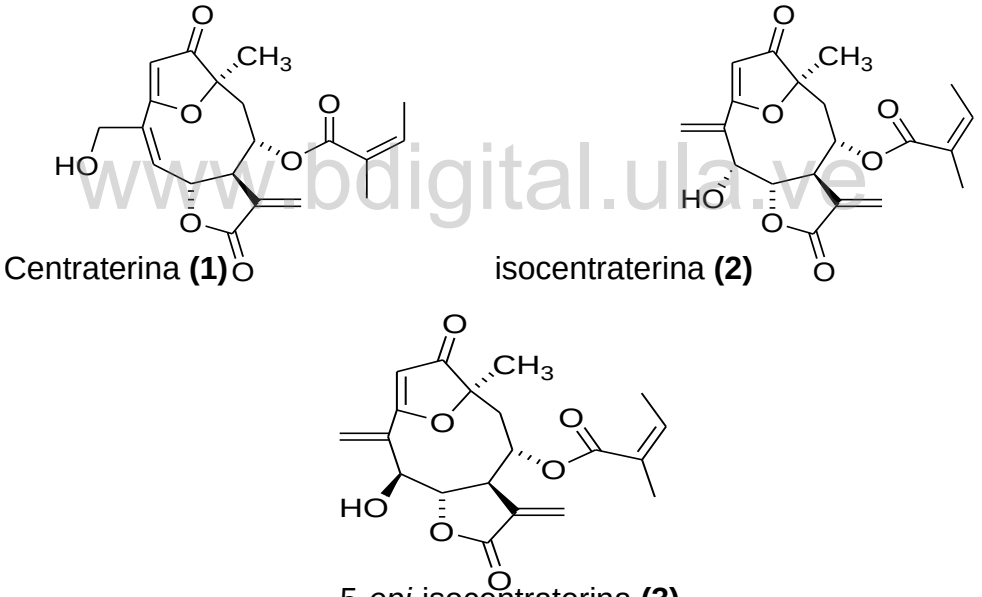
www.bdigital.ula.ve

Al mismo tiempo, la investigación realizada por Chitra y Benno (2018), titulada: Tamizaje fitoquímico y análisis CG-EM del extracto metanólico de las flores de *Centratherum punctatum*. El análisis fitoquímico reveló la presencia de terpenoides, fenoles, saponinas, esteroides, taninos, carbohidratos, quininas y cumarinas. Además, determinaron la actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Dicha actividad se midió mediante el método de difusión en pozos, donde todas las bacterias

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

probadas respondieron de manera diferente, mostrando un comportamiento antibacteriano en dosis dependiente. Así pues, la máxima zona de inhibición se observó contra *E. coli* en comparación con *S. aureus* y *P. aeruginosa* con 28, 22 y 20 mm, respectivamente a una concentración de 400 µg/mL. Por lo tanto, existe una importante correlación entre esta investigación y el presente estudio, debido a que se ensayó el extracto de las flores de la especie en cuestión con un solvente polar.

Cuadro 1. Lactonas Sesquiterpénicas Aisladas de *Centratherum punctatum* Cass.



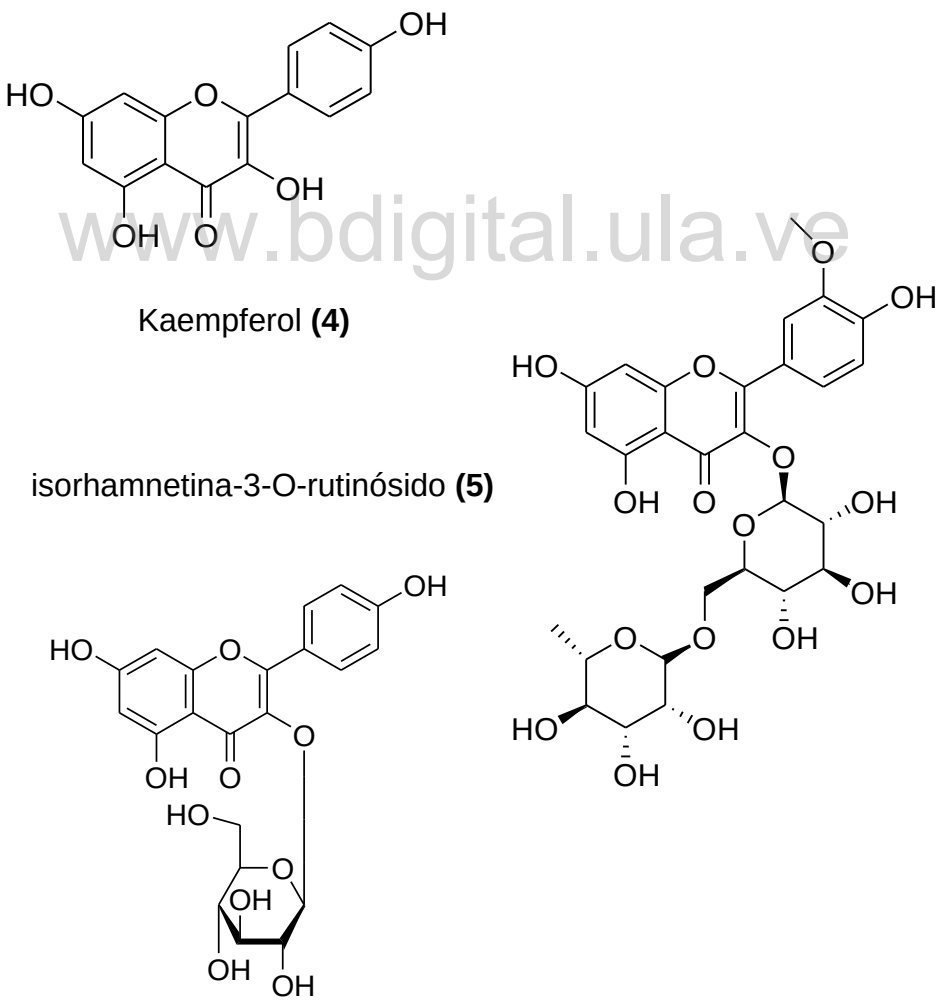
Fuente: Chukwujekwu *y cols.*, 2018.

En cuanto a la investigación de Shankaran, Ahmad, Arun, Brindha y Mahadevan, (2016) donde evaluaron el potencial del extracto etanólico de las partes aéreas de *Centratherum punctatum* Cass., como agente antiinflamatorio. Los extractos se analizaron por cromatografía en capa fina de alto rendimiento y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, en la cual se identificó la presencia de flavonas: kaempferol

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

(4), glucósido isorhamnetina-3-*O*-rutinósido **(5)** y kaempferol-3-glucósido **(6)** (Cuadro 2). El extracto ensayado exhibió propiedades antioxidantes mediada por la inhibición de la desnaturalización de proteínas (inhibición de proteinasa) y estabilización de la membrana según lo confirmado por el estudio, donde las flavonas y glucósidos de flavonas cumplen funciones estabilizadoras de membrana, las cuales validaron el potencial antiinflamatorio del extracto. Dicho estudio permitió validar el análisis de los componentes fitoquímicos presentes en la especie vegetal.

Cuadro 2. Flavonoides Aislados del *Centratherum punctatum* Cass.



www.bdigital.ula.ve

Fuente: Shankaran *y cols.*, 2016.

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

Finalmente, la investigación realizada por Deepak *y cols*., (2014) titulada: Actividad antibacteriana y antifúngica de las semillas de *Centratherum anthelminticum* (Asteraceae). La cual determinaron los efectos antibacterianos y antifúngicos contra diferentes cepas: *S. aureus*, E*. coli*, *P. aerugenosa*, *Bacillus subtilis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phomopsis dalbergiae* y *Trichoderma piluliferum*, por el método de difusión en agar con disco. Donde el extracto presentó actividad significativa contra las bacterias Gram negativas (E*. coli* 0,0020 µg/mL y *P. aerugenosa* 0,006 µg/mL), y los hongos ensayados (0,0025 µg/mL). Este estudio permitió sustentar la metodología seguida en la presente investigación e inferir en la actividad antimicrobiana de la especie estudiada del género *Centratherum*.

www.bdigital.ula.ve

Antecedentes Históricos

A finales del siglo XIX, con el nacimiento de la química moderna y de la farmacognosia, se realizaron los primeros estudios fitoquímicos principalmente de las plantas traídas del Viejo Mundo. Aunque en la misma época, muchos naturistas ingleses ya habían aportado información sobre la flora de la Amazonía, importantes para la taxonomía y la farmacognosia (Cower y Helfand, 1990). Sin embargo, 300 años a.C., Teofrasto reconoce la familia de las Asteraceae (Compositae) de todas las especies de Angiospermas (plantas con flores), como la más grande y ha sido objeto de numerosos estudios.

En 1972 fue establecida con el nombre de Compositae por Giseke y durante el periodo 1812-1831 se realizaron las más importantes aportaciones de dicha familia por el francés Henri Cassini, en cuanto a la

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

descripción detallada de la morfología de Asteraceas, agrupándola en 19 tribus (Katinas, Gutiérrez, Grossi y Crisci, 2007).

Posteriormente, se realizaron algunas modificaciones por parte de Lessing (1832), Candolle (1838) y Bentham (1873), quienes reagruparon a Astereaceae en ocho (8), tres (3) y trece (13) tribus, respectivamente. Esta última clasificación es la que se conoce hasta hoy, incluida en la obra Genera Plantarum (1862-1883) de George Bentham junto a Joseph Dalton Hooker. Además, uno de los aportes más significativos a la clasificación y filogenia de las asteráceas llegó con los estudios moleculares de ADN de Jansen y Palmer (1987) (Katinas *y cols*., 2007).

También en el año 1987 el botánico sueco Kare Bremer produce el primer cladograma de las asteraceas esencialmente sobre la base de caracteres morfológicos y en 1994, el mismo Bremer, produce un tratado sobre la familia. La clasificación de Bremer (1994) toma en cuenta los avances en el conocimiento de la filogenia de la familia y comprende tres subfamilias: la subfamilia Barnadesioideae con la tribu Barnadesieae, la subfamilia Cichorioideae con las tribus Arctoteae o Arctotideae; Cardueae o Cynareae; Lactuceae o Cichorieae; Liabeae; Mutisieae y Vernonieae y la subfamilia Asteroideae con las tribus Anthemideae, Astereae, Calenduleae, Eupatorieae, Gnaphalieae, Helenieae, Heliantheae, Inuleae, Plucheeae y Senecioneae (Katinas *y cols*., 2007).

www.bdigital.ula.ve

La delimitación tribal de Vernonieae de la subfamilia Cichorioideae se ha mantenido prácticamente sin cambios desde que fue propuesta por Cassini (1819). La propuesta de clasificación más reciente de la tribu se fundamenta en los resultados de estudios filogenéticos, así como trabajos taxonómicos tradicionales en los que se han esclarecido los límites genéricos en complejos de especies de *Vernonia* s.l., el restablecimiento de varios géneros reducidos a sinonimia y la propuesta de nuevos

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

géneros. Los taxones se agrupan en subtribus de acuerdo con la clasificación de Keeley y Robinson. En esta propuesta se reconocen 21 subtribus, 118 géneros y alrededor de 1050 especies (Redonda, 2017).

Entre las subtribus propuesta por Rob., F. Bohlmann y R.M. Rey (1980) y reconocidas en la nomenclatura taxonómica de la tribu Vernonieae se encuentra Centratherinae, a la cual pertenece el género *Centratherum.* Sin embargo, el género fue descrito por Alexandre Henri Gabriel de Cassini y publicado en Bulletin des Sciences, para la Société Philomatique, Paris en 1817. Actualmente, este género comprende 48 especies descritas y de estas, solo 5 aceptadas. A la especie *Centratherum punctatum* Cass., se le atribuyen 16 sinónimos homotípicos y 13 sinónimos heterotípicos (Katinas *y cols*., 2007; Redonda, 2017).

www.bdigital.ula.ve

Bases Teóricas

Generalidades de la Familia Asteraceae

La familia Asteraceae (Compositae) es la más diversa de las angiospermas o plantas con flor. Incluye unos 1.700 géneros y alrededor de 25.000 especies. Es además una de las más modernas evolutivamente hablando. En Venezuela se conocen cerca de 760 géneros y 210 especie, de los cuales 12 géneros, 189 especies, 2 subespecies y 5 variedades son endémicos (Katinas *y cols.*, 2007; Hokche, Berry y Huber, 2008).

Características Botánicas de la Familia Asteraceae

Son plantas herbáceas anuales o perennes, más raramente arbustos o árboles. La característica principal de la familia son las inflorescencias, llamadas capítulos, donde las flores están reunidas de forma tan

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

compacta que parece que cada capítulo sea una flor individual. Un capítulo consta de un involucro compuesto por brácteas verdes (que son en realidad hojas modificadas), y un receptáculo ensanchado sobre el que se disponen numerosas flores sésiles. El receptáculo es de forma variable (plano, convexo, cónico o esférico) y puede ser desnudo o poseer escamas o pelos. Los capítulos a su vez pueden agruparse en distintos tipos de inflorescencias secundarias (Figura 1) (Ferriol y López, 2018).

Figura 1. Partes de la Inflorescencia de la Familia Asteraceae. Fuente: Peralta y Royuela, 2019.

En cuanto a la clasificación taxonómica de la familia Asteraceae se subdivide en tres subfamilias, entre ellas Cichorioideae, la cual se compone por ocho tribus a saber: Cichorieae Lam., Arctotideae Cass., Eremothamneae, Liabeae, Vernonieae Cass., Platycarpheae, Moquinieae y Heterolepis Cass. A su vez, la tribu Vernoieae se subdivide en veintiún subtribus como son: Centrapalinae, Centratherinae, Chrestinae, Dipterocypselinae, Distephaninae, Elephantopinae, Erlangeinae, Gymnantheminae, Hesperomanniinae, Leiboldiinae, Lepidaploinae, Linziinae, Lychnophorinae, Mesanthophorinae, Pacourininae, Piptocarphinae, Rolandrinae, Sipolisiinae, Stokesiinae, Trichospirinae y Vernoniinae (ver Tabla 1) (Funk, Susanna, Stuessy y Bayer, 2009).

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

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de la Familia Asteraceae.

Reino:Plantae División:Magnoliophyta Clase:Magnoliopsida Orden:Asterales Familia:Asteraceae Subfamilia:Barnadesioideae Asteroideae Cichorioideae	

Fuente: Funk *y cols.*, 2009.

Distribución Geográfica de la Familia Asteraceae

La familia Asteraceae es cosmopolita, se encuentran en todos los continentes excepto la Antártida (Figura 2), dado que sus miembros han sido extraordinariamente exitosos en la adaptación a los más diversos hábitats, por lo que, más del 10 % de la flora pertenece a esta familia (Katinas *y cols.*, 2007). Las compuestas aparecen en casi todos los tipos de hábitats terrestres, incluidos las dunas costeras, los acantilados, los desiertos, suelos tóxicos como los alcalinos o yesosos, prados de altas montañas o lugares alterados por la acción antrópica. Unas pocas especies son incluso acuáticas o epífitas (Ferriol y López, 2018).

www.bdigital.ula.ve

En Venezuela se encuentran desde el nivel del mar como la cordillera de la costa, donde crece la *Espeletia neriifolia*, hasta los sitios más elevados de los páramos andinos. En la zona andina y alto Guayana existe una elevada concentración de especies de las Astereaceas (De Pérez, 1973).

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

Figura 2. **Distribución Geográfica de la Familia Asteraceae.**
Fuente: Passicot y Cabral, 2010.

Composición Química y Actividad Biológica de la Familia Asteraceae

www.bdigital.ula.ve

Algunos de los compuestos químicos secundarios presentes en la familia Asteraceae son: monoterpenos, diterpenos, triterpenos, flavonoides, lactonas sesquitérpenicas, cumarinas, amidas y alcaloides. Asimismo, una gran variedad de compuestos volátiles (Funk *y cols.*, 2009; Ortiz y Chaves, 2017).

La presencia de éstos metabolitos, se ha asociado con propiedades curativas debido a actividades farmacológicas específicas tales como: antiinflamatoria, antioxidante, anticancerígena, antiespasmódica, antireumática, antiulcerogénica, analgésica, cicatrizante y antimicrobiana (Ortiz y Chaves, 2017).

Por lo tanto, se ha reportado que diferentes especies de la familia Asteraceae se han usado para el tratamiento de diversas afecciones de salud como diurética, depurativa, adelgazante, antidiabética, regulador

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

hormonal y de grasas, tratamiento de problemas hepáticos y alérgicos. También para tratar enfermedades como pulmonía, pleuresía, estimulante, digestiones difíciles, dolor estomacal, estimulante del apetito y de la función biliar, fatiga, falta de ánimo y para la caída de cabello o calvicie prematura. Incluyendo, su empleo para tratar afecciones de la piel como el acné, dermatitis, infecciones urinarias, antimalárico, antioxidante (Molinelli, Perisse, Fuentes y Panchuelo, 2014).

Género *Centratherum* Cass

Características Botánicas y Clasificación Taxonómica del Género *Centratherum* Cass

www.bdigital.ula.ve

Son hierbas o subarbustos bajos, hasta 0,5 m de alto, erectos a escandentes de tallos simples a veces ramificados, ramas estriadas, vellosas a tomentosas. Hojas alternas, las caulinares frecuentemente agrupadas, lanceoladas a ovadas u obovadas a espatuladas, 2–7 cm de largo y 0,5–3 cm de ancho, ápice agudo a obtuso, base cuneada a atenuada, márgenes serrados, a veces ciliados, superficies punteado glandulares y escasamente pubescentes; sésiles a cortamente pecioladas, pecíolos indefinidos. Es un género de plantas fanerógamas perteneciente a la familia de las asteráceas que comprende 48 especies descritas y de estas, solo 5 han sido aceptadas: *Centratherum australianum* (K. Kirkman). A.R. Bean, *Centratherum cardenasii* H.Rob., *Centratherum confertum* K. Kirkman, *Centratherum intermedium* (Link) Less., *Centratherum punctatum* Cass. La clasificación taxonómica se resume en la Tabla 2 (https://colombia.inaturalist.org).

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

Tabla 2. Clasificación Taxonómica del Género *Centratherum* Cass.

Reino:Plantae División:Magnoliophyta Clase:Magnoliopsida Orden:Asterales Familia:Asteraceae Subfamilia:Cichorioideae Tribu: Vernonieae Género: *Centratherum* Cass. Sinonimia: *Ampherephis* Kunth	

Fuente: https://colombia.inaturalist.org

Distribución Geográfica del Género *Centratherum* Cass

El género *Centratherum* Cass., es nativo de Argentina (Nordeste), Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana Francesa, Paraguay, Perú y Venezuela. Además, ha sido introducida en Bangladesh, Camerún, China Sur-Central, Costa Rica, República Dominicana, El Salvador, Ghana, Guatemala, Islas del Golfo de Guinea, Haití, Hawái, Honduras, India, Malasia, Centro de México, Nueva Guinea, Nicaragua, Nigeria, Panamá, Filipinas, Puerto Rico, Tailandia, Trinidad-Tobago, Vietnam, Australia Occidental, entre otros (Figura 3) (Robinson y Funk, 2018).

www.bdigital.ula.ve

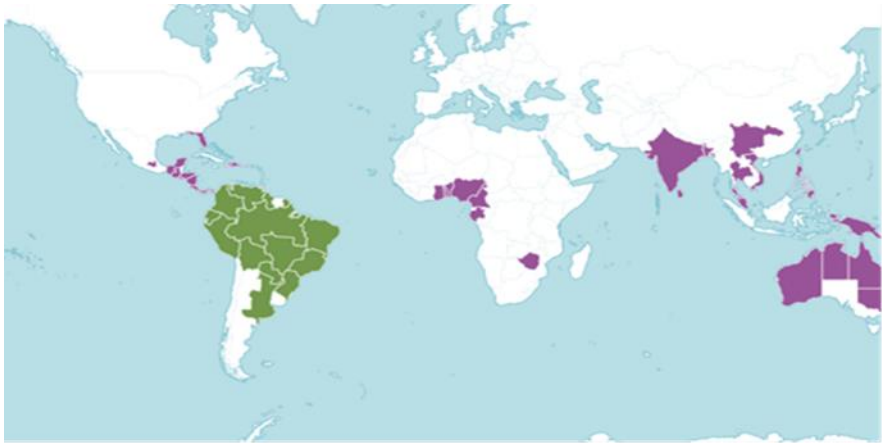


Figura 3. **Distribución Geográfica del Género *Centratherum* Cass.**

Fuente: https://powo.science.kew.org

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

Especie *Centratherum punctatum* Cass

Características Botánicas del *Centratherum punctatum* Cass

La planta *Centratherum punctatum* Cass. (1817) es una especie herbácea perenne generalmente erecta, alta hasta 70 cm, con tallo cilíndrico pubescente que se ramifica en la parte superior. Las hojas sobre un corto pecíolo alado, son simples, alternas, de ovadas a lanceoladas con márgenes dentados y ápice acuminado, largas 2-7 cm y anchas 0,8-4 cm, punteadas de minúsculas glándulas transparentes, aromáticas cuando se aprietan (Puccio, 2018).

Posee capítulos, que forman las típicas inflorescencias de las Asteraceae, con características terminales, solitarias, sésiles, subglobosas, de cerca 3,5 cm de diámetro, constituidas por 30-60 flores tubulosas (flósculos) hermafroditas, insertadas en una base discoide plana, el receptáculo, circundada por un involucro hemisférico, de 1-2 cm, de diámetro, constituido por 30-50 brácteas, las externas largas 1-2 cm, son foliáceas y recurvas, las internas, largas 0,6 cm, escariosas (membranáceas) y espinosas. Corola imbutiforme de color de lavanda a púrpura, larga 0,8-1,4 cm, con tubo cilíndrico y 5 lóbulos lineares con ápice acuminado, largos cerca 3 mm (Figura 4) (Funk *y cols.*, 2009).

www.bdigital.ula.ve

Los frutos son aquenios (o más correctamente cipsela) de color marrón claro, lineares, rallados, largos 1-2,5 mm, provistos de vilano caduco constituido por escamas filiformes de color amarillo pálido, largas 1-3 mm, que le facilitan la dispersión a través del viento (Funk *y cols.*, 2009; Puccio, 2018).

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

A B

Figura 4: Hojas (A) e Inflorescencias (B) de *Centratherum punctatum* Cass. Fuente: Calvillo, 2019.

Clasificación Taxonómica de *Centratherum punctatum* Cass

La especie *Centratherum punctatum* Cass., conocida como flor de botón brasileño, margarita o siempreviva, es una de las cinco especies reconocidas taxonómicamente dentro de la familia Asteraceae (Tabla 3) (Redonda, 2017).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 3. Clasificación Taxonómica de la Especie *Centratherum punctatum* Cass.

Reino:Plantae División:Magnoliophyta Clase:Magnoliopsida Orden:Asterales Familia:Asteraceae Subfamilia:Cichorioideae Tribu: Vernonieae Subtribu: Centratherinae Género: *Centratherum* Cass. Especie: *Centratherum punctatum* Cass.

Fuente: Funk *y cols*., 2009; Redonda, 2017.

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

Distribución Geográfica de *Centratherum punctatum* Cass

La especie *C. punctatum*es nativa de América tropical, Australia, Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Filipinas, Guyana, Guyana Francesa, Panamá, Paraguay, Perú y Trinidad, se ha difundido en varios países de clima cálido (Figura 5), donde crece en áreas verdes abiertas y en los márgenes de las forestas, desde el nivel del mar hasta cerca 1200 m de altitud (Calvillo, 2019).

www.bdigital.ula.ve

Figura 5. Distribución Geográfica de *Centratherum punctatum* Cass. Fuente: Calvillo, 2019.

Esta planta se autodisemina fácilmente tanto como para tornarse infectante en diversos países tropicales. Se reproduce fácilmente por semilla en sustrato orgánico drenante mantenido húmedo a 20-22 ºC de temperatura, con la primera floración luego de cerca 3 meses. Es una especie ornamental de fácil cultivación y de larga floración utilizable para borduras o como cubresuelo en los jardines de las zonas de clima tropical y subtropical sea húmedo o relativamente seco (Puccio, 2018).

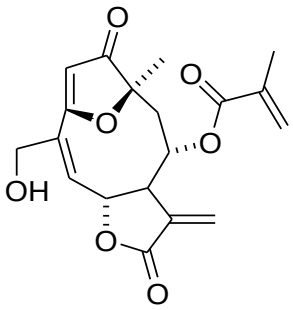
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Composición Química de *Centratherum punctatum* Cass

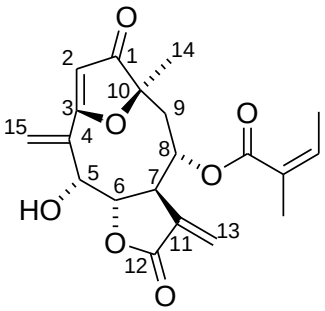
Como ya se ha mencionado, la especie *C. punctatum* Cass., es rica en lactonas sesquiterpénicas, de la cual se han reportado del extracto de diclorometano tres compuestos identificados: centraterina **(1)**, isocentraterina **(2)** y 5-*epi*-isocentraterina **(3)** (Chukwujekwu *y cols.*, 2018). Asimismo, se ha reportado de las partes aéreas de la especie, lactonas sesquiterpénicas del tipo goyazensolida (lychnophorolida A) **(7)** e isogoyazensolida (isolychnophorolida B) **(8)** (ver Cuadro 3) (Álvarez, Bardón, Catalán, Gedris y Herz, 1998). Igualmente, del análisis fitoquímico de extracto metanólico de las flores de *C. punctatum* Cass., reveló la presencia de terpenoides, fenoles, saponinas, esteroides, taninos, carbohidratos, quininas y cumarinas (Chitra y Benno, 2018) y del extracto acuoso el tamizaje fitoquímico ha reportado la presencia de flavonoides, alcaloides, taninos y vitamina C (Krithika, Niraimathi, Arun, Narendran, Balaji y Brindha, 2016).

www.bdigital.ula.ve

Cuadro 3. Lactonas Sesquiterpénicas del Tipo Goyazensolida e Isogoyazensolida Aislados del *Centratherum punctatum* Cass.



lychnophorolida A **(7)**



isolychnophorolida B **(8)**

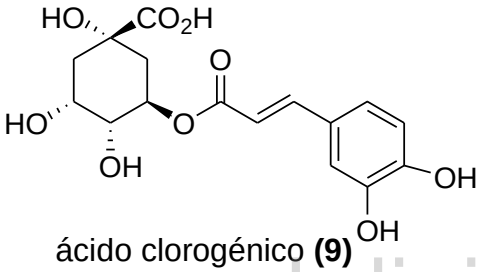
Fuente: Álvarez *y cols.*, 1998.

Por su parte, la investigación de Chitra y Brindha (2015), analizaron el perfil cromatográfico del extracto acuoso de las partes aéreas de

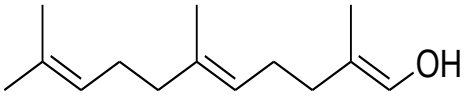
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Centratherum punctatum Cass., donde las principales moléculas presentes correspondían a kaempferol **(4)**, isorhamnetina-3-*O*-rutinosido **(5)**, kaempferol-3-glucósido **(6)**, ácido clorogénico **(9)**, farnesol **(10)**, cianidina-3,5-di-*O*-glucósido **(11)**, biocanina-1 **(12)**, 5-hidroxi-4'-metoxi-7-metilflavonas **(13)**, ergocornina **(14)**, derivados de qingyangshengenina **(15)** y germacranólido **(16)** entre otros compuestos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Compuestos Químicos Identificados del Extracto Acuoso de *Centratherum punctatum Cass.*

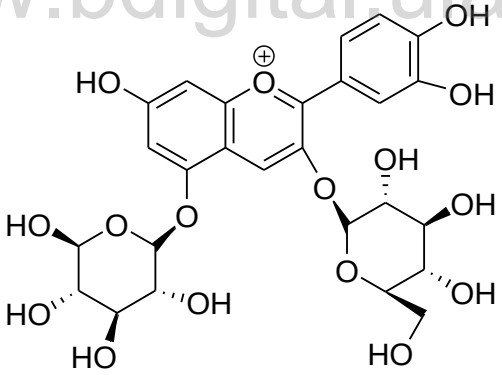


ácido clorogénico **(9)**

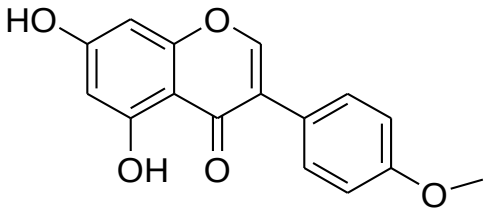


farnesol **(10)**

www.bdigital.ula.ve



cianidina-3,5-di-0-glucósido **(11)**

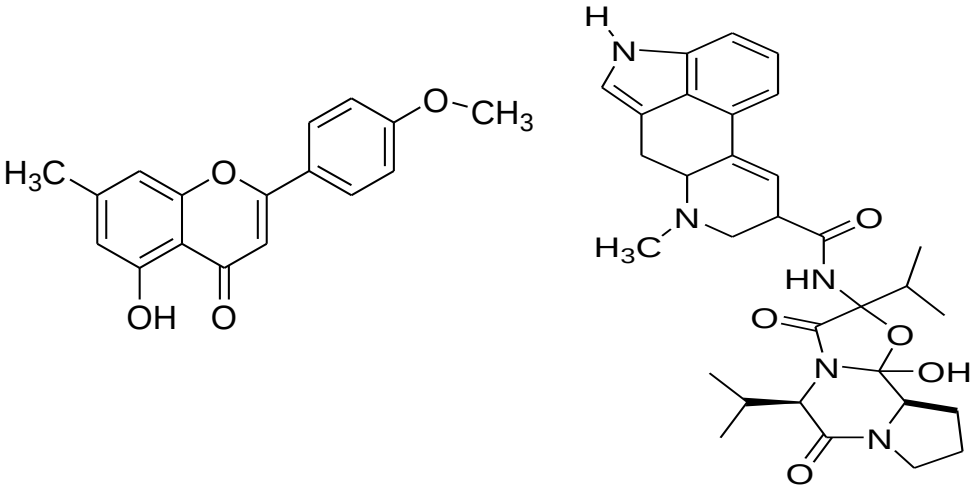


biocanina-1 **(12)**

Fuente: Chitra y Brindha, 2015.

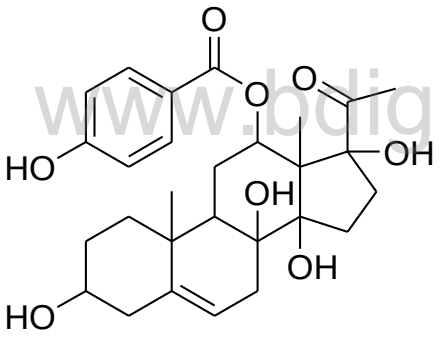
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Cuadro 4. Compuestos Químicos Identificados del Extracto Acuoso de *Centratherum punctatum Cass.* Continuación.

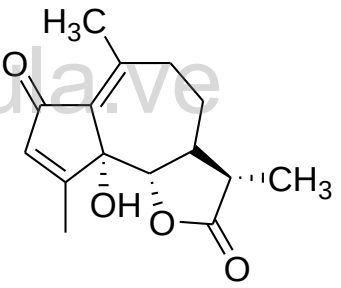


5-hidroxi-4'-metoxi-7-metilflavonas **(13)**

ergocornina **(14)**



qingyangshengenina **(15)**



germacranolido **(16)**

Fuente: Chitra y Brindha, 2015.

www.bdigital.ula.ve

Usos Etnobotánicos de *Centratherum punctatum* Cass

Tradicionalmente *C. punctatum* ha sido valorada como planta medicinal, ya que es eficaz contra numerosas patologías como el cáncer, la inflamación, los trastornos intestinales, la fiebre y el dolor. También, es rica en moléculas bioactivas que son útiles como anticancerígenos, antiinflamatorios, antipiréticos, antimicrobianos, analgésicos y cicatrizantes. Además, posee capacidades antioxidantes y antiproliferativas. Se utiliza en preparaciones de aceite para el cabello y

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

como blanqueador de la piel y agentes antienvejecimiento. Las proteasas presentes en las flores de *C. punctatum* desempeñan un papel en la propiedad de curación de heridas de la planta. Tradicionalmente se usa para aumentar la libido y como antídoto para la mordedura de serpiente y de tigre (Sivasubramanian y Brindha, 2013; Chitra y Benno, 2018).

Productos Naturales

Se conoce como productos naturales todas aquellas moléculas activas generadas por diversas especies vegetales, que no son necesarias para el crecimiento y la reproducción de las plantas, pero cumplen con roles muy importantes en el reino vegetal (Lizcano y Vergara, 2008). A estas moléculas también se les denomina metabolitos secundarios o fitoquímicos, las cuales están estrechamente relacionadas con funciones de defensa, agentes polinizadores, sustancias de reserva y cicatrizantes para sus propias heridas (Domínguez, 1973).

www.bdigital.ula.ve

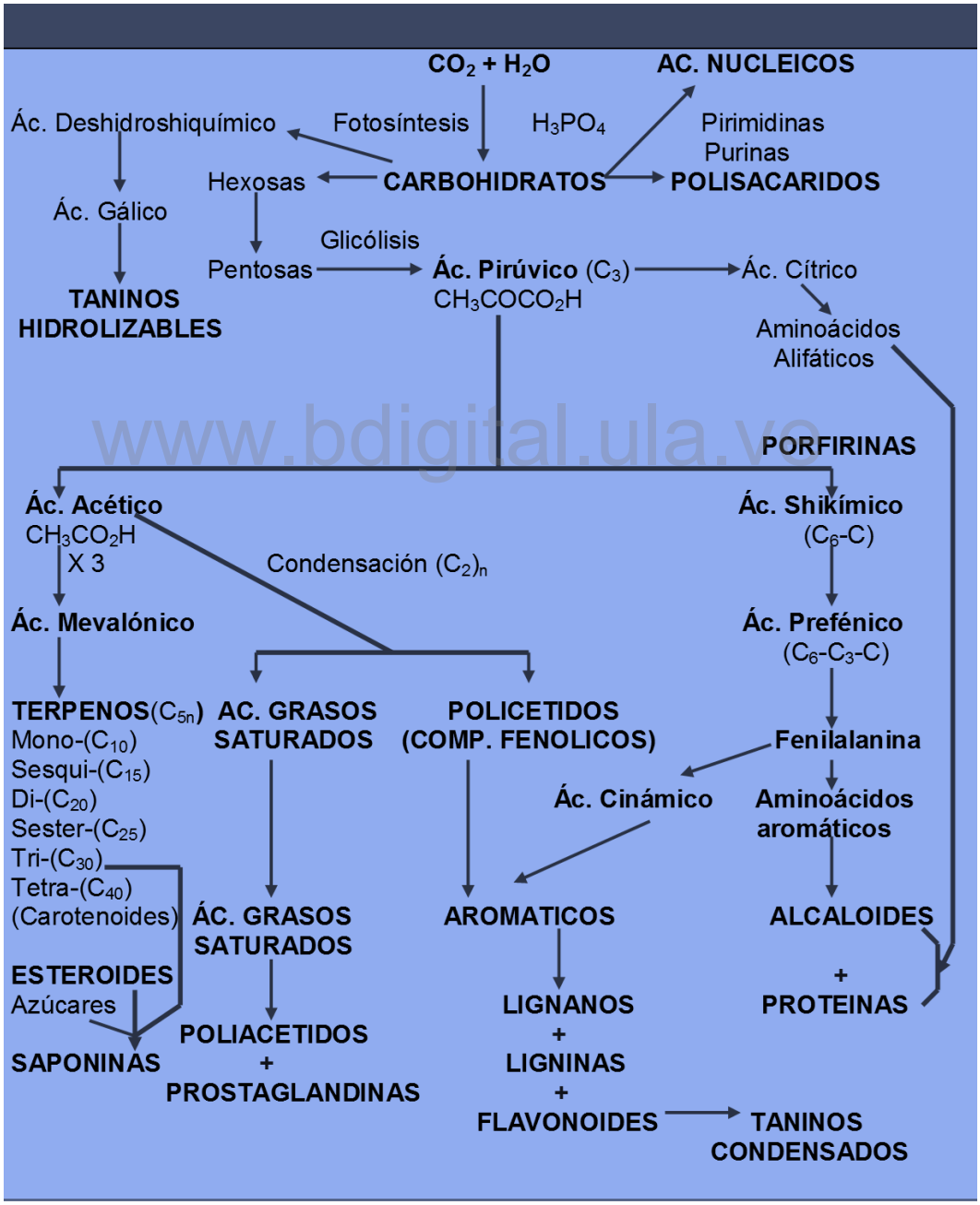
Clasificación de los Productos Naturales

Estos productos se pueden clasificar según su estructura, bioformación, fuente de producción y acción biológica. No obstante, el criterio más acertado es aquel que usa la biosíntesis como denominador común, la cual; comprende la formación de metabolitos primarios y secundarios. Existen dos vías metabólicas importantes las cuales dan lugar a la formación de una gran cantidad de metabolitos, como son la ruta metabólica del ácido mevalónico que origina todo el grupo de terpenos y la ruta metabólica del ácido shiquímico responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas (Ávalos, Pérez y Carril, 2009) (ver Esquema 1). Dentro de los principales compuestos considerados hasta hoy como fitoquímicos se encuentran los

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

terpenos (carotenoides y saponinas), polifenoles (flavonoides), los fitoestrógenos (isoflavonas y lignanos), los compuestos azufrados (glucosinolatos), polisacáridos (glucanos) y los fitoesteroles (Cseke, Kirakosyan, Kaufman, warber, Duke y Brielman, 2006).

Esquema 1. Biosíntesis de los Principales Metabolitos.



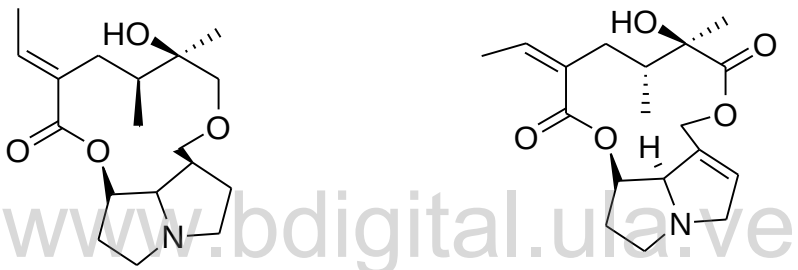
Fuente: Tomado y modificado de Vanaclocha y Cañigueral, 2003.

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

Según Anaya (2000), algunos de ellos son:

***Alcaloides*:** Son compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno básico, muchos de ellos son insolubles o poco solubles en agua y reaccionan con los ácidos para formar sales. Entre estos, se encuentran la neoplatifilina **(17)** y senecionina **(18)** (Cuadro 5) que son alcaloides pirrolizidinicos presentes en diferentes especies del género *Senecio* de la familia Asteraceae (Blanco-Olano, Olascuaga, Rubio y Valdiviezo, 2020).

Cuadro 5. Alcaloides del Género *Senecio* (Asteraceae).



www.bdigital.ula.ve

neoplatifilina **(17)** senecionina **(18)**

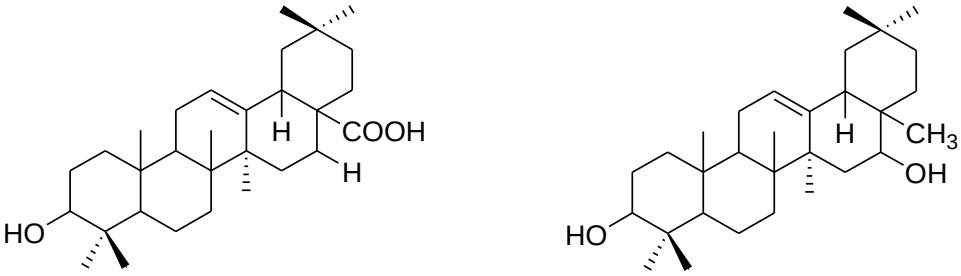
Fuente: Blanco-Olano *y cols.,* 2020.

***Triterpenos*:** Son terpenos con 30 carbonos cuyo esqueleto está constituido por seis unidades de isopreno, la ciclación de los triterpenos se produce de formas muy diversas y están relacionados con los esteroles y saponinas. Entre ellos los triterpenos del género *Baccharis*: ácido oleanólico **(19)** y el maniladiol **(20)** de núcleo oleanano (Cuadro 6) (Prada, Orduz y Coy, 2016).

***Esteroles*:** Son alcoholes sólidos con 27 a 29 átomos de carbono, en cuya cadena lateral pueden insertarse radicales metilo (serie ergostano) o radicales etilo (serie estigmastano). Entre estos el estigmasterol **(21)** y *β*-sitosterol **(22)** (Cuadro 7) aislados de *Ageratum conyzoides* L., (Asteraceae) (Kamboj y Saluja, 2008).

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

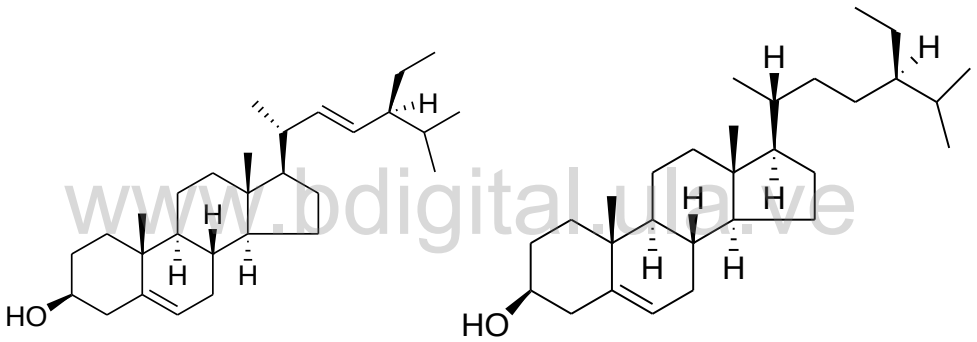
Cuadro 6. Triterpenos del Género *Baccharis* (Asteraceae).



ácido oleanólico **(19)** maniladiol **(20)**

Fuente: Prada *y cols.,* 2016.

Cuadro 7. Esteroles de *Ageratum conyzoides* L., (Asteraceae).



estigmasterol **(21)** *β*-sitosterol **(22)**

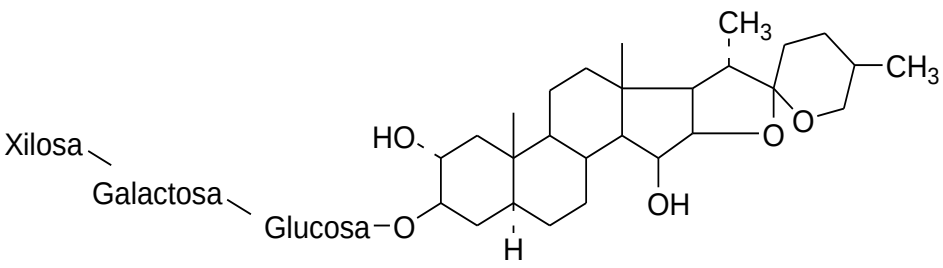
Fuente: Kamboj y Saluja, 2008.

www.bdigital.ula.ve

***Saponinas*:** Son glicósidos que se encuentran distribuidos ampliamente en las plantas y están formadas por una aglicona de origen terpénico, esteroidal o esteroidal alcaloide; al cual se une por el hidroxilo del carbono-3 una cadena ramificada de azúcares, la cual puede ser de hasta cinco moléculas, usualmente glucosa, arabinosa, ácido glucurónico, xilosa y ramnosa. Su nombre se debe a sus propiedades jabonosas. Por ejemplo la digitonina **(23)** es un glucósido formado por un pentasacárido y el esteroide digitogenina presente en Asteraceae (Cuadro 8) (Díaz, 2009).

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

Cuadro 8. Ejemplo de Saponina en Géneros de las Asteraceae.



digitonina **(23)**

Fuente: Díaz, 2009.

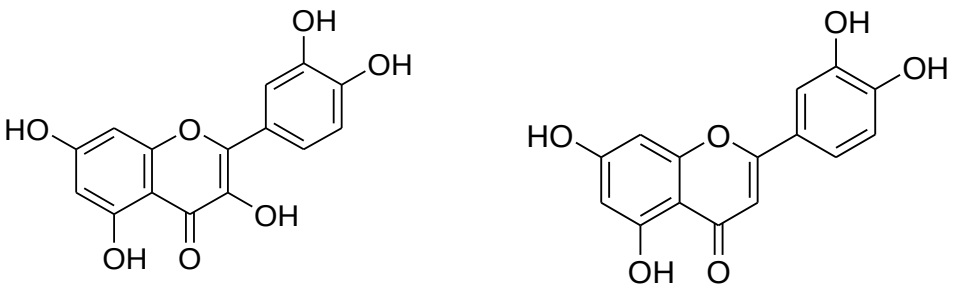
***Taninos*:** Las plantas presentan una mezcla compleja de compuestos fenólicos, entre ellos los flavonoides poliméricos de alto peso molecular y estructuras mal definidas que por hidrólisis producen antocianidinas y flavanoles. Estas sustancias son de origen vegetal, no nitrogenadas, solubles en agua, alcohol y acetona. Se ha repostado la presencia de taninos en una gran variedad de especies de la familia Asteraceae como: *Taraxacum officinale*, *Bidens pilosa*, *Heliopsis oppositifolia*, *Acmella mutisii*, entre otras, reportadas en extractos etanólicos (Aguirre-Obando, Duarte, Álvarez y Jiménez, 2018).

www.bdigital.ula.ve

***Flavonoides*:** Son metabolitos secundarios de las plantas, generalmente amarillos, que se encuentran en los jugos celulares y en los pétalos de las flores de algunas plantas en forma de glucósidos de diversos azucares (glucosa, galactosa, pentosa), otros tienen carácter vitamínico y aplicaciones terapéutica como la quercetina **(24)** y la luteolina **(25)** (ver Cuadro 9) que posee propiedades antioxidantes, antinflamatorias, anticancerígeno, entre otras. Estos compuestos se han aislado en diferentes especies de la familia Asteraceae, por ejemplo en la *Artemisia annua* L., *Aster tataricus* L., *Cynara scolymus* L., (alcachoja) y *Arthemis nobilis* (manzanilla romana) (Caia, Lou, Sun y Corke, 2004; Shi, Huang, Zhu, Ong, Zhao, Lu *y cols.,* 2007).

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

Cuadro 9. Flavonoides Aislados de Especies de Asteraceae.

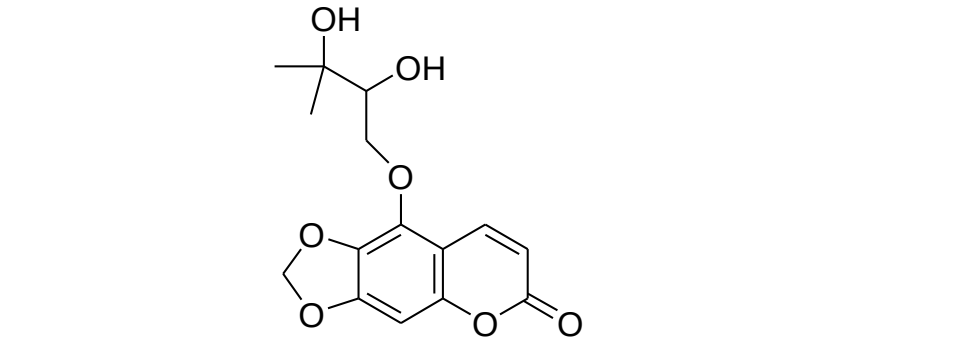


Fuente: Caia *y cols.,* 2004; Shi *y cols.,* 2007.

***Cumarinas*:** Son productos naturales, pertenecen al grupo de compuestos conocidos como benzopironas, consistentes en un anillo bencénico unido a una pirona, la fluorescencia de la cumarina es muy sensible a la posición y la naturaleza de los constituyentes sobre el anillo de benzopiranona. El sabadinol **(26)** (Cuadro 10) es una cumarina aislada de la especie *Pterocaulon interruptum* DC., de la familia Asteraceae (Winkler, Gomes, Dallarmi, Mayumi y Delle, 2006).

www.bdigital.ula.ve

Cuadro 10. Cumarina de *Pterocaulon interruptum* (Asteraceae).



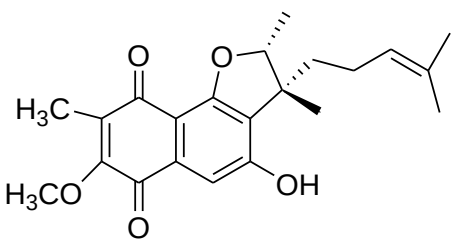
Fuente: Winkler *y cols.,* 2006.

***Quinonas*:** Se considera dentro de la serie aromática, las quinonas dependen exclusivamente del sistema de dobles enlaces conjugados y

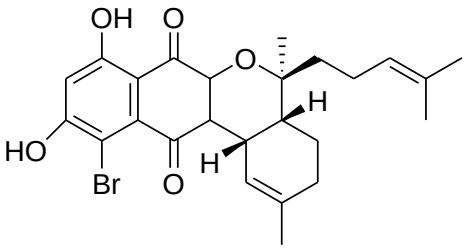
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

son extraordinariamente variadas. Ejemplo la furaquinocina C **(27)** y marinona **(28)** (Cuadro 11), que pertenecen a un pequeño grupo de naftoquinonas de naturaleza isoprénica (Peña, 2011).

Cuadro 11. Ejemplo de Naftoquinonas de Naturaleza Isoprénica.



furaquinocina C **(27)**



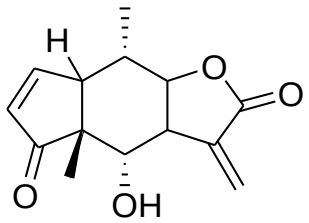
marinona **(28)**

Fuente: Peña, 2011.

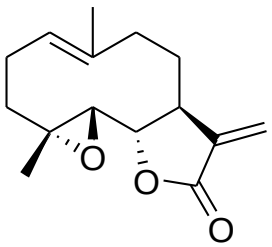
www.bdigital.ula.ve

***Lactonas Sesquiterpénicas*:** Constituyen un grupo de compuestos homogéneos amargos, difíciles de saponificar. Se originan a partir del ácido mevalónico, derivando casi todos de la estructura del germacranolido. Estos compuestos son muy abundantes en la familia Asteraceae, por ejemplo: la helenalina **(29)** de la *Arnica montañosa* y el parthenolido **(30)** presente en la *Tanacetum parthenium* (Cuadro 12) (Bermejo, Léon, Brouard, Hernández, López, Eiroa *y cols.,* 2011).

Cuadro 12. Lactonas Sesquitérpenicas Presentes en Asteraceae.



helenalina **(29)**



parthenolido **(30)**

Fuente: Bermejo *y cols.,* 2011.

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

Extractos Vegetales

Son concentrados obtenidos por tratamientos de productos vegetales con solventes apropiados tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos con una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (Lizcano y Vergara, 2008).

Consistencia de los Extractos

Según Castillo y Martínez (2007), de acuerdo a la consistencia y concentración de principio activo, los extractos se clasifican en: Fluidos, secos, blandos y crioextractos.

- *Extractos Fluidos:* Son extractos de drogas que con la concentración prescrita de etanol, están preparados de forma que una parte de droga corresponde a una parte o dos partes del extracto fluido, teniendo en cuenta que 85 partes de droga seca corresponden a 100 partes de planta fresca.

www.bdigital.ula.ve

- *Extractos Secos:* Son aquellos que tienen una consistencia seca y son fácilmente pulverizables, se obtienen por evaporación del disolvente y desecación del residuo.

- *Extractos Blandos:* Poseen una concentración de principio activo superior a la de la droga original y tienen consistencia semisólida. El disolvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas. Los extractos blandos son poco estables y resultan difíciles de manipular; por lo que no se utilizan.

- *Crioextractos:* Se obtiene por molturación de la droga vegetal correctamente desecada, sometida a condiciones de congelación (-196 °C), mediante inyección de nitrógeno líquido, de forma que los

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

principios activos no se ven alterados por la acción del calor desprendido en un proceso de molturación y que, dependiendo de la droga vegetal, puede llegar a ser hasta 70 °C.

Métodos de Obtención de los Extractos Vegetales

Frecuentemente se usa la extracción con solventes orgánicos de bajo punto de ebullición tales como alcohol, acetato de etilo y además con baja reactividad. Algunas veces es conveniente extraer los compuestos lipídicos del material vegetal con éter de petróleo (extracto etéreo) o hexano. El alcohol es más eficaz para recuperar metabolitos secundarios. En el caso de extracción con agua, los extractos son evaporados bajo presión reducida o liofilizados (Castillo y Martínez, 2007).

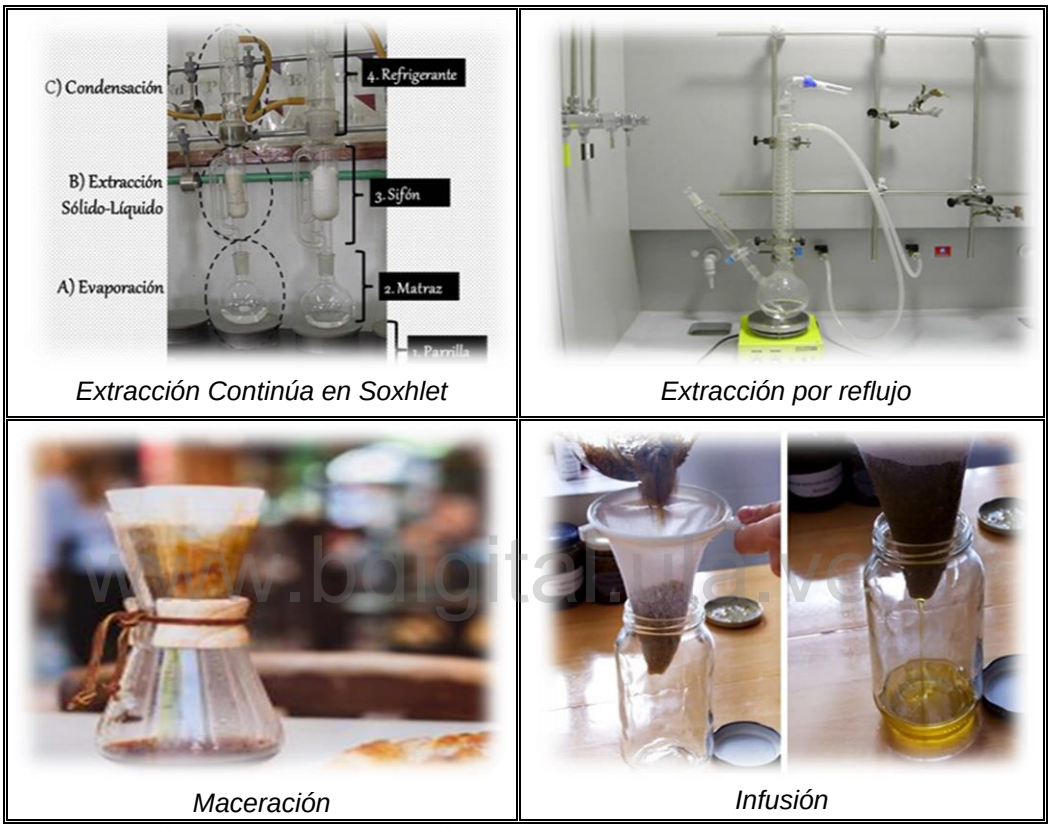
Según Bruneton (2001), los extractos se pueden obtener a través de (Figura 6):

www.bdigital.ula.ve

- *Extracción Continúa en Soxhlet*: El material seco se posa en una cámara central y el solvente se hace evaporar en caliente, en un recipiente inferior, el vapor del solvente asciende al condensador y gotea sobre el material vegetal.
- *Extracción por Reflujo:* El material vegetal y el solvente se colocan en un balón el cual tiene acoplado un refrigerante, se calienta, el solvente evaporado se condensa y vuelve a mezclarse con el material vegetal.
- *Maceración:* Consiste en el contacto prolongado durante cierto tiempo de la especie vegetal con el solvente, donde este ejerce su acción sobre toda la fracción vegetal. Circulando en todas las direcciones y extrayendo sus principios activos hasta producirse una concentración en equilibrio con la del contenido celular.

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

- *Infusión:* Es una solución diluida de constituyentes fácilmente solubles de la droga vegetal cruda. Se realiza sumergiendo las partes a utilizar de la planta en una cantidad de agua hirviendo, se deja reposar unos 15 minutos y se filtra a través un tamiz o papel de filtro.



Extracción Continúa en Soxhlet | *Extracción por reflujo*

Maceración | *Infusión*

Figura 6. Métodos de Obtención de los Extractos Vegetales.

Fuente: Lucana y Huanca, 2014.

Tamizaje Fitoquímico de los Extractos Vegetales

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Por lo tanto, consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de

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

reacción de color y precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo (Nikolain, 2000).

Entre las pruebas químicas para dicho tamizaje, se encuentran:

***Alcaloides*:** La detección de alcaloides se lleva a cabo con agentes reveladores que se basan en la capacidad que tiene los alcaloides en estado de sal, obtenidas a partir de extractos ácidos que, al combinarse con el yodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tungsteno, forman precipitados con coloraciones específicas. Los reactivos generales que se utilizan para detectar alcaloides son los descritos por: Wagner, Mayer, Dragendorff, Hager, Bertrand, y Erlich como prueba específica para el grupo pirrol (Crews y Berthiller, 2010).

***Saponinas y Esteroles*:** Permiten ser identificadas por el ensayo de Liebermann- Burchard el cual reconoce en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, ya que ambos tipos de productos poseen un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6. En donde se protona el grupo OH libre y se deshidrata la molécula esteroidea, obteniéndose el ion carbonio 3,5-colestadieno, que constituye el primer paso de la reacción (Bermejo, Pereira, Cintra y Morales, 2014).

www.bdigital.ula.ve

***Flavonoides*:** Los flavonoides poseen un núcleo benzopirona que producen coloraciones rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado, según el método de Shinoda (Bermejo *y cols.,* 2014).

***Taninos y Polifenoles*:** Los compuestos fenólicos se detectan por la coloración parda que producen en presencia de una solución de cloruro férrico al 1 % (Marcano y Hasegawa, 2002).

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

***Antraquinonas*:** Las sustancias con compuestos quinonicos, al ser tratadas con KOH (0,5 N) y acidificadas con ácido acético, al someterse a separación con benceno, producen una capa orgánica que puede contener antraquinonas, estas últimas se identifican mediante la alcalinización con hidróxido de amonio, para producir una sustancia colorada, que varía desde amarillo al violeta, según la concentración del metabolito en la sustancia (Marcano y Hasegawa, 2012).

Generalidades de las Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares, relativamente simple, debido a que su material genético no está encerrado por una membrana nuclear especial, las células bacterianas se denominan procariontes y suelen presentar diversas formas, la forma de bastón de los bacilos, esférica u oval de los cocos y la forma de tirabuzón o curva de los espirilos, son los más comunes (Granados y Villaverde, 2003).

www.bdigital.ula.ve

Según la coloración de Gram se clasifica en: bacterias Gram positivas, que presentan una pared compuesta por varias capas de peptidoglicano; conformando una estructura gruesa y rígida, además contienen ácido teicoico. Mientras que las Gram negativas, presentan una capa fina de peptidoglicano unido a la lipoproteína de la membrana externa y se encuentra en el periplasma, una sustancia gelatinosa localizada entre la membrana externa y la membrana plasmática (Figura 7) (Granados y Villaverde, 2003).

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

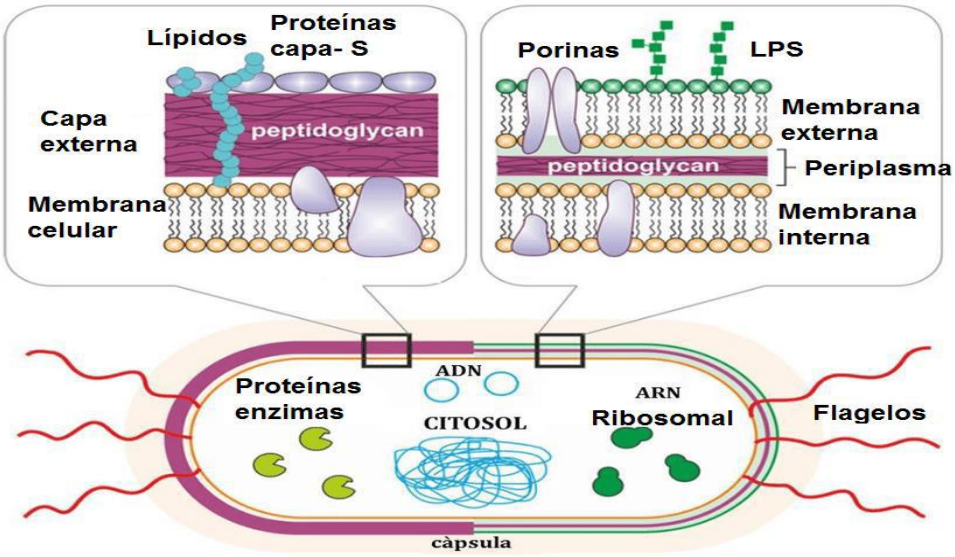


Figura 7. Estructuras Bacterianas de Gram positivas y Gram negativas. Fuente: Tortora *y cols.*, 2007.

Bacterias Gram positivas

www.bdigital.ula.ve

***Género Staphylococcus*:** Está formado por 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, son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre). Está implicada con el síndrome de piel escaldada (descamación diseminada del epitelio, generalmente en lactantes), shock tóxico (intoxicación multisistémica), impétigo, foliculitís, forúnculos, carbuncos, bacteriemia, endocarditis, neumonía, osteomielitis, artritis séptica, entre otras (Murray, 2006).

***Género Enterococcus*:** Son cocos Gram positivos que se disponen en pareja, crecen en medios usuales, son aerobios y anaerobios

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

facultativos, generalmente no hemolíticos, catalasa negativa, crecen en caldo de 6,5 % de cloruro de sodio, hidrolizan la esculina y crecen en presencia de 40 % de sales biliares. Los *Enterococcus faecium y Enterococcus faecalis*, ocasionan bacteriemias primarias en pacientes granulopénicos y endocarditis bacteriana, además de producir infecciones urinarias y abdominales (Tortora *y cols.*, 2007).

Bacterias Gram negativas

***Género Klebsiella*:** Son bacilos Gram negativos, no esporulados, anaerobios facultativos, inmóviles, causantes de enfermedades infecciosas oportunistas y los principales causantes de infecciones nosocomiales, se aíslan con frecuencia en pacientes que se encuentran hospitalizados en unidad de cuidados intensivos (UCI) y que su enfermedad de base sea la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), diabetes mellitus, en aquellos que tienen un daño en el parénquima pulmonar, esta bacteria es causante de absceso pulmonar y neumonía grave. La colonia de esta bacteria es fermentadora, su característica principal es tener una consistencia gelatinosa (Tortora *y cols.*, 2007).

www.bdigital.ula.ve

***Género Escherichia*:** Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tribu *Escherichia*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea. Morfológicamente, las colibacterias son bacilos rectos generalmente flagelados perítricos y, por tanto, móviles. Pueden multiplicarse tanto en condiciones aerobias como anaerobias y son fácilmente cultivables en medios nutritivos sencillos.

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

Catabolizan glucosa, lactosa y otros azúcares, mientras que no pueden utilizar urea ni citratos (Vilariño, 1988).

Su identificación en el laboratorio se realiza en base a la coloración de Gram, y su prueba principal para diferenciarla es la oxidasa siendo negativa ya que la bacteria no produce la enzima citocromo oxidasa como la mayoría de las enterobacterias. Para identificarla se hacen pruebas bioquímicas como la fermentación de carbohidratos (glucosa, lactosa), producción de gas y motilidad. Es causante de las infecciones urinarias, sepsis, gastroenteritis e insuficiencia renal. Resistente a múltiples antibióticos (Forbes, Sahm y Weissfeld, 2007).

***Género Pseudomonas*:** Es un patógeno ubicuo, oportunista y bastante persistente en el medio ambiente. Esta bacteria tiene forma de bastón aproximadamente de 0,5 - 1 µm in diámetro y de 1,5 - 5 µm de largo. Cuentan con un flagelo polar que le confiere la motilidad necesaria. Se considera a esta especie como bacteria aerobia facultativa debido a la capacidad que tiene para crecer en medios anaerobios tomando el nitrógeno o arginina como terminal de aceptación de protones (Tortora *y cols*., 2007).

www.bdigital.ula.ve

Este patógeno puede llegar a persistir de manera eficaz en el agua y en el suelo viviendo con un requerimiento nutricional mínimo y tolerando diversos medios físicos. Puede crecer entre 20 y 43 ºC, y al crecer en altas temperaturas se diferencia del resto de las otras especies. Se caracteriza por ser parte del grupo de no fermentadores que tienen en común la incapacidad de fermentar lactosa, con la capacidad de utilizar fuentes de carbono y nitrógeno como acetato y amoniaco, obteniendo energía de la oxidación de azúcares (Forbes *y cols*., 2007).

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

Resistencia Bacteriana

Existen microorganismos capaces de tolerar o resistir ciertas condiciones físico-químicas y biológicas adversas. Donde quiera que exista un cambio de susceptibilidad bacteriana provocado por un agente que ha sido poco efectivo en contra de cierto microorganismo, éste se considera como resistente. Existen microorganismos no susceptibles y por lo tanto intrínsecamente resistentes a un agente en particular por su naturaleza fisiológica o bioquímica, los microorganismos susceptibles pueden volverse insensibles por mutaciones o por la incorporación de información genética que codifica a la resistencia (Kummerer, 2004).

El fenómeno de la resistencia se puede entender en base a dos factores: los antibióticos que actúan como un agente selectivo, que ayuda a propagar a los microorganismos que tienen el segundo factor: los genes de resistencia. A nivel de la célula bacteriana, los principales mecanismos de la resistencia a los antibióticos incluyen: sistemas de eflujo activo de la droga, mutaciones que resultan en alteraciones de la permeabilidad celular, degradación celular de los antibióticos y alteraciones de sus blancos celulares (Figura 8) (Murray, 2006).

www.bdigital.ula.ve

Tipos de Resistencia Bacteriana

***Mecanismos de Resistencia Natural*:** Las bacterias pueden presentar resistencia a antibióticos como resultado de mutaciones cromosomales o por intercambio de material genético mediante el transporte de genes de resistencia a través de varios mecanismos como: Transducción, Conjugación, Transformación, Transposición (Cabrera, Gómez y Zúñiga, 2007).

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

***Mecanismos de Resistencia Adquirida*:** Existen cuatro mecanismos de resistencia adquirida. Las bacterias pueden utilizar más de un mecanismo, según Cabrera *y cols*., (2007) son:

- Modificación Enzimática o Destrucción del Antibiótico: Es el mecanismo de resistencia que utilizan algunas bacterias contra medicamentos betalactámicos. El ejemplo más representativo son las betalactamasas, enzimas que inactivan el antibiótico al hidrolizar el anillo betalactámico de la molécula. Otra clase importante de antibióticos que son destruidos por enzimas, son los aminoglicósidos. Se sabe que hay tres tipos de modificaciones catalizadas por *O*-fosfotransferasas (OPH), *O*-adeniltransferasas (ANT) y N-acetiltransferasas (ACT) que inactivan estos medicamentos.

- Impermeabilidad al Antibiótico: Existen diferencias en la composición de la envoltura celular de las bacterias y en especial en la cantidad del peptidoglicano junto con grandes proteínas de membrana externa llamadas porinas. Estas porinas varían en número y tamaño y funcionan como canales acuosos que generan una ruta hidrofílica a través de la estructura de la membrana hacia el espacio periplásmico. La resistencia se relaciona con la poca cantidad de moléculas de porina, las mutaciones que resultan por la alteración de la forma y el número de las ya existentes, influyen en la permeabilidad a los antibióticos, por lo cual se presentan diversos tipos de resistencia a través de la membrana.

- Alteración o Producción de Nuevos Sitios Blanco: Los cambios en el sitio blanco del antibiótico son uno de los mecanismos más importantes de resistencia a los antibióticos, pues evitan el efecto bactericida/bacteriostático que estimula la resistencia.

www.bdigital.ula.ve

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

- Presencia de Bombas de Eflujo que Expulsan el Antibiótico: El mecanismo de eflujo para múltiples agentes antimicrobianos contribuye a la resistencia intrínseca y adquirida contra tales agentes. El análisis del genoma de bacterias Gram positivas y Gram negativas ha confirmado la amplia distribución de estos sistemas. Este modo de resistencia puede llegar a disminuir o inclusive suprimir la susceptibilidad a un amplio rango de antimicrobianos. El diseño de eflujo (bomba) es mediado por proteínas de transporte, que confieren resistencia a los componentes tóxicos.

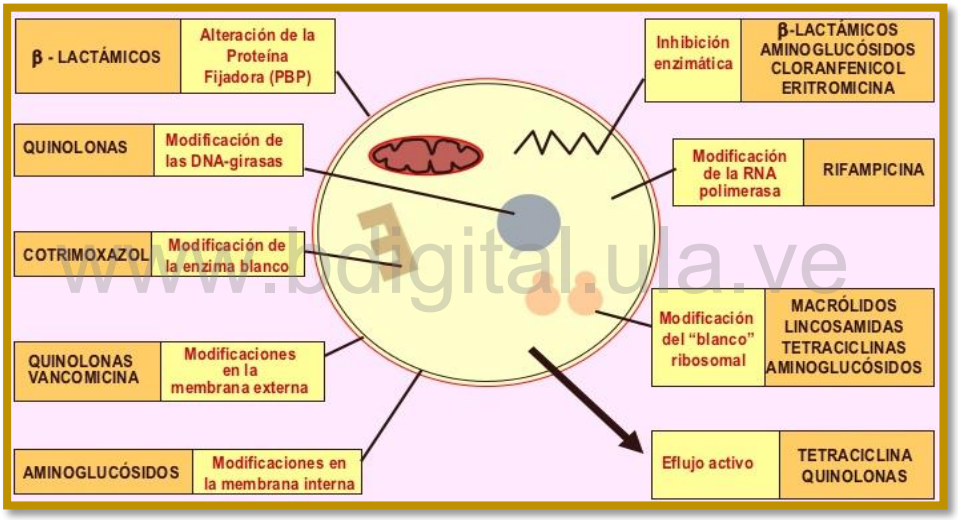


Figura 8. Mecanismos de Resistencia Bacteriana.
Fuente: Murray, 2006.

***Mecanismos de Acción de Antibióticos en la Célula Bacteriana*:** Los antibióticos se pueden definir como toda sustancia química derivada o producida por microorganismos que tiene la capacidad, a bajas concentraciones, de inhibir el desarrollo o disminuir otros microorganismos. Los antibióticos pueden actuar de dos maneras: como microbicidas, es decir, que aniquilan las formas vegetativas de los gérmenes, específicamente se denominan bactericidas. Como microbiostático, donde inhibe el crecimiento de microorganismos (Forbes

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

y cols., 2009). Según De Ahumada, Santana y Serrano (2002) el mecanismo de acción de los antibióticos se clasifican en:

- *Antibióticos que Inhiben la Síntesis de la Pared Bacteriana:* La desaparición de esta pared conduce al estallido de la bacteria. Los antibióticos utilizados pertenecen al grupo de penicilinas, cefalosporinas, Vancomicina®, quinolonas y Fosfomicina®.

- *Antibióticos que Alteran la Permeabilidad de la Membrana Celular de los Microorganismos:* Permite la salida de compuestos indispensables para la sobrevivencia de la bacteria. Los antibióticos son: polimixinas, y los antifúngicos Nistatina® y Anfotericina B®.

- *Antibióticos que Inhiben la Síntesis de Proteínas en las Bacterias:* Como consecuencia, estas no crecen ni se reproducen. Entre ellos se encuentra el Cloranfenicol®, las tetraciclinas y los macrólidos.

www.bdigital.ula.ve

- *Antibióticos que dan Lugar a la Formación de Proteínas que no son útiles para el Germen:* Pertenecen los aminoglucósidos y las quinolonas.

Generalidades de los Hongos

Los hongos son organismos eucariontes, cuyas células poseen núcleo diferenciado que contiene el material genético, encerrado por una membrana nuclear. Los organismos del reino Fungí pueden ser unicelulares o multicelulares. Los hongos multicelulares como las setas pueden asemejarse a las plantas. Sin embargo, no tienen la capacidad de realizar la fotosíntesis. Algunos de estos, nombrados como hongos verdaderos, tienen membranas compuestas por una sustancia denominada quitina. Morfológicamente, los hongos y las levaduras, son

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

microorganismos ovales más grandes que las bacterias. Algunos forman estructuras visibles denominadas micelios, compuestas por filamentos largos (hifas) que se ramifican y entrelazan. A estos últimos se les conocen como hongos filamentosos o mohos. Estos pueden reproducirse de forma sexual o asexual (Tortora *y cols*., 2007).

Género *Candida*

El género *Cándida* son hongos unicelulares o levaduras. Forma parte de la familia Cryptococcaceae, presenta células ovoides de 3 - 5 µm por 612 µm. Se reproducen por blastoconidias, crecen generalmente en medios aerobios a una temperatura óptima entre 25 – 37 °C y a un pH entre 2,5 – 7,5. Su principal representante es *Cándida albicans,* aunque muchas otras especies son fuente bien documentada de infecciones. Esta levadura está presente en la mayoría de los humanos como un microorganismo comensal ubicuo, se encuentra normalmente en piel, estomago, colón, vagina, recto y cavidad oral. A pesar de ello, en algunos pacientes en donde su sistema de defensa está severamente comprometido por procesos tales como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), inmunosupresión por trasplantes de órganos, diabetes, quimioterapias, edad avanzada y anormalidades inherentes al sistema inmune, etc. Además, puede convertirse en un patógeno que causa infecciones locales o sistémicas (Vilariño, 1988).

www.bdigital.ula.ve

Mecanismos de Resistencia de los Hongos

La resistencia puede ocurrir por una variedad de mecanismos que incluyen mutaciones que modifican la diana, sobreexpresión de los genes, sobreexpresión de bombas de achique de la membrana que sacan el antifúngico del interior de la célula fúngica, alteración e interferencia con la acción sobre enzimas de la biosíntesis del ergosterol y la disminución

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

de la permeabilidad de la membrana plasmática al fármaco (Pontón y Quindós, 2006).

Probablemente uno de los mecanismos más importantes de resistencia sea el fallo en la acumulación intracelular del fármaco mediante la sobreexpresión de los genes que codifican las bombas de achique. Además, una resistencia muy infrecuente se ha relacionado recientemente con mutación genética (ERG1/FSK1) (Pontón y Quindós, 2006).

Mecanismo de Acción Antifúngica

En la actualidad existen tres clases principales de compuestos con actividad antifúngica autorizados para el uso clínico, los polienos, los azoles y las equinocandinas, los cuales actúan frente a una de las dos dianas principales en los hongos: el ergosterol, componente esencial de la membrana plasmática fúngica responsable de su fluidez y permeabilidad y el *β*-glucano, polisacárido estructural que constituye más del 50 % de la pared celular de los hongos (Rivero, 2019) (Figura 9).

www.bdigital.ula.ve

El mecanismo de acción se basa en su unión al ergosterol, generando poros en la membrana plasmática fúngica que dan lugar a su disrupción y posterior pérdida del contenido citoplasmático, lo que resulta en la muerte celular. Además, se ha propuesto otro mecanismo de acción en el que está implicada la liberación de especies reactivas de oxígeno provocada por la inducción de estrés oxidativo y por peroxidación lipídica de las células fúngicas, viéndose afectada la permeabilidad de su membrana plasmática (Rivero, 2019).

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

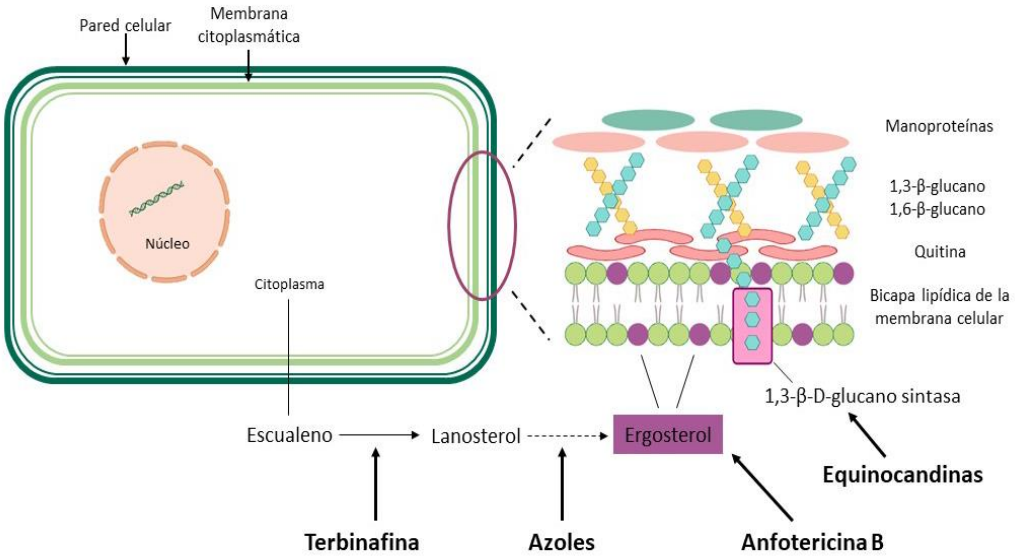


Figura 9. Mecanismos de Acción de las Diferentes Familias de Antifúngicos de Uso Clínico. Fuente: Rivero, 2019.

www.bdigital.ula.ve

Actividad Antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se utiliza para evaluar la actividad inhibitoria de una planta o sus derivados, la potencia de un compuesto a la susceptibilidad de un microorganismo a concentraciones conocidas. Esta actividad biológica puede variar desde la inhibición completa o parcial del crecimiento microbiano hasta la acción bactericida o fungicida. Para evaluar la actividad es preciso conocer el modelo microbiano perfectamente y tenerlo controlado en las condiciones de laboratorio, ya sea por procedimientos *in vitro* o *in vivo* (Ramírez y Marín, 2012).

Métodos para Determinar la Actividad Antimicrobiana

***Método de Difusión en* Agar:** El método de difusión en agar se considera uno de los procedimientos más utilizados para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales sobre

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

microorganismos aerobios. También es llamado como técnica de Kirby-Bauer, la cual se fundamenta en la inhibición del crecimiento del microorganismo *in vitro*, mediante la difusión del antimicrobiano en un medio de cultivo, generando una zona que se conoce como formación de halos de inhibición; zona en la que una concentración crítica del antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano. El diámetro del halo de inhibición del crecimiento expresa la sensibilidad o resistencia del microorganismo, este halo se mide en milímetros (Reyes, Palou y López, 2014).

A nivel metodológico, existen dos formas de realizar la difusión: impregnando un papel filtro con una solución de concentración conocida del extracto y colocándolo sobre la superficie del agar o perforando el agar, con un sacabocados, y vertiendo en el orificio una solución de concentración conocida del antimicrobiano a evaluar, conocido como método de difusión en pozo (Ingraham y Ingraham, 1998).

www.bdigital.ula.ve

***Método de Dilución en Caldo*:** La prueba de dilución y microdilución en caldo se basa en la exposición de los microorganismos a distintas concentraciones de los antimicrobianos, en diluciones a la mitad, con el objetivo de observar su crecimiento y, con base en este, definir la mínima concentración en la que no se observa turbidez (García, 2000).

La prueba de dilución y microdilución seriada se realiza en tubos o placas de pocillos con medios líquidos, que contienen concentraciones seriadas crecientes extracto diluidas en caldo, inoculado con una concentración definida de células del microorganismo. Posterior a la incubación a temperatura y tiempo óptimo. La presencia de turbidez o sedimentación indican crecimiento visible del microorganismo (Reyes *y cols*., 2014).

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

***Método de Dilución en Agar*:** En éstas lo que se pretende es hacer un gradiente decreciente de la concentración de un antibiótico dado y probarlo contra un inóculo bacteriano estandarizado. La escogencia de la concentración en la que se inicia el gradiente, depende del antibiótico y del tipo de cepa a probar. La actividad antimicrobiana se detecta por la inhibición del crecimiento microbiano en toda la placa (Reyes *y cols*., 2014).

Sin embargo, la inhibición de algunas especies con determinados antifúngicos, como ocurre con los hongos filamentosos y las equinocandinas, es solo parcial y el hongo es capaz de producir hifas muy cortas y ramificadas. En esos casos se determina la concentración mínima efectiva (CME) (Rivero, 2019) (ver Figura 10).

www.bdigital.ula.ve

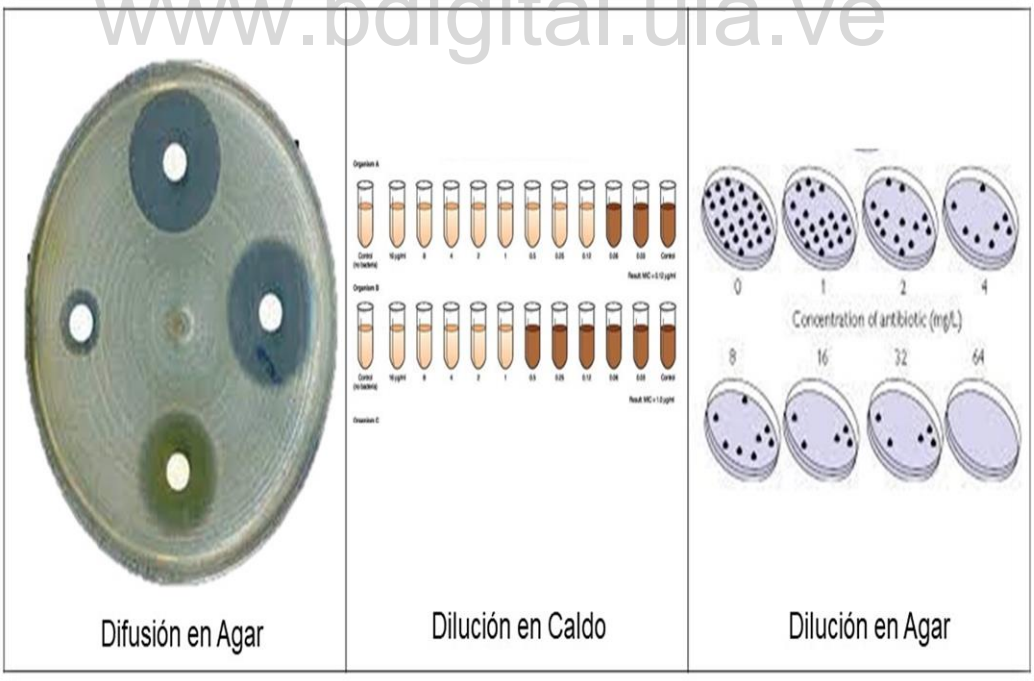


Figura 10. Diferentes Métodos para la Determinación de la Actividad Antimicrobiana.

Fuente: Reyes *y cols*., 2014; Rivero, 2019.

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

Definición Operacional de Términos

Glosario Botánico (Tomado de Bruneton, 2001; Acosta, 2008).

- **Ápice:** Extremo superior o punta de la planta.

- **Aquenios:** Es un fruto seco e indehiscente (Semilla cerrada en los carpelos) proveniente de un ovario súpero. Es un fruto monospermo, es decir; una sola semilla.

- **Arbusto:** Vegetal leñoso, de menos de 5 m., de altura, sin un tronco preponderante, porque se ramifica a partir de la base.

- **Capitulo:** Es una inflorescencia racemosa con eje inflorescencial acortado y ensanchado, donde se disponen las flores las cuales son sésiles, pueden ser hermafroditas y/o unisexuales y estériles.

www.bdigital.ula.ve

- **Corola:** Verticilo interno de las flores que tienen perianto heteroclámideo, puede ser dialipétala o gamopétala. Presenta una textura más fina y colores más brillantes que el verticilo externo (cáliz).

- **Hierba:** Planta no lignificada o apenas lignificada, de manera que tiene consistencia blanda en todos sus órganos, tanto subterráneos como epigeos.

- **Hoja:** Órgano aéreo nacido lateralmente de un tallo, que constituye el follaje de la planta. Su función principal es la elaboración de sustancias nutritivas mediante la fotosíntesis.

- **Hojas Alternas:** Son hojas pecioladas que nacen de una en una a lo largo del tallo.

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

- **Inflorescencia:** Forma de agruparse las flores en una planta, los principales tipos de inflorescencia son racimos, espiga, umbela, capítulo y cima.

- **Peciolo:** Pezón o rabillo que une la lámina de la hoja a la base foliar a al tallo.

- **Pedúnculo:** Es una ramita que se prolonga de la hoja, flor o fruto.

- **Receptáculo:** Extremo de la flor donde descansan los diversos verticilos. En una inflorescencia, parte engrosada del pedúnculo en el que se asientan las flores.

Glosario Médico (Tomado de Fica, 2005; Rivero, 2019).

www.bdigital.ula.ve

- **Antibacteriano:** Relativo a una sustancia que destruye las bacterias o inhibe su crecimiento o reproducción.

- **Antibiótico:** Relacionado con la capacidad de destruir o impedir el desarrollo de un organismo vivo.

- **Bactericida:** Acción mediante la cual se eliminan los microorganismos de una matriz, y en contraste, el término bacteriostático, se refiere únicamente a la supresión del crecimiento y desarrollo bacteriano, de tal modo que mientras el agente antimicrobiano este en contacto con el microorganismo se impide la proliferación.

- **Concentración Mínima Efectiva (CME):** Se define como la concentración de antifúngico más baja a la que se observa un crecimiento aberrante del hongo con respecto a su crecimiento control en el mismo medio pero sin fármaco.

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

Sistema de Hipótesis

Hipótesis de Investigación

Es posible que la actividad antimicrobiana *in vitro*, se relacione con la composición química de los extractos vegetales de las hojas y flores de *Centratherum punctatum* Cass., perteneciente a la familia botánica Asteraceae contra cepas de referencia ATCC.

Hipótesis Nula

www.bdigital.ula.ve

Es posible que no exista relación entre la actividad antimicrobiana *in vitro* con la composición química de los extractos vegetales de las hojas y flores de *Centratherum punctatum* Cass., perteneciente a la familia botánica Asteraceae contra cepas de referencia ATCC.

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

Operacionalización de las Variables

La operacionalización de las variables es el procedimiento mediante el cual se determinan los indicadores que caracterizan a las variables de una investigación. Para establecer el sistema de variables es necesaria la definición conceptual y la operacionalización de las mismas, es decir, de las dimensiones y los indicadores de cada una (Palella y Martins, 2010).

El proceso de la operacionalización de las variables garantiza que los objetivos propuestos sean alcanzados. En la tabla 4 se muestran las variables que se asumieron en la presente investigación y los indicadores que las definen como tales.

Variable Dependiente: Actividad antimicrobiana de *Centratherum punctatum* Cass., contra cepas de referencia ATCC.

www.bdigital.ula.ve

Variable Independiente: Composición química de los extractos de hexano y etanol de las hojas y flores de *Centratherum punctatum* Cass.

Variable Interviniente: Metodología utilizada en la preparación de los cultivos y los materiales e instrumentos usados en la ejecución de las técnicas.

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

Tabla 1. Operacionalización de las Variables.

Variable	Tipo	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensiones	Indicador
Actividad antimicrobiana de la especie *Centratherum punctatum* Cass., contra cepas de referencia ATCC.	Dependiente Discreta	La actividad antimicrobiana es la capacidad que poseen las plantas de producir una sustancia capaz de eliminar los microorganismos o inhibir su crecimiento (Brooks *y cols*., 2010).	Método de difusión de agar en disco (Kirby Bauer)	Sensible/ Resistente Frente a cepas de: - *Staphylococcus aureus* - *Enterococcus faecalis* - *Escherichia coli* - *Pseudomonas aeruginosa* - *Klebsiella pneumoniae* - *Candida albicans* - *Candida krusei*	Tamaño del halo de inhibición del crecimiento microbiano en milímetros (mm)
Composición química de los extractos de hexano y etanol de las hojas y flores de *Centratherum punctatum* Cass.	Independiente Discreta	Son todas aquellas moléculas activas generadas por las plantas, que no son necesarias para su crecimiento y reproducción (Brown *y cols*., 2004).	Pruebas químicas cualitativas también conocidas como Tamizaje fitoquímico.	-Presente -Ausente -No determinado De los diferentes metabolitos evaluados.	*Alcaloides*: Turbidez o precipitados. *Esteroles y/o triterpenos:* Coloración azul o verde para esteroides; coloración rosa, rojo, magenta o violeta para triterpenos. *Saponinas*: Espuma. *Compuestos Fenólicos*: Coloración de azul a negro. *Taninos*: Precipitado blanco. *Flavonoides*: Coloración naranja a rojo. *Antraquinonas y quinonas*: Coloración roja. *Cumarinas*: La presencia de fluorescencia azul-violeta. *Lactonas/Lactonas Sesquiterpénica*: Coloración naranja.

Realizada por el autor Peralta, 2022.

www.bdigital.ula.ve

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

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Enfoque de la Investigación

La presente investigación se planteó con un enfoque mixto, en el que se presentan los resultados tanto cualitativos como cuantitativos. Estas investigaciones (cualitativas-cuantitativas) se combinan para ofrecer una imagen general, y muy eficiente sobre las características del sujeto sometido a estudio y sobre la relación entre las variables. Según, Hernández, Fernández y Baptista (2010) el enfoque cuantitativo representa un conjunto de procesos, es secuencial y probatorio. Cada etapa precede a la siguiente y no se puede "brincar" o eludir pasos, el orden es riguroso y la recolección de los datos se fundamenta en la medición. Esta recolección se llevó a cabo al utilizar procedimientos estandarizados y aceptados por una comunidad científica.

www.bdigital.ula.ve

Por otro lado, para el análisis de los datos fue imprescindible la aplicación de un enfoque cualitativo según las caracteristicas observadas durante el desarrollo de las pruebas ejecutadas, mediante criterios de comparación y discriminación estructurada de acuerdo a los fundamentos establecidos (Hernández *y cols*., 2010), en cuanto a la identificación de metabolitos secundarios.

Tipo y Diseño de la Investigación

Según Hurtado (2010), el tipo de investigación se relaciona con la interrogante de estudio, la cual enfatiza lo que se quiere saber. Condicionalmente, esto marca el logro general de lo que se desea

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

obtener durante el proceso de la investigación. Específicamente, en esta investigación se basó en la relación entre la actividad antimicrobiana y la composición química de extractos vegetales de *Centratherum punctatum* Cass. (Asteraceae) en cepas de referencia.

Es por ello que este trabajo se planteó como una investigación de tipo explicativa, ya que los estudios explicativos van más allá de la descripción de conceptos o fenómenos o del establecimiento de relaciones entre conceptos; es decir, están dirigidos a responder por las causas de los eventos y fenómenos físicos. Como su nombre lo indica, su interés se centra en explicar por qué ocurre un fenómeno y en qué condiciones se manifiesta o por qué se relacionan dos o más variables (Hernández *y cols*., 2010).

www.bdigital.ula.ve

En relación al diseño de investigación, este engloba los elementos necesarios para recolectar los datos. Específicamente, los elementos que se consideran primordiales en la investigación corresponden con el dónde, cuándo y con la amplitud de la información que se recolectará. Con respecto al dónde, el diseño fue mixto y experimental. Se consideró un diseño mixto ya que, fue un proceso de búsqueda de campo y laboratorio (natural y artificial) (Hurtado, 2010).

Asimismo, fue experimental porque se trabajó con un grupo control, se manipuló la variable independiente para lograr algún efecto en la variable dependiente. Con respecto a la temporalidad, de acuerdo a los lineamientos de Hurtado (2010), esta investigación fue contemporánea y transeccional porque se estudió el evento en el presente y en un único momento en el tiempo.

En cuanto a la amplitud, se consideró unieventual debido a que se analizó solo una variable dependiente e independiente.

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

Población y Muestra

El conjunto de seres que poseen características o eventos de interés, enmarcados dentro de criterios de inclusión, se conoce como población, que según su extensión, puede ser finta o infinita, requiriéndose la selección de una muestra (Hurtado, 2010). Por consiguiente, la muestra es un subconjunto representativo de un universo o población (Arias, 2006).

Partiendo de la anterior definición la población o universo de la presente investigación fue infinita y corresponde a la planta *Centratherum punctatum* Cass., (Asteraceae) (Figura 11).

Figura 11. Planta *Centratherum punctatum* Cass., Cultivada en el Jardín Botánico de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. (Foto: El autor Peralta, 2019).

Las muestras se recolectaron en el Jardín Botánico de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y se analizó en el laboratorio del Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de la misma Facultad, de la Universidad de Los Andes. De la población señalada se

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

tomó una muestra no probabilística, la cual, según Hernández *y cols.*, (2010) corresponde al tipo de muestra cuya selección no depende de que todas tengan la misma probabilidad de ser elegidos, sino la decisión del investigador. Esta muestra estuvo integrada por la recolección de 264,65 gramos de las partes aéreas de la especie vegetal *Centratherum punctatum* Cass. La determinación botánica se realizó en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, con la ayuda de un taxónomo especialista, el Prof. Pablo Meléndez. Un voucher de la muestra se depositó bajo el número 01. L. Peralta, para la preparación de los extractos y el ensayo *in vitro* de la actividad antimicrobiana (ver Figura 12).

www.bdigital.ula.ve

Figura 12. Ejemplar de la Especie *Centratherum punctatum* Cass. (Asteraceae). (Foto: El autor Peralta, 2019).

Procedimientos de la Investigación

Obtención de los Extractos de *Centratherum punctatum* Cass.

El material vegetal fresco fue pesado y separado del tallo, obteniéndose un total de hojas (132,60 g) y flores (43,63 g) para ser sometidas a secado en estufa a 40 °C y posteriormente molienda. El

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

material seco y molido (hojas: 24,98 g, flores: 14,39 g) se colocó en extracción por reflujo con solventes de polaridad creciente: hexano y etanol, en periodos de tiempo diferentes, de forma continua para obtener el mayor número de metabolitos secundario de acuerdo con la solubilidad en los solventes empleados.

Extractos de Hexano: Las muestras se sometieron a extracción por reflujo con 200 mL de hexano a una temperatura de 50 °C hasta llegar a ebullición; posteriormente se bajó la temperatura a 40 °C y se dejó por una hora. Al enfriar se filtró a través de papel filtro y se llevó a concentración en el rotavapor. Una vez concentradas se transvasaron a frascos de color ámbar con tapa de papel aluminio con agujeros y se dejó a temperatura ambiente por 15 días para que se evaporara el solvente residual.

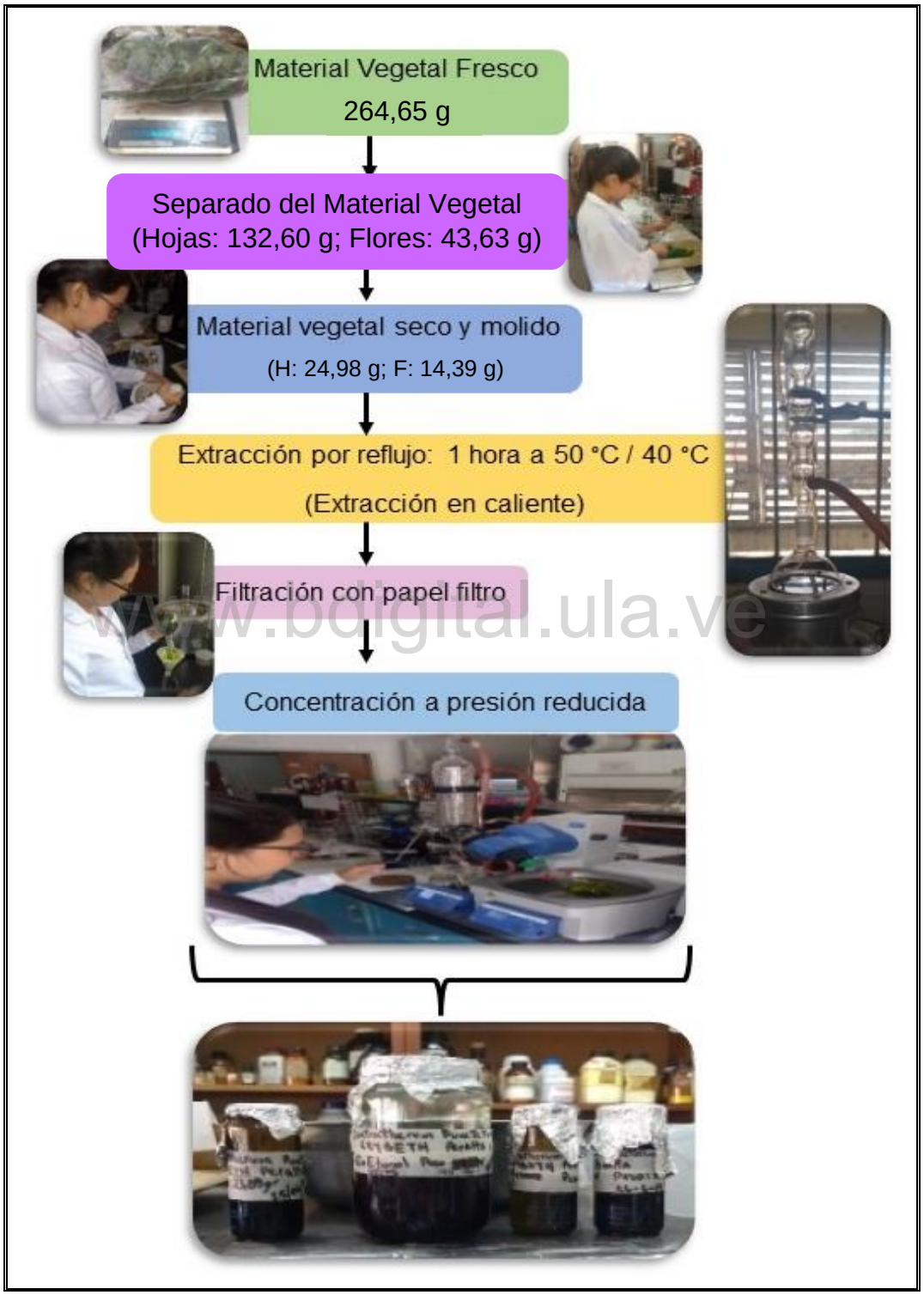
www.bdigital.ula.ve

Extractos de Etanol: Las muestras se sometieron a extracción por reflujo con 150 mL de etanol a una temperatura de 50 °C hasta llegar a ebullición, luego se bajó la temperatura a 40 °C y se dejó por una hora. Posteriormente, se siguieron los mismos pasos descritos en la preparación de los extractos con hexano.

Obteniendo así cuatro (4) muestras; es decir, dos (2) de cada extracto de hojas y flores: Extracto Hexano de hojas (EHh), Extracto Hexano de flores (EHf), Extracto Etanol de hojas (EEh), Extracto Etanol de flores (EEf) con un peso de 0,41; 0,3; 1,4; 0,81 g respectivamente. Las muestras fueron almacenadas hasta el momento de utilizarlas para el ensayo. En el esquema 2 se resumen los pasos para la preparación de los extractos crudos.

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

Esquema 2. Preparación de los Extractos de *Centratherum punctatum* Cass. (Asteraceae)



Realizada por el autor Peralta, 2023.

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

Screening Fitoquímico de los Extractos de Hexano y etanol de Hojas y Flores de *Centratherum punctatum* Cass (Asteraceae)

Los extractos de hexano y etanol se sometieron a los ensayos correspondientes al tamizaje fitoquímico según los protocolos de fundamentos descritos por Marcano y Hasegawa (2002), con el fin de determinar de forma cualitativa los grupos de metabolitos secundarios, realizando el siguiente panel de ensayos:

a) Identificación de Alcaloides (Ensayo de Dragendorf-Wagner-Mayer): Se tomó una porción de cada uno de los extractos en 4 tubos de ensayo separados y se agregaran 5 mL de HCl al 10 % a cada tubo, se mezcló y se llevó a baño de María por 10 minutos, se filtró y cada uno de los filtrados se dividieron en 2 tubos para realizar el ensayo con los reactivos de Dragendorff, Wagner y Mayer. La presencia de alcaloides forma precipitados característicos de color rojo o anaranjado.

www.bdigital.ula.ve

b) Identificación de Triterpenos y Esteroles (Ensayo de Liberman-Burchard): Se disolvieron cuatro fracciones de los extractos en 0,5 mL de diclorometano anhidro. Se añadieron 0,5 mL de anhídrido acético a cada uno, estando todos los tubos tapados para evitar la evaporación de los solventes y bajo campana. Luego se le adicionaron cuidadosamente por las paredes del tubo una gota de ácido sulfúrico concentrado. La reacción es positiva para esteroles si aparece una coloración azul verdoso y color rojo, rosado o púrpura para triterpenos.

c) Identificación de Flavonoides (Ensayo de Shinoda): Se tomó 1 mL de solución de cada extracto por separado. Se añadieron algunas virutas de Mg, se sujetó el tubo con una pinza, se añadieron cuidadosamente por la pared del tubo unas gotas de HCl concentrado. La aparición de una coloración naranja o violeta, se considera una prueba positiva.

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

d) Identificación de Compuestos Fenólicos (Prueba con $FeCl_3$): A un (1) mL de solución de cada uno de los extractos, se le agregó una gota de solución acuosa de cloruro férrico al 10 %. La formación de color azul o verde indicó la presencia de fenoles.

e) Identificación de Saponinas (Ensayo de la Espuma): Se colocó en un tubo una pequeña cantidad de cada uno de los extractos y se le adicionó un (1) mL de agua. Se agitó vigorosamente durante un minuto. La prevalencia de la espuma durante más de 5 minutos indica la positividad de la prueba.

f) Identificación de Taninos (Prueba de la Gelatina): Las fracciones alcohólicas secas se disolvieron en agua por separado, aparte se preparó una solución al 10 % de gelatina y se puso en contacto con el extracto. La desnaturalización de la proteína que se evidencia con la presencia de un precipitado o la ruptura de la gelatina, se considera positiva la prueba.

www.bdigital.ula.ve

g) Identificación de Quinonas (Prueba del H_2SO_4): En una cápsula de porcelana se colocó una porción de cada extracto y se adicionó una gota de ácido sulfúrico concentrado. La formación de una coloración roja indica la presencia de quinonas.

h) Identificación de Antraquinonas (Prueba del NH_4OH): A los extractos previamente disueltos se les añadió 3 gotas de Hidróxido de Amonio concentrado. La presencia de una coloración roja en los primeros dos minutos, indica la presencia de antraquinonas.

i) Identificación de Cumarinas (Prueba luz UV): Se disolvió cada extracto en su propio solvente (0,5 mL). Se Adicionó 2 gotas de hidróxido

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

de amonio concentrado. Se considera positiva la prueba si se presenta una fluorescencia azul-violeta bajo luz UV.

j) Identificación de Lactonas Sesquiterpénicas (Prueba de Baljet): Se agregó una porción del extracto a un tubo de ensayo, se disolvió una porción del extracto en etanol, luego se adicionó una gota de hidróxido de potasio 2 N en metanol. Se calentó la mezcla a ebullición de 1 a 2 minutos, se dejó enfriar y se llevó a pH de 1 con ácido clorhídrico 0,5 N. Se adicionó una gota de cloruro férrico al 1 %. Las coloraciones roja, violeta o rosa indican que la prueba es positiva para este metabolito (García, Cruz, Alarcón, Nieto y Gallegos, 2019).

Determinación de la Actividad Antimicrobiana de *Centratherum punctatum* Cass. (Asteraceae)

www.bdigital.ula.ve

Para evaluar la actividad antimicrobiana se empleó la técnica de difusión en agar con discos, llamada también método de Kirby-Bauer descrito por Velasco *y cols.,* 2007, empleando bacterias y levaduras de referencia internacional: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (ATCC 14053) y *Candida krusei* (ATCC 6258). Este método es utilizado para estimar la susceptibilidad de los agentes microbianos ante determinadas sustancias químicas, en el caso de la presente investigación se refiere a la susceptibilidad ante los extractos crudos (Rodríguez *y cols.,* 2005).

Para valorar la actividad antibacteriana se llevó a cabo en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”, bajo la asesoría de la Profesora Yndra

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

Cordero de Rojas y para evaluar la actividad antifúngica en el Laboratorio de Micología “Dr. Corrado Capretti”, bajo la asesoría de los profesores Clara Díaz y Alexander Moreno, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

***Preparación de las Muestras*:** Se pesaron 10 mg de cada extracto de etanol (EEh; EEf) y se disolvieron en 1mL de dimetil sulfóxido DMSO. Obteniéndose para los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana las muestras de los extractos etanólicos: (EEh, EEf) a una concentración de 10 mg/mL. Las muestras en hexano no fueron ensayadas por problemas de disolución.

***Preparación del Inóculo*:** Cada inóculo bacteriano se preparó en solución salina fisiológica (SSF) estéril (0,85 % p/v NaCl), a partir de un cultivo fresco de cada cepa bacteriana repicada en caldo Müeller-Hinton y las levaduras en agar Sabouraud dextrosa suspendidas en 1 mL de SSF, hasta que se logró una turbidez correspondiente al patrón de McFarland Nº 0,5 (1 x 10^{6-8} UFC/mL) para las cepas bacterianas y en el caso de las levaduras al patrón de McFarland Nº 1 (3 x 10^{8} UFC/mL, UFC: unidades formadoras de colonias) (ver Esquema 3).

www.bdigital.ula.ve

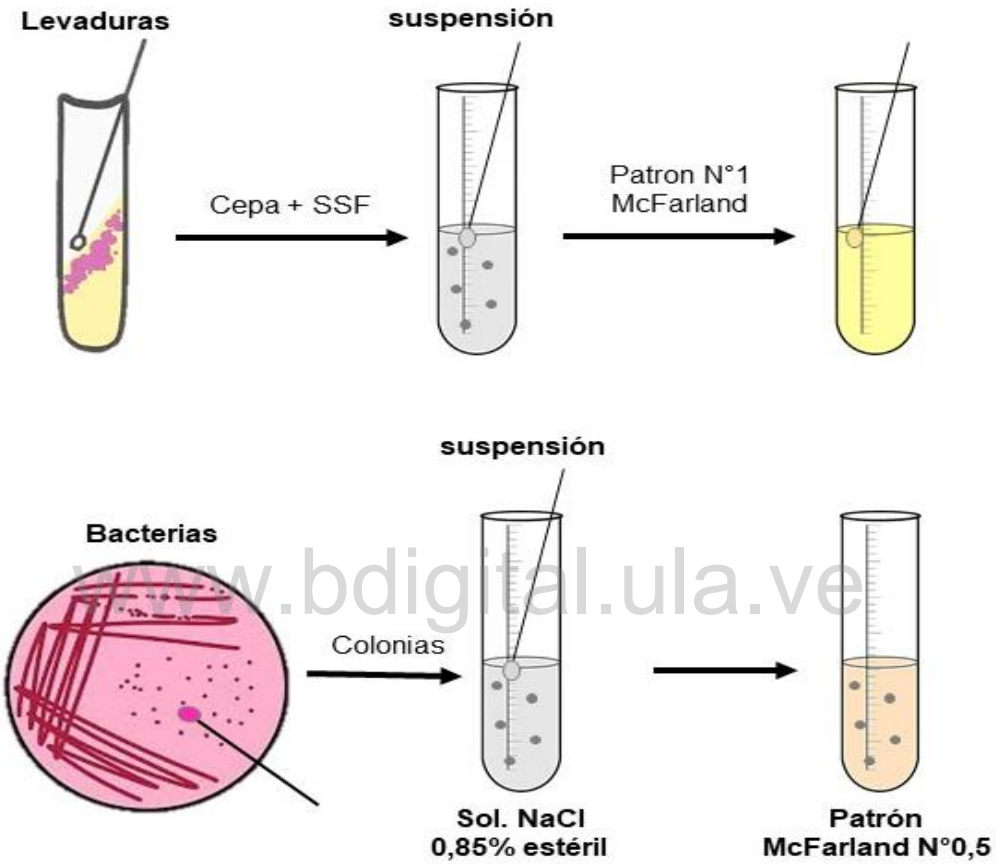
***Preparación de las Placas de Petri*:** Para las bacterias se depositaron aproximadamente 20 mL de agar Müeller-Hinton (HIMEDIA®) en placas de Petri previamente esterilizadas (CLSI, 2018), y para las levaduras 20 mL de agar Müeller-Hinton (HIMEDIA®), suplementado con 2 % p/v de glucosa y azul de metileno (0,05 µg/mL) (NCLS, 2004). Posteriormente las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente, se realizó el control de esterilidad y se conservaron a 4 ºC hasta su uso.

***Preparación de los Discos*:** Se emplearon discos de papel de filtro de 2 mm de grosor por 6 mm diámetro, los cuales se organizaron en una

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

placa de Petri y se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), durante 90 minutos previos al ensayo.

Esquema 3. Preparación de los Inóculos.



www.bdigital.ula.ve

Realizado por el autor Peralta, 2023.

***Inoculación*:** En el caso de las cepas bacterianas, una vez preparado el inóculo de cada microorganismo, se sembró en la superficie del agar con un aplicador estéril y para las levaduras se suspendió 1 mL cada inóculo en 20 mL de agar Müeller-Hinton modificado, mezclando en forma envolvente con la finalidad de depositarlos en placas de Petri una vez solidificado el agar y seco el inóculo. Se colocaron los discos de papel de filtro, previamente impregnados con cada muestra (Extracto de etanol

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

de hojas y flores: EEh, EEf) para las cepas bacterianas se impregnaron con 10 µL y 20 µL para las levaduras.

También se utilizaron discos de antibióticos comerciales como control positivo con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos estudiados (Tabla 5) y como control negativo discos impregnados con 10 µL del solvente dimetil sulfóxido (DMSO). Todos los discos sobre la superficie del agar inoculado.

Tabla 5. Antibióticos como Control Positivo en el Estudio de la Actividad Antimicrobiana.

Microorganismos	Compuestos de Referencia
Staphylococcus aureus ATCC 25923	Eritromicina ® 15 µg
Enterococcus faecalis ATCC 29212	Ampicilina ® 10 µg
Escherichia coli ATCC 25922	Piperacilina ® 100 µg
Klebsiella pneumonia ATCC 23357	Piperacilina ® 100 µg
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	Piperacilina ® 100 µg
Candida albicans ATCC 14053	Fluconazol® 25 µg
Candida krusei ATCC 6258	Voriconazol® 25 µg

Fuente: NCCLS, 2004.

www.bdigital.ula.ve

***Preincubación e Incubación*:** Las placas de Agar Müeller Hinton se preincubaron a 4 °C durante 3 horas aproximadamente para permitir la difusión de los extractos en estudio, posteriormente se incubaron durante 24 horas a 37° C.

***Lectura de los ensayos*:** Se realizó la lectura de los halos de inhibición a las 24 horas (Esquema 4). Una vez transcurrido el tiempo de

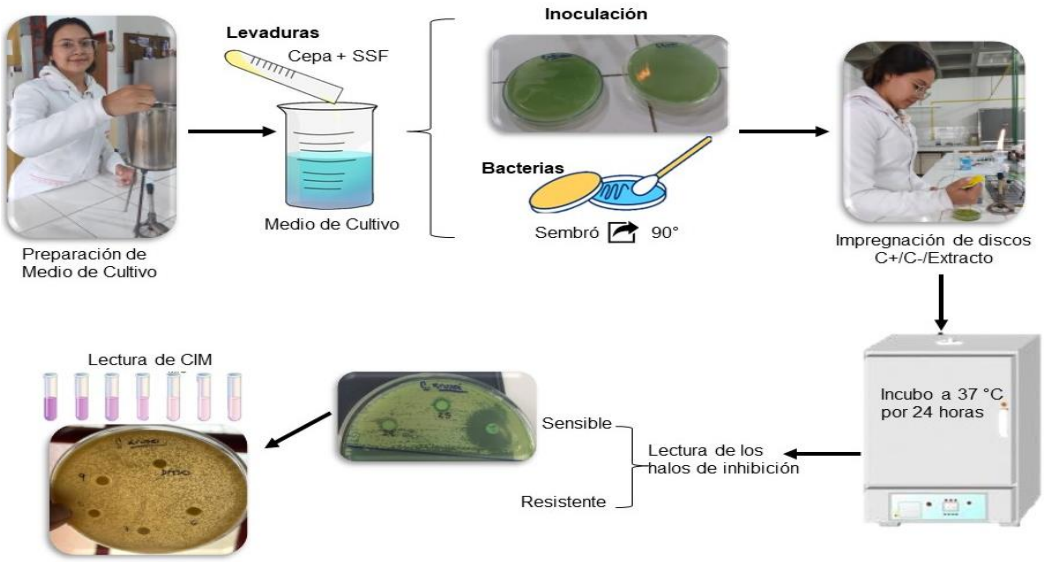
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

incubación, se procedió a examinar cada una de las placas, en las cuales se consideró como positivo la presencia de un halo de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor del disco, medida en milímetros; por el contrario, la ausencia de este halo se interpretó como negativo. Este ensayo se realizó por duplicado.

***Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)*:** Es la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo visible (CLSI, 2018). La CIM se le realizó solo contra los microorganismos que mostraron susceptibilidad a los extractos ensayados. Este método consiste en enfrentar a las cepas de referencia a diferentes concentraciones de la muestra, (Romero, 2007). En este caso se determinó la CIM en la valoración antifúngica, donde se realizaron diluciones de los extractos con DMSO con un rango de concentración de 9 - 1 mg/mL, se impregnaron discos con 20 µL de cada dilución para luego ser evaluados por el método de difusión en agar con discos.

www.bdigital.ula.ve

Esquema 4. Análisis Microbiológico y Lectura de los Halos de Inhibición.



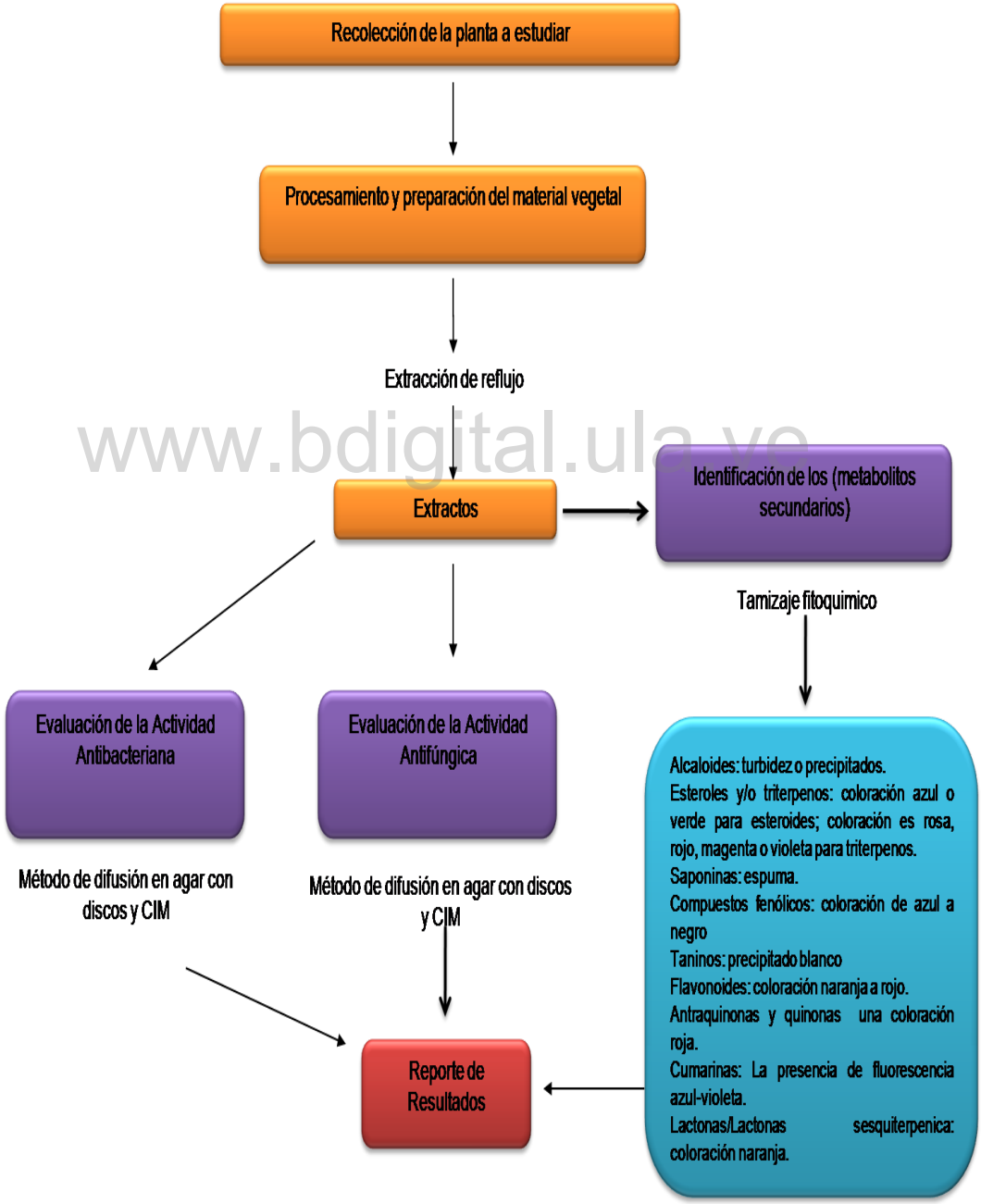
Realizado por el autor Peralta, 2023.

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

Organización de la Información

En tablas y gráficos mediante números. La metodología seguida en el presente trabajo de investigación se resume en el esquema 5.

Esquema 5. Camino Metodológico.



Realizado por el autor Peralta, 2023.

www.bdigital.ula.ve
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Screening Fitoquímico de los Extractos de Hexano y Etanol de las Hojas y Flores de *Centratherum punctatum* Cass., (Asteraceae)

Los ensayos de caracterización cualitativa realizados a los extractos de hexano y etanol de las hojas y flores de *Centratherum punctatum* Cass., indican la presencia de esteroles en los extractos de las hojas (EHh y EEh). En las flores se determinó la presencia de triterpenos (EHf) y flavonoides, compuestos fenólicos, seguido de alcaloides (EEf) como los más abundantes. Cabe resaltar que la mayoría de los compuestos identificados estaban presentes en los extractos de las flores de *C. punctatum,* donde se evidencio la presencia de taninos y lactonas sesquiterpénicas, aunque poco abundantes (Tabla 6).

www.bdigital.ula.ve

Según, Chitra y Benno (2018) entre los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de las flores de *Centratherum punctatum* Cass., se encuentran: Terpenoides, fenoles, taninos y quinonas. Aunque previamente los autores Chitra y Brindha en el 2015, usaron solventes como éter de petróleo, cloroformo, etanol y agua, para identificar los compuestos bioactivos de las partes aéreas de *C. punctatum* Cass., donde la prueba química cualitativa preliminar reveló la presencia de alcaloides, fenoles, quinonas, flavonas, esteroles y proteínas. Concluyendo que estos constituyentes químicos pueden contribuir en el tratamiento de diversas enfermedades para las que se utiliza como agente anticancerígeno, analgésico y cicatrizante de heridas.

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

Tabla 6. Tamizaje Fitoquímico de los Extractos de Hexano y Etanol de Hojas y Flores de *Centratherum punctatum* Cass (Asteraceae)

Metabolitos	Pruebas	Hojas		Flores	
		EHh	EEh	EHf	EEf
Alcaloides	Mayer	-	-	-	+
	Dragendorf	-	-	-	+
	Wagner	-	-	-	+
Triterpenos y Esteroles	Reacción de Lieberman-Burchard	**(Verde) ++++**	**(Verde) +++**	**(Rojo) ++**	-
Compuestos Fenólicas	Reacción con $FeCl_3$ al 10 %	ND	+	ND	++
Flavonoides	Reacción de Shinoda	-	-	-	**Naranja ++**
	Reacción con NaOH 10 %	-	+	-	**Naranja-café ++**
Cumarinas	Reacción con NH_4OH Concentrado	-	-	-	-
Antraquinonas	Reacción con NH_4OH Concentrado	-	-	-	-
Quinonas	Reacción con H_2SO_4 Concentrado	-	-	-	-
Saponinas	Reacción de Espuma	ND	-	ND	-
Taninos	Reacción Gelatina 10 %	ND	+	ND	+
Lactonas Sesquiterpénicas	Reacción NaOH	-	-	+	+

www.bdigital.ula.ve

EHh: Extracto Hexano/hojas. **EEh**: Extracto Etanol/hojas. **EHf**: Extracto Hexano/flores. **EEf**: Extracto/Etanol flores. **+++** Muy abundante. **++** Abundante. **+** Poco Abundante. **–** Negativo. **ND**: no determinado.

Por su parte, Shankaran *y cols.,* (2016) señalan la presencia de flavonoides con un importante efecto antinflamatorio en el extracto etanólico de las partes aéreas de la especie. Asimismo, Chitra y Brindha (2015) obtuvieron metabolitos secundarios como sesquiterpenos, triterpenoides, saponinas, isoflavonoides y flavonoles, del extracto acuoso de las partes aéreas de *C. punctatum*. Aunque varios metabolitos y específicamente lactonas sesquiterpénicas han sido aisladas de *Centratherum punctatum* Cass., la química de esta subespecie parece ser razonablemente constante en su amplio rango y no es significativamente

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

diferente de la de muchos miembros de la subtribu Lychnophorinae de la que se ha segregado *Centratherum* (Álvarez *y cols.,* 1998).

Por otra parte, Madhumitha *y cols.,* (2020) identificaron la presencia de alcaloides, flavonoides, fenoles, carbohidratos, taninos, proteínas, esteroides, aminoácidos y terpenoides, en el análisis fitoquímico del extracto acuoso, metanol y acetato de etilo de *C. punctatum in vivo* e *in vitro*. Finalmente, los resultados obtenidos de los metabolitos identificados en la presente investigación se correlacionan con los datos anteriormente reportados.

Actividad Antimicrobiana de los Extractos Vegetales de *Centratherum punctatum* Cass., (Asteraceae)

www.bdigital.ula.ve

Se estudió la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar con discos o método de Kirby Bauer, así como la concentración inhibitoria mínima (CIM). Las bacterias y levaduras que se utilizaron para los ensayos fueron cepas ATCC de importancia clínica.

Los resultados obtenidos de la actividad de los extractos de etanol de *Centratherum punctatum* Cass., fueron reportados en la Tabla 7, donde se observa resultados positivos significativos frente a la bacteria Gram positiva *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), con un halo de 11 mm de diámetro a una concentración de 10 mg/mL, siendo el máximo halo de inhibición del extracto de etanol de las flores (EEf) de la especie vegetal (Figura 12). De igual forma, hubo inhibición para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) en el extracto de hojas y flores (EEh; EEf) con un halo de 7 y 9 mm de diámetro, respectivamente (Figura 13).

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

En relación a las bacterias Gram negativas se observó inhibición para *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) y *Pseudomona aeruginosas* (ATCC 27853*)* con halos entre 7 y 8 mm de diámetro para ambos extractos EEh, EEf (Figuras 14 y 15). En las levaduras ensayadas, el extracto de etanol de las flores (EEf) de *C. punctatum* Cass inhibieron el crecimiento de *Candida albicans* (ATCC 14053) y *Candida krusei* (ATCC6258) presentando un halo de inhibición de 9 y 10 mm, respectivamente y una CIM de 7 mg/mL (ver Figura 16).

Los datos obtenidos con las muestras estudiadas, no guardan mucha diferencia con los reportados por Oliveira, Fonseca, Saraiva, Neves, Acre, Caetano y *cols.,* (2013) en los extractos de las hojas de *Centratherum punctatum* Cass., donde presentaron actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, a una concentración de 50 y 100 mg/mL. Dichos extractos se diluyeron en dimetil sulfóxido (DMSO) al 20%, al igual que los ensayos realizados.

www.bdigital.ula.ve

La investigación realizada por Nevada y Dennis (2013) señalaron que la especie *Centratherum punctatum* Cass., posee propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antihipersensibles, antibacterianas y antifúngicas y se usa comúnmente en preparaciones para el cuidado del cabello. Asimismo, Donga, Moteriya y Chanda (2017) señalan a la especie como una planta prometedora con propiedades antimicrobianas activa contra *Acinetobacter baumannii, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli* y *Bacillus subtilis.*

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

Tabla 7. Actividad Antimicrobiana de los Extractos de Etanol de las Hojas y Flores de *Centratherum punctatum* Cass., (Asteraceae)

Halo de Inhibición (mm)								
Microorganismos	**Extractos (10 mg/mL)**		**Antibióticos**			**Antifúngicos**		
	EEh	**EEf**	**ERI**	**AMP**	**PIP**	**FLO**	**VOR**	**CIM**
S. aureus ATCC 25923	7	9	32	-	-	-	-	ND
E. faecalis ATCC 29212	0	11	-	32	-	-	-	ND
K. pneumoniae ATCC 23357	8	7	-	-	27	-	-	ND
E. coli ATCC 25922	ND	ND	-	-	27	-	-	ND
P. aeruginosa ATCC 27853	7	7	-	-	27	-	-	ND
C. albicans ATCC 14053	-	9	-	-	-	50		7 mg/mL
C. krusei ATCC 6258	-	10	-	-	-		20	7 mg/mL

www.bdigital.ula.ve

EEh: Extracto Etanol/Hojas. **EEf**: Extracto Etanol/Flores. **ERI:** Eritromicina® 15µg. **AMP:** Ampicilina® 10µg. **PIP:** Piperacilina® 100µg. **FLO:** Fluconazol® 25µg. **VOR:** Voriconazol® 25µg. **mm:** milímetros. **ND**: no determinado. **CIM:** Concentración Inhibitoria Mínima con rango de concentración 9-1 mg/mL.

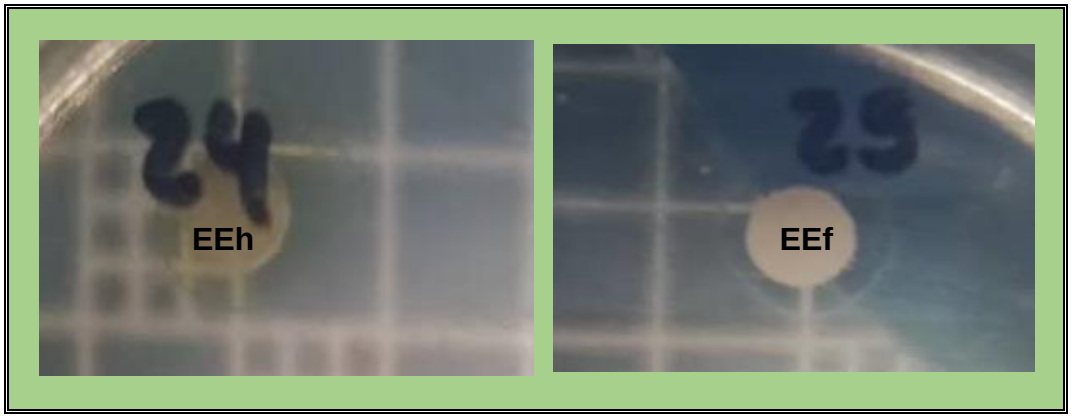


Figura 12: Resultados con la Cepa *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212). Foto: El autor Peralta, 2023.

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

Figura 13: Resultados del Ensayo con la Cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Foto: El autor Peralta, 2023.

Figura 14: Resultados del Ensayo con la Cepa *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357). Foto: El autor Peralta, 2023.

Figura 15: Resultados del Ensayo con la Cepa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Foto: El autor Peralta, 2023.

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

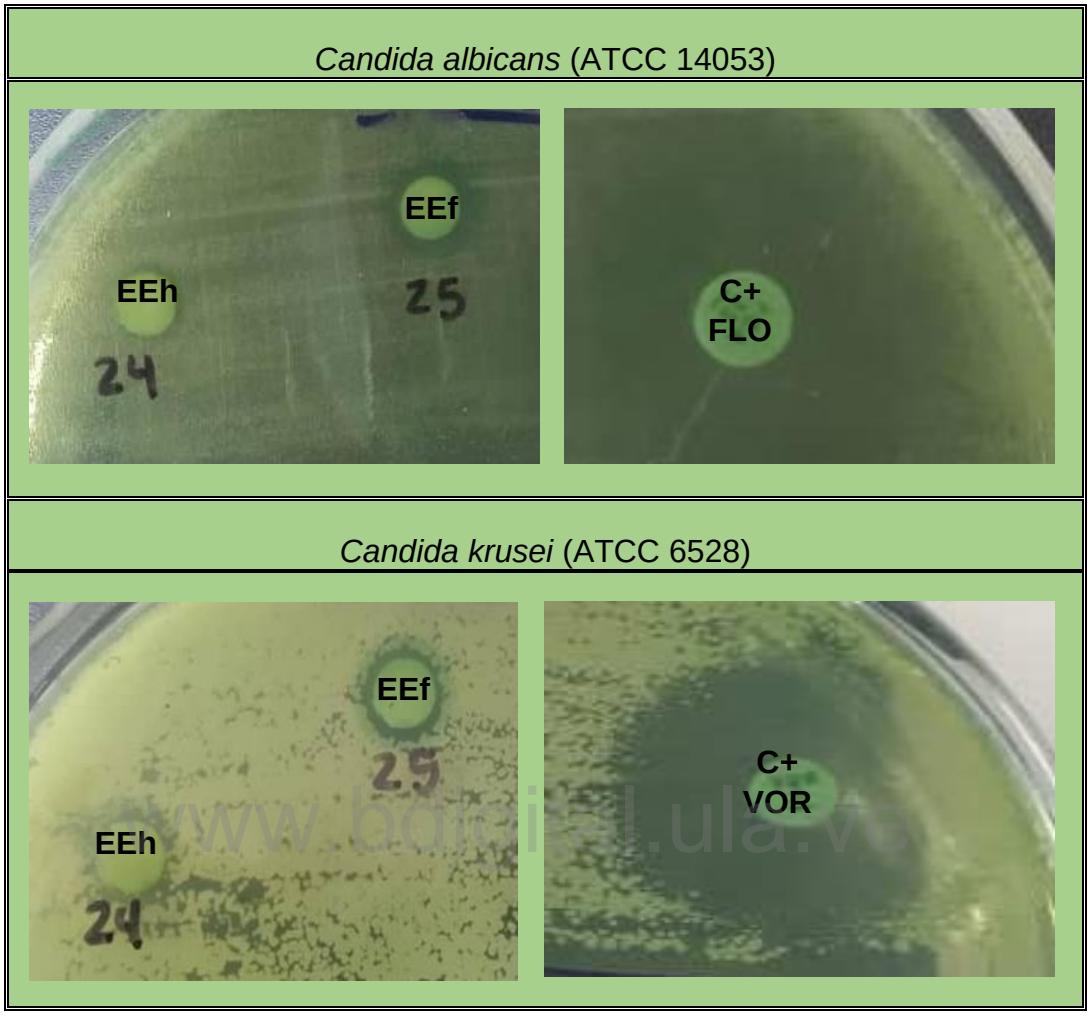


Figura 16: Resultados del Ensayo con las Cepas *Candida albicans* (ATCC 14053) y *Candida krusei* (ATCC 6258).

Leyenda: **EEh**: Extracto Etanol/Hojas. **EEf**: Extracto Etanol/Flores. **C+FLO**: Control positivo Fluconazol® 25µg. **C+VOR**: Control positivo Voriconazol® 25µg.

Por otra parte, la investigación de Hari-Vishva *y cols.,* (2022) reportan que diferentes estudios sobre extractos de las hojas, flores y raíz de *Centratherum punctatum* Cass., presentan actividad antifúngica, sobre el hongo causante de la caspa aislado de *Malassezia*. Además, de actividad antibacteriana contra bacterias patógenas como: *Acinetobacter baumanii* y *Staphylococcus aureus* resistentes a los medicamentos.

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

Ahora bien, la investigación realizada por Chitra y Benno (2018) en el extracto con metanol de las flores de *C. punctatum*, quienes obtuvieron mayor actividad antibacteriana frente a *E. coli* con un halo de inhibición de 28 mm de diámetro, para *S. aureus* 22 mm y *P. aeruginosas* fue de 20 mm a una concentración de 400 µg/mL.

En cuanto a la actividad antifúngica mostrada por el extracto de las flores de *Centratherum punctatum* Cass., este es el primer reporte en cuanto a las cepas ensayadas como *Candida albicans* (ATCC 14053) y *Candida krusei* (ATCC 6258). Al respecto, *Candida albicans* es la especie más importante del género por su alta prevalencia en el ser humano, la más patógena, debido a su habilidad para evadir a los mecanismos de defensa del hospedador, de resistir al tratamiento antifúngico, o de lesionar las células y tejidos que invade (Álvarez *y cols.,* 1998). Como consecuencia, la terapia antifúngica está jugando un papel muy importante en el cuidado de la salud y el tamizaje de plantas tradicionales en busca de nuevos antifúngicos es ahora más frecuente (Yoc, Soto, Gutiérrez y Arriola, 2012).

www.bdigital.ula.ve

Finalmente, es importante señalar que los constituyentes presentes en el extracto ensayado mostraron propiedades antimicrobianas de diferente naturaleza, es posible a que fueron extraídos con un solvente polar. Por lo tanto, el grado de polaridad del solvente influye de modo significativo en la actividad del extracto (Roseel y Srivastava, 1987).

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

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- En el screening fitoquímico de los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Centratherum punctatum* Cass., indican la presencia de esteroles en mayor abundancia. En el caso de la determinación de alcaloides, flavonoides, taninos, quinonas, lactonas sesquitérpenicas, resultaron ausentes dichos metabolitos.

- En el screening fitoquímico del extracto de hexano de las flores de *Centratherum punctatum* Cass., indica la presencia de triterpenos y en el extracto de etanol la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos y alcaloides. Todos estos metabolitos como los más abundantes.

www.bdigital.ula.ve

- En el extracto de etanol de las flores de *C. punctatum* se indicó la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, lactonas sesquiterpénicas poco abundantes.

- Los extractos de etanol de hojas y flores de *Centratherum punctatum* Cass a una concentración de 10 mg/mL mostraron inhibición frente a la bacteria Gram positiva *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), con un halo de 11mm de diámetro, siendo el máximo halo de inhibición del extracto de etanol de las flores de la especie vegetal. De igual forma, hubo inhibición para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) en el

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

extracto de hojas y flores con un halo de 7 y 9 mm de diámetro respectivamente.

- En relación a las bacterias Gram negativas se observó inhibición para *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) y *Pseudomonas aeruginosas* (ATCC 27853*)* con halos entre 7 y 8 mm de diámetro para ambos extractos.

- Los extractos de etanol de las flores de *C. punctatum* inhibieron el crecimiento de *C. albicans* y *C. kruseii*, presentando un halo de inhibición de 9 y 10 mm, respectivamente y una CIM de 7 mg/mL.

- La actividad antimicrobiana presentada por los extractos de *C. punctatum* frente a cepas de referencia internacional pueden estar asociada a los compuestos con mayor abundancia identificados, como lo son los triterpenos, esteroles y flavonoides.

- Finalmente, es importante destacar que es la primera vez que en Venezuela se realiza el estudio de la actividad antimicrobiana en levaduras de las hojas de esta especie vegetal.

www.bdigital.ula.ve

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

Recomendaciones

- Es preciso ampliar el estudio sobre la especie *Centratherum punctatum* Cass., (Asteraceae) sobre otras actividades biológicas que pudiera presentar ya que no hay suficiente información divulgada de la misma, lo cual la hace una especie de interés para la investigación.

- Ensayar el extracto hexanóico de las hojas y flores de la especie *Centratherum punctatum* Cass., (Asteraceae) para evaluar su posible actividad antimicrobiana.

- Estudiar la actividad antimicrobiana de *C. punctatum* contra diferentes especies patógenas de origen nosocomial, para contribuir con la investigación sobre dicha actividad y pueda servir como base para futuros estudios farmacológicos.

www.bdigital.ula.ve

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

BIBLIOHEMEROGRÁFIA

Acosta, P. (2008). ***Botánica general***. Guía didáctica. Editorial Universidad Técnica Particular de Loja. Escuela de ciencias de la educación. Ecuador. Consulta: 2010 Octubre 28. Disponible: http://www.utpl.edu.ec/eva/descargas/material/143/g247051.pdf

Aguirre-Obando, O., Duarte, I., Álvarez, J., y Jiménez, J., (2018). Actividad larvicida de extractos vegetales de la familia Asteraceae y modelación matemática para su uso en el control de poblaciones de *Aedes aegypti*. ***Actualidades Biológicas; 40***, (108): 5-16.

Álvarez, D., Bardón, A., Catalán, C., Gedris, T. y Herz, W. (1998). Goyazensolides and isogoyazensolides from Argentine *Centratherum punctatum ssp. punctatum.* ***Biochemical Systematics and Ecology;* 26**: 805-808.

Anaya, A. (2000). ***Ecología Química***. 1era Edición. Editores: Plaza y Valdez. México.

Arias, F. (2006). ***El Proyecto de Investigación: Introducción a la Metodología Científica****.* Caracas-Venezuela, Editorial Episteme. Pp: 57-56, 63-64.

Ávalos, A., Pérez, E. y Carril, U. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. ***Reduca: Serie de Fisiología Vegetal; 2***:119-145.

Bermejo, A., Pereira, S., Cintra, M. y Morales, G. (2014). Determination of parameters chemist-physical of dyes to 20 obtained % of the leaves,

www.bdigital.ula.ve

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

shafts and fruits of *Melia azedarach* L., (Pursiana). ***Revista Habanera de Ciencias Médicas; 13***, (5): 670-680.

Bermejo, J., Léon, F., Brouard, I., Hernández, J., López, T., Eiroa, J., Pérez, F., Estévez, F., Quintana, J., Benayache, S., y Benayache, F. (2011). Identificación y síntesis de metabolitos secundarios aislados de plantas y hongos de canarias, norte de africa y sudamérica. ***Biocancer, 5***: 196-214.

Blanco-Olano, C., Olascuaga, K., Rubio, S., y Valdiviezo-Castillo, J. (2020). *Senecio tephrosioides* Turcz., (Asteraceae): Una revisión de etnobotánica, fitoquímica y farmacología. ***Ethnobotany Research and Applications, 19***, (14): 1-14.

www.bdigital.ula.ve

Brooks, G., Morse, S., Carrol, K., Mietzner, T., y Butel J. (2010). ***Microbiología Médica*** (25ª Edición). México: Editorial Mc Graw Hill Interamericana.

Brown, T., Lemay, E., Bursten, B., y Burdge, J. (2004). ***Introducción: materia y medición. Química la Ciencia Central***. México: Prentice Hall Inc.

Bruneton, J. (2001). ***Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales***. Zaragoza: Acribia. 1100.

Cabrera, C., Gómez, R., y Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. ***Colombia Médica; 38***, (2): 149-158.

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

Caia, Y., Lou, Q., Sun, M., y Corke, H., (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticáncer. ***Life Sciencies,74***: 2157-84.

Calvillo, L. (2019). ***Centratherum punctatum* Cass. Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares**. Instituto de Biología UNAM. En: Portal de Datos Abiertos UNAM. (En línea) (Consultado, marzo 2022). México, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en:http://datosabiertos.unam.mx /IBUNAM:MEXU:969850.

Castillo, A., Pascual, Y., Cunhanune, N., Lorente, C., y Cañete, F. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas y semillas de *Morinda citrifolia* L. (Noni). ***Revista Cubana de Plantas Medicinales; 19***, (1):374-382.

www.bdigital.ula.ve

Castillo, E., y Martínez, I. (2007). ***Manual de Fitoterapia***. Barcelona, España, Elsevier Masson.

Cespedes, G., Avila, A., Martínez, B., Calderón. J. y Salgado, R. (2006). Antifungal and Antibacterial. Activities of Mexican Tarragon. ***Journal of Agricultural and Food Cheministry; 5***, (10): 3521-3527.

Chitra, B., y Brindha, P. (2014). Studies on preliminary phytochemical screening of different extracts of *Centratherum punctatum Cass*. - a traditional wound healer. ***International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences; 6***, (1): 19-22.

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

Chitra, B., y Benno, A. (2018). Phytochemical screening and GC-MS analysis of methanol extract of flower of *Centratherum puntatum* Cass. ***International Journal of Research Instinct.; 5***, (2): 26-35.

Chitra, B., y Brindha, P. (2015). Chromatographic profile frim the aqueous extract of aerial parts of *Centratherim punctatum Cass.* ***Asian Journal of Biological and Life Sciences; 4***, (2): 156-163.

Chukwujekwu, J., Van Heerden, F. y Van Staden, J. (2018). Synergistic properties of sesquiterpene lactones isolated from *Centratherum punctatum* Cass., in combination with ampicillin against beta-lactam-resistant Gram-negative bacteria. ***South African Journal of Botany; 117***: 79-82.

www.bdigital.ula.ve

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (2018). ***Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing****.* 28th ed. CLSI supplement. M100-S28. Wayne, PA.

Cordero, Y., Ustáriz, L., Araujo, L., Usubillaga, A., Rojas, F., y Moujir, L. (2017). Actividad antibacteriana de diterpenos del kaurano aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec. ***Revista de la Facultad de Farmacia; 59***: 03-07.

Cower, D., y Helfand, W. (1990). ***Historia de la Farmacia***. Madrid: Ediciones Doyma. Edición Española. Pp. 59-245.

Crespo, M. (2002). La lectura interpretativa del antibiograma: una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. ***Colombia Medicinal; 4***: 179-193.

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

Crews, C., y Berthiller, R. (2010). Update on analytical methods for toxic pyrrolizidine alkaloids. ***Analytical and Bioanalytical Chemistry;*** (396): 327-338.

Cseke, L., Kirakosyan, A., Kaufman, P., Warber, S., Duke, J., y Brielman, H. (2006). ***Natural products from plants.*** 2th Edi. USA: CRC press. Boca Raton.

De Ahumada, I., Santana, L., y Serrano, J. (2002). Farmacología práctica para diplomaturas. En: ***Ciencias de la Salud. Enfermería. Fisioterapia. Podología***. Madrid, España: Editorial Díaz de Santos.

Deepak, S. N., Alok, S., Vijay, J., Amita, J. R., y Rahmi. (2014). Antibacterial and antifungal activity of *Centratherum anthelminticum*seeds Asteraceae (Compositae). ***International Journal Pharmaceutical and Medicinal Research; 2***, (5): 136-139.

De Pérez, M. (1973). ***Estudio del contenido en ácido kaurénico en el ciclo vital de la Espeletia floffosa***. (Tesis de Grado). Universidad de Los Andes. Mérida Venezuela.

Díaz, N., (2009). Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: Saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. ***Revista de Estudios Transdisciplinarios; 1***: (2): 32-55.

Domínguez, X. (1973). ***Métodos de Investigación Fitoquímica***. México. Editorial Limusa. Pp. 69-76.

www.bdigital.ula.ve

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

Donga, S., Moteriya, P., y Chanda, S. (2017). Evaluation of antimicrobial and synergistic antimicrobial properties of *Pterocarpus santalinus*. ***Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research; 10***: (11): 204-209.

Fabri, R., Noguera, M., Dutra, L., Bouzada, M., y Scio, E. (2011). Potencial antioxidante y antimicrobiano de especies e familia Asteraceae. ***Revista Brasilera de Plantas Medicinales; 13***, (2): 183-189.

Ferriol, M., y López, C. (2018). ***Familia* Compositae (Asteraceae): *Caracteres generales***. Universidad Politécnica de Valencia. España.

www.bdigital.ula.ve

Fica, A. (2005). Aspectos básicos sobre antimicrobianos I. ***Medwave; 5***, (2): e2522.

Forbes, B., Sahm, D., y Weissfeld, A. (2007). ***Diagnostico microbiológico***. 12ª edición. Madrid-España: Editorial medica panamericana.

Forbes, B., Sahm, D., y Weissfeld, A. (2009). Balley de Scott: diagnostico from leaf explants of *Centratherum punctatum Cass*., A wild ornamental plant. ***Scientia Horticulturae; 320*** . Disponible en https://doi.org/10.1016/j.scienta.2023.112201

Funk, V., Susanna, A., Stuessy, T., y Bayer, R. (2009). ***Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae***. Vienna, Austria. Ed. International Association for Plant Taxonomy.

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

Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. ***Anales de la Facultad de Medicina*****; *77***, (4): 327-332.

García, J. (2000). ***Procedimientos en Microbiología Clínica****.* Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Editor: Juan J. Picazo. Pp. 54.

García, R., Cruz, F., Alarcón, F., Nieto, A., y Gallego, M. (2019). Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos de *Thalassia testudinum* Banks ex Köning et sims from the area of champoton, Campeche, México. ***Polibotánica; 48***: 151-168.

Granados, R., y Villaverde, C. (2003). ***Microbiología***. (Tomo 1). España: Editorial Paraninfo.

www.bdigital.ula.ve

Gutiérrez, A., y Estévez, A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI. ***Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales;103***, (2): 409-41.

Hari Vishva., P., M, Vanitha., C., Jothimanivannan., S., Ganesan., A., Abdul A., y Gokulnath., K. (2022). Pharmacological activities of *Centratherum punctatum* - a review**.** ***World Journal of Pharmaceutical Research;*** **11**, (13): 986-992.

Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2010). ***Metodología de la Investigación****.* México: Editorial Mc Graw Hill.

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

Hokche O., Berry P., y Huber O. (2008). ***Nuevo Catálogo de la Flora Vascular de Venezuela***. Caracas Venezuela: Fundación Instituto Botánico de Venezuela Dr. Tobías Lasser.

Hurtado, J. (2010). ***El proyecto de Investigación. Compresión holística de la metodología y la investigación***. Caracas: FEDUPEL.

Ingraham, J., y Ingraham, C. (1998). ***Introducción a la Microbiología***. (Vol.2). Barcelona, España. Editorial Reverté, S.A.

Kamboj, A., y Saluja, A. (2008). *Ageratum conyzoides* L.: A review on its phytochemical and pharmacological profile. ***International Journal of Green Pharmacy; 2***: 59-68.

www.bdigital.ula.ve

Katinas, L., Gutiérrez, D., Grossi, M., y Crisci, J. (2007). Panorama de la familia Asteraceae (Compositae) en la República Argentina **Boletín *de la Sociedad Argentina de Botánica; 42***, (1-2): 113-129.

Krithika, S., Niraimathi, K., Arun, K., Narendran, R., Balaji, K., y Brindha, P. (2016). *In vitro* anti-inflammatory studies on silver nanoparticles synthesizen from *Centratherum punctatum* Cass. ***International Journal Research Ayurveda Pharmaceutical; 7***, (2): 61-66.

Kummerer, K (2004). Resistance in the environment. ***Journal of Antimicrobial Chemotherapy;*** **54**, (2): 311-320.

Lizcano, A., y Vergara, J. (2008). ***Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y/o aceites***

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

esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruinea, Myrcianthes rophaloides y Pasiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. (Tesis de Maestría). Pontificia Universidad Javeriana Pontifia, Bogotá, Colombia.

Lock de Ugaz, O. (1994). ***Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales***. Editorial PUCP. Perú. Pp.5-28.

Lucana, M., y Huanca, R. (2014). Estructura bacteriana. ***Revista de actualización clínica; 49***: 2589-92.

Madhumitha, K., Anbumalarmathi, J., Aruna, S., Nandhini, G., y Shanmuga, G. (2020). A Comparative Study of *in vivo* Plant and *in vitro* Callus Extracts of *Centratherum punctatum Cass.* ***Annual Research & Review in Biology; 35***, (3): 1-13.

www.bdigital.ula.ve

Marcano, D. y Hasegawa, H. (2002). ***Fitoquímica Orgánica***. Caracas, Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.

Miranda, M., y Cuéllar, A. (2012). ***Farmacognosia y productos naturales***. 2da Edición. La Habana: Editorial Félix Varela. Pp. 135-158.

Molinelli M., Perisse P., Fuentes E., y Panchuelo A. (2014). Calidad botánica de drogas crudas comercializadas como "Canchalagua" en Córdoba, Argentina. ***Boletin de la. Sociedad Argentina de Botánica;*** **49**, (2): 293-316.

Murray, P. (2006). ***Microbiología Médica***. Editorial Elsevier Mosby. Pp. 957-963.

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

NCCLS. (2004). ***Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods; approved guideline***. NCCLS document EP5-A2. 2 nd ed. Wayne, Pennsylvania.

Nevada, A., y Dennis, T., (2023). Direct and indirect shoot regeneration from leaf explants of *Centratherum punctatum* Cass., A wild ornamental plant. ***Scientia Horticulturae; 320***. Disponible en: https://doi.org/10.1016/j.scienta.20023.112201

Nikolain, S. (2000). ***Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos***. Bogotá: CYTED.

Oliveira, A., Fonseca., E., Saraiva, A., Neves, F., Acre, R., Caetano M., Cavalcanti, E., y Albuquerque, U. (2013). Which Approach Is More Effective in the Selection of Plants with Antimicrobial Activity? ***Medical Ethnobiology and Ethnopharmacology in Latin America*;** (308980): 1-9. Disponible en: http://dx.doi.org /10.1155/2013/308980

Ortiz, L., y Chaves, G. (2017). Composición fitoquímica del extracto de raíz de *Lchthyothere terminalis* de dos regiones geográficas de Colombia. ***Revista Colombiana de Química; 46***, (3): 11-16.

Palella, S., y Martins, F. (2010). ***Metodología de investigación cuantitativa***. Caracas, Venezuela: Fedeupel.

Pascual, D., Pérez, Y., Morales, I., Castellanos, I., y González, E. (2014). Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. ***MEDISAN;18***, (10): 1467-74.

www.bdigital.ula.ve

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

Passicot, C., y Cabral, E. (2010). ***Asterideas: Diversidad vegetal, taxonomía de espermatofitos***. Argentina: UNNE/FACENA; 178-185.

Pawar, N. y Arumugam, N. (2011). Leaf extract of *Centratherum punctatum* exhibits antimicrobial, antioxidant and antiproliferative properties. ***Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research;*** **4**: 71-76.

Peña, M. (2011). **Nuevas Metodologías en Síntesis Orgánica: Síntesis de Neomarinona, Fumaquinona y Barrenazinas.** Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias. Universidade da Coruña. España.

Peralta, J., y Royuela, M. (2019). ***Familia*** **Compositae (Asteraceae)**. Herbario: Departamento de Ciencias. Universidad Pública de Navarra. España.

Pontón, J., y Quindós, G. (2006). Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica. ***Medicina Clinica. (Barcelona);*** 126: 56-60.

Prada, J., Orduz, L., y Coy, E. (2016). *Baccharis latifolia*: Una Asteraceae poco valorada con potencialidad química y medicinal en el neotrópico. ***Revista Facultad de Ciencias Básicas; 12***, (1): 92-105.

Puccio, P. (2018). ***Centratherum punctatum***. Monaco Nature Encyclopedia. Discover the biodiversity. (En línea). (Consultado: marzo 2022). Disponible en: https://www.monaconature encyclopedia.com/centratherum- punctatum-2/?lang=es

www.bdigital.ula.ve

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

Ramírez, L., y Marín, D. (2012). Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales y extractos etanólicos utilizando medios de difusión en agar y dilución en pozo. ***Scientia et Technica; 50***, (1): 152-157.

Redonda, R. (2017). Diversidad y distribución de la tribu Vernonieae (Asteraceae) en México. ***Acta Botánica Mexicana*; 119**: 115-138.

Reyes, F., Palou, E., y López, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. ***Temas selectos de Ingeniería de Alimentos; 8***, (1): 68-78.

Rivero, O. (2019). ***Estudio de la resistencia a los antifúngicos en hongos patógenos humanos***. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid. España.

Robinson, H., y Funk, V. (2018). Compositae-Vernonieae. ***Flora of Ecuador 94***: 1-128. Gothenburg University.

Rodríguez E. *y cols.* (2005). ***Bacteriología General.*** Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica. 339-340.

Romero R. (2007). ***Microbiología y Parasitología Humana.*** México. Editorial Médica Panamericana C.A. 875.

Roseel, K.. y Srivastava, L. (1987). Fatty acids as antimicrobial substances in brown algae. ***Hydrobiological; 152***, (1):471-475.

www.bdigital.ula.ve

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

Samiul, A., Nachiketa B., Sayeed S., Masnoon K., y Mohammad, H. (2016). *In vitro* antibacterial potential of *Bixa orellana* L., against some pathogenic bacteria and comparative investigation on some standard antibiotics. ***Journal of Pharmacognosy and phytochemistry; 5***, (2): 178-181.

Shankaran, S., Ahmad,A., Arun, K., Brindha, P., y Mahadevan, V. (2016). In silico and *in vitro* evaluation of the anti-inflammatory potential of *Centratherum punctatum* Cass-A. ***Journal of Biomolecular Structure and Dynamics;*** **8,** (58): 1-30.

Shi, R., Huang, Q., Zhu, X., Ong, Y- B., Zhao, B., Lu, J., Ong, Ch., y Shen, H. (2007). Luteolin sensitizes the anticancer effect of cisplatin via c-Jun NH2-terminal kinase-mediated p53 phosphorylation and stabilization. ***Therapeutics Molecular Cancer; 6***, (4): 1338-347.

Sivasubramanian, R., y Brindha, P. (2013). *In vitro* cytotoxic, antioxidant and GC-MS studies on *Centratherum punctatum* Cass. ***International Journal Pharmaceutical Science; 5***, (3): 364-367.

Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (2007). ***Introducción a la microbiología****.* Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 959.

Vanaclocha B., y Cañigueral, S. (2003). ***Fitoterapia.*** Barcelona España. Editorial El Sevier. 29-30.

Velasco, J., Araque, M., Araujo, E., Longa, A., Nieves, B., Ramírez, A., Sánchez, K., y Velazco, E. (2007). ***Manual práctico de***

www.bdigital.ula.ve

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

bacteriología clínica. Primera edición, Universidad de Los Andes. Vicerrectorado Académico, CODEPRE. P. 226.

Vilariño, R. (1988). ***Prontuario Microbiológico*****.** Madrid-España: Disinlimed.

Winkler, A., Gomes, O., Dallarmi, M., Mayumi, C., y Delle, F. (2006). Estudo fitoquimico da especie *Pterocaulon interruptum* DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas; 42**, (4): 585 – 88.

Yoc, C. A., Soto, L. E., Gutiérrez, M. J., y Arriola, N. M. (2012). ***Estudios de actividad biocida, citotóxica y genotóxica de tres plantas medicinales de la familia Euphorbiaceae: Euphorbia lancifolia, Cnidoscolus aconitifolius var. mansa y Cnidoscolus aconitifolius var. estrella.*** Seminario de Investigación para optar al título de Químicos Biólogos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala. Noviembre, Guatemala.

www.pdigital.ula.ve

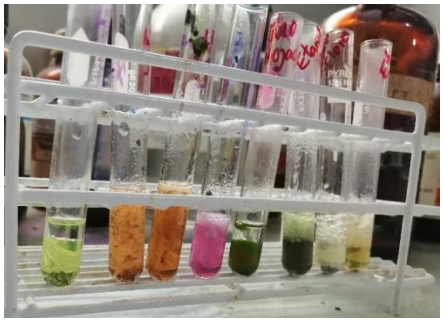
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

ANEXOS

Anexo 1. Tamizaje Fitoquímico.

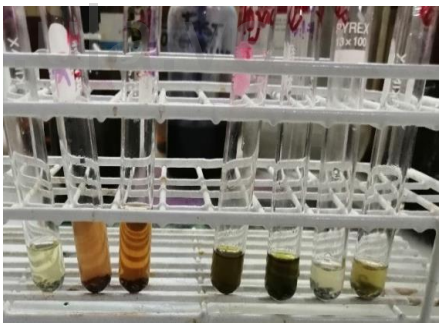
Triterpenos

Flavonoides (Prueba Shinoda)

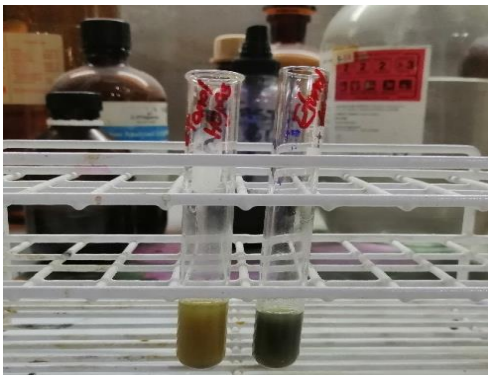


Alcaloides

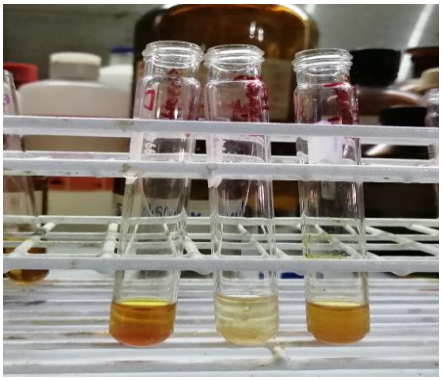
Flavonoides



Fenoles



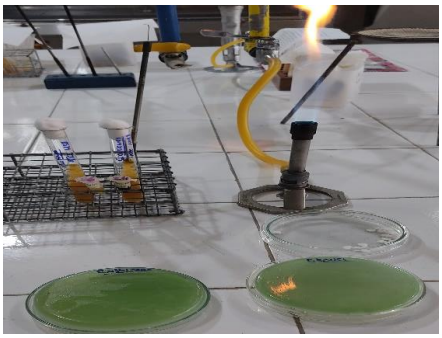
Alcaloides



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

Taninos

Materiales utilizados



Anexo 2. Actividad Antimicrobiana.

www.bdigital.ula.ve

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