



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



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Jatropha gossypifolia* L. EN CEPAS BACTERIANAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS

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

Autor (a):

Eliana S. Morales Z.

C.I: V- 24.192.988

Tutor (a):

Dra. Johanna C. Hernández M.

Mérida, Junio de 2023

DEDICATORIA

Agradecer en primer lugar a Dios por darme las fuerzas e inteligencia suficiente para poder desarrollar este trabajo y seguir luchando cada día por este gran sueño.

A mis padres, Ana Iris Zambrano y Pedro Morales† por siempre velar por mi bienestar, por ser el apoyo incondicional en este largo camino, por siempre estar cuando los necesitaba, gracias a ustedes, culmino esta meta tan deseada. Y aunque mi padre ya no está conmigo físicamente sé que desde el cielo me sigue acompañando en este gran logro y que hoy lo celebra junto a mí. Gracias por tanto esfuerzo que han hecho hacia mí.

A mis príncipes, mis dos hijos Cristopher y Cristhian, quienes me ensañan mucho a pesar de su corta edad, porque cada triunfo es por ellos y para ellos, porque con su amor, paz e inocencia me impulsan a ser mejor cada día y a seguir adelante., los Amo.

A Jesús Daniel, por ser mi compañero de vida, por darme su amor, apoyo y siempre estar presente en los momentos buenos y malos que la vida nos ha dado, porque nunca ha dejado que me rinda.

A mis hermanos Pedro Armando y Jorge Arsenio, por el cariño y animo brindado.

Eliana Morales

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a Dios, a la Virgen, al Niño de la Cuchilla y al Dr., José Gregorio Hernández que me permitieron culminar este gran recorrido y etapa con éxitos, porque me iluminaron de sabiduría y entendimiento en todo momento y nunca me desampararon.

En primer lugar a mis padres, porque gracias a los valores que inculcaron en mí soy la persona quien soy, por ser las bases que me ayudaron a llegar hasta aquí, por brindarme la oportunidad de tener una educación de calidad y apoyarme en todo momento.

A mi familia que de alguna forma han colaborado en la realización de esta tesis y a los cuales deseo agradecer sinceramente. A mis tías, primas y mi comadre por haberme brindado su ayuda cuando más las necesite.

A mi tutora Johanna Hernández por su compromiso y dedicación que permitió llevar a feliz término la investigación y escritura del informe.

A las profesoras del Instituto de Investigaciones: Yndra Cordero, Ysbelia Obregón, Alida Pérez y Rosa Aparicio por su ayuda y paciencia en el desarrollo del trabajo de investigación y las tareas experimentales.

A mi compañera Genisis Calderón que en algún momento formo parte de este trabajo de investigación, quien fue mi apoyo mientras estuvimos caminando juntas en este gran recorrido.

A mis compañeras por su amistad, sus consejos y compañía, por los momentos compartidos en todos estos años, especialmente a Yesnaie Rivas, Lauren Belandria, Yusmily Arellano, Grecia Pérez y Oraides Hernández.

A la Universidad de Los Andes, en especial a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por permitirme aprender en sus espacios académicos, profesionales y humanos.

A todas aquellas personas que de una forma u otra contribuyeron a culminar esta tesis como parte de mi desarrollo profesional. A todos, MUCHAS GRACIAS!

Eliana Morales

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE ESQUEMAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
RESUMEN.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	4
Planteamiento del Problema.....	4
Justificación e Importancia de la Investigación.....	6
Objetivos de la Investigación.....	7
<i>Objetivo General</i>	7
<i>Objetivos Específicos</i>	7
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	8
<i>Alcances de la Investigación</i>	8
<i>Limitaciones de la Investigación</i>	8
CAPÍTULO II. MARCO TEORICO.....	9
Trabajos Previos.....	9
Antecedentes Históricos.....	12
Bases Teóricas.....	14
<i>Familia Euphorbiaceae</i>	14
<i>Composición Química</i>	15
<i>Usos etnobotánicas y actividad farmacológica y/o biológica....</i>	16
<i>Género Jatropha</i>	17
<i>Composición Química</i>	18
<i>Usos etnobotánicas y actividad farmacológica y/o biológica.....</i>	20
<i>Especie en estudio Jatropha gossypifolia L</i>	22
<i>Composición Química</i>	22
<i>Usos etnobotánicas y actividad farmacológica y/o biológica.....</i>	30

ÍNDICE DE CONTENIDO

(Continuación)

<i>Productos Naturales</i>	31
<i>Clasificación de los metabolitos</i>	31
<i>Rutas de Biosíntesis</i>	33
<i>Extractos Vegetales</i>	34
<i>Métodos y Técnica de Extracción</i>	35
<i>Percolación</i>	35
<i>Maceración</i>	35
<i>Digestión</i>	35
<i>Decocción</i>	36
<i>Infusión</i>	36
<i>Reflujo por calentamiento</i>	36
<i>Tamizaje Fitoquímico</i>	36
<i>Pruebas Químicas</i>	37
<i>Bacterias</i>	39
<i>Clasificación de las Bacterias</i>	39
<i>Microorganismos patógenos</i>	40
<i>Mecanismo de Acción</i>	41
<i>Inhibidores de la síntesis de la pared celular</i>	41
<i>Inhibidores de la función de la membrana celular</i>	42
<i>Inhibidores de la síntesis de proteína</i>	42
<i>Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos</i>	43
<i>Inhibidores de otros procesos metabólicos</i>	43
<i>Mecanismo de Resistencia</i>	44
<i>Tipos de Mecanismo de Resistencia</i>	45
<i>Método para Determinar la actividad Antibacteriana</i>	45
<i>Definición Operacional de Términos</i>	46

ÍNDICE DE CONTENIDO

(Continuación)

Operacionalización de las Variables.....	48
Hipótesis.....	51
CAPITULO III. MARCO METODOLOGICO.....	52
Tipo de Investigación.....	52
Diseño de Investigación.....	52
Población y Muestra.....	53
<i>Unidad de Investigación.....</i>	53
<i>Selección y Tamaño Muestral.....</i>	53
Sistema de Variables.....	53
Procedimientos de la Investigación.....	53
<i>Recolección de la Muestra.....</i>	53
<i>Preparación del Material Vegetal.....</i>	53
<i>Obtención de los Extractos.....</i>	54
<i>Procedimiento para determinar los metabolitos secundarios por medio del tamizaje fitoquímico.....</i>	55
<i>Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de Jatropha gossypifolia L. por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).....</i>	59
Diseño de Análisis.....	64
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	66
Resultados.....	66
<i>Ensayo Fitoquímico Preliminar.....</i>	66
<i>Evaluación de la Actividad Antibacteriana.....</i>	70
Discusiones.....	74
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	81
Conclusiones.....	81

ÍNDICE DE CONTENIDO

(Continuación)

Recomendaciones.....	82
BIBLIOHEMEROGRAFIA.....	83

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1.	Procedimiento empleado para la obtención del extracto de hexano y etanol de la especie <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	55
Esquema 2.	Procedimiento para determinar los metabolitos secundarios por medio del tamizaje fitoquímico.....	58
Esquema 3.	Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de <i>Jatropha gossypifolia</i> L. por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).....	64

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación taxonómica de la familia Euphorbiaceae.....	15
Tabla 2.	Clasificación taxonómica del género <i>Jatropha</i>	18
Tabla 3.	Aislados a partir de especies vegetales del género <i>Jatropha</i> ...	19
Tabla 4.	Clasificación taxonómica de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	22
Tabla 5.	Principales compuestos aislados de <i>Jatropha gossypifolia</i> L..	23
Tabla 6.	Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana de los extractos de <i>Jatropha gossypifolia</i> L....	49
Tabla 7.	Operacionalización de la variable independiente: Composición química de los extractos de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	50
Tabla 8.	Halos de inhibición de los controles positivos usados como referencia en las cepas bacterianas.....	61
Tabla 9.	Resultados del ensayo fitoquímico de los extractos de las hojas y tallos de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	67
Tabla 10.	Reporte ilustrado de los resultados del tamizaje fitoquímico de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	68
Tabla 11.	Resultados obtenidos en la determinación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	71
Tabla 12.	Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.....	72



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



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS DE *Jatropha gossypifolia* L. EN CEPAS BACTERIANAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS

Autor (a):

Eliana S. Morales Z.

C.I: V- 24.192.988

Tutor (a):

Dra. Johanna C. Hernández M.

RESUMEN

Se realizó un estudio con el fin de confirmar la composición química y la actividad antibacteriana de los extractos de *Jatropha gossypifolia* L. en cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas, dicha planta es utilizada en la medicina popular por sus propiedades curativas y farmacológicas tales como: hipoglucémica, analgésica, antidiabética, antialérgica, antiinflamatoria, antimicrobiana y contra el cáncer. Para obtener los extractos de las hojas y tallos de *J. gossypifolia* L. se usó la técnica de reflujo en caliente con disolventes orgánicos como hexano y etanol, seguidamente se ejecutó el tamizaje fitoquímico analizado cualitativamente para identificar los metabolitos secundarios por medio de diferentes pruebas químicas, logrando obtener triterpenos, esteroides, glucósidos cardiotónicos, compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides. Posteriormente, se determinó la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar por disco, a una concentración de 10 mg/mL, donde se demostró que los extractos de etanol fueron activos y mostraron halos de inhibición frente a: *Staphylococcus aureus* (8 mm), *Enterococcus faecalis* (9 mm), *Klebsiella pneumoniae* (7 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (7 mm), mientras que, *Escherichia coli* no presentó actividad alguna.

Palabras claves: *Jatropha gossypifolia* L., tamizaje fitoquímico, actividad antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales, elaboran unos productos llamados metabolitos secundarios, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo vivo, los cuales pueden servir como droga o medicamento que alivie la enfermedad, o restablezca la salud perdida (Muñoz, 2002).

Las plantas tienen la habilidad de sintetizar compuestos químicos, que en muchos casos le sirven como mecanismos de defensa contra microorganismo, insectos y herbívoros. Atendiendo a ello, el hombre ha dirigido sus investigaciones a la identificación y aislamiento de estas sustancias que tienen actividad antimicrobiana y ha logrado probar que un gran número de especies vegetales inhiben el crecimiento de bacterias resistentes a numerosos antibióticos y hongos patógenos para el hombre (Castillo, Pascual, Nune, Lorente, y Águila, 2014).

Para la producción de extractos o para el aislamiento de sustancias naturales puras, se utiliza como materia prima las plantas medicinales; estos adquieren una importancia cada vez mayor, ya que permiten una mejor caracterización analítica, cumpliendo de una manera más eficaz los requisitos de calidad, efectividad y seguridad, exigidos a cualquier medicamento moderno, sea natural o sintético (Sharapin, 2000).

La especie *Jatropha gossypifolia* L., es ampliamente cultivada como planta ornamental en los países tropicales de todo el mundo. Tanto las hojas como los tallos, las raíces, las semillas y el látex se utilizan en diferentes formas de preparación (infusión, decocción y maceración, entre otros) y

formas de administración (orales, tópicas, baños, entre otras). Estudios han demostrado que esta posee una enorme reserva de fitoquímicos diferentes como: Terpenoides, esteroides, saponinas, flavonoides, triterpenoides, taninos, los glucósidos cardíacos, azúcares reductores. La mayoría de estos componentes químicos pueden ser responsables de muchas actividades farmacológicas (Ojeda, y López, 2022).

Es por esto, que el presente trabajo se basó en evaluar la composición química y la determinación de la actividad antibacteriana de *Jatropha gossypifolia* L., con el fin de confirmar que los metabolitos secundarios presentes en los extractos de las partes aéreas, poseen actividad antibacteriana.

El trabajo de investigación se realizó siguiendo las normas de la Asociación Psicológica Americana APA y ha sido estructurado en V capítulos. El Capítulo I: El Problema, contiene los siguientes elementos: Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia de la Investigación, Objetivos de la Investigación. El Capítulo II: Marco Teórico, abarca los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos o Epistemológicos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las Variables e Hipótesis. El Capítulo III: Marco Metodológico, comprende los siguientes puntos: Tipo de Investigación, Diseño de Investigación, Unidad de Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Procedimiento de la Investigación y Diseño de Análisis. El Capítulo IV, donde se evidencia los Resultados y Discusiones del tamizaje fitoquímico y la actividad antibacteriana realizados a partir de los extractos de hexano y etanol de *Jatropha gossypifolia* L. El capítulo V, titulado y compuesto por,

Conclusiones y Recomendaciones. Y finalmente encontramos las Referencias Bibliohemerográficas.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

La principal problemática es la resistencia bacteriana a los antibióticos, la cual, se produce cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos fármacos. La velocidad con la que surge y se extiende en poblaciones microbianas esta con frecuencia determinada por la cantidad de antibióticos concretos usados en un ambiente dado. Existe por ello la posibilidad de retrasar su aparición y limitar su extensión con un juicioso uso de antibióticos, tanto en humanos como animales (Medina, 2000).

Las infecciones por patógenos resistentes tienen más altas tasas de morbilidad y mortalidad, y suponen un mayor costo, que las causadas por patógenos sensibles. Es necesario recurrir para el tratamiento de distintas infecciones, a antibióticos más caros y/o más tóxicos. Además, las cepas resistentes lo son con frecuencia a varios antimicrobianos (multirresistencia). Cuando se debe al uso inapropiado de antibióticos es, por tanto, una carga adicional innecesaria (Medina, 2000).

Entre los diferentes mecanismos de resistencias a los antimicrobianos se encuentran: la resistencia biológica o clínica, que se refiere a los cambios que determinan que la sensibilidad del microorganismo a un antimicrobiano determinado sea inferior al observado con anterioridad. Cuando la sensibilidad al antimicrobiano se pierde hasta tal grado que el fármaco ya no es eficaz para su uso clínico se dice que el microorganismo alcanzó la resistencia clínica. En segundo lugar, la resistencia mediada por factores

ambientales, que resulta directamente de las características físicas o químicas del ambiente y que alteran de forma directa al agente antimicrobiano o la respuesta fisiológica normal del microorganismo al fármaco; entre los ejemplos de factores ambientales que median la resistencia figura el pH, una atmósfera anaerobia, la concentración de cationes y el contenido de timina. Finalmente, encontramos la resistencia mediada por microorganismos que puede ser intrínseca o adquirida (Forbes, Sahm y Weissfeld, 2009).

Por tal motivo, se dará a conocer la siguiente relación causa-efecto a través del presente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación que existe entre la actividad antibacteriana y los metabolitos secundarios de los extractos de *Jatropha gossypifolia* L. en cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas?

Justificación e Importancia de la Investigación

Se considera que la proliferación de enfermedades causadas por microorganismos patógenos, constituye un factor de riesgo para la salud pública, es por esto que se buscan fuentes naturales que inhiban el crecimiento bacteriano; descubriendo en las plantas compuestos bioactivos para tal fin. Es así como los productos naturales han desempeñado un papel importante en el desarrollo de fármacos, los cuales han sido la base de las primeras medicinas permitiendo el descubrimiento de diferentes productos, entre ellos los antibacterianos (Corzo, 2012).

De las plantas se usan sus extractos en diversas formas de preparación, para mejorar el estado de salud. La medicina herbaria es apreciada por su costo bajo y por los reducidos índices de toxicidad, en comparación con los productos de síntesis (Corzo, 2012).

El interés de la siguiente investigación viene dado por los productos naturales de las partes aéreas de la *Jatropha gossypifolia* L. como alternativa terapéutica, la cual busca obtener nuevos compuestos químicos para combatir la resistencia antimicrobiana que existe en la actualidad y poder proporcionar solución a diferentes enfermedades.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la composición química y la actividad antibacteriana de los extractos de la especie *Jatropha gossypifolia* L. en cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas.

Objetivos específicos

1. Obtener los extractos de *J. gossypifolia* L. de hexano y etanol de las partes aéreas (hojas y tallos) por la técnica de reflujo en caliente.
2. Identificar cualitativamente mediante el tamizaje fitoquímico la presencia de algunos metabolitos secundarios en los extractos de la especie en estudio.
3. Evaluar la actividad antibacteriana frente a *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, mediante el método de Kirby Bauer en agar con disco.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

La siguiente investigación tiene como finalidad confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y los extractos de *Jatropha gossypifolia* L. en cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas, de este modo mejorar el conocimiento sobre el tema en estudio y motivar el control del buen uso de los antibióticos en la sociedad, para así disminuir la resistencia antibacteriana.

Limitaciones de la Investigación

En el desarrollo de esta investigación se encontraron las siguientes limitaciones: se presentó la dificultad de acceder a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, consecuencia a la pandemia del Covid-19; la recolección del material vegetal por su ubicación, debido a la falta de transporte; costos elevados de materiales, reactivos, además de problemas eléctricos, incluyendo la falta de internet.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Mondal y Roy (2022), realizaron un trabajo titulado: Evaluación farmacognostica y fitoquímica de la hoja de *Jatropha nana* var. *Bengalense*, miembro endémico de Euphorbiaceae; define como objetivo general, investigar la farmacognosia y la fitoquímica de las hojas de la *Jatropha nana* var. *bengalense* (Euphorbiaceae), una planta etnomedicinal. Obtuvieron los extractos de las hojas mediante la técnica de maceración en frío de los solventes metanol, etanol y agua destilada, luego realizaron las pruebas químicas cualitativas de los extractos utilizando varios reactivos, detectando los siguientes metabolitos secundarios; taninos, saponinas, alcaloides, flavonoides, lignina, fenol y azúcares reductores. Por otra parte, el extracto seco se disolvió en 2 mL de etanol y se sometió a cromatografía en capa fina (CCF) en diferentes sistemas de solventes como etanol: hexano (9:1) y acetato de etilo: etanol (9:1), usando placa de CCF recubierta previamente con gel de sílice, y así determinaron la presencia de importantes derivados fitoquímicos como; flavonoides $8,23 \pm 0,20$ (mg/g); y fenol $9,85 \pm 0,18$ (mg/g). Es por ello que concluyen que, los datos sobre la disponibilidad de diferentes grupos fitoquímicos no solo respaldarán el aseguramiento de la calidad del fármaco obtenido de esta planta etnomedicinal, sino que también el análisis fitoquímico cuantitativo de las hojas califica por sí mismo para sus estudios científicos posteriores en un amplio panorama de funciones farmacológicas que incluyen antimicrobianas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, anticancerígenas, entre otras.

Quezada (2020), en su trabajo titulado, Caracterización biodirigida de compuestos antioxidantes y antibacterianos de *Jatropha dioica* originaria de Durango, tuvo como objetivo general identificar y caracterizar los compuestos con actividad antioxidante y antibacteriana de los extractos de *Jatropha dioica* originaria de Durango. Se encontró que los extractos presentaron alcaloides, terpenos, fenoles y flavonoides. Los extractos metanólico y etanólico de la raíz de la planta mostraron mayor porcentaje de capacidad antioxidante con 90,57 % y 89,99 % respectivamente, seguido del acuoso de las partes aéreas (hojas y tallos) con 88,25 %. El extracto acuoso de las partes aéreas y los extractos metanólico y etanólico tuvieron mayor actividad antibacteriana contra *S. aureus* con 10 ± 1 ; $10,33 \pm 2,08$; $10,66 \pm 1,52$ mm, respectivamente, presentando una CMI de 25 mg/mL, sin embargo, ninguno de los extractos probados mostró actividad contra *E. coli*. Los compuestos detectados por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) fueron: ácido shikímico, catequinas y epicatequinas. Por ello la autora concluye que, *Jatropha dioica*, es fuente de diversos metabolitos secundarios como los alcaloides, terpenos, fenoles y flavonoides, que poseen actividades tanto antibacteriana como antioxidantes.

Pérez, Guerra, Reyes, Cuevas y Guerra (2020), en el trabajo realizado sobre Actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de *Jatropha dioica* contra bacterias fitopatógenas de tomate, expusieron como objetivo general evaluar la actividad antibacteriana de extractos de diferente polaridad y en su caso, de raíces de *J. dioica*, contra las bacterias fitopatógenas *Clavibacter michiganensis* Subsp. *michiganensis* (Cmm), *Pseudomonas syringe* pv. *tomato* (Pst), *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv). Seguidamente, los autores de acuerdo con los resultados, determinaron que el extracto hexánico mostró la menor Concentración Inhibitoria Media Máxima (CI₅₀= 0,1 mg/mL) contra Pst y Xcv ($0,5 \pm 0,01$ y $1,7 \pm 0,36$ mg/mL,

respectivamente) por lo que se separó por cromatografía en columna. Como resultado, se aisló y purificó un sólido cristalino blanco identificado espectroscópicamente como citlaltiriona, dicho compuesto también presentó actividad contra las bacterias Cmm, Pst y Xcv con una ($CI_{50} = 0,1$ mg/mL) de $1,0 \pm 0,13$; $1,0 \pm 0,11$ y $1,1 \pm 0,19$ mg/mL, respectivamente. Por esta razón, los autores concluyeron que, los extractos de *J. dioica* presentaron actividad inhibitoria *in vitro* sobre el crecimiento de bacterias fitopatógenas que afectan al cultivo de tomate. Por lo que el extracto hexánico mostró mayor actividad antibacteriana contra Pst y Xcv y el extracto de acetato de etilo contra Cmm. Del extracto hexánico se aisló e identificó el compuesto diterpénico citlaltiriona como uno de los responsables de la actividad inhibitoria. Estos resultados abren la posibilidad de utilizar estos extractos vegetales y el compuesto citlaltiriona para el control de las enfermedades causadas por Cmm, Pst y Xcv como una alternativa al uso de antibióticos o compuestos de cobre para el control de enfermedades bacterianas del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*).

Bastos, Rodríguez, Silva, Feitosa, Melo, Araujo y Guedes da Silva (2020), en el trabajo de investigación titulado, Análisis fitoquímico y actividad antibacteriana de *Jatropha mollissima* (Euphorbiaceae); señalaron como objetivo general evaluar el potencial antibacteriano de *J. mollissima* contra cepas bacterianas multirresistentes. Los autores determinaron los extractos de etanol de hojas y los concentraron en un evaporador rotatorio al vacío, seguidamente realizaron pruebas que se basaron en la observación visual de un cambio de color o formación de precipitado después de la adición de reactivos específicos al extracto; los resultados fueron presencia de alcaloides, antocianinas, antraquinonas, compuestos fenólicos, cumarinas, derivados antracénicos, lignanos, saponinas, taninos y triterpenos/esteroles.

El efecto antibacteriano lo realizaron mediante el método de microdilución en caldo, preparando una solución madre de 25 mg/mL de los extractos utilizando una solución acuosa de DMSO al 20 %. Luego realizaron diluciones en serie, en concentraciones de 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,195 y 0,0975 mg/mL; y agregaron los inóculos a cada pocillo para probar la eficacia antibacteriana del extracto etanólico crudo. Para la gentamicina usaron una concentración inicial de 1,6 mg/mL pudieron observar que, entre los resultados obtenidos para la concentración mínima inhibitoria, los extractos frente a la cepa *Serratia marcescens*, presentaron valores de 0,195 mg/mL, y frente a *Shigella flexneri*, una CMI de 3,125 mg/mL. Finalmente, los autores concluyen que, los principales metabolitos secundarios identificados en los extractos de *J. mollissima* tienen actividad directa contra muchas especies de bacterias, y que las cepas *S. marcescens* y *S. flexneri*, obtuvieron buena actividad inhibitoria.

Antecedentes Históricos

En primer lugar, nadie sabe exactamente donde se utilizaron las plantas medicinales por primera vez, seguramente la búsqueda de algún remedio fue algo que se dio en varias culturas a la vez, fruto del deseo de los hombres de sanar, ya sea por cuestiones religiosas o de algún preparado que le proporcionara una mayor felicidad temporal (Granda, 1997).

La mayoría de los descubrimientos fueron simplemente el resultado de la necesidad de encontrar nuevos alimentos. Los antepasados tenían que comprobar si las nuevas especies podían ingerirse, lo que conllevaba a que descubrieran con su propio cuerpo que muchas eran comestibles, otras eran tóxicas y algunas producían efectos diferentes. Se sabe que el primer texto escrito sobre el uso de las plantas medicinales tiene unos 4000 años de

antigüedad y aparece en una tablilla de arcilla en la cultura de los sumerios, lo que equivaldría al actual Iraq (Granda, 1997).

Siguiendo con el mismo orden de ideas, *Jatropha* históricamente tiene su origen en América Central y el norte de América del Sur. No obstante, se ha distribuido a otras regiones tropicales por navegantes y exploradores europeos a partir del siglo XVI. Los registros históricos muestran que fue utilizada por los indios nativos de Centroamérica y quizás de América del Sur en la medicina herbaria. Ya en el año de 1836 las semillas se producían comercialmente en las islas de Cabo Verde, donde fueron exportadas a Portugal y Francia, y el aceite se utilizaba para el alumbrado de la calle y la producción de jabón. Debido a la toxicidad de las hojas y su rápido crecimiento y resistencia, *Jatropha* se empleó frecuentemente como una protección o cerco vivo, ya que no era afectada por el ganado (Putten, Franken y Jongh, 2009).

Seguidamente, encontramos el origen de la actividad antibacteriana que inicia en la era moderna de la terapéutica antimicrobiana en 1934, con la descripción de Dogmak de la efectividad de la primera sulfonamida en el tratamiento de las infecciones experimentales por *Streptococcus*. La llamada “Edad de Oro” de los antibióticos comienza en 1941 con la producción de la penicilina a gran escala y su utilización con buenos resultados en ensayos clínicos (Jackson, Machado, y Hamilton, 1998).

Bases teóricas

Familia Euphorbiaceae

Euphorbiaceae es una numerosa familia de angiospermas, con aproximadamente 300 géneros y 8000 especies, también se encuentran arbustos, arboles, enredaderas y suculentas. Son comunes en áreas tropicales, como América y África; no obstante, puede encontrarse en todo el mundo, excepto en la Antártica (Díaz, 2010).

Los géneros más importantes son: *Euphorbia* (1000 especies), *Crotón* (500- 600 especies) y *Phyllanthus* (400 especies). Sin embargo, debido a la distribución principalmente tropical de la familia y a sus diminutas flores, las Euphorbiaceae han sido mucho menos estudiadas que otras familias botánicas (Pascual y Correal, 1992).

Las características más comunes de las Euphorbiaceae son: hojas compuestas palmeadas o simples estipuladas; inflorescencias cimosas, a veces muy modificadas, con forma de racimo; flores unisexuales, radialmente simétricas con disco nectarífero receptacular (a veces ausente); pétalos generalmente ausentes; estambres desde uno a muchos; granos de polen con 2-3 núcleos y con distintos dibujos; gineceo con 3-6 carpelos unidos, con estilos no divididos a multífidos; óvulos solitarios o por pares en cada carpelo, anátropos y epítropos, crasinucelados con dos tegumentos; frutos generalmente capsulares y carpelos que se separan de una columnilla central en la dehiscencia (Pascual y Correal, 1992).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la familia Euphorbiaceae:

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malpighiales
Familia	Euphorbiaceae

Fuente: Díaz, 2010.

Composición química: Se ha investigado la composición química de más de 120 especies, principalmente del género *Euphorbia*. Sus principales compuestos químicos son triterpenoides, flavonoides y alcaloides, también contienen cumarinas, glucósidos cianogénicos y taninos. El látex de *Euphorbia* contiene mayormente triterpenos y sus esteres. En el análisis de los aceites esenciales de varias especies de *Crotón* se identificaron varios componentes como monoterpenoides, fenilpropanoides y sesquiterpenoides (Pascual y Correal, 1992).

Además, en géneros como *Áleurites*, *Crotón*, *Euphorbia*, *Jatropha*, *Sapium*, etc., se encuentran esteres diterpenos de tipo forbol, de estructura compleja (tiglianos, dafnanos, ingenanos), los cuales son altamente irritantes para la piel y las mucosas, y algunos son promotores de tumores (Díaz, 2010).

Por otra parte, el aceite de semilla de esta familia contiene ácidos grasos saturados e insaturados, el aceite de ricino contiene un 80-90% del triacil glicerol del ácido ricinoleico. Otros de los compuestos fenólicos detectados en diversas especies de esta familia son: a) cumarinas en *Euphorbia lathyris* y *Ricinus communis*; b) taninos hidrolizables en *Euphorbia macuiata* L., *Gleditsia japónica* Miq. y *Sapium sabiferum*, etc; c) fenantrenos y quinonas

en *Euphorbia pulcherrima* y *Hevea brasiliensis*, y d) ácidos fenólicos en *Ricinus communis* (Krewson y Scott, 1966).

Usos etnobotánicos y actividad farmacológica y/o biológica: Se caracterizan por la producción de látex, otras por la del aceite o raíces comestibles, algunas se comportan como maleza, ornamentales y medicinales (Díaz, 2010).

Las Euphorbiaceas producen aceite de ricino, aceite de tung, sebo vegetal y otros tipos de aceites, grasas y ceras. Varias plantas productoras de caucho pertenecen a esta familia, la más importante es *Hevea brasiliensis* el árbol del caucho, principal suministrador del caucho producido en el mundo. Otras especies de los géneros *Manihot*, *Micandra* y *Cnidoscolus* también producen caucho en menores cantidades. Hay pocas especies que producen madera adecuada para la fabricación de muebles; sin embargo, existen algunas especies arbóreas que son valiosas para producir madera y pulpa para papel como: *Ricinodendron africanus*, o *Hura crepitans* L. Muchos miembros de esta familia especialmente del género *Euphorbia*, producen hidrocarburos, cada especie contiene un látex que es en realidad una emulsión de 30% de terpenos en agua (Pascual y Correal, 1992).

Plantas utilizadas en la industria alimenticia como: la cassava (*Manihot esculenta*) también llamada manioca, mandioca, yuca o tapioca, es una especie próxima a la patata dulce que alimenta a buena parte de la población mundial, especialmente en Sudamérica, África e India. Otras plantas de interés son: *Crotón eluteria* Benn utilizado en licores por sus componentes volátiles, y *Cnidoscolus marcgravii* Pohl. y *Jatropha oligandra* Muell. que producen unas nueces utilizadas como alimento y para la producción de aceite de cocinar. Las plantas de esta familia se han utilizado desde tiempos

remotos como medicinas en el tratamiento de tumores, inflamaciones, asma, conjuntivitis, hepatitis, etc (Pascual y Correal, 1992).

Género *Jatropha*

El género *Jatropha*, cuenta con unas 172 especies de biotipos variados, desde árboles, arbustos, herbáceas perennes a plantas suculentas, nativas de América Central y Caribe, aunque también se distribuyen por América del Norte, Asia y África, en zonas tropicales y subtropicales (López y Pérez, 2011).

La planta tiene hojas verdes con una longitud y anchura de 6 a 15 centímetros; muestran diferente estructuración que va desde una planta con tallo principal sin o con pocas ramas a una planta que se ramifica desde la base. Las ramas contienen un líquido (látex) de color blanco, de textura pegajosa que deja manchas marrones, difíciles de lavar. El sistema radicular está muy bien desarrollado, con raíces creciendo tanto lateral como verticalmente en las capas más profundas del suelo. Es monoica, con presencia de flores masculinas y femeninas en la misma planta, las frutas crecen al final de las ramas en racimos de 5 a 20 unidades, tienen una forma semejante a un balón de fútbol americano y alrededor de 40 milímetros de largo, cada fruta contiene 3 semillas, aunque a veces se puede encontrar hasta 4 o 5 (Putten y cols., 2009).

Encontramos que las semillas de *J. pohliana*, *J. gossypifolia* y *J. curcas* tienen un alto contenido de aceite, lo cual ha permitido que estas especies se consideren como cultivos potenciales para la producción de biodiesel. Este género es bien conocido por su alta toxicidad, ya que su mayoría cuenta, en

su látex, con un cóctel de toxinas muy elevado, el látex tiene propiedades antibióticas contra algunas bacterias (López y Pérez, 2011).

Tabla 2. Clasificación taxonómica del Género *Jatropha*:

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malpighiales
Familia	Euphorbiaceae
Subfamilia	Crotonoideae
Tribu	Jatropheae
Género	<i>Jatropha</i>

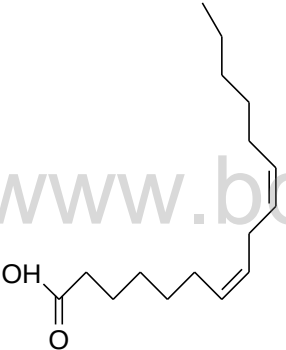
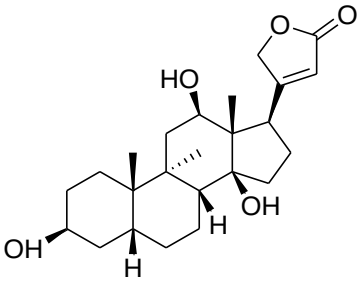
Fuente: Pabón y Hernández, 2012.

Composición química de la *Jatropha*: sintetiza compuestos que intervienen en sus interacciones ecológicas con el ambiente como terpenos, compuestos fenólicos, glicósidos y alcaloides, estos metabolitos cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos. *Jatropha curcas* es un ejemplo de este género en el gran número de estudios dirigidos a conocer la composición química en cada una de las partes de esta planta; se han identificado flavonoides, diterpenos, esteroides, triterpenos, sapogeninas, cumarinas, deoxipreussomerinas, ácidos orgánicos, iridioides, saponinas y taninos (Pabón y Hernández, 2012).

Una de las especies más relevantes del género es *J. curcas*, donde la extracción de aceites a partir de su semilla contiene el 21 % de ácidos grasos saturados y el 79 % de ácidos grasos insaturados, principalmente el ácido linoleico (1) (Tabla 3). Seguidamente a *J. cuneata* se le atribuye una alta

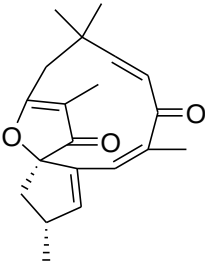
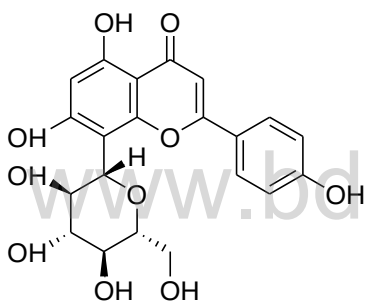
cantidad de saponinas, como digoxigenina (2). Además *J. gossypifolia* se suma a la lista de especies de este género, donde estudios fitoquímicos realizados a esta especie muestran que partes aéreas poseen diterpenos como la jatrofona (3); la cual ejerce una actividad antibiótica contra *Staphylococcus aureus*, en sus hojas abundan flavonoides C-glicósidos tales como vitexina (4) (Tabla 3) (Cabrera, 2017).

Tabla 3. Aislados a partir de especies vegetales del género *Jatropha*.

Estructura	Compuesto
(1) 	Ácido linoleico (1)
(2) 	Digoxigenina (2)

Fuente: Cabrera, 2017.

**Tabla 3. Aislados a partir de especies vegetales del género *Jatropha*.
(Continuación)**

Estructura	Compuesto
(3) 	Jatrofona (3)
(4) 	Vitexina (4)

Fuente: Cabrera, 2017.

Usos etnobotánicos y actividad farmacológica y/o biológica: presentan diferentes usos en el control de plagas como insecticida y fungicida, pueden controlar de manera eficiente hongos, parásitos y otros organismos que afectan el crecimiento y la producción de cultivos. Ha sido utilizada también en procesos de fitorremediación de suelos contaminados principalmente por aceites lubricantes usados en los automóviles, la planta ofrece una alternativa de recuperación del suelo rentable y viable con el medio ambiente (Pabón y Hernández, 2012).

Estudios de evaluación económica han mostrado que la producción de biodiesel de *Jatropha* es rentable, si se comercializan los subproductos obtenidos de la producción. Por ejemplo, el glicerol obtenido durante el proceso de producción de biodiesel puede servir como un insecticida contra las garrapatas del ganado. Por sus diversas aplicaciones esta especie vegetal ha sido reconocida por diferentes gobiernos, para promover la siembra y el uso de esta planta oleaginosa, con 2 objetivos principales: el desarrollo económico y sostenible del medio ambiente y el desarrollo rural en cuanto se refiere a la obtención de nuevas alternativas de energía (Kumar y Sharma, 2008).

La utilización de la planta en medicina tradicional y el uso veterinario se ha reportado en India, África y América Latina. En Egipto se utilizan las semillas para artritis, gota e ictericia. En Malí, Nigeria, Camerún, Camboya, Filipinas y Malasia las hojas se han utilizado para la malaria, la ictericia, el reumatismo, la diarrea y como purgante y cicatrizante respectivamente. Extractos obtenidos de las semillas, las hojas, la corteza y el aceite de *J. curcas* han mostrado acción eficaz como purgante natural. La actividad antiinflamatoria y la utilización como tratamiento del reumatismo ha sido evidenciado mediante la utilización de las hojas de la planta sobre la región afectada; los tallos se han utilizado para elaborar cepillos de dientes con el fin de fortalecer las encías, reducir y evitar la presencia de abscesos; y la raíz se ha utilizado para el tratamiento de la neumonía, la sífilis y como abortivo, purgante y desinflamatorio local (Gubitz; Mittelbach; y Trabi, 1999).

Especie *Jatropha gossypifolia* L.

Jatropha gossypifolia es una planta herbácea de 1 a 2 m de alto, con hojas de 7 a 15 cm, acorazonadas en la base que crece a la orilla de los caminos, en terrenos yermos y cultivados, calcáreos, principalmente de poca o mediana elevación. Originaria de América tropical, pero ahora se cultiva ampliamente en los países tropicales de todo el mundo. Se observa en las Antillas Mayores y en muchas de las Menores y en las Bahamas (Granda, 1997).

Tabla 4. Clasificación taxonómica de *Jatropha gossypifolia* L.:

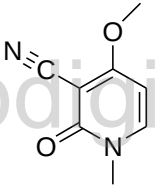
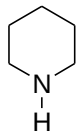
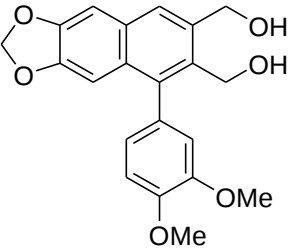
Reino	Plantae
División	Angiospermas
Clase	Eudicotas
Familia	Euphorbiaceae
Género	<i>Jatropha</i>
Nombre científico	<i>Jatropha gossypifolia</i> L.
Nombre común	Tuatúa
Otros nombres comunes	Frailecillo, frailecito, San Juan del Cobre

Fuente: Muñoz, 2016.

Composición química: Estudios realizados a las hojas de *Jatropha gossypifolia* L. demuestran que posee una enorme reserva de fitoquímicos diferentes como: terpenoides, esteroides, saponinas, triterpenoides, flavonoides, taninos, glucósidos cardíacos, azúcares reductores y proteínas (Renu, 2010).

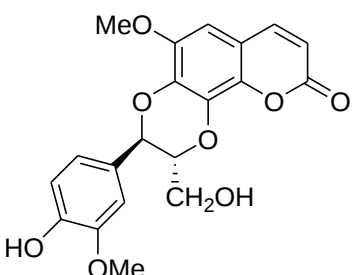
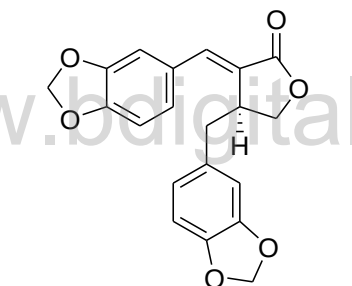
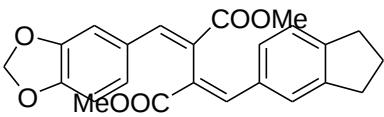
Comúnmente, los estudios usan solventes o mezclas de solventes con características no polares, lo que podría contribuir a una mayor caracterización de compuestos no polares, como terpenoides y lignoides. Los compuestos polares como flavonoides, taninos y azúcares están poco descritos en la especie hasta el momento, probablemente debido a este hecho (Tabla 5).

Tabla 5. Principales compuestos aislados de *Jatropha gossypifolia* L.

Clasificación	Estructura	Parte de la Planta	Compuesto
Alcaloides	(5)  (6) 	Hojas	Ricinina (5) Piperidina (6)
Cumarina-lignoides	(7) 	Tallos, raíces y semillas	4-O-dimetil retroquinensina Ariinaftaleno lignano (7)

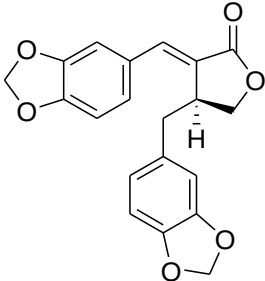
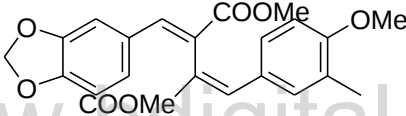
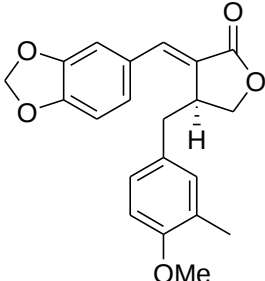
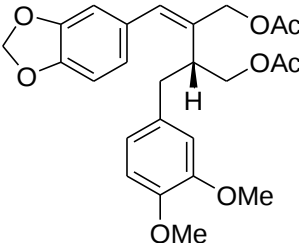
Fuente: Félix, Brandt, Silva, Zucolotto y Fernandes, 2014.

**Tabla 5. Principales compuestos aislados de *Jatropha gossypifolia* L.
(Continuación)**

Clasificación	Estructura	Parte de la Planta	Compuesto
Cumarina-lignoides	(8) 	Tallos	Cleomiscosina A (8)
Cumarina-lignoides	(9) 	Tallos, raíces y semillas	Gadaina (9)
Cumarina-lignoides	(10) 	Tallos	Gossypidieno (10)

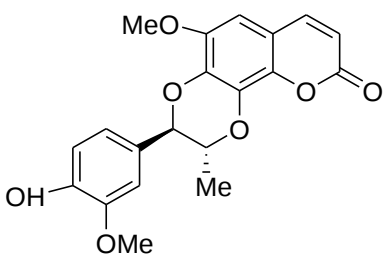
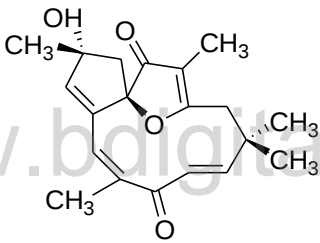
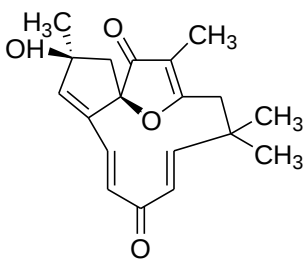
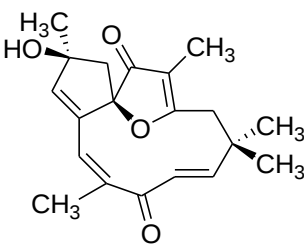
Fuente: Félix, Brandt, Silva, Zucolotto y Fernandes, 2014.

**Tabla 5. Principales compuestos aislados de *Jatropha gossypifolia* L.
(Continuación)**

Clasificación	Estructura	Parte de la Planta	Compuesto
Cumarina-lignoides	(11) 	Tallos	Isogadaina (11)
	(12) 		Jatrodieneo (12)
Cumarina-lignoides	(13) 	Tallos, raíces y semillas	Jatrofano (13)
Cumarina-lignoides	(14) 	Tallos	Prasanthaline (14)

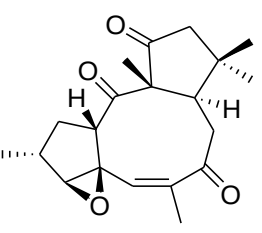
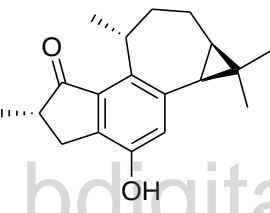
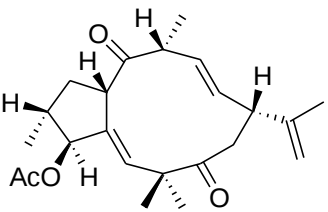
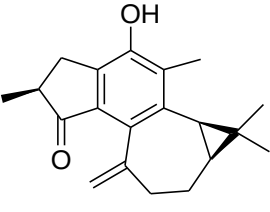
Fuente: Félix, Brandt, Silva, Zucolotto y Fernandes, 2014.

**Tabla 5. Principales compuestos aislados de *Jatropha gossypifolia* L.
(Continuación)**

Clasificación	Estructura	Parte de la Planta	Compuesto
Cumarina-lignoides	(15) 	Tallos	Propacina (15)
Diterpenos	(16) 	Raíces	2α-hidroxijatrophono (16)
Diterpenos	(17)  (18) 	Raíces	2β-hidroxi-5,6-isojatrophono (17) 2β-hidroxijatrophono (18)

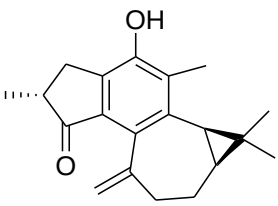
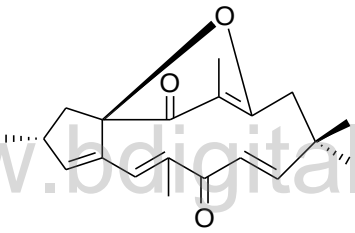
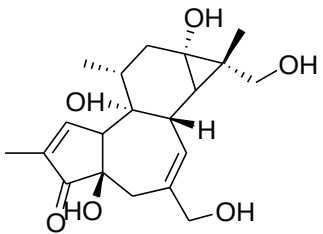
Fuente: Félix, Brandt, Silva, Zucolotto y Fernandes, 2014.

**Tabla 5. Principales compuestos aislados de *Jatropha gossypifolia* L.
(Continuación)**

Clasificación	Estructura	Parte de la Planta	Compuesto
Diterpenos	(19)  (20) 	Toda la planta	Abiodona Citlalitrona (19) Falodona (20)
	(21)  (22) 	Raíces	Jatrofenona (21) Jatrofolona A (22)

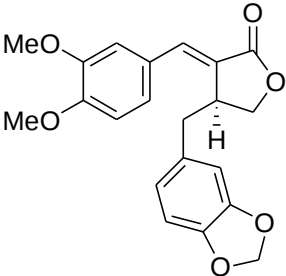
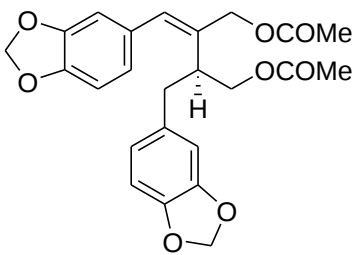
Fuente: Félix, Brandt, Silva, Zucolotto y Fernandes, 2014.

**Tabla 5. Principales compuestos aislados de *Jatropha gossypifolia* L.
(Continuación)**

Clasificación	Estructura	Parte de la Planta	Compuesto
Diterpenos	(23) 	Raíces	Jatrofolona B (23)
	(24) 		Jatrofona (24)
Esteres	(25) 	Semillas	12-desoxi-16- hidroxilforbol (25)

Fuente: Félix, Brandt, Silva, Zucolotto y Fernandes, 2014.

**Tabla 5. Principales compuestos aislados de *Jatropha gossypifolia* L.
(Continuación)**

Clasificación	Estructura	Parte de la Planta	Compuesto
Lignanós	(26) 	Partes aéreas	Gossypifano (26)
	(27) 		Gosipilina (27)

Fuente: Félix, Brandt, Silva, Zucolotto y Fernandes, 2014.

Usos etnobotánicos y actividad farmacológica y/o biológica: la Tuatúa es ampliamente cultivada como planta ornamental, se encuentra en los jardines y las zonas comunes, por lo que es de fácil acceso. Las raíces, tallos, hojas, semillas y frutos de la planta han sido ampliamente utilizados en la medicina popular tradicional por sus propiedades curativas en muchos países (Renu, 2010).

El aceite de las semillas de *Jatropha gossypifolia* L. se conoce como aceite infierno, aceite pinheon, infernale óleo o óleum majoris ricini, que contiene pequeñas cantidades de un ácido curcanoleico irritante, que está relacionado con el ácido ricinoleico y ácido crotonoleico, ingredientes activos del aceite de ricino y aceite de crotón respectivamente (Muñoz, 2016).

La mayoría de los componentes químicos pueden ser responsables de muchas actividades farmacológicas reportadas sobre la Tuatúa; como las saponinas que poseen propiedades hipocolesterolemiantes y antidiabéticas. Los terpenoides, han demostrado la reducción del nivel de azúcar en la sangre, en estudios realizados a animales. Por otra parte, los esteroides y triterpenoides mostraron propiedades analgésicas y antiinflamatorias, además que pueden contribuir en las actividades del sistema nervioso central. La presencia de flavonoides y taninos en las hojas los hace responsable de la actividad de captación de radicales libres; también los flavonoides se han denominado como modificadores de la respuesta biológica de la naturaleza debido a la fuerte evidencia experimental de su capacidad para modificar la reacción del cuerpo a las alergias, virus y carcinógenos, mostrando actividad antialérgica, antiinflamatoria, antimicrobiana y contra el cáncer (Muñoz, 2016).

El uso del látex, está asociado como agente hemostático para prevenir trastornos hemorrágicos, ya que, los resultados del tiempo de coagulación se reducen significativamente, lo que sugiere una actividad procoagulante. Mientras que, el extracto de las hojas, por vía oral, altera las principales hormonas involucradas en la regulación del ciclo estral, lo que indica su efecto antifertilidad (Jain, Choudhary, y Jain, 2012).

Productos Naturales

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

Los compuestos derivados del metabolismo secundario, se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, contienen propiedades biológicas, además desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus distintas aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas o colorantes, entre otros (Bruneton, 2001).

Clasificación de los metabolitos

Flavonoides: sin ser metabolitos primarios, se encuentran casi en cualquier vegetal superior, hay más de 8000 compuestos conocidos de plantas vasculares mientras que en los vegetales inferiores: algas, hongos, bacterias, los compuestos fenólicos principales son quinonas y xantonas y a

estos deben su color. La función de los flavonoides en las plantas son varias como antioxidantes y secuestradores de radicales libres, agentes antimicrobianos y antinutricionales, fotoreceptores y protectores contra la luz UV entre otros (Marcano y Hasegawa, 2002).

Isoflavonoides: son distribuidos en pocas familias, probablemente debido a un sistema enzimático, responsable de su bioformación, muy especializado. Se encuentra principalmente en la subfamilia: Papilionoideas de las Leguminosas y menos frecuente en otra subfamilia: Caesalpinioideas (Marcano y Hasegawa, 2002).

Quinonas: constituyen un grupo importante de pigmentos vegetales y animales, el ejemplo más antiguo es la alizarina, una antraquinona usada desde hace más de 2000 años para teñir telas. Estos compuestos tienen afinidad por la zona calcárea y se fijan a ellas. Tomando en cuenta su estructura se puede clasificar en benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas y quinonas extendidas. Como criterio general, se acepta que las quinonas provenientes de los microorganismos son formadas a partir de ácido acético y aquella de los vegetales superiores lo son de ácido shikímico (Marcano y Hasegawa, 2002).

Terpenos: están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y su frecuencia y abundancia están íntimamente ligados a factores genéticos y climáticos. Los terpenos pueden encontrarse en la fuente vegetal solos o formando glicósidos. Estos son más frecuentes para Triterpenos. De manera general, los terpenos obedecen a lo que se conoce como regla del isopreno, es decir, la secuencia de los átomos que conforman un terpeno es tal que pueden localizarse varias unidades consecutivas de isopreno (Marcano y Hasegawa, 2002).

Alcaloides: son bases orgánicas que se aíslan principalmente de las plantas superiores y se han encontrado en más de 100 familias de Fanerogamas, en menor proporción en Criptogamas (licopodios), microorganismos (ergot) y animales (peces, sapos). Su actividad fisiológica, principalmente a nivel de sistema nervioso, fue el motor de las primeras investigaciones en productos naturales. Algunos se han manifestados como altamente tóxicos, y otros en dosis apropiadas, son drogas comúnmente usadas en medicina (Marcano y Hasegawa, 2002).

Fenoles: las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles, o fenilpropanoides y todas ellas se originan del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. En cuanto a la estructura química, comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina (Avalos y Pérez, 2009).

Saponinas: son un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial de esta, por lo tanto al sacudir sus soluciones, se forma una espuma abundante, y relativamente estable (Domínguez, 1979).

Rutas de Biosíntesis

Todos los compuestos orgánicos están constituidos por carbono e hidrógeno, a menudo contienen oxígeno y nitrógeno y menos frecuentemente azufre, fósforo y halógenos. La formación de los productos naturales comienza con la fotosíntesis que tiene lugar en plantas superiores, algas y algunas bacterias. Es un proceso endotérmico que requiere de la luz solar.

Aquellos organismos incapaces de absorber la luz obtienen su energía, de la degradación de carbohidratos. Se conocen en la actualidad tres grandes vías o rutas fundamentales que permiten la biosíntesis de la gran mayoría de los diferentes tipos de productos naturales conocidos como:

Ruta del ácido mevalónico: a partir de él se forman unidades de prenilo que tras uniones sucesivas conducen a isoprenoides (terpenoides, esteroides, carotenoides).

Ruta del ácido shikímico: a partir de él se forman los aminoácidos y desde ellos los otros compuestos aromáticos más complejos (fenilpropanoides, flavonoides, alcaloides).

Ruta del acetato-malonato (ruta policétida): a partir del malonato y acetato se forman los policétidos (acetogeninas) y ácidos grasos (Marcano y Hasegawa, 2002).

Extractos vegetales

Es un preparado concentrado de drogas, vegetales o animales, obtenido mediante la remoción de los constituyentes activos con disolventes adecuados (agua, etanol) y la posterior evaporación del disolvente hasta la concentración final deseada. Los extractos vegetales se clasifican, según su consistencia en fluidos, blandos y secos. Como su propio nombre lo indica, los fluidos son líquidos y corresponden, en general, a la droga seca en una proporción de 1:1 (1 mL de extracto correspondiente a 1 g de la droga seca). Los extractos blandos son semi-sólidos con contenido de agua alrededor de un 60 %, mientras los extractos secos son sólidos, polvos o granulados (Sharapin, 2000).

Métodos y técnicas de extracción

Percolación: también conocido como lixiviación, es uno de los procesos más difundidos pues se puede realizar con disolventes orgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener el material. Consiste en colocar el material fragmentado en un embudo o recipiente cónico, y hacer pasar un disolvente adecuado a través del mismo. No es apropiado para resinas o materiales que se hinchen dado que el disolvente no percolará. Se requiere agregar solvente constantemente (González, 2004).

Maceración: es una extracción que se realiza a temperatura ambiente. Consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente (agua o etanol, se prefiere el etanol puesto que a largos tiempos de extracción el agua puede propiciar la fermentación o la formación de mohos) hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no sea atacado con el disolvente; en éste se colocan el material vegetal con el disolvente y tapado se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto (González, 2004).

Digestión: en este proceso se agrega solvente caliente (con temperaturas no mayores a los 50 °C) al material vegetal molido colocado en un envase de vidrio de boca pequeña, la temperatura del solvente permite una mayor extracción de compuestos ya que la solubilidad de la mayoría de las especies aumenta con la temperatura (González, 2004).

Decocción: operación que consiste en hervir en agua sustancias con principios medicinales durante unos minutos para extraer los principios solubles que contiene (González, 2004).

Infusión: operación que consiste en poner a calentar un disolvente; una vez que éste se encuentra caliente, se verta sobre una especie vegetal para obtener sus principios medicinales, o bien, verter la especie vegetal sobre el disolvente, dejando reposar para su posterior uso. Se aplica generalmente a aquellas plantas cuyos principios activos podrían alterarse por ebullición (González, 2004).

Reflujo por calentamiento: es un proceso experimental que se utiliza para producir el calentamiento de reacciones, por lo que es propicio mantener el volumen de la reacción constante, la ventaja de esta técnica es que puede ser dejada por un periodo de tiempo largo sin necesidad de adicionar más solvente (González, 2004).

Tamizaje Fitoquímico

Es una de las etapas de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar al fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente en una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del tamizaje farmacológico (Sharapin, 2000).

Pruebas Químicas

Ensayo de Sudán III: permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos, respectivamente (Pereira, Vega, Almeida y Morales, 2009).

Ensayo de Mayer y el de Wagner: permiten identificar alcaloides, se procede de la forma descrita para el ensayo de Dragendorff, hasta obtener la solución ácida. Si al añadir 2 o 3 gotas de la solución reactiva de Mayer o Wagner respectivamente, se observa opalescencia, turbidez definida, precipitado coposo, entonces se considera positiva la presencia de este tipo de metabolito (Pereira, Vega, Almeida y Morales, 2009).

Ensayo de Baljet: permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas, aunque otros compuestos láctónicos pueden dar también positivo este ensayo. En estas condiciones se considera la presencia de esta familia de compuestos por la aparición de una coloración y un precipitado (Pereira, Vega, Almeida y Morales, 2009).

Ensayo de Borntrager: se emplea para la identificación de quinonas. Si la fase acuosa alcalina se colorea de rosado a rojo, el ensayo se considera positivo (Pereira, Vega, Almeida y Morales, 2009).

Ensayo de Liebermann-Burchard: la reacción se oxida en presencia de triterpenos y/o esteroides, debido a que ambos tipos de productos poseen un

núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6 (Pereira, Vega, Almeida y Morales, 2009).

Ensayo de Ninhidrina: para observar la presencia de aminoácidos libres o de aminas. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color violáceo (Pereira, Vega, Almeida y Morales, 2009).

Ensayo de Shinoda: permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal. El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos (Pereira, Vega, Almeida y Morales, 2009).

Ensayo de antocianidinas: permite identificar en los extractos la existencia en estas estructuras de secuencia C6-C3-C6 del grupo de los flavonoides. La aparición de un color rojo a marrón en la fase amílica es indicativa de un ensayo positivo. La presencia de estructuras tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa, que aumenta la densidad del agua donde se extrae, denota la presencia de mucílagos (Pereira, Vega, Almeida y Morales, 2009).

Ensayo de espuma: permite reconocer la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroidal como triterpénicas (Pereira, Vega, Almeida y Morales, 2009).

Ensayo de Fehling: permite reconocer la presencia de azúcares reductores, este se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece un precipitado rojo (Pereira, Vega, Almeida y Morales, 2009).

Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares muy pequeños y relativamente muy sencillos, cuyo material genético no está rodeado por una membrana nuclear especial, por ello se llaman *procariotas*. Diferenciándose tres formas fundamentales: esféricas (cocos), cilíndrica recta (bacilos) y cilíndrica curvada (espirilos). Por ello, se visualizan al microscopio óptico tras la tinción de Gram, que utiliza los siguientes colorantes: cristal violeta que corresponde al colorante primario, lugol que es el mordiente, ayuda a fijar el colorante, alcohol acetona que es el decolorante y la safranina (Pérez y Villaverdes, 2003).

Esta coloración se basa en la diferencia de la pared celular de las bacterias, clasificándolas en Gram positivas por presentar una pared celular constituida por peptidoglicanos y al decolorar con la mezcla de alcohol acetona la bacteria se deshidrata y cierra los poros de la pared, impidiendo la salida del complejo violeta genciana yodo, por lo tanto estas permanecen de color púrpura siendo los cocos. Y en bacterias Gram negativas por presentar un mayor contenido de lípidos en su pared, al agregar un decolorante cuya base es la acetona abre los poros de la membrana externa de la pared celular, permitiendo la salida del complejo violeta de genciana yodo quedando las bacterias incoloras y al adicionar safranina toman este colorante quedando de color rosado, siendo los bacilos (García, Fernández y Paredes, 1994).

Clasificación de las bacterias

Bacterias Gram positivas: la pared celular bacteriana es más gruesa y de estructura más sencilla, en comparación con las Gram negativas, están

constituidas por un 60 % aproximadamente de peptidoglicano y un porcentaje relativamente bajo de ácidos teicoico y teicuronicos (Barrios, 1996).

Bacterias Gram negativas: están formadas por una capa fina de peptidoglicano por un espacio periplásmico o zona intermedia, la membrana externa se basa en una doble capa de fosfolípidos y lipopolisacáridos. Poseen paredes celulares más complejas, desde el punto de vista estructural, la pared celular contiene dos capas situadas en el exterior de la membrana citoplasmática y por fuera de esta membrana se encuentra una delgada capa de peptidoglicano que representa de un 5 % al 10 % del peso de la pared celular (Barrios, 1996).

www.bdigital.ula.ve Microorganismos patógenos

Staphylococcus aureus: es un coco Gram positivo, se agrupan en racimos que son indicativos de que tienen la capacidad de dividirse en más de un plano. Su respiración es aeróbica y anaeróbica, y la mayoría de las cepas pueden fermentar el manitol de manera anaeróbica. Produce catalasa, coagulasa y un factor de agrupamiento extracelular (García, 2006).

Enterococcus faecalis: son cocos Gram positivos que no generan ninguna toxina potente, por lo que en general se considera que poseen una limitada capacidad patógena, su virulencia viene mediada por la capacidad de adherirse a las superficies del hospedero tapizando los tejidos intestinales y vaginales, por tener la facultad de secretar enzimas extracelulares con actividad hemolítica y proteolítica, que producen una lesión localizada del tejido (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

Klebsiella pneumoniae: son bacilos Gram negativos, quienes asimilan y fermentan la lactosa que se puede observar en el agar MacConkey donde las colonias son de color rosado. Es el responsable de causar neumonía, sepsis e infección del tracto urinario. Este microorganismo vive en el tracto respiratorio superior y gastrointestinal de los individuos sanos (Valdivia, 2020).

Escherichia coli: es un bacilo Gram negativo, forma parte de la microbiota del tracto gastrointestinal. Se transmite a los humanos, en la mayoría de los casos, a través de los alimentos. Puede causar infecciones en heridas, vías urinarias, aparato digestivo y meningitis (Valdivia, 2020).

Pseudomonas aeruginosa: bacilo Gram negativo, patógeno oportunista que con frecuencia causa infecciones intrahospitalarias, especialmente en pacientes con asistencia respiratoria mecánica, pacientes quemados y aquellos con neutropenia o debilidades crónicas (Bush y Vázquez, 2022).

Mecanismo de acción

Inhibidores de la síntesis de la pared celular: Los que inhiben la síntesis de la pared son los betalactámicos, glucopéptidos y la bacitracina. El anillo betalactámico es la clave del mecanismo de acción de estos fármacos, que están dirigidos contra la síntesis de la pared celular y la inhiben por unión a las enzimas que participan en ellas. Las enzimas esenciales para esta función se encuentran fijadas en la membrana celular y como grupo se denominan proteínas de unión a la penicilina (PBP), cuando los betalactámicos se unen a estas PBP, la síntesis de la pared celular se detiene. La muerte es resultado de la inestabilidad osmótica causada por la síntesis defectuosa de la pared celular, o bien de que la unión del

betalactámico a una PBP desencadena una serie de acontecimientos que llevan a la autólisis y a la muerte celular (Forbes y cols., 2009).

Posteriormente, encontramos a los glucopéptidos que conforman la otra clase importante de antibióticos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana; la vancomicina, que es el agente de esta clase usado con mayor frecuencia, su modo de acción es diferente de los antibióticos betalactámicos, este agente no se une a la PBP sino a los precursores de la síntesis de la pared celular. La unión interfiere en la capacidad de las enzimas PBP, como transpeptidasas y las transglucosilasas, de incorporar a los precursores en la pared celular en crecimiento. Con la detención de la síntesis de la pared celular también se detiene el crecimiento de la célula, que a menudo muere. La vancomicina por su tamaño suele ser ineficaz para las bacterias Gram negativas. De último encontramos la bacitracina la cual actúa en la síntesis y transporte de los precursores del peptidoglicano (Forbes y cols., 2009).

Inhibidores de la función de la membrana celular: La polimixinas (polimixina B y colistina) son los agentes que alteran la membrana celular. Esta alteración produce pérdida de macromoléculas y de iones esenciales y muerte de la bacteria. Debido a que su efectividad varía con la composición molecular de la membrana celular bacteriana, son más activas contra las Gram negativas, mientras que su actividad contra la Gram positivas tiende a ser escasa (Forbes y cols., 2009).

Inhibidores de la síntesis de proteína: Varias clases de antibióticos están dirigidas contra la síntesis de proteínas provocando alteraciones graves del metabolismo celular. Entre las clase de antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas figuran los aminoglucósidos, tetraciclinas y glicilglicinas

que se unen a los receptores de la subunidad ribosómica 30S, impidiendo que el ARNt forme complejos de iniciación. También se encuentran los antibióticos del grupo de los macrólidos-lincosamida-estreptograminas (MLS) los fenicoles y las oxazolidinonas que se unen a los receptores de la subunidad ribosómica 50S. Los fenicoles bloquean la formación de los enlaces peptídicos, seguidamente encontramos los antibióticos de los macrólidos-lincosamida-estreptograminas que bloquean el ARNt, los macrólidos no son efectivos contra la mayoría de las bacterias Gram negativas. Y por último se encuentran las oxazolidonas que interfiere en la formación del complejo de inicio 50S (Forbes y cols., 2009).

Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos: los agentes antimicrobianos primarios dirigidos contra el metabolismo del ADN son las fluoroquinolonas, el metronidazol y rifampicina. Las fluoroquinolonas, que a menudo se denominan quinolonas, se unen con el ADN girasas involucradas en la regulación del superenrollamiento del material genético bacteriano, un proceso esencial para su replicación y transcripción, por lo que interfieren en su actividad. Luego encontramos al metronidazol el cual incluye interacciones directas entre el fármaco activado y el ADN que provoca la ruptura de sus cadenas genéticas. Y finalmente la rifampicina se une a la enzima ARN polimerasa dependiente del ADN inhibiendo la síntesis de este, su actividad es menor para las bacterias Gram negativas, que la que muestra contra las bacterias Gram positivas (Forbes y cols., 2009).

Inhibidores de otros procesos metabólicos: los antimicrobianos que tienen como acción procesos diferentes a los expuestos son, las sulfonamidas, el trimetopim y la nitrofurantoína. En las sulfonamidas las bacterias usan la vía del ácido fólico para producir precursores importantes para la síntesis de ADN. La diana de las sulfonamidas es una de estas

enzimas, la dihidropteroato sintasa, a la que se unen para destruir la vía del ácido fólico. Posteriormente, encontramos el trimetropim que también actúa en la vía del ácido fólico, sin embargo, inhibe una enzima diferente, la dihidrofolato reductasa, con frecuencia se lo combina con una sulfonamida, para producir un agente antibacteriano que pueda atacar de manera simultánea dos dianas en la misma vía metabólica del ácido fólico. Por último de la nitrofurantoína no se conoce por completo su mecanismo de acción. Este agente puede tener varias dianas entre las proteínas bacterianas y en la síntesis de enzimas y también puede dañar el ADN en forma directa (Forbes y cols., 2009).

Mecanismos de resistencia

Los mecanismos de resistencias son estrategias que generan las bacterias para disminuir o inactivar la acción de los agentes antimicrobianos, ante el ataque de estos y así poder persistir dentro en el hospedero. Se puede dividir en dos grupos la resistencia intrínseca; es el resultado del estado normal genético, estructural o fisiológico de un microorganismo; y la resistencia adquirida, que es el resultado de la alteración de la fisiología y la estructura de las células a causa de cambios en la composición genética habitual de un microorganismo. Por lo tanto, la resistencia puede adquirirse por mutaciones genéticas exitosas, adquisición de genes de otros microorganismos por medio del mecanismo de transferencia genética y por una combinación de acontecimientos de mutación y de transferencia genética (Forbes y cols., 2009).

Tipos de mecanismo de resistencia

- La producción de enzimas.
- Bombas de expulsión o eflujo, las cuales expulsan el fármaco del espacio intracelular bacteriano.
- Cambios en la permeabilidad de la membrana, impidiendo que el fármaco alcance concentraciones intracelulares efectivas.
- Alteración del sitio de acción (Forbes y cols., 2009).

Método para determinar la actividad antibacteriana

Método de difusión en agar: el método utilizado con mayor frecuencia para evaluar la sensibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos es el denominado prueba de difusión del disco, también se le conoce con el nombre de “prueba de Kirby Bauer”, solo brinda información cualitativa o semicuantitativa sobre la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico determinado. Sin embargo, los resultados obtenidos son de gran valor clínico para iniciar, mantener o modificar un antibióticoterapia. Este ensayo ofrece muchas ventajas sobre otros métodos: simplicidad, bajo costo, la capacidad de probar cantidades enormes de microorganismos y agentes antimicrobianos, y la facilidad para interpretar los resultados proporcionados (Machado, 2019).

Método de dilución en caldo: es uno de los métodos de prueba de susceptibilidad antimicrobiana más básicos. El procedimiento implica preparar diluciones del agente antimicrobiano en un medio de crecimiento líquido, dispensado en tubos que contienen un volumen mínimo de 2 mL (macrodilución) o con volúmenes más pequeños usando una placa de

microtitulación de 96 pocillos (microdilución); luego se inocula con el microorganismo preparado en el mismo medio. La CMI es la concentración más baja de agente antimicrobiano que inhibe por completo el crecimiento del organismo en los tubos o los pocillos de microdilución detectados a simple vista (Machado, 2019).

Definición Operacional de Términos

Antimicrobiano

Se refiere a cualquier agente que interfiera con el crecimiento y la actividad de los microorganismos. Si se refiere a grupo de microorganismos determinados se emplean los términos *antibacteriano* o *antifúngico*, entre otros (Montoya, 2008).

Cepa bacteriana

Es aquella que se deriva de un único microorganismo aislado en cultivo, y la cepa de referencia de una especie representa un ejemplo invariable de la especie en cuestión y es parte de una colección de cultivos (Winn, Allen, Janda, Koneman, Procop y Woods, 2006).

Escala de Mc Farland

La utilidad de la escala es poder realizar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón, generalmente se suele usar el 0,5 Mc Farland, para esto se toma una muestra de nuestra bacteria y la inoculamos en un tubo con solución salina, en el momento en que se produzca un poco de turbidez ya estamos en el 0,5 (de forma visual) (Domínguez, 2006).

Extracción

El proceso de extracción consiste en incorporar las sustancias activas de una planta a un solvente, que generalmente suele ser agua o alcohol; se puede realizar en frío o en caliente, y el producto resultante puede ser una solución concentrada o espesa en función de la sustancia de origen, o espesarse por propio interés en base a la aplicación que se le vaya a dar (González, 2004).

Microorganismo

Son seres vivos microscópicos, como las bacterias, los virus, los hongos unicelulares (levaduras) y los protistas. Antes eran llamados microbios, desempeñan un papel esencial en los ciclos ecológicos, aunque algunas especies son patógenas (García, 2008).

Ornamentales

Todas las plantas ornamentales del comercio son utilizadas siempre al exterior en ajardinamientos, siendo cultivadas normalmente en plena tierra, y son plantas florales. Aunque con diferentes usos, e independientemente de factores socio-culturales, todas ellas basan su atractivo en cualidades estéticas (Sánchez, 2012).

Tóxico

Sustancia venenosa que puede ocasionar la muerte o graves trastornos en el organismo (es nocivo para la salud) (García, 2008).

Operacionalización de las Variables

Las variables son una característica, particularidad o medida que pueden sufrir cambios y que son objeto de análisis en una investigación. Por esta razón, pueden clasificarse en; dependiente e independiente (Pérez, 2009). De esta manera, la variable dependiente, es la actividad antibacteriana (Tabla 6) y la variable independiente, la composición química de los extractos de las partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. (Tabla 7).

www.bdigital.ula.ve

Tabla 6. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana de los extractos de *Jatropha gossypifolia* L.

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual
Actividad antibacteriana de los extractos de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Dependiente • Cualitativa • Cuantitativa	Es un compuesto que impide la formación o el desarrollo de los microorganismos mediante métodos que evalúan la actividad antibacteriana (Muñoz, 2016).
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Método de difusión en disco (Kirby-Bauer).	Bacterias Gram positivas: • <i>S. aureus</i> • <i>E. faecalis</i>. Bacterias Gram negativas: • <i>Escherichia coli</i> • <i>K. pneumoniae</i> • <i>P. aeruginosa</i>	Tamaño de los halos de inhibición de crecimiento: • Sensible • Resistente

Elaborado por: Morales y Hernández, 2023.

Tabla 7. Operacionalización de la variable independiente: Composición química de los extractos de *Jatropha gossypifolia* L.

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual
Composición química de los extractos de <i>Jatropha gossypifolia</i> L.	Independiente y cualitativa	Los productos naturales son sustancias derivadas del metabolismo secundario de los organismos vivos, las cuales generalmente participan directamente en los mecanismos de defensa y supervivencia. De ahí que también se les denomine “metabolitos secundarios” (Delgado, 2005).
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Tamizaje fitoquímico.	Pruebas químicas cualitativas: Alcaloides: reactivo de Wagner, Mayer y Dragendorff Saponinas: formación de espuma Taninos: prueba con gelatina- sal (NaCl) Flavonoides: prueba de Shinoda Fenoles: prueba de cloruro férrico Triterpenos: prueba de Liebermann-Burchard	- Alcaloides: precipitados. - Triterpenos: la coloración es rosa, rojo, magenta o violeta. - Saponinas: Formación de abundante espuma. - Fenoles: coloración azul a negro. -Taninos: Precipitado blanco. -Flavonoides: coloración naranja a rojo (Prashant, Bimlesh, Mandeep, Gurpreet, y Harleen, 2011).

Elaborado por: Morales y Hernández, 2023.

Hipótesis

Estudios anteriores han demostrado la presencia de metabolitos secundarios con actividad antibacteriana contra cepas Gram positivas y Gram negativas en diferentes especies del género *Jatropha*, es de esperar que la especie *J. gossypifolia* L. presente igual o mejor actividad antibacteriana frente a las cepas Gram positivas y Gram negativas.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

La investigación confirmatoria es la que el positivismo ha considerado como la única “científica”, y su propósito es verificar las hipótesis derivadas de las teorías; este tipo de investigación indaga acerca de las posibles relaciones entre eventos, a partir del control de una serie de variables extrañas (Hurtado, 2000).

Se confirmó la relación que existe entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos obtenidos de *Jatropha gossypifolia* L. en cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas, basándose en teorías ya existentes que puedan ser corroboradas por medio de un método experimental, y así poder aceptar o negar dicha relación.

Diseño de Investigación

El diseño de la investigación es de campo, de laboratorio, transversal y bivariable. De campo, ya que las partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. se recolectaron en Lagunillas, Municipio Sucre del Estado Mérida. De laboratorio, porque las partes aéreas recolectadas fueron llevadas al laboratorio del Instituto de Investigación “Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, para la obtención del extracto de la planta. Además, el diseño es transversal y bivariable, ya que al obtener la información se realizó en un solo momento del tiempo y con dos tipos de variables. Por lo que, el diseño es un arreglo restringente, mediante

el cual se pretende recoger la información necesaria para responder a la pregunta de investigación (Hurtado, 2000).

Población y Muestra

Unidad de Investigación

La población en estudio estuvo constituida por la especie vegetal de *Jatropha gossypifolia* L.

Selección y Tamaño Muestral

La muestra estuvo representada por aproximadamente 500 g de las partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L.

Sistemas de Variables

Considerando el marco teórico y los objetivos la variable dependiente es la actividad antibacteriana y la variable independiente es la composición química *Jatropha gossypifolia* L.

Procedimientos de Investigación

1. Recolección de la Muestra: La muestra de la planta *Jatropha gossypifolia* L., fue recolectada en Lagunillas, Municipio Sucre del Estado Mérida, tomándose aproximadamente 500 g de la misma.

2. Preparación del material vegetal: El secado se realizó mediante calor artificial utilizando una estufa a 40 °C, extendiendo las partes aéreas en

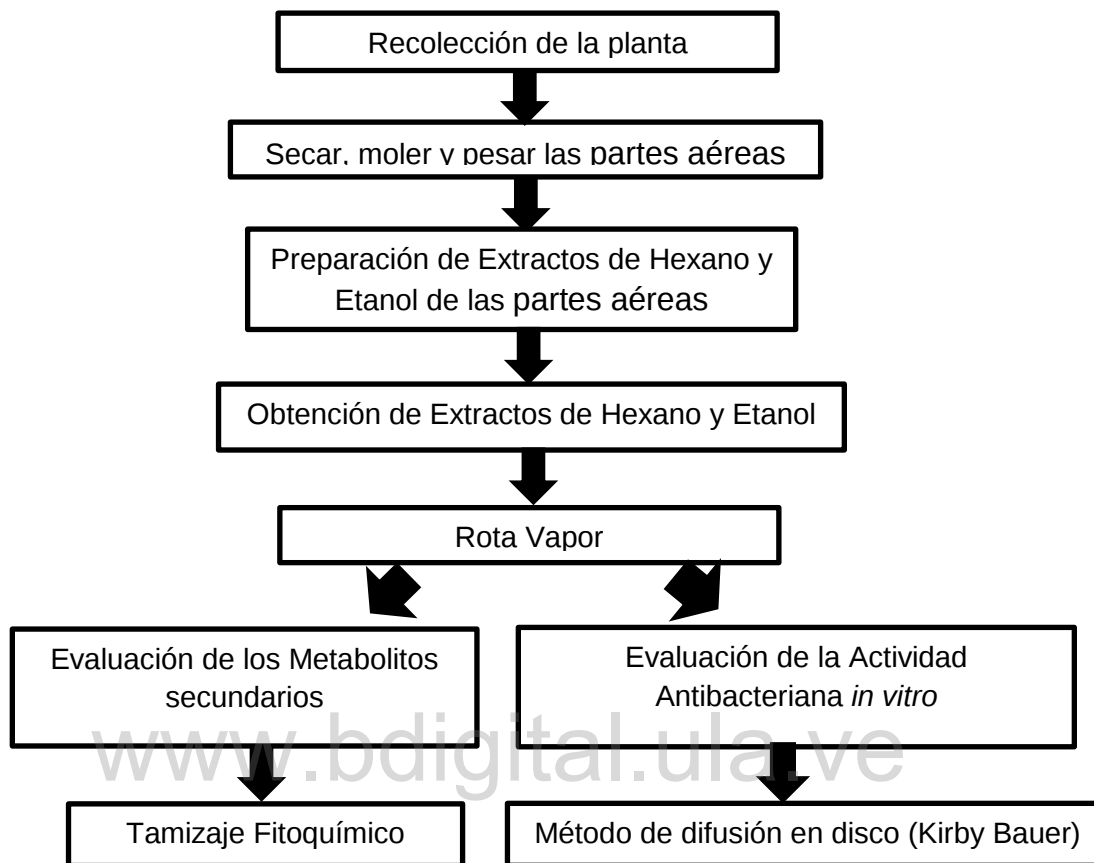
capas delgadas sobre bandejas metálicas y removiendo varias veces para evitar contaminaciones microbiológicas, hasta peso constante. Después del secado, el material se trituroó en un molino utilizando un tamiz de 1 mm.

3. Obtención de los extractos: En un balón redondo de 1 L se colocó un trozo de porcelana, luego se llenó con 70,6 g de la planta molida y pesada, después se le agregó 400 mL de hexano. Se colocó en una manta eléctrica a una temperatura de 50 °C, cuando alcanzó su temperatura de ebullición, ocurrió la técnica de reflujo en caliente. Durante la extracción, que se mantuvo por 1 hora, se observó que el disolvente fue recirculando completándose lo que llamamos ciclos de extracción (Pavia, Lampman y Kriz, 1978).

Seguidamente se dejó enfriar, luego se filtró utilizando para ello una fiola, un embudo y papel filtro, se concentró en un rotavapor a presión reducida y temperatura controlada no mayor a 45 °C hasta eliminar el solvente, dando lugar a un extracto de color verde oscuro intenso, característico de los extractos obtenidos a partir de las partes aéreas con una significativa extracción de pigmentos clorofílicos (Muñoz, 2016).

Posterior a esto, se colocó en un frasco ámbar el extracto de la planta y se llevó a la estufa por 40 °C para secar y obtener el extracto seco. Por último, se ejecutó el mismo procedimiento con etanol.

Dicho procedimiento se puede observar en el esquema 1.



Esquema 1. Procedimiento empleado para la obtención del extracto de hexano y etanol de la especie *Jatropha gossypifolia* L. Elaborado por: Morales y Hernández, 2023.

Procedimiento para determinar los metabolitos secundarios por medio del tamizaje fitoquímico.

Pruebas químicas de laboratorio: es conveniente efectuar una serie de pruebas rápidas que permitan decidir la estrategia de separación; la evaluación fitoquímica se repite entonces para los grupos principales de sustancias tanto en el vegetal fresco como en un “crudo” preparado por extracción del material vegetal molido. Este extracto crudo total, obtenido por

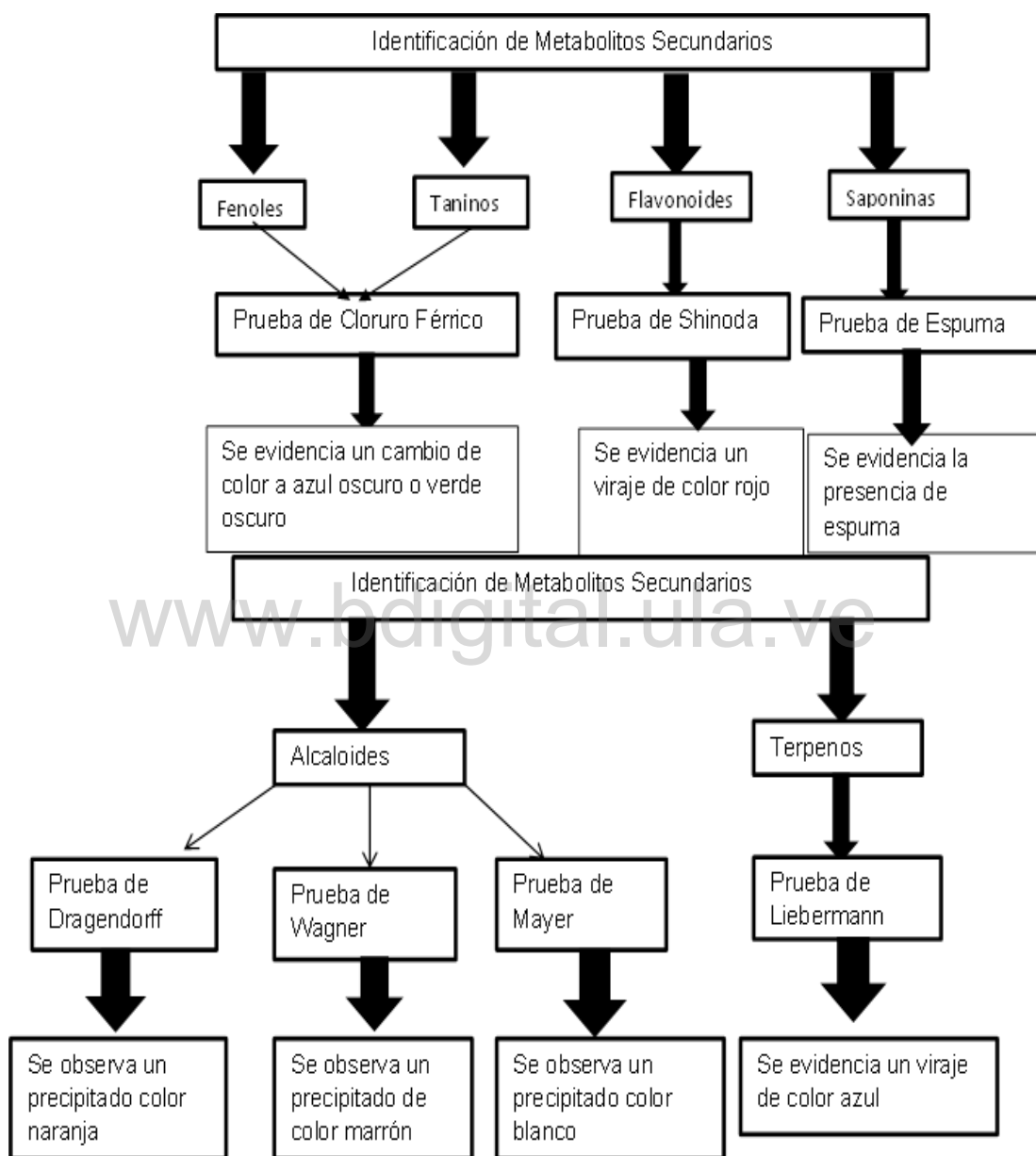
reflujo en caliente, que está libre de almidón, proteínas y de la mayoría de azúcares de bajo PM, se concentra y se evalúa para:

1. **Alcaloides:** el extracto proveniente del reflujo en caliente se retomó con 5 mL del HCl 10 %, se calentó en baño de María por 10 min, se precipitó con reactivo de Mayer y se sometió a reacciones de color con reactivo de Dragendorff y Wagner, lo que permitió detectar alcaloides. Se considera como positiva las pruebas que formen un precipitado de naranja a rojo (Wagner), precipitado de blanco a naranja (Mayer y Dragendorff).
2. **Saponinas:** se agitó una porción del extracto con agua caliente. La aparición de espuma es indicio de estos compuestos.
3. **Fenoles:** se disolvió la muestra (1-2 mg) en 1 mL del disolvente y se filtró antes de la reacción con cloruro férrico al 5 %. Si los fenoles están presentes producen una coloración marrón o verde oscura.
4. **Taninos:** se disolvió 100 mg del extracto, se filtró y se tomó una alícuota de 1 mL, la cual se trató con unas gotas de solución de gelatina al 1 %. La presencia de taninos se manifiesta con la precipitación del complejo proteína-tanino.
5. **Flavonoides:** el extracto se trató con un trozo de Mg y HCl concentrado. La formación de una coloración roja es indicativo de flavonoides.
6. **Esteroles y triterpenos:** se disolvió una porción del extracto con diclorometano, se mezcló con 0,5 mL de anhídrido acético y se

adicionó por la pared del tubo dos gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se observó los cambios de coloración, azul o verde para esteroides; coloración rosa, rojo, magenta o violeta para triterpenos.

7. **Cumarinas:** se disolvió la muestra en el disolvente, se agregaron unas gotas de hidróxido de amonio concentrado, luego se llevó el tubo a la lámpara de luz ultravioleta (UV) a 365 nm, debe observarse fluorescencia azul.
8. **Antraquinonas:** el extracto total llevado a sequedad, se dividió en 2 porciones. Se agregó 1 gota de hidróxido de amonio concentrado a una parte del extracto y 1 gota de ácido sulfúrico concentrado a otra porción de los extractos. Si la capa orgánica toma una coloración roja al alcalinizarla con hidróxido de amonio, hay antraquinonas presentes.
9. **Lactonas sesquiterpénicas:** en una cápsula de porcelana o tubo de ensayo se disolvió una porción del extracto en el disolvente, luego adicionar una gota de hidróxido de potasio en metanol. Calentar la mezcla a ebullición de 1 a 2 minutos, enfriar y llevar a pH de 1 con ácido clorhídrico, adicionar una gota de cloruro férrico 1 %. Las coloraciones roja, violeta o rosa indican que la prueba es positiva.
10. **Glicósidos cianogénicos:** al material se le añade gotas del disolvente y se calienta a 50-70 °C en tubo cerrado, los vapores se ponen en contacto con un papel de filtro impregnado en una solución al 1 % de ácido pícrico en carbonato de sodio al 10 %. Los compuestos cianogénicos se manifiestan como una mancha roja sobre el papel; el tiempo de reacción varia puede tomar hasta 2 horas (Marcano y Hasegawa, 2002).

Dicho procedimiento se puede observar en el esquema 2.



Esquema 2. Procedimiento para determinar los metabolitos secundarios por medio del tamizaje fitoquímico. Elaborado por: Morales y Hernández, 2023.

Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de *Jatropha gossypifolia* L. por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).

Se realizó por medio del método de difusión en agar con disco (Kirby-Bauer). Este método consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico se esparce radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición (Forbes y cols., 2009).

Los ensayos de sensibilidad han de estar convenientemente estandarizados y sujetos a procesos de control de calidad que aseguren no solo su reproductibilidad, sino también la confiabilidad de los resultados reportados (Forbes y cols., 2009). La misma se llevó a cabo 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 la Profesora Ysbelia Obregón y el Técnico Emilio Salazar.

Bacterias de Ensayo:

Para este estudio se seleccionaron cinco especies de bacterias: dos especies que pertenecen a las bacterias Gram positivas y tres pertenecientes a las bacterias Gram negativas, de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), que se obtuvieron del Cepario de

Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes a cargo de la Licenciada María Eugenia Nieves, las cuales son:

Cepas Gram positivas:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

Cepas Gram negativas:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Por otra parte, se tomó como controles positivos los discos de antibióticos comerciales eritromicina, ampicilina y piperacilina, con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar (Tabla 8).

Tabla 8. Halos de inhibición de los controles positivos usados como referencia en las cepas bacterianas

Cepas Bacterianas ATCC	Halos de Inhibición en mm					
	E (15 µg)		AMP (10 µg)		PIP (100 µg)	
	CLSI	CE	CLSI	CE	CLSI	CE
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	≥ 23	32	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	≥ 17	32	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	≥ 21	27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	≥ 22	27
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	-	-	-	-	≥ 21	27

Leyenda: Lectura de los halos de inhibición de los antibióticos: Eritromicina (**E**), Ampicilina (**AMP**), Piperacilina (**PIP**), Milímetros (**mm**), Lectura de los halos de inhibición recomendados por el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínicos (**CLSI**), Halos de Cepas ensayadas obtenidos (**CE**).
Elaborado por: Morales y Hernández, 2023

Preparación de las muestras:

El extracto de etanol de la especie *Jatropha gossypifolia* L. fue evaluado inicialmente en concentraciones de 10 mg/mL.

Preparación de placas:

Las placas de Petri se prepararon colocando aproximadamente 20 mL de Agar Müller Hinton (Merck ®) estéril, dejándose solidificar a temperatura ambiente.

Preparación de pre-inóculos bacterianos:

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

Preparación de los inóculos bacterianos:

Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas, se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa estéril, tomándose una pequeña cantidad de colonias para preparar una suspensión en solución salina fisiológica estéril (0,85 %) hasta obtener una turbidez visualmente comparable al patrón Mc Farland N° 0,5 ($1,6 \times 10^8$ UFC/mL) (Anon, 2003).

Inoculación de las placas:

Una vez preparadas las placas, se inocularon en forma homogénea en la superficie de cada una de ellas con cada uno de los inóculos bacterianos en solución de NaCl al 0,9% utilizando para ello un hisopo de algodón estéril.

Preparación de los discos:

Se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los cuales se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), durante toda una noche.

Colocación de los discos impregnados:

En las placas de Petri con Agar Müller Hinton previamente inoculados con cada cepa en estudio, se colocaron los discos impregnados con 10 microlitros (μL) a una concentración de 10 mg/mL de los extractos a ensayar, además de los discos de antibióticos comerciales como control positivo con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar y como control negativo discos impregnados con 10 μL del solvente dimetil sulfóxido (DMSO); usando una pinza metálica esterilizada.

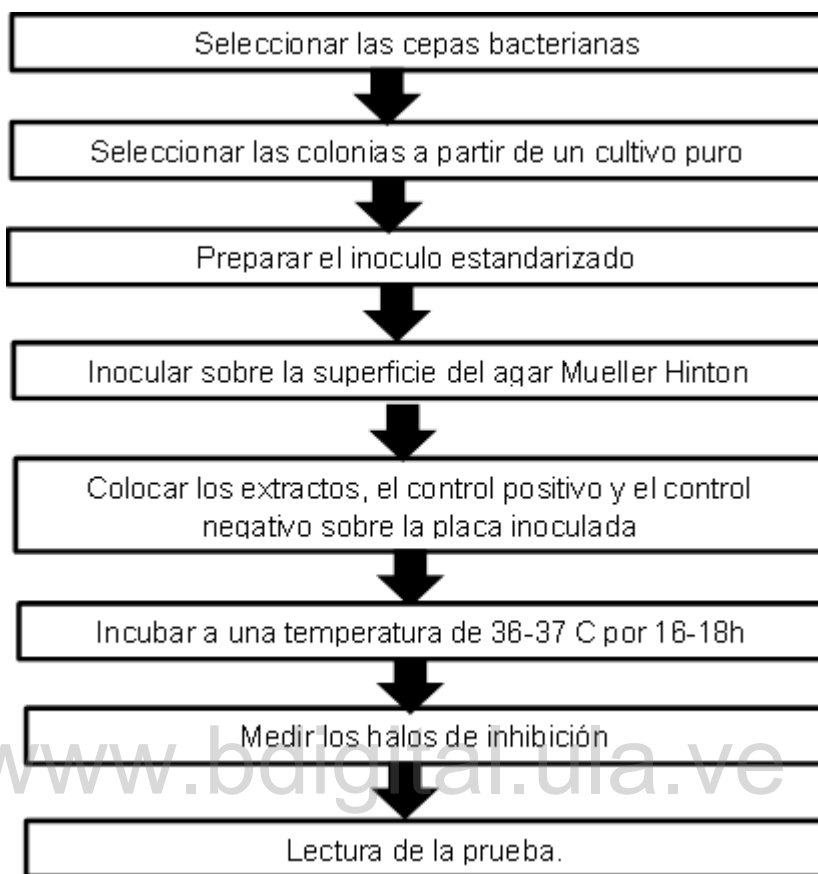
Pre-incubación e incubación de las placas:

Después de haber colocado los discos en las placas con Agar Müller Hinton previamente inoculadas, estas se dejaron en la nevera a temperatura de 4 °C aproximadamente durante 30 min, con la finalidad de que los discos impregnados con sus diferentes muestras difundieran a través del Agar, para luego llevar las placas a la estufa durante 24 horas a temperatura de 37 °C (incubación).

Lectura de las placas:

Luego de ser incubadas cada una de las placas, estas fueron revisadas para realizar la lectura de las mismas con una regla milimétrica. Donde se consideró un resultado positivo o sensible (presencia de actividad antibacteriana) cuando se observó un halo de inhibición alrededor del disco, y se tomó como resultado negativo o resistente (sin actividad antibacteriana) la ausencia de dicho halo (Anon, 2003).

Dicho procedimiento se puede observar en el esquema 3.



Esquema 3. Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de *Jatropha gossypifolia* L. por el método de difusión en disco (Kirby Bauer). Elaborado por: Morales y Hernández, 2023.

Diseño de Análisis

Los datos recolectados en un proceso de investigación pueden ser analizados a través de dos enfoques, cualitativo y cuantitativo. En este trabajo los datos fueron estudiados a través de un proceso cuantitativo, el cual consiste en analizar y explicar los textos, desestimando el contenido interior, la coherencia interna y los vínculos que pueden existir entre las ideas (Pérez, 2009).

Enfoque cuantitativo: Mediante la preparación de extractos de hexano y etanol de la especie *Jatropha gossypifolia* L., se probó la efectividad biológica antibacteriana, utilizando la susceptibilidad de cepas bacterianas frente a la acción de los componentes químicos.

Enfoque cualitativo: Por medio de la composición química de los extractos de *Jatropha gossypifolia* L. siendo ésta evaluada a través del tamizaje fitoquímico.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Ensayo fitoquímico preliminar:

El estudio de los metabolitos secundarios presentes en el extracto de hexano y de etanol de *Jatropha gossypifolia* L., se ejecutó por medio del tamizaje fitoquímico, utilizando diferentes técnicas. Se determinó en el extracto de hexano y etanol compuestos orgánicos que de acuerdo a su solubilidad podían ser obtenidos en estos solvente, la extracción fue realizada por reflujo en caliente, mientras que el tamizaje fitoquímico se obtuvo mediante los siguientes ensayos: Wagner, Mayer y Dragendorff (alcaloides), hidróxido de sodio (flavonoides), prueba de Shinoda (flavonoides), prueba de Liebermann-Burchard (triterpenos y esteroides), cloruro férrico (compuestos fenólicos), reacción con hidróxido de amonio (cumarinas), bicarbonato de sodio, llamada prueba de espuma (saponinas), prueba de gelatina (taninos), reacción con hidróxido de amonio (antraquinonas), lactonas sesquiterpénicas, quinonas en cápsula y finalmente glucósidos cardiotónicos.

Según los resultados del tamizaje fitoquímico realizado a la especie en estudio (tabla 9), se puede evidenciar que los extractos de hexano y etanol mostraron metabolitos secundarios como triterpenos y esteroides (ver tabla 10); y se identificaron únicamente en el extracto de etanol glucósidos cardiotónicos, compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides (ver tabla 10).

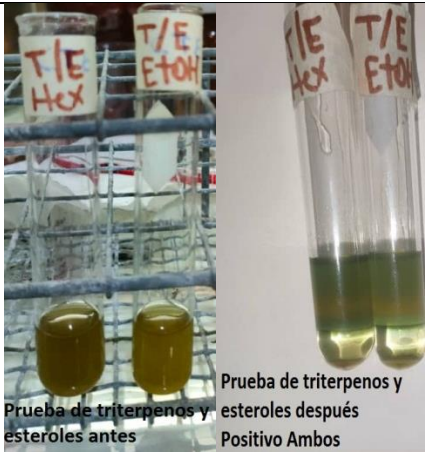
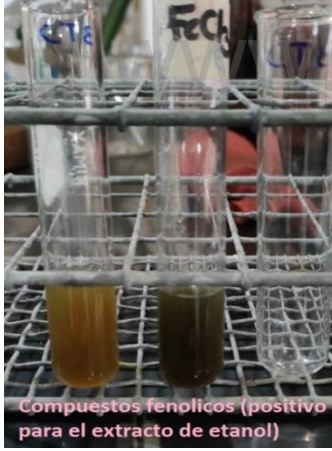
Tabla 9. Resultados del ensayo fitoquímico de los extractos de las partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L.

Metabolitos y Pruebas químicas	Extracto Hexano	Extracto Etanol
Alcaloides		
Dragendorff	-	+
Wagner	-	+
Mayer	-	+
Triterpenos/Esteroles		
Lieberman-Burchart	+	+
Compuestos fenólicos		
FeCl ₃	ND	+
Saponinas		
Espuma	ND	-
Taninos		
Gelatina	ND	-
Flavonoides		
Shinoda	-	+
NaOH al 10%	-	+
Cumarinas		
NH ₄ OH concentrado	ND	-
Antraquinonas		
NH ₄ OH concentrado	ND	-
Quinonas cápsula		
H ₂ SO ₄ concentrado	-	-
Lactonas sesquiterpenicas	-	-
Glucósidos cardiotónicos	ND	+

Leyenda: Positivo (+); Negativo (-); No determinado (ND).

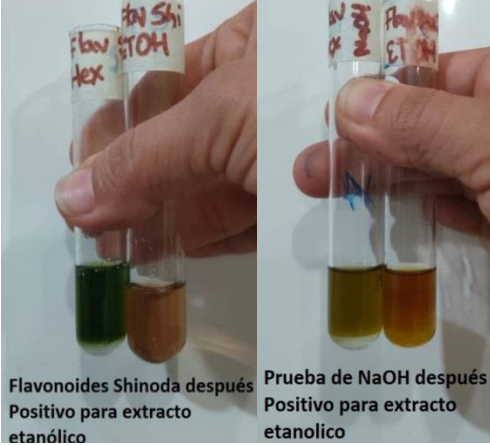
Elaborado por: Morales y Hernández, 2023.

Tabla 10. Reporte ilustrado de los resultados del tamizaje fitoquímico de *Jatropha gossypifolia* L.

Prueba	Reporte
 Prueba de triterpenos y esteróles después esteróles antes Positivo Ambos	Prueba: Liebermann – Burchard Metabolito determinado: Triterpenos y esteroles. Reporte: Triterpenos y esteroles positivo para el extracto de hexano y etanol.
 Compuestos fenolicos (positivo para el extracto de etanol)	Prueba: Tricloruro férrico (FeCl₃) Metabolito determinado: Compuestos fenólicos. Reporte: Compuestos fenólicos positivo para el extracto de etanol.

Elaborado por: Morales y Hernández, 2023.

Tabla 10. Reporte ilustrado de los resultados del tamizaje fitoquímico de *Jatropha gossypifolia* L. (Continuación)

Prueba	Reporte
 Flavonoides Shinoda después Positivo para extracto etanólico Prueba de NaOH después Positivo para extracto etanólico	Prueba: Shinoda y NaOH Metabolito determinado: Flavonoides Reporte: Flavonoides positivo para el extracto de etanol
	Prueba: Reactivos de Dragendorff, Wagner y Mayer. Metabolito determinado: Alcaloides Reporte: Alcaloides positivo para el extracto de etanol
 Ensayo de Saponinas Taninos negativo Quinonas en cápsula Cumarinas después negativo	Reporte: Los ensayos para antraquinonas, quinonas en cápsula, cumarinas, saponinas, taninos y lactonas sesquiterpenicas resultaron negativos, para los extractos de hexano y etanol

Elaborado por: Morales y Hernández, 2023.

Evaluación de la Actividad Antibacteriana:

La actividad antibacteriana del extracto de etanol de la especie *Jatropha gossypifolia* L., se estableció en concentraciones madres de 10 mg/mL, aplicando el método de Kirby Bauer en agar con disco.

Los microorganismos seleccionados son las siguientes bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*., de la misma forma también se estudió las bacterias Gram negativas, como lo son: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).

El estudio se consideró como positivo, ya que no hubo crecimiento bacteriano alrededor del disco, en cada caso se procedió a medir el diámetro de los halos (Tabla 11). Por lo tanto los resultados fueron, para las cepas bacterianas Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC (25923) donde se determinó un diámetro de inhibición equivalente a 8 mm, en el experimento realizado, de igual forma para la cepa *Enterococcus faecalis* ATCC (29212), la cual obtuvo un diámetro de 9 mm frente al extracto de etanol de dicha especie en estudio (Tabla 12).

En tal sentido, se obtuvo para las cepas bacterianas Gram negativas, *Klebsiella pneumoniae* ATCC (23357) un diámetro de 7 mm y la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853) obtuvo un diámetro de inhibición equivalente a 7 mm, mientras que *Escherichia coli* ATCC (25922) no presentó inhibición (los resultados se muestran en las imágenes de la Tabla 12).

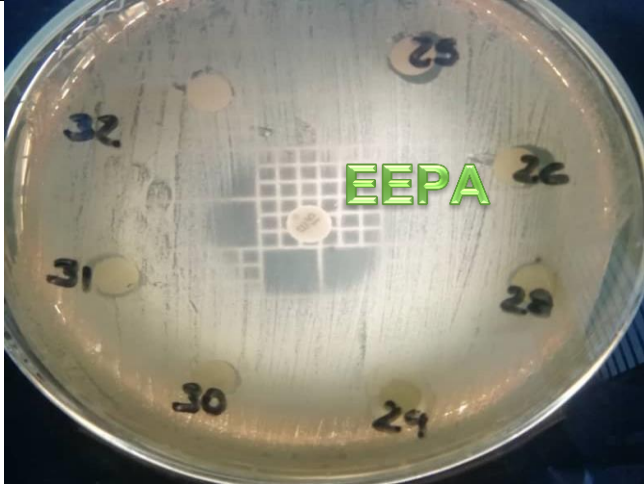
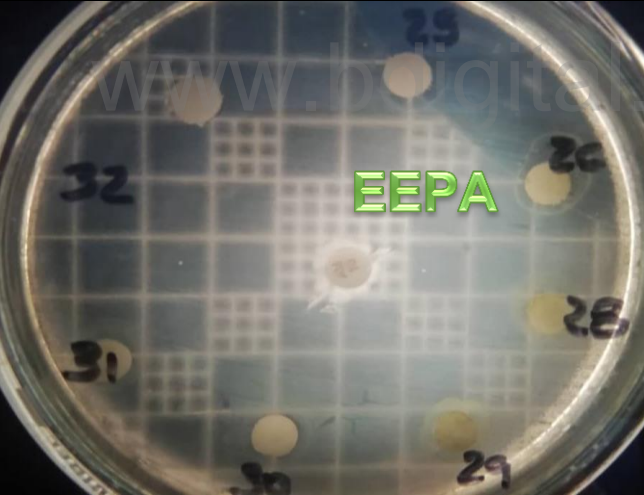
Tabla 11. Resultados obtenidos en la determinación de la Actividad Antibacteriana del extracto etanólico de *Jatropha gossypifolia* L.

Muestras ensayadas [] 10 mg/mL	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
Extracto de etanol	8 mm	9 mm	7mm	ND	7 mm
Controles Positivos					
Eritromicina (E)	32 mm	-	-	-	-
Ampicilina (AMP)	-	32 mm	-	-	-
Piperacilina (PIP)	-	-	27 mm	27 mm	27 mm

Leyenda: mm: Milímetros, ND: no determinado.

Elaborado por: Morales y Hernández, 2023.

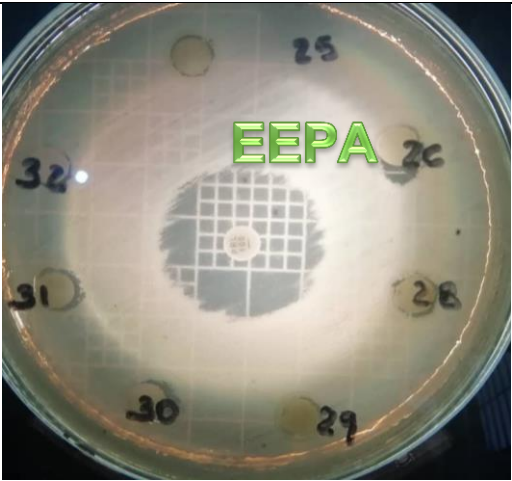
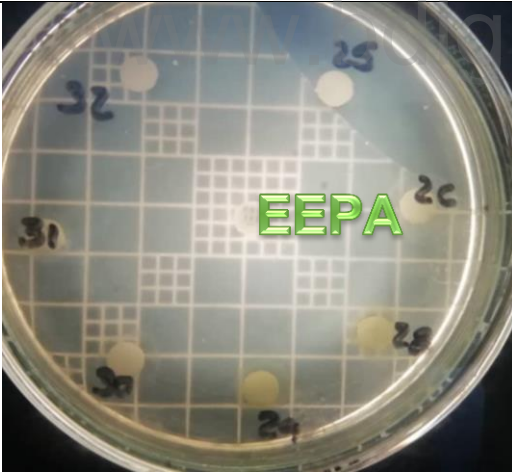
Tabla 12. Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de *Jatropha gossypifolia* L.

Prueba	Resultado
	Prueba: Kirby-Bauer Especie en estudio: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. Reporte: EEPA: sensible
	Prueba: Kirby-Bauer Especie en estudio: <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212. Reporte: EEPA: sensible

Leyenda: EEPA: Extracto de Etanol de las Partes Aéreas.

Elaborado por: Morales y Hernández, 2023.

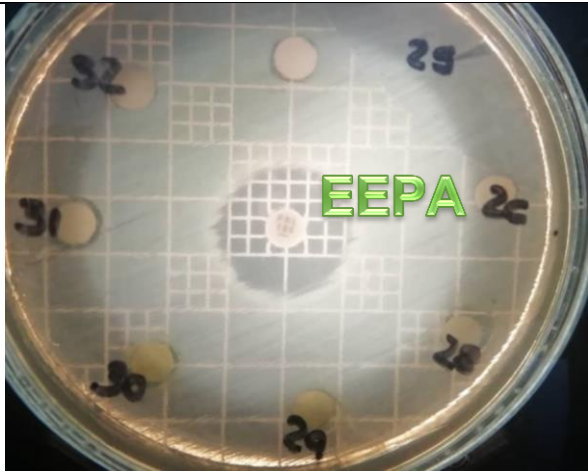
Tabla 12. Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de *Jatropha gossypifolia* L. (Continuación)

Prueba	Resultado
	Prueba: Kirby-Bauer Especie en estudio: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357. Reporte: EEPA: sensible
	Prueba: Kirby-Bauer Especie en estudio: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. Reporte: No hubo crecimiento bacteriano, por lo tanto no se determinó su actividad antibacteriana.

Leyenda: EEPA: Extracto de Etanol de las Partes Aéreas.

Elaborado por: Morales y Hernández, 2023.

Tabla 12. Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de *Jatropha gossypifolia* L. (Continuación)

Prueba	Resultado
	Prueba: Kirby-Bauer Especie en estudio: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853. Reporte: EEPA: sensible

Leyenda: EEPA: Extracto de Etanol de las Partes Aéreas.

Elaborado por: Morales y Hernández, 2023.

Discusiones

En el presente estudio realizado a los extractos de hexano y etanol de las partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L., se identificaron a través de pruebas químicas cualitativas la presencia de algunos metabolitos secundarios como: triterpenos y esteroides para ambos extractos; y para el extracto de etanol se evidenciaron glucósidos cardiotónicos, compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides. Sin embargo, el extracto etanólico demostró tener efecto inhibitorio frente a *Staphylococcus aureus* (8 mm), *Enterococcus faecalis* (9 mm), *Klebsiella pneumoniae* (7 mm) y *Pseudomonas aeruginosa* (7 mm). Por esta razón, al comparar los resultados obtenidos con las investigaciones anteriores de los extractos de la especie

en estudio, recolectadas en diferentes países; se demostró tener una gran similitud.

En el 2019 Contreras, Chávez y Gallardo, realizaron estudios del látex del tallo de *Jatropha curcas* “Piñón” el cual fue muy soluble en agua destilada, etanol y metanol; además, contiene en su mayoría metabolitos secundarios polares, según el análisis fitoquímico el látex presentó flavonoides, taninos, compuestos fenólicos, alcaloides y esteroides; así mismo, evaluaron el efecto antibacteriano usando el método de Kirby – Bauer, en una cepa pura de *S. aureus* ATCC 25923, donde el látex de *J. curcas* fue preparado a diferentes concentraciones con agua destilada (10 %, 20 %, 30 %, 40 % y 100 %), presentando un halo de inhibición de 8,8 mm a una concentración del 40 %, por lo que presentó una actividad antibacteriana ligera. Este ensayo refleja similitud con el trabajo de investigación llevado a cabo, ya que, se encontraron también flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides y esteroides, pero difiere de esta porque no se encontraron taninos; mientras que, la actividad antibacteriana también concuerda con el resultado de esta investigación, al poseer efecto inhibitorio frente a *S. aureus*.

Adicionalmente, Pabón y Hernández, en el 2012, se refieren al látex de *J. curcas* como semilíquido de gran densidad y elasticidad, que contiene compuestos como jatrofina, jatrofano y curcaina, por lo que se ha observado actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *E. coli*.

Además se han realizado investigaciones más a fondo sobre *Jatropha gossypifolia* L. por Gomes, Ferreira, Caetano, Barbosa, Sales, y Bastos, (2018). Donde los extractos los obtuvieron por maceración en etanol, lo concentraron en rotavapor y secaron en desecador al vacío. En el análisis realizaron pruebas de prospección fitoquímica cualitativas; detectando

metabolitos como: taninos, esteroides, flavonoides, flavonas, xantonas. Luego realizaron el fraccionamiento del extracto mediante una columna de filtración al vacío, utilizando como fase estacionaria, gel de sílice y, como fase móvil, hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol; generando en las fracciones de cloroformo y hexano del tallo la presencia de taninos, flavonoides y esteroides, mientras que en la fracción metanólica, la presencia de flavonoides y esteroides. En hexano, solo se encontraron flavonas. Para las fracciones metanólica y de acetato de etilo se identificaron flavonoides, de igual manera, en la fracción de acetato de etilo se evidenció las flavonas. Continuaron con, la microdilución en caldo para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) la ejecutaron en una asociación de 2 mg de la muestra en cuestión, donde el extracto etanólico de las hojas inhibió a los microorganismos *S. aureus* a una concentración de 500 mg/mL, *S. epidermidis* a 250 mg/mL y *P. aeruginosa* a una concentración de 500 mg/mL. Mientras que, el tallo fue resistente a los microorganismos *S. aureus* y *P. aeruginosa*, a una concentración de 1000 mg/mL, y la concentración de 500 mg/mL inhibió el crecimiento de *S. epidermidis*. Cabe resaltar que, la actividad antibacteriana de la anterior investigación concuerda con el resultado de este trabajo, ya que el extracto etanólico demostró tener efecto inhibitorio también frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*, aunque se usó diferente método la CMI; y en cuanto a la obtención de los metabolitos secundarios solo coincide con la presencia de flavonoides y esteroides, pero ellos lograron afianzar la presencia de los metabolitos por el fraccionamiento del extracto mediante una columna de filtración al vacío.

La autora Machado (2019), le atribuye a los metabolitos secundarios de *J. gossypifolia* L. como a los flavonoides, la responsabilidad del efecto de inhibición de crecimiento bacteriano por la ruptura del ADN en un sitio determinado; por bloqueo del complejo aminoacil transferasa, por

intercalación entre bases de ADN alterando la síntesis de ácido nucleico o por la formación de dímeros de timina. Así mismo, las flavonas forman complejos con las proteínas solubles, extracelulares y con las células de la pared bacteriana. Y los taninos atacan a los microorganismos aglutinando las proteínas de su superficie.

Continuando con el mismo orden de ideas, en el 2008 Kaya, Yigit y Benli, exponen que la presencia de esteroides y/o triterpenos como metabolitos secundarios de la planta en estudio, alteran la membrana celular bacteriana mediante diferentes vías, ya sea permitiendo la entrada de iones, generando inestabilidad en la membrana plasmática o alterando el ordenamiento de la bicapa lipídica.

Por otra parte, un elemento importante en la valoración de los extractos es la naturaleza química de los componentes, pues esta información puede orientar hacia la posible acción farmacológica que puedan ejercer y a los posibles metabolitos responsables de tales efectos. En correspondencia a este criterio, Rivero (2014) realizó la evaluación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Jatropha gossypifolia* L., donde detectó los constituyentes químicos de la planta a través de ensayos cualitativos que permitieron identificar saponinas, alcaloides, fenoles, flavonoides, triterpenos, aminoácidos libres, cumarinas, azúcares reductores y quinonas., adicionalmente determinó la prueba de sensibilidad antibacteriana mediante el método dilución en Agar, donde la CMI del extracto hidroalcohólico de las hojas de *J. gossypifolia* L. frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mostró tener una inhibición de 2 mg/mL, tanto en el experimento inicial como en la réplica del mismo y para el antibacteriano de referencia (Sulfato de Gentamicina) la concentración mínima inhibitoria fue de 1 mg/mL. Estos resultados se encontraron en correspondencia con los informes fitoquímicos

y antibacterianos de la especie botánica, siendo similares a los obtenidos en este trabajo de investigación, solo exceptuando la presencia de saponinas, aminoácidos libres, cumarinas, azúcares reductores y quinonas.

Muñoz, en 2016, explica que *Jatropha gossypifolia* L., es ampliamente utilizada en la medicina popular tradicional por sus propiedades curativas y ofrece una enorme reserva de fitoquímicos con acción analgésica, en este sentido, se desarrolló la evaluación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de la planta que incluyó el tamizaje fitoquímico y la cuantificación del contenido de fenoles y flavonoides totales mostrando la presencia de saponinas, alcaloides, fenoles, flavonoides, aminoácidos libres, cumarinas, azúcares reductores y quinonas como principales metabolitos secundarios. El contenido de fenoles y flavonoides totales del extracto hidroalcohólico de las hojas de *J. gossypifolia* L. son superiores a los reportados en la bibliografía para otras especies de su misma familia, donde el contenido total de compuestos fenólicos es $140,41 \pm 1,27$ ($\mu\text{gEAG/mgES}$) que fue calculado empleando la curva de calibración del ácido gálico como patrón, los resultados se expresaron como microgramos equivalentes de ácido gálico por miligramos de extracto seco; y el contenido total de flavonoides es $27,23 \pm 0,16$ ($\mu\text{gEQ/mgES}$) para el extracto que fue calculado empleando la curva de calibración de la Quercetina. De esta manera, exponemos que en dicho trabajo cuantificaron fenoles y flavonoides hecho que en nuestro trabajo de investigación no se logró hacer; mientras que, los resultados obtenidos cualitativamente a través del tamizaje fitoquímico si guardaron relación al presentar alcaloides, fenoles y flavonoides.

Tenemos que dentro del género *Jatropha*, Pérez y cols., (2020)., describen que las raíces *J. dioica* contienen tres diterpenos con actividad biológica como., riolozatriona, citlalitriona y jatrophona, además de algunos

compuestos como flavonoides y polifenoles, que revelan actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* y *S. typhi*.

En el estudio realizado por Axini (2012), expone que *Jatropha dioica* es una especie ampliamente conocida en México y utilizada tradicionalmente para el tratamiento de padecimientos asociados a microorganismos. En este estudio se evaluó la actividad antibacteriana de extractos metanólicos y de diclorometano de rizomas y tallos de la planta. Utilizó el método de dilución seriada en agar contra microorganismos con importancia médica, como; *Salmonella typhi* (100 mg/mL), *Staphylococcus aureus* (100 mg/mL), determinando su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Los valores de CMI muestran que los extractos de diclorometano y metanol de *J. dioica* presentan actividad antibacteriana importante, y que los rizomas son más activos que los tallos. Cabe resaltar que, en ambos ensayos se encontró correspondencia al presentar semejanza en la actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, a pesar de que el método, los extractos y la especie botánica son distintos.

En 2019 en Perú, Rimarachin y Vales realizaron un trabajo de investigación, sobre el extracto etanólico de la raíz de *Jatropha curcas* (piñón blanco), el cual mostró una actividad antibacteriana resistente e intermedia, para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, y *Salmonella* sp. respectivamente, donde se observa la inhibición del *Staphylococcus aureus* frente al de extracto etanólico en concentraciones de 600 mg ($10,0 \pm 0,0$ mm) y 300 mg ($9,0 \pm 0,6$ mm de halo), mientras que la inhibición de *Salmonella* sp. en concentraciones de 600 mg ($13,0 \pm 0,0$ mm) y 300 mg ($9,0 \pm 0,5$ mm de halo). Por otro lado, nuestra actividad antibacteriana si arrojó cierta

sensibilidad en el extracto etanólico contra *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 8mm en el método de difusión en disco (Kirby Bauer).

Sin embargo, Pabón, Vanegas, Rendón, Santos, y Hernández (2013), han estudiado que tanto las hojas como las raíces de *J. curcas* posee actividad antibacteriana debido a la presencia de compuestos como fenoles (ácido gálico y pirogalol), saponinas y flavonoides, que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas como *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *E. coli.*, lo cual puede indicar que los compuestos como fenoles, dañan la pared celular y desnaturalizan las proteínas.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONSLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. En el estudio del tamizaje fitoquímico se evidencio triterpenos y esteroles que son los principales metabolitos secundarios identificados en el extracto de hexano de las partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L.
2. Por otra parte, en el ensayo fitoquímico del extracto de etanol de *J. gossypifolia* L. se identificaron triterpenos, esteroles, glucósidos cardiotónicos, flavonoides y alcaloides.
3. La presencia de estos compuestos químicos en los extractos de las partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. se relacionan con algunas de las acciones atribuidas de la planta como su efecto diurético, procoagulante, analgésico, antiinflamatorio y antibacteriano.
4. El análisis de la actividad antibacteriana mediante el procedimiento de difusión en agar con discos fue positivo pero poco significativo frente a las cepas bacterianas, Gram negativas y Gram positivas.
5. El extracto etanólico de *J. gossypifolia* L., se estableció en concentraciones madres de 10 mg/mL y presentó halos de inhibición contra las cepas estudiadas: *Staphylococcus aureus* (8 mm), *Enterococcus faecalis* (9 mm), *Klebsiella pneumoniae* (7mm) y *Pseudomonas aeruginosa* (7 mm) *in vitro*. Sin embargo, la cepa de *E. coli*, no presentó crecimiento.

Recomendaciones

1. Utilizar técnicas cromatográficas que permitan separar y aislar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos de *Jatropha gossypifolia* L.
2. Continuar con el estudio de la actividad antibacteriana de diferentes extractos de *Jatropha gossypifolia* L. en otras cepas bacterianas.
3. Realizar estudios frente a otro tipo de actividad biológica como antifúngica o antioxidante.
4. Incentivar la investigación de especies vegetales como el género *Jatropha*, en busca de alternativas a la medicina científica y dar un valor agregado a las plantas medicinales. Ya que, la información que se destaca aquí, es un aporte para el posible desarrollo de nuevos agentes terapéuticos.

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Anon, A. (2003). Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9, (1).
- Avalos, A. y Pérez, E. (2009). *Metabolismo secundario de las plantas. Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Biología*. (Tesis de pregrado). Universidad Complutense de Madrid. España.
- Axini, G. (2012). *Estudio químico biodirigido y evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de Jatropha dioica Sessé ex Cerv.* (Tesis de pregrado). Universidad Autónoma de Queretano, México.
- Barrios, A. (1996). *Microbiología General*. Universidad de Los Andes Facultad de Farmacia, Mérida, Venezuela, 1, 60-61. ISBN 980-221-788-3
- Bastos, N., Rodríguez, C., Silva, R., Feitosa, D., Melo, H., Araujo, L., y Guedes da Silva, J. (2020). Análisis fitoquímico, actividad antibacteriana y acción modificadora de antibióticos de *Jatropha mollissima*. *Anales de Biología*, 42(10), 85-94.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica. Plantas medicinales*. Segunda Edición. Acribia, Zaragoza.
- Bush, L., y Vazquez, M. (2022). *Manual MSD. Infecciones por Pseudomonas y patógenos relacionados*. Editorial Board and Reviewers, EE.UU.
- Cabrera, S. (2017). *Aislamiento e identificación de metabolitos secundarios a partir de Jatropha nudicaulis con posible actividad antiparasitaria*. (Tesis de pregrado). Universidad técnica particular de Loja, Ecuador.
- Castillo, A., Pascual, Y., Nune, L., Lorente, C., y Águila, F. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas y semillas de

- Morinda citrifolia* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(4), 2-3.
- Contreras, M., Chávez, J., y Gallardo, G. (2019). Evaluación del efecto antibacteriano del látex de *Jatropha curcas* “piñón” frente a *Staphylococcus aureus*. *Duazary*, 16(1), 105 – 114.
- Corzo, D. (2012). *Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico*. (Tesis de pregrado). Jardín botánico José Celestino Mutis, Colombia.
- Delgado, G. (2005). *Productos Naturales Orgánicos* (tesis de pregrado). Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma, México.
- Díaz, J. (2010). *Plantas toxicas de importancia en salud y producción animal en Colombia*. Primera Edición, Editorial Universidad Nacional de Colombia.
- Domínguez, S. (2006). El Laboratorio de Microbiología. *elsevier*, 19(1), 1-2.
- Domínguez, X. (1979). *Métodos de investigación fitoquímica*. Primera Edición, Editorial Limusa, S.A.
- Félix, J., Brandt, R., Silva, A., Zucolotto, S., y Fernandes, M. (2014). *Jatropha gossypifolia* L. (Euphorbiaceae): A Review of Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology, and Toxicology of This Medicinal Plant. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014 (369204), 3-14.
- Forbes, B., Sahm, D., y Weissfeld, A. (2009). *Diagnostico microbiológico*. 12^a edición, Editorial Medica panamericana.
- García, L (2006). *Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de Staphylococcus aureus con resistencia múltiple* (tesis de pregrado). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México.
- García, P., Fernández, M., y Paredes, F. (1994). *Microbiología Clínica Práctica*. Segunda Edición, Editorial Servicio de publicaciones de la Universidad de Cadiz.

- García, T. (2008). *El Pequeño Larousse Ilustrado*. 13° edición, Editorial Larousse, México.
- Gomes, P., Ferreira, R., Caetano, J., Barbosa, W., Sales, R., y Bastos, M. (2018). Actividad citotóxica, antimicrobiana y cicatrizante de extractos de *J. gossypifolia* L. *Revista de enfermagem*, 12(2), 465-74
- González, A. (2004). *Obtención de Aceites Esenciales y Extractos Etanólicos de Plantas del Amazonas* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, Colombia.
- Granda, E. (1997). *Conozca las plantas medicinales*. La Habana: Editorial Científico Técnica.
- Gubitz, G., Mittelbach, M., y Trabi, M. (1999). Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. *Bioresource Technol*, 67(1), 37-40.
- Hurtado, J. (2000). *Metodología de la investigación holística*. Tercera edición, Fundación Sypal, Caracas, Venezuela.
- Jackson, L., Machado, L., y Hamilton, M. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta médica*, 8(1), 13-17.
- Jain, S., Choudhary, G., y Jain, D. (2012). Evaluación farmacológica de la actividad contra la fertilidad del extracto etanólico de la hoja de *Jatropha gossypifolia* en ratones albinos hembra. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3), 1671–1672.
- Kaya, I., Yigit, N., y Benli, M. (2008). Antimicrobial Activity of Various Extracts of *Ocimum basilicum* L. and Observation of the Inhibition Effect on Bacterial Cells by Use of Scanning Electron Microscopy. *Afr J. Traditional and Alternative Medicine*, 5(4), 363-364.
- Krewson, C., y Scott, W. (1966). *Euphorbia lagascae* Spreng., an abundant source of epoxyoleic acid; seed extraction and oil composition. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 43 (1) 171-173.

- Kumar, A., y Sharma, S. (2008). An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.). *Industrial Crops Products*, 28(1), 1-5.
- López, J., y Pérez, J. (2011). Potencial etnomedicinal de dos especies tropicales del género *Jatropha* L. *Medicina naturista* 2011, 5(1), 8-12.
- Machado, L. (2019). *Potencial antimicrobiano de los extractos de las hojas de Jatropha gossypifolia* L. (tesis de pregrado). Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Cuba.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Segunda edición, Editorial Universidad Central de Venezuela consejo de desarrollo científico y humanístico.
- Medina, J. (2000). *Guía de antimicrobianos y tratamientos de las infecciones*. Segunda Edición, Editorial Díaz de Santos, S.A.
- Mondal, S., y Roy, N. (2022). Evaluación farmacognostica y fitoquímica de la hoja de *Jatropha nana* var. *Bengalense* un miembro endémico de Euphorbiaceae. *Pharmacognosy Research*, 14(2), 204-207.
- Montoya, H. (2008). *Microbiología básica para el área de la salud y afines*. Segunda edición, Editorial Universidad de Antioquia.
- Muñoz, M. (2016). *Evaluación farmacológica de la actividad Analgésica del extracto hidroalcohólico de las hojas de Jatropha gossypifolia* L. (Tesis pregrado). Universidad Central Marta Abreu de las Villas, Santa Clara, Cuba.
- Muñoz, F. (2002). *Plantas medicinales y aromáticas*. Cuarta Edición, Editorial Aedos, S.A.
- Murray, P., Rosenthal, K., y Pfaller, M. (2009). *Microbiología médica*. Sexta Edición, Elsevier.
- Pabón, C., Vanegas, J., Rendón, M., Santos, R., y Hernández, P. (2013). Actividad antioxidante y antibacteriana de extractos de hojas de cuatro

- especies agroforestales de la Orinoquía Colombia. *Revista cubana de Plantas Medicinales*, 18 (1).
- Pabón, L., y Hernández, P. (2012). Importancia química de *Jatropha curcas* y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales. *Revista cubana de Plantas Medicinales*, 17 (2) ,15-17.
- Pascual, M., y Correal, E. (1992). La familia Euphorbiaceae como fuente de aceites vegetales para la industria tecnoquímica. *Consejería de Agricultura de la Región de Murcia*, 43 (1).
- Pavia, D., Lampman, G., y Kriz, G. (1978). *Química Orgánica Experimental* (tesis de pregrado). Universitaria de Barcelona Eunibar, España.
- Pereira, S., Vega, D., Almeida, M., y Morales, G. (2009). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas de la *Trichilia hirta* L. *Revista química viva*, 3 (8), 196-197.
- Pérez, A. (2009). *Guía metodológica para anteproyectos de investigación*. Tercera Edición, Editorial Fondo Editorial de la Universidad Pedagógica Experimental Libertador.
- Pérez, J., Guerra, D., Reyes, B., Cuevas, J., y Guerra, P. (2020). *Actividad antimicrobiana in vitro de extractos de Jatropha dioica Seseé contra bacterias fitopatógenas de tomate* (tesis de pregrado). Polibotánica Instituto politécnico nacional, México.
- Pérez, R., y Villaverdes, C. (2003). *Microbiología*. Primera Edición, Editorial Paraninfo.
- Prashant, T., Bimlesh, K., Mandeep, K., Gurpreet, K., y Harleen, K. (2011). Phytochemical Screening and Extraction. *Review. Internationale Pharmaceutica Sciencia*, 1 (1), 98-100.
- Putten, E., Franken, Y., y Jongh, J. (2009). Manual de *Jatropha*. *FACT*, 8(11) ,8-12.

- Quezada, K. (2020). *Caracterización biodirigida de compuestos antioxidantes y antimicrobianos de Jatropha dioica originaria de Durango* (tesis de pregrado). Universidad Juárez del Estado de Durango, México.
- Renu, S. (2010). Analysis of the phytochemical content and anti-microbial activity of *Jatropha gossypifolia* L. *Archives of Applied Science Research*, 2(1), 285-91.
- Rimarachin, H., y Vales M. (2019). *Actividad antioxidante y antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la raíz de Jatropha curcas L. (Piñón blanco), Iquitos 2017* (tesis de pregrado). Universidad Nacional de la Amazonía Peruana, Perú.
- Rivero, B. (2014). *Evaluación toxicológica y farmacológica del extracto hidroalcohólico de Jatropha gossypifolia L.* (tesis de pregrado). Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas, Cuba.
- Sánchez, J. (2012). Nuevas Plantas Ornamentales. *Producción y Comercialización de Plantas Ornamentales*, (1-2).
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Primera edición, Editorial Convenio Andrés Bello.
- Valdivia, P. (2020). *Comparación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de diferentes productos naturales frente Escherichia coli y Staphylococcus aureus* (tesis de pregrado). Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España.
- Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop., G., y Woods, G. (2006). *Diagnóstico Microbiológico*. Sexta Edición, Editorial Médica Panamericana.