



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



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS
EXTRACTOS DE LAS HOJAS Y FRUTOS *Crescentia cujete* L EN
BACTERIAS GRAMPOSITIVAS Y GRAMNEGATIVAS**

www.bdigital.ula.ve

Autora:

Yoselyn A. Romero B.

C.I. V - 24.879.618

Tutora:

Prof. Ysbelia M. Obregón D.

Mérida, Junio de 2023



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



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS
EXTRACTOS DE LAS HOJAS Y FRUTOS *Crescentia cujete* L EN
BACTERIAS GRAMPOSITIVAS Y GRAMNEGATIVAS**

www.bdigital.ula.ve

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

Autora:

Yoselyn A. Romero B.

C.I. V - 24.879.618

Tutora:

Prof. Ysbelia M. Obregón D.

Mérida, Junio de 2023

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso, que me ha dado la vida, salud, fortaleza para continuar cuando a punto de caer he estado y guiarme a lo largo de mi existencia; por ello con toda la humildad que de mi corazón puede emanar dedico primeramente mi trabajo a Dios.

A mi familia, por ser el pilar fundamental que podemos tener en nuestra vida; mi madre por ser el canal de bendición para traerme a este mundo y apoyarme en mi formación académica, a mi padre por siempre confiar mí, brindarme una palabra de aliento, han hecho posible que de otro paso importante en mi vida y a mi abuela Mariana por siempre estar conmigo durante este proceso, gracias por ser ese ejemplo de perseverancia, nunca podré pagar todo tu sacrificio.

A mi hijo, a ti mi pequeño, eres mi inspiración, llegaste en medio de este camino hacia la meta y me diste el coraje de seguir. Te amo.

A mi esposo, por su amor, comprensión y apoyo incondicional.

A mis tías y hermanas por estar siempre presentes, por sus buenos consejos y ese calor humano que me brindaron a lo largo de este camino.

A todas las personas que me han apoyado y han hecho que este trabajo se realice con éxito, en especial a aquellos que me abrieron sus puertas y compartieron sus conocimientos.

Yoselyn Romera

AGRADECIMIENTOS

A Dios y la Virgen, por ser los inspiradores, darme la fuerza y sabiduría para continuar en este proceso y así lograr uno de mis objetivos más deseados, siendo esa la muestra de su infinita bondad y amor.

A mi familia, gracias por formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, por su apoyo incondicional, compartiendo buenos y malos momentos a mi lado.

A mi tutora, la profesora Ysbelia Obregón, quien con su motivación, conocimiento, experiencia y paciencia me guió en esta investigación y formó parte de este objetivo alcanzado.

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, a cada uno de sus miembros, especialmente a las profesoras Rosa y Álda, por brindarme sus conocimientos y guiarme en el laboratorio.

A mis compañeras y amigas, Ninive, Mercedes, Katy, Betania, Gerardo, Leo, Natalia y a la Sra. Rubí, quién me abrió las puertas de su hogar recibíendome como a una hija y me tendió su mano cuando más lo necesite. Gracias por su apoyo y hacer de esta una experiencia inolvidable.

A la ilustre Universidad de Los Andes, mi casa de estudio, por permitir convertirme en una profesional llena de conocimientos y expectativas y dar un paso más hacia el éxito.

Yoselyn Ramero

Índice de Contenido

	Pág.
Índice de tablas.....	ix
Índice de figuras.....	x
Índice de esquemas.....	xi
Resumen.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: EL PROBLEMA.....	3
Planteamiento del problema.....	3
Justificación e importancia de la investigación.....	6
Objetivos de la investigación.....	8
<i>Objetivo General.....</i>	<i>8</i>
<i>Objetivos Específicos.....</i>	<i>8</i>
Alcances y Limitaciones de la investigación.....	9
<i>Alcances de la Investigación.....</i>	<i>9</i>
<i>Limitaciones de la Investigación.....</i>	<i>9</i>
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	10
Trabajos Previos.....	10
Antecedentes Históricos de la Investigación.....	13
Bases Teóricas.....	15
<i>Familia Bignoniaceae.....</i>	<i>15</i>
<i>Género Crescentia.....</i>	<i>18</i>
<i>Especie Crescentia cujete L.....</i>	<i>20</i>
<i>Productos Naturales.....</i>	<i>24</i>
<i>Extractos Vegetales.....</i>	<i>29</i>
<i>Técnicas de obtención de los extractos.....</i>	<i>30</i>
<i>Tamizaje fitoquímico.....</i>	<i>33</i>
<i>Bacterias grampositivas.....</i>	<i>36</i>
<i>Bacterias gramnegativas.....</i>	<i>37</i>
<i>Características de las bacterias a usar durante el estudio.....</i>	<i>37</i>

Índice de Contenido (continuación)

	Pág.
<i>Resistencia Bacteriana</i>	39
<i>Antibióticos</i>	40
<i>Actividad antibacteriana</i>	42
<i>Método de difusión para evaluar la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal</i>	42
<i>Categorías interpretativas</i>	43
Definición operacional de términos.....	44
Operacionalización de las variables.....	47
Hipótesis.....	50
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	51
Tipo de Investigación.....	51
Diseño de Investigación.....	51
Población y Muestra.....	52
<i>Unidad de Investigación</i>	52
<i>Selección del Tamaño de la Muestra</i>	53
Sistema de Variables.....	53
Instrumentos de Recolección de Datos.....	53
Procedimientos de la Investigación.....	54
<i>Recolección del Material Vegetal</i>	55
<i>Método utilizado para la Preparación de los Extractos</i>	55
<i>Tamizaje Fitoquímico</i>	57
<i>Determinación de la actividad antibacteriana por el Método de Difusión en Disco (Kirby-Bauer)</i>	60
Diseño de Análisis.....	65
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
Resultados.....	66
<i>Tamizaje Fitoquímico Preliminar</i>	66

Índice de Contenido (continuación)

	Pág.
<i>Evaluación de la Actividad Antibacteriana</i>	72
Discusiones.....	75
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	80
Conclusiones.....	80
Recomendaciones.....	82
BIBLIOHEMEROGRAFÍAS.....	83

www.bdigital.ula.ve

Índice de tablas

Tabla N°		Pág.
1.	Taxonomía de Bignoniaceae.....	16
2.	Especies del género <i>Crescentia</i> y su distribución geográfica	18
3.	Parámetros que influyen en la obtención de los extractos vegetales.....	33
4.	Operacionalización de la variable dependiente actividad antibacteriana presente en los de etanol de las hojas y frutos de <i>Crescentia cujete</i> L.....	48
5.	Operacionalización de la variable independiente composición química de los extractos de hexano y etanol de las hojas y frutos de <i>Crescentia cujete</i> L.....	49
6.	Pruebas preliminares para realizar el tamizaje fitoquímico	57
7.	Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).....	61
8.	Descripción del peso de los extractos y su rendimiento porcentual.....	66
9.	Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos obtenidos de las hojas y frutos de <i>Crescentia cujete</i> L.....	67
10.	Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de <i>Crescentia cujete</i> L.....	68
11.	Reporte de resultados obtenidos en la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de <i>Crescentia cujete</i> L.....	73

Índice de figuras

Figura N°		Pág.
1.	Metabolitos secundarios presentes en la Familia Bignoniaceae.....	17
2.	Metabolitos secundarios presentes en el género <i>Crescentia</i>	19
3.	Árbol y fruto de <i>Crescentia cujete</i> L.....	20
4	Distribución geográfica de <i>Crescentia cujete</i> L.....	21
5.	Metabolitos secundarios presentes en <i>Crescentia cujete</i> L.....	22
6.	Rutas biosintéticas de los principales grupos de metabolitos secundarios.....	29
7.	Clasificación de los métodos de obtención de los extractos vegetales.....	32
8.	Material vegetal utilizado en proceso de extracción.....	56
9.	Equipo utilizado para técnica de reflujo en caliente.....	56
10.	Reporte de resultados ilustrados de la actividad antibacteriana de los extractos de etanol de las hojas y frutos de <i>Crescentia cujete</i> L.....	74

Índice de Esquemas

Esquema N°		Pág.
1.	Procedimiento empleado para la extracción, separación e identificación de los componentes de los extractos de <i>Crescentia cujete</i> L.....	54
2.	Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de etanol de hojas y frutos de <i>Crescentia cujete</i> L., por el método de difusión en agar o método de Kirby-Bauer.....	64

www.bdigital.ula.ve



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



Actividad antibacteriana y composición química de los extractos de las hojas y flores de *Crescentia cujete* L en bacterias grampositivas y gramnegativas

Autora: Yoselyn A. Romero B. Cédula: 24.879.618

Tutora: Prof. Ysbelia M. Obregón D. Cédula: 13.019.807

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de las hojas y frutos de *Crescentia cujete* L, en bacterias grampositivas y gramnegativas. La planta fue recolectada en Arapuey, Municipio Julio César Salas del Estado Mérida, procesada en el Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Los extractos fueron obtenidos por reflujo en caliente con hexano y etanol, la identificación de los compuestos se llevó a cabo a través del tamizaje fitoquímico, identificándose triterpenos en el extracto de hexano de las hojas, alcaloides, esteroides, flavonoides y glicósidos cardiotónicos, en los extractos de etanol de las hojas, alcaloides, triterpenos, flavonoides, quinonas, lactonas sesquiterpénicas y glicósidos cardiotónicos y en el extracto de los frutos. Así mismo, la actividad antibacteriana se efectuó por el método de difusión en disco o de Kirby-Bauer en cinco cepas bacterianas a una concentración de 10 mg/mL de los extractos etanol de las hojas y frutos de *C. cujete*, se procedió a la lectura de los halos de inhibición del cultivo bacteriano, demostrando que el extracto etanol de las hojas presentó actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (7 mm), *Enterococcus faecalis* (7 mm), *Escherichia coli* (8 mm), *Klebsiella pneumoniae* (11 mm), *Pseudomonas aeruginosa* no presentó actividad y el extracto de los frutos fue activo frente a *S. aureus* (7 mm), *K. pneumoniae* (7 mm) y *P. aeruginosa* (8 mm), no presentó actividad contra *E. faecalis* ni *E.coli*. Cabe resaltar que esta investigación es el primer estudio de las hojas de *Crescentia cujete* en Venezuela.

Palabras claves: *Crescentia cujete* L, extracto, tamizaje fitoquímico, actividad antibacteriana, bacterias grampositivas y bacterias gramnegativas.

INTRODUCCIÓN

Las plantas se han utilizado como materia prima para la elaboración de preparaciones diversas, tal es el caso de infusiones o jugos, que favorecen el mantenimiento y buen funcionamiento del organismo de los seres humanos, de manera tal que permiten controlar ciertas enfermedades infecciosas, por lo que constituyen un valioso recurso dentro de los sistemas de salud de países en desarrollo, pues según la Organización Mundial de la Salud (2017), más del 80 % de la población utiliza la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud y que gran parte de los tratamientos tradicionales se basan en el uso de extractos de plantas o sus principios activos, con la finalidad de encontrar alternativas terapéuticas efectivas para las infecciones producidas por microorganismos resistentes a los antibióticos.

Según Pengelly (1996), los metabolitos secundarios de las plantas, presentan propiedades biológicas, tienen un importante y significativo valor medicinal y económico en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica, pues un gran número de éstos productos naturales han sido usados desde tiempos remotos para combatir enfermedades, atribuyéndoseles a estos la actividad antibacteriana determinada por su composición química dada por los flavonoides, terpenoides, cumarinas, quinonas y glucósidos.

Varios investigadores han divulgado información acerca de la actividad antibacteriana de *Crescentia cujete* L, usando cultivos de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, demostrándose su actividad antibacteriana como la propiedad de ciertas sustancias que forman un compuesto, o que se hallan en una muestra capaz de eliminar agentes bacterianos o la inhibición de su crecimiento sin incurrir en el daño del objeto, ambiente u organismo que las porta (Parvin, Das, Jahan, Akhter, Nahar e Islam, 2015).

Pérez (2009), agrega que, para el correcto aprovechamiento de las propiedades de las plantas, se hace necesario realizar procesos de extracción que pudieran ser de diversos tipos, en función del método que se utilice y de la concentración de sus principios activos como compuestos producidos de la obtención de sustancias biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, con el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos o de otros), mediante un proceso de extracción adecuado.

El objetivo de la presente investigación fue confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de las hojas y frutos de *Crescentia cujete* L, en bacterias grampositivas y gramnegativas con el propósito de contribuir en la implementación de nuevos fármacos.

Esta investigación ha sido sistematizada de la siguiente manera. El Capítulo I: El Problema, formado por los siguientes subtítulos: Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II: Marco Teórico, en este se enmarcan los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos o Epistemológicos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las Variables e Hipótesis. El Capítulo III: Marco Metodológico, describe el Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Unidad de Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Procedimientos o Metodología de la Investigación y Diseño de Análisis. El capítulo IV está titulado como Resultados y Discusiones, y el capítulo V está titulado y compuesto por, Conclusiones y Recomendaciones.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

La actividad antibacteriana definida por Vemedia (2015), es la capacidad que presenta un compuesto para inhibir o eliminar el aumento de una población de bacterias que puede ser expresada cuantitativamente con pruebas *in vitro* y medidas en concentración inhibitoria mínima (CIM).

La resistencia bacteriana a los antibióticos, es un aspecto particular de la evolución natural del microorganismo, seleccionada bajo la presión de productos antibacterianos. Este fenómeno mundial incluye todos los gérmenes patógenos para el ser humano y las diversas clases de antibióticos. En los países en vías de desarrollo se acumulan factores agravantes puesto que una vez aparecidas las bacterias resistentes se multiplican y diseminan en la comunidad y al faltar tratamientos adecuados se vuelven endémicas. En efecto, cada vez que se ha empleado un nuevo antibiótico las bacterias se han adaptado a él con mayor rapidez, necesitando en general sólo dos a cuatro años para desarrollar nuevos mecanismos de defensa (Oromí, 2000).

Una de las amenazas más relevantes es la bacteriemia que según Gutiérrez (2012), puede originar septicemia, la enfermedad más mortal que ocurre en los centros hospitalarios, relacionada con la resistencia bacteriana a los antibióticos. Cuando el microorganismo entra al torrente sanguíneo produce infecciones, pudiendo afectar severamente órganos vitales como el hígado, corazón, riñones, pulmones y cerebro. De tal manera que es

alarmante el aumento de la resistencia a antibióticos como las quinolonas, cefalosporinas, aminoglucósidos, *B*-lactámicos, tetraciclinas, macrólidos, sulfonamidas y vancomicinas usados en Venezuela.

Desde tiempos remotos, las plantas y sus partes han sido utilizadas de diversas formas, pues gran cantidad de ellas sirven como suplementos nutricionales, colorantes, perfumes, recursos forestales, pero también como agentes terapéuticos, productoras de sustancias analgésicas, antiinflamatorias, sedantes, estimulantes, entre otros usos (Martínez, Patiño y Reyes, 2007).

Galindo (2011), expresa que los aspectos relacionados con la actividad antibacteriana y composición química de *Crescentia cujete* L, contienen flavonoides, terpenoides y glucósidos, además de cumarinas, taninos, quinonas (naftoquinonas), lactonas sesquiterpénicas. Los mencionados metabolitos se encontraron en sus frutos y hojas.

Parvin y cols (2015), resaltan que la evaluación del potencial antiinflamatorio y antibacteriano *in vitro* de las hojas y corteza del tallo de *Crescentia cujete* L, se demostró mediante su potente actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, dado a que ya existen fundamentos que indican algunos compuestos presentes tales como flavonoides, esteroides y triterpenos en la especie a estudiar ciertamente se puede inferir la actividad antibacteriana en hojas y frutos de *Crescentia cujete* L, siendo importante su estudio, ya que a partir de la misma podemos obtener nuevos fármacos o metabolitos secundarios, dando nuevos aportes a la medicina moderna mediante la medicina tradicional ante diferentes bacterias, proporcionando así una alternativa eficaz a menor costo, ante la resistencia de algunas bacterias a diferentes antibióticos, sobre todo en los tiempos de post pandemia por el SARS-CoV-2 (Covid-19). En Venezuela se está vigilando la resistencia bacteriana a los antibióticos desde

el año 1987, cuando se creó el Programa Venezolano de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana a los Antimicrobianos.

Según el reglamento técnico sobre aditivos y saborizantes, Resolución N° 10/06 del Mercado Común del Sur (MERCOSUR) (2006), la extracción consiste en retirar las sustancias o fracción activa contenida en planta, utilizando para eso algún solvente apropiado y toxicológicamente seguro que favorezca el procedimiento. Por tanto, los extractos son productos obtenidos por agotamiento a frío o a caliente, a partir de productos de origen animal, vegetal o microbiano con solventes permitidos.

Al respecto, Gutiérrez (2012), ha señalado acerca de las bacterias resistentes a antibióticos lo siguiente:

Las bacterias más propensas a presentar resistencia a antibióticos dentro de los centros de salud en Venezuela son: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* y *Enterococcus faecium*. La bacteremia puede originar septicemia, la enfermedad más mortal que ocurre en los centros hospitalarios, relacionada con la resistencia bacteriana a los antibióticos. Cuando el microorganismo entra al torrente sanguíneo produce infecciones, pudiendo afectar severamente órganos vitales como el hígado, corazón, riñones, pulmones y cerebro. De tal manera que es alarmante el aumento de la resistencia a las fluoroquinolonas usadas en Venezuela.

Luego de describir la situación actual del problema de investigación, se formula el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos de las hojas y frutos de *Crescentia cujete* L, en bacterias grampositivas y gramnegativas?

Justificación de la Investigación

La actividad antibacteriana tiene gran importancia a nivel clínico porque los compuestos de ciertas sustancias pueden eliminar o inhibir el crecimiento de agentes bacterianos, que impiden el daño de determinado organismo que las contiene, como el caso de los antibióticos u otros cuerpos capaces de combatirlos (Vemedia, 2015).

El continuo y mal uso generalizado de antibióticos condujo a la aparición de mutaciones multirresistentes (MDR) de bacterias patógenas. Luego de décadas desde el descubrimiento de los antibióticos, muchas bacterias patógenas resistentes a los fármacos, antimicrobianos o antibióticos actuales se han considerado un desafío complejo de salud pública mundial. De allí radica la importancia de este trabajo, en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para equilibrar la ecología bacteriana y crear un instrumento de apoyo médico (Vaou, Stravropoulou, Voidarou y Tsigalou, 2021).

A nivel teórico, el presente estudio va dirigido a resaltar la importancia que tiene la actividad antibacteriana en la elaboración de los extractos de *Crescentia cujete* L, analizando su composición química para avanzar en los conocimientos planteados y ahondar en la búsqueda de nuevas explicaciones que permitan mantener o modificar los preceptos o conocimientos iniciales.

En cuanto a la metodología utilizada, el presente trabajo pretende ser un apoyo científico fundamental, no sólo en la elaboración de los extractos de determinada planta medicinal, sino también como antecedente a trabajos posteriores que se relacionen con el presente.

Es de resaltar, que la relevancia de los metabolitos secundarios radica en que los mismos han proporcionado una diversidad de medicamentos

novedosos, mostrando actividad antibacteriana, antifúngica, antitumorales, antiparasitarias y antioxidantes.

Al respecto, Martínez y cols (2007), expresan que poseen gran valor desde el punto de vista social y económico, al presentar propiedades que mejoran las dolencias y las enfermedades de las personas, por tal motivo la evaluación de estos resultan necesarios para una correcta utilización de las potencialidades que ofrecen las plantas. En consecuencia, como desarrollo de alternativas terapéuticas para garantizar la disponibilidad de nuevos productos que reduzcan la mortalidad y morbilidad derivadas de la resistencia bacteriana.

Ya explicadas las razones y relevancias de la presente investigación, se hace necesario focalizar el interés sobre el evento de estudio, actividad antibacteriana y composición química de los extractos de hexano y etanol de las hojas y frutos de *Crescentia cujete* L, desde el punto de vista confirmatorio según Rahmaningsih y Pujiastutik, (2019), quienes expresan que existe una estrecha relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de *Crescentia cujete* L, en la evaluación *in vitro* in silico de la actividad antibacteriana de compuestos bioactivos de *Crescentia cujete* L, frente a *Vibrio harveyi*, cuyas investigaciones al respecto demostraron el potencial del extracto del fruto de la especie como un agente antibacteriano debido a su bioactividad, dado que, posee constituyentes tales como flavonoides, terpenoides y saponinas.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos de hojas y frutos de *Crescentia cujete* L, en bacterias grampositivas y gramnegativas.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos de las hojas y frutos de *Crescentia cujete* L, utilizando el método de reflujo en caliente con los solventes hexano y etanol.
- Analizar la composición química de los extractos de hexano y etanol de las hojas y frutos de *Crescentia cujete* L, utilizando el tamizaje fitoquímico.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de etanol de hojas y frutos de *Crescentia cujete* L, frente a bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) y gramnegativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*), mediante el método de difusión en disco (Kirby-Bauer).

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

Nuevas alternativas que fomenten el uso de *Crescentia kujete* L., en la medicina moderna, como fuente natural prometedora para el desarrollo de fármacos que den respuesta a la antibioticoterapia o terapia con antibióticos. Además, aportar conocimientos sobre la actividad antibacteriana de *C. kujete* L., y confirmar que la mencionada actividad esté relacionada con la composición química de los extractos de la citada especie. Todo esto, siendo el primer reporte de las hojas de *Crescentia kujete* L. en el Estado Mérida-Venezuela.

Limitaciones de la Investigación

Pudieron representar ciertas limitantes:

- El costo de los reactivos específicamente hexano y etanol, así como el del agar (Müeller - Hinton) necesario para la actividad antibacteriana.
- Los cortes imprevistos de energía eléctrica presentados al momento de realizar los procedimientos en el laboratorio y en el trabajo de investigación.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos previos

Entre los trabajos más destacados se puede mencionar a Gonzáles, Sevilla y Tsai (2023), quienes publicaron investigación, titulada: “Actividades farmacológicas de los compuestos bioactivos de *Crescentia cujete* L. Una revisión” planteando como objetivo general: Describir estudios disponibles sobre el uso etnobotánico, general y médico, hallazgos fitoquímicos y aplicaciones farmacológicas de *C. cujete* L. Se recopilaron los estudios disponibles de la especie, en cuanto a los compuestos fitoquímicos y bioactivos de la misma se revelaron numerosos metabolitos secundarios, que se consideran contribuyentes a sus conocidas aplicaciones medicinales y farmacológicas. Los más abundantes en todas las plantas son flavonoides, fitoesteroles, glucósidos y terpenoides. Extractos del fruto de etanol, hexano y diclorometano adicionalmente contienen glucósidos cardíacos, ácido crescéntico, ácido tartárico, ácido cítrico y tánico, irioides, alcaloides, saponinas, compuestos aislados como Crescentosido A, B y C, Crescentin I, II, III IV y V, Acantosido D, Sibiriosido A, Kaempferol, Globulol, Aucubina, Ningpogenina, (2R)-5,6-dimetoxidehidroiso- α -lapachona, entre otros.

En consecuencia, sugieren realizar más investigaciones sobre otras partes de la especie, como las semillas, cortezas y flores, que han sido menos estudiadas para comprender mejor los compuestos bioactivos y su mecanismo de acción. Esto permitirá avances más rápidos y precisos en la aplicación farmacológica de *Crescentia cujete* L.

Por otra parte, Choirul, Rahma y Niken (2022), publicaron un trabajo de investigación titulado: "Actividad antibacteriana *in vitro* de las fracciones de los extractos acuosos, etanol, diclorometano y *n*-hexano de las hojas de Majapahit (*Crescentia cujete* L.) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Su objetivo general: Determinar la actividad antibacteriana de la fracción foliar de *Crescentia cujete* y la concentración óptima para inhibir la bacteria *E. coli*. El extracto de las hojas se obtuvo mediante la maceración con etanol 70 % seguido del fraccionamiento del extracto acuoso, diclorometano y *n*-hexano en la identificación fitoquímica. Para la evaluación antibacteriana utilizaron el método de difusión de disco y agregaron 4 fracciones de las hojas de *Crescentia cujete* L a los discos impregnándolos de ellos, con concentraciones en serie de 5 %, 10 % y 15 % con un total de 20 μ L utilizando como control positivo cloranfenicol® y control negativo dimetilsulfóxido (DMSO) para las 4 fracciones. Los resultados para el tamizaje fitoquímico de los extractos fueron positivos para flavonoides, alcaloides y saponinas. Los resultados de la prueba de actividad antibacteriana de la fracción foliar de la especie, indican estadísticamente que el más activo fue el extracto acuoso al 15 % (6,7 mm \pm 5,8 DS), siendo sensible a diferencia del extracto de diclorometano al 10 % (6,0 mm \pm 4,0 DS) que mostró resistencia. Concluyendo que el uso de diferentes tipos de solventes no produjo diferencias significativas en la inhibición de *E. coli* y no pudiendo determinar la concentración óptima de la fracción foliar de *Crescentia cujete* L, porque con el análisis estadístico no mostró comparación significativa.

El trabajo anteriormente citado, representa un aporte relevante para esta investigación motivado a que *Crescentia Cujete* L, mostró actividad antibacteriana en la cepa probada, sirviendo como alternativa eficaz, económica y de fácil acceso como antibacteriano natural para los seres humanos.

Del mismo modo, Linares (2021), en su trabajo titulado: Evaluación química y actividad antibacteriana de los extractos orgánicos producidos por hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth”, cuyo objetivo general fue: Evaluar la actividad antibacteriana de extractos producidos por hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth e identificar el perfil químico del extracto con mayor actividad. Se estandarizó el método basado en cromatografía en capa fina (CCF), el Factor de retención fue de 0,72 con coloración naranja en la placa donde se agregó reactivo de Dragendorff, el cual permitió identificar (alcaloides, aminas biogénicas, terpenos y aminas fenólicas), producidos por el hongo endófito aislado de *Crescentia alata* Kunth, que demostró la mayor actividad antibacteriana (mayor halo de inhibición de 10 mm). El extracto del sobrenadante del hongo endófito aislado de la rama *Crescentia alata*, identificado como *Periconia cf. ignaria* (CaBr80) inhibió el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (halo de inhibición 8,1 mm con ambas bacterias). La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), contra las bacterias *E. coli* y *S. aureus*, fue de 250 y 21,25 µg/mL y punto de aplicación de 500 µg/mL del extracto diluído en acetato de etilo.

Dicho estudio, se relaciona con el presente, motivado a que se evalúa químicamente la actividad antibacteriana de los extractos orgánicos producidos por hongos endófitos aislados de *Crescentia alata* Kunth”, usando bacterias como *E. coli* y *S. aureus*. Por consiguiente, se comprueba que en su composición química posee alcaloides y otros metabolitos secundarios, lo que guarda similitud con lo que se pretende realizar en el actual trabajo de investigación (Arroyo, 2019).

Asimismo, Vinicius, Silva, Nuñez, Méndez, Marques y Maia (2020), publicaron un trabajo de investigación, titulado: “Actividad antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Chenopodium ambrosioides* y *Crescentia cujete* (coité) sobre *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*”, planteando

como objetivo general: Analizar la actividad antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* y *Crescentia cujete* (coité) en cepas de *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus* resistente y sensible a Meticilina (MRSA y MSSA). La investigación *in vitro* de la actividad antibacteriana fue determinada por la técnica de difusión en pozo con 100 mg/mL de los extractos para posterior medición de los halos de inhibición. Como control positivo se utilizó digluconato de clorheximida al 0,12 %. Se realizó la prueba de Mann Whitney para verificar la diferencia antibacteriana ante cada extracto. *Crescentia cujete* L, mostró un efecto antibacteriano equivalente o superior a la clorheximida al 0,12 % en las cepas probadas demostrando halos de inhibición de 15,8 mm frente a *S. mutans* y 16,2 mm contra *S. aureus*.

El trabajo anteriormente citado, representa un aporte relevante para esta investigación motivado a que *Crescentia Cujete* L, mostró actividad antibacteriana en las cepas probadas, sirviendo como alternativa eficaz, económica y de fácil acceso como antibacteriano natural para los seres humanos. Estos hallazgos podrían contribuir a mejorar la salud pública al proporcionar una nueva opción para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por bacterias patógenas.

Antecedentes Históricos de la Investigación

El hombre ha utilizado las plantas no solo como fuente de alimentos sino para el tratamiento de las enfermedades. Existen evidencias que indican que las propiedades medicinales de las plantas se descubrieron en su mayoría de manera casual lográndose conocer, por ensayo y error qué tipo de plantas eran. Se hace referencia a numerosas fórmulas y procesos, como extractos acuosos y oleosos, infusiones de vino, ebulliciones, unciones y demás. Entre los personajes que influyeron en el uso racional de los

productos naturales están: Hipócrates, el cual usaba las plantas con fines curativos; Paracelso quien introdujo un nuevo enfoque desde el punto de vista químico en el uso de las plantas. Diocles, autor de la *Botánica Médica*. Dioscórides (77 a.C.), autor de *La Materia Médica*, considerada como la principal guía de plantas medicinales de la antigüedad (Rojas, 2019).

En cuanto a la evolución de los productos naturales se conoce que, hasta comienzos del siglo XIX, los medicamentos fueron únicamente preparados a base de sustancias naturales, principalmente de origen vegetal y en menor proporción animal y mineral; con el continuo avance de la ciencia se fueron desarrollando técnicas y procedimientos que permitieron sintetizar sustancias para sustituir a los productos procedentes de la naturaleza (Rojas, 2019).

Estos compuestos se clasifican en dos grupos: Los metabolitos primarios que son todos aquellos compuestos que participan en los procesos químicos conocidos como respiración, transporte de solutos, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes y diferenciación de tejidos; los cuales intervienen en forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas. Han sido clasificados como carbohidratos, lípidos y proteínas (Rojas, 2019).

Por su parte, los metabolitos secundarios son los compuestos químicos biosintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales para el desarrollo de las mismas, en defensa contra predadores y patógenos; sirven como sustancias atractoras de los organismos polinizadores y actúan como agentes alelopáticos, que al ser liberados ejercen efectos sobre otras plantas (Rojas, 2019).

A partir de entonces, la atención de los químicos respecto a los productos naturales fue virando hacia la disolución de las rutas biosintéticas halladas en la planta, convirtiéndose los metabolitos secundarios en una fuente inagotable de compuestos químicos y complejas sustancias activas,

que desde hace muchos años han sido explotadas por el hombre (Torres, 2004).

Ahora bien, *Crescentia*, por Pier Crescenzi (1230/35-ca. 1320). El mismo fue un jurista italiano de Bolonia, también conocido por ser escritor de un libro de agricultura y jardinería. Escribió un tratado agrícola basado, en gran medida, en las fuentes clásicas y medievales, así como en su propia experiencia como propietario de tierras. Así mismo, la “L”, por el autor Carl Von Linneo el cual fue un naturalista sueco que desarrolló la nomenclatura binómica para clasificar y organizar los animales y las plantas (Galindo, 2011).

Bases teóricas

Familia Bignoniaceae

Aspectos botánicos

Se caracteriza por incluir varios géneros de grandes árboles y un gran número de lianas, así como por las hojas opuestas y compuestas. Zonas glandulares con frecuencia presentes entre los peciolo; escamas de las yemas axilares frecuentemente pseudoestipulares o algunas veces foliáceas. Hojas por lo general opuestas, palmeadas o pinnado compuestas, algunas veces simples, el foliolo terminal con frecuencia reemplazado por un zarcillo. Inflorescencia terminal o axilar, algunas veces reducida a un fascículo o una sola flor. El fruto es capsular y formado por dos valvas, generalmente dehiscente. Semillas planas y normalmente aladas (Amat y Aguirre, 2019).

Distribución geográfica y taxonomía de Bignoniaceae

Tiene una distribución casi cosmopolita, pero principalmente tropical, de América del Sur, con algunas especies nativas de las zonas templadas (Tabla 1). Comprende unos 120 géneros y alrededor de 750 especies. En

Venezuela la familia se distribuye aproximadamente en 30 géneros y 157 especies (Amat y Aguirre, 2019).

Tabla 1. Taxonomía de Bignoniaceae

Dominio	Eukarya
Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Scrophulariales
Familia	Bignoniaceae
Géneros	<i>Catalpa, Crescentia, Jacaranda, Kigelia, Markhamia, Parmentiera, Radermachera, Spathodea, Tecoma, Fridericia, Tabebuia...</i>

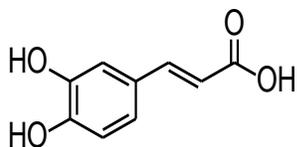
Tomado y modificado de Amat y Aguirre, 2019.

Metabolitos secundarios aislados

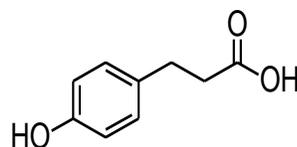
Representan una valiosa fuente para la producción de compuestos químicos en general, como flavonoides; flavonas, flavononas, isoflavonas, naftoquinonas, glucósidos iridoides alcaloides, triterpenos, polifenoles y taninos (Villarreal, Moreno, Jaimez, Rojas, Lucena, Díaz, Díaz y Carmona, (2017).

El género *Tabebuia*, perteneciente a esta familia, en diferentes partes del árbol posee ácidos: cafeico **(1)**, *p*-hidroxicumárico **(2)**, *p*-cumárico **(3)**, oleanólico, ferúlico **(4)**, gentísico, cianidina-3-O-β-D-rutinósido, hentriacontan-1-ol, *n*-hentriacontano, *n*-hexacosano: lapachol, α-isodeshidrolapachona. lupenona, lapachona **(5)**, Nafto-(2,3- β)-furano4,9 diona,2-(1-hidroxietil) **(6)**, sitosterona, β-sitosterol, especiósido, tecomaquinona I, II y III y deshidrotectol (Figura 1) (Idiáquez, Maradiaga, y Mayorga, 2015).

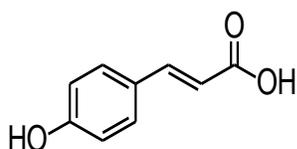
Figura 1. Metabolitos secundarios presentes en la Familia Bignoniaceae



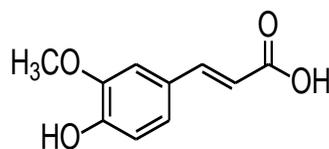
Ácido cafeico (1)



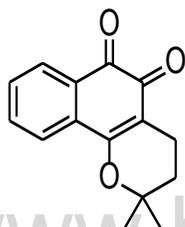
Ácido *p*-hidroxicumárico (2)



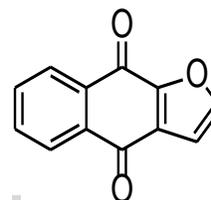
Ácido *p*-cumárico (3)



Ácido ferúlico (4)



Lapachona (5)



Nafto-(2,3- β -furano)-4,9-diona2-(1-hidroxietil) (6)

Tomado y modificado de Idiáquez, Maradiaga, y Mayorga, 2015.

Actividades farmacológicas

Entre las diversas actividades farmacológicas destacan: antiinflamatoria, antitumoral dada por el lapachol, antimicrobiana ya que la β -lapachona tiene actividad antimicrobiana contra *Bacillos subtilis* *Salmonella typhimurium* y *Candida albicans*, antiviral, antihelmintica, antioxidantes, antiresfriados, antiprotozoal, anticancerígena, reconstituyente y energizante (Gachet y Schühly, 2009).

Género *Crescentia*

Aspectos botánicos

Los árboles del género *Crescentia*, presentan una abundancia muy amplia en el bosque seco tropical caracterizado por la predominancia de matorrales y arbustos con espinas (Gentry y Tomb, 1979). No se reporta ningún trabajo que trate de manera inclusiva los caracteres anatómicos del género, pero sí existen estudios a nivel de subfamilia y género que ayudan a la disociación de especies (Jiménez, 2008).

Distribución geográfica y taxonomía

El género *Crescentia* comprende 6 especies diferenciadas (tabla 2), en América tropical se encuentran distribuidas principalmente desde México y las Antillas hacia Centroamérica, mientras *Crescentia kujete* L. y *Crescentia amazónica* Ducke se encuentran en el norte de Sudamérica (Gentry y Tomb, 1979).

Tabla 2. Especies del género *Crescentia* y su distribución

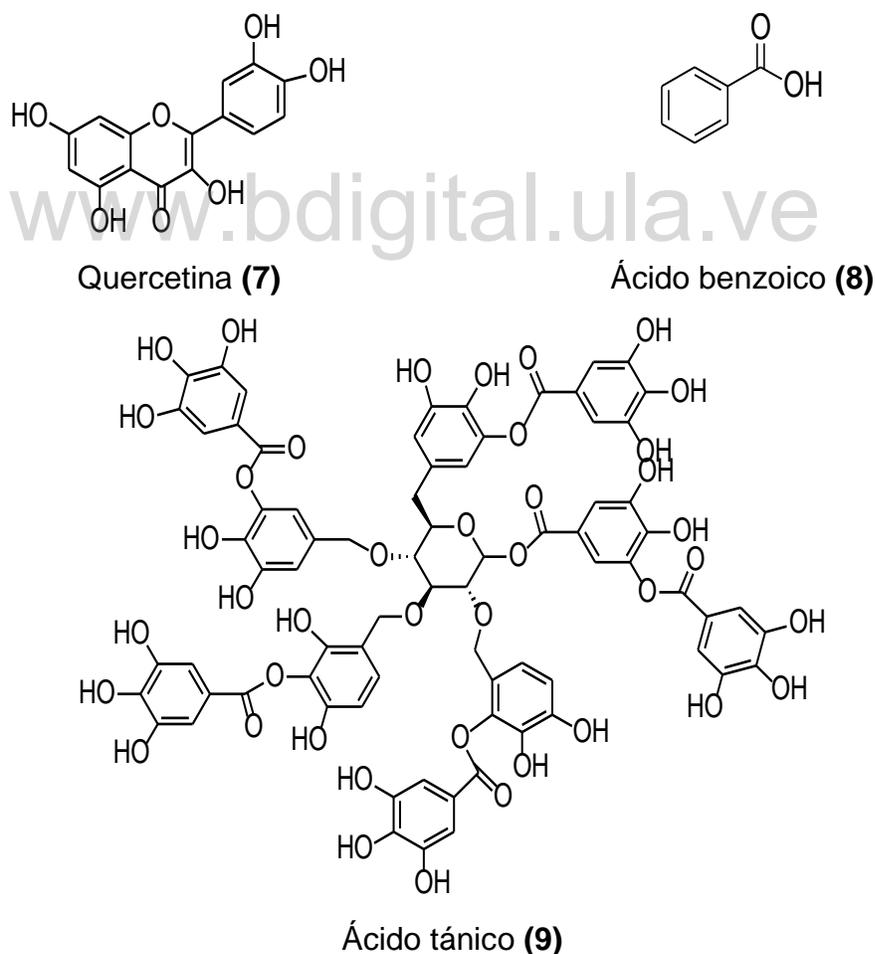
ESPECIE	DISTRIBUCIÓN NATURAL
<i>Crescentia alata</i> H.B & K	México, Honduras, Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica.
<i>Crescentia amazónica</i> Ducke Venezuela.	Colombia, Brasil, Perú.
<i>Crescentia kujete</i> L.	Venezuela, Colombia, Brasil, Ecuador, Perú, Bolivia, Panamá, México, Honduras, Guatemala, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica, Belice, Cuba, Puerto Rico
<i>Crescentia linearifolia</i> Miers	Puerto Rico, Belice, República Dominicana, Haití
<i>Crescentia mirabilis</i> Ekman ex Urban	Cuba
<i>Crescentia portoricensis</i> Britton	Puerto Rico

Tomado y modificado de Gentry y Tomb, 1979.

Metabolitos aislados

Presencia de de grupos de metabolitos secundarios, flavonoides como quercetina (**7**) y epigenina, esteroides y triterpenos hallados especialmente en *Crescentia alata* (Figura 2). Además de compuestos fenólicos tales como Ácido benzoico (**8**), taninos como el ácido tánico (**9**), furanonaftoquinonas (3-hidroximetilfuro [3,2- β]nafto [2,3- β]furan-5,10-diona), ácido crescéntico y oligosacáridos (dextrina) (Arroyo, 2019). Adicionalmente bioactivos: isotiocianatos, tiocianatos e índoles (Heltzel y cols., 2007).

Figura 2. Metabolitos secundarios presentes en el género *Crescentia*



Tomado y modificado de Heltzel y cols., 2007.

Actividad farmacológica

Se ha determinado que posee efectos anticancerígenos, antifúngicos, antibacterianos, antiparasitarios; evitando la diarrea causada por amibas, expectorante ya que es auxiliar en el tratamiento de bronquitis, propiedades antidiabéticas y la pulpa del fruto es usada como tratamiento para la psoriasis (Heltzel y cols., 2007).

Especie *Crescentia cujete* L

Aspectos botánicos

Es un árbol de tamaño mediano con ramas largas y extendidas, hojas agrupadas en fascículos espatuladas, obtusa, acuminadas en el ápice estrechas hacia la base casi sésiles, corteza lisa y verdosa. Su rasgo más distintivo es el fruto, el cual es una calabaza esférica con cáscara dura, leñosa y pulpa gelatinosa con numerosas semillas (Figura 3) (Espitia y cols., 2011). Inflorescencias formadas por 1 a 2 flores grandes cauliflora, campanuladas, a lo largo de ramas y troncos, el cáliz bilabiado, amarillentas solitarias, amontonadas con pedúnculos robustos (Galindo, 2011).

Figura 3. Árbol y frutos de *Crescentia cujete*.

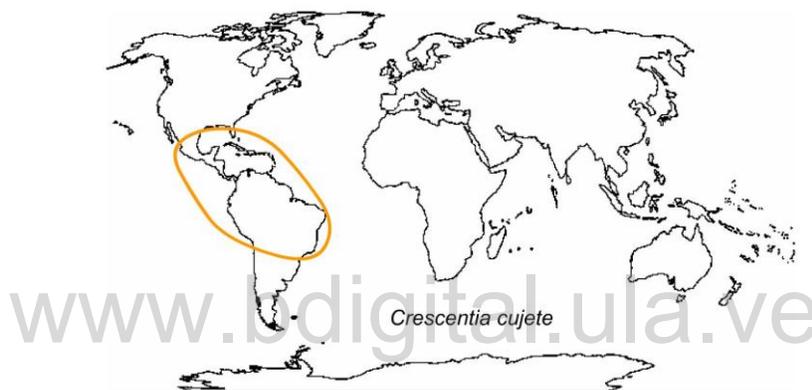


Tomado y modificado de León y cols., 2013.

Distribución geográfica *Crescentia cujete* L

Es un árbol de la zona intertropical, originaria de América de unos 5 metros de altura (Figura 4). Es conocida popularmente en algunos países con los siguientes nombres: En México, Cuba y Ecuador es llamada jícaro, en el Salvador como mate o totuma, en Venezuela y Colombia totumo o tapara (Espitia y cols., 2011).

Figura 4. Distribución geográfica de *Crescentia cujete* L



Tomado y modificado de Espitia y cols, 2011.

Metabolitos secundarios aislados de *Crescentia cujete* L

Los estudios realizados de los extractos etanólicos, metanólicos y etanol-agua (70:30 v/v) de la corteza, señalan (Figura 5) antocianinas, flavonas como Kaempferol **(10)**, fenoles tales como Sibiriosido A **(11)**, alcaloides, irioides, falvodiol, leucoantocianinas; en forma notable glicósidos irioides: Crescentosido A **(12)**, Crescentosido B **(13)**, Crescentosido C **(14)**, Aucubina **(15)**, Ningpogenina **(16)**, Acantosido D **(17)**, terpenos (estigmasterol, asperulósido), saponinas, esteroides, presencia de cumarinas, taninos y derivados antracénicos libres (Guevara, Hernández, Camacho, Cruz y Bulás, 2020). La pulpa del fruto es rica en ácidos crescéntico,

tartárico, cítrico, tánico, cianhídrico y clorogénico. También contiene alcaloides cuaternarios y polifenoles, ácido gentísimo 1,4- naftoquinona, 2-(1'-hidroxietil)-hidroxifurano; azúcares, proteínas, ácidos oléico y linoléico. El tallo contiene naftoquinonas y las hojas ácido caféico (Cáceres, 1996). Además en este se aisló furanonaftoquinonas: (2R)-5,6- Hidroxi-dehidroiso- α -lapachona (**18**) y 2-(l-Hydroxyethyl)naphtho[2,3- β]furan-4,9-dione, derivados sesquiterpénicos (Globulol) y glicósidos irioides como el Ajugol (**19**). Los componentes de los frutos reportan furanononaftoquinonas, las cuales han demostrado actividad selectiva para dañar el ADN de tumores cancerígenos (González, Sevilla y Tsai, 2023).

Figura 5. Metabolitos secundarios presentes en *Crescentia cujete* L.

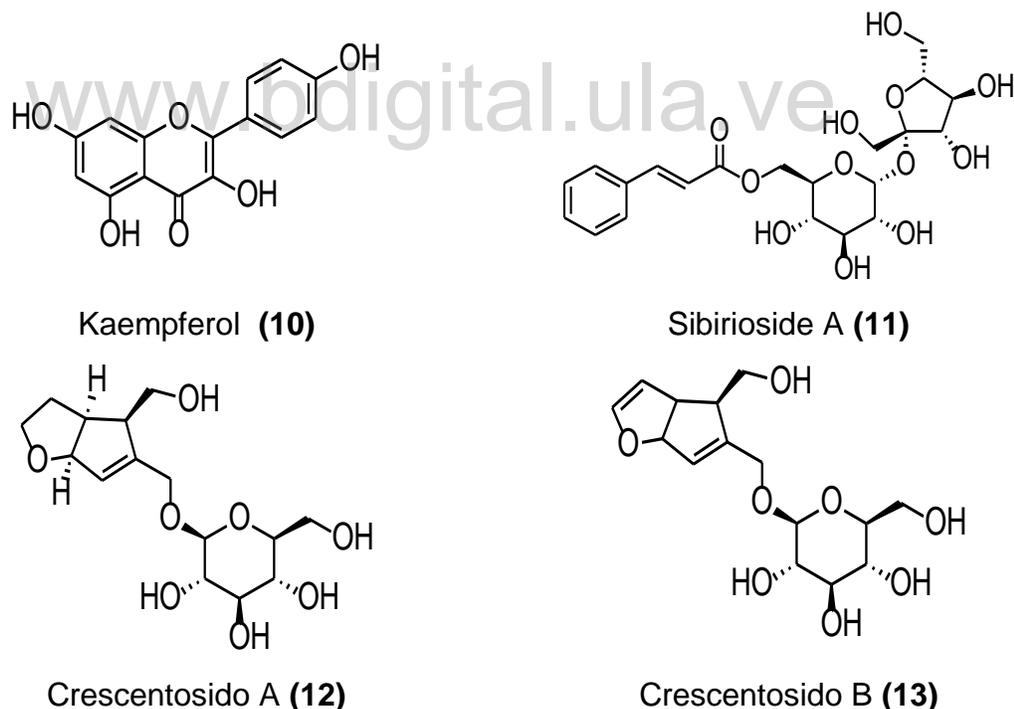
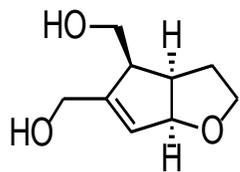
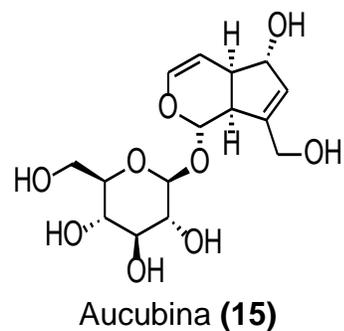
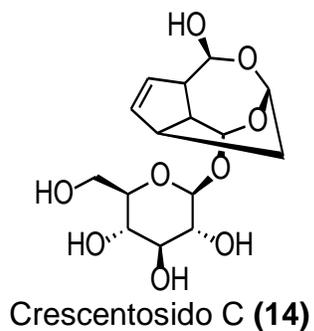
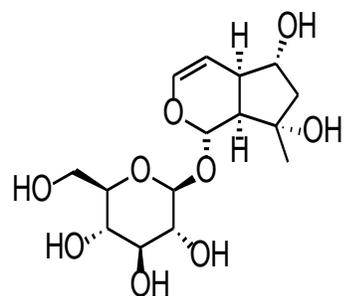
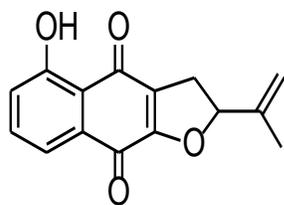
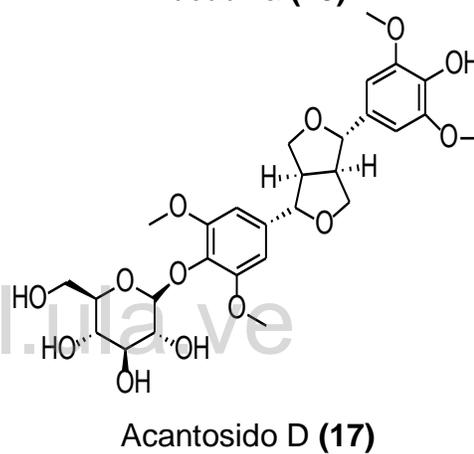


Figura 5. Metabolitos secundarios presentes en *Crescentia cujete* L.
(continuación)



www.bdigital.ula.ve



Tomado y modificado de Gonzáles, Sevilla y Tsai, 2023.

Usos etnobotánicos y actividades farmacológicas

Las hojas se usan en infusión para tratar la hipertensión, mientras que la pulpa actúa como purgante, calmante, antifebril, expectorante y para calmar el dolor de cabeza. La fruta cocida se ingiere para tratar diversas dolencias como diarrea, el dolor de estómago, resfriados, bronquitis, tos, asma y uretritis (Calle y Botero, 2012). El zumo del fruto es efectivo contra la dermatomicosis actuando como fungicida y el jugo del totumo es útil para hipertermias y dolores auditivos. Las semillas son usadas como cereal ya que son ricas en nutrientes y aumentan la cantidad y calidad de la leche materna. La decocción de la corteza por vía oral es utilizada para acelerar el parto (Galindo, 2011). Además, las hojas y corteza del tallo de *Crescentia cujete* L, poseen potente actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Parvin y cols., 2015). Asimismo, tiene propiedad antioxidante, antihelmíntica, antiveneno, cicatrizante de heridas, antidiabética, acaricida, protector de enfermedades neurodegenerativas. (González, Sevilla y Tsai, 2023).

Productos Naturales

Los productos naturales son compuestos formados esencialmente por carbono, obtenidos de fuentes naturales (flora, fauna, tierra, etc) y que generalmente poseen muy diversas e interesantes propiedades. Así mismo, estos compuestos son el resultado de la actividad metabólica y es por ello que se denomina metabolitos. Estos compuestos orgánicos pueden dividirse en dos tipos: primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son los más abundantes y forman parte de los procesos vitales, ya que intervienen en la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas, formando parte de ellos las proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y lípidos. Por el contrario, los metabolitos secundarios se dan de manera restringida, generalmente en

pequeñas cantidades a diferencia de los primarios su ausencia no impide la supervivencia; sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que puedan ser útiles para el organismo que los produce (Quiored, 2004).

Clasificación de los componentes del metabolismo secundario

Según Ávalos y Pérez (2009), se clasifican en cuatro grandes grupos que son: terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides.

Terpenos

Están formados por la unión de un número entero de unidades de isopreno (C5); según ese número se clasifican en monoterpenos (2 unidades de isopreno = C10), sesquiterpenos (3 unidades de isopreno = C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), carotenos (C40), politerpenos (Cn), estos son insolubles en agua y se sintetizan a partir de metabolitos primarios. Los terpenos incluyen, hormonas que contienen diterpenos como las giberelinas y ácido abscísico, pigmentos carotenoides como carotenos y xantofilas, esteroides que contienen triterpenos como el ergosterol, sitosterol, colesterol (derivados de los esteroides conocidos como glicósidos cardíacos) (Ávalos y Pérez, 2009).

Compuestos fenólicos

También llamados polifenoles o fenilpropanoides, son productos secundarios que contienen un grupo fenol, es decir un anillo aromático con un hidroxilo; conjunto muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos, hasta polímeros complejos como los taninos, que son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturalizándolas y también se encuentran pigmentos flavonoides que contienen 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos (Ávalos y Pérez, 2009).

Glicósidos

Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de interés: saponinas, son triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura, se pueden presentar como agliconas, es decir sin el azúcar en cuyo caso se denominan sapogeninas. Los glicósidos carditónicos, semejantes a las saponinas esteroideas, tienen también propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Por último, los glicósidos cianogénicos, son compuestos nitrogenados, no tóxicos por sí mismos, pero se degradan cuando las plantas son aplastadas liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno. Una cuarta familia los glucosinolatos, se degradan y desprenden sustancias volátiles responsables del aroma, el olor y el gusto de condimentos (Ávalos y Pérez, 2019).

Alcaloides

Por su parte, Brunenton (2001) agrega que los alcaloides tienen en común tres características que son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos, aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos), como la mescalina o la colchicina. En los vegetales, estos se encuentran formando combinaciones solubles al estado de sales como citratos, maleatos, tartrados, isobutiratos, benzoatos, entre otros, o sales más específicas como meconatos, quinatos, aconitatos, entre otros. Estos se localizan en tejidos periféricos como tegumentos de la semilla, capas externas de corteza, tallos, raíces, epidermis y capas subepidérmicas de las hojas.

Cumarinas

Estructuralmente son lactonas del ácido *o*-hidróxi-cinámico (2H-1-benzopiran-2-onas). Derivadas del ácido cinámico por ciclización de la cadena lateral del ácido *o*-cumárico. A las cumarinas le son atribuidas una gran variedad de actividades farmacológicas, bioquímicas y terapéuticas, las cuales dependen de sus patrones de sustitución y ellos poseen isómeros naturales conocidos como cromonas (5H-1-benzopiran-5-onas) (García y Pérez, 2009).

Flavonoides

Son los pigmentos amarillos derivados de la fenil-benzo- γ -pirona o fenil-cromona. Son una estructura molecular del tipo C6 – C3 – C6. Son una familia muy diversa de compuestos solubles en agua. Existen 6 clases principales, chalconas, flavonas, flavonoles, flavanoles, antocianidinas, taninos condensados, xantonas y las auronas (Pengelly, 1996). Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos (García y Pérez, 2009).

Taninos

Son sustancias polifenólicas hidrosolubles no nitrogenadas. Los hay hidrolizables y condensados. Se encuentra principalmente en las raíces, la corteza, y de vez en cuando en las hojas de la planta. Estos compuestos tienen propiedades antibacterianas, astringentes y antisépticas. Se encuentran especialmente en las familias de las Ericáceas, Leguminosas, Rosáceas y Salicáceas (Pengelly, 1996).

Rutas biosintéticas

El metabolismo primario proporciona un gran número de moléculas simples, como el ácido shiquímico, el acetato y los aminoácidos, los cuales constituyen los materiales de partida para las rutas biosintéticas del metabolismo secundario. El ácido shiquímico, por la ruta metabólica que lleva su nombre, da origen a muchos compuestos aromáticos, entre ellos los aminoácidos, los ácidos cinámicos y algunas estructuras polifenólicas (García, 2004).

El acetato es el precursor de los ácidos grasos y de los policétidos en la ruta del acetato-malonato, y los terpenos o isoprenoides son sintetizados en la ruta del acetato-mevalonato. Los aminoácidos son precursores de los alcaloides y de los antibióticos peptídicos (García, 2004).

www.bdigital.ula.ve

Todos los terpenos naturales proceden de unidades de acetato activo (acetil-CoenzimaA), que se condensan y transforman para originar ácido mevalónico, unidad de cinco átomos de carbono, específica de la biosíntesis de terpenos. La biosíntesis de las estructuras fenólicas se efectúa por dos rutas metabólicas esenciales: la del ácido shiquímico y la del ácido malónico (conocida como la de los policétidos); la primera es mayoritaria en las plantas superiores y la segunda es favorecida en los microorganismos (Figura 6). La fenilalanina y la tirosina son intermediarios metabólicos en la biosíntesis de numerosos compuestos fenólicos, y el triptófano es el precursor de hormonas como el ácido indolacético (García, 2004).

Los alcaloides se forman por rutas biosintéticas muy diversas, a partir de muchos aminoácidos como la L-arginina, la L-lisina, la L-fenilalanina, el L-triptófano y otros. Ocasionalmente derivan de la L-prolina, el ácido antranílico (precursor y producto de degradación del L-triptófano), el ácido nicotínico (formado a partir del ácido aspártico), raras veces del L-triptófano, restos de

Técnicas de obtención de los extractos

Para promover la extracción, la industria cuenta con diversidad de tecnologías y procesos extractivos, cuyos principales métodos utilizados en el proceso de extracción y fabricación de extractos (ver Figura 7 y Tabla 3) son: (González, 2004).

Maceración

Consiste en el simple contacto del vegetal con el líquido extractor o solvente, por un período de tiempo determinado. Esta maceración puede ser estática (parada) o dinámica (con movimiento), con agitación (movimiento en reactor) de ambas. Indicada para fabricación de extractos sensibles a degradación térmica, cuando se desea mantener intactas las características sensoriales de la planta y no agotar la extracción de los activos (González, 2004).

Infusión

Es adicionada a la planta agua hirviente u otro líquido extractor apropiado. Es el método de preparación del té casero más común. También es muy usado para plantas sensibles a la degradación térmica, buscando una mejor calidad sensorial del extracto obtenido (Guerra, 2005).

Decocción o reflujo

En este método, el líquido extractor entra en ebullición (hervor) en contacto con la planta. Indicado para extracción de activos no termosensibles y para extracción de partes más rígidas de las hierbas como tallos, raíces y semillas (Pérez, 2009).

Digestión

El contacto planta-sustancia extractora es mantenido a una temperatura de 40°C a 60°C. Muy usado para obtención de extractos de frutas y vegetales. Muchas veces una etapa de enzimado hace parte de la digestión, para obtención de extractos con más impacto sensorial y clarificado (consiste en clarear líquidos turbios) (Guerra, 2005).

Percolación

Permite la extracción más eficiente de los activos por la dinámica y artificios posibles. El pasaje del líquido extractor a través de la planta molida, en aparatos conocidos como percoladores con control de flujo, tiempo y temperatura, optimiza el proceso. Generalmente es usado para extracción de activos no termosensibles. En muchos casos, es posible extraer en torno de 95% de los activos contenidos en el material vegetal (Pérez, 2009).

Extracción con CO₂ Supercrítico

Se utiliza fluido supercrítico CO₂ para modular extracción, pueden también ser utilizados con solventes como etanol. Esta tecnología aún no está muy difundida en la industria, debido a su alto costo y bajo rendimiento. Es usada para extracción de aceites esenciales (González, 2004).

Extracción Asistida por Ultrasonido

Técnica emergente, posibilitando la obtención de elevadas tasas de extracción en tiempos menores. La cavitación (fenómeno de vaporización de un líquido por la reducción de la presión, durante su movimiento) generada por el ultrasonido es conocida por producir diversos efectos en la matriz vegetal, tales como: la circulación del líquido (agitación del líquido extractor) en el sistema y generación de turbulencia que puede auxiliar en el aumento de la transferencia de masa. Esto reduce el tiempo de extracción,

posibilitando el consumo reducido del líquido, además evita daños térmicos al extracto minimizando pérdidas de activos (Pérez, 2009).

Otras operaciones unitarias importantes para fabricación de extractos son:

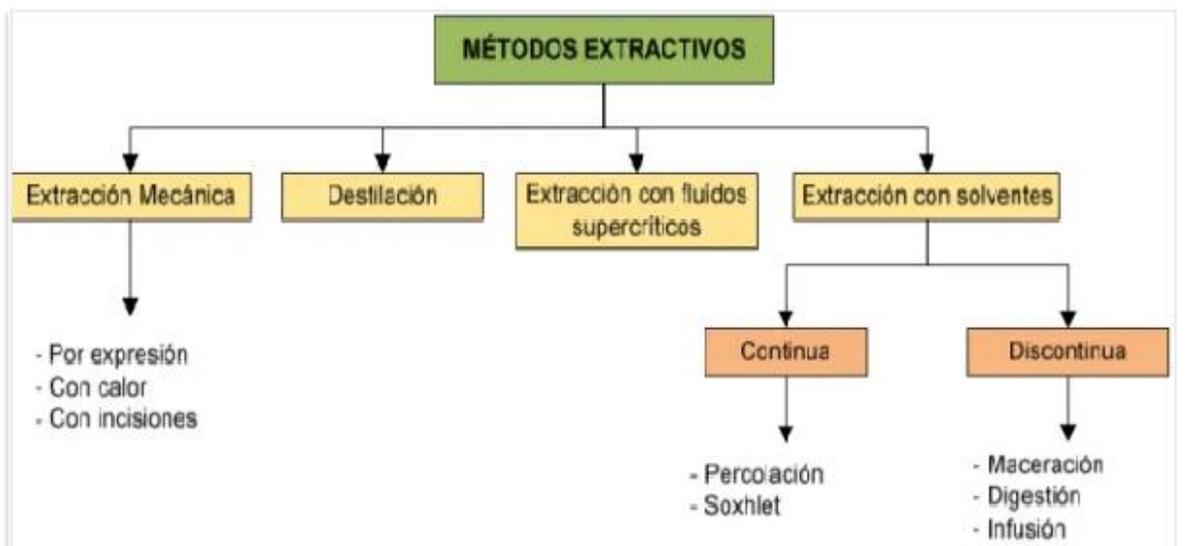
Destilación

Consiste en la eliminación parcial o total del líquido extractor. Esta destilación puede ser simple o fraccionada (González, 2004).

Secado

Cuando el extracto líquido tiene su sustancia extractora removida por procesos de evaporación o es sometido a secados (para virar polvo, pedazos o flakes) en equipos como spray dryer, drum dryer, vacuum dryer o liofilización, que son los métodos más empleados (González, 2004).

Figura 7. Clasificación de los métodos de obtención de extractos vegetales



Tomado y modificado de Kuklinski, 2003.

Tabla 3. Parámetros que influyen en la obtención de extractos vegetales

Naturaleza química de la materia vegetal	Es indispensable conocer las propiedades o características del metabolito a extraer.
Solvente	El solvente óptimo es aquel que logre extraer un mayor rendimiento del compuesto en estudio.
Relación sólido-líquido	La porción adecuada será la que alcance extraer la mayor cantidad del principio activo de interés.
Tamaño de la partícula	Tamaños pequeños de partícula favorece mayor contacto con el disolvente.
Temperatura	El aumento de temperatura favorece la extracción sin embargo a temperaturas elevadas pueden conducir a lixiviar solutos indeseables.
Viscosidad del medio	Es recomendable no usar solventes a viscosidad relativamente alta.
Velocidad de agitación y tiempo de extracción	Extraer un mayor rendimiento del producto. A mayor tiempo de contacto, el disolvente tendrá alta capacidad para obtener concentraciones del principio activo.

Tomado y modificado de Carmona, López, González, y Muñoz, 2006.

Tamizaje fitoquímico

Es la técnica que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta (metabolitos secundarios) y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Se basa en la realización de reacciones químicas con diferentes reactivos, donde la aparición de un color o precipitado es muestra de la presencia de un determinado metabolito (Manual de Operaciones, 2005).

Pruebas químicas

Reconocimiento de alcaloides : Ésta prueba se fundamenta en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos) de combinarse con el yodo y metales pesados formando precipitados con reactivos como el mercuriyoduro de potasio (Mayer) y yoduro de bismuto (Dragendorff) (Coy, Cuca y Parra, 2014).

Reacción de precipitación con reactivo de Mayer: Este reactivo precipita la mayoría de los alcaloides en medio ácido favoreciendo la formación de precipitados cristalinos de color blanco. Cuando el yoduro de potasio reacciona con el cloruro de mercurio forma un precipitado rojo de yoduro de mercurio, el cual es soluble en exceso de iones de yoduro dando la formación de un anión complejo incoloro. La solución alcalina de este complejo sirve para descubrir indicios de amoníaco, en esta reacción se forma el compuesto de color pardo oxiyoduro mercuri amoníaco, que es soluble en exceso de complejo generando un color amarillo (Coy, Cuca y Parra, 2014).

Reacción de precipitación con reactivo de Dragendorff: Este reactivo contiene yoduro de bismuto potasio, donde al reaccionar $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ con el ácido (HCl) y con yoduro de potasio, forma complejos de color naranja (Coy, Cuca y Parra, 2014).

Reconocimiento de saponinas: Son glicósidos cuya aglicona consiste en un núcleo esteroidal o triterpénico; ésta característica estructural le confiere un carácter anfótero que les permite actuar como tensioactivos. Aprovechando esta propiedad, la prueba utilizada para su detección es la formación de espuma, que consiste en agitar vigorosamente la solución

acuosa, obtenida de la muestra en un tubo de ensayo y observar la espuma formada, ésta debe ser estable por lo menos 10 min (Coy, Cuca y Parra, 2014).

Reconocimiento de flavonoides: La identificación de estos metabolitos se realiza por medio de la prueba de Shinoda (Zn/HCl), la cual se fundamenta en que, al poner en contacto ácido clorhídrico con magnesio metálico se genera hidrógeno, el cual reduce al flavonoide desarrollando coloraciones que van del rojo anaranjado al violeta (Coy, Cuca y Parra, 2014).

Reconocimiento de taninos y fenoles: En el caso de taninos los métodos de detección se basan en la propiedad que tienen para precipitar proteínas, haciéndose la reacción más sensible por la salificación del complejo proteína-tanino; la prueba utilizada para ellos es la precipitación de proteínas con gelatina-sal (NaCl), formándose un precipitado. La prueba de cloruro férrico es la más utilizada para fenoles. Si hay desarrollo de una coloración rojo vino será un compuesto fenólico en general, ahora si se forma un precipitado azul oscuro, verde o azul-verdoso, se debe a la reacción entre el cloruro férrico y los grupos fenólicos del tanino (Coy, Cuca y Parra, 2014)

Reconocimiento de triterpenos: La prueba utilizada para su identificación es la de Liebermann- Burchard que consiste en una reacción donde el esteroide se oxida por la presencia del ácido sulfúrico que forma una molécula que contiene un doble enlace adicional. En la etapa inicial ocurre la protonación del grupo OH del esteroide habiendo pérdida de agua y obtención del ion carbonio 3,5-colestadieno (Coy, Cuca y Parra, 2014).

Bacterias

Son organismos unicelulares procariotas, que pertenecen al reino Monera. Estos microorganismos se caracterizan por su estructura celular simple (desprovistos de una membrana que delimita al núcleo celular), su capacidad de replicación rápida y su diversidad metabólica. Las bacterias pueden ser beneficiosas o perjudiciales para los seres humanos y son importantes en diversos procesos biológicos y ecológicos, como la descomposición de la materia orgánica, la fijación de nitrógeno y la producción de alimentos fermentados (Madigan, Martinko, Bender, Buckley y Stahl, 2018).

Bacterias grampositivas

Se define como el grupo de bacterias que no posee una membrana externa capaz de proteger el citoplasma bacteriano, tienen una gruesa capa de peptidoglicano y que presentan ácidos teicoicos en su superficie. Entre otras cosas, se distinguen especialmente por teñirse de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram aplicada en bacteriología para analizar muestras de laboratorio y es justamente esto último lo que explica su nombre. El peptidoglicano es un exoesqueleto con forma de malla, cuya función es semejante a la del exoesqueleto de los insectos. Sin embargo, el peptidoglicano de la célula es lo suficientemente poroso (a diferencia del exoesqueleto) como para permitir la difusión de los metabolitos a la membrana plasmática. Entre éstas se encuentran: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* (Cavalier y Smith, 2006).

Bacterias gramnegativas

Son aquellas que no se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue: de ahí el nombre de "gramnegativas". Presenta dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, mientras que las bacterias grampositivas presentan solo una membrana lipídica y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa. Al ser la pared fina, no retiene el colorante durante la tinción de Gram. Algunas de ellas son: *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhi* (Gupta, 2011).

Características de las bacterias a usar durante el estudio

Para realizar el estudio, se utilizarán bacterias grampositivas como: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*; del mismo modo bacterias gramnegativas como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Staphylococcus aureus

Son cocos grampositivos, dispuestos en forma aislada, en pares o en forma similar a racimos de uvas irregulares, no son formadores de esporas, anaeróbicos facultativos, catalasa variable por lo común positivos temperatura óptima de crecimiento: 30-37 °C; sensibles a la lisis por la lisostafina, pero resistentes a la lisozima; algunos contienen pigmentos carotenoides de color naranja o amarillo (MacFaddin, 2003)

Enterococcus faecalis

Son cocos grampositivos en pares, cadenas cortas o en formas aisladas en medios líquidos, no formadores de esporas, anaeróbicos facultativos, catalasa negativos, movilidad variable, escasos flagelos, temperatura óptima de crecimiento: 37 °C; sin embargo, crecen en caldo a 10 °C y 45 °C a pH 9,6, todos insolubles en bilis (MacFaddin, 2003).

Klebsiella pneumoniae

Forma parte de la familia Enterobacteriaceae; células aisladas, pareja, cadenas cortas, encapsulado, inmóvil; se encuentran en tierra, agua y como parásitos patógenos del hombre y animales (MacFaddin, 2003).

Pseudomonas aeruginosa

Bacilos gramnegativos, rectos o ligeramente curvos, no helicoidales, no formadores de esporas, son aerobios, catalasa positivos, presentan movilidad variable debido a flagelos polares y rara vez inmóviles, lipasa positivo sólo *P. aeruginosa*; la temperatura óptima de crecimiento: 30- 37°C (MacFaddin, 2003).

Escherichia coli

Forma parte de la familia Enterobacteriaceae, cuyas células se presentan aisladas o en parejas, frecuentemente móviles (flagelo peritricomal), temperatura óptima: 37°C; se caracteriza por la capacidad de fermentar la lactosa con producción de ácido y gas; se encuentra en el intestino del hombre y de los animales como microbiota habitual (MacFaddin, 2003).

Resistencia Bacteriana

Se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios al verse expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos). Los microorganismos resistentes a la mayoría de los antimicrobianos se conocen como ultrarresistentes. Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas. Los pacientes con infecciones causadas por bacterias farmacorresistentes corren mayor riesgo de tener peores resultados clínicos y morir. Además, consumen más recursos sanitarios que los infectados por cepas no resistentes de las mismas bacterias (OMS, 2017).

Tipos de Resistencias bacterianas

Se encuentran dos tipos, la resistencia intrínseca y la resistencia adquirida:

Resistencia intrínseca

Son mecanismos permanentes determinados genéticamente, propios de cada familia, especie o grupo bacteriano, donde se tienen características como: barreras contra la permeabilidad, falta de susceptibilidad de la pared celular o blancos ribosómicos que las hacen no susceptibles por factores inherentes (Ryan y Ray, 2017).

Resistencia adquirida

Tal como su nombre lo indica esta resistencia es adquirida por una cepa de una especie bacteriana, tal resistencia puede ocurrir por mutación o derivarse de otro organismo por adquisición de nuevos genes al utilizar

mecanismos de intercambio genético como: transformación, transducción conjugación y transposición (Ryan y Ray, 2017).

Antibióticos

Es una sustancia química producida por un ser vivo o derivado sintético, que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente son fármacos usados en el tratamiento de infecciones por bacterias, de ahí que se les conozca como antibacterianos. Normalmente los antibióticos presentan toxicidad selectiva, siendo muy superior para los organismos invasores que para los animales o los seres humanos que los hospedan. Generalmente ayudan a las defensas de un individuo hasta que las respuestas locales sean suficientes para controlar la infección (Strohl, 1997).

Clasificándose como actúan en:

Antibióticos de bajo espectro: Aquellos que solo atacan a bacterias de un tipo concreto (Basualdo y Coto, 1996).

Antibióticos de amplio espectro: Atacan a bacterias de varios tipos; tanto grampositivas como gramnegativas (Basualdo y Coto, 1996).

De acuerdo a su poder de acción ante las bacterias en:

Bacteriostático: Si impide el crecimiento de los gérmenes (Strohl, 1997).

Bactericida: Si los destruye, pudiendo generar también ambos efectos, según los casos (Strohl, 1997).

Según el mecanismo de acción

Inhibidores de la biosíntesis de la pared bacteriana: inhibiendo la síntesis del peptidoglicano, compuesto fundamental para la integridad de la pared celular bacteriana. Impiden los sucesivos pasos de la síntesis de la pared bacteriana; como consecuencia de esta interferencia, la célula bacteriana sin pared no resiste los cambios osmóticos, se hincha y estalla. Por ello, los *B*-lactámicos (penicilinas, cefalosporinas), bacitracina, vancomicina, teicoplanina son bactericidas pues matan a la célula bacteriana en el momento de la división por lo tanto no actúan cuando la célula está estática (Basualdo y Coto, 1996).

Inhibidores de la síntesis proteica: estos antibióticos afectan las etapas fundamentales en el proceso de síntesis proteica como: la transcripción del mensaje genético del ADN para formar el ARN mensajero o la traducción de dicho mensaje y formación de la cadena polipeptídica, llevada a cabo en los ribosomas, en la cual intervienen las subunidades 30S y 50S del ribosoma. Dentro de ellos se encuentran: Macrólidos, Tetraciclinas, Lincomicina, Aminoglucósidos, Cloranfenicol (Basualdo y Coto, 1996).

Antibióticos que bloquean la síntesis de ácidos nucleicos: los que afectan la función y replicación del ADN son agentes antimicrobianos muy eficaces. Sin embargo, su uso es limitado puesto que altera el ADN de las células eucariotas, lo cual se traduce en daños severos al organismo. Estos pueden interactuar con las bandas de ADN impidiendo su replicación o con las enzimas que intervienen en este proceso. Dentro de este grupo están: Rifamicinas, Ácido nalidíxico, Novobiocina, Gliseofulvina y Mitomicina (Basualdo y Coto, 1996).

Antibióticos que alteran la permeabilidad de la membrana: como ésta es una estructura esencial para la célula bacteriana, los antibióticos que la lesionan ocasionan su muerte por pérdida de sustancias nutritivas o acumulación de productos tóxicos. Aunque estos antibióticos tienen un gran efecto antimicrobiano, no son de mucha aplicación ya que no tienen toxicidad selectiva, sobre las células de los microorganismos pudiendo lesionar las del hospedador. Dentro de estos se encuentran: Polimixinas, Nistatina, Gramicidinas (Basualdo y Coto, 1996).

Actividad antibacteriana

Es la propiedad de ciertas sustancias que forman un compuesto, o que se hallan en una muestra capaz de eliminar agentes bacterianos o la inhibición de su crecimiento sin incurrir en el daño del objeto, ambiente u organismo que las porta. Son en esencia fármacos como es el caso de los antibióticos u otros agentes químicos capaces de combatir estos cuerpos (Vemedica, 2015).

Método de difusión para evaluar la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal.

El Comité Nacional para Normas de Laboratorios Clínicos, sus siglas en inglés, NCCLS (1997), destaca el método originalmente descrito por Bauer denominado (Kirby-Bauer), cuya técnica está basada en la difusión en disco o en pozo que fue estandarizado y es actualmente recomendado. El método consiste en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la

cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia.

Categorías interpretativas

El NCCLS (1997), creó las siguientes categorías para la interpretación de la efectividad de un antibiótico:

Sensible: La categoría "sensible" implica que una infección debido a una cepa puede ser apropiadamente tratada con la dosis de agente antimicrobiano recomendado para ese tipo de infección y especie infectante.

Intermedio: Incluye aislamientos con agentes antimicrobianos con un CMI que se aproximan usualmente a nivel de tejido y sangre disponible y para los cuales su velocidad de respuesta puede ser más lenta que la de los aislamientos susceptibles. La categoría "Intermedia" implica eficacia clínica en sitios del cuerpo donde la droga es fisiológicamente concentrada (por ej. quinolonas y β -lactámicos en orina).

Resistente: Las cepas resistentes no son inhibidas por la concentración sistémica usualmente alcanzable de un agente cuando los esquemas de dosificación normal son usados. Pueden tener CMI que caen dentro del rango donde están disponibles mecanismos de resistencia específicos (por ej. β -lactámicos) y la eficacia clínica no ha sido confiable en tratamientos estudiados.

Definición operacional de términos

Bacteriemia

Es la presencia de bacterias viables en el torrente sanguíneo. La duración de las bacteriemias tiene implicaciones pronósticas: transitorias, frecuentes en determinadas manipulaciones (extracciones dentales, sondaje vesical, otros), sostenidas, que sugieren infección intramuscular y la intermitente, asociada a la obstrucción de las vías biliares y urinarias (Pujol y Limón, 2013).

Cepas

Las cepas son células genéticamente diferentes dentro de un clon, es decir una población de células derivadas de una única célula parental, que en algunos casos en los cultivos puros de la misma especie no son idénticos en todos los aspectos; estas suelen identificarse por números, letras, o nombres que siguen al epitelio específico (Tortora, Funke y Case, 2007).

Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Se define como la menor concentración del antibiótico que evita el crecimiento bacteriano visible (Tortora y cols., 2007).

Disolvente

Sustancia que se utilizan para extraer o suspender otras sustancias para formar una disolución. Los disolventes, que generalmente son líquidos, también pueden existir en forma gaseosa o sólida. El disolvente más común es el agua, acertadamente denominada el “disolvente universal” dado que disuelve más sustancias que ningún otro disolvente. Se utilizan ampliamente: en el laboratorio químico como medio para las reacciones orgánicas y las separaciones analíticas (Chang y Goldsby, 2016).

Espatulada

Hoja en forma de espátula o cuchara, es decir con la base estrecha y ensanchándose hacia el ápice (Cáceres, 1996).

Fitoquímico

Según la Red de Programación de Entretenimiento y Deporte, sus siglas en inglés (ESPN), (2016), son elementos químicos que se encuentran en los alimentos de origen vegetal, pero no son ni propiamente nutrientes, ni macronutrientes ni tampoco están incluidos dentro del grupo de vitaminas ni minerales. Por lo tanto, no tienen función energética ni nutricional y, sin embargo, aportan diversas funciones beneficiosas

Precipitado

Se refiere a un sólido formado desde una solución, mediante la cristalización de una sustancia disuelta o por la formación de una sustancia insoluble por medio de una reacción química. El proceso del precipitado comienza a partir de una sustancia sólida que estaba disuelta y que se vuelve menos soluble (Chang y Goldsby, 2016).

Halo de inhibición

Es la zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma, en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculado con la bacteria. Cuyo diámetro será directamente proporcional del antibacteriano, frente a la bacteria en cuestión e inversamente proporcional a la (CIM) del agente antibacteriano (Tabla 4). La longitud obtenida después del procedimiento se compara con estándares que permitirán saber si el medicamento será o no efectivo en el tratamiento (García, 2014).

In silico

Expresión que significa “hecho por un computador o vía simulación computacional”. Se refieren a experimentos hechos en organismos vivos o fuera de organismos vivos, donde los procesos naturales o de laboratorio son modelados por un ordenador (Sieburg, 1990).

www.bdigital.ula.ve

Operacionalización de las Variables

Para operacionalizar el sistema de variables con el respectivo criterio de análisis, es necesario la definición conceptual y la operacional de las mismas. Hurtado (2010) enfatiza que las variables se operacionalizan con la finalidad de identificar los elementos y datos empíricos que expresan su presencia. En esta investigación se medirán las variables independientes y dependientes. Los indicadores derivarán de las bases teóricas. El proceso de la operacionalización de las variables garantizó que los objetivos propuestos sean alcanzados descritas en Tablas 4 y 5.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 4. Operacionalización de la variable dependiente actividad antibacteriana presente en los extractos de hexano y etanol de las hojas y frutos de *Crescentia cujete* L.

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición Conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana de los extractos de hexano y etanol de las hojas y frutos de <i>Crescentia cujete</i> L.	Dependiente o explicada y discreta	Actividad antibacteriana, es la propiedad capaz de eliminar agentes bacterianos o la inhibición de su crecimiento sin incurrir en el daño del objeto, ambiente u organismo que las porta. Son en esencia fármacos como es el caso de los antibióticos u otros agentes químicos capaces de combatir estos cuerpos (Vemedia, 2015).
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
Método de difusión en disco (Kirby-Bauer)	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Resistente - Sensible Presencia del halo de inhibición medido en milímetros (mm) frente a cepas grampositivas y gramnegativas.

Elaborado por Romero y Obregón, 2022.

Tabla 5. Operacionalización de la variable independiente composición química de los extractos de hexano y etanol de las hojas y frutos de *Crescentia cujete* L.

1.Variable	2.Tipo de variable	3. Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química de los extractos de <i>Crescentia cujete</i> L	Independiente o explicativa	Para el aprovechamiento de las propiedades de las plantas, se hace necesario realizar procesos de extracción para la concentración de sus principios activos (metabolitos secundarios) como compuestos producidos de la obtención de sustancias biológicamente activas presentes en ellas y a las cuales se les atribuyen diversas propiedades (Pérez, 2009).
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
A través de Pruebas cualitativas conocidas como Tamizaje Fitoquímico	Presencia o ausencia de: <ol style="list-style-type: none"> 1 Alcaloides. 2 Esteroles y/o triterpenos. 3 Saponinas. 4 Compuestos fenólicos simples. 5 Taninos. 6 Flavonoides. 7 Quinonas/ antraquinonas 8 Glicósidos cardiotónicos. 9 Cumarinas 10 Lactonas sesquiterpénicas 	<ol style="list-style-type: none"> 1 Aparición de turbidez o precipitados. 2 Coloración azul o verde para esteroides; coloración es rosa, rojo, magenta o violeta para triterpenos. 3 Formación de abundante espuma. 4 Coloración de azul a negro. 5 Un precipitado blanco. 6 Coloración naranja a rojo, para flavonas; si es rojo flavonoles y magenta flavononas. 7 Coloración roja. 8 Coloración púrpura o violácea. 9 Fluorescencia azul-violeta. 10 Coloración roja, violeta o rosa

Elaborado por Romero y Obregón, 2022.

Hipótesis

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

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

La investigación en general responde a ciertos objetivos. De acuerdo a cada uno de estos objetivos, es posible derivar un tipo particular de investigación. En relación a lo anterior, la Investigación Holística ha organizado y clasificado los objetivos, así como sus correspondientes tipos de investigación. Específicamente pueden ser: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, confirmativa y evaluativa. Una investigación confirmatoria requiere de una explicación previa a una serie de respuestas o hipótesis, los cuales se desean confirmar (Hurtado, 2010). De tal modo en esta investigación se confirmó la relación entre la actividad antibacteriana y composición química de los extractos de las hojas y frutos de *Crescentia Cujete* L en bacterias grampositivas y gramnegativas.

Diseño de la Investigación

El diseño de investigación hace explícitos los aspectos operativos de la misma. Si el tipo de investigación se define con base al objetivo, el diseño de investigación se define con base al procedimiento, el cual se debe determinar a través de las estrategias que se implementan para recolectar la información de una fuente determinada, en un tiempo específico y en una cantidad o amplitud asociada a lo que se quiere saber. Hay un grupo de

diseños que son específicos de las investigaciones de nivel integrativo, en especial de las confirmatorias y evaluativas, las cuales responden a dos criterios que no aplican a los demás tipos de investigación; estos criterios son: el grado de intervención del investigador y la rigurosidad del control de variables extrañas (Hurtado, 2010).

En concordancia con lo antes expuesto, la presente investigación es de tipo confirmatoria, con un diseño de campo, transeccional contemporáneo y multivariable, donde el investigador hace un control estricto de variables extrañas para descartar que los cambios hayan sido originados por otros factores distintos a las variables independientes (Hurtado, 2010). Por tal motivo, las muestras recolectadas de *Crescentia cujete* L., en Arapuey, Parroquia San Isidro, Municipio Julio Cesar Salas del Estado Mérida, fueron procesadas en el laboratorio A de Química de Productos Naturales, del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes.

Población y muestra

Unidad de Investigación

La población es el conjunto de elementos que se quiere conocer o investigar algunas de sus características. La muestra es un subconjunto representativo de un universo o población (Arias y Johnson, 2006). La unidad de investigación está representada por la especie *Crescentia cujete* L., situada en la población, Arapuey, Parroquia San Isidro, Municipio Julio Cesar Salas del Estado Mérida.

Selección del Tamaño de la Muestra

La “n” muestral está representada por 140 g de las hojas y 950 g del fruto de la especie *Crescentia cujete* L, situada en la población, Arapuey, Parroquia San Isidro, Municipio Julio Cesar Salas del Estado Mérida.

Sistema de Variables

Existen diferentes tipos de variables como son: la variable dependiente, variable independiente y variable interviniente. Teniendo de esta forma que la variable dependiente es la que se modifica por acción de la variable independiente, constituye los efectos o consecuencias que se miden. En relación a la variable independiente es la causa que genera y explica los cambios en la variable dependiente y en cuanto a la variable interviniente es la que se interpone entre la variable independiente y la variable dependiente pudiendo influir en la modificación de esta última (Arias y Johnson, 2006). Las variables que guardan relación con el objetivo de la investigación son las siguientes; variable dependiente (VD): Actividad antibacteriana. Variable independiente (VI): Composición química de los extractos de hexano y etanol de las hojas y frutos de *Crescentia cujete* L.

Instrumentos de Recolección de Datos

Esta investigación estuvo enfocada en la técnica de observación, que consiste en estar a la expectativa frente al fenómeno, del cual se tomó y se registró la información para su posterior análisis, que se realizó por medio de la utilización de tablas para recopilar de manera cualitativa de los datos obtenidos de las pruebas preliminares para la identificación de los metabolitos presentes en la planta en estudio, de igual forma se registraron

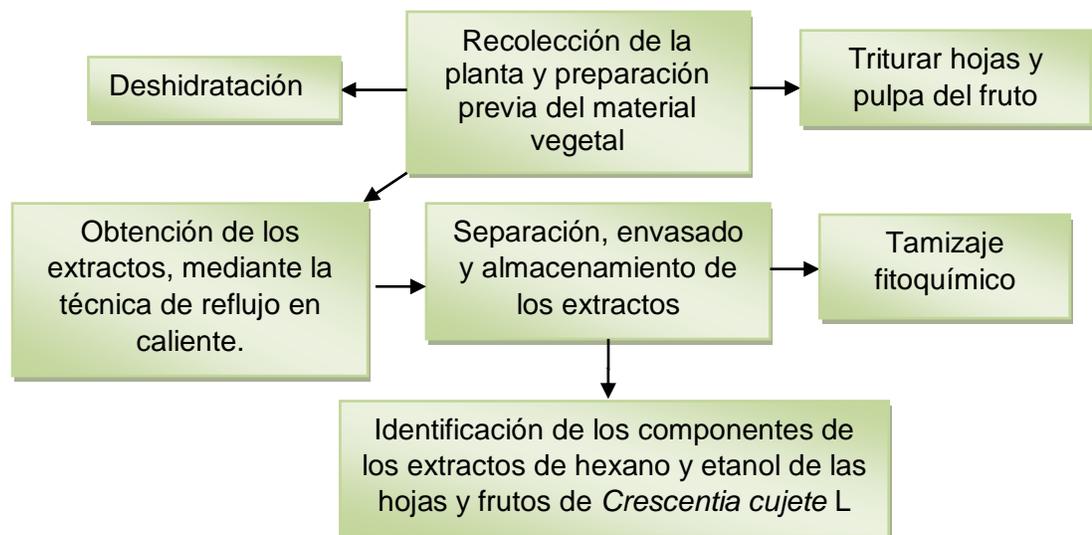
los datos recopilados arrojados por el método empleado en la determinación de la actividad antibacteriana; en ella se ha apoyado el investigador para obtener el mayor número de datos (Palella y Martins, 2012).

Procedimientos de la Investigación

Es importante que el investigador describa con detalle, paso por paso, el procedimiento que llevará a cabo durante la investigación, esta descripción permite, no sólo verificar que el procedimiento utilizado cumplió con los requerimientos metodológicos del proceso de investigación, sino además hará posible que otros investigadores puedan apoyarse en la información para investigaciones similares en otros contextos (Hurtado, 2010).

El procedimiento que siguió esta investigación se encuentra descrito en el esquema 1.

Esquema 1. Procedimiento empleado para la extracción, separación e identificación de los componentes de los extractos de *Crescentia cujete* L



Elaborado por Romero y Obregón, 2022.

1. *Recolección del material vegetal*

La planta fue recolectada en Arapuey, Parroquia San Isidro, Municipio Julio Cesar Salas del Estado Mérida a una altitud de 54 m.s.n.m aproximadamente. Se ubicó en la literatura química, esto informó sobre los posibles constituyentes químicos, para posteriormente ser utilizada en el Laboratorio A de Química de Productos del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes, bajo asesoría de la profesora Ysbelia Obregón.

2. *Preparación del material vegetal*

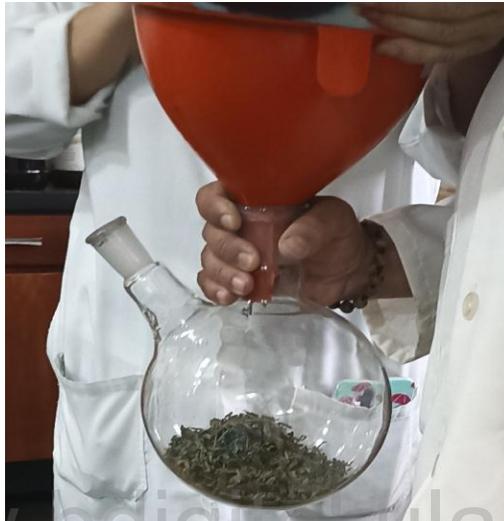
Se sometió el material hojas y frutos (despulpados) de *Crescentia cujete* L, a un proceso de secado (bajo sombra y en estufa), por aproximadamente una semana y posteriormente se procedió a realizar la respectiva molienda o triturado para la reducción del material, seguidamente se empleó el uso de una balanza analítica para conocer la cantidad de planta que se va a procesar (70,01 g de hojas molidas y secas) y (100 g de la pulpa del fruto deshidratada y molida) previo a la extracción en un balón aforado se agrega el triturado y se mezcla con 500 mL de hexano y etanol, respectivamente para facilitar el contacto con el solvente. Bajo asesoría de la profesora Rosa Aparicio y el auxiliar del laboratorio José Emilio Salazar.

3. *Extracción en caliente por reflujo*

Se ejecutó un proceso de extracción vegetal, por medio de la técnica de reflujo, la cual es similar a la extracción por digestión, adaptando un condensador al balón donde se efectúa el proceso, seguidamente se aplica calor moderado a una temperatura inicial de 50 °C y luego que el material comienza a ebulir se disminuye la una temperatura a 40 °C, lo que permite aumentar el poder del disolvente y por tanto el mismo pueda emplearse continuamente de reciclaje. Este proceso se repite hasta que se completa la

extracción de los analitos de la muestra y se concentran en el solvente (Figuras 8 y 9).

Figura 8. Material vegetal utilizado en el proceso de extracción



www.origina.ve
Fuente propia: Romero, 2022

Figura 9. Equipo utilizado para técnica de reflujo en caliente



Fuente propia: Romero, 2022

4. **Concentración de los extractos hexano y etanol**

Luego de someterlo al proceso de extracción, se dejó enfriar el solvente apolar utilizado (hexano) junto con el extracto obtenido de las hojas, dicho solvente se colocó a una temperatura de 40 °C, con la finalidad de concentrarlo en el rota-vapor a 80 rpm. Después es repetido el proceso de extracción, pero con el solvente polar (etanol) y el material vegetal que quedó de residuo en la primera extracción para así garantizar el aprovechamiento de los analitos contenidos en la muestra. La obtención del extracto del fruto se llevó a cabo siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

5. **Tamizaje Fitoquímico**

Después se procedió a realizar las pruebas preliminares para caracterizar los metabolitos secundarios o compuestos biológicamente activos contenidos en las plantas (Marcano y Hasegawa, 2018), las cuales constan de las siguientes pruebas agrupadas en la Tabla 6.

Tabla 6. Pruebas preliminares para realizar el tamizaje fitoquímico

METABOLITOS SECUNDARIOS	PRUEBA	PROCEDIMIENTO
Alcaloides	Wagner Mayer Dragendorff	Se disolvió una porción del extracto en 2 mL de HCl al 5 %, posteriormente se agitó, filtró y se tomó una alícuota a la cual se le adicionó gotas del reactivo de Wagner Mayer y Dragendorff, respectivamente. - Un precipitado rojo pardo (Wagner) blanco o amarillento (Mayer) y rojo-anaranjado (Dragendorff) indicó la presencia de alcaloides.
Triterpenos/ Esteroles	Lieberman Bouchard	A una pequeña porción del extracto concentrado se le añadió 1 mL de ácido acético anhidro y luego se estratificó con 2 – 3

Tabla 6. Pruebas preliminares para realizar el tamizaje fitoquímico (Continuación)

		gotas de H ₂ SO ₄ concentrado. Posteriormente, se dejó en reposo concentrado. Se dejó e reposo por 5 minutos La formación de una interfase azul, verde, rosa, rojo y violeta indicó la presencia de esteroides y triterpenoides.
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	Se le agregó 4 gotas de disolución acuosa de FeCl ₃ 10 % p/v. Un color grisáceo negro y negro – azulado indicó la presencia de catecol y pirogalol.
Saponinas	Altura de la Espuma	En un tubo de ensayo se colocó 1 mL del extracto, luego se agitó vigorosamente durante 1 minuto y se midió con una regla la altura de la espuma. - La formación de una espuma de 8 mm – 1 cm y estable por 10 minutos indica la presencia de saponinas.
Taninos	-----	Se disolvió en 10 mL de etanol por 5 minutos 100 mg del extracto, posteriormente se extrajo con 25 mL de agua destilada, llevando a ebullición durante 15 minutos. Luego se dejó en reposo hasta alcanzar temperatura ambiente, posteriormente se adicionó 0,2 mL de disolución NaCl al 10 % p/v y se filtró con papel de filtro cualitativo. El filtrado obtenido se distribuyó en partes iguales en 5 tubos de ensayo, los cuales fueron sometidos a distintos procedimientos
	Gelatina 1 %	Se le agregó 4 gotas de disolución acuosa de gelatina 1 %. - Un precipitado indicó la presencia de taninos.

Tabla 6. Pruebas preliminares para realizar el tamizaje fitoquímico
(Continuación)

Flavonoides	Shinoda	<p>A 1 mL de extracto diluido se le adicionó una pequeña cantidad de magnesio metálico y 3 gotas de HCl concentrado.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Un color rojo, naranja, rojo azulado y violeta indicó la presencia de flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas. <p>Ocasionalmente los flavonoles, las flavononas y los flavononoles dan coloración verde-azul</p>
	NaOH 10 %	<p>A 1 mL de extracto diluido se le adicionó 3 gotas de NaOH al 10 %.</p> <ul style="list-style-type: none"> - La formación de una coloración de amarillo a rojo indicó la presencia de xantonas y flavonas. - Una coloración café a naranja indicó la presencia de flavonoles. - Una coloración púrpura a rojizo indicó la presencia de chalconas. - Una coloración azul indicó la presencia de antocianinas.
Cumarinas	NH ₄ OH _{conc}	<p>En un tubo A se disolvió del 10 mg de extracto en 1 mL de etanol y en tubo B con 1 mL de diclorometano, se agregó unas gotas de NH₄OH_{conc} en ambos, se llevaron los tubos a la lámpara de luz ultravioleta (UV) a 365 nm.</p> <ul style="list-style-type: none"> - La ausencia de fluorescencia azul indicó la negatividad de la prueba
Antraquinonas	NH ₄ OH _{conc}	<p>A 10 mg de cada extracto se le adicionó 1 gota de NH₄OH_{conc}</p> <ul style="list-style-type: none"> - Un color rojo indicó la presencia de antraquinonas.

Tabla 6. Pruebas preliminares para realizar el tamizaje fitoquímico (Continuación)

Quinonas	H ₂ SO ₄ conc	A 10 mg de cada extracto se le adicionó una gota de ácido sulfúrico concentrado. - Un color rojo indicó la presencia de quinonas.
Lactonas sesquiterpénicas	Baljet	Se prepararon 2 soluciones. En la solución A, se agregó 1 g de ácido pícrico y se disolvió en 2 mL de etanol. En la solución B, se añadieron 10 gr de NaOH y se disolvieron en 2 mL de agua. Se colocaron 3 a 4 mg del reactivo. - Formación de coloración naranja a rojo indicó positividad
Glicósidos cardiotónicos		En un tubo 1 se agregó 1 mL de H ₂ SO ₄ concentrado. En tubo 2 se disolvió la porción del extracto en 2,5 mL de H ₂ O, luego se adicionaron 2 mL de ácido acético glacial y 1 gota de FeCl ₃ y ésta mezcla se agregó al tubo 1. - Un color amarillo marrón en la interfaz indicó positividad.

Tomado y modificado de Marcano y Hasegawa, 2018.

Determinación de la actividad antibacteriana por el Método de Difusión en Disco (Kirby-Bauer)

La determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de *Crescentia cujete* L. se dispone en el esquema 2.

Esta prueba se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio sólido, y posteriormente se

evidencia por la formación de halos claros. Para la disolución del extracto se utiliza como disolvente DMSO (Velasco, Rojas, Salazar, Rodríguez, Díaz, Morales y Rondón, 2007)

Esta técnica se desarrolló en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA), bajo la asesoría de las Profesoras Yndra Cordero, Ysbelia Obregón y la colaboración del auxiliar del laboratorio José Emilio Salazar.

Bacterias estudiadas

Se eligieron diferentes cepas bacterianas grampositivas y gramnegativas, las cuales se estuvieron del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes a cargo de la Licenciada María Eugenia Nieves (Tabla 7).

Tabla 7. Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).

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

Elaborado por Romero y Obregón, 2023.

Preparación de las placas

Las placas de Petri se prepararon colocando 20 mL de Agar Müeller-Hinton estéril, dejando solidificar a temperatura ambiente.

Preparación de los inóculos bacterianos

Posteriormente se procedió a realizar el inóculo bacteriano en 5 mL de solución salina fisiológica al 0,85 % estéril en un tubo 13x100, tomando con un asa en aro de dos a tres colonias de cada cepa bacteriana, cada una en un tubo respectivamente hasta alcanzar el patrón de turbidez 0,5 a escala de Mc Farland (10^{6-8} UFC/mL).

Inoculación de las placas

Las placas que contenían Agar Müller-Hinton fueron inoculadas con la suspensión microbiana, con un hisopo de algodón estéril, seguidamente se extendió por la superficie del agar en varias direcciones, con el fin de sembrar uniformemente el medio de cultivo.

Preparación de los discos

Se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los mismos se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), durante una noche. Previo a la preparación del inóculo se impregnaron los discos de papel con 10 μ L del extracto a una concentración de 10 mg/mL.

Colocación de los discos

Como control positivo se utilizaron 3 antibióticos comerciales: Eritromicina® 15 μ g para *Staphylococcus aureus*, Ampicilina® 10 μ g para *Enterococcus faecalis* y Piperacilina® 100 μ g para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*. Adicionalmente como control negativo discos impregnados con 10 μ L del solvente dimetilsulfóxido (DMSO), esto con la finalidad de medir la sensibilidad de los

microorganismos a estudiar. A cada placa se colocaron los discos impregnados con cada uno de los extractos a una concentración de 10 mg/mL.

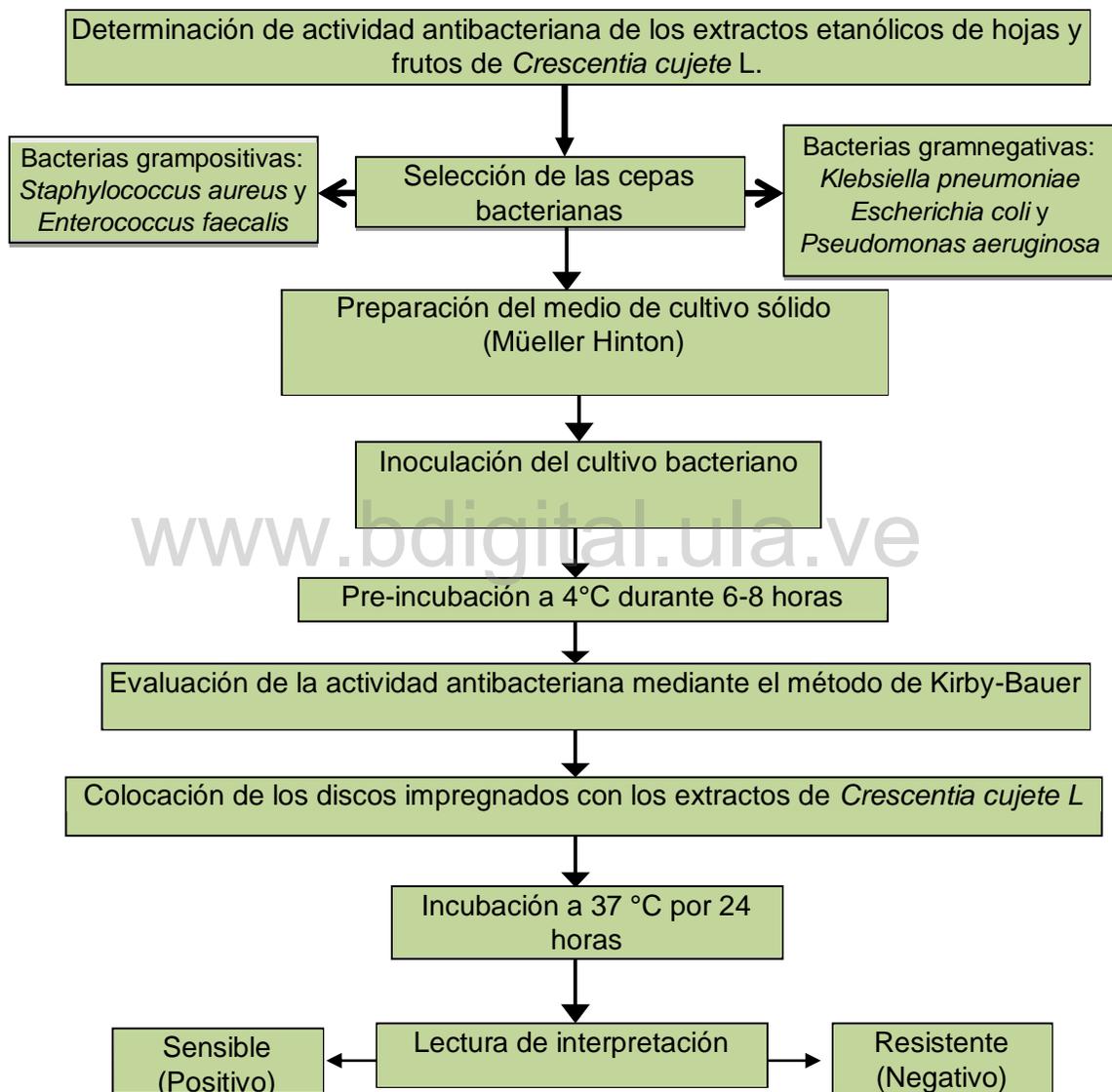
Pre-incubación e incubación de las placas

Al haber colocado los discos en las placas con Agar Müeller Hinton previamente inoculados, se dejaron en la nevera a temperatura de 4 °C aproximadamente durante 30 min, que corresponde con la 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 condiciones de aerobiosis (incubación). Este procedimiento fue seguido para cada microorganismo.

Lectura de placas

Transcurrido el periodo de incubación se observa la formación de halos de inhibición procediendo a registrar los diámetros en mm (Velasco y cols., 2007). Se procede a la lectura, de acuerdo a las categorías interpretativas, sensibles, intermedias y resistentes. Un resultado positivo o sensible presenta un halo de inhibición alrededor del disco (posee actividad antibacteriana) y la ausencia de dicho halo, negativo o resistente (sin actividad).

Esquema 2. Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de etanol de las hojas y frutos de *Crescentia cujete* L., por el método de difusión en agar o método de Kirby-Bauer



Elaborado por Romero y Obregón, 2023.

Diseño de Análisis

Existen dos tipos de enfoques de investigación: cualitativo y cuantitativo. La metodología cuantitativa se basa en métodos de recolección de datos con medición numérica y análisis matemático (Hernández, Fernández y Baptista, 2010). Por lo tanto, esta investigación tuvo un enfoque cualitativo ya que se realizaron pruebas preliminares para determinar los metabolitos secundarios, mediante el tamizaje fitoquímico y cuantitativo ya que se analizaron numéricamente los datos recolectados de la unidad de estudio con el fin de medir la actividad antibacteriana de los extractos de etanol de las hojas y frutos de *Crescentia cujete* L. en bacterias grampositivas y gramnegativas.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Las hojas secas y molidas de *Crescentia cujete* L. (70,01 g) fueron sometidas a un proceso de extracción en caliente con los solventes hexano y etanol, por separado, la pulpa del fruto seco y molido (100 g) se sometió al mismo procedimiento sólo con el solvente etanol (Tabla 8). Obteniéndose así 3 extractos.

Tabla 8. Descripción del peso de los extractos y su rendimiento porcentual.

Partes de la planta y peso (g)	Extracto	Peso (g)	% de rendimiento
Hojas (70,01)	Hexano	28,54	40,76
	Etanol	9,94	14,19
Fruto (100)	Etanol	22,05	22,05

Elaborado por Romero y Obregón, 2023.

Tamizaje Fitoquímico Preliminar

Los extractos obtenidos a partir de las hojas y frutos de *Crescentia cujete* L., fueron sometidos a diferentes pruebas químicas preestablecidas para conocer el grupo de metabolitos secundarios presentes en la muestra; siendo de forma cualitativa la revelación de cada uno de los componentes

por fenómenos químicos de reacción como: viraje de color, precipitados, turbidez del medio, y fluorescencia por exposición a la luz UV. Estos fenómenos fueron los indicativos primordiales para la presencia de los metabolitos presentes de la planta en estudio (Tablas 9 y 10).

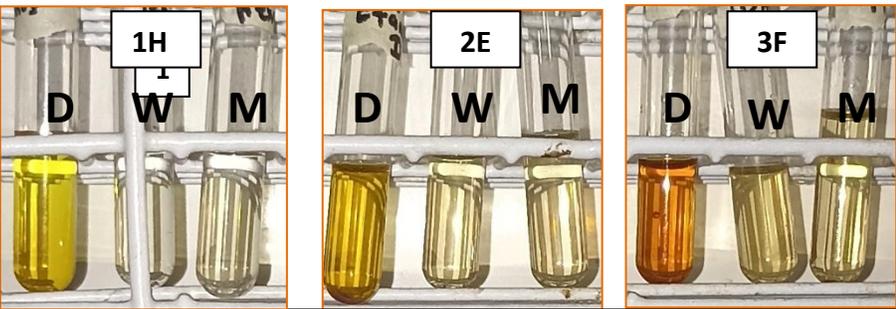
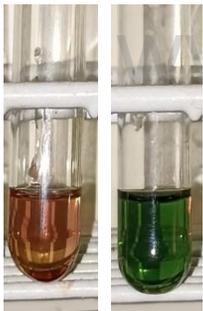
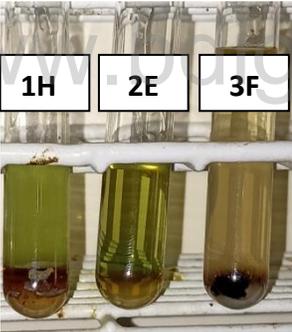
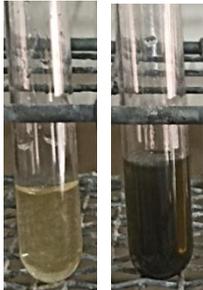
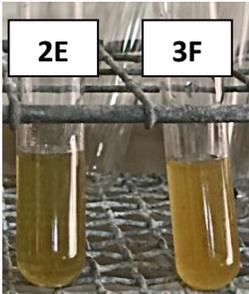
Tabla 9. Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos obtenidos de las hojas y frutos de *Crescentia cujete* L.

Prueba Química	Hexano	Etanol hojas	Etanol frutos
Alcaloides			
- Dragendorff	-	+	+
- Mayer	-	+	+
- Wagner	-	+	+
Triterpenos/Esteroles	+ rojo (Triterpenos)	++ verde (Esteroles)	+ Ligeramente rojo (Triterpenos)
Compuestos fenólicos	ND	-	-
Saponinas	ND	-	-
Taninos	ND	-	-
Flavonoides			
- Shinoda	-	-	-
- NaOH al 10 %	-	-	+ (ligero naranja)
Cumarinas	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-
Quinonas	-	-	+ rojo
Lactonas sesquiterpénicas	ND	-	+
Glicósidos cardiotónicos	ND	+ (anillo marrón)	+ (anillo marrón)

Leyenda: ND: No Determinado. (-): Negativo y (+): Positivo

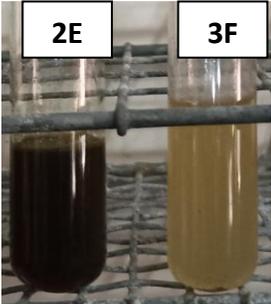
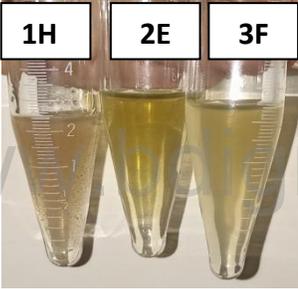
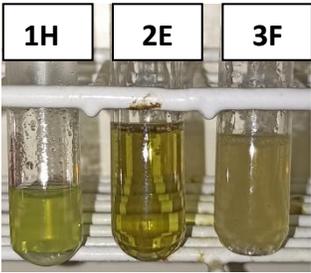
Elaborado por Obregón y Romero, 2023.

Tabla 10. Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de *Crescentia cujete* L.

Control+	Metabolito determinado Alcaloides		
			
<p>Prueba: (D) Drangendorff, (M) Mayer y (W) Wagner Reporte: Negativo en el extracto hexano de hojas y positivo en extracto etanólico de hojas y de frutos, observándose precipitado naranja y blanco respectivamente.</p>			
Control +	Metabolito determinado Triterpenos/Esteroles		
 <p data-bbox="297 1308 456 1373">Triterpenos/ Esteroles</p>	 <p data-bbox="829 1016 1401 1220">Prueba: Lieberman Bouchard Reporte: Positivo - viró a color rojo (triterpenos) en extracto hexano y etanólico de frutos. Hubo viraje a color verde en extracto etanólico de hojas indicando (esteroles).</p>		
Control - y +	Metabolito determinado Compuestos fenólicos		
	 <p data-bbox="824 1499 1401 1633">Prueba: (FeCl₃). Reporte: Negativo. No hubo formación de una coloración verde oscura o negra en ninguno de los extractos</p>		

Leyenda: (1H) Extracto hexano de hojas, (2E) Extracto etanol de hojas, (3F) Extracto etanol de frutos.

Tabla 10. Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de *Crescentia cujete* L. (Continuación)

Control +	Metabolito determinado Saponinas
	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;">  </div> <div> <p>Prueba: Altura de la espuma Reporte: Negativo. No hubo formación de espuma.</p> </div> </div>
Control +	Metabolito determinado Taninos
	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;">  </div> <div> <p>Prueba: Gelatina 1 % Reporte: Negativo. No hubo formación de precipitado blanco.</p> </div> </div>
Control +	Metabolito determinado Flavonoides
	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 20px;">  </div> <div> <p>Prueba: Shinoda Reporte: Negativo. No hubo viraje de color a rojo.</p> </div> </div>

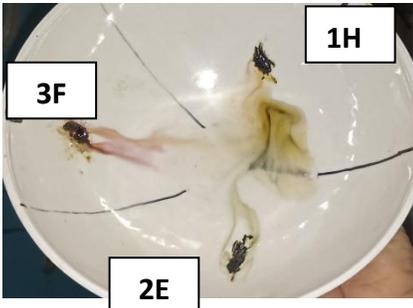
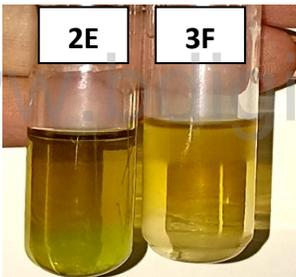
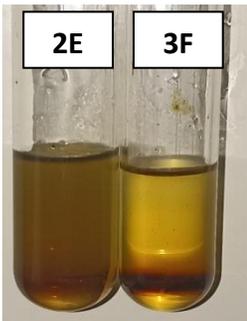
Leyenda: (1H) Extracto hexano de hojas, (2E) Extracto etanol de hojas, (3F) Extracto etanol de frutos.

Tabla 10. Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de *Crescentia cujete* L. (Continuación)

Control +	Metabolito determinado Flavonoides
	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">  <p>1H</p> </div> <div style="margin-right: 10px;">  <p>2E</p> </div> <div>  <p>3F</p> </div> <div style="margin-left: 10px;"> <p>Prueba: NaOH al 10 % Reporte: Negativo en el extracto de hexano, no hubo viraje de color. Positivo en el extracto etanólico de hojas, viró a color café y el extracto de frutos a ligero naranja.</p> </div> </div>
Control +	Metabolito determinado Cumarinas
	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">  <p>1H</p> </div> <div style="margin-right: 10px;">  <p>2E</p> </div> <div>  <p>3F</p> </div> <div style="margin-left: 10px;"> <p>Prueba: Fluorescencia UV Reporte: Negativo. No se observó fluorescencia azul en los extractos analizados</p> </div> </div>
Control +	Metabolito determinado Antraquinonas
	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="margin-right: 10px;">  <p>1H</p> </div> <div style="margin-right: 10px;">  <p>2E</p> </div> <div>  <p>3F</p> </div> <div style="margin-left: 10px;"> <p>Prueba: NH₄OH_{conc} Reporte: Negativo. No hubo viraje de color en los extractos estudiados</p> </div> </div>

Leyenda: (1H) Extracto hexano de hojas, (2E) Extracto etanol de hojas, (3F) Extracto etanol de frutos.

Tabla 10. Reporte de resultados ilustrados del tamizaje fitoquímico de *Crescentia cujete* L. (Continuación)

Metabolito determinado Quinonas	
	<p>Prueba: H₂SO₄ conc Reporte: Negativo en extracto de hexano y etanólico de hojas. Positivo en el extracto etanólico de frutos, si hubo viraje de color a rojo.</p>
Control +	Metabolito determinado Lactonas sesquiterpénicas
	 <p>Prueba: Baljet Reporte: Negativo para el extracto etanólico de hojas. Positivo para extracto de frutos</p>
Control +	Metabolito determinado Glicósidos cardiotónicos
	 <p>Prueba: Reporte: Positivo, hubo presencia de anillo marrón en los extractos etanólicos de hojas y frutos, respectivamente.</p>

Leyenda: (1H) Extracto hexano de hojas, (2E) Extracto etanol de hojas, (3F) Extracto etanol de frutos.

Elaborado por Obregón y Romero, 2023.

Evaluación de la Actividad Antibacteriana

Se determinó a través del método de difusión en disco (Kirby-Bauer) en agar, con los extractos etanólicos de las hojas y el fruto, a una concentración de 10 mg/mL o 10.000 ppm, frente a las diferentes cepas bacterianas ATCC de las cuales se emplearon 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). Con sus respectivos controles positivos comerciales y el control negativo. Los resultados de esta actividad antibacteriana se muestran en la Tabla 11 y Figura 10.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 11. Reporte de resultados obtenidos en la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de *Crescentia cujete* L.

	Halos de inhibición en milímetros (mm) de las bacterias ATCC				
Muestras ensayadas [] 10 mg/mL	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
EEH	7	7	8	11	0
EEF	7	0	0	7	8
Controles Positivos	Halos de inhibición en milímetros (mm) de los controles positivos				
Eritromicina 15 µg	35	-	-	-	-
Ampicilina 10 µg	-	20	-	-	-
Piperacilina 100 µg			22		
(C-) DMSO	-	-	-	-	-

Leyenda: **EEH:** Extracto etanol de las hojas y **EEF:** Extracto etanol de los frutos. **(C-):** Control negativo **DMSO:** dimetilsulfóxido.

Elaborado por Obregón y Romero, 2023.

Figura 10. Reporte de resultados ilustrados de la actividad antibacteriana de los extractos de etanol de las hojas y frutos de *Crescentia cujete* L.

***S. aureus* ATCC 25923**

2: 7 mm y 3: 7 mm



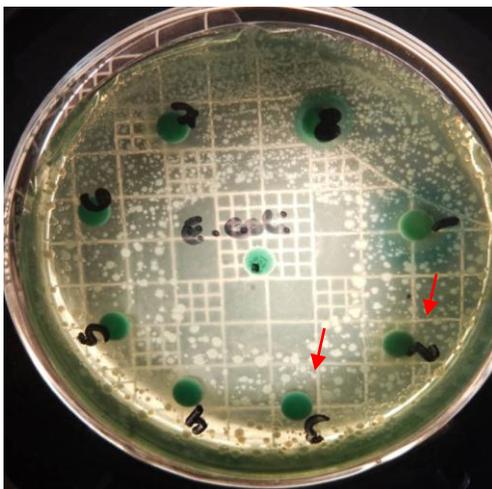
***E. faecalis* ATCC 29212**

2: 7 mm y 3: 0 mm



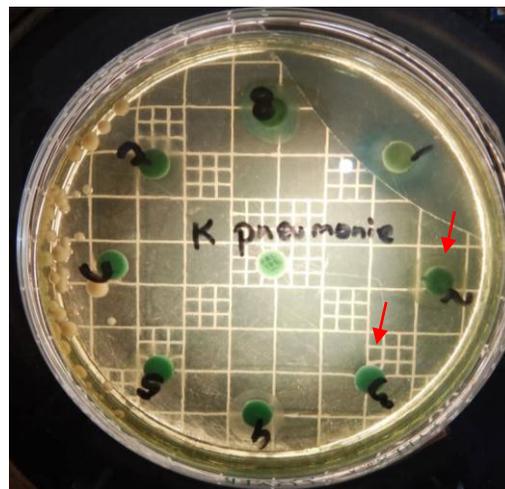
***E. coli* ATCC 25922**

2: 8 mm y 3: 0 mm



***K. pneumoniae* ATCC 23357**

2: 11 mm y 3: 7 mm



Leyenda: 2: Extracto etanol de hojas y 3: Extracto etanol de frutos.

Figura 10. Reporte de resultados ilustrados de la actividad antibacteriana de los extractos etanol de las hojas y frutos de *Crescentia cujete* L. (Continuación)

***P. aeruginosa* ATCC 27853**

2: 0 mm y 3: 8 mm



Leyenda: 2: Extracto etanol de hojas y 3: Extracto etanol de frutos.

Elaborado por Obregón y Romero, 2023.

Discusiones

Análisis Fitoquímico

En la presente investigación se obtuvieron 3 extractos; uno de hexano y etanol de las hojas de *Crescentia cujete* L y un tercer extracto de etanol de los frutos de la misma, mediante la técnica de reflujo en caliente. Luego se procedió a realizar las pruebas químicas cualitativas que demostraron la presencia de algunos metabolitos secundarios como: alcaloides, triterpenos,

esteroles, flavonoides, quinonas, lactonas sesquiterpénicas y glicósidos cardiotónicos en los extractos analizados como se muestra a continuación:

En el extracto de hexano de las hojas de *Crescentia cujete* se observó solo la presencia de triterpenos, mientras que en el extracto etanol de las hojas se evidenció la presencia de alcaloides, esteroles, flavonoides y glicósidos cardiotónicos.

Por su parte, en el extracto etanol de los frutos de *Crescentia cujete* se comprobó la presencia de alcaloides, triterpenos, flavonoides, quinonas, lactonas sesquiterpénicas y glicósidos cardiotónicos. Corroborándose así la extracción de los compuestos de acuerdo a su polaridad, por lo que en el extracto de hexano se separaron los apolares y en los de etanol los compuestos polares. Se denotó la ausencia de alcaloides, flavonoides, cumarinas y quinonas en el extracto de hexano y en el de etanol de las hojas se observó la ausencia de compuestos fenólicos, saponinas, taninos, cumarinas, antraquinonas y lactonas sesquiterpénicas, asimismo, en el extracto etanol de los frutos se evidenció la ausencia de compuesto fenólicos, saponinas y taninos.

Al comparar los resultados obtenidos con estudios anteriores de la caracterización fitoquímica de extractos de *Crescentia cujete* L., de otros países, esta investigación mostró tener composición química similar.

Según González, Sevilla y Tsai (2023), en el tamizaje fitoquímico encontraron flavonoides, fitoesteroles, glucósidos, terpenoides, siendo los más abundantes de manera general en la planta de *Crescentia cujete* L., y en el fruto hallaron alcaloides, compuestos fenólicos, glucósidos irioides, saponinas, furnonaftoquinonas y derivados sesquiterpénicos, por tanto los metabolitos hallados en esta investigación guardan relación con los descritos en dicha literatura, difiriendo de los taninos y saponinas en ambas partes de la especie.

En el estudio realizado por Choirul, Rahma y Nike (2022), en extractos acuosos, de etanol, diclorometano y *n*-hexano de las hojas de *Crescentia cujete* L., el último utilizado para la evaluación fitoquímica, en el cual se observó la presencia de flavonoides y alcaloides. En efecto, esta investigación difiere totalmente de la realizada, ya que no se hallaron ninguno de los mencionados metabolitos en el extracto de hexano de las hojas de la especie. Adicionalmente en ese estudio determinaron la actividad antibacteriana hasta una concentración de 20 µL de la fracción foliar de *Crescentia cujete* para inhibir a *E. coli*, siendo más activa la fracción acuosa al 15 % (6,7 mm ± 5,8 DS), guardando similitud con los resultados obtenidos en esta investigación, ya que el extracto etanol de las hojas de mencionada especie demostró tener mayor actividad (8 mm) frente a dicha bacteria.

Por otra parte, Barahona y Buñay (2020), en el estudio químico de la actividad antioxidante de la pulpa del fruto de *Crescentia cujete*, encontraron alcaloides, triterpenos, taninos y flavonoides, demostrando relación con el trabajo realizado, aunque exceptuando la presencia de taninos en el fruto del presente estudio.

Linares (2021), en la evaluación química de los extractos orgánicos producidos por hongos endófitos aislados de "*Crescentia alata* Kunth", de México, por cromatografía en capa fina se identificó alcaloides, aminas biogénicas, terpenos y aminas fenólicas. Por tanto, este guarda concordancia con la investigación realizada por obtenerse alcaloides y terpenos. Además, esta literatura demostró la actividad antibacteriana, realizando una bioautografía por el método de superposición en agar utilizando resazurina (a una concentración final de 0,8 mg/mL). A las 2 horas de incubación a 37 °C se logró observar con un halo de inhibición de 8,2 mm del extracto del sobrenadante del hongo endófito aislado de la rama *Crescentia. alata*, identificado como *Periconia cf. ignaria* (CaBr80) para *Escherichia coli* y de 8,1 mm contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. De tal manera, que se

asemeja con este trabajo de investigación, ya que los diámetros obtenidos de los halos de inhibición de los extractos de *Crescentia alata* fueron muy similares a los de esta investigación en *Crescentia cujete*.

Espitia y cols (2011), a partir de 800 g del epicarpio de *Crescentia cujete*, originaria de Colombia, obtuvieron 15,8 g de extracto etanol seco, equivalentes al 1,97 % de rendimiento, en el tamizaje fitoquímico hallaron flavonoides, esteroides y triterpenos, relacionándose con el trabajo realizado, ya que mencionados metabolitos también se denotaron en el fruto de la especie, sustentando así la investigación ejecutada en la que se demostró también tener mejor rendimiento en el extracto obtenido.

Asimismo, Vinicius, Silva y cols (2020), en el extracto hidroalcohólico de *Crescentia cujete* frente a *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus* resistente y sensible a Meticilina (MRSA y MSSA), por la técnica de difusión en pozo con 100 mg/mL, mostró actividad antibacteriana con halos de inhibición de 15,8 mm frente a *S. mutans* y 16,2 mm para *S. aureus*. De tal modo que en esta investigación el halo de inhibición del extracto etanol de las hojas fue de 7 mm frente a *S. aureus*.

Prabukumar, Rajkuberan, Sathishkumar, Illaiyaraja, y Sivaramakrishnan (2018), en la evaluación de la actividad antibacteriana mediante la síntesis de nanopartículas de plata de *Crescentia cujete* altamente estables (CCAgNP), muestran significativa actividad antibacteriana contra los patógenos humanos *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella typhi*, *Mycobacterium smegmatis*, *Shigella flexneri* y *Vibrio cholerae*, ya que en estudio basado en fluorescencia, se observa que penetran en la membrana celular bacteriana y provocan el fracaso de una reacción en cadena interna con una concentración de 50 µg/mL, pudiendo implementarse en el desarrollo de nanofármacos antimicrobianos. De tal manera, esta literatura afonda en la implementación de nuevos fármacos a

partir de la especie en estudio, teniendo en cuenta que es lo que se quiere alcanzar en este trabajo.

La actividad antibacteriana del extracto etanol de las hojas se le atribuye a la presencia de alcaloides, flavonoides y posiblemente a los glicósidos cardiotónicos, del mismo modo, en el extracto de etanol de los frutos se debe también a los alcaloides, flavonoides, además de atribuírsele a la presencia de quinonas, lactonas sesquiterpénicas y glicósidos cardiotónicos. A pesar, de que la composición química de las hojas y de los frutos es diferente, porque hay más de variedad de metabolitos secundarios en el fruto, este último debió haber presentado mejor actividad antibacteriana que el extracto de las hojas y no fue así.

Esto pudo deberse a que los compuestos presentes en el extracto del fruto quedaron retenidos en el papel de filtro, ya que por la composición del mismo; celulosa, con uniones (β -1-4) estos grupos hidroxilos libres presentes en la glucosa retienen los compuestos polares por lo que probablemente no pudieron ejercer su actividad quedando atrapados en él, no difundiendo en el agar con las cepas probadas (Burgess, Bregu, Mearns-Spragg y Boyd, 1999).

En la presente investigación las hojas y frutos de *Crescentia cujete* no presentaron compuestos fenólicos, saponinas y taninos, los cuales reportó en la mayoría de los estudios, esto pudo deberse a la distribución geográfica de la especie (condiciones atmosféricas; clima y temperatura), así como también al momento de la recolección y a la parte de la especie utilizada ya que las plantas se adaptan a las condiciones. Sin embargo, la especie puede no presentar estos compuestos, o que ellos se encuentren en pequeñas cantidades siendo indetectables por las pruebas cualitativas empleadas, pero demostró la presencia de otros no reportados anteriormente como las lactonas sesquiterpénicas en el fruto de *Crescentia cujete* L. mencionadas (Sánchez, Galván y Pitre, 2020).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

En el extracto de hexano de las hojas de *Crescentia cujete* L., se observó la presencia de triterpenos. Sin embargo, se denotó la ausencia de alcaloides, flavonoides, cumarinas y quinonas en el mismo. Por otra parte, en el extracto de etanol de las hojas de la especie estudiada, se evidenció la presencia de alcaloides, esteroides, flavonoides y glicósidos cardiotónicos. No obstante, se observó la ausencia de compuestos fenólicos, saponinas, taninos, cumarinas, antraquinonas y lactonas sesquiterpénicas,

Asimismo en el extracto de etanol de los frutos de *C. cujete* se comprobó la presencia de alcaloides, triterpenos, flavonoides, quinonas, lactonas sesquiterpénicas y glicósidos cardiotónicos, pese a lo cual, se evidenció la ausencia de compuestos fenólicos, saponinas y taninos.

La actividad antibacteriana de los extractos de las hojas y frutos a una concentración de 10 mg/mL, determinada frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*, indica que las muestras analizadas presentan una actividad antibacteriana leve, con halos de inhibición entre 7-11 mm, siendo las bacterias gramnegativas las que presentaron mayor sensibilidad.

El extracto de etanol obtenido de las hojas de *Crescentia cujete* L. presentó actividad antibacteriana contra las cepas ensayadas de *S. aureus* (7 mm), *E. faecalis* (7 mm), *E. coli* (8 mm) y *K. pneumoniae* (11 mm). Sin

embargo, este extracto no presentó actividad antibacteriana contra *P. aeruginosa*.

El extracto de etanol obtenido de los frutos de *Crescentia cujete* L., presentó actividad antibacteriana contra *S. aureus* (7 mm), *K. pneumoniae* (7 mm) y *P. aeruginosa* (8 mm). No obstante, este extracto no presentó actividad antibacteriana contra *E. faecalis* y *E. coli*. Siendo más activo el extracto etanol de las hojas a pesar de presentar más variedad de metabolitos secundarios los frutos.

El estudio de la composición química de las hojas de *Crescentia cujete* L. es el primer reporte en Venezuela y además de ello, proporciona de manera particular el primero que determina la actividad antibacteriana de las hojas de la especie *Crescentia cujete* L. en el país

www.bdigital.ula.ve

Recomendaciones

1. Determinar la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar en pozo o el método de dilución de los extractos de las hojas y frutos de *Crescentia cujete* frente a las bacterias ensayadas, para probar que los compuestos polares no están siendo retenidos en el papel de filtro y confirmar la actividad antibacteriana de las muestras analizadas.
2. Aislar e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las hojas y frutos de *Crescentia cujete* L., mediante técnicas cromatográficas.
3. Establecer la concentración inhibitoria mínima (CIM), para así fijar la concentración más baja del extracto que alcanza inhibir el crecimiento bacteriano.
4. Estudiar tallos y flores de *Crescentia cujete*., para identificar metabolitos secundarios y determinar su actividad antibacteriana.
5. Evaluar la actividad anticancerígena, antioxidante, antiparasitaria y antifúngica de *Crescentia cujete* L.

BIBLIOHEMEROGRAFÍAS

- Amat, G., y Aguirre, J. (2019). De la historia natural al conocimiento de la biodiversidad en Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 44(172), 768–779.
- Arias, F., y Johnson, J. (2006). *Métodos de investigación en psicología y educación*. México: Pearson Educación.
- Arroyo, G. (2019). *Investigación de la actividad antibacteriana de hongos endófitos aislados de Crescentia alata Kunt.* (Tesis de maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos Centro de Investigación en Biotecnología, México.
- Ávalos, S., y Pérez, L. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA*, 2(3), 119-145.
- Azcón, B y Talón, J. (2008). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Editorial Universitaria Ramón Areces.
- Basualdo, J., y Coto, C. (1996). *Microbiología Biomédica*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Atlante Argentina.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*. Zaragoza, España: Acribia S. A.
- Burgess, G., Bregu, M., Mearns-Spragg, A., y Boyd, K. (1999). Antagonismo microbiano: una vía descuidada de investigación de productos naturales. *Biotecnología*, 70(1-3), 27.
- Cáceres, A. (1996). *Plantas de Uso Medicinal en Guatemala*. San Carlos, Guatemala: Editorial Universitaria.
- Calle, Z y Botero, R (2004). El totumo, árbol de las Américas para la ganadería moderna. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*.

- Carmona, R., López, O., González, M., y Muñoz, A. (2006). Obtención de extractos a partir de plantas medicinales. *Revista de Investigación en Ciencias Naturales y Tecnología*, 3(2), 1-10
- Cavalier, T., y Smith, A. (2006). Rooting the tree of life by transition analyses. *Biology direct*, 1(1), 19.
- Chang, R., y Goldsby, K. (2016). *Química General*. (11a ed.) McGraw-Hill.
- Choirul, H., Rahma., M., y Niken, D. (2022) Actividad antibacteriana de Aquades, Diclorometano y *n*-Hexano de la hoja de Majapahit (*Crescentia cujetete* L.) frente a bacterias *Escherichia coli* ATCC 25922 *in vitro*. *Revista farmacéutica islámica*, 6(2), 22-25.
- Comité Nacional para Normas de Laboratorios Clínicos (NCCLS). (1997). Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. *Villanova*, 17(1), 9-11.
- Coy, C., Parra, L., y Cuca, J. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (rutaceae). *Dialnet*, 4(4), 31-49
- Espitia, J., Duran, H., Fandiño, F., Díaz, F., Castillo, J., y Gómez, H. (2011). Química y biología del extracto etanólico del epicarpio de *Crescentia cujete* L (totumo). *Revista Colombiana de Química*, 40(2), 281-290.
- Gachet, M., y Schühly, W. (2009). Jacaranda-An ethnopharmacological and phytochemical review. *Journal of Ethnopharmacology*, 121(1), 14-27.
- Galindo, T. (2011). *Crescentia cujete* usos y propiedades más allá de lo ornamental. *Revista Digital Universitaria*, 12(5), 1-13.
- García, D. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Estación Experimental de Pastos y forrajes "Indio Hatuey"*, 27(1), 112-148.
- García, E., y Pérez, U. (2009). *Fisiología Vegetal*. Madrid, España: Editorial Universidad Complutense.

- García, H. (2014). *Microbiología halos de inhibición*. Caracas: Universidad Central de Venezuela.
- Gentry, A., y Tomb, S. (1979). Taxonomic Implications of Bignoniaceae Palynology. *Missouri Botanical Garden*, 66(4), 756-777.
- González, A., Sevilla, U., Tsai, P. (2023). Pharmacological Activities of Bioactive Compounds from *Crescentia cujete* L. Plant - A Review. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 13(2), 2-18.
- González, A. (2004). *Obtención de Aceites Esenciales y Extractos Etanólicos de Plantas Amazónicas*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Guerra, E. (2005). Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas químicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*) a nivel de laboratorio. (Tesis de maestría). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Guevara, V., Hernández, C., Camacho, M., Cruz., y Bulás, M. (2020). Actividad biológica de la corteza del jícaro (*Crescentia cujete* L). *Coloquio de Investigación Multidisciplinaria*, 8(1), 1491-1496.
- Gupta, R. (2011). Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100(2), 171-182.
- Gutiérrez, J. (2012): La Resistencia Bacteriana en Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 20(1), 82-88.
- Heltzel, C., Gunatilaka, A., Glass A., Kingston T., Hoffmann, G., y Johnson, R. (1993). Bioactive furanonaphthoquinones from. *Journal of natural products*, 56(9), 1500-1505
- Hernández, R., Fernandez, C., y Baptista, P. (2010). *Metodología de la Investigación*. Ciudad de México: McGraw Hill.

- Hurtado, J. (2010). *Guía para la comprensión holísticas de la ciencia*. Caracas, Venezuela: Fundación Sypal.
- Idiáquez, L., Maradiaga, S., y Mayorga, T. (2015). *Evaluación de la citotoxicidad, mediante el bioensayo de la artemia salina y caracterización de alcaloides en 4 especies vegetales: Citrus aurantifolia (limón ácido), Catharanthus roseus (mariposa), Tabebuia rosea (roble) y Pouteria sapota (sapote), recolectadas en la ciudad de León* (Tesis de pregrado Lic. en Farmacia y Química). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Nicaragua.
- Jiménez, O. (2008). Índice de confort de la vegetación. *Revista Nodo*, 3(5), 49-70.
- Kuklinski, K. (2003). *Farmacognosia estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona, España: Omega.
- León, P., Díaz, S., López, M., Uribe, M., Willms, K., López, G., Montes, J., y Delgado, F. (2013). Actividad antibacteriana de extractos de frutos de nanchi (*Byrsonima crassifolia* (L.) Kunth), arrayán (*Psidium sartorianum* (O. Berg) Nied y ayale (*Crescentia alata* Kunth). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromática*, 12(4), 356-364.
- Linares, M. (2021). *Evaluación química y de actividad antibacteriana de los extractos orgánicos producidos por hongos endófitos aislados de Crescentia alata Kunth*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
- MacFaddin, J. (2003). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., y Stahl, D. (2018). *Brock biology of microorganisms*. New York, Estados Unidos: Editorial Pearson.

- Magno, I., Esmail, R., Shariz, M., Padua, J., Reyes, K., Lanz, A., Valdez, A., y Hassanal, A. (2022). Antibacterial effect of calabash (*Crescentia cujete*) leaf and fruit on preservation of lettuce (*Lactuca Sativa*) leaves with *Escherichia coli*. *ASEAN Journal of Science and Engineering* 2(1), 91-94.
- Manual de Operaciones. (2005). Procedimiento estándar de operación. *Laboratorio de Investigación de productos naturales*, 2(1), 1-9
- Marcano, D y Hasegawa, M. (2018). *Fitoquímica orgánica*. Caracas, Venezuela: Editorial Consejo de desarrollo científico y humanístico de la UCV.
- Martínez, J., Patiño, G., y Reyes, A. (2007). Caracterización de los metabolitos secundarios de dos especies de *Ocinum* (Fam. Labiatae), en función del método de extracción. *Scientia Et Technica*, 13(33), 121-123
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2017). *Resistencia bacteriana*. Consultado el 01 de marzo de 2022. Recuperado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Oromí, J. (2000) Resistencia bacteriana a los antibióticos. *Medicina integral*, 36(10), 367-370.
- Parella, S. y Martins, F. (2012). *La metodología o el marco metodológico*. Caracas, Venezuela: FEDUPEL.
- Parvin, S., Das, N., Jahan, N., Akhter, L., Nahar, M., e Islam, E. (2015). Evaluation of in vitro anti-inflammatory and antibacterial potential of *Crescentia cujete* leaves and stem bark. *Traditional and Complementary Medicine*, 8 (412), 4-7
- Pengelly, A. (1996). *The constituents of Medicinal Plants*. Reino Unido: Allen & Unwin.
- Pérez, T. (2009). *Obtención de extractos vegetales a partir de plantas medicinales*. La Habana, Cuba: Academia.

- Prabukumar, S., Rajkuberan, C., Sathishkumar, G., Illaiyaraja, M., y Sivaramakrishnan, S. (2018). One pot green fabrication of metallic silver nanoscale materials using *Crescentia cujete* L. and assessment of their bactericidal activity. *Journal of Cluster Science*, 29(2), 313-318
- Pujol, M., Limón, E. (2013). Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. *Infecciones Microbiología Clínica*, 31(2), 65-78.
- Quiored (2004). *Origen y aplicación de los productos naturales*. Universidad de Granada: Departamento de química orgánica.
- Rahmaningsih, S y Pujiastutik, H. (2019). An *in vitro* and *in silico* evaluation of the antibacterial activity of the bioactive compounds in Majapahit (*Crescentia cujete* L.) fruit. *Veterinary World*, 12(12), 1959-1965.
- Red de Programación de Entretenimiento y Deporte (2016). *Nutrición: ¿Qué son los fitoquímicos?*. New York: ESPN Run.
- Reglamento técnico sobre aditivos y saborizantes, Resolución N° 10/06 (MERCOSUR) (2006). (En red) Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-10-2006-118977>.
- Rojas, J. (2019). *Los productos naturales y sus beneficios para el ser humano*. Mérida: Academia de Mérida.
- Ryan, K y Ray C (Eds), (2017). Sherris: *Microbiología médica (7ª ed.)*. McGraw-Hill.
- Sánchez, F., Galván, D., y Pitre, L. (2022). Análisis fitoquímico de extractos de frutos y hojas de dividivi (*Caesalpinia coriaria*) (Jacq) Willd. *Revista Ciencia e Ingeniería*, 9(2):1-18.
- Sieburg, H. (1990). Physiological Studies *in silico*. Studies in the Sciences of Complexity. *Trends in Biochemical Sciences*, 12(1), 321-342.
- Strohl, W. (1997). *Biotechnology of Antibiotics*. Boca Ratón, Estados Unidos: CRC press

- Torres, M. (2004). Investigación en la transformación secundaria de frutos, tubérculos, flores, hojas o tallos de especies pertenecientes a ecosistemas andinos. Informe Técnico. Jardín Botánico José Celestino Mutis – Subdirección Científica. Bogotá D. C. 2-14
- Tortora, J, Funke, R, y Case, L. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- Vaou, N., Stravropoulou, E., Voidarou, C., y Tsigalou, C (2021). Towards Advances in Medicinal Plant antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Microorganisms*, 9(10), 2041.
- 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 multiresistent bacterial strains of nosocomial origin. *Natural Products Communication*, 2(1), 85-88
- Vemedia, (2015). Definición de Antibacteriano. Barcelona: Vemedia Pharma Hispania. Recuperado de: <http://conceptodefinicion.de/antibacteriano/>
- Villarreal, S., Moreno, S., Jaimez, D; Rojas, L., Lucena, M., Díaz, L., Díaz, T., y Carmona, J. (2017). Actividad antibacteriana y antioxidante de especies pertenecientes a la familia Bignoniaceae, entre estas *Spathodea campanulata* Beauv, *Podranea ricasoliana* (Tanfani) Sprague, *Tecoma stans* (Linn.) y *Jacaranda mimosifolia* D. Don. *Bioquímica*, 42(1), 35-42.
- Vinicius, J., Silva, B., Nuñez, M., Méndez, P., Márquez, M., Bezerra, J., y Maia, G. (2020). Actividad antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Chenopodium ambrosioides* (mastruz) y *Crescentia cujete* (coité) sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. *Revista de investigación en Ciencias de la Salud*, 8(2), 45-55.