



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



COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
LAS HOJAS DE *Allamanda cathartica*

www.bdigital.ula.ve

Autor:

Angerina Rincón Rojas

C.I. V- 18.798.636

Tutor:

Prof. Yndra Cordero

Mérida, Junio de 2023

Dedicatoria

A Dios por darme la fortaleza necesaria para seguir adelante con esta meta tan anhelada.

A mis amados padres, quienes han sido mi mayor fuente de inspiración y motivación a lo largo de mi vida. Su ejemplo de dedicación y sacrificio han sido la razón por la cual he llegado hasta aquí. Gracias por estar a mi lado en cada paso de este camino, por alentarme en los momentos difíciles y celebrar conmigo cada pequeño logro, los amo con todo mi corazón.

A mí querido hermano este logro es con todo mi amor para ti y espero que te inspire a perseguir tus propios sueños con dedicación y esfuerzo. Te quiero.

A mis amados hijos Sebastián y Santiago, quienes me han inspirado a lo largo de mi vida. Ustedes son mi razón de ser, mi mayor bendición y mi motivo para seguir adelante. Espero que este logro les inspire a seguir sus propios sueños, como yo lo hice gracias a su amor incondicional. Los amo y espero que siempre se sientan orgullosos de lo que hemos logrado juntos como familia.

A mis primos incondicionales Lilin y José Gregorio, quienes han sido mi apoyo inquebrantable, mi ejemplo a seguir y mis cómplices en esta aventura. Gracias por estar presentes en cada momento importante de mi vida, y por hacer posible que este logro sea una realidad. Los Amo.

A mis adoradas primitas Gabriela, Paola y Sofía, quienes han sido mi mayor fuente de alegría y motivación en este camino. Gracias por sus atenciones y compañía. Espero que este logro sea un ejemplo para ustedes

Agradecimientos

A Dios por haberme permitido completar esta tesis y por haberme dado la paciencia necesaria para superar los desafíos en el camino.

A mis padres y hermano, su amor ha sido una fuerza constante en mi vida, mis hijos por la motivación para seguir adelante, mis primos especialmente a Lilin mi amiga fiel, gracias por llenar mi vida de risas, alegría y amor incondicional, por ser junto a José G. mi apoyo constante en cada paso de este camino. Grecia, Tibisay, Mayra, y Francisco, la presencia de ustedes en mi vida ha sido un regalo invaluable, Gracias a todos, este logro también es de ustedes, Los amo con todo mi corazón

A mis compañeros de estudio en especial a Betania, Katherine, Mercedes, Ninive, Yoselin, Nayvedi, Gerardo y Leonardo, gracias por brindarme su amistad y apoyo incondicional, muchos éxitos.

A mi tutora Prof. Yndra Cordero, agradezco su orientación, paciencia y sabiduría en todo momento. Gracias por brindarme su apoyo incondicional durante todo el proceso de tesis. Dios la bendiga.

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, a las Prof. Ysbelia Obregón, Alida Pérez, Rosa Aparicio. Por toda su ayuda y los conocimientos brindados para la culminación de este trabajo.

De igual manera, mi agradecimiento a la ilustre Universidad de Los Andes, casa magna de estudio. Por abrirme sus puertas y enriquecerme en conocimientos, para alcanzar esta meta tan anhelada.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	3
Planteamiento del Problema.....	3
Justificación e Importancia de la Investigación.....	6
Objetivos de la Investigación.....	7
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	8
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	9
Trabajos Previos.....	9
Antecedentes Históricos.....	11
Bases Teóricas.....	14
<i>Familia Apocynaceae</i>	14
<i>Género Allamanda</i>	19
<i>Especie Allamanda cathartica</i>	23
<i>Productos naturales</i>	28
<i>Extractos vegetales</i>	40
<i>Bacterias</i>	43
<i>Antibióticos</i>	48
<i>Actividad antibacteriana</i>	50
<i>Métodos para la determinación de la actividad antibacteriana</i>	53
<i>Generalidades del estudio fitoquímico</i>	54
Definición Operacional de Términos.....	59
<i>Actividad antimicrobiana</i>	59
<i>Antibiograma</i>	59

ÍNDICE DE CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

<i>Bactericida</i>	59
<i>Fitoquímica</i>	59
<i>Medios de cultivo</i>	59
<i>Taxonomía</i>	60
<i>Toxicidad</i>	60
<i>Etnobotánica</i>	60
Operacionalización de las Variables	61
Operacionalización de la variable independiente	62
Operacionalización de la variable dependiente	63
Hipótesis	64
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	65
Tipo de Investigación	65
Diseño de Investigación	65
Población y Muestra	66
Sistema de Variables	66
Instrumento de Recolección de Datos	67
Procedimiento de la Investigación	67
Diseño de Análisis	79
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	80
Resultados	80
Discusiones	87
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	91
Conclusiones	91
Recomendaciones	92
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas Nº	Pág.
1 Clasificación taxonómica de la especie <i>Allamanda cathartica</i>	27
2 Operacionalización de la variable independiente composición química de los extractos de <i>Allamanda cathartica</i>	65
3 Operacionalización de la variable dependiente actividad antibacteriana de los extractos de <i>Allamanda cathartica</i>	66
4 Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).....	77
5 Halos de inhibición de los controles positivos usados como referencia en las cepas bacterianas.....	78
6 Pesos de los extractos y su rendimiento.....	84
7 Reporte de resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de <i>Allamanda cathartica</i>	85
8 Reporte ilustrado de resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de <i>Allamanda cathartica</i>	87
9 Resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de <i>Allamanda cathartica</i>	89

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Esquemas N°	Pág.
1	Procedimiento empleado para la obtención e identificación de los componentes de las hojas de <i>Allamanda cathartica</i>	71
2	Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Allamanda cathartica</i> por el método de difusión de disco en agar (Kirby-Bauer).....	82

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras N°	Pág.
1 Familia Apocynaceae.....	15
2 Distribución y hábitat de la familia Apocynaceae	17
3 Estructuras de los compuestos químicos de la familia Apocynaceae	18
4 Género <i>Allamanda</i>	22
5 Distribución geográfica del género <i>Allamanda</i>	23
6 Estructuras de los compuestos químicos del género <i>Allamanda</i>	24
7 Especie <i>Allamanda cathartica</i>	26
8 Ubicación de la especie <i>Allamanda cathartica</i>	28
9 Estructuras de los compuestos químicos de la especie <i>Allamanda cathartica</i>	29
10 Estructura química de los alcaloides.....	33
11 Estructura química de los triterpenos y esteroides.....	35
12 Estructura química de los fenoles.....	37
13 Estructura química de los flavonoides.....	38
14 Estructura química de las saponinas.....	39
15 Estructura química de las quinonas.....	40
16 Estructura química de los taninos.....	41
17 Estructura química de las cumarinas.....	42
18 Estructura química de los glicósidos.....	42
19 Pared celular de las bacterias grampositivas y gramnegativas...	47
20 Reporte ilustrado de los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de <i>Allamanda cathartica</i>	90



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
“Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”
LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Productos Naturales
UNIDAD CURRICULAR: TRABAJO DE GRADO II



COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
Allamanda cathartica

Autor:

Angerina Rincón

Tutor:

Prof.(a). Yndra Cordero

RESUMEN

Allamanda cathartica es una planta ornamental originaria de América del Sur, en la cual se han encontrado una gran variedad de metabolitos secundarios, destacándose las lactonas y glicósidos, los cuales poseen actividad antibacteriana. Por tal motivo, el objetivo de esta investigación fue confirmar la relación entre la composición química de los extractos de *Allamanda cathartica* y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional. Se realizó la obtención de los extractos vegetales a partir de las hojas de la planta en estudio, usando como solventes: hexano, diclorometano y etanol, los cuales se utilizaron para realizar el análisis fitoquímico preliminar, y posterior a esto, se determinó la actividad antibacteriana mediante el método de difusión de disco en agar (Kirby-Bauer) con una concentración del extracto etanólico de 10 mg/mL. En los resultados se evidenció la presencia de metabolitos secundarios tales como esteroides, alcaloides, saponinas, flavonoides, y glicósidos cardiotónicos, en todos los extractos. Además el extracto etanólico presentó actividad antibacteriana frente a las cepas de referencia internacional, con halos de inhibición de 7 mm de diámetro para *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, y de 10 mm de diámetro para *Enterococcus faecalis*. De acuerdo a los resultados obtenidos se considera que esta investigación representó un aporte al estudio de los productos naturales con potencial actividad antimicrobiana.

Palabras clave: *Allamanda cathartica*, Extracto vegetal, Composición química, Tamizaje fitoquímico, Actividad antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido desde tiempos remotos, fuentes inagotables de sustancias con diversas propiedades, tales como: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antioxidante, anticancerígena, entre otras. Distintos tipos de extractos y aceites han sido utilizados a lo largo de la historia en forma empírica y constituyen la base de numerosas terapias homeopáticas, por lo cual representan una alternativa para la salud. *Allamanda cathartica*, es una especie vegetal que pertenece a la familia Apocynaceae; es nativa de distintas zonas de Sudamérica y Centroamérica. Esta planta es ornamental, y también es conocida con diferentes nombres comunes, como por ejemplo copa de oro, trompeta amarilla, o trompeta dorada, debido a que posee flores amarillas y en forma de trompeta (Chan, Kuin y Yan, 2013).

El motivo por el cual las plantas comenzaron a ser usadas para tratar enfermedades se basó en el hecho de que estas contienen compuestos bioactivos, que entre otras características, poseen actividad antibacteriana. Esta última se refiere a la capacidad de ciertas sustancias de eliminar o inhibir el crecimiento bacteriano. Se ha determinado que los extractos de diversas plantas contienen metabolitos primarios y secundarios, motivo por el cual se ha incrementado su uso en la medicina alternativa (García, 2010). Es por esto, que la presente investigación se basó en el estudio de la composición química de la *Allamanda cathartica*, en la cual se ha evidenciado la presencia de metabolitos secundarios, los cuales le confieren actividad antibacteriana a la planta, debido a que posee lactonas iridoides y glucósidos iridoides (Chan, Kuin y Yan, 2013).

El siguiente trabajo de investigación fue estructurado en V capítulos. El Capítulo I, denominado El Problema, contiene los siguientes elementos: Planteamiento del Problema, Justificación, Objetivos, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II, llamado Marco Teórico abarca: Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas,

Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las variables e Hipótesis. El Capítulo III, titulado Marco Metodológico comprende los siguientes puntos: Tipo y Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Instrumento de Recolección de Datos, Procedimientos de la Investigación y Diseño de Análisis. El Capítulo IV, denominado Resultados y Discusión, y El Capítulo V, llamado Conclusiones y Recomendaciones.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

La introducción de los antibióticos en la práctica clínica supuso una de las intervenciones más importantes para el control de las enfermedades infecciosas. Puesto que, han salvado millones de vidas, y además han supuesto una revolución en la medicina. Han contribuido de forma muy significativa al progreso en campos como los trasplantes de órganos sólidos y de progenitores hematopoyéticos, la supervivencia de prematuros e inmunosuprimidos (naturales o por terapias farmacológicas), la cirugía de material protésico y los catéteres vasculares, en las que las infecciones son especialmente prevalentes e importantes. Su mayor aporte, viene dado con el aumento de la esperanza de vida de la población (Medina, 2000). A pesar del éxito del descubrimiento de los antibióticos, las enfermedades infecciosas siguen siendo la segunda causa principal de muerte en todo el mundo, mientras que la resistencia a los antibióticos es uno de los problemas más importantes del siglo XXI (Fatoki, Nwinyi, Omonhinmin, Oranusi y Ugboko, 2020).

En los años 60, la aparición del *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (oxacilina) y *Pseudomonas* resistentes a gentamicina confirmaron la gravedad de la resistencia antimicrobiana. Este fenómeno se fue haciendo más dramático con el incremento de la resistencia a la ampicilina en los 70; la aparición de *Enterococcus* resistente a la vancomicina en los 90 y la extensión de la resistencia a diferentes familias de antimicrobianos acordes

con su velocidad de uso y cuantía en la práctica médica, la que ya involucra, incluso, a antibióticos de última generación (Errecalde, 2004).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), aseguró que la resistencia a los antibióticos es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo, ya que la resistencia a los antibióticos puede afectar a cualquier persona, sea cual sea su edad o el país en el que viva, pues aunque se trata un fenómeno natural, el uso indebido de estos fármacos en el ser humano y los animales está acelerando el proceso. Sobre todo, en los países que carecen de directrices terapéuticas normalizadas, el personal sanitario y veterinario, tienden a prescribirlos en exceso, y la población a consumirlos. Por lo tanto, esta organización recalca la necesidad de cambiar urgentemente la forma de prescribir y utilizar los antibióticos, pues aunque se desarrollen nuevos medicamentos, si no se modifican los comportamientos actuales, la resistencia a los antibióticos seguirá representando una grave amenaza (Alcántar, Giono, Morfin, Santos y Torres, 2021).

Por tal motivo, actualmente se están buscando alternativas naturales para combatir la resistencia de las bacterias a los antibacterianos, específicamente se han realizado estudios con extractos de plantas para conocer el efecto que estos producen sobre los microorganismos; ya que las plantas poseen compuestos biológicamente activos presentes en los tejidos de las mismas, los cuales puede obtenerse con el uso de solventes (alcohol, agua, u otros solventes selectivos) mediante un proceso de extracción adecuado. Se puede decir que, de una misma planta, dependiendo de la parte de ella utilizada, del solvente y de la técnica de extracción, se puede obtener una diferente gama de sustancias (Astorga, Martín y Santamaría, 2015). Dichos extractos contienen componentes los cuales son llamados metabolitos secundarios, responsables del olor, sabor y color de la planta, estos presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como

medicamentos, insecticidas, herbicidas, entre otros. Reciben también la denominación de productos naturales (Ávalos y Pérez, 2009).

La Organización Mundial de la Salud, considera a la medicina natural y tradicional, en la que se incluye el tratamiento con plantas medicinales, como la medicina más natural, inocua, efectiva, además de tener un costo racional, ser asequible y aceptada por la población (Alcántar y cols., 2021). En la actualidad, se han reportado alrededor de 50.000 especies de plantas que tienen algún uso medicinal, correspondientes aproximadamente a un 10 % de todas las que existen en el mundo. Aunque su uso nunca ha dejado de estar vigente, el avance de la ciencia y la tecnología ayudó a que los principios activos contenidos en esas plantas sean sintetizados químicamente, haciéndolos disponibles en las farmacias a precios accesibles y en dosis adecuadas para cada tratamiento. La práctica de la medicina tradicional se basa en el uso terapéutico de diferentes partes de plantas y en distintas formas de preparación para prevenir o curar diversas dolencias (Bussmann, Fuentes, Maldonado, Paniagua y Zenteno, 2020).

En las últimas dos décadas se han realizado diversos trabajos de investigación farmacológica y taxonómica en la región de Centroamérica y el Caribe, para determinar la efectividad, eficacia, eficiencia y riqueza existente de plantas medicinales. Tal es el caso de la planta en estudio *Allamanda cathartica*, la cual está indicada para diferentes tratamientos como: antifúngico, analgésico, antiinflamatorio, antidepresivo, antidiabético, antihiperlipidéxico, agente antifertilidad, cicatrizante, trombolítico, purgante, antimicrobiano, agente antipalúdico, nematicida, antioxidante, entre otros (Abarca y Petricevich, 2019).

De esta manera, se planteó el siguiente enunciado holopráxico; ¿Cuál es la relación entre la composición química y la actividad antibacteriana de la *Allamanda cathartica*?

Justificación e Importancia de la Investigación

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas medicinales, la Organización Mundial de la Salud ha estimado que más del 80 % de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud. Además, gran parte de los tratamientos tradicionales implica el uso de extractos de plantas o sus principios activos (Akerlele, 1993).

En este mismo contexto, la fitoquímica estudia los compuestos presentes en las plantas y sus propiedades, a su vez estudia los metabolitos secundarios, compuestos de los cuales no se conoce en general su función pero que se cree tienen propiedades terapéuticas (Cáceres, Martínez, y Ocampo, 2007). En base a esto, se identificaron necesidades tales como: el estudio de las plantas como fuente de medicamentos, la utilización de las plantas medicinales como recurso terapéutico, y el desarrollo de resistencia microbiana a los medicamentos, en consecuencia, es motivo para que los investigadores estudien la actividad antibacteriana de la *Allamanda cathartica* (Akerlele, 1993).

De lo antes expuesto y en aras de buscar alternativas de aprovechamiento, además de conocer la presencia de principios activos en la especie en estudio, se hace necesaria la evaluación de la composición química de dicha planta con la finalidad de proporcionar nuevas opciones terapéuticas que presenten actividad antibacteriana. Debido a esto, se focalizó el interés sobre la propiedad antibacteriana de la *Allamanda cathartica*, por varias razones; la primera, fue la resistencia bacteriana a los antibióticos, la segunda, la grave falta de antibióticos para combatir la misma, la tercera, el aprovechamiento de las propiedades farmacológicas de las

plantas, y la cuarta, proporcionar opciones terapéuticas naturales, que permitan paliar el aumento en los precios de los fármacos actuales

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la relación que existe entre la composición química y la actividad antibacteriana de las hojas de *Allamanda cathartica*.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos de hexano, diclorometano y etanol de las hojas de *Allamanda cathartica* utilizando la técnica de reflujo.
- Identificar los metabolitos secundarios en los extractos obtenidos de las hojas de *Allamanda cathartica* mediante tamizaje fitoquímico.
- Evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Allamanda cathartica* mediante el método de difusión de disco en agar (Kirby Bauer).

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

Los alcances de la investigación se relacionan con la profundidad del conocimiento que los autores proponen. En tal sentido, esta investigación tuvo un alcance con el grado de elaboración confirmatoria, el cual requiere de una explicación previa a una serie de supuestos o hipótesis, que se desean confirmar (Hurtado, 2010). Dentro de esta perspectiva, el alcance de este estudio representó el aporte de datos actuales provenientes del estado Mérida, sobre la composición química y la actividad antibacteriana de las hojas de *Allamanda cathartica*, lo que servirá como antecedente para estudios posteriores así como, para la creación de fármacos para curar, detener y prevenir enfermedades.

Limitaciones de la Investigación

En esta investigación se consideraron las siguientes limitaciones: Los excesivos costos para la adquisición de materiales y reactivos para la elaboración de la tesis, así como la obtención de los medios de cultivos específicos para la realización de las pruebas de susceptibilidad. Además de los problemas del servicio de transporte, las constantes fallas de internet y electricidad. Aunado a esto, otra dificultad fue la poca existencia de trabajos previos sobre la planta *Allamanda cathartica*, sin embargo, las limitaciones mencionadas no afectaron la viabilidad de esta investigación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Purnama, Rahmawati, Riski y Yustisla (2022), realizaron una investigación titulada: Características del extracto etanólico de la flor de *Allamanda cathartica*, cuyo objetivo fue determinar las propiedades y la composición química del extracto etanólico de flores de la especie en estudio. Para esto, las flores se secaron al aire durante siete días; posteriormente, la muestra se maceró en etanol al 96 %. A dicho extracto se le evaluó sus características, incluyendo contenido de cenizas, contenido de agua y tamizaje fitoquímico. Los resultados revelaron que el contenido de agua fue de 1,14 % y el contenido de cenizas de 4,71 %. Así mismo, mediante el análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico de las flores de *Allamanda* se evidenció la presencia de flavonoides y saponinas.

Ngwe, Tun, Win y Wynn (2019), realizaron un estudio titulado: Aislamiento de un compuesto de tipo sesquiterpeno bioactivo y evaluación de algunas actividades biológicas de tallos y raíces de *Allamanda cathartica*, el cual tuvo como objetivo la determinación de componentes fitoquímicos, y la evaluación de la actividad antimicrobiana de los tallos y raíces de la especie en estudio; las muestras fueron sometidas a secado, molienda, y luego se realizó el proceso de extracción mediante la técnica de percolación, empleando como solventes el éter de petróleo (EP), acetato de etilo (EtOAc), etanol (EtOH) y agua (H₂O). Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se ensayaron los ocho extractos obtenidos de tallos y raíces (cuatro extractos de cada parte de la planta) a una concentración de 20 mg/mL, contra seis microorganismos que fueron *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*,

Pseudomonas aeruginosa, *Bacillus pumilus*, *Candida albicans* y *Escherichia coli*, mediante el método de difusión en pozo modificado (Kirby Bauer). El resultado de esta investigación, en cuanto a las pruebas fitoquímicas, demostró en ambas muestras (tallos y raíces), la presencia de alcaloides, flavonoides, terpenoides, esteroides, glucósidos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, saponinas, taninos y carbohidratos en los tallos y raíces, además, mediante métodos cromatográficos en capa fina y columna de gel de sílice, se aisló un compuesto, que fue la plumericina, a partir del extracto de acetato de etilo de las raíces.

Por otra parte, los resultados de la determinación de la actividad antimicrobiana demostraron que todos los extractos de las raíces tuvieron una actividad antimicrobiana más pronunciada con diámetros de zona de inhibición frente a *S. aureus* de 14 mm (EP), 30 mm (EtOAc), 30 mm (EtOH) y 20 mm (H₂O); frente a *P. aeruginosa* de 15 mm (EP), 20 mm (EtOAc), 20 mm (EtOH) y 14 mm (H₂O) y frente a *E. coli* de 15 mm (EP), 33 mm (EtOAc), 33 mm (EtOH) y 21 mm (H₂O). Mientras que los extractos de los tallos registraron menores diámetros de zona de inhibición frente a *S. aureus* de 13 mm (EP), 15 mm (EtOAc), 14 mm (EtOH) y 14 mm (H₂O); frente a *P. aeruginosa* de 18 mm (EP), 18 mm (EtOAc), 15 mm (EtOH) y el extracto acuoso no tuvo actividad; y frente a *E. coli* de 14 mm para los extractos de éter de petróleo, acetato de etilo y etanol; mientras que el extracto acuoso no tuvo actividad. Además, los investigadores llegaron a la conclusión de que el extracto de acetato de etilo (EtOAc) de las raíces, registró la mayor actividad inhibitoria contra *B. pumilus*.

Nwandu, Nyananyo y Ozimede (2019), realizaron un estudio titulado: Detección fitoquímica de extractos de hojas de once especies de plantas tropicales seleccionadas del este y sur de Nigeria, cuyo objetivo fue determinar los componentes bioactivos presentes en once especies de plantas, entre las cuales estuvo incluida la especie *Allamanda cathartica*. Las muestras de las plantas se obtuvieron de las partes frescas de las mismas,

se recogieron en bolsas de polietileno oscuro y se conservaron en la prensa de plantas antes de ser llevadas al herbario para su identificación y autenticación, luego fueron trituradas usando un molinillo de cuchilla. Por consiguiente para la obtención de los extractos vegetales, el polvo de hojas de las plantas en estudio se disolvió en diferentes solventes como butanol y otros solventes de naturaleza ácida, a los que posteriormente se les realizó las pruebas químicas correspondientes al análisis fitoquímico preliminar, el cual tuvo como resultado que el extracto ácido y alcohólico de las hojas de la especie de *Allamanda cathartica* posee metabolitos secundarios en su composición química, los cuales fueron identificados como alcaloides, saponinas y taninos, pero en baja concentración, sin embargo, dicho hallazgo justifica su uso en la medicina tradicional.

Antecedentes Históricos

El empleo de las plantas para la alimentación del hombre y la curación de diversas enfermedades, se remonta a la creación del mundo. Esta experiencia fue transmitida de generación en generación, a tal punto, que en la actualidad, en pleno siglo XXI, son denominadas plantas de uso tradicional, lo cual continuará hasta el fin de los tiempos. Al respecto, la medicina herbaria, que también se conoce como medicina botánica, fitoterapia o fitomedicina, es la forma más antigua de atención médica que se ha conocido en la humanidad (Castellano, González, Morales, Pascual y Pérez, 2014).

La medicina herbaria es apreciada por su costo bajo y por los reducidos índices de toxicidad, en comparación con los productos de síntesis. La práctica de la medicina herbaria se basa en el uso terapéutico de las plantas medicinales como sustitutas de las medicinas farmacéuticas o en combinación. De las plantas se usan sus extractos en diversas formas de

preparación, para mejorar el estado de salud. Según la OMS, los medicamentos herbarios abarcan las hierbas, material herbario, preparaciones herbarias y productos herbarios acabados, que contienen como principios activos partes de plantas u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos elementos, y su uso está bien establecido y ampliamente reconocido como inocuo y eficaz (Gallegos, 2016).

Existe gran interés por la medicina tradicional y, dentro de esta, la medicina herbaria, que ha generado numerosos estudios, y ha sido divulgada en prestigiosas publicaciones. Pero, hay poco uso de medicamentos de origen vegetal por parte de los profesionales de la salud; ya que sus tratamientos están basados únicamente en fármacos sintéticos, incluso, en el tratamiento de problemas de salud diagnosticados como enfermedad leve. (Gallegos, 2016).

En la actualidad, existe un reconocimiento del empleo de fuentes naturales de medicamentos y en especial de la fitoterapia, justificado en muchos casos por razones económicas, disminución de efectos tóxicos crónicos, muy frecuentes en sustancias químicas puras, con una tendencia en los países desarrollados al retorno del empleo de productos naturales en el tratamiento de diversas afecciones; en lo que se destaca, el importante papel de la OMS, en cuanto a la utilización de la fitoterapia dentro de los programas de salud de los distintos países, a través de la validación de efectos etnobotánicos, adjudicados a las plantas durante la existencia de la humanidad. Por lo tanto, la medicina natural y tradicional forma parte del acervo cultural de la humanidad, y se ha desarrollado en muchos países con características propias, en franca tendencia a los recursos disponibles en ellos, sobre la base, además, de la idiosincrasia de sus habitantes; por tanto, es el resultado de una evolución lenta, pero avalada por la experiencia práctica (Marinoff, 2006).

Allamanda cathartica es una especie que pertenece a la familia Apocynaceae, es endémica de América del Sur y tiene una amplia

distribución global en climas cálidos. Esta es una planta conocida por sus propiedades medicinales, antifúngicas y antibacterianas. El género fue dedicado por Linneo al naturalista suizo Frederick-Louis Allamand, a finales del siglo XVIII, el cual fue un estudioso de la flora brasileña, que recolectó semillas en Surinam y las envió a Carlos Linneo para que las nombrara en 1771. El nombre de la especie deriva del griego “*katharticos*” que significa “purificar”, refiriéndose a las presuntas propiedades purgativas de la planta. Además, se informa que en la composición fitoquímica de dicha especie, se ha evidenciado la presencia de metabolitos primarios y metabolitos secundarios (Abarca y Petricevich, 2019).

www.bdigital.ula.ve

Bases Teóricas

Familia Apocynaceae

Apocynaceae, es una familia de dicotiledóneas, que pertenece al orden Gentianales, junto con Loganiaceae, Retziaceae, Gentianaceae y Asclepidaceae (Cronquist, 1981). Dicho orden se amplía incorporando las Rubiaceae y Gelsemiaceae. Señalan que la familia Apocynaceae comprende unos 250 géneros como pueden ser *Adenium*, *Allamanda*, *Catharanthus*, *Mandevilla*, *Nerium*, *Plumeria*, *Pachypodium*, *Thevetia*, *Tabernaemontana* (**Figura 1**) y 2.000 especies (Endress, Morillo, Leeuwenberg, y Zarucchi, 1995).

Figura 1. Familia Apocynaceae



Tomado y modificado de Endress y cols., 1985.

Aspectos botánicos de la familia Apocynaceae.

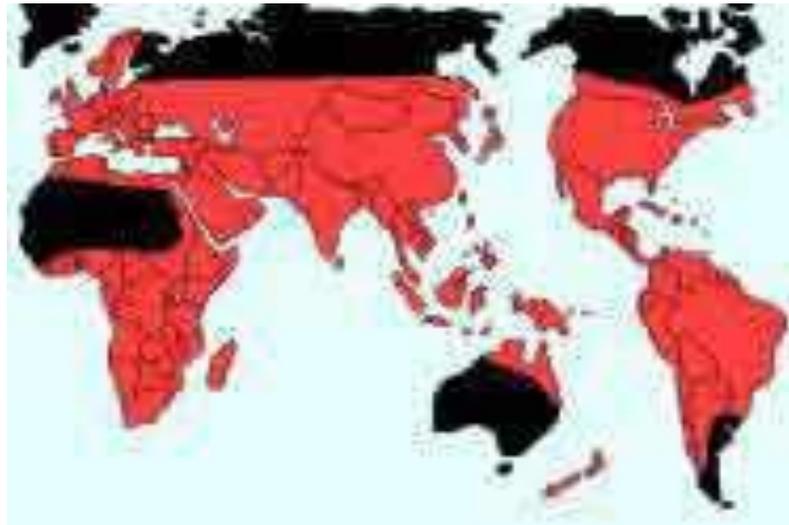
Cronquist (1981) presenta algunos detalles generales sobre la anatomía xilemática de las Apocynaceae e indica que esta familia se caracteriza por presentar tallos que ocasionalmente desarrollan estructuras anómalas, vasos con platinas de perforación simples u ocasionalmente escalariformes de pocas barras, fibras septadas con punteaduras simples o no septadas y con punteaduras areoladas, radios heterocelulares a homocelulares, 1-5 células de ancho (León y Williams, 2011). La familia Apocynaceae incluye árboles, arbustos, frútices y más frecuentemente lianas, rara vez suculentas, con conductos lactíferos no segmentados y haces vasculares bicolaterales. A menudo con alcaloides y glicósidos tóxicos. Presentan hojas simples, enteras, generalmente opuestas, raras veces verticiladas (*Nerium*, *Mandevilla*, *Microplumeria*, *Condylocarpon*, *Allamanda*, *Rauvolfia*, *Couma*) (Clausnitzer, 1968).

Además presentan flores perfectas, actinomorfas, simpétalas, 5-meras, sépalos iguales o desiguales, evidentes o inconspicuos, imbricados, con o sin coléteres en la base de la cara adaxial (Cerros y González, 2015). Además de corola hipocrateriforme, infundibuliforme, rotada, tubular o urceolada, amarilla, blanca, rosada, roja o azul, a veces con estructuras coronales accesorias (coronas anulares y lóbulos coronales libres, éstos a veces reducidos a crestas callosas), limbo con 5 lóbulos, sinistrocontortos o dextrocontortos; estambres 5 incluidos o exsertos, filamentos generalmente cortos, a veces largos, anteras basifijas, biloculares, por lo común introrsas, pero a veces extrorsas, conniventes y aglutinadas a la cabeza estigmática o libres, provistas a veces de apéndices supraestaminales; gineceo bicarpelar, con ovario apocárpico o sincárpico (*Allamanda* y *Carissa*), ovario súpero, raramente semiínfero (*Plumeria*), estilo simple; la parte superior del gineceo forma una estructura especializada, denominada estigma, cabeza estilar o cabeza estigmática (Alvarado, Jaimes, y Villaseñor, 2007).

Distribución y hábitat de la familia Apocynaceae.

La familia Apocynaceae está ampliamente distribuida en las áreas tropicales y subtropicales del mundo, tiene un marcado centro de diversidad en Sudamérica, donde varios géneros están confinados a la cuenca amazónica o a la cordillera de Los Andes (Endara, León, Navarrete, Pitmam, Ulloa, y Valencia, 2019). Así mismo, se trata de una familia pantropical con algún representante en las regiones templadas. Los bosques tropicales pluviales y pantanosos de la India y de la península Malaya, contienen árboles perennifolios desde muy pequeños hasta de gran talla. Las especies de *Plumeria* muy cultivadas, son originarias de América central. Los bosques de América del sur, África y Madagascar son ricos en lianas. Las adelfas (*Nerium*) son nativas de los biotopos húmedos de la región mediterránea templada. (Heywood, 1985)

Figura 2. Distribución de la familia Apocynaceae

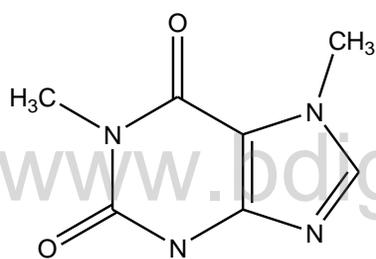


Tomado y modificado de Heywood, 1985.

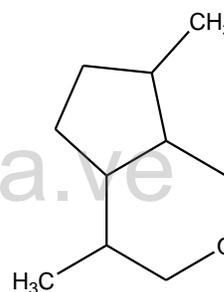
Compuestos químicos de la familia Apocynaceae

Las apocináceas tienen los siguientes compuestos fitoquímicos (**Figura 3**) presentan en la mayoría de las veces alcaloides **(1)**, además se han detectado iridoides **(2)** en algunos géneros (*Plumeria*, *Rauvolfia* y *Allamanda*). También presentan proantocianidinas **(3)**, cianidina **(4)**, delphinidina **(5)** y pueden presentar kaempferol **(6)**. Se ha encontrado ácido ursólico, y los azúcares son transportados como sacarosa o como oligosacáridos (Morales, 2005).

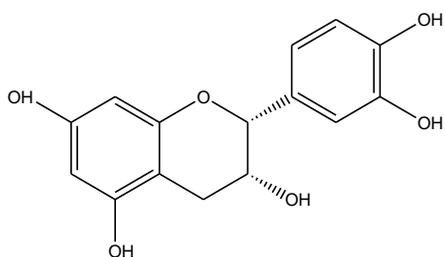
Figura 3. Estructuras de los compuestos químicos de la familia Apocynaceae



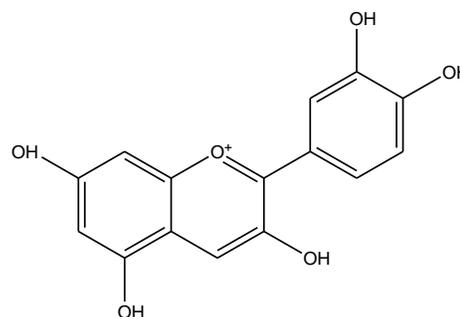
(1) Alcaloide



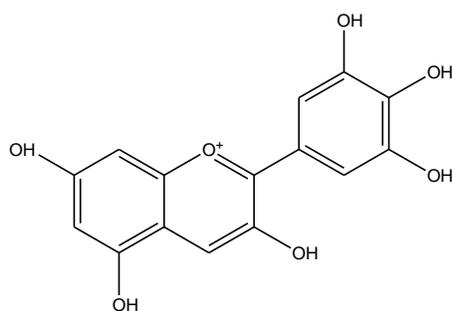
(2) Iridoide



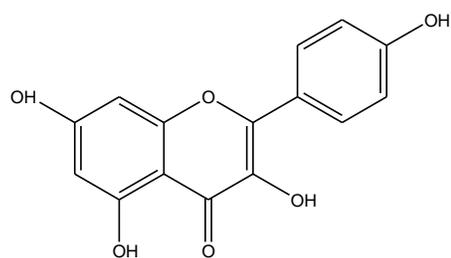
(3) Proantocianidinas



(4) Cianidina



(5) Delphinidina



(6) Kaempferol

Tomado y modificado de Morales, 2005.

Usos de la Familia Apocynaceae

Algunas plantas de esta familia tuvieron una importancia económica en el pasado. El jugo lechoso de *Pachypodium* ha sido usado como veneno para impregnar las puntas de las flechas por los bosquimanos. Los siguientes géneros son plantas ornamentales: *Amsonia* (estrella azul), *Nerium* (adelfa), *Vinca* (pervinca), *Carissa* (ciruela de Natal, una fruta comestible), *Allamanda* (trompeta dorada), *Plumeria* (frangipani), *Thevetia* (nuez afortunada), *Mandevilla* (flor de la sabana). *Rauvolfia caffra* es el "árbol de la quinina", de Sudáfrica. *Rauvolfia serpentina* o "raíz de serpiente" de la India suministra los alcaloides reserpina y rescinamina. Algunos, como *Acokanthera*, *Apocynum*, *Cerbera*, *Nerium*, *Thevetia* y *Strophanthus*, son fuentes de drogas, tales como glucósidos cardíacos, relacionados con el funcionamiento del corazón. El género *Apocynum* se usó como fuente de fibras por los nativos americanos. La continua expansión de la familia ha sido acompañada por diversos cambios fitoquímicos que le han permitido desarrollar y explorar nuevos mecanismos defensivos (alcaloides, conductos laticíferos, olores, etc.) Impulsado por sus propiedades anticancerígenas y antipalúdicas, se actualiza el conocimiento actual sobre diez géneros (*Allamanda*, *Alstonia*, *Calotropis*, *Catharanthus*, *Cerbera*, *Dyera*, *Kopsia*, *Nerium*, *Plumeria* y

Vallaris). Algunas especies como *Thevetia* y *Nerium* contienen glúcidos cardiotónicos, utilizados en el tratamiento de enfermedades cardíacas, otras especies como *Rauvolfia serpentina*, de la India, producen los alcaloides reserpina y rescinamina con propiedades hipotensoras y sedantes. Otras proporcionan un látex de importancia comercial que sirve para la obtención de caucho (Abarca y Petricevich, 2019).

Género *Allamanda*

Allamanda cathartica pertenece al género *Allamanda* (**Figura 4**) es llamado así en honor al botánico suizo Dr. Frédéric-Louis Allamand (1735-1803) a finales del siglo XVIII. Sus nombres comunes son : “allamanda” (italiano); “allamanda“, “golden trumpet” (inglés); “alamanda-amarela”, “carolina”, “dedal de dama” (portugués); “trompette d’or”, “liane à lait”, “orélie de guyane”, “monette” (francés); “copa de oro”, “flor de mantequilla”, “trompeta amarilla”, “trompeta dorada”, “trompeta de oro”, “jasmin de Cuba” (español); “allamande”, “goldtrompete” (alemán). El género *Allamanda* contiene aproximadamente 15 especies (*A. augustifolia*, *A. blanchetti*, *A. caccicola*, *A. cathartica*, *A. doniana*, *A. laevis*, *A. martii*, *A. nobilis*, *A. oenotherifolia*, *A. polyantha*, *A. puberula*, *A. schottii*, *A. setulosa*, *A. thevetifolia* y *A. weberbaueri*) (Abarca y Petricevich, 2019).

Figura 4. Género *Allamanda*.



Tomado y modificado de Abarca y Petricevich, 2019.

www.bdigital.ula.ve

Aspectos botánicos del género Allamanda

Allamanda tiene un porte arbustivo con tendencia trepadora que puede alcanzar varios metros ya que su crecimiento es vigoroso. Sus hojas perennes tienen forma lanceolada de color verde claro. Florece desde mediados de primavera hasta bien entrado el otoño mediante inflorescencias con vistosas flores amarillas en forma de campana que desprenden un delicado y afrutado aroma. La flor tiene cinco sépalos lobulados y una corola en forma de campana o embudo de cinco pétalos, El fruto tiene forma de cápsula ligeramente aplanada y elíptica con aspecto espinoso que contiene en su interior entre dos y cuatro semillas con forma plana, seca y con un ala concéntrica gruesa. Los frutos crecen de abril a julio y en octubre (Abarca y Petricevich, 2019).

Distribución geográfica del género Allamanda

Este es un género muy extendido en todo el mundo. Es endémico de América del Sur (Guyana Francesa, Guyana, Brasil, Surinam, Venezuela); vive preferiblemente en áreas soleadas, en las orillas de la selva y sobre las riberas de los ríos. Además, es ampliamente cultivado y más o menos naturalizada en todos los trópicos (**Figura 5**) (Ahamed, Banu, y Farzana, 2021).

Figura 5. Distribución geográfica del género *Allamanda*.



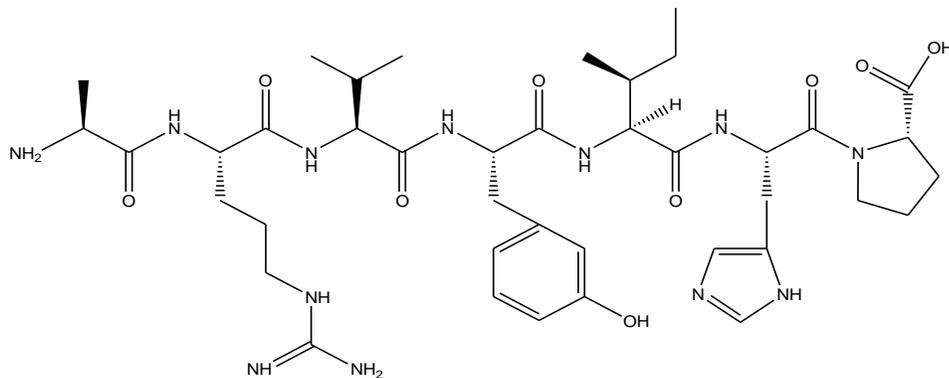
Tomado y modificado de Ahamed y cols., 2021.

Compuestos químicos del Género Allamanda

El género *Allamanda* han producido varios compuestos químicos (**Figura 6**) incluidas lactonas iridoides como la alamandina (**7**) la plumericina. En particular, se demostró que la plumericina es un inhibidor del factor nuclear κB (NF- κB) muy potente, con actividad antiinflamatoria *in vitro* e *in vivo*,

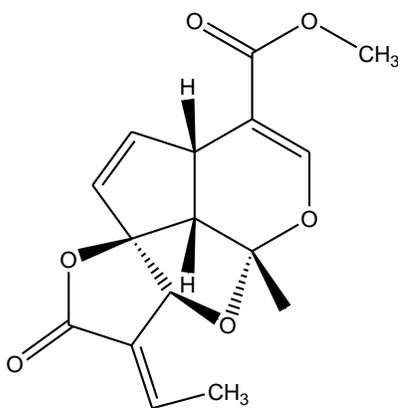
mientras que sus derivados estructuralmente relacionados plumierdina, plumericina **(8)** y alamandina no tienen actividad. El lignano pinosresinol y cumarinas como escopoletina y escoparona se han aislado de *Allamanda schottii* (Abarca y Petricevich, 2019).

Figura 6. Estructuras de los compuestos químicos del género *Allamanda*.



(7) Alamandina

www.bdigital.ula.ve



(8) Plumericina

Tomado y modificado de Abarca y Petricevich, 2019.

Usos del Género Allamanda

Por su gran belleza, estas son utilizadas como plantas ornamentales, para decoración de interiores y para cubrir muros o columnas ya que es una planta trepadora, pero necesita soportes para ayudarla a trepar. Todas las partes de las plantas son tóxicas y la linfa puede provocar dermatitis y reacciones alérgicas a personas particularmente sensibles. Presentan propiedades espasmolíticas, anti-amebianas, antifúngicas, afrodisíacas y antioxidantes. Se han usado principalmente externamente como parte de una cataplasma, tintura, unguento o donde las hojas se aplican directamente por vía transdérmica a la piel. Los usos externos tradicionales han incluido el tratamiento de dolores, otitis, artritis, reumatismo, dolores de cabeza, infecciones y como un antiinflamatorio. Los usos internos, son en preparaciones altamente diluidas, y a menudo como parte de una mezcla más grande, han incluido tratamientos para dolencias estomacales y musculares, como descongestionantes, para inducir el vómito, para expulsar gusanos y parásitos, y como sedante (Abarca y Petricevich, 2019).

Especie Allamanda cathartica

Esta es la especie más ampliamente difundida del género, que se puede reconocer con facilidad por el tamaño de sus hojas, flores y frutos (**Figura 7**). Es común que las variedades cultivadas produzcan pocos frutos. Algunos de sus nombres comunes son : Alamanda de flor amarilla, Alamanda de flor grande, Barbero loco, Copa de oro, Flor de mantequilla, Flor de barbero, Trompeta amarilla, Trompeta dorada, Trompeta de oro, Jazmín de Cuba, Jazmín de la tierra, y Mala suegra (Abarca y Petricevich, 2019).

Figura 7. Especie *Allamanda cathartica*.



Tomado y modificado de Abarca y Petricevich, 2019.

www.bdigital.ula.ve

Aspectos botánicos de la especie Allamanda cathartica

Es un arbusto de 1 a 2,5 m de alto, con las ramillas más o menos polosas. Hojas verticiladas en grupos de 3 ó 4, o las superiores opuestas, oblongas u oblanceoladas, subcartáceas, cortamente pecioladas, de 5 a 12 cm de largo, lampiñas en la cara superior, pelosas en las venas más fuertes del envés; el ápice acuminado, la base estrechada. Flores grandes en racimos terminales irregularmente pulrifloros. Corola embudada, amarilla, de 7 a 9 cm de largo, el limbo de 6 a 8 cm de ancho, los 5 lóbulos anchos y redondeados, sinistrosos; el cuello campanulado que porta escamas ciliadas en el interior. Estambres insertos en el cuello de la corola; filamentos cortos; anteras lanceoladas, libres del estigma, sus celdas no apendiculadas. Ovario locular; estilo filiforme; estigma con una membrana anular refleja. Cápsula suborbicular comprimida, densamente espinosa, de 4 a 6 cm de ancho, las

espinas de 7 a 15 mm de largo. Semillas comprimidas, marginadas o aladas. Si el clima es muy cálido puede florecer durante todo el año, aunque especialmente desde mediados de primavera hasta bien entrado el otoño. Lo hace mediante inflorescencias racemosas con flores amarillas, sépalos ovados y foliáceos. El olor que desprenden sus flores es afrutado y delicado. En la **Tabla 1** se muestra su clasificación taxonómica (Abarca y Petricevich, 2019).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la especie *Allamanda cathartica*.

Taxón	Nomenclatura
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Gentianales
Familia	Apocynaceae
Subfamilia	Rauvolfioideae
Tribu	Plumerieae
Género	<i>Allamanda</i>
Especie	<i>A. cathartica</i>

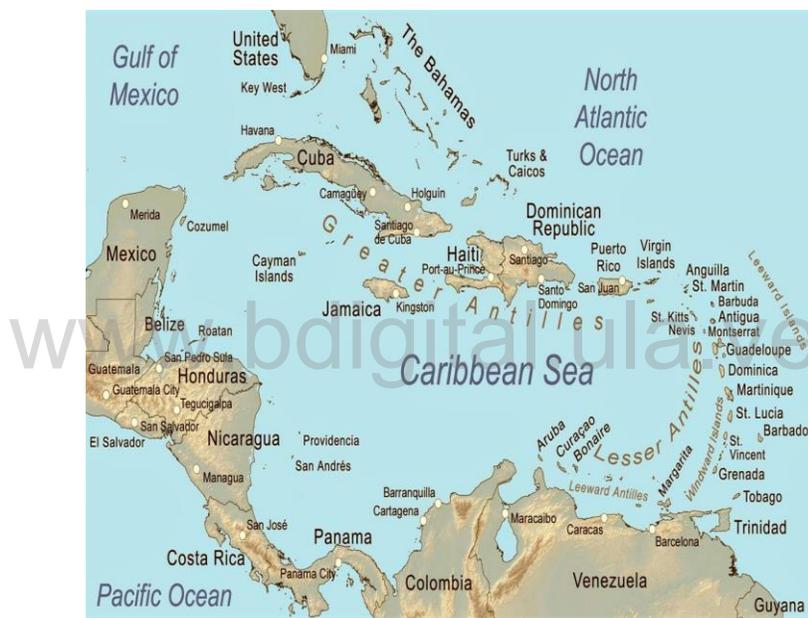
Tomado y modificado de Abarca y Petricevich, 2019.

Distribución geográfica de la especie Allamanda cathartica

Es nativa de Brasil y Centroamérica.; abunda en todas las Antillas Mayores, excepto las Bahamas, y en la América tropical continental. Introducido en los trópicos del Viejo Mundo. Se distribuye en áreas tropicales

y subtropicales de muchos países, incluidos Estados Unidos, México, Belice, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Bolivia, Ecuador, Guyana, Guyana Francesa, , Brasil, Hawái, India, las islas Andamán, Bangladesh, Pakistán, Malasia, Indonesia, Filipinas, Tailandia, Singapur, Hong Kong, Myanmar, Nepal, Sri Lanka, China, Australia, Kuwait, Ghana, la República de Mauricio, Camerún, Madagascar, Nigeria, Zimbabue y Francia **(Figura 8)** (Abarca y Petricevich, 2019).

Figura 8. Ubicación de la especie *Allamanda cathartica*.



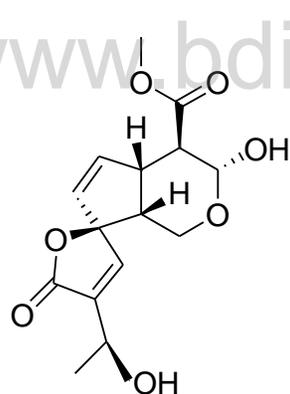
Tomado y modificado de Abarca y Petricevich, 2019.

Compuestos químicos de la especie *Allamanda cathartica*

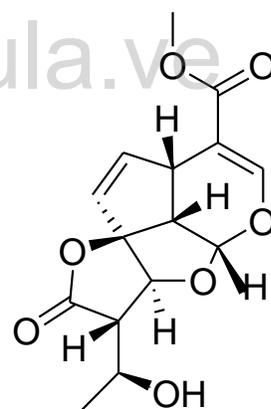
Toda la planta contiene un látex blanco cáustico. Existen diversos compuestos presentes en distintas partes de la planta **(Figura 9)**. Las hojas contienen triterpenos esterificado, el plumeroide **(9)** la isopluméricina, ácido ursólico, de β -amirina y β -sitosterol. Las raíces contienen lactonas iridoides

allamandina, allandina y allamandicina (10) y lactonas triterpénicas (fluvoplumeirina, plumericina (8) La flor contiene flavonoides (quercetina y kaempferol). Los componentes químicos de *A. cathartica* se han estudiado ampliamente desde 1954. Los estudios químicos preliminares mostraron la presencia de alcaloides, antraquinonas, antocianinas, carbohidratos, carotenoides, cumarinas, flavonoides, glucósidos, hidrocarburos, lignina, lípidos, compuestos fenólicos, quinonas, saponinas, esteroides, taninos y terpenos de varios extractos, principalmente hojas, flores, tallos, corteza de tallo, raíces y brotes. Solo estos grupos de compuestos químicos han sido aislados e identificados y no se han encontrado antraquinonas, antocianinas, cumarinas, quinonas o ligninas (Abarca y Petricevich, 2019).

Figura 9. Estructuras de los compuestos químicos de la especie *Allamanda cathartica*.



(9) Plumerioide



(10) Allamandicina

Tomado y modificado de Abarca y Petricevich, 2019.

Usos de la especie *Allamanda cathartica*

Allamanda cathartica se ha utilizado en la medicina tradicional para diversos fines, entre los que se incluye el tratamiento de tumores hepáticos, ictericia, esplenomegalia y malaria. En los análisis, algunas especies han mostrado cierta actividad contra las células del carcinoma, los hongos patógenos y el VIH. El nombre del epíteto alude a que la planta tiene efectos purgantes, o laxantes. Los extractos de la corteza tienen propiedades hidrogogías. Todas las partes de la planta tienen principios tóxicos, particularmente el látex (que tiene propiedades antibacterianas y anticancerígenas) (Mesa y Roig, 1988).

Los síntomas más frecuentes en casos de intoxicación son: náuseas, espasmos estomacales, aumento de la temperatura y ocasionalmente erupciones cutáneas. En Guyana se han empleado las raíces y las flores para combatir la ictericia y la malaria, también sus flores y hojas se han usado como emético, laxante, y como remedio contra la anuria y el vértigo. En Brasil, de donde es nativa, aunque las más frecuentes son las de flores amarillas, también se encuentran variedades de flores anaranjadas, blancas, liláceas y rosas. Sus principios tóxicos hacen que se constituya en una alternativa de pesticida natural para combatir plagas como pulgones y cochinillas. Además se menciona el empleo de las flores, hojas, látex y raíz en diferentes aplicaciones de efectos: antitérmico, antitusígeno, laxante, purgativo, vermífugo, antisárnica, antipediculosis y otras. Las raíces se usan contra la ictericia y para la malaria. Existen referencias del uso del látex de *Allamanda cathartica* para casos de "saturnismo" (Mesa y Roig, 1988).

Productos Naturales

Los productos naturales, también llamados metabolitos secundarios, son compuestos de bajo peso molecular, sintetizados por seres vivos,

generalmente plantas, y que tienen una acción biológica determinada, por lo tanto, no cumplen funciones esenciales en ellas (Albornoz, 1997). Su distribución se encuentra restringida en el reino vegetal, pues son sintetizados en pequeñas cantidades y no de forma generalizada. Estos compuestos no sólo tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, sino que también, una síntesis activa de estos compuestos se induce, cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: El consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados); el ataque por microorganismos (virus, bacterias y hongos); la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes, entre las diferentes especies de plantas, y la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Porta, Rocha y Sepúlveda, 2003). Se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, y presentan propiedades biológicas, así como también, funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros (Barros, Gómez, Mejía, Sierra y Suárez, 2018).

Clasificación de los productos naturales

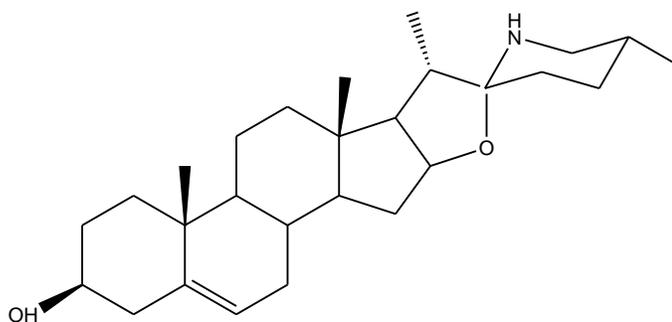
La clasificación de los productos naturales, puede hacerse de acuerdo a su estructura, biosíntesis, fuente de producción y acción biológica. En todos estos casos es inevitable la superposición, por ejemplo, por ser moléculas generalmente polifuncionales, es difícil ubicarlas en un determinado grupo químico, o dos compuestos totalmente diferentes tienen la misma acción, o la misma fuente de producción puede originar simultáneamente compuestos muy distintos. Aparentemente el criterio más acertado, es aquel que usa la biosíntesis como denominador común, la cual, en su esquema básico, engloba la formación de los metabolitos primarios y secundarios (Marcano y Hasegawa, 1991).

Los precursores de la biosíntesis de metabolitos secundarios se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato. En la actualidad se conocen diferentes tipos de metabolitos secundarios, entre los cuales se incluyen: fenoles, taninos, flavonoides, alcaloides, antraquinonas, cumarinas, esteroides y terpenos. La variedad estructural dentro de un mismo grupo de metabolitos secundarios está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación (Kuklinski, 2000).

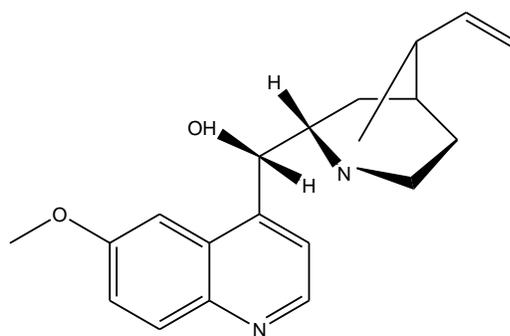
Alcaloides

Reciben esta denominación los compuestos nitrogenados heterocíclicos procedentes del metabolismo de aminoácidos; de proceder de otra vía, se definen como pseudoalcaloides. Poseen una gran diversidad estructural con más de 12000 estructuras (Domínguez, 1973). Pertenecen a este grupo, entre otras sustancias, la solasodina **(12)**, morfina, quinina **(13)** la heroína y la cocaína **(Figura 10)**. El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante la intercalación entre la pared celular y el ADN del microorganismo (Domingo, 2003).

Figura 10. Estructura química de los alcaloides



(12) Solasodina



(13) Quinina

Tomado y modificado de Domingo, 2003.

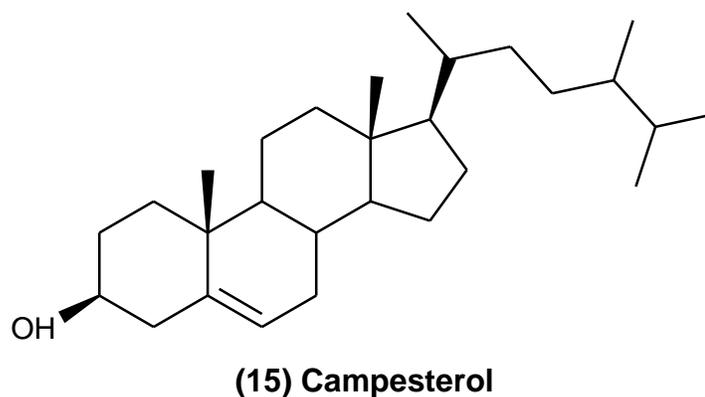
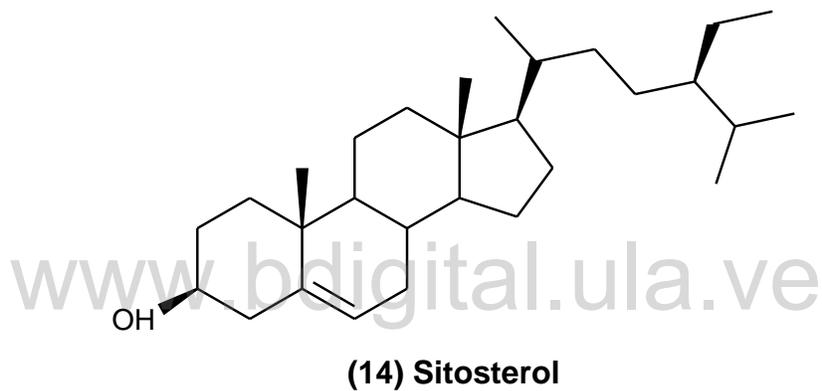
Triterpenos y/o esteroides

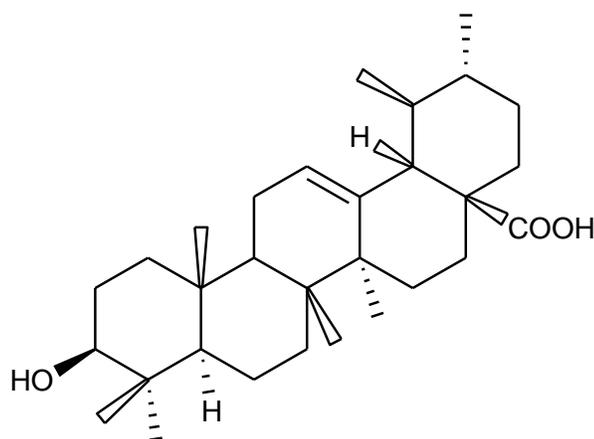
Con el nombre de terpenos o isoprenoides se conoce a un conjunto de sustancias que conforman uno de los grupos de fitoquímicos más difundidos. Estos compuestos tienen un origen biosintético común y, aunque con estructuras químicas muy distintas, todos ellos proceden de la condensación del isopreno, un hidrocarburo de 5 átomos de carbono. Los terpenos se encuentran principalmente en los alimentos de color verde, en productos derivados de la soja y en los cereales (Aleixandre López y Miguel, 2012). Muchas de las plantas, deben sus esencias a los compuestos terpénicos, pero estas sustancias, además poseen propiedades farmacodinámicas muy variadas en relación con las diferentes funciones ligadas a su esqueleto terpénico; sin embargo, algunos, son irritantes para la piel y mucosas (Domínguez, 1973).

Los compuestos esteroidales como el sitosterol **(14)** campesterol **(15)**, pueden interferir en determinados procesos de síntesis vitales en la célula bacteriana y los triterpenos, por su parte, pueden actuar siguiendo diversos mecanismos dependiendo de su naturaleza química, los de naturaleza

hidrocarbúrica, por ejemplo, tienen generalmente acción depresora sobre la tensión superficial lo cual, cuando tiene lugar en el entorno de la célula bacteriana, altera la selectividad de la membrana citoplasmática para el intercambio de sustancias. Por otro lado, el ácido ursólico **(16)** (**Figura 11**) es un triterpeno de naturaleza alcohólica y puede alterar la naturaleza coloidal del protoplasma de la célula provocando su muerte (Domingo, 2003).

Figura 11. Estructura química de los triterpenos y esteroides





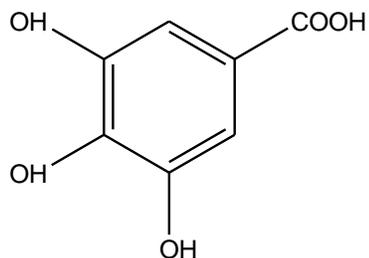
(16) Ácido ursólico

Tomado y modificado de Domingo, 2003.

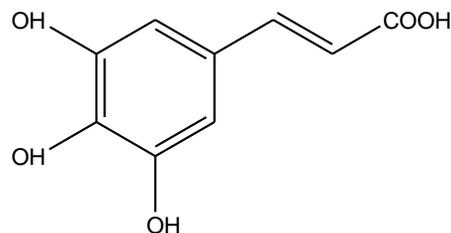
Compuestos fenólicos

Son los compuestos más simples y consisten en al menos un grupo fenol, es decir, un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo, que constituye su grupo funcional. Por lo general son sintetizados por una de dos vías biosintéticas: la ruta del ácido shikímico o la ruta del ácido mevalónico (Domínguez, 1973). Algunos ejemplos los constituyen el catecol, el pirogalol y los ácido gálico **(17)** y caféico **(18)** (**Figura 12**). El mecanismo de acción antibacteriana de los fenoles parece estar relacionado con la desorganización de membranas y paredes celulares y con la inhibición enzimática por los compuestos oxidados, posiblemente mediante reacciones de grupos sulfhidrilos o por interacciones no específicas con proteínas (Domingo, 2003).

Figura 12. Estructura química de los fenoles



(17) Ácido gálico



(18) Ácido caféico

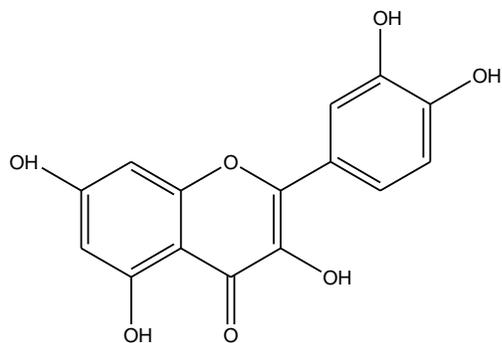
Tomado y modificado de Domingo, 2003.

Flavonoides

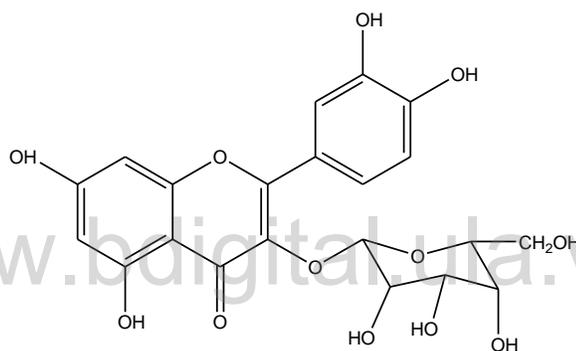
www.bdigital.ula.ve

Sin ser metabolitos primarios se encuentran casi siempre en cualquier vegetal superior. Los flavonoides pueden encontrarse en la naturaleza tanto en forma libre (agliconas) como en forma de O- y C- heterósidos, que es lo más frecuente. Los flavonoides tienen como estructura base, un esqueleto de carbono que pueden sufrir posteriormente muchas modificaciones y adiciones de grupos funcionales por lo que los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Los flavonoides que conservan su esqueleto pueden clasificarse, según las isomerizaciones y los grupos funcionales que le son adicionados, en las chalconas, las flavonas, los flavonoles, los flavandioles, las antocianinas, quecirtinas **(19)** e hiperosida **(20)** (**Figura 13**). Estos compuestos poseen propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas. En las plantas, estos actúan como antioxidantes, especialmente las catequinas del té verde (Domínguez, 1973).

Figura 13. Estructura química de los flavonoides



(19) Quercetina



(20) Hiperosida

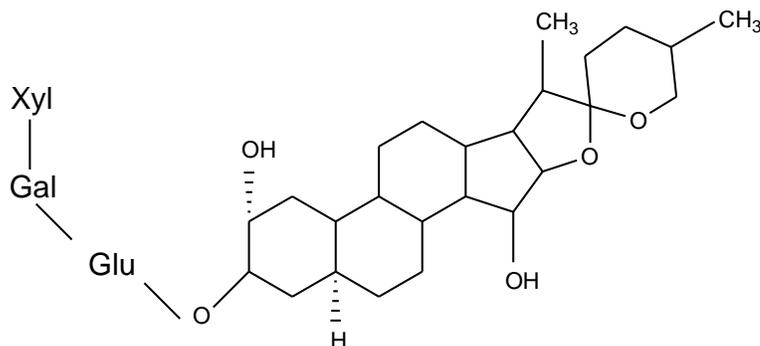
Tomado y modificado de Domínguez, 1973.

Saponinas

Las saponinas son glucósidos de esteroides o de triterpenoides, llamadas así por sus propiedades semejantes a las del jabón. Cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (representado por el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el glucósido) y forman una espuma cuando se les agita en agua (**Figura 14**). Existe una gran variedad de plantas que contienen saponinas en distintas concentraciones, y por

hidrólisis de estas se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada genéricamente saponina (Blanco y Mena, 2015).

Figura 14. Estructura química de las saponinas

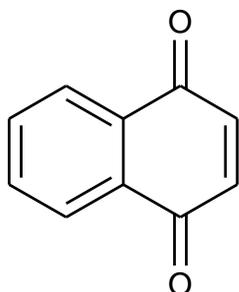


Tomado y modificado de Blanco y Mena, 2015.

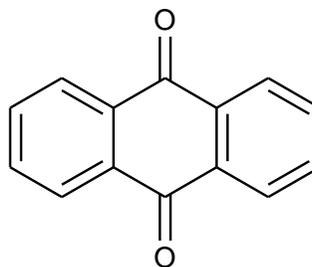
Quinonas

Las quinonas son isómeros de la ciclohexanodiona o bien un derivado de los mismos. Los dos isómeros son la orto-benzoquinona (o-benzoquinona), que es la 1,2-diona, y la para-quinona (p-benzoquinona), que es la 1,4-diona. Algunas de las quinonas son la 1,4-naftoquinona **(21)** y la 9,10-antraquinona **(22)** (**Figura 15**). La parabenzoquinona es la forma oxidada de la hidroquinona y la orto-benzoquinona es la forma oxidada del catecol (1,2-dihidroxibenceno) (Domínguez, 1973). Las quinonas son anillos aromáticos con dos funciones: se ubican en la naturaleza y son causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando se dañan. Poseen una alta reactividad, formando complejo con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio (Domingo, 2003).

Figura 15. Estructura química de las quinonas



(21) 1,4-naftoquinona



(22) 9,10-antraquinona

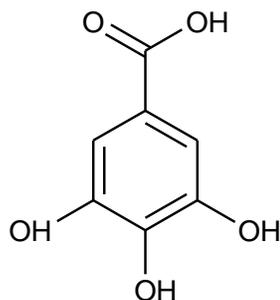
Tomado y modificado de Domínguez, 1973.

Taninos

www.bdigital.ula.ve

Los taninos son compuestos químicos de carácter fenólico de alto peso molecular, no cristalizables que forman con el agua soluciones coloidales de reacción ácida y de sabor astringente. Se distinguen dos grupos básicos de taninos que difieren por su estructura y su origen biogénico: taninos hidrolizables (**Figura 16**) y condensados o catéquicos, en función de que puedan o no ser hidrolizados. Estos compuestos son de sabor astringente y tiene la propiedad común de curtir la piel, haciéndola imputrescible e impermeable al fijarse sobre sus proteínas. Se han descrito más de 30 taninos que pueden inhibir hongos y bacterias (Domingo, 2003).

Figura 16. Estructura química de los Taninos.

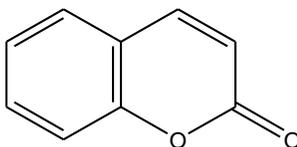


Tomado y modificado de Domingo, 2003.

Cumarinas

Las cumarinas constituyen un grupo importante de compuestos naturales, se les considera derivados de la lactona del ácido o-hidroxicinámico. Son compuestos químicos que poseen el esqueleto de un anillo bencénico unido a un solo carbono, derivan de un fenilpropanoide al que se le deleccionaron dos carbonos de la cadena propánica (**Figura 17**). Son biosintetizadas por las plantas por la vía del ácido shikímico, a partir de fenilalanina. En plantas, se encuentran en los tegumentos de las semillas, frutos, flores, raíces, hojas, y tallos, aunque la mayor concentración se encuentra en general en frutos y flores. Son compuestos importantes no sólo en las respuestas defensivas de la planta, sino, a los que se les atribuye una importante actividad farmacológica que hace posible en humanos, coadyuvar en el tratamiento de múltiples enfermedades y padecimientos (Reija, 2007).

Figura 17. Estructura química de las cumarinas

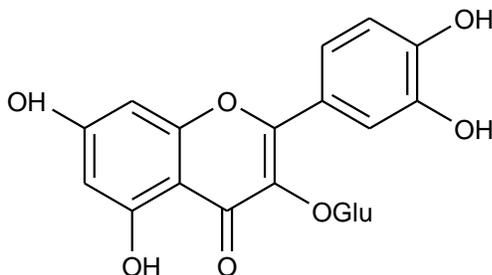


Tomado y modificado de Reija, 2007.

Glicósidos

Son metabolitos vegetales de gran importancia. Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo (**Figura 18**). Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardíacos y glicósidos cianogénicos; estos últimos, cumplen funciones de defensa, ya que al ser hidrolizados por algunas enzimas liberan cianuro de hidrogeno, por un proceso llamado cianogénesis (García y Pérez, 2009).

Figura 18. Estructura química de los glicósidos



Tomado y modificado de García y Pérez, 2009.

Extractos Vegetales

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados, tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca. Los extractos de plantas proporcionan una fuente excelente de propiedades naturales biológicamente activos, una de las características de los extractos es que se pueden presentar varios efectos, ya que el ingrediente activo puede tener un efecto sobre una plaga, sobre un hongo y sobre una bacteria (Gómez y Valcárcel, 2004).

Métodos de obtención de extractos vegetales

Maceración

Es un proceso de extracción sólido-líquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretenden extraer. Consiste en remojar la materia prima fragmentada con el solvente para que este penetre la estructura celular y disuelva las sustancias. El material se agita esporádicamente por un período mínimo de dos días. Luego se decanta el líquido, filtrando y exprimiendo el residuo (Albornoz, 1980).

Lixiviación

Es un proceso que consiste en disolver selectivamente, en un disolvente apropiado, los componentes mayoritarios o los elementos traza de una muestra o un metal líquido, se trata de un proceso inverso a la precipitación,

otro nombre que recibe esta técnica es disolución selectiva (Gómez y Valcárcel, 2004).

Destilación

Es el proceso de evaporar una sustancia, condensar los vapores y devolverlos al estado líquido. La destilación comprende variantes, según si el material vegetal fresco o seco puede alterarse por la ebullición del agua. Generalmente se utiliza el arrastre con vapor, macerando el material con agua en un balón, e inyectando a través de esta masa una corriente de vapor, el agua condensada contiene la sustancia arrastrada la cual se separa por decantación (Albornoz, 1980).

Extracción por Soxhlet

El proceso de extracción por el método Soxhlet se realiza de manera continua de un material sólido que contiene distintos compuestos deseados, se coloca dentro de un dedal de papel filtro grueso, que se carga en la cámara principal del extractor Soxhlet, donde se hace pasar el solvente, este ciclo puede repetirse muchas veces, durante un período de horas o días (Gómez y Valcárcel, 2004).

Calentamiento a reflujo

El reflujo es una técnica experimental de laboratorio para el calentamiento de reacciones. Las cuales transcurren a temperatura superior a la del ambiente, causando que el disolvente se evapore y se condense en el refrigerante de reflujo, volviendo de nuevo al matraz. Es ampliamente utilizada en aquellos procedimientos que requieren mantener un volumen de reacción constante. Además, presenta como ventaja la obtención de dos

extractos que se pueden obtener simultáneamente y en un periodo corto de tiempo (Durst, y Gokel, 1985).

Extracción por solución

Precisa una mayor inversión que la extracción por arrastre de vapor, pero genera un rendimiento casi duplicado respecto a los sistemas anteriores, además de obtenerse «prácticamente todos» los compuestos presentes en la matriz herbácea: volátiles, grasas, ceras, pigmentos, etc. Por otra parte, emplea equipos de vacío para poder obtener los aceites absolutos, con altos costes operativos en comparación con los de extracción por arrastre ; además es necesario utilizar disolventes orgánicos como alcoholes, hidrocarburos, éteres, etc (Palomino, 2001).

Extracción sólido – líquido

Consiste en pulverizar una muestra sólida y en extraer los analitos mediante un disolvente en el que sean muy solubles, que los diferencie de las sustancias presentes en la matriz, que han de ser muy insolubles en ese disolvente. Se suele hacer con agitación, temperatura o ultrasonidos para una mayor eficacia. Normalmente se somete a centrifugación tras la extracción para eliminar los sólidos que hayan podido quedar (Palomino, 2001).

Extracción líquido – líquido

Consiste en extraer los analitos de una muestra líquida mediante un disolvente inmisible en ella, como puede ser una fase acuosa con un disolvente orgánico no miscible. El pH es fundamental para conseguir buen rendimiento (Palomino, 2001).

Extracción por centrifugación

Los extractos obtenidos por este proceso tienen características aromáticas superiores a las conseguidas por extracción por arrastre de vapor. Al no ser un proceso térmico, sus propiedades son más estables, por los antioxidantes naturales presentes. Aun así, la fricción interna de la materia prima provoca un aumento de temperatura no controlable que puede implicar una degradación térmica y un oscurecimiento del extracto (Palomino, 2001).

Extracción en fase sólida

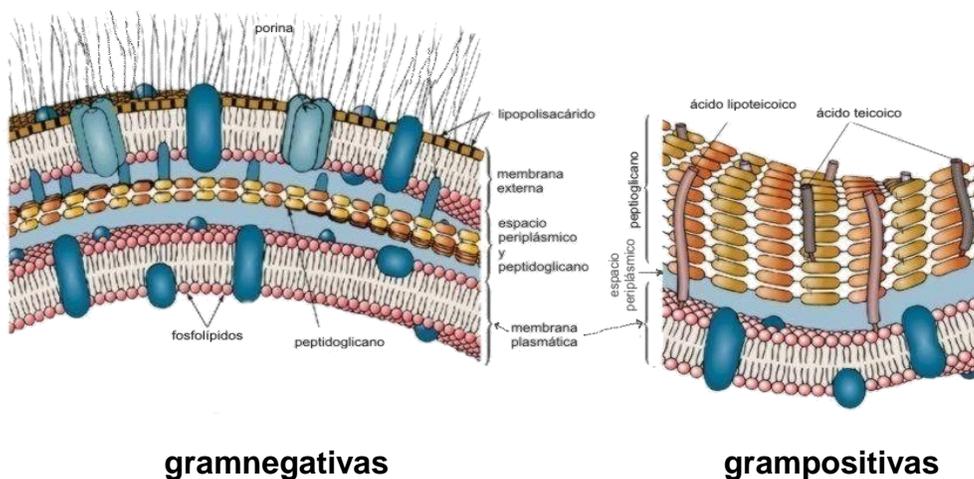
Se emplean columnas o cartuchos capaces de retener el analito, que se extrae posteriormente con un pequeño volumen de disolvente (Palomino, 2001).

www.bdigital.ula.ve

Bacterias

Son microorganismos procariotas unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de golgi ni retículo endoplásmico, se reproducen por división asexual. Poseen membrana citoplasmática, citoplasma, ADN y ARN, ribosomas y pared celular. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja y existen dos formas básicas: una pared celular grampositiva y una pared celular gramnegativa. Su tamaño es variable entre 1 – 5 μm . Las bacterias de acuerdo a la tinción de Gram se clasifican en: bacterias grampositivas y bacterias gramnegativas (**Figura 19**) (Murray, Pfaller y Rosenthal, 2009).

Figura 19. Pared celular de las bacterias grampositivas y gramnegativas



Tomado y modificado de Murray, Pfaller y Rosenthal, 2009.

Bacterias grampositivas

Son aquellas bacterias que poseen una pared celular gruesa que consta de varias capas y está formada principalmente por peptidoglicano que rodea la membrana citoplasmática, este es un elemento clave para la estructura, la replicación y supervivencia de la célula. Posee también otros componentes como los ácidos teicoicos y lipoteicoicos, y polisacáridos complejos. Los ácidos teicoicos son unos polímeros hidrosolubles de fosfato de poliálcool que están unidos al peptidoglicano mediante enlaces covalentes y son fundamentales para la viabilidad celular. Los ácidos lipoteicoicos poseen un ácido graso y se encuentran unidos a la membrana citoplasmática, estas moléculas son antígenos de superficie frecuentes que diferencian los serotipos bacterianos (Murray, Pfaller y Rosenthal, 2009). Estas bacterias cuya pared celular de peptidoglicano es más densa, al ser deshidratadas cierran sus poros impidiendo la salida del complejo violeta de genciana-yodo

(colorante primario), adquiriendo así un color púrpura que le atribuye su característica grampositiva (Marin y Ramírez, 2009).

Staphylococcus aureus

Son bacterias aeróbicas presentes en el medio ambiente y en la flora normal de humanos y animales. Son cocos grampositivos que crecen como racimo de uvas y se diferencian de los estreptococos por ser catalasa positiva. Las especies se clasifican en *Staphylococcus aureus* que son coagulasa positivos y *Staphylococcus epidermidis* y *saprophyticus* que son coagulasa negativa. *S. aureus* es una causa común de infecciones piógenas en piel y otros padecimientos como osteomielitis, artritis séptica, infecciones profundas, abscesos, neumonía, empiema, endocarditis, pericarditis, meningitis y enfermedades mediadas por sus toxinas incluyendo intoxicación alimenticia, fiebre escarlatina, síndrome de piel escaldada y síndrome de choque tóxico (Arteaga y Arteaga, 2005).

Enterococcus faecalis

Son cocos grampositivos, encontrados solos, en pares o formando cadenas y eventualmente pueden tener una morfología cocobacilos. Son anaerobios facultativos y tienen un rango óptimo de crecimiento entre 30 y 35 °C. Todas las especies crecen en caldos con 6,5% de NaCl e hidrolizan la esculina en la presencia de sales biliares. Son organismos catalasa negativa, pero en algunas oportunidades pueden ser catalasa positiva y el ácido láctico es el producto final de la fermentación de la glucosa (Campos, Herrera, y Vargas, 1998).

Las bacterias del género *Enterococcus* han adquirido un papel relevante en las dos últimas décadas, principalmente debido al aumento del número de casos intrahospitalarios, representando en la actualidad la tercera causa de

infección nosocomial. La incidencia anual aproximada de bacteriemia por *E. faecalis* es de uno a dos episodios por cada 1.000 pacientes hospitalizados. Su prevalencia como patógeno nosocomial ha aumentado debido a la selección de estos microorganismos en relación con el uso de antibióticos de amplio espectro sin actividad frente a enterococos, al incremento de procedimientos terapéuticos y de monitorización invasivos en pacientes graves y al aumento del número de pacientes inmunocomprometidos, fundamentalmente neutropénicos (Campos, Herrera, y Vargas, 1998).

Bacterias gramnegativas

Son bacterias que poseen una capa de peptidoglicano delgada, una membrana externa que contiene fosfolípidos, proteínas, y lipopolisacáridos, los cuales están formados por tres regiones estructurales: el lípido A, región central del polisacárido, y antígeno O, el espacio periplásmico existente entre la membrana citoplasmática y la membrana externa contiene las proteínas de transporte, degradación, y síntesis de la pared celular. La membrana externa está unida a la membrana citoplasmática en unos puntos de adhesión; asimismo está fija al peptidoglicano por enlaces de lipoproteínas (Murray, Pfaller y Rosenthal, 2009). Estas bacterias cuya pared celular es rica en lípidos, al decolorar quedan poros en su pared que permiten la salida del complejo violeta de genciana-yodo y al adicionar la safranina (colorante de contraste) toman el colorante por lo que se observan color morado, característica bacteriana gramnegativa (Araque y cols., 2010)

Escherichia coli

Son bacilos gramnegativos poco exigentes en sus necesidades nutritivas y relativamente resistentes a los agentes externos. La bacteria se presenta como bastones gramnegativos, son pequeños, oblongos, finos; se mueven

por medio de flagelos periticos, algunas cepas pueden tener cápsulas y ser inmóviles. Se estima un periodo de incubación de 12 a 60 horas, siendo la media de 48 horas. Causa principalmente colitis hemorrágicas que afectan a cualquier grupo de edad, pero las tasas de infección son máximas en niños menores de cinco años y van decreciendo con la edad. La sintomatología son calambres abdominales seguidos de diarreas acuosas y sanguinolentas (Guevara y López, 2002).

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa es un bacilo gramnegativo, aerobio obligado, móvil, con forma de bastón y con un solo flagelo. Posee una membrana citoplasmática interna y una celular externa. Entre ambas se encuentra el espacio periplásmico que contiene peptidoglicano. Para demostrar la existencia de *P. aeruginosa* en infecciones del aparato respiratorio inferior pueden utilizarse diversas técnicas, como: muestra de esputo, aspiración traslaríngea-trastraqueal, broncoscopia y lavado broncoalveolar. Los cultivos de sangre deberán tomarse siempre durante la fase aguda de la neumonía. También existen pruebas de detección directa rápida con anticuerpos fluorescentes para identificar antígenos en improntas, extendidos y secciones de tejidos (Chavarría, Farías, y Medina, 2005).

Klebsiella pneumoniae

Es una bacteria gramnegativa. Poseen una cápsula prominente que da un aspecto mucoide a las colonias aisladas. Producen neumonía lobular primaria adquirida en la comunidad e infecciones de heridas y del aparato urinario (Murray, Pfaller y Rosenthal, 2009).

Antibióticos

Son sustancias derivadas de un organismo vivo, generalmente un microorganismo o una modificación química de la misma, que inhibe la reproducción, crecimiento, o incluso, destruye otros microorganismos y células anormales (Cruz, Domínguez, Domínguez y Parajó, 2001). Los antibacterianos han facilitado el tratamiento de enfermedades que eran mortales hasta hace poco más de medio siglo. Ello ha contribuido enormemente al aumento de la esperanza de vida y a mejorar la calidad de la misma en la población de muchos países (Betés, Durán, Mestres y Nogués, 2008).

Clasificación de los antibióticos

De acuerdo a las investigaciones realizadas por distintos autores se han diseñado varios esquemas para la clasificación de los antibióticos, sin embargo, la más utilizada es la que los agrupa de acuerdo con su mecanismo de acción y estructura química:

Inhibidores de la síntesis de la pared celular bacteriana

Las penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenemos, pertenecen a la familia de los β -lactámicos ya que la base de su estructura química es el anillo β -lactámico. Los antibióticos β -lactámicos inhiben la síntesis de la pared bacteriana uniéndose a enzimas que actúan en la fase final de la síntesis del peptidoglucano inactivándolas, es decir inactivan a las proteínas ligadoras de las penicilinas (PBP), además, inducen un efecto autolítico, por lo tanto, su efecto es bactericida (Gudiol y Marín, 2003).

Inhibidores de la función de la membrana citoplasmática

Los polipéptidos son antibióticos bactericidas altamente nefrotóxicos, por lo que están restringidos a uso tópico, es decir, para el tratamiento de infecciones cutáneas, oftálmicas y óticas, ya que no se absorben. En microbiología se utilizan principalmente para la identificación de algunos bacilos gramnegativos no fermentadores y para la elaboración de medios selectivos. Su estructura química está conformada por polipéptidos que se unen a los fosfolípidos de la membrana citoplasmática, alterando su permeabilidad y ocasionando su destrucción (Pigrau, 2003).

Inhibidores de la síntesis de proteínas

Este grupo de antibióticos actúa uniéndose a la unidad 30S ribosomal o a la unidad 50S ribosomal, inhibiendo la síntesis de proteínas (García, Mensa y Vila, 2003). Los antibióticos que actúan en la unidad 30S ribosomal son aminoglucósidos y tetraciclinas. Mientras que los que actúan en la unidad 50S ribosomal son fenicoles, macrólidos, lincosaminas, estreptograminas, ketólidos, oxazolidinonas. En líneas generales, los antibióticos pertenecientes a estos grupos son bacteriostáticos excepto los aminoglucósidos y streptograminas que son bactericidas (Pigrau, 2003).

Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos

Se dividen en rifamicinas, quinolonas y sulfamidas. Las rifamicinas son un grupo de antibióticos de estructura compleja que inhiben la síntesis de ARN bacteriano mediante la inhibición de la enzima ARN polimerasa, su acción es bactericida. Por otra parte, las quinolonas son un grupo de antibióticos sintéticos que actúan sobre la replicación del ADN bacteriano inhibiendo la acción del ADN girasa (Topoisomerasa II) y la Topoisomerasa IV, que se

encargan del superenrollamiento de la molécula de ADN y separación de las cadenas de la doble hélice durante la replicación bacteriana. Su acción es bactericida. Así mismo, las sulfamidas son un grupo de antibióticos con actividad contra bacterias y protozoarios. El trimetoprim, que tiene actividad contra bacterias, es un análogo del ácido dihidrofólico, compuesto esencial en la síntesis de aminoácidos y nucleótidos, inhibe competitivamente la enzima dihidrofolato reductasa, impidiendo así la síntesis de ADN y ARN. Su efecto es bactericida (Pigrau, 2003).

Este grupo de antibióticos fueron los primeros quimioterápicos eficaces que se administraron por vía sistémica para prevenir y tratar infecciones en humanos. Las sulfonamidas son análogos del ácido para-aminobenzoico (PABA), compuesto necesario en la síntesis del ácido fólico, que actúan inhibiendo la enzima dihidropteroato sintetasa, enzima que incorpora el PABA en la síntesis del ácido fólico. Su efecto es bacteriostático (Pigrau, 2003).

www.bdigital.ula.ve

Actividad Antibacteriana

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

Clasificación y mecanismo de acción

En la práctica diaria, las clasificaciones que más se utilizan son las que se basan en la acción del antibiótico sobre la bacteria, las que los clasifica según su mecanismo de acción, y al tener en cuenta la coloración de Gram que los agrupa según su estructura química; según el efecto que ejerzan sobre la bacteria pueden ser: bacteriostáticos (aquellos que inhiben la

multiplicación bacteriana, la cual se reanuda una vez que se suspende el tratamiento) y bactericidas (poseen la propiedad de destruir la bacteria, su acción es terapéutica irreversible). Estas designaciones de bacteriostático o bactericida pueden variar según el tipo de microorganismo: la penicilina G suele ser bactericida para cocos grampositivos, pero sólo es bacteriostático contra enterococos (*Enterococcus faecalis*), en tanto que el cloranfenicol suele ser bacteriostático, incluso a concentraciones muy altas, pero puede ser bactericida contra *Haemophilus influenzae* (Hamilton, Jackson y Machado, 1998).

Resistencia bacteriana

El consumo excesivo de antibióticos sin previa autorización médica, ha traído como consecuencia la resistencia de los gérmenes patógenos a esos antibióticos mejor conocida como resistencia bacteriana, creándose un problema mundial, y por tanto el empeoramiento de los síntomas de la enfermedad, que además crean serias dificultades para la eliminación de los gérmenes, sin hablar de los efectos secundarios que pueden provocar enfermedades adversas (Cruz y cols., 2001). Se entiende por resistencia, el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos. Existen diferentes tipos de resistencia entre ellos están:

- Natural o intrínseca: todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permiten tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico, la resistencia se transmite de forma vertical de generación en generación.
- Adquirida: Constituye un problema en la clínica, se pone de manifiesto en los fracasos terapéuticos en un paciente infectado con cepas de un microorganismo en otros tiempos sensibles.

La aparición de la resistencia en una bacteria se produce a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de cromosoma) y por la transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias. La transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético movable como integrones y transposones; esto último no solo permite la transmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos (Fernández, López, Machado y Ponce, 2003).

Mecanismos de resistencia bacteriana

Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antibióticos. El primero de ellos es por la posición de un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, una especie de bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que puede eliminar además muchos de estos agentes antibacterianos. El segundo, se realiza mediante la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entrada (porinas). La producción de enzimas inactivadoras de los antibióticos constituye el tercer mecanismo. Por último, algunos antibióticos ejercen su acción contra las bacterias uniéndose a una proteína esencial para la supervivencia de estas. La resistencia bacteriana se produce cuando el germen modifica la proteína diana, y cambia su función o produce enzimas distintas (Fernández, López, Machado y Ponce, 2003).

Métodos para la Determinación de la Actividad Antibacteriana

Método de difusión en agar

Es llamado técnica de Kirby-Bauer, y se basa en la inhibición del crecimiento del microorganismo alrededor de un disco de papel de filtro impregnado con cantidades conocidas de los agentes antimicrobianos. Esta técnica consiste en la siembra de la bacteria en la superficie de una placa con medio de cultivo, sobre él se depositan los discos de papel impregnados con el antibiótico, los cuales difunden casi instantáneamente a través del agar, formándose un gradiente de concentración del mismo alrededor del disco. Posteriormente, se lleva a incubar a 37 °C durante 18 horas. El microorganismo se desarrolla en toda la placa excepto alrededor de los discos cuya concentración de antimicrobiano es inhibitoria. El diámetro de halo de inhibición del crecimiento expresa la sensibilidad o resistencia del microorganismo, dicho halo es medido en milímetros (Forbes, Sahm y Weissfeld, 2009).

Métodos de dilución

El método de dilución, en agar o en caldo, como test de susceptibilidad microbiana, es utilizado para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia, que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas, y como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo, después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado, respectivamente (Marin y Ramírez, 2009). En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución), que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es

inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la CMI es determinada después de la incubación. Por otra parte, en el método de dilución en agar, las placas se siembran por profundidad con una determinada concentración de extracto vegetal, luego se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas, después de ésta, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las placas; la principal desventaja de este método es la cantidad necesaria de muestra a evaluar (Marin y Ramírez, 2009).

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

Generalidades del Estudio Fitoquímico

El estudio fitoquímico está destinado al aislamiento de principios activos, es decir, de metabolitos secundarios de origen vegetal responsables de una determinada actividad y la metodología que se sigue depende de los objetivos planteados. Los metabolitos secundarios son moléculas generadas por diversas especies vegetales; son elementos que no son necesarios para el crecimiento y la reproducción de las plantas, pero cumplen funciones muy importantes en el reino vegetal, puede ser una ventaja competitiva considerable sobre otros organismos. No todos los componentes químicos elaborados por la planta, presentan el mismo uso dentro de la fitoquímica (Marcano y Hasegawa, 2002).

Alcaloides

La extracción de estos compuestos depende tanto de la naturaleza del material a procesar como de las estructuras químicas y por ende, de las propiedades físicas de los alcaloides presentes que se desean separar del material biológico. Por estar casi siempre en forma de sal son solubles en agua, además pueden utilizarse solventes orgánicos, si son transformados a sus bases libres por alcalinización. Las bases cuaternarias son casi siempre solubles en agua por lo que debe recurrirse a su precipitación por formación de complejos con solución de yodo-yoduro de potasio (Reactivo de Wagner), bicloruro de mercurio, tetrayoduro de potasio (Reactivo de Mayer), nitrato de bismuto pentahidratado (Reactivo de Dragendorff), solución de ácido pícrico (Reactivo de Hager), entre otros (Marcano y Hasegawa, 2002).

Saponinas

Se denominan saponinas a un grupo de glicósidos de comportamiento anfótero, que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial de ésta, por lo tanto, al agitar sus soluciones, se forma una espuma abundante y relativamente estable (Ensayo de la espuma). Por hidrólisis de las mismas con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada generalmente sapogenina, la cual posee un esqueleto esteroideal o triterpenoidal (Blanco y Mena, 2015).

Compuestos fenólicos

Los fenoles son sustratos muy reactivos a la sustitución aromática electrofílica, porque los electrones no enlazantes del grupo hidroxilo estabilizan al complejo sigma que se forma por ataque en la posición orto o para. Para la identificación de los mismos, se utiliza el ensayo con tricloruro

férrico (FeCl_3), en esta reacción el Fe^{3+} , se une al grupo fenólico para formar complejos. Esta respuesta se debe al ataque producido por el ion Cl^- al hidrogeno del grupo $-\text{OH}$, provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenólico al Fe^{3+} . Dicha reacción se caracteriza por generar soluciones vivamente coloreadas (azul, verde y violeta). Si el color es amarillo débil, el mismo que el FeCl_3 , la reacción se considera negativa. Algunos fenoles no dan coloración, como la hidroquinona, ya que se oxidan con el reactivo a quinona (Wade, 2004).

Triterpenos y/o Esteroides

Para su análisis preliminar en plantas la prueba más comúnmente usada es la de Liebermann-Burchard que se basa en la reacción de los triterpenos y esteroides con el anhídrido acético y ácido sulfúrico concentrado, produciéndose una pérdida de agua y una protonización del colesterol. Seguido a esto se constituyen en medio anhidro polímeros de hidrocarburos no saturados de intenso color verde azulado, indicando la positividad de la reacción (Carvajal y Uribe, 2009).

Flavonoides

Para su detección se emplea principalmente la prueba de Shinoda, la cual consiste en una reacción de oxidación del magnesio metálico por la acción del ácido clorhídrico concentrado, dando como productos al dihidrógeno, que es eliminado en forma de gas y el cloruro de magnesio, que es el que forma complejos con los flavonoides dando coloraciones características que van del tono rosa a magenta. El magnesio divalente intensifica la coloración por estar doblemente coordinado (Marcano y Hasegawa, 2002).

Quinonas

Las naftoquinonas y antraquinonas libres, al ser tratadas con la solución de hidróxido amónico forman complejos de color rojo cereza. Al extracto se le adiciona peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico y se procede a calentar, bajo estas condiciones, se hidrolizan los enlaces glicosídicos y se oxidan las antronas y los antranoles hasta antraquinonas, las cuales al ser extraídas con tolueno y agitadas en presencia de una solución de hidróxido de sodio al 5 % que contiene hidróxido de amonio al 2 %, presentan coloraciones que van del rosado al rojo intenso, dependiendo de la concentración de estos compuestos en la muestra. Esta reacción es utilizada para la detección directa de quinonas en los extractos vegetales (Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011).

Cumarinas

Las cumarinas emiten fluorescencia (azul, verde) al ser irradiadas con luz ultravioleta, lo cual permite su reconocimiento. Para llevar a cabo su detección, se tiene en cuenta el hecho de que son fluorescentes a la luz ultravioleta. Para aumentar la intensidad, se tratan previamente con hidróxido de amonio (Butrón y Solano, 2008).

Taninos

Los taninos hidrolizables por tratamiento con ácidos se separan en azúcares y ácidos fenólicos, mientras que los condensados no se degradan. Los primeros, son compuestos reductores que forman sales complejas coloreadas con todos los metales (FeCl_3) y precipitan con acetato de plomo y alcaloides. También poseen la propiedad de coagular la gelatina y esta es utilizada para su identificación, cuya positividad se evidencia por la aparición

de un precipitado blanco, ya que los taninos tienen la propiedad de reaccionar con las proteínas formando compuestos insolubles (Delporte, 2010).

www.bdigital.ula.ve

Definición Operacional de Términos

Actividad Antimicrobiana: Es la capacidad que poseen los antibióticos de inhibir o propagar el crecimiento de determinados organismos en un medio de agar frente a un antibiótico específico. Caracterizados por la sensibilidad o resistencia ante los mismos (Betés, Durán, Mestres y Nogués, 2008).

Antibiograma: Es el estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los agentes antimicrobianos, mediante pruebas que evalúan el comportamiento de un microorganismo ante uno o varios antimicrobianos. Los resultados obtenidos de estos ensayos proporcionan una valiosa información acerca de la posibilidad de tratar con éxito mediante un agente antimicrobiano específico a un paciente infectado con el microorganismo aislado (Araque y cols., 2010).

Bactericida: se entiende por bactericida, toda sustancia, capaz de provocar una acción letal sobre las bacterias, es decir, que genera su muerte (Calvo y Martínez, 2009).

Fitoquímica: es una disciplina científica que tiene como objeto el aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias producidas por los vegetales (Ringuelet y Viña, 2013).

Medios de cultivo: Es una sustancia o solución que permite el crecimiento de uno o más organismos. Así mismo es el producto del crecimiento de un organismo o grupo de organismos, establecido con fines experimentales o industriales. Puede ser puro es decir, cultivo de un solo organismo y su progenie o clonal de un organismo libre de todo contaminante (Domingo, 2003)

Taxonomía: es una ciencia que comprende tanto la identificación, clasificación, nominación y descripción de especies (microtaxonomía), como la clasificación de grupos taxonómicos mayores (macrotaxonomía) (Brusa, Damborenea, Dellapé, Fernández, y Gallardo, 2013).

Toxicidad: es la capacidad de una sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él (Peña, 2005).

Etnobotánica: Es el estudio de la relación de las plantas con el hombre, estudia las relaciones entre los grupos humanos y su entorno vegetal, es decir el uso y aprovechamiento de las plantas en los diferentes espacios culturales y en el tiempo (Araque y cols, 2010)

www.bdigital.ula.ve

Operacionalización de las Variables

Según Arias (2012), las variables se operacionalizan para transformar los conceptos abstractos en empíricos y de esta manera poderlos medir. Las variables son características o magnitudes que pueden sufrir cambios y son el objeto de análisis, medición, manipulación y control en esta investigación. En este trabajo las variables se operacionalizan para convertir los conceptos abstractos en empíricos con el fin de medirlos a través de un instrumento y una metodología pertinente. A continuación, se describen dos variables: La variable dependiente (**Tabla 2**) está relacionada con la actividad antibacteriana y la variable independiente (**Tabla 3**) relacionada con la composición química.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente composición química de los extractos de *Allamanda cathartica*.

1.Variable	2.Tipo de Variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química de los extractos de la especie <i>Allamanda cathartica</i>	Independiente Cualitativa	Son moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos (Ringuelet y Viña, 2013).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6.Indicador
Pruebas químicas cualitativas también conocidas como Tamizaje fitoquímico.	Para las pruebas químicas cualitativas puede haber presencia y ausencia de: -Alcaloides. -Esteroles y/o triterpenos. -Saponinas. -Compuestos fenólicos simples. -Taninos. -Flavonoides. -Quinonas y Antraquinonas. -Glicosidos cardiotónicos. Cumarinas. Sesquiterpenlactonas. .	Alcaloides: la aparición de turbidez o precipitados. -Esteroles y/o triterpenos: coloración azul o verde para esteroides; coloración es rosa, rojo, magenta o violeta para triterpenos. -Formación de abundante espuma, para saponinas. -Compuestos fenólicos: coloración de azul a negro. -Un precipitado blanco indica presencia de taninos. -Flavonoides: coloración naranja a rojo, para flavonas; si es rojo flavonoles y magenta flavononas. -Para antraquinonas y quinonas una coloración roja. -Glicosidos cardiotónicos: coloración púrpura o violácea. -Cumarinas: La presencia de fluorescencia azul-violeta. - Las coloraciones roja, violeta o rosa para sesquiterpenlactonas.

Elaborado por Rincón y Cordero, 2023.

Tabla 3. Operacionalización de la variable dependiente actividad antibacteriana de los extractos de *Allamanda cathartica*

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana de los extractos de la especie <i>Allamanda cathartica</i>	Dependiente Cuantitativa Continua	La actividad antibacteriana, se define como la habilidad específica de ciertas sustancias que forman un compuesto, de lograr su efecto planeado. Y se basa, en la medición de algún atributo del producto, por ejemplo, su efecto inhibitorio frente a un determinado microorganismo. Se determina por el método analítico más adecuado (Castellanos y Pedraza, 2009).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
La actividad antibacteriana se puede medir por: -Método de difusión de disco en agar (Kirby-Bauer).	-Sensible -Sensibilidad intermedia -Resistente Frente a Cepas grampositivas: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 Cepas gramnegativas: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	-Presencia o ausencia del halo de inhibición frente a cepas grampositivas y gramnegativas.

Elaborado por Rincón y Cordero, 2023.

Hipótesis

En vista que los reportes encontrados del género *Allamanda*, sobre sus metabolitos secundarios en diversos extractos y sus actividades biológicas; es de esperar que las hojas de *Allamanda cathartica* presenten sustancias activas que ejerzan actividad antibacteriana en varias cepas grampositivas y gramnegativas

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Cada tipo de investigación tiene características y procesos propios. Pueden ser de tipo exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. (Hurtado, 2010). Por lo que esta investigación fue de tipo confirmatoria, la cual busco verificar hipótesis derivadas de teorías e indagar acerca de la posible relación entre la composición de la *Allamanda cathartica* y la actividad antibacteriana.

Diseño de Investigación

El diseño alude a las decisiones que se toman en cuanto al proceso de recolección de datos (y de experimentación en el caso de investigaciones confirmatorias y evaluativas), que permitan al investigador lograr la validez interna de la investigación, es decir, tener un alto grado de confianza de que sus conclusiones no son erradas. Hurtado (2010). De acuerdo con lo antes expuesto, esta investigación posee un diseño de campo, experimental y de laboratorio, ya que la especie vegetal fue recolectada en su hábitat natural y tratada en un ambiente creado como el del Laboratorio A Química de Productos Naturales “Dr. Carl Seelkopf”, del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes (ULA). Donde la especie se sometió a determinadas condiciones, estímulos o tratamientos, para observar los efectos y reacciones que se producen en la determinación de la actividad antibacteriana.

Población y Muestra

Unidad de investigación

Para Tamayo (2001), la población es la totalidad del fenómeno a estudiar, en donde la unidad de población posee una característica común, la cual se estudia y da origen a los datos de la investigación. La unidad de investigación fue la especie en estudio *Allamanda cathartica*.

Selección del tamaño de la muestra

La muestra estuvo representada por 1000 gramos de hojas frescas de *Allamanda cathartica*, recolectada en el sector La Mata, del Municipio Libertador, del Estado Mérida

Sistema de Variables

Existen diferentes tipos de variables, entre ellas, la dependiente y la independiente. En tal sentido, la variable dependiente es la que refleja los resultados del estudio en una investigación, o bien, es la variable resultante de la investigación. Por otra parte, la variable independiente, representa los tratamientos o condiciones que el investigador controla para probar sus efectos sobre algún resultado (Salkind, 1999). Las variables relacionadas con el propósito de esta investigación fueron las siguientes: variable dependiente (Actividad antibacteriana del extracto de las hojas de *Allamanda cathartica*) y la variable independiente (Composición química de los extractos de las hojas de *Allamanda cathartica*).

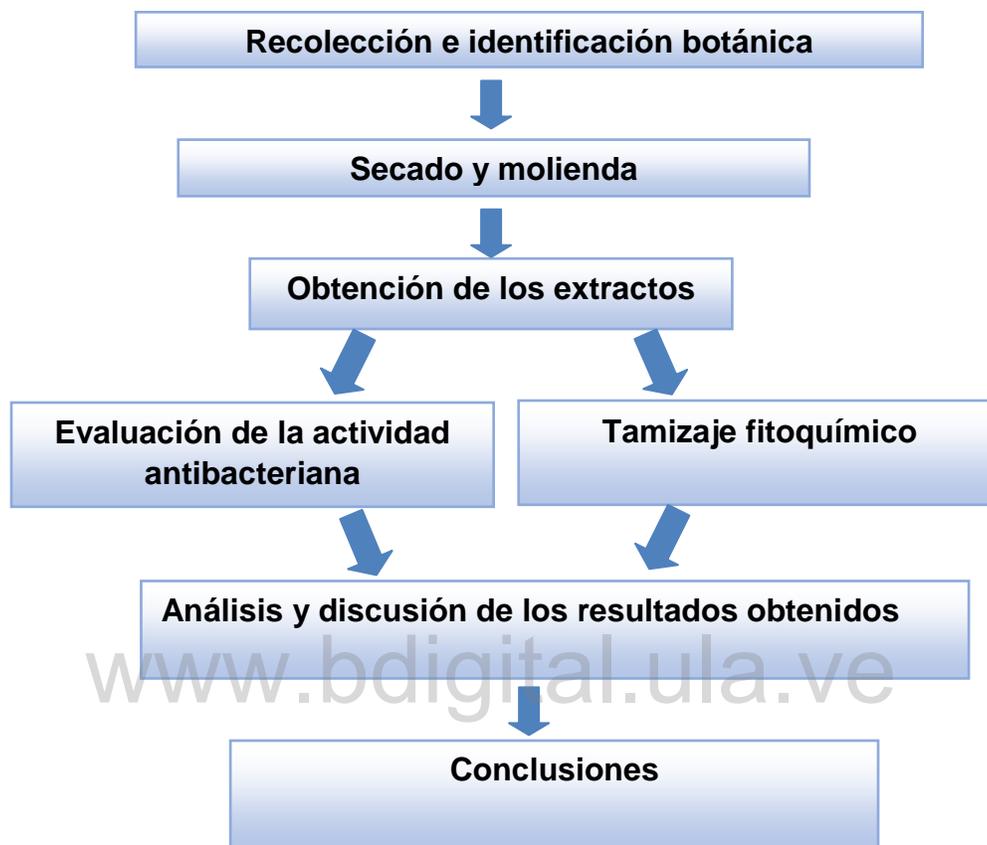
Instrumento de Recolección de Datos

Según, Hurtado (2010) Si se trata de eventos poco estudiados, puede ser necesario que el investigador elabore sus propios instrumentos, y éstos pueden ser listas de cotejo, escalas o cuestionarios, entre otros. En algunas áreas del conocimiento se requiere de instrumentos de medición mecánicos o electrónicos, dependiendo del evento estudiado. Los instrumentos que se utilizaron para la recolección de datos fueron listas de cotejo, las cuales son un instrumento propio de la técnica de observación. Consisten, en una lista de compuestos encontrados en el extracto de las hojas de la *Allamanda cathartica*, así como la presencia o ausencia del halo de inhibición, como característica de la actividad antibacteriana, expresado en milímetros (mm).

Procedimientos de la Investigación

El procedimiento de la investigación se describe con los diferentes estadios que se realizaron durante la realización del este proyecto (**Esquema 1**).

Esquema 1. Procedimiento empleado para la obtención e identificación de los componentes de las hojas de *Allamanda cathartica*



Elaborado por Rincón y Cordero, 2023.

Recolección e identificación botánica

Es importante describir con detalle, el procedimiento que se llevó a cabo, esta descripción permite, no sólo verificar que el procedimiento utilizado cumplió con los requerimientos metodológicos del proceso, sino además hará posible que otros investigadores puedan apoyarse en la información en contextos similares (Hurtado, 2010). El material vegetal utilizado de *Allamanda cathartica*, fue recolectado en su hábitat natural, en el sector La

Mata, Municipio Libertador, del Estado Mérida; e identificado botánicamente por el Dr. Pablo Meléndez (Director del herbario MERF). La obtención de los extractos se realizó en el laboratorio "A" de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo la asesoría de la Dra. Rosa Aparicio. Aproximadamente 1000 g de hojas de la planta, fueron deshojadas, secadas y trituradas para el posterior procesamiento.

Secado y molienda

El proceso de secado se realizó a partir del material fresco, se seleccionaron las hojas de *Allamanda cathartica* las cuales fueron trituradas y secadas en estufa a 40 °C durante una semana, una vez secas las hojas se procedió con la molienda, obteniéndose la cantidad de 100 g de polvo vegetal.

Obtención de los extractos

La obtención de los extractos orgánicos de la planta *Allamanda cathartica* se realizó a través de la técnica de extracción por reflujo en caliente a una temperatura de 40 °C usando hexano, diclorometano y etanol como disolventes, se esperó que enfriaran los extractos, luego se filtró cada uno por separado para posteriormente llevar a cabo la concentración en el rotavapor a 80 rpm y 50 °C. Se obtuvo 2,17 g de extracto de hexano con un rendimiento de 2,17 %, 2,97 g de extracto de diclorometano con un rendimiento de 2,97 % y 9,15 g de extracto de etanol con un rendimiento de 9,15 %.

Tamizaje fitoquímico preliminar

En este análisis se determinó la presencia de metabolitos secundarios en los extractos de *Allamanda cathartica*, para lo cual se realizaron unas pruebas químicas específicas y se logró identificar los metabolitos presentes; entre estas se incluyeron:

Determinación de alcaloides

El extracto etanólico crudo se mezcló con ácido clorhídrico al 10 % y se procedió a la separación de las dos fases, una con cloroformo y la otra con agua. La fase acuosa se alcalinizó y se extrajo con un solvente inmisible. De cada fase se tomó una alícuota y se hizo reaccionar con el reactivo de Dragendorff; la presencia de alcaloides se evidenció por la formación de un precipitado de color naranja. Además, se realizaron dos pruebas más, que se llevaron a cabo empleando el reactivo de Mayer y el de Wagner, la positividad de la prueba se evidenció por la formación de un precipitado de color blanco y marrón respectivamente (Marcano y Hasegawa, 2002).

Determinación de triterpenos y/o esteroides

Se realizó la prueba de Liebermann-Burchard. Se tomó una pequeña cantidad del extracto previamente llevados a sequedad, se adicionó diclorometano en cantidad suficiente para cubrir las muestras, se colocó en el ultrasonic hasta disolver las mismas, se añadió 0,5 mL de anhídrido acético, luego se adicionó cuidadosamente por las paredes de los tubos 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se consideró positiva al observar una coloración azul o verde que indicó la presencia de esteroides, o una coloración roja indicativa de la presencia de triterpenos (Marcano y Hasegawa, 2002).

Determinación de Flavonoides

Se utilizaron dos pruebas para la determinación de flavonoides: la reacción de Shinoda y la reacción de hidróxido de sodio al 10 % que se describen a continuación:

- ***Reacción de Shinoda:*** Se mezclaron virutas de Magnesio, ácido clorhídrico concentrado y el extracto de la planta. Después de algunos minutos el color rosa mostró la presencia de flavonoides (Marcano y Hasegawa, 2002).
- ***Hidróxido de sodio al 10 %:*** Se adicionaron 0,5 mL de NaOH, la aparición de una coloración de amarillo a rojo indicó la presencia de xantonas y flavonas, de café a naranja flavonoles; de purpura a rojizo chalconas y azul de antocianidas (Marcano y Hasegawa, 2002).

Determinación de polifenoles y taninos

Al extracto etanólico se le añadió unas gotas de cloruro férrico al 1 % cuya positividad se evidenció por un viraje de color a azul oscuro o verde oscuro. Además, para la identificación de taninos se utilizó gelatina al 1 % y la reacción positiva se observó por la formación de un precipitado blanco (Marcano y Hasewaga, 2002).

Determinación de saponinas

Una pequeña porción del extracto se agitó fuertemente en agua, y se dejó en reposo; mediante la aparición de una espuma consistente de unos 30

minutos de duración después de la agitación, se evidenció la presencia de este metabolito (Marcano y Hasewaga, 2002).

Determinación de antraquinonas y quinonas

Se colocaron 5 mL del extracto hexano y etanólico en una cápsula de porcelana y se concentró a sequedad, posteriormente se dividió el extracto en 2 porciones. Se agregó 1 gota de hidróxido de amonio concentrado a una parte del extracto; la ausencia de una coloración roja indicó la negatividad de la prueba para antraquinonas. Se agregó 1 gota de ácido sulfúrico concentrado a otra porción de los extractos; la ausencia de una coloración roja indicó la negatividad para quinonas (Marcano y Hasewaga, 2002).

Determinación de cumarinas

Se disolvió la muestra en 1 mL de etanol y en otro tubo con 1 mL de diclorometano, se agregó unas gotas de hidróxido de amonio concentrado a ambos tubos, se llevaron los tubos a la lámpara de luz ultravioleta (UV) a 365 nm, la ausencia de fluorescencia azul indicó la negatividad de la prueba (Marcano y Hasewaga, 2002).

Determinación de glicósidos cardiotónicos

Se determinó mediante la prueba de Keller-Kilan, para lo cual se diluyeron los extractos con 2,5 mL de agua, luego se adicionó 1 mL de ácido acético glacial más una gota de tricloruro férrico, posteriormente se añadió la muestra a un tubo con 0,5 mL de ácido sulfúrico. La positividad de la prueba se evidenció por la formación de un anillo marrón (Marcano y Hasewaga, 2002).

Determinación de lactonas sesquiterpénicas

Se realizó la prueba de Baljet, agregando 2 mg de extracto más 1 mL de hidróxido de sodio al 10 %, y se adicionó 1 gota de ácido clorhídrico. La positividad de la prueba se evidenció por la desaparición del color de la mezcla (Marcano y Hasewaga, 2002).

Determinación de la Actividad Antibacteriana por el Método de Difusión en Disco (Kirby- Bauer)

La determinación de la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de las hojas de *Allamanda cathartica* (**Esquema 2**). La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer y cols (1966) (Método de Kirby-Bauer). Esta prueba se realizó en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la asesoría de la Prof. Yndra Cordero, Prof. Ysbelia Obregón y la colaboración del auxiliar de Laboratorio TSU. José Emilio Salazar.

Bacterias estudiadas

Los microorganismos utilizados para la determinación de la actividad antibacteriana fueron las cepas de referencia internacional, conocidas como cepas ATCC (American Type Culture Collection) Para el presente estudio se utilizaron: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. (**Tabla 4**). Para evaluar la sensibilidad de las cepas bacterianas se utilizó el método de difusión del disco en agar o Kirby-Bauer. (Velasco y cols., 2007)

Tabla 4. Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).

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

Elaborado por Rincón y Cordero, 2023.

Controles positivos

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

Tabla 5. Halos de inhibición de los controles positivos usados como referencia en las cepas bacterianas.

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

Leyenda: Eritromicina (**E**), Ampicilina (**AMP**), Piperacilina (**PIP**), milímetros (**mm**). Lectura de los halos de inhibición recomendados por el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínicos (**CLSI**), halos de cepas ensayadas obtenidos (**CE**).

Elaborado por: Rincón y Cordero 2023.

Preparación de placas

En las placas de Petri se preparó el medio de cultivo colocándose aproximadamente 20 mL de Agar Müeller Hinton (Merck ®) estéril, y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

Preparación de pre-inóculos bacterianos

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

Preparación de los inóculos bacterianos

Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de una asa en aro estéril, tomándose de ésta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en una solución de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0,85 % previamente estéril, hasta alcanzar la turbidez del patrón de Mac Farland N° 0,5 equivalentes a 10^{6-8} UFC/mL.

Inoculación de las placas

Una vez preparada las placas, se inocularon en forma homogénea en la superficie de cada una de ellas con cada uno de los inóculos bacterianos previamente preparados en solución de NaCl al 0,85 % (cepas bacterianas en estudio), utilizando para ello un hisopo de algodón estéril.

Preparación de los discos

Se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los cuales se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), durante toda una noche. Previo a la preparación del inóculo se impregnaron los discos de papel con 10 µL de la muestra en

estudio a una concentración estándar de 10.000 ppm (10 mg/mL). También se utilizaron discos de antibióticos comerciales como control positivo con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar y como control negativo discos impregnados con 10 μ L del solvente dimetil sulfóxido (DMSO).

Colocación de los discos impregnados

En las placas de Petri con Agar Müller Hinton previamente inóculados con cada cepa en estudio, se colocaron los discos impregnados con 10 μ L de la muestra a ensayar y se colocaron los discos de antibióticos comerciales como control positivo correspondiente a cada de las cepas en estudio, además del control negativo; usando una pinza metálica previamente esterilizada (Bauer y cols., 1966).

Pre-incubación e incubación de las placas

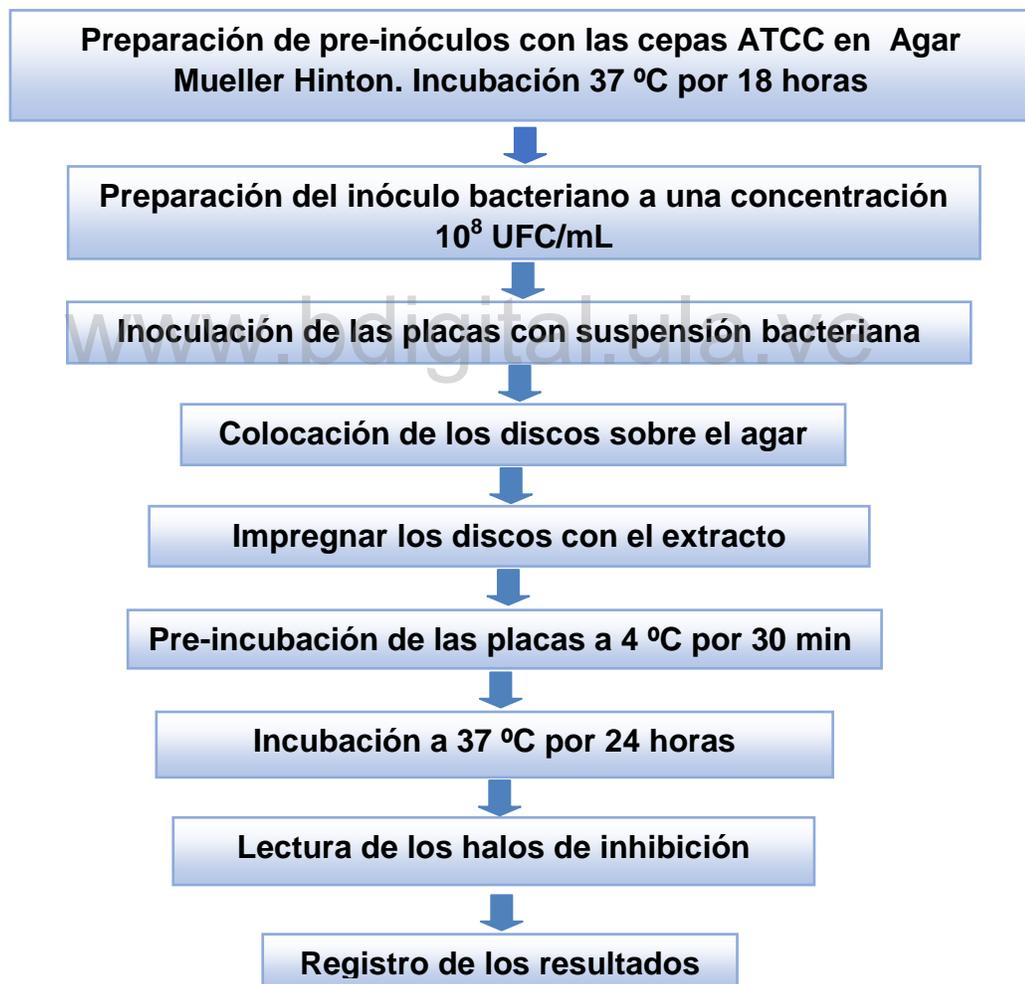
Después de haber colocado los discos en las placas con Agar Müller Hinton previamente inóculados, estas se dejaron en la nevera a temperatura de 4 °C aproximadamente durante 30 min (pre-incubación), con la finalidad de que los discos impregnados con sus diferentes muestras difundieran a través del agar,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

Lectura de las placas

Luego de ser incubadas cada una de las placas por un lapso de tiempo de 24 h estas fueron revisadas para realizar la lectura de las mismas con una regla milimétrica. Se consideró un resultado positivo o sensible (presencia de actividad antibacteriana) cuando se observó un halo de inhibición alrededor

del disco, y se tomó como resultado negativo o resistente (sin actividad antibacteriana) la ausencia de dicho halo. El diámetro de la zona de inhibición producto de la actividad antibacteriana de las muestras en estudio se expresó en milímetros (mm) (Bauer y cols., 1966).

Esquema 2. Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Allamanda cathartica* por el método de difusión de disco en agar (Kirby-Bauer).



Elaborado por Rincón y Cordero, 2023.

Diseño de Análisis

Tal como lo propone Palella y Martins (2006), existen dos tipos de enfoques de investigación: cualitativo y cuantitativo. En el enfoque cuantitativo los datos fueron medidos numéricamente con el fin de ser analizados a través de operaciones matemáticas, este enfoque estuvo representado por el diámetro en milímetros (mm) de los halos de inhibición registrados en las pruebas de susceptibilidad. Mientras que el enfoque cualitativo no se basa en mediciones ni expresiones numéricas, sino en características de la unidad de investigación, y estuvo representado por las características químicas observadas en las pruebas preliminares de identificación, que se llevaron a cabo en el tamizaje fitoquímico. Por lo tanto, la presente investigación tuvo un enfoque cualitativo y cuantitativo de los datos recolectados de la unidad de estudio, con el fin de determinar la composición química y evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de la *Allamanda cathartica* en cepas de referencia internacional.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Las hojas de *Allamanda cathartica* fueron sometidas a un proceso de digestión en caliente con 3 solventes orgánicos: hexano, diclorometano y etanol, por separado, obteniéndose 3 extractos (**Tabla 6**).

Tabla 6. Pesos de los extractos y su rendimiento

Parte de la Planta	Peso	Peso del extracto	Rendimiento del extracto
Hojas molidas	100 g	Hexano: 2,17 g	2,17 %
		Diclorometano: 2,97 g	2,97 %
		Etanol: 9,15 g	9,15 %

Elaborado por Rincón y Cordero 2023.

Los tres extractos de las hojas de *Allamanda cathartica* fueron sometidos a las pruebas químicas preestablecidas para conocer el grupo de metabolitos secundarios contenidos en la muestra. Siendo de forma cualitativa la revelación de cada uno de los componentes por fenómenos químicos de reacción como: viraje de color principalmente, aparición de precipitados, turbidez del medio, producción de espuma por agitación y fluorescencia por

exposición a la luz ultravioleta (UV). Estos fenómenos fueron los indicativos primordiales para la caracterización fitoquímica de las estructuras vegetales (Tabla 7 y 8).

Tabla 7. Reporte de resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de *Allamanda cathartica*.

Metabolitos	Pruebas	Extractos		
		EHAC	EDAC	EEAC
Alcaloides	Reacción de Dragendorff (1),	+ (1)	- (1)	- (1)
	Mayer (2) y	- (2)	- (2)	- (2)
	Wagner (3)	- (3)	- (3)	- (3)
Triterpenos y esteroides	Reacción de Liebermann-Burchard	Triterpenos	Triterpenos	Triterpenos
		-	-	-
		Esteroides	Esteroides	Esteroides
		+	+	-
Saponinas	Reacción de la Espuma	ND	ND	+
Compuestos fenólicos	Reacción con FeCl ₃ al 1 %	ND	ND	+

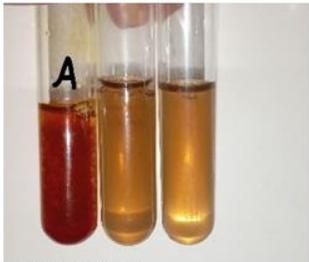
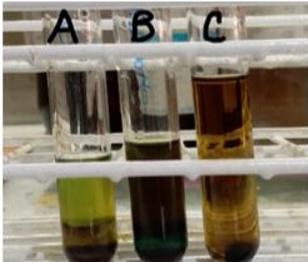
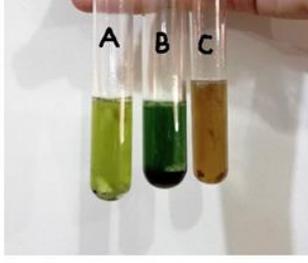
Leyenda: Extracto de hexano de *Allamanda cathartica* (EHAC), Extracto de diclorometano de *Allamanda cathartica* (EDAC), Extracto de etanol de *Allamanda cathartica* (EEAC), No determinado (ND), Ausente(-) Presente (+)
Elaborado por Rincón y Cordero 2023.

Tabla 7. Reporte de resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de *Allamanda cathartica* (Continuación).

Metabolitos	Pruebas	Extractos		
		EHAC	EDAC	EEAC
Flavonoides	-NaOH 10 %	-	-	+
	-Reacción de Shinoda	-	-	-
Cumarinas y Antraquinonas	Reacción con Hidróxido de amonio	-	-	-
Taninos	Ensayo de la gelatina	-	-	-
Lactonas sesquiterpénicas	Baljet	-	-	-
Quinonas	Reacción con H ₂ SO ₄	-	-	-
Glicósidos cardiotónicos	Ensayo de Keller-Kilan	ND	ND	+

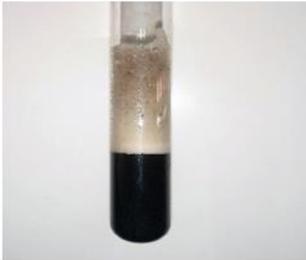
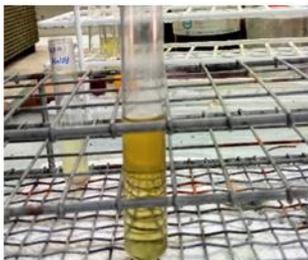
Leyenda: Extracto de hexano de *Allamanda cathartica* (**EHAC**), Extracto de diclorometano de *Allamanda cathartica* (**EDAC**), Extracto de etanol de *Allamanda cathartica* (**EEAC**), No determinado (**ND**), Ausente(-) Presente (+)
Elaborado por Rincón y Cordero 2023.

Tabla 8. Reporte ilustrado de resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de *Allamanda cathartica*.

<p>Prueba: Reactivo de Dragendorff, reactivo de Mayer y reactivo de Wagner</p>  <p>• Metabolitos determinados: Alcaloides</p> <p>• Reporte: Positivo</p> <ul style="list-style-type: none"> • Formación de precipitados color naranja. • Tubos A: solo extracto hexanoico . 	<p>Prueba: Liebermann – Burchard</p>  <p>• Metabolitos determinados: Esteroles</p> <p>• Reporte: Positivo</p> <ul style="list-style-type: none"> • Formación de anillo verde. • Tubo A: extracto hexanoico. • Tubo B: extracto de diclorometano • Tubo C: extracto etanólico 	<p>Prueba: Tricloruro Férrico (FeCl₃)</p>  <p>• Metabolitos determinados: Fenoles</p> <p>• Reporte: Positivo/ligeramente</p> <ul style="list-style-type: none"> • Formación de coloración verde oscura o negra. • Tubo: extracto etanólico.
<p>Prueba: NaOH 10 %</p>  <p>• Metabolitos determinados: Flavonoides</p> <p>• Reporte: Negativo</p> <ul style="list-style-type: none"> • para el extracto de hexano y diclorometano (tubos A-B). Positivo: para el extracto de etanol, (tubo C) hubo viraje de color naranja 	<p>Prueba: Shinoda</p>  <p>• Metabolitos determinados: Flavonoides</p> <p>• Reporte: Negativo</p> <ul style="list-style-type: none"> • No hay presencia de color rojo intenso. • Tubo A: extracto hexano. • Tubo B: extracto diclorometano. • Tubo C: extracto etanol 	<p>Prueba: NH₄OH []</p>  <p>• Metabolitos determinados: Antraquinonas y Quinonas</p> <p>• Reporte: Negativo</p> <ul style="list-style-type: none"> • No hay presencia de color rojo. • A: extracto hexano. • B: extracto diclorometano • C: extracto etanólico.

Elaborado por Rincón y Cordero, 2023.

Tabla 8. Reporte ilustrado de resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de *Allamanda cathartica* (Continuación).

<p>Prueba: Fluorescencia UV</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Metabolitos determinados: Cumarinas • Reporte: Negativo • No hay presencia de fluorescencia azul. • Tubo A: extracto hexano. • Tubo B: extracto diclorometano. • Tubo C: extracto etanólico. 	<p>Prueba: Espuma</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Metabolitos determinados: Saponinas • Reporte: Positivo • Hay formación de espuma. • Tubo: extracto etanólico. 	<p>Prueba: Reacción de Baljet</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Metabolitos determinados: Sesquiterpenlactonas • Reporte: Negativo • No hay Presencia de color naranja a rojo • Tubo: extracto diluido en etanol.
<p>Prueba: Kedde</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Metabolitos determinados: Glucósidos Cardiotónicos • Reporte: Positivo • Presencia de un color violáceo • Tubo A: extracto etanol diluido en agua • Tubo B: extracto puro. 	<p>Prueba: Ensayo de la Gelatina</p>  <ul style="list-style-type: none"> • Metabolitos determinados: Taninos • Reporte: Negativo • No hay formación de un precipitado blanco. • Tubo: extracto etanólico. 	

Elaborado por Rincón y Cordero, 2023.

Evaluación de las Actividad Antibacteriana

Se determinó a través del método de difusión en disco en agar (Kirby-Bauer), con el extracto etanólico de las hojas de *Allamanda cathartica*, a una concentración de 10 mg/mL, frente a las diferentes cepas bacterianas ATCC: dos especies grampositivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), y tres especies gramnegativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Registrando diversos diámetros en los halos de inhibición (**Tabla 9**) (**Figura 20**).

Tabla 9. Resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Allamanda cathartica*

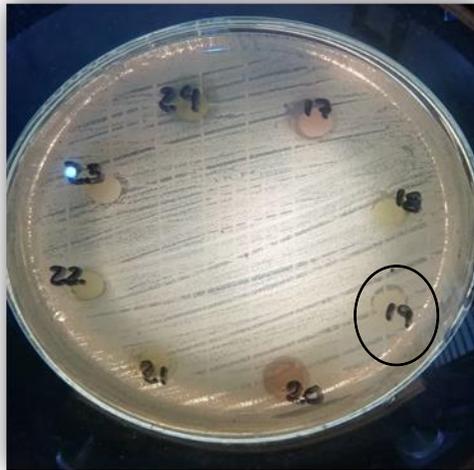
Microorganismos de ensayo	Halos de inhibición en mm				
	Control Positivo			Control Negativo	Extracto etanólico
	Eritromicina 15 µg	Ampicilina 10 µg	Piperacilina 100 µg	DMSO	[] 10 mg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i>	35	-	-	0	7
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	20	-	0	10
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	22	0	7
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	22	0	7

Nota: no hubo crecimiento de la cepa bacteriana *Escherichia coli* ATCC 25922.

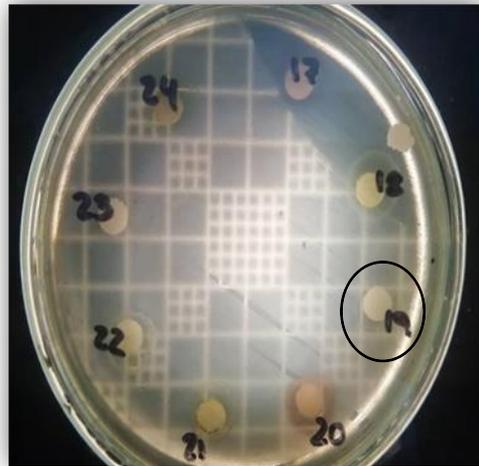
Elaborado por Rincón y Cordero (2023).

Figura 20. Reporte ilustrado de los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Allamanda cathartica*

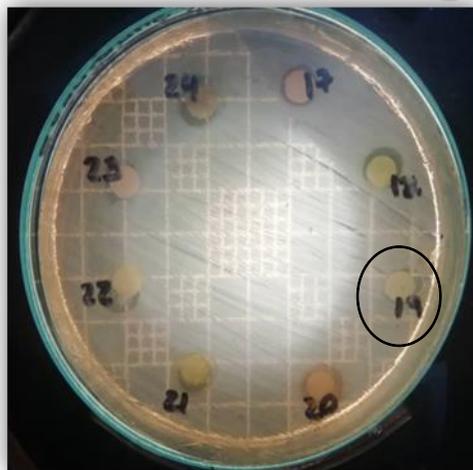
Staphylococcus aureus



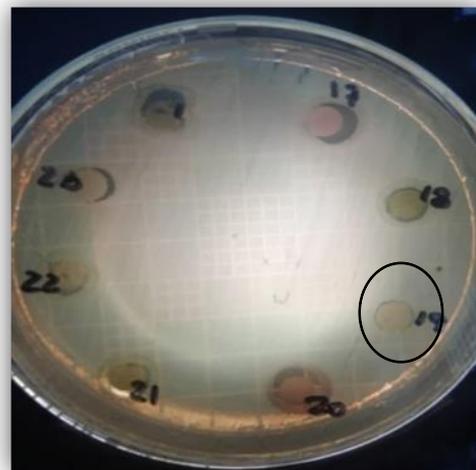
Enterococcus faecalis



Pseudomonas aeruginosa



Klebsiella pneumoniae



Nota: no hubo crecimiento de la cepa bacteriana *Escherichia coli* ATCC 25922.

Elaborado por Rincón y Cordero (2023).

Discusiones

Los resultados obtenidos revelaron la presencia de alcaloides y esteroides en el extracto de hexano, mientras que en el extracto de diclorometano solo se demostró la presencia de esteroides. Por otra parte, en el extracto de etanol se evidenció la presencia de saponinas, flavonoides, compuestos fenólicos y glicósidos cardiotónicos. Además, en la evaluación fitoquímica de compuestos taninos, cumarinas, lactonas y quinonas, se comprobó la ausencia de los mismos, en los tres extractos.

De acuerdo a lo descrito anteriormente, Purnama, Rahmawati, Riski y Yustisla en el año 2022, realizaron una investigación sobre la composición química del extracto etanólico de flores de *Allamanda cathartica*, para lo cual sometieron las flores de la especie en estudio a secado al aire libre durante siete días; posteriormente, para obtener el extracto de la muestra seca de flores de la planta, emplearon el método de maceración utilizando etanol como solvente. Los resultados del análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico de las flores, demostraron la presencia de flavonoides y saponinas. Por tal motivo, este estudio se correlaciona con la presente investigación, ya que en ambos se evidenció la presencia de flavonoides y saponinas en el extracto etanólico, a pesar de que se utilizaron diferentes partes de la planta y se emplearon distintas técnicas de extracción, ya que los investigadores usaron maceración, mientras que en este estudio se obtuvo el extracto por medio de la técnica de reflujo.

Por otro lado, en el año 2019, Nwandu, Nyananyo y Ozimede realizaron un estudio para determinar los componentes bioactivos presentes en once especies de plantas, entre las cuales estuvo incluida la especie *Allamanda cathartica*. Las muestras de las plantas se obtuvieron de las partes frescas de las mismas, luego fueron trituradas y usadas para la obtención de los extractos vegetales, para lo cual emplearon diferentes solventes como butanol y otros de naturaleza ácida, a los que posteriormente se les realizó el

análisis fitoquímico preliminar, el cual tuvo como resultado que el extracto ácido y alcohólico de las hojas de la especie de *Allamanda cathartica* posee alcaloides, saponinas y taninos; por lo tanto, los resultados de ambas investigaciones se correlacionan en cuanto a los alcaloides y saponinas, ya que en el presente estudio se evidenció la ausencia de taninos; esto pudo deberse a que los solventes usados fueron diferentes, además de esto, la recolección de la planta se realizó en diferentes ubicaciones geográficas (Nigeria y Venezuela) y algunos estudios informan que esta última influye en la síntesis de metabolitos secundarios. Sin embargo el hecho de obtener resultados similares aun existiendo variaciones en las condiciones de ensayo, indica que la planta verdaderamente posee los metabolitos secundarios mencionados anteriormente, por lo que se recomienda su uso en la medicina tradicional.

En cuanto a la evaluación de la actividad antibacteriana, fue realizada, empleando el método de difusión en agar con disco (Kirby-Bauer), usando el extracto etanólico de las hojas de *Allamanda cathartica*, frente a cepas bacterianas de referencia internacional (ATCC), presentando halos de inhibición de 7 mm de diámetro contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* y de 10 mm frente a *Enterococcus faecalis*; por otra parte, la cepa de *Escherichia coli*, no fue determinada, debido a que no hubo crecimiento bacteriano.

Ngwe, Tun, Win y Wynn en el año 2019, realizaron un estudio con la finalidad de identificar los componentes fitoquímicos y de evaluar la actividad antimicrobiana de tallos y raíces de *Allamanda cathartica*; los cuales se sometieron a secado, molienda, y luego se realizó el proceso de extracción mediante la técnica de percolación, empleando como solventes el éter de petróleo, acetato de etilo, etanol y agua; posteriormente se evaluó su actividad a una concentración de 20 mg/mL, contra seis microorganismos: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus pumilus*, *Candida albicans* y *Escherichia coli*, mediante el método de difusión

en pozo modificado (Kirby Bauer). El resultado de esta investigación, en cuanto a las pruebas fitoquímicas, demostró en ambas muestras (tallos y raíces), la presencia de alcaloides, flavonoides, terpenoides, esteroides, glucósidos, compuestos fenólicos, saponinas y taninos; además, por cromatografía se aisló un compuesto, que fue la plumericina, a partir del extracto de acetato de etilo de las raíces. Ahora bien, ambos estudios se correlacionan, ya que los resultados del tamizaje fitoquímico de la presente investigación evidenciaron la presencia de alcaloides, flavonoides, esteroides, saponinas y glucósidos, sin embargo, los investigadores demostraron la presencia de otros metabolitos secundarios mencionados anteriormente y esto pudo deberse a que ellos utilizaron diferentes partes de la planta, distintos solventes y la técnica de extracción también presentó variación, ya que los investigadores usaron la técnica de percolación, mientras que en este estudio se empleó la técnica de reflujo; por tal motivo estas pudieran ser las razones de las discrepancias observadas en los resultados de ambas investigaciones.

Por otra parte, los resultados de la determinación de la actividad antimicrobiana demostraron que todos los extractos de las raíces tuvieron halos de inhibición entre 14 mm y 35 mm, mientras que los extractos de los tallos registraron diámetros entre 12 mm y 18 mm. Evidentemente, existen diferencias significativas con los resultados obtenidos en la presente investigación, ya que el mayor halo de inhibición que se registró, tuvo un diámetro de 10 mm (frente a *Enterococcus faecalis*); entonces, esta discrepancia pudo deberse a que los extractos ensayados fueron obtenidos a partir de diferentes partes de la planta, además, la concentración del extracto con el que se evaluó la actividad antimicrobiana fue distinta, los investigadores usaron una concentración de 20 mg/mL, mientras que en el presente estudio se usó una de 10 mg/mL, por lo tanto, es de esperar que los resultados sean diferentes, ya que a mayor concentración del extracto, mayor será la inhibición.

Buitrago, Mender, Rojas y Velasco en el año 2016, realizaron una investigación que tuvo como finalidad evaluar la actividad antimicrobiana de diversas plantas medicinales, entre las que se incluyó *Allamanda cathartica*; frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Cándida albicans* y *Cándida krusei*. Para lo cual se recolectaron aproximadamente 500 g de hojas de la planta fresca, que luego fue sometida a secado, molienda y fue tratada mediante la técnica de extracción por maceración, a temperatura ambiente, usando metanol como solvente. Para la determinación de la actividad antibacteriana se empleó el método de difusión en agar con discos impregnados con 20 µL del extracto, además se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para lo cual se usó una dilución del extracto, en un rango de concentración de 550-20 mg/mL, registrándose un valor de CMI de 304 mg/mL para *S. aureus*. En base a esto, se puede confirmar la correlación entre ambas investigaciones en cuanto a la capacidad inhibitoria de *Allamanda cathartica*, frente a las diversas cepas microbianas, puesto que, a pesar de usar diferentes métodos tanto para la extracción, como para la evaluación de la actividad antibacteriana, así como diferentes solventes y concentraciones de los extractos ensayados, se evidencio la presencia de actividad antibacteriana en ambos estudios. Sin embargo, cabe destacar que en esta investigación se utilizó una concentración de 10 mg/mL de extracto, siendo ésta 30 veces inferior a las concentraciones que demostraron tener actividad inhibitoria significativa (304 mg/mL), frente a las cepas bacterianas ensayadas por los investigadores.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- De 100 g de las hojas de *Allamanda cathartica*, se obtuvo un porcentaje de rendimiento para el extracto de hexano de 2,17 %, diclorometano de 2,97 % y etanol 9,15 % respectivamente, y se realizó mediante la técnica de extracción por reflujo.
- En los extractos de hexano y diclorometano obtenidos de las hojas de *Allamanda cathartica*, se identificó mediante el tamizaje fitoquímico la presencia de esteroides. Por otro lado, en el extracto hexano se demostró también la presencia de alcaloides. Mientras que en el extracto de etanol se evidenció la presencia de saponinas, flavonoides, glucósidos cardiotónicos y compuestos fenólicos.
- El extracto etanólico de las hojas de *Allamanda cathartica*, mediante el método de difusión de disco en agar (Kirby-Bauer) presentó actividad antibacteriana frente a las cepas ensayadas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* con un halo de inhibición de 7 mm de diámetro cada una, mientras que *Enterococcus faecalis* presentó un halo de inhibición de 10 mm, frente a una concentración del extracto de 10 mg/mL. Por otra parte, en cuanto a la cepa de *Escherichia coli*, fue indeterminada, debido a que no hubo crecimiento bacteriano.
- Los resultados obtenidos en esta investigación representan un aporte científico con respecto a la composición química y actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *Allamanda cathartica*, sumándose así a los estudios provenientes del Estado Mérida.

Recomendaciones

- Evaluar si los metabolitos secundarios de los extractos de las hojas de *Allamanda cathartica* presentan otras actividades biológicas como actividad antifúngica, antioxidante, entre otras.
- Aislar, identificar y cuantificar los metabolitos secundarios de otras partes de la planta *Allamanda cathartica* como lo son flores, tallos, raíces y frutos, empleando distintas técnicas como cromatografía, espectrofotometría de masas acoplada a cromatografía de gases, entre otras.
- Evaluar la actividad antibacteriana de cada metabolito secundario identificado, con el objetivo de evidenciar cual es el responsable de dicha actividad.
- Obtener extractos usando distintos solventes como metanol, butanol, éter de petróleo y agua, para poder identificar otros metabolitos secundarios de distinta naturaleza.
- Analizar la actividad antibacteriana del extracto etanólico, por medio de la técnica de dilución en caldo, para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI), de esta manera se lograría determinar la concentración exacta a la cual las cepas bacterianas son inhibidas, además de permitir la comparación de resultados al aplicar el método de difusión de disco en agar (Kirby-Bauer).

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Abarca, R., y Petricevich, V. (2019). *Allamanda cathartica*: Una revisión de la fitoquímica, farmacología, toxicología y biotecnología. *Moléculas*, 24(7), 1235-1238.
- Ahamed, K., Banu, A., y Farzana, B. (2021). Evaluation of inhibitive performance of *Allamanda cathartica* leaves extract as a green corrosion inhibitor on mild steel in acid medium. *Materials Today: Proceedings*, 47 (10), 10-16.
- Akerele, O. (1993). Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. *Foro Mundial de la Salud*, 14 (2), 390-395.
- Albornoz, A. (1980). *Productos naturales sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Albornoz, A. (1997). *Medicina Tradicional Herbaria*. Caracas-Venezuela: Instituto Farmacoterápico Latino S.A. División de fitoterapia y productos naturales.
- Alcántar, M., Giono, S., Morfin, M., Santos, J., y Torres, F. (2021). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta Médica de México*, 156 (2), 2-6.
- Alvarado, C., Jaimes, V., y Villaseñor, J. (2007). La familia Apocynaceae sensu lato en México: diversidad y distribución. *Rev. Mex. Biodivers*, 78 (2), 459-482.
- Aleixandre, A., López, N., y Miguel, M. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos sobre la salud. *Revista Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 32 (3), 81-91.
- Anon, A. (2003). *Determination of minimum inhibitory concentration (MICS) of antibacterial agents by broth dilution*. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(1).

- Araque, M., García, E., Longa, A., Mosqueda, N., Nieves, M., Ramírez, A., Sánchez, K., y Velasco, J. (2010). *Manual práctico de bacteriología general*. Mérida, Venezuela: Colección Textos Universitarios de la Universidad de Los Andes.
- Arias, F. (2012). *El Proyecto de Investigación Introducción a la Metodología Científica*. Caracas-Venezuela: Editorial Episteme, C.A.
- Arteaga, M. y Arteaga, R. (2005). Infecciones estafilocócicas. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 44(3), 178-180.
- Astorga, F., Martín, A., y Santamaría, C. (2015). Extractos vegetales: uso en la reducción del estrés. *Nutrínnews*, 3 (2), 75-78.
- Ávalos, A., y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA*, 2(3), 119-145.
- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45 (2), 493.
- Barros, R., Gómez, D., Mejías, A., Sierra, M., y Suárez, D. (2018). *Productos Naturales: Metabolitos secundarios y aceites esenciales*. Bogotá D.C-Colombia: Fundación Universitaria Agraria de Colombia: UNIAGRARIA.
- Betés, M., Durán, M., Mestres, C. y Nogués, R. (2008). *Farmacología para Fisioterapeutas*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Blanco, Y., y Mena, L. (2015). Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20 (1), 106-116.
- Brusa, F., Damborenea, M., Dellapé, P., Fernández, M., y Gallardo, F. (2013). *Introducción a la Taxonomía Manual de ejercitaciones*. Buenos Aires, Argentina: Editorial de la Universidad de La Plata
- Buitrago, A., Mender, T., Rojas, J., y Velasco, J. (2016). Evaluación de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales seleccionadas del

- Jardín Botánico del Orinoco, municipio Heres, Estado Bolívar. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 58 (1), 2-10.
- Bussmann, R., Fuentes, A., Maldonado, C., Paniagua, N., y Zenteno, F. (2020). La importancia de las plantas medicinales, su taxonomía y la búsqueda de la cura a la enfermedad que causa el coronavirus (COVID-19). *Ecología en Bolivia*, 55 (1), 1–5.
- Butrón, A., y Solano, M. (2008). *Fitoquímica y actividad antibacteriana de las cumarinas*. (Tesis de pre-grado). Universidad Autónoma de México, Los Reyes Iztacala, Mexico.
- Cáceres, A., Martínez, J., y Ocampo, S. (2007). *Manual de agrotecnología de plantas medicinales nativas*. San José Costa, Rica: Ediciones Sanabria.
- Calvo, J., y Martínez, L. (2009). Mecanismo de acción de los antibióticos. *Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica*, 27 (1), 2-3.
- Campos, M., Herrera, L., y Vargas, A. (1998). Aislamientos de *Enterococcus* spp., resistentes a la vancomicina, en muestras de heces de niños costarricenses. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 33(1-2), 29-38.
- Carvajal, R., y Uribe, Y. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de cupatá (*Strychnos schultesiana* Krukoff). *Revista Colombiana Forestal*, 12 (2), 161-170
- Castellano, I., González, E., Morales, I., Pascual, D., y Pérez, Y. (2014). Algunas consideraciones sobre el surgimiento y la evolución de la medicina natural y tradicional. *Medisan*, 18 (2), 1444-1451.
- Castellanos, H., y Pedraza, P. (2009). Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro (Tesis). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C., Colombia.

- Cerros, R., y González, E. (2015). La familia Apocynaceae (Apocynoideae y Rauvolfioideae) en el estado de Morelos, México. *Acta botánica mexicana*, 3 (110), 21-70.
- Chan, E., Kuin, S., y Yan, Y. (2013). Botánica, usos, fitoquímica y farmacología de especies seleccionadas de Apocynaceae: una revisión. *Comunicaciones de Farmacognosia*, 3 (3), 2-4.
- Chavarría, J., Farías, E., y Medina, R. (2005). Neumonía nosocomial por *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista de Medicina Interna*, 21 (4), 368-379.
- Clausnitzer, I. (1968). Los Géneros De Las Apocynaceae De Venezuela. *Acta Botánica Venezolánica*, 3(4), 427–494.
- Cronquist, A. (1981). *Un sistema integrado de clasificación de plantas con flores*. New York: Columbia University Press.
- Cruz, J., Domínguez, J., Domínguez, H., y Parajó, J. (2001). Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2459-2464.
- Delporte, C. (2010). *Farmacognosia Trabajos prácticos*. Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica. Manual práctico. Santiago, Chile
- Domingo, D. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4), 385-393.
- Domínguez, A. (1973). Phytochemistry Methods Frontiers. Revista Latinoamericana de Química. *First Special Supplement. Departamento de Química*, 3 (2) , 1-15.
- Durst, H., y Gokel, G. (1985). *Química orgánica experimental*. Barcelona: Editorial Reverté.
- Endara, C., León, S., Navarrete, H., Pitmam, L., Ulloa, U., y Valencia, N. (2019). *Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador*. Ecuador,

- Quito: Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Endress, B., Morillo, M., Leeuwenberg, A., y Zarucchi, J. (1995). *Flora of the Venezuelan Guayana*. Missouri: Botanical Garden Press.
- Errecalde, J. (2004). *Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en salud pública*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Fernández, F., López, J., Machado, C., y Ponce, L. (2003). Resistencia Bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32 (1), 41.
- Forbes, B., Sahm, D., y Weissfeld, A. (2009). *Diagnóstico microbiológico*. Buenos aires. Editorial: medica panamericana.
- Fatoki, T., Nwinyi, O., Omonhinmin, C., Oranusi, S., y Ugboko, H. (2020). Importancia antimicrobiana de las plantas medicinales en Nigeria. *Hindawi La Revista Mundial Científica*, 2 (1), 2-5.
- Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anuales de la Facultad de Medicina*, 77(4), 327-332.
- García, C. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química viva*, 9 (2), 1666-1700.
- García, E., Mensa, J., y Vila, J. (2003). Macrólidos, cetolidos y estreptograminas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21 (4), 200-208.
- García, A., y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca*, 2(3),119-145.
- Gómez, A., y Valcárcel, M. (2004). *Técnicas Analíticas de Separación*. Barcelona: Editorial Reverté.

- Guevara, J., y López, W. (2002). Infección por *Escherichia coli* Enterohemorrágica. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Ricardo Palma*, 3 (1), 38-41.
- Gudiol, F., y Marín, M. (2003). Antibióticos β -lactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21 (1), 42-55.
- Hamilton, M., Jackson, L., y Machado, L. (1998). Principios Generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Medica*, 2 (2), 13- 27.
- Heywood, V. (1985). *Plantas con flores del mundo*. Oxford: Oxford University Press.
- Hurtado, J. (2010). *El Proyecto de Investigación*. Caracas-Venezuela: Ediciones Quirón.
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia, Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona-España: Ediciones Omega.
- León, H., y Williams, J. (2011). Anatomía de la madera de 26 especies del género *Aspidosperma* (Apocynaceae). *Acta Botánica Venezuelica*, 34(1), 127-152.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (1991). *Fitoquímica Orgánica*. Caracas-Venezuela: Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Caracas-Venezuela: Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.
- Marinoff, M. (2006). Las plantas medicinales desde la Biblia a la actualidad. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, 53 (7), 34-37.
- Marin, D., y Ramírez, L. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Redalyc*, 15 (42), 3-6.
- Medina, J. (2000). *Guía de antimicrobianos y tratamientos de las infecciones*. Madrid: Editorial Días de Santos.

- Mesa, F., y Roig, M. (1988). *Plantas medicinales aromáticas o venenosas de Cuba*. 2da ed. La Habana, Cuba: Editorial Científico-Técnica.
- Morales, J. (2005). Estudios en las Apocynaceae Neotropicales. *Jardín Botánico de Madrid*, 62 (3), 65-68.
- Murray, M., Pfaller, A., y Rosenthal, S. (2009). *Microbiología Médica*. 6ta. Edición. Editorial Elsevier.
- Nwandu, C., Nyananyo, B., y Ozimede, C. (2019). Detección fitoquímica de extractos de hojas de once especies de plantas tropicales seleccionadas del este y sur de Nigeria. *Revista de Ciencias Aplicadas y Gestión Ambiental*, 23(10), 1867-1873.
- Ngwe, D., Tun, Y., Win, N., y Wynn, K. (2019). Aislamiento de un compuesto sesquiterpenoide bioactivo y evaluación de algunas actividades biológicas de tallos y raíces de *Allamanda cathartica* L. *Revista de la academia de artes y ciencia de Myanmar* 17 (1), 454-469.
- Palomino, O. (2001). *Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales*. Apuntes del Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI).
- Parella, S., y Martins, F. (2006). *Metodología de la Investigación Cuantitativa*. Caracas-Venezuela: FEDUPEL.
- Peña, C. (2005). Tipos de toxicidad y escalas de valoración. *Oncología*, 28 (2), 2-6.
- Pigrau, C. (2003). Oxazolidinonas y glucopeptidos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21 (3), 157-165.
- Porta, H., Rocha, M., y Sepúlveda, G. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21 (3), 4-5.
- Purnama, Y., Rahmawati, S., Riski, A., y Yustisla, N. (2022). Características del extracto etanólico de la flor de *Allamanda (Allamanda cathartica L.)*. *Proceder- Conferencia Internacional de Benkulu sobre salud*, 1 (1), 5-7.

- Reija, O. (2007). *Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes*. España: Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes.
- Ringuelet, J., y Viña, S. (2013). *Productos Naturales Vegetales*. Buenos Aires, Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de la Plata.
- Salkind, N. (1999). *Métodos de Investigación*. México: Prentice Hall.
- Tamayo, M. (2001). *El proceso de investigación científica* (4a ed.). México: Limusa.
- Tamayo, R., Verdecia, A., y Mojera, I. (2011). Tamizaje Fitoquímico de los extractos alcohólicos, etéreo y acuosos de las hojas y tallo de la *Isocarpha cubana* B. *Red de Revistas Científicas*, 2 (3), 3-5.
- Velasco J, Rojas J, Salazar P, Rodríguez M, Díaz T, Morales A y Rondón M. (2007). *Antibacterial activity of the essential oil of Lippia oreganoides against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin*. *Nat. Prod. Commun.* 2:85-88.
- Wade, L. (2004). *Química orgánica*. 5ª Edición. Estados Unidos: Editorial Pearson Prentice Hall.