



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES

“Dr. ALFREDO NICOLÁS USUBILLAGA DEL HIERRO”



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Amaranthus dubius*
EN CEPAS GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS**

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

Autores:

María Eduvina Contreras Gómez

C.I: V-26.439.368

Yusmarys Elizabeth Soto Araujo

C.I: V-26.002.665

Tutor:

Prof. Joel Lara

Mérida, Enero de 2024

Este trabajo es el resultado de mi esfuerzo, dedicación y constancia a pesar de tantos obstáculos que se me han presentado a lo largo de este camino universitario

A Dios Padre Todopoderoso quien siempre está conmigo y cada día me da la valentía para enfrentarme a las circunstancias que la vida me presenta.

A mi madre, María Gómez quién es mi apoyo fundamental e incondicional, siempre dándome sus palabras de aliento y ánimo para seguir adelante, su ayuda a sido muy necesaria para seguir adelante, este logro es de ella también.

A mi familia y amistades que de una u otra forma han contribuido en este caminar y me han expresado sus buenos deseos e intenciones. Especialmente a tía Ismelda Gómez gracias por creer en mí y por sus buenos deseos y bendiciones.

Maria Eduvina Contreras Gómez

DEDICATORIA

Nunca renuncie a lo que deseaba y lograr alcanzar este éxito y la cima de este sueño, es una meta de todo ser humano, pero no es fácil, solo con perseverancia, sacrificio, esfuerzo y dedicación, se hace posible y una vez que se llega a alcanzar este triunfo en el que se realizan unos de mis sueños más deseados siento que no es solo mío, sin dejar de percibir un sentimiento de gratitud hacia aquellas personas que permanecieron a mi lado, creyeron y tuvieron confianza en mí, apoyándome en cada momento, por ello este triunfo quiero dedicarlo:

A mi Padre Celestial: Gracias por estar siempre a mi lado, por ser mi guía espiritual, mi refugio a lo largo del camino que he recorrido con satisfacción.

A mi cinco Seres Especiales: A mi abuelos (as) Edicta, María Matilde, Maximino Carlos y a mi prima Andreina. A ustedes les dedico mi triunfo, estoy segura que si estuviesen hoy con vida se sentirían felices, sé que están cerca de la Divina Misericordia de Dios.

A mis padres Liset Araujo y Wuilmer Soto: Gracias porque antes de comenzar esta carrera me motivaron a seguir adelante, no hay palabras suficientes para agradecerles todo lo que han hecho por mí, por su amor incondicional, paciencia, apoyo y sacrificio para hacer posible mi educación, este triunfo más que mío les pertenece.

A mis Hermanas Génesis y Wuilmary: sigan luchando y constantes en sus metas para que puedan ver los frutos en un mañana.

A mis sobrinos (as) Débora, Gabriel, Nazaret y Caleb les dedico mi triunfo como ejemplo a seguir.

A mis hermanos de la Iglesia Peniel Amor de Dios y Dios Pentecostal: Quienes con sus oraciones, consejos y amor me motivaron a perseverar en mis logros, meta y vida espiritual. Dios los bendiga siempre.

A mis amigos y compañeros de estudio: María Contreras y María Cobos, espero que con el tiempo no se olviden todos esos momentos que compartí

con cada una de ustedes, gracias por su amistad y al resto de mis compañeros también les doy las gracias.

www.bdigital.ula.ve

A todos estos mil gracias.

Yusmarys Elizabeth Soto Araujo

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a María Santísima por ser mi guía, mi fortaleza y consuelo, por darme la sabiduría y el entendimiento para tomar correctas decisiones, por ayudarme a superar muchos obstáculos y llegar hasta este momento tan grato y satisfactorio, pido que me de mucha vida y salud para lograr muchas cosas más.

A mi mamá, María Gómez quien es mi persona incondicional, mi motor y mi guía para salir adelante, gracias por tanto, no hay palabras para expresar tanto amor y gratitud. Gracias mamá Te Amo.

A mis profesores quiénes con su paciencia, amor y conocimiento nos forman para ser excelentes profesionales.

Al profesor Joel Lara, gracias por aceptar ser tutor de este trabajo de investigación, por las orientaciones y el cariño, siempre con una sonrisa.

Al jurado evaluador, Dra(s). Rosa Aparicio e Ysbelia Obregón, gracias por sus valiosos aportes, sugerencias y conocimientos, han sido fundamentales para culminar esta investigación.

A todo el personal de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, que cada día con su trabajo aportan un granito de arena por nuestra Facultad y hacen posible que se mantenga activa.

A la Ilustre Universidad de Los Andes lugar donde florecen los sueños y se forman excelentes profesionales en todas las áreas, muy orgullosa de ser ulandina.

A tía Carmen Rodríguez y familia, por permitirme vivir en su casa, algo muy importante para poder realizar estudios en la ciudad de Mérida.

A Richard Pinto, al Padre Leonardo Gamboa SJ y al Instituto San Javier del Valle Grande por permitirme formar parte de la familia javeriana, ha sido una experiencia muy enriquecedora y fundamental para continuar con mi carrera universitaria.

A mi compañera de tesis Yusmarys Soto, gracias por recorrer conmigo este camino y apoyarnos en los buenos y malos momentos.

A mis compañeros de universidad, gracias por la amistad y el apoyo en las diversas dificultades que se presentaron, gracias a la promoción XVII de Licenciados en Bioanálisis más que compañeros hemos sido una familia.

www.bdigital.ula.ve

Maria Eduvina Contreras Gómez

AGRADECIMIENTO

A todas aquellas personas que de una u otra manera me apoyaron y confiaron en mí, que con su gran generosidad y comprensión han compartido momentos tristes, alegres e inolvidables les debo éste triunfo.

Agradezco a Dios por ser mi guía, mi fortaleza y consuelo, por darme la sabiduría y el entendimiento para culminar con éxito todas las actividades.

A la Universidad de Los Andes Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente y a la vez por haberme abierto la puerta en tan prestigiosa universidad. Me siento muy orgullosa.

A todos mis profesores, por sus sabios conocimientos y orientaciones brindadas en la formación académica que hoy se hace realidad. A ustedes infinitas gracias.

Al profesor Joel Lara, además de ser mi tutor, Gracias por su apoyo, paciencia y capacitación durante esta práctica donde brindó lo mejor de sí.

Al jurado evaluador, Dra(s). Rosa Aparicio e Ysbelia Obregón, gracias por su imparcialidad, objetividad y transparencia, han sido fundamentales para culminar esta investigación.

A todo el personal de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, que cada día hacen posible que se mantenga activa la universidad. A todos ustedes muchas gracias.

A Isabel y Carlos Villarreal, Rafaela Navas, Berta Durán y a su hijo Carlos, por permitirme vivir en su casa, me brindaron su apoyo incondicional en los momentos más difíciles de mi vida estudiantil, con ustedes aprendí a madurar y sobre llevar los triunfos y derrotas en esta gran universidad.

A la Residencia Estudiantil Femenina por permitirme formar parte de ustedes, ha sido una experiencia muy enriquecedora y fundamental para continuar con mi carrera universitaria.

A mi compañera de proyecto de grado, María Contreras, por dar lo mejor

en este arduo trabajo, y confiar en mí para dar este paso tan importante en nuestras vidas.

A mis compañeros de curso, que me brindaron su apoyo incondicional en los momentos más difíciles de mi vida estudiantil , gracias a la promoción XVII de Licenciados en Bioanálisis por ser esa plataforma que nos permitió llegar a este punto del camino en nuestra formación profesional.

Gracias a cada una de las personas que han puesto su granito de arena para que yo pueda dar este paso tan importante en mi vida. ¡Mil Gracias!

www.bdigital.ula.ve

Yusmarys Elizabeth Soto Araujo

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
RESUMEN	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	3
Planteamiento del Problema.....	3
Justificación de la Investigación.....	6
Objetivos de la Investigación.....	8
<i>Objetivo General</i>	8
<i>Objetivos Específicos</i>	8
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	9
<i>Alcances de la Investigación</i>	9
<i>Limitaciones de la Investigación</i>	9
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	10
Trabajos Previos.....	10
Antecedentes Históricos.....	13
Bases Teóricas.....	14
Familia Amaranthaceae.....	12
Distribución Geográfica de la Familia Amaranthaceae.....	15
Clasificación Taxonómica de la Familia Amaranthaceae.....	15
Composición Química de la Familia Amaranthaceae.....	16
Usos Etnobotánicos y/o Farmacológicos de la Familia Amaranthaceae.....	18
Género <i>Amaranthus</i>	19
Distribución Geográfica del Género <i>Amaranthus</i>	19
Composición Química del Género <i>Amaranthus</i>	20

ÍNDICE DE CONTENIDO

(Continuación)

	Pág.
Usos Etnobotánicos y/o Farmacológicos del Género <i>Amaranthus</i>	21
Especie <i>Amaranthus dubius</i> Mart.....	22
Taxonomía de la especie <i>Amaranthus dubius</i> Mart.....	24
Composición Química del <i>Amaranthus dubius</i> Mart.....	24
Usos del <i>Amaranthus dubius</i> Mart.....	25
Extracto Vegetal.....	26
Proceso de Extracción.....	26
Tipos de Extractos.....	26
Técnicas Extractivas.....	27
Metabolitos Secundarios.....	31
Clasificación de los Metabolitos.....	32
Tamizaje Fitoquímico.....	37
Bacterias.....	39
Clasificación de las bacterias.....	40
Tipos de Bacterias.....	40
Bacterias Gram Negativas.....	40
Bacterias Gram Positivas.....	42
Antibióticos.....	43
Técnicas de Antibiograma Convencional.....	43
Técnicas de Difusión.....	44
Técnicas de Dilución.....	46
Interpretación de Resultados del Antibiograma.....	47
Definición Operacional de Términos.....	48

ÍNDICE DE CONTENIDO

(Continuación)

	Pág.
Operacionalización de las Variables.....	50
Hipótesis.....	53
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO.....	54
Tipo de Investigación.....	54
Diseño de Investigación.....	54
Población y Muestra.....	55
Unidad de Investigación.....	55
Selección del Tamaño de la Muestra.....	55
Sistema de Variables.....	55
Instrumento de Recolección de Datos.....	56
Procedimiento de la Investigación.....	56
Diseño de Análisis.....	65
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	67
Resultados.....	67
Discusiones.....	74
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	80
Conclusiones.....	80
Recomendaciones.....	81
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

N°		Pág
1	Metabolitos aislados en la familia <i>Amaranthaceae</i>	17
2	Metabolitos aislados en el género <i>Amaranthus</i>	21
3	Especie <i>Amaranthus dubius</i> Mart.....	23
4	Metabolitos aislados en la especie <i>Amaranthus dubius</i>	25
5	Estructura química de Terpenos.....	33
6	Estructura química del Fenol.....	34
7	Estructura química de Glicósidos.....	36
8	Estructura química de Alcaloides.....	37
9	Estructura de la pared celular bacteriana.....	42
10	Extracción por reflujo.....	58

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

N°		Pág
1	Descripción taxonómica de la familia <i>Amaranthaceae</i>	16
2	Descripción taxonómica de la especie <i>Amaranthus dubius</i>	24
3	Operacionalización de la variable dependiente actividad antibacteriana del extracto de las hojas de <i>Amaranthus dubius</i> ...	51
4	Operacionalización de la variable independiente composición química del extracto de las hojas de <i>Amaranthus dubius</i>	52
5	Cepas de referencia internacional de la Colección de Tipo Americano (ATCC).....	62
6	Antibióticos empleados como control positivo para el estudio de la actividad antibacteriana.....	64
7	Pesos obtenidos y porcentaje de rendimiento del extracto vegetal de las hojas de <i>Amaranthus dubius</i>	67
8	Reporte de los resultados del estudio fitoquímico realizado al extracto etanólico de las hojas de <i>Amaranthus dubius</i>	68
9	Reporte ilustrado de los resultados (positivos) obtenidos del estudio fitoquímico realizado al extracto etanólico de las hojas de <i>Amaranthus dubius</i>	70
10	Resultados obtenidos en la determinación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de <i>Amaranthus dubius</i>	71
11	Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de <i>Amaranthus dubius</i>	72

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

Las plantas han constituido desde la antigüedad un recurso inapreciable para cuidar y preservar la salud. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2007) ha considerado que aproximadamente el 80 % de la población mundial ha utilizado la medicina tradicional para su atención primaria de salud y con frecuencia es subestimada. Desde hace miles de años, cuando el hombre fue encontrando curas para las enfermedades que le aquejaban usando plantas silvestres, además de dar inicio a lo que se conoce como medicina tradicional herbolaria, se empezó a establecer una relación empírica entre el tipo de planta y la actividad biológica atribuida a cada una, distinguiendo una planta de otra solo por las características externas más notorias, del conocimiento empírico de los beneficios del uso de plantas para fines terapéuticos, surgen los primeros fármacos sintéticos (Aragón y cols., 2016).

La medicina tradicional ha sido y sigue siendo una inspiración para la búsqueda de nuevos medicamentos, el uso de plantas con propiedades medicinales es un área de gran interés para la sociedad por su diversidad de aplicaciones, por lo cual, la búsqueda de nuevos fármacos antibacterianos para tratar las patologías causadas por diferentes microorganismos es una tarea que genera gran impacto.

La actividad antibacteriana es la capacidad de un componente de inhibir el crecimiento o multiplicación de bacterias dañinas para la salud. Las sustancias con dicha propiedad antibacteriana conocidos como antibióticos son esenciales en el tratamiento de las infecciones locales o generalizadas provocadas por éstos microorganismos. En los últimos años, la resistencia bacteriana a los antibióticos sintéticos se ha incrementado de manera importante, de ahí que la búsqueda de nuevas sustancias naturales con

actividad antibacteriana ha tomado mayor importancia, para el control de enfermedades infecciosas. Las plantas constituyen una fuente alternativa de sustancias farmacológicas antibacterianas y de toda índole, esto debido a que existen en la naturaleza, una variedad muy amplia de especies de origen vegetal que pueden en ciertos casos reemplazar las terapias sistematizadas químicamente (Alonso, 2004).

Por lo tanto, el estudio de extractos de las plantas en relación a su actividad antibacteriana mediante halos de inhibición es decir, empleando la técnica de Kirby-Bauer ha permitido conocer la actividad inhibitoria que pueden presentar dichos extractos. Por consiguiente, el tamizaje fitoquímico permite determinar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en una planta. El objetivo de este trabajo fue confirmar la actividad antibacteriana y el tamizaje fitoquímico del extracto de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart, en cepas Gram positivas y Gram negativas.

El siguiente trabajo se encuentra sistematizado por las normas APA de la Sociedad Americana de Psicología en cinco capítulos. Capítulo I: se plantea El Problema de estudio, la justificación de la investigación, junto con los objetivos que se quieren alcanzar. Capítulo II: Marco Teórico que comprende: Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición de Términos Operacionalización de las Variables y Sistema de Hipótesis. Capítulo III: Marco Metodológico constituido por: Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variable, Procedimientos o Metodología de la investigación, Diseño de análisis. El capítulo IV esta titulado como Resultados y Discusiones, y el capítulo V esta titulado y compuesto por, Conclusiones y Recomendaciones y Referencias Bibliohemerográficas.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Actualmente a nivel mundial existen importantes problemas de salud pública, algunos de ellos relacionados con la resistencia bacteriana a los antibióticos sintéticos lo cual lleva consigo que se dificulte el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Por lo tanto, ha surgido la necesidad de buscar alternativas que permitan el control de los microorganismos que causan enfermedades en la población. De allí, la importancia del estudio de metabolitos o sustancias de origen natural con capacidad antibacteriana así como otras propiedades beneficiosas para la colectividad en general (Aragón y cols., 2016).

En este sentido, la actividad antibacteriana se refiere a la capacidad de un componente químico, natural o sintético de inhibir el crecimiento de microorganismos dañinos para la salud, por lo que se están realizando en la actualidad diversas investigaciones con el objetivo de relacionar la composición química de plantas de interés con su actividad biológica y la factibilidad de su aplicación como alternativa terapéutica (Carrillo, Aguilar y Alvarado, 2012). De tal manera que la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios de las plantas se puede conseguir mediante diferentes métodos de extracción y purificación de los componentes fitoquímicos (García, 2015).

En relación a lo anterior, debido a que las plantas están siendo utilizadas en medicina convencional se ha hecho necesaria la comprobación de su actividad fitoquímica para su uso farmacológico. Por lo tanto, es de gran

importancia conocer los principios activos que contienen las plantas para establecer parámetros de control, estandarizarlos y validar su efecto terapéutico (Juárez, 2018).

El tamizaje o “Screening” fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos, presentes en una planta y, a partir de allí orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés (Sharapin, 2000).

Se consideran metabolitos primarios los azúcares, grasas, proteínas, etc, que están involucrados en los procesos químicos que la planta debe realizar para sobrevivir y reproducirse (Anaya, 2003). Por su parte, los metabolitos secundarios son compuestos derivados del metabolismo primario de las plantas y constituyen una fuente de principios activos de gran importancia para el uso farmacéutico, ya que ejercen efectos a nivel productivo beneficiosos para el área de la salud (Hernández, Zaragoza, López, Peláez, Olmedo y Rivero, 2018).

Así mismo, los aportes teóricos sobre el mecanismo de acción antimicrobiano, el cual hace referencia a la capacidad de los compuestos químicos de alterar la permeabilidad celular provocando pérdida de macromoléculas en el interior de la célula e impidiendo su metabolismo. Así bien, el estudio de extractos naturales es una área de estudio de gran importancia debido a su efecto sobre el desarrollo de varias bacterias, sin embargo dicha actividad varía de acuerdo a la concentración y naturaleza química de los compuestos bioactivos del extracto vegetal (Gómez y Bhethusa, 2014).

Con respecto a lo expuesto anteriormente, es importante destacar que la actividad antibacteriana de los extractos puede variar por la fuente vegetal, su estado de madurez y la época del año en la que es recolectada, además

está relacionada con la concentración y naturaleza química de los compuestos bioactivos contenidos en ellos (Gómez y Bhethusa, 2014).

Una vez expuesto el planteamiento del problema las autoras de esta investigación formulan el siguiente enunciado holopráxico: ¿Cuál es la relación entre la actividad antibacteriana y el tamizaje fitoquímico del extracto de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius*, en cepas Gram positivas y Gram negativas?

www.bdigital.ula.ve

Justificación de la Investigación

La justificación debe responder a los por qué o razones de la investigación. Específicamente, estas razones pueden ser categorizadas como necesidades, curiosidades y preocupaciones, motivaciones, intereses, valores, potencialidades, oportunidades, tendencias, contradicciones (Hurtado, 2012). Las autoras de esta investigación identificaron necesidades tales como: La importancia del estudio de sustancias de origen natural para el control de enfermedades infecciosas relacionadas con la resistencia bacteriana a los antibióticos sintéticos que afectan actualmente a la población mundial (Aragón y cols., 2016). Además, es necesario conocer y comprobar la actividad biológica de los compuestos fitoquímicos de las plantas para validar su efecto farmacológico (Juárez, 2018).

Por otra parte, los investigadores identificaron razones que les motivaron e interesaron. Entre ellas, la factibilidad de la aplicación de metabolitos secundarios de plantas como alternativa terapéutica al uso de los antibióticos convencionales llama la atención de los investigadores, puesto que hoy en día se están realizando diversas investigaciones sobre extracción y purificación de componentes fitoquímicos (Díaz, Palá, y Usano, 2014; García, 2015). También ha despertado el interés de los investigadores los productos beneficiosos que generan los metabolitos secundarios de las plantas a nivel medicinal, nutritivo y cosmético (Anaya, 2003; Hernández y cols., 2018).

Otras de las razones que justifican esta investigación son las oportunidades. El Screening o tamizaje fitoquímico permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en la planta, representa una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica y a partir de allí se orienta la investigación según los grupos químicos de interés para el investigador (Balseca, 2017). El estudio de los extractos en relación

a su actividad antibacteriana permite conocer si los mismos presentan diámetro promedio de inhibición para calificarlos como bactericidas frente a las cepas de estudio lo cual representa una ventaja para su uso en el control de dichos microorganismos (Cardona, Hincapié y Marín, 2020).

Asimismo, se encontraron potencialidades. Primera, los estudios previos de la actividad antibacteriana de extractos vegetales presentaron cualidades que posibilitan el control de varias bacterias. Segunda, representa la posibilidad de conocer los factores que originan diferencias con respecto a la actividad antibacteriana de las plantas (Gómez y Bhethusa, 2014). Los resultados de los trabajos previos representan una posibilidad para el uso de extractos de plantas con actividad biológica y aplicación terapéutica (Rivas, 2020). Al considerar los porqués anteriores, los autores de esta investigación también encontraron razones con categoría de tendencia específicamente, porque los trabajos previos son evidencia de la diversidad de resultados que se pueden conseguir en investigaciones de actividad antibacteriana y fitoquímicos ya que los mismos suelen variar normalmente, obteniéndose halos de inhibición con diferentes diámetros, de acuerdo a la concentración y naturaleza del extracto utilizado (Jacóme y Paucar, 2019).

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y el tamizaje fitoquímico del extracto de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart, en cepas Gram positivas y Gram negativas.

Objetivos Específicos

- Obtener el extracto de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius* mediante la técnica de reflujo en caliente.
- Identificar los fitoquímicos en el extracto de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart mediante el tamizaje fitoquímico.
- Evaluar la actividad antibacteriana del extracto de *Amaranthus dubius* por el método Kirby-Bauer, en cepas Gram positivas y Gram negativas.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

La presente investigación tiene como finalidad obtener conocimientos sobre la actividad antibacteriana y la composición química del extracto de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart, con el propósito de brindar una mayor información sobre su posible uso medicinal, ya que esta es la primera investigación de la especie realizada en Mérida, Venezuela.

Limitaciones de la Investigación

El desarrollo del presente trabajo de investigación se vio limitado por los costos de los materiales necesarios para la ejecución de la parte experimental en el laboratorio, también se presentaron algunas fallas en los servicios públicos los cuales obstaculizaron la ejecución de la misma.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Bari y Alfaki, (2023). Realizaron una investigación titulada Actividad antimicrobiana de *Amaranthus caudatus* tratamiento contra *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae* resistentes a múltiples drogas. El objetivo de esta investigación fue examinar los efectos antibacterianos de un extracto de semillas de *Amaranthus caudatus* contra *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*. El extracto se obtuvo mediante aparato de Soxhlet utilizando como disolvente metanol. El análisis fitoquímico preliminar para la determinación de metabolitos secundarios se realizó mediante cromatografía de gases conectado a un espectrómetro de masas. Para la determinación de la actividad antibacteriana utilizaron el ensayo de difusión y el método de dilución en caldo para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) utilizando diferentes concentraciones: 500 mg, 250mg, 125 mg. Como resultados en el análisis fitoquímico revelaron la presencia de taninos, flavonoides, fenoles y proteínas, con respecto a la actividad antibacteriana, luego de 24 horas de incubación, se inhibió el crecimiento de los microorganismos a prueba como *Acinetobacter baumannii* 22 mm a 500 mg, 17 mm a 250 mg, 14 mm a 125 mg y *Klebsiella pneumoniae* 24 mm a 500 mg, 18 mm a 250 mg y 15 mm a 125 mg. Lo cual permitió concluir que el extracto de semillas de *Amaranthus caudatus* presenta actividad antibacteriana lo cual puede representar una fuente de sustancias antibacterianas. Esta investigación se relaciona con

nuestro trabajo porque estudia el perfil fitoquímico y la actividad antibacteriana de una especie de *Amaranthus*.

Díaz, y Tineo (2022), realizaron un trabajo titulado Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* L (paico) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Se obtuvo un extracto hidroalcohólico mediante maceración, al cual se le realizó tamizaje fitoquímico y se le determinó la actividad antibacteriana mediante la técnica de difusión en pozos. Como resultados obtuvieron que en el tamizaje fitoquímico se reveló la presencia de compuestos fenólicos (+++) abundante, quinonas (++) moderado, triterpenos (++) moderado y alcaloides (+) presente. Los halos de inhibición que demuestran la actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* fueron de $13,13 \pm 0,26$ mm al 100 %, de $12,62 \pm 0,32$ mm al 75 % y de $11,11 \pm 0,28$ mm al 50 %, para el control positivo (ciprofloxacino) fue de $26,63 \pm 0,26$ mm. Lo cual permitió concluir que el extracto hidroalcohólico de *Chenopodium ambrosioides* L (paico) presenta actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* a diferentes concentraciones. Este trabajo se relaciona con nuestra investigación ya que realizaron tamizaje fitoquímico y la actividad antibacteriana con *E. coli*.

Por su parte, Guzmán, Rodríguez y Rojas (2021), realizaron una investigación titulada Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* L “Paico” y *Schinus molle* “Molle” frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. Para dicho estudio las hojas de ambas plantas fueron seleccionadas, lavadas, trozadas, secadas y pulverizadas para luego ser maceradas en etanol. Los extractos resultantes se usaron para tamizaje fitoquímico y también se realizó un ensayo microbiológico para determinar el efecto antibacteriano *in vitro* mediante el método de Kirby-Bauer con discos de difusión en agar Müller-Hinton, se realizaron 10 repeticiones con discos etiquetados con los extractos a 500 mg/mL, ciprofloxacino 5 µg y agua destilada. Finalmente los resultados

obtenidos indicaron lo siguiente, en el tamizaje fitoquímico se determinó la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, lactonas y alcaloides. El extracto etanólico de *Chenopodium ambrosioides* al 50 % no presentó efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*, sin embargo, la mezcla al 50 % con el extracto de *Schinus molle* si presentó actividad frente a *Staphylococcus aureus*, presentando un halo de inhibición de $8,86 \pm 0,25$ mm. Esta investigación se relaciona con nuestra investigación porque se realizó tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana frente a *S. aureus*.

Así mismo, Cardona, Hincapié y Marín (2020), realizaron un trabajo titulado Actividad bactericida *in vitro* de *Chenopodium quinoa* Willd y *Artemisia dracunculus* L. sobre bacterias patógenas. El objetivo de este trabajo fue definir la actividad antibacteriana de extractos de semilla de *C. quinoa* (quinua) y de hojas de *A. dracunculus* (estragón ruso). El material vegetal de las dos plantas se sometió a maceración sin agitación a temperatura ambiente. Los solventes usados fueron hexano (apolar), acetato de etilo (medianamente polar) y metanol (polar). Para esto se depositaron 50 g de muestra molida en un recipiente de vidrio con el respectivo solvente grado analítico durante 72 horas. Cumplido este tiempo, se filtró la muestra y el extracto fue recuperado por destilación a presión reducida a 40 °C en rotaevaporador. Dicho proceso se repitió tres veces. Los tres tipos de extractos obtenidos se evaluaron sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922, a través de los métodos de difusión en pozo, Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB). Pasado el tiempo requerido (24 horas), se realizó la medición del halo de inhibición alrededor de cada pozo. El extracto metanólico de *A. dracunculus*, con una concentración de 20 mg/mL, generó diámetros promedio de inhibición de 30,67 mm para *E. coli* y de 32 mm para *S. aureus*. Con la misma concentración, el extracto metanólico de *C. quinoa* generó

diámetros promedio de inhibición de 28,33 mm para *S. aureus* y de 30 mm para *E. coli*. Las cepas de ambas bacterias registraron sensibilidad alta (10 mg/mL) frente al extracto de *A. dracunculus*. Para el extracto de *C. quinoa* las cepas de *S. aureus* (500 mg/mL) y *E. coli* (100 mg/mL) presentaron sensibilidad baja. Se pudo concluir que los dos extractos metanólicos de las plantas evaluadas tienen actividad antibacteriana contra las cepas de los microorganismos evaluados. El extracto metanólico de *A. dracunculus* registró un halo de inhibición sin diferencias estadísticamente significativas con el halo generado por la ampicilina, usado como testigo positivo, lo cual muestra un mayor potencial para su uso como antibiótico. La actividad ejercida por ambos extractos se considera bactericida dado que obtuvieron los mismos valores de CMI y CMB. Este trabajo guarda relación con nuestra investigación porque se estudia la actividad antibacteriana de las especies de interés frente a *S. aureus* y *E.coli*. Por otra parte, la actividad antibacteriana de los extractos de las especies vegetales depende de la cantidad de metabolitos secundarios obtenidos de acuerdo con el mecanismo de extracción, a la concentración utilizada y a las cepas bacterianas usadas. Otros aspectos que influyen en la actividad son el tipo de solvente usado, la parte de la planta del que se obtiene el extracto, la localización geográfica del cultivo y la época del año, entre otros.

Antecedentes Históricos

Etnobotánicamente, el género *Amaranthus* ha estado muy ligado al ser humano a lo largo de la historia, ya que ha sido aprovechado en forma silvestre y cultivado por distintos pueblos y civilizaciones. En América era ampliamente utilizado desde el suroeste de los Estados Unidos hasta la Patagonia por buena parte de los pueblos indígenas, tal como lo evidencian los hallazgos arqueológicos de semillas en México, Centroamérica, Perú,

Bolivia y Argentina esto refuerza la hipótesis que señala al continente americano como centro de origen y domesticación de las especies de *Amaranthus*. En Mesoamérica el amaranto es uno de los cultivos más antiguos y constituyó una de las principales fuentes de alimentación junto con el maíz, el frijol, la calabaza y el chile (Carmona y Orsini, 2010).

Las culturas prehispánicas utilizaron el amaranto tanto para consumo humano como para usos religiosos. Debido a ello, esta planta fue cultivada a gran escala bajo el sistema intensivo de chinampas que desarrollaron los Aztecas en la zona lacustre del Valle de México. De acuerdo a las investigaciones el género fue descrito por Carlos Linneo, en 1753 y la organización más reciente del género fue propuesta por Mosyakin y Robertson en 1996 (Carmona y Orsini, 2010).

www.bdigital.ula.ve Bases Teóricas

Familia Amaranthaceae

La familia Amaranthaceae ha sido organizada tradicionalmente en dos subfamilias: Amaranthoideae y Gomphrenoideae, pero con los recientes estudios moleculares y filogenéticos se han agregado las subfamilias Chenopodioideae y Salsoloideae provenientes de la familia Chenopodiaceae (Carmona y Orsini, 2010).

Son plantas herbáceas, de hojas alternas, simples, inflorescencias axilares o terminales, en racimos o panícula, con brácteas que pueden ser espinescentes. Flores hermafroditas o unisexuales, actinomorfas, periantio verdoso o coloreado de rojo con 3-5 piezas iguales o distintas, 5 estambres, gineceo con ovario de 2-3 carpelos y 2-3 estilos. Fruto en pixidio, con semillas lenticulares, lisas, negras y, a menudo, brillantes (Agudelo, 2008).

Distribución Geográfica de la Familia Amaranthaceae

La familia Amaranthaceae tiene una distribución geográfica cosmopolita, Es una familia pantropical, se distribuye en las zonas tropicales y subtropicales del mundo algunas especies pueden penetrar como malezas a regiones más frías o áridas, pero la mayoría se encuentra en áreas calurosas. Algunos representantes son más o menos acuáticos, con extensiones a las zonas templadas (Sandoval y Siqueiros, 2019).

La familia tiene amplia distribución, pues está presente en diferentes regiones naturales y desde el nivel del mar hasta 3500 m de altitud. Cerca del 50% de las especies están concentradas en los climas cálidos y relativamente secos, con temperaturas que oscilan entre 22 y 35 °C. La mayoría de las especies crece en suelos arenosos, pedregosos, rocosos, áridos, fértiles o infértiles, en hábitats que varían entre sabanas, zonas de ecotono, orillas de ríos, bosques secundarios, dunas y áreas costeras, incluidos los manglares. Las Amaranthaceae son muy abundantes en áreas disturbadas como bordes de caminos y predios urbanos (Agudelo, 2008).

Clasificación Taxonómica de la Familia Amaranthaceae

El conocimiento de la familia Amaranthaceae comienza con el trabajo de Jussieu en 1789, quien la describió y propuso su nombre. Posteriormente, Moquin- Tandom en 1849 publicó una revisión de la familia, en la que incluyó 451 especies y 43 géneros agrupados en tres tribus: Celosieae, Achyrantheae y Gomphreneae. La definición de las tribus se basó en el número de lóculos de las anteras y el número de óvulos por carpelo, mientras que los géneros al interior de las tribus, se separaron por las características de los estambres, la organización de las flores, el tipo de dehiscencia del fruto y la disposición de las hojas. Posteriormente, Bentham

y Hooker en 1880 conservaron las tres tribus usando los mismos caracteres, pero propusieron cambiar el nombre de la tribu Achyrantheae por el de Amarantheae, con dos subtribus diferenciadas por la posición del óvulo y el tamaño del funículo. Schinz en 1934 realizó un tratamiento posterior para la familia, en el que incluyó 693 especies y 63 géneros. El sistema de clasificación de Schinz se basó en los sistemas propuestos por Moquin-Tandon, Bentham y Hooker en 1880, considerando también los caracteres florales, como número de lóculos en las anteras, organización de las flores, dehiscencia del fruto, forma del estigma, posición de los estambres y orientación de la semilla. Sin embargo, dividió la familia en dos subfamilias: Amaranthoideae, compuesta por las tribus Celosieae y Amarantheae, y Gomphrenoideae constituida por Brayulineae y Gomphreneae. A su vez, subdividió la tribu Amarantheae en dos subtribus, con base en la orientación de la semilla: Amaranthinae y Achyranthinae (Tabla 1) (Agudelo, 2008).

Tabla 1. Descripción taxonómica de la familia Amaranthaceae

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Eudicotyledoneae
Orden	Caryophyllales
Familia	Amaranthaceae

Tomado y modificado de Agudelo, 1996.

Composición Química de la Familia Amaranthaceae

La familia Amaranthaceae se caracteriza por su diversidad en metabolitos secundarios: aceites esenciales, sesquiterpenos [1], diterpenos [2], triterpenos [3], flavonoides [4], ácidos fenólicos [5] y betalaínas [6] ver

Figura 1. Esta familia incluye diversos géneros en los que se han reportado betalaínas: *Alternanthera*, *Amaranthus*, *Beta*, *Chenopodium*, *Celosia* y *Gomphrena*. A algunos de estos géneros se les han atribuido varias propiedades: antioxidantes, efectos positivos sobre la salud metabólica, cardiovascular y gastrointestinal en humanos; antipalúdicos. En algunas especies de plantas pertenecientes a esta familia como *Charpentiera obovata* se ha revelado la presencia de alcaloides (Miguel, 2018; Meesakul y cols., 2023).

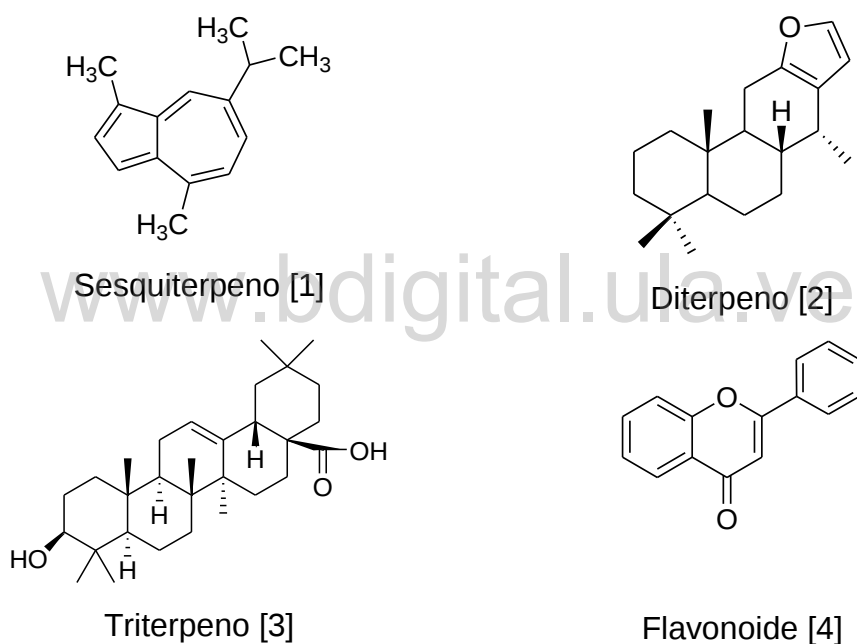


Figura 1: Metabolitos aislados en la familia Amaranthaceae.

Tomado y modificado de Delgado y Romo, 2022.

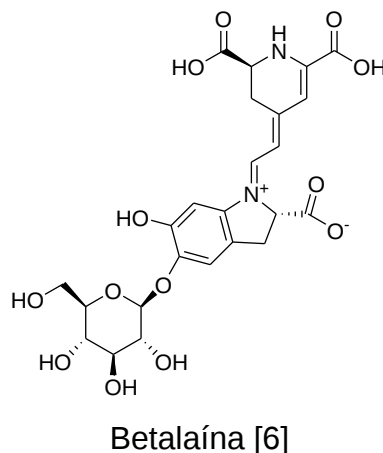
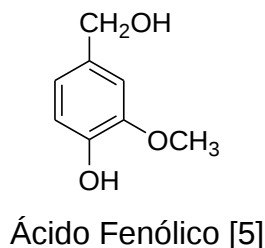


Figura 1: Metabolitos aislados en la familia Amaranthaceae (continuación).
Tomado y modificado de Delgado y Romo, 2022.

Usos Etnobotánicos de la Familia Amaranthaceae

www.bdigital.ula.ve

Respecto a las potencialidades de las especies de Amaranthaceae en zonas urbanas y rurales, utilizando la bibliografía relacionada con la temática y entrevistas directas con campesinos, indígenas y expendedores. Se encontró que el 54% de las especies tienen importancia económica, debido a que son utilizadas principalmente como medicinales (82 %), alimenticias (36 %) y ornamentales 21 %). A nivel medicinal, estas plantas son utilizadas para combatir enfermedades cardíacas, cancerígenas, respiratorias e infecciosas. Sin embargo, falta información sobre la composición química, la actividad biológica y las dosis adecuadas para el consumo humano, entre otros aspectos, que respalden su utilización con fines medicinales (Agudelo, 1996).

Género *Amaranthus*

El género *Amaranthus* pertenece a la subfamilia Amaranthoideae, la cual está organizada en dos tribus: Celosiae con cinco géneros, de los cuales sólo *Celosia* está presente en América, y Amaranthae, con dos subtribus: Amaranthinae con 12 géneros, siendo *Amaranthus* el único pantropical y Aervinae con 37 géneros, dos de ellos de amplia distribución (Carmona y Orsini, 2010).

El amaranto es una planta perteneciente a la familia Amaranthaceae, el género *Amaranthus*, la cual tiene más de 60 especies distribuidas en zonas tropicales y subtropicales. Es una planta fotosintética, con alta diversidad genética, alta productividad y se adapta a diferentes condiciones edafoclimáticas, especialmente a suelos secos y altas temperaturas. En Venezuela estas plantas crecen en forma silvestre y comúnmente se consideran malezas de varios cultivos de subsistencia, como el maíz, sorgo y algunas leguminosas sin embargo, en algunas regiones de América se usan con un interés medicinal, como verdura para la alimentación humana o como forraje complementario en la alimentación de animales (Matteucci, Pla y Colma, 1999).

Distribución Geográfica del Género *Amaranthus*

Es una hierba tropical adventicia, poco común en regiones templadas. Se originó en América aunque ha sido introducida en Europa y África por lo que posee una amplia distribución en toda la franja intertropical del planeta. En Venezuela está presente en todo el país a altitudes desde el nivel del mar hasta los 2800 msnm, donde se encuentran distribuidas unas 12 especies de amaranto, siendo las principales *A. dubius*, *A. spinosus* y *A. hybridus*. Particularmente, *Amaranthus dubius*, es una especie localizada en todas las

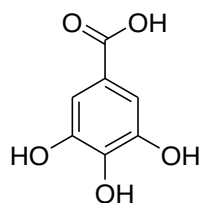
regiones de Venezuela, se le conoce comúnmente como Amaranto, Bledo, Pira, Yerba caracas (Carmona y Orsini, 2010).

Composición Química del Género *Amaranthus*

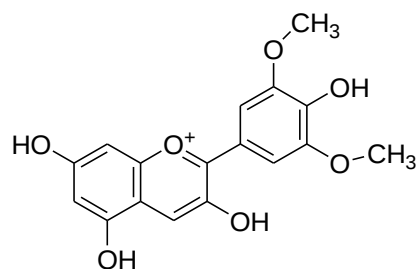
Los granos de amaranto poseen un alto valor nutricional debido a su contenido de proteínas, niveles de aminoácidos esenciales (lisina y metionina) en comparación con otros granos. El grano de amaranto también se considera una buena fuente de fibra soluble e insoluble, vitaminas (riboflavina, niacina, ácido ascórbico) y contenido mineral (calcio y magnesio). Más allá de estos componentes, también existen metabolitos secundarios como los fenoles y pigmentos (betacianinas) en las hojas del amaranto así como en el grano (Miguel, 2018).

Una de estas investigaciones sobre la caracterización fitoquímica de las hojas de amaranto, reporta que dichas hojas contienen flavonoides y ácidos fenólicos e indica que la producción de ciertos productos naturales se ve influenciada por las condiciones del cultivo su vez afirma que el amaranto es utilizado como planta medicinal (Rodríguez, 2008).

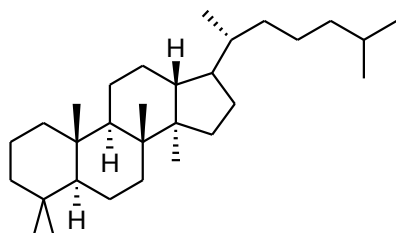
De igual forma, los estudios del *Amaranthus* en los que se ha realizado tamizaje fitoquímico y pruebas microbiológicas para evaluar su efecto antibacteriano y antifúngico han obtenido como resultado bajas concentraciones de taninos [7], flavonoides como las antocianinas [8], saponinas (triterpénicas) [9] y alcaloides [10] Figura 2. En cuanto a su actividad biológica los extractos mostraron en algunos casos nula actividad, mientras que en otros ensayos los resultados fueron satisfactorios frente a determinados microorganismos (Gómez, 2010; Moyón, 2015).



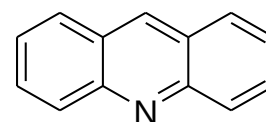
Tanino [7]



Antocianina [8]



Saponina triterpénica [9]



Alcaloide [10]

Figura 2: Metabolitos aislados en el género *Amaranthus*.

Tomado y modificado de Delgado y Romo, 2022.

Usos Etnobotánicos del Género *Amaranthus*

Debido a la composición química del *Amaranthus*, este tiene diferentes aplicaciones en cada área geográfica, en países como África es usado como verdura, y en Europa como cereal, mientras que en China y Rusia se utiliza como forraje para animales. Por su parte, en países de América sus semillas, tallos y hojas son utilizados para el consumo humano, en la industria farmacéutica y como forraje (Matías, Hernández, Torres, Espinoza y Ramírez, 2018).

La palabra *Amaranthus* se deriva de la palabra griega “Anthos” (Flor) que significa eterna, inmortal. *Amaranthus* conocido como amaranto es un género de hierbas que incluye entre 60 y 70 especies. La mayoría de las especies son malezas anuales. Las especies de este género pueden ser

fuelle de pseudocereales, vegetales y ornamentales, algunas especies pueden utilizarse como verdura o como grano. Por ejemplo: las hojas de las plantas jóvenes de *A. cruentus* se pueden utilizar en ensaladas y sopas y se utilizan los granos, en panes, pasteles, galletas, dulces y sopas, se ha considerado que los granos de amaranto poseen un alto valor nutricional, Esto ha convertido a *A. tricolor* en una fuente alternativa de nutrición para las personas que viven en países en desarrollo con poco acceso a alimentos ricos en proteínas (Miguel, 2018).

A. tricolor se utilizó como sudorífico, febrífugo, emoliente, purificador de la sangre, en el tratamiento de la menstruación, fiebres eruptivas, dolor, cólicos, anemia, disentería, enfermedades de la piel, hidropesía, dolor de muelas, llagas de garganta, tos, bronquitis, trastornos biliosos y diabetes Se han utilizado extractos de *A. tricolor* donde se le han reportado actividades antioxidante; hepatoprotector, antimicrobiano, antiproliferativo en líneas celulares AGS humano (gástrico), Cáncer del sistema nervioso central (SNC), SF-268), (colon) HCT-116, (pulmón) NCI-H460 y (mama) MCF-7 líneas celulares, antiinflamatorio al inhibir ambas isoenzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) y también mediante la regulación negativa de la expresión del gen de citoquinas proinflamatorias factor de necrosis tumoral (TNF) factor-, interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6) en células inducidas por productos finales de glicación avanzada; entre otras propiedades (Miguel, 2018).

Especie *Amaranthus dubius* Mart

Descripción Botánica de la Especie *Amaranthus dubius* Mart

Amaranthus dubius Mart, es una hierba anual de hasta un metro de alto, tallo verde, morado, rojizo, sus hojas son largas pecioladas u ovaladas, con

ápice emarginado y mucronado, con base redondeada o aguda. Sus flores son verdes o blancuzcas en forma de espigas terminales y axilares de 10-25 cm de largo y agrupadas en diferentes glomérulos axilares. Brácteas aovadas, agudas, mucronadas, cortas o largas como los segmentos periánticos. Presenta 5 segmentos periánticos, en las flores masculinas son aovados, oblongos, obtusos y mucronados, en las flores femeninas oblongo-espatulados, mucronados y comúnmente emarginados (Leal y Benítez, 2010).



Figura 3. Especie *Amaranthus dubius* Mart.

Fuente: Contreras, Soto y Lara, 2024.

Taxonomía de la especie *Amaranthus dubius*

Tabla 2. Descripción taxonómica de la especie *Amaranthus dubius* Mart.

Nombre Científico	<i>Amaranthus dubius</i> Mart.
Reino	Plantae
División	Fanerógama Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Amaranthaceae
Subfamilia	Amaranthoideae
Género	<i>Amaranthus</i>
Especie	<i>Amaranthus dubius</i>

Tomado y modificado de Sauer, 1967.

Composición Química del *Amaranthus dubius*

El *Amaranthus dubius* presenta alta concentración de proteínas y minerales; especialmente calcio (Ca), magnesio (Mg) y hierro (Fe), bajas concentraciones de sustancias tóxicas y antinutricionales, y no se detectó la presencia de metales pesados como cadmio (Cd) y plomo (Pb). La composición química del *A. dubius* le confiere un gran interés nutricional, ya que puede ser empleado como una nueva fuente de nutrientes de bajo costo en materias primas de la industria agroalimentaria, comparable con fuentes convencionales como leguminosas y forrajeras (Montero, Moreno, Molina y Sánchez, 2011).

En los últimos años el amaranto ha sido ampliamente estudiado, una de las razones del renovado interés es su excelente perfil de nutrientes, comparable con los cereales. Recientemente se ha demostrado que las semillas de amaranto tienen un alto valor nutricional, asociado con la

cantidad y calidad de sus proteínas; además de contener grasas, fibras, minerales y vitaminas; así como compuestos bioactivos, tales como, saponinas, escualeno [11], fitoesteros (sitosterol) [12], y polifenoles [13] ver Figura 4 (Montero, Moreno, Molina y Sánchez, 2011).

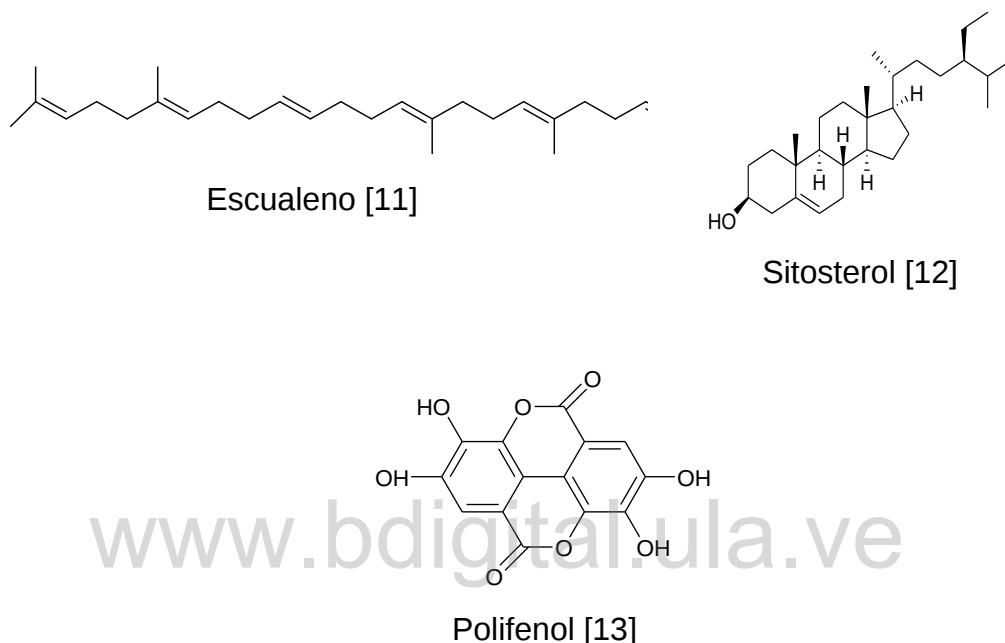


Figura 4: Metabolitos aislados en la especie *Amaranthus dubius*

Fuente: Tomado y modificado de Marcano y Hasegawa, 2002.

Usos del *Amaranthus dubius*

El *Amaranthus dubius* en varios países de América del Sur y Centroamérica, es utilizado en la culinaria por su importante valor nutricional, antes de florecer se prepara en forma de incurtido, parecido a la espinaca, sus hojas son utilizadas en ensaladas, sopas y como verdura además de sus semillas se obtiene harina de buena calidad. A nivel medicinal se ha catalogado como un poderoso oxigenante cerebral, en medicina tradicional es usado como cataplasma para sanar llagas inflamadas y en baños febrífugos, se emplea por vía oral en forma de infusión para para calmar

vómitos de sangre, para combatir parásitos intestinales y como diurético, externamente se emplea como cicatrizante de heridas, para sanar alergias y combatir oftalmías. De igual forma, se han referido usos etnomédicos como antitusivo, antigripal, asma y bronquitis. Por otra parte en el área agropecuaria se utiliza como forrajero para ganados, vacunos y cerdos y además es una planta apícola (Cabrera, 2005; Carmona, Gil y Rodríguez, 2008).

Extracto vegetal

Mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenible por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología. Es un conjunto de compuestos con actividad farmacológica, compuesta por un principio activo dentro de una matriz, en principio, sin actividad terapéutica (Albornoz, 1980).

Proceso de Extracción

La extracción es una operación de separación cuyo objetivo es aislar a una sustancia de la mezcla sólida o líquida que la contiene, generalmente se requiere de un disolvente. Las microextracciones en fase sólida pueden estar exentas de disolvente. Mediante la extracción se pueden aislar y purificar numerosos productos sintéticos o naturales, como vitaminas, alcaloides, grasas, hormonas y colorantes (Albornoz, 1980).

Tipos de Extractos

La naturaleza química de los extractos varía de acuerdo a los compuestos a extraer, al material que los contiene y a la técnica empleada.

Tal es el caso de los extractos secos obtenidos de la concentración de los licores, mediante evaporación al vacío por atomización. Como las sustancias termodegradables pueden desnaturalizarse en la actualidad, se emplea la liofilización con respecto al contenido enzimático y vitamínico, emana de las preparaciones vegetales frescas y de este modo no se alteran y pueden regenerarse al producto inicial al agregarle el agua que se le había quitado (Albornoz, 1980).

Por ende, los extractos hidroalcohólicos contienen los principios hidrosolubles, que son los más numerosos en el resto vegetal. Además, permiten obtener extractos ricos en sustancias mucilaginosas, taninos, sales, flavonoides, entre otros. Los extractos oleosos son obtenidos de plantas con principios liposolubles, tales como esencias, carotenos y pigmentos. Necesitan de la adición de estabilizadores y antioxidantes termodegradables ya que son sensibles a la oxidación (Albornoz, 1980).

Técnicas Extractivas

Maceración

Consiste en dejar las partes vegetales sumergidas en un disolvente, a temperatura ambiente, durante un tiempo relativamente largo, en este método las sustancias termolábiles no se ven afectadas; sin embargo, la solubilidad de los principios es menor a temperaturas más bajas y, así, se extrae una menor cantidad de principios activos en comparación a la que pudiera extraerse a una temperatura superior (Casado, 2012). El material se agita esporádicamente por un periodo mínimo de dos días y hasta por semanas, al cabo del cual se decanta el líquido, filtrando y experimentando el residuo. En esta técnica se remoja la droga cruda fragmentada con el

solvente, con el fin de que este penetre la estructura y disuelva las sustancias (Albornoz, 1980).

Lixiviación o Percolación

Es un proceso mediante el cual se extrae uno o varios solutos de un sólido, ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto o los solutos pueden difundirse desde el sólido a la fase líquida, lo que produce una separación de los componentes originales del sólido. Consiste en que el material vegetal pulverizado es colocado en un percolador, a través del cual pasa continuamente el solvente, dicho solvente se satura de los principios solubles (Albornoz, 1980).

Digestión

Esta es una forma de maceración en la que se aplica calor moderado al material pulverizado, aumentando el poder disolvente. La digestión se efectúa al adaptar un condensador al balón, permitiendo que el solvente pueda usarse continuamente por reciclaje (Albornoz, 1980). Se trata de una extracción a temperaturas superiores a la ambiente, entre 35 y 40 °C, e inferiores a los 50 °C. Se introducen las partes vegetales a extraer en un recipiente que contiene el líquido previamente calentado a la temperatura deseada; se mantiene durante un período que puede oscilar entre media hora y veinticuatro horas, agitando regularmente el envase (Casado, 2012).

Infusión

Consiste en dejar en contacto por algunos minutos las partes secas de la planta seca con agua hirviendo, se deja reposar unos minutos y se filtra a continuación mediante un tamiz o papel de filtro. El no usar calor directo garantiza que sus partes o principios activos no sufran deterioro (Laguna, 2016). Es decir, las partes tiernas de las plantas como son las hojas y flores, entre otros, no son sometidas a ebullición sino que solo se extraen con agua caliente, manteniendo bien cerrado el recipiente, durante unos treinta minutos (Albornoz, 1980).

Decocción

En esta técnica, se somete material crudo como cortezas, raíces o tallos relativamente duros a ebullición con agua, impidiendo que dicho material se derrame, para ello se coloca previamente en un recipiente apropiado (Albornoz, 1980). En este procedimiento se hierve la planta en agua por espacio de 15 a 60 minutos, se enfría, se cuela y se añade suficiente agua fría hasta obtener el volumen deseado. Las dosis son similares a las de la infusión, es decir una parte de planta por cada diez de agua excepto con las plantas que tienen alto contenido en mucílagos que será de 1/20 para evitar que la solución se torne viscosa. Las decocciones se preparan para ser utilizadas al momento y no deben ser almacenadas por más de 24 horas (Laguna, 2006).

Destilación

Es el proceso de evaporar una sustancia, condensar los vapores y cogerlos al estado líquido. Entre estos, generalmente se utiliza el arrastre

con vapor, macerando el material con agua en un balón, e inyectando a través de esta masa, una corriente de vapor; el agua condensada contiene la sustancia arrastrada, la cual se separa por decantación. La operación de destilación se lleva a cabo en un balón de dos o tres bocas de fondo redondo. Alternativamente, el vapor puede ser suministrado por un matraz externo. Es importante destacar, que las sustancias que se someten a este proceso deben ser inmiscibles y que no reaccionen con el agua, por ello, la destilación con arrastre de vapor es útil para separar sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles de otros productos no volátiles mezclados con ellas (Albornoz, 1980).

Extracción Mediante Aparato de Soxhlet

Es un método de extracción continuo que se utiliza para materiales sólidos, este método consiste en colocar el material a extraer previamente molido y pesado, en un cartucho de celulosa que se introduce en la cámara de extracción la cual se encuentra conectada por un lado a un balón de destilación y por otra parte a un refrigerante, el disolvente contenido en el balón se calienta hasta ebullición, el vapor asciende por el tubo lateral y se condensa en el refrigerante y cae sobre el material. Dicho proceso se repite hasta que el material deseado se agote (Lamarque, Zygadlo, Labuckas, López, Torres y Maestri, 2008).

Extracción por reflujo

En el proceso de reflujo, el material previamente disuelto en el solvente elegido, se somete a ebullición. Para evitar que un calentamiento excesivo evapore el solvente se utiliza un sistema de reflujo que consiste en enfriar el vapor del solvente con un refrigerante y devolverlo al balón que contiene el

material para continuar el proceso, esto además garantiza que no haya pérdidas ni de material ni de solvente durante el proceso de extracción. La temperatura elevada del disolvente permite una mejor extracción de los componentes deseados, ya que la solubilidad de la mayoría de las sustancias aumenta con la temperatura. Este método presenta el inconveniente de que muchos compuestos termolábiles se alteran o descomponen a la temperatura de ebullición del disolvente (Lamarque y cols., 2008).

Metabolitos Secundarios

Los metabolitos secundarios difieren de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas, su producción a menudo es restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada. Los metabolitos secundarios tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. Algunos de estos productos, tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes o repelentes de animales. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales (Ávalos y Pérez, 2009).

Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. En la medicina antigua, un gran número de estos productos se usaban como remedios para combatir

enfermedades y en la actualidad se utilizan como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes (Ávalos y Pérez, 2009).

Clasificación de los Metabolitos Secundarios

Terpenos

La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Los terpenos, también conocidos como terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40.000 moléculas diferentes). Entre los metabolitos primarios se encuentran hormonas, carotenoides, clorofilas y plastoquinonas, ubiquinonas y esteroides. Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C) (Ávalos y Pérez, 2009).

De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno (C₅) que contienen: los terpenos de 10 C contienen dos unidades C₅ y se llaman monoterpenos; los de 15 C tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, y los de 20 C tienen cuatro unidades C₅ y son los diterpenos. Los triterpenos tienen 30 C, los tetraterpenos tienen 40 C y se habla de politerpenos cuando contienen más de 8 unidades de isopreno. Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) (Ávalos y Pérez, 2009).

A la vista de esta variedad de compuestos, es evidente que muchos terpenos tienen un importante valor fisiológico y comercial, siendo muchos de ellos de gran interés en el comercio como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, teniendo una importancia tanto en la calidad de

productos agrícolas como en el área medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalariales, antimicrobianas, etc. Los terpenos que se encuentran en los aceites esenciales, los cuales son responsables de los olores y sabores característicos de estas plantas, son generalmente monoterpenos, como el limoneno [14], principal monoterpeno constituyente de los aceites de limón (Ávalos y Pérez, 2009).

Entre los diterpenoides se encuentra el fitol [15], un diterpeno de cadena abierta que forma parte de la estructura de las clorofilas, mientras que entre los triterpenos se encuentran esteroides y esteroides derivados del escualeno. El más abundante en las plantas es el estigmasterol [16] ver Figura 5 (Ávalos y Pérez, 2009).

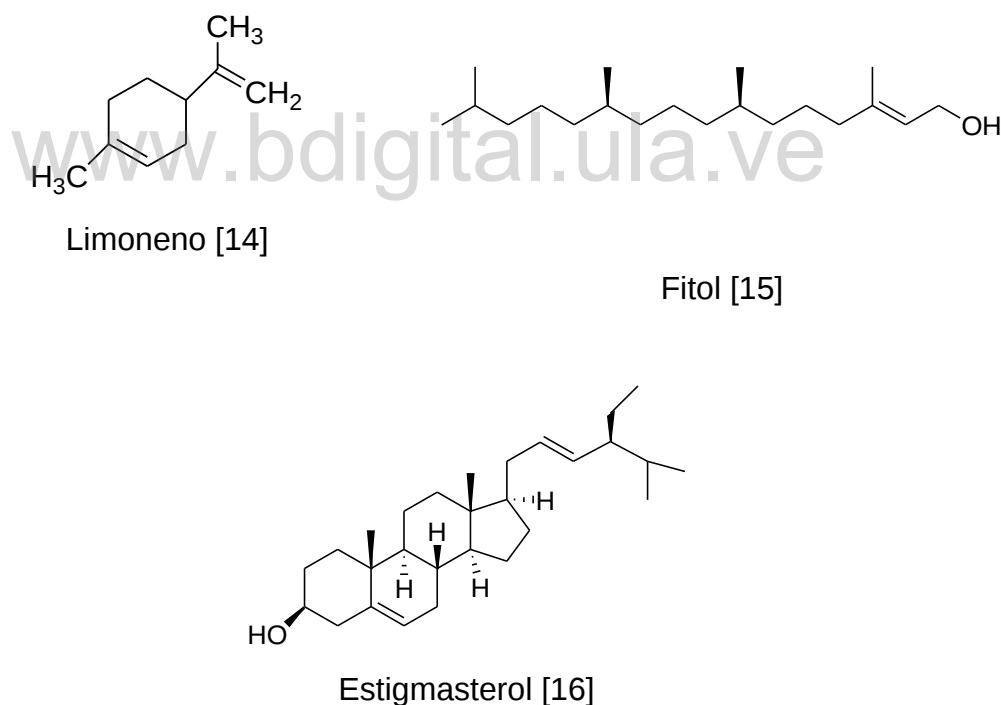


Figura 5: Estructura química de terpenos.

Fuente: Tomado y modificado de Shegebayev y cols., 2023.

Compuestos Fenólicos

Son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas como los ácidos fenólicos hasta polímeros complejos como los taninos y la lignina. En el grupo también se encuentran pigmentos flavonoides. Muchos de estos productos están implicados en las interacciones planta-herbívoro. Es importante señalar, que la mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina. Entre los productos secundarios que sintetizan las plantas se encuentra el grupo fenol, los cuales son sintetizados en gran variedad. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido shiquímico y la ruta del acetato-malonato (Ávalos y Pérez, 2009).

La ruta del acetato-malonato es poco empleada en plantas superiores, además es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, mientras que la ruta del ácido shiquímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. A partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido shiquímico y aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) ver Figura 6. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias (Ávalos y Pérez, 2009).

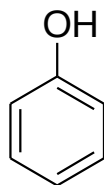


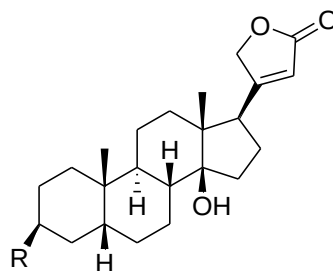
Figura 6. Estructura química del Fenol

Fuente: Tomado y modificado de Shegebayev y cols., 2023.

Glicósidos

Su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo y son metabolitos vegetales de gran importancia. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardiacos y glicósidos cianogénicos. Una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos. Las saponinas son triterpenoides o esteroides que contienen una o más moléculas de azúcar en su estructura y se encuentran como glicósidos esteroideos, glicósidos esteroideos alcaloides o bien glicósidos triterpenos, además Se pueden presentar como agliconas, es decir, sin el azúcar (el terpeno sin el azúcar, por ejemplo), en cuyo caso se denominan sapogeninas (Ávalos y Pérez , 2009).

Por ende, los glicósidos cardiacos o cardenólidos se encuentran de forma natural en forma de glicósidos o de agliconas. Quizá el más conocido sea la digitoxina [17] ver Figura 7, o su análogo digoxina, aislada de *Digitalis purpurea* y utilizada como medicamento en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva. Los glicósidos cardiacos o cardenólidos son semejantes a las saponinas esteroideas, tienen también propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona. Mientras que los glicósidos cianogénicos se degradan cuando la planta es aplastada liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno (HCN) (Ávalos y Pérez, 2009).



Digitoxina [17]

Figura 7: Estructura química de Glicósidos.

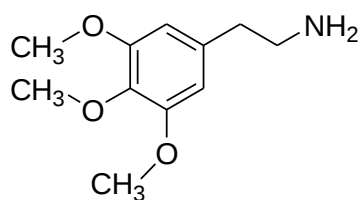
Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

Alcaloides

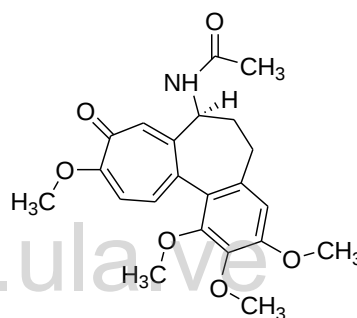
www.bdigital.ula.ve

Un alcaloide es un compuesto orgánico de origen natural (normalmente vegetal), nitrogenado, más o menos básico, de distribución restringida y dotado, a bajas dosis, de marcadas propiedades farmacológicas. La mayoría de los alcaloides son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos) como la mescalina [18] o la colchicina [19] por ejemplo ver Figura 8. Se encuentran en el 20 % aproximadamente de las plantas vasculares, la mayoría dicotiledóneas herbáceas y son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. Se sintetizan normalmente a partir de lisina, tirosina y triptófano, aunque algunos como la nicotina y compuestos relacionados derivan de la ornitina (Bruneton, 2001; Ávalos y Pérez, 2009).

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante, antitusivos o analgésicos. Si bien la noción de alcaloide es bastante reciente, el conocimiento de la toxicidad y de las propiedades de las plantas y de las drogas que poseen alcaloides es muy antiguo. Los alcaloides se clasifican de acuerdo a la ruta biosintética (Bruneton, 2001; Ávalos y Pérez, 2009).



Mescalina [18]



Colchicina [19]

Figura 8. Estructura química de Alcaloides.

Tomado y modificado de Marcano y Hasegawa.

Tamizaje Fitoquímico

El ensayo fitoquímico o screening fitoquímico es la etapa inicial de la investigación, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El estudio fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados, tales como: agua, acetona, alcohol, cloroformo, hexano y éter. Otro solvente, el diclorometano, se usa específicamente para la extracción de terpenoides. Posterior a la extracción, se llevan a cabo

reacciones de coloración y precipitación. Permitiendo una evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo (Palacios, 2008).

De esta manera, los resultados del estudio fitoquímico constituyen únicamente una orientación la cual deberá ser interpretada en conjunto con los resultados del screening farmacológico. Así cuando una planta revela acción sobre el sistema nervioso central durante el tamizaje farmacológico y presencia de alcaloides en el screening fitoquímico, es bastante probable que la acción farmacológica se deba a la fracción alcaloidal. Por otro lado, el hecho de evidenciarse acción antiinflamatoria en el tamizaje farmacológico y la presencia de flavonoides en el ensayo fitoquímico, puede dar lugar a procesos de aislamiento y sometiendo a pruebas más específicas de estos compuestos (Palacios, 2008). Entre las distintas pruebas químicas de identificación tenemos:

1. Determinación de Alcaloides; mediante la prueba de Wagner; Mayer y Dragendorff; se fundamenta en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal de combinarse con el yodo y metales pesados formando precipitados (Domínguez, 1979).
2. Determinación de Saponinas; mediante la prueba de Altura de la Espuma; se basa en la presencia de un núcleo esteroidal o triterpénico; esta característica les confiere un carácter anfótero que les permite actuar como tensoactivos (Carvajal, Hata, Sierra y Rueda, 2009).
3. Determinación de Flavonoides; mediante la prueba de Shinoda; se fundamenta en la reacción del magnesio con el HCl concentrado y el hidrógeno generado produce la reducción del ion flavilio al color rojo escarlata (Domínguez, 1979).
4. Determinación de Fenoles; mediante la prueba de tricloruro férrico; esta respuesta se debe al ataque producido por el ion cloruro al hidrógeno del

grupo hidroxilo provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro, provocando una precipitación (Domínguez, 1979).

5. Determinación de Triterpenos; mediante la prueba de Lieberman-Burchard, la presencia de color es debido al grupo hidroxilo (-OH) del colesterol lo que genera un aumento en la conjugación de la insaturación del anillo, fusión adyacente (Domínguez, 1979).

6. Determinación de Taninos: mediante la prueba de la gelatina al 1 %, son polifenoles que tienen la propiedad de unirse a las proteínas y precipitarlas; la presencia de taninos se observa mediante un precipitado blanco (Carvajal, Hata, Sierra y Rueda, 2009).

7. Determinación de Quinonas: mediante la prueba de H_2SO_4 ; las quinonas son dicetonas insaturadas, que por reducción se convierten en polifenoles los que fácilmente las regenera por oxidación. Esta reacción da como resultado una coloración de amarilla a roja (Domínguez, 1979).

8. Determinación de Cumarinas: mediante la prueba de NH_4OH (Hidróxido de amonio concentrado), se basa en la apertura y solubilización en medio básico, se caracteriza por su intensa absorción en la región ultravioleta del espectro, las cuales al ser examinadas a la luz ultravioleta presentan una coloración en presencia de amoniaco (Domínguez, 1979).

Bacterias

Las bacterias son microorganismos procariotas que presentan un tamaño de unos pocos micrómetros (por lo general entre 0,5 y 5 μm de longitud) y diversas formas incluyendo filamentos, esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos). Las bacterias son células

procariotas, por lo que a diferencia de las células eucariotas (de animales, plantas, hongos) no tienen el núcleo definido ni presentan, en general, orgánulos membranosos internos. Generalmente poseen una pared celular y ésta se compone de peptidoglicano. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles (Mollinedo y González, 2014).

Clasificación de las Bacterias

Las bacterias se clasifican en dos grupos diferentes en función de la estructura de su pared. Un grupo, las denominadas Gram positivas, sólo poseen peptidoglicano; el otro, las denominadas Gram negativas, tienen adosada por fuera del peptidoglicano una membrana rica en lipopolisacáridos. Algunas bacterias tienen una cápsula rodeando la pared; también pueden poseer flagelos, que facilitan su movilidad, y fimbrias (Pili), que desarrollan varias funciones, fundamentalmente de adherencia. En las bacterias, además del ADN cromosómico (nucleoide) puede existir ADN extra cromosómico formando plásmidos (Prats, 2005).

Tipos de Bacterias

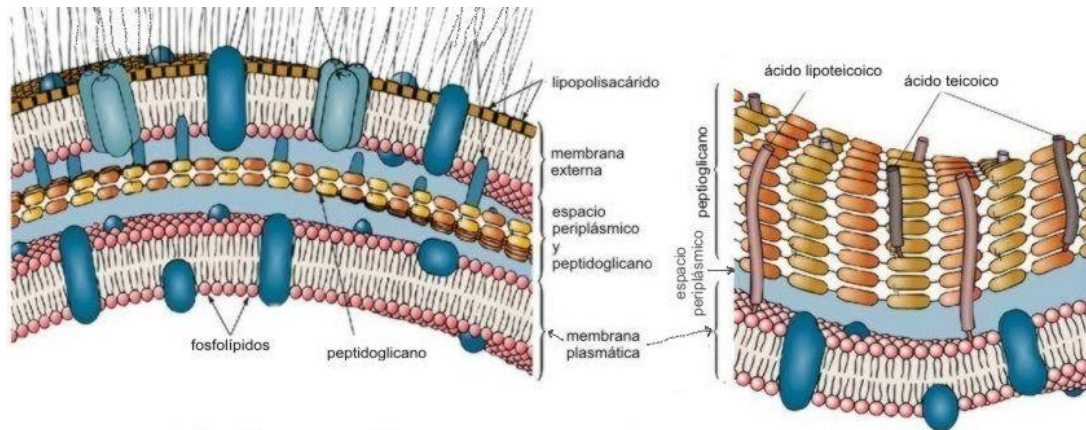
Bacterias Gram negativas

Se denominan bacterias Gram negativas a los microorganismos que tienen una reacción con la tinción Gram en su pared celular y se diferencian de las Gram positivas, pues no se tiñen de color azul oscuro o violeta, sino de color rosa y se constituyen de: Membrana plasmática formada por fosfolípidos, proteínas y enzimas; Pared celular, siendo estas más compleja que las Gram positivas, tanto química como estructuralmente. Sus

componentes son: Peptidoglicano o mureína, Espacio periplasmático, Membrana externa, proteínas y Lipopolisacáridos; también están constituidas de cápsula, capa de limo, flagelos y Fimbrias ver Figura 9 (Mollinedo y Gonzáles, 2014).

Las bacterias Gram negativas no retiene el complejo de cristal violeta durante el proceso de coloración y por lo tanto no es posible su tinción azul violácea, presentan una capa muy delgada de peptidoglucano en su pared celular y está unida, mediante lipoproteínas, a otra membrana plasmática externa, dicha membrana es soluble en solventes orgánicos. La patogenicidad de estas bacterias se debe a la presencia de lipopolisacáridos (endotoxinas) en la parte externa de la membrana celular, estas moléculas desencadenan una respuesta inmune, pues su antígeno genera un amplio espectro de efectos fisiopatológicos, que pueden desencadenar un shock endotóxico o incluso la muerte. Se determinó que varias especies de bacterias Gram negativas producen enfermedades (Mollinedo y Gonzáles, 2014).

Hay muchas especies de bacterias Gram negativas, agrupadas en varias familias y existen diferentes formas de clasificarlas según su: forma, óptimo de temperatura, pH en el que se desarrollan, requerimiento de oxígeno para poder permanecer con vida, ésta última clasifica a estos microorganismos en: bacterias aerobias estrictas y bacterias anaerobias (Mollinedo y Gonzáles, 2014).



Pared de Gram negativos

Pared de Gram positivos

Figura 9. Estructura de la pared celular bacteriana.

Tomado y modificado de Sánchez, 2006.

Bacterias Gram positivas

Consideradas Gram positivas se tiñen de color violeta y tiene una gruesa capa de peptidoglicano, dos tipos de ácidos teicoicos: el ácido lipoteicoico (ubicado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática) y el ácido teicoico (que se halla en la superficie, anclado solamente en el peptidoglicano) ver Figura 9. Entre las bacterias Gram positivas, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* spp. Son importantes agentes etiológicos de infecciones hospitalarias y comunitarias. Estos patógenos son responsables de altas tasas de morbilidad y mortalidad en pacientes hospitalizados y generan costos elevados en las instituciones de salud de todo el mundo (Mollinedo y Gonzáles, 2014).

Antibióticos

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferentes comportamientos farmacocinética y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo. El objetivo de la antibioticoterapia es controlar y disminuir el número de microorganismos viables, de modo que el sistema inmunológico sea capaz de eliminar la totalidad de los mismos (Velázquez, 2008).

Técnicas de Antibiograma Convencional

La mayoría de los laboratorios de microbiología clínica determinan la sensibilidad o la resistencia de los microorganismos empleando técnicas fenotípicas en las que se mide directamente la interacción entre microorganismo y antimicrobiano. Por lo cual, se emplean métodos de difusión, en los que el antimicrobiano se encuentra en un disco, una tableta o una tira que al ser colocado sobre un medio de cultivo donde crecerá la bacteria, forma un gradiente de concentración, o también métodos de dilución, en los que el antimicrobiano se incorpora al medio de cultivo donde crece la bacteria. Además, cada vez son más frecuentes los ensayos en los que se estudia si un microorganismo tiene un determinado mecanismo bioquímico o uno o más genes de resistencia (Ramírez y Marín, 2009).

Atendiendo a criterios técnicos, hay múltiples factores que influyen en el resultado del antibiograma incluyendo el medio de cultivo, el inóculo bacteriano, la atmósfera y la temperatura de incubación de los cultivos una vez inoculados, el tipo de crecimiento bacteriano y en el caso del método de difusión con disco, el contenido de este (Ramírez y Marín, 2009).

El medio de cultivo ideal para realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* debería tener una composición definida (peptonas, agar, electrólitos) que permitan el crecimiento rápido de la mayoría de los microorganismos y la adición de los suplementos (sangre, etc.) necesarios para el crecimiento de microorganismos; se debe tamponar los exoproductos bacterianos para que no ejerza un efecto antagónico con ningún antimicrobiano y finalmente tiene que asegurar la reproducibilidad del ensayo. El medio más empleado en microbiología clínica para la realización del antibiograma es el medio de Müeller-Hinton, en su versión sólida (con agar) o líquida (con concentraciones ajustadas de cationes para asegurar la reproducibilidad de los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de aminoglucósidos frente a *Pseudomonas aeruginosa* y de tetraciclinas frente a la gran mayoría de microorganismos (Ramírez y Marín, 2009).

Técnicas de Difusión

Las técnicas de difusión son bastante sencillas de realizar. El método disco-placa se basa en los estudios que a mediados del siglo pasado completaron Kirby-Bauer consiste en colocar discos de papel secante (o tabletas de material poroso con una concentración definida de antibiótico sobre una placa de agar, que previamente ha sido sembrada con un inóculo estandarizado de la bacteria a estudiar. Cuando el disco entra en contacto con el medio de cultivo (con cierta proporción de agua), el antibiótico que contiene difunde al medio y a su alrededor crea un gradiente de concentración. Si la bacteria se inhibe en presencia de alguna de las concentraciones de dicho gradiente, cuando haya crecimiento en la placa de agar se producirá una zona (halo) de inhibición (García, Fernández y Paredes, 1994).

Dependiendo del par microorganismo-antimicrobiano, el tamaño del halo es indicador del nivel de sensibilidad de la bacteria, este método se suele llevar a cabo empleando agar Múeller-Hinton y es útil para el estudio de la sensibilidad de bacterias de crecimiento rápido empleando el medio y las condiciones de incubación adecuados, también se puede destinar para muchos microorganismos de crecimiento fastidioso. La lectura de los halos de inhibición se suele hacer a las 16-20 horas de incubación, pero en determinados casos debe retrasarse hasta las 24 horas para asegurar la correcta identificación de las cepas resistentes, que podrían no ser evidentes antes de ese plazo (García, Fernández y Paredes, 1994).

En vez de usar discos de papel o tabletas, se pueden usar tiras que contienen a lo largo de la misma un gradiente de antimicrobiano que abarca un amplio rango de concentraciones, como el que puede emplearse en las técnicas de dilución. La cantidad de antimicrobiano incorporado a la tira va creciendo a lo largo de la misma, lo que determina que el gradiente que se crea en la placa una vez que se coloca la tira no sea lineal sino exponencial; por ello tras, la incubación de la placa y la consiguiente inhibición del crecimiento se forma una zona de inhibición con aspecto piriforme o elipsoidal (García, Fernández y Paredes, 1994).

El método ha sido calibrado de tal forma que el punto de contacto entre la tira y la zona donde se inicia la inhibición del crecimiento corresponde con la CMI del antimicrobiano. Así bien, el método ha sido evaluado en infinidad de microorganismos habiendo estudios que indican su posible utilidad para bacterias de crecimiento lento como levaduras y hongos filamentosos (García, Fernández y Paredes, 1994).

Técnicas de Dilución

Están basadas en valorar la inhibición del crecimiento bacteriano en una batería de tubos o placas con medio de cultivo que representan un rango de concentraciones del antimicrobiano a estudiar. A tal efecto, se preparan en el medio de cultivo adecuado (caldo o agar) diluciones del antimicrobiano, habitualmente en una escala discontinua de progresión geométrica en base con posterioridad se inoculan los tubos o placas para permitir el crecimiento, y tras ello se realiza la lectura observando en qué concentración sobreviene la inhibición del microorganismo, lo que permite definir la CMI del antimicrobiano en cuestión. Cuando se emplea un medio líquido, además, se puede determinar la actividad bactericida realizando un subcultivo de los medios sembrados previamente en un medio de cultivo nuevo que no tenga antimicrobiano (García, Fernández y Paredes, 1994).

En la variante de macrodilución en caldo se emplea por cada bacteria y antibiótico a estudiar una batería de tubos, en la que cada uno de ellos contiene una concentración creciente de antimicrobiano. Como se requiere gran cantidad de material para llevar a cabo el ensayo, y este es complejo metodológicamente, se recurre con frecuencia al método de microdilución con caldo, en el que cada batería de tubos es sustituida por una fila o una columna de una placa de microtitulación con fondo en “U”; el uso de micropipetas de dispensación múltiple facilita el manejo de las placas y disminuye considerablemente la cantidad de material que se requiere en las mismas; todo ello, junto con la posibilidad de hacer lectura automática de las placas una vez se haya producido el crecimiento (o la inhibición) del microorganismo ha popularizado el uso de este método (García, Fernández y Paredes, 1994).

Como alternativa a la macrodilución en caldo y antes del desarrollo de la técnica de microdilución en medio líquido, se empleó con frecuencia el

método de dilución en agar, en el que los tubos de la batería de macrodilución son sustituidos por placas de medio sólido, cada una con una concentración diferente de antimicrobiano que es añadido al medio antes de que este se emplee como control de crecimiento. En cada placa se pueden sembrar simultáneamente muchos microorganismos entre 32 y 36. Tras la correspondiente incubación de las placas, se observa a simple vista en qué placa con más baja concentración se produce la ausencia de crecimiento del microorganismo, obteniéndose así el valor de la CMI (García, Fernández y Paredes, 1994).

Interpretación de Resultados del Antibiograma

Los datos crudos del antibiograma se interpretan en forma de categorías clínicas aplicadas a los microorganismos estudiados, de las que habitualmente se manejan tres: sensible (S), intermedio (I) y resistente(R) (Martínez, 2016).

De forma general, la categoría de “sensible” indica que el microorganismo está causando una infección que puede tratarse adecuadamente con las dosis habituales de antimicrobiano. La categoría de “intermedio”, que en sangre o tejidos se alcanzan concentraciones cercanas a los valores de CMI y que es de esperar eficacia clínica si la infección se localiza donde se alcanzan altas concentraciones de antimicrobiano por ejemplo en orina o cuando se emplean dosis más elevadas de lo habitual, tradicionalmente, la categoría de “intermedio” también se emplea para incluir valores de CMI o halos de inhibición que pudieran estar influidos por pequeños errores técnicos durante el desarrollo del ensayo pero que se traducirían en cambios importantes de interpretación en la categoría clínica (Ramírez y Marín, 2009).

La bacteria será “resistente” cuando no es de esperar que se inhiba con las concentraciones de antimicrobiano que se alcanzan habitualmente in vivo; también se aplica la categoría de “resistente” a las bacterias que poseen un mecanismo de resistencia específico para el que se ha demostrado que su presencia es causa de fracaso terapéutico (Ramírez y Marín, 2009).

Definición Operacional de Términos

Taxonomía

La taxonomía es una ciencia que procura identificar, delimitar, nombra y clasificar las especies. Se trata de la ciencia de la clasificación que se aplica en la biología para la ordenación sistemática y jerarquizada de los grupos de animales y vegetales (Barrientos, 2003).

Etnobotánica

Es el campo científico que estudia las interrelaciones que se establecen entre el hombre y las plantas, a través del tiempo y en diferentes ambientes. Estudia los conocimientos que las diferentes culturas han adquirido a lo largo del tiempo sobre las propiedades y potencialidades de las plantas (Barrera, 1982).

Fitoquímica

Este vocablo proviene del griego *Phyton* (Planta o vegetal), literalmente significa, química de las plantas. Comprende el estudio de las

sustancias vegetales, extracción, separación, purificación y elucidación de sus estructuras moleculares, para dichos análisis de determinación comúnmente se emplea reacciones colorimétricas (Albornoz, 1980).

Producto Natural

Es toda sustancia de origen orgánico o inorgánico que se halle en la naturaleza y que pueda ser aislada y procesada por el hombre. Cuando se habla de producto natural mejorado es porque ha sido perfeccionado mediante algún proceso físico y no significa que se ha mezclado artificialmente con otras sustancias (Albornoz, 1980).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en $\mu\text{g/mL}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37 °C. La CMI se ha establecido como "*gold Standard*" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado (Romero, 2007).

Resistencia Bacteriana

Cuando los microorganismos sobreviven a una concentración de antibiótico mayor a la que puede alcanzarse *in vivo*. La resistencia bacteriana a los antibióticos es un aspecto particular de su evolución natural, seleccionada bajo la presión de los productos antibacterianos, tanto si se trata de antibióticos como de antisépticos o desinfectantes. Este fenómeno

mundial incluye todos los gérmenes patógenos para el ser humano y las diversas clases de antibióticos (Oromí, 2000).

Susceptibilidad

Consiste en estudios *in vitro* donde se enfrentan bacterias con antimicrobianos, usando un mismo número de bacterias a diferentes concentraciones de antibióticos, para obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la resistencia antimicrobiana (Romero, 2007).

Operacionalización de las Variables

Las variables son una característica, cualidad o medida que puede sufrir cambios y que es objeto de análisis, medición o control en una investigación. De esta manera, pueden clasificarse según su función en; dependiente e independiente. La variable dependiente es aquella que se modifica por acción de la variable independiente, constituyen los efectos o consecuencias que se miden y que dan origen a los resultados de una investigación. Mientras que la variable independiente son las causas que generan y explican los cambios de la variable dependiente (Tablas 3 y 4) (Arias, 2004).

Tabla 3. Operacionalización de la variable dependiente Actividad Antibacteriana del extracto de las hojas de *Amaranthus dubius*

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana del extracto de las hojas de <i>Amaranthus dubius</i>	Dependiente Cualitativa Nominal	Capacidad que poseen algunas sustancias de inhibir el crecimiento de determinadas bacterias en un medio de cultivo (Betés y cols., 2008)
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
Difusión en disco en agar (Prueba de Kirby y Bauer)	Cepas Gram positivas: - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> Cepas Gram negativas: - <i>Escherichia coli</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Presencia de halos de Inhibición en milímetros (mm).

Fuente: Contreras, Soto y Lara, 2024

Tabla 4. Operacionalización de la variable independiente Composición química del extracto de las hojas de *Amaranthus dubius*

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición conceptual ¿Qué es?
Composición química del extracto de las hojas de <i>Amaranthus dubius</i>	Independiente Cualitativa Nominal	Son compuestos derivados del metabolismo secundario de las plantas, no tienen función reconocida en los procesos vitales y tienen distribución restringida en el reino vegetal (Taíz y Zeiger, 2006).
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
Mediante métodos químicos que dan reacciones de color. (Pruebas Cualitativas preliminares).	Las pruebas químicas cualitativas a realizar para: -Alcaloides: prueba de Dragendorff, Wagner y Mayer. -Triterpenos y/o Esteroles: prueba de Liebermann Burchard. -Compuestos fenólicos: prueba de cloruro férrico. -Saponinas: prueba de espuma. -Taninos: prueba con gelatina. -Flavonoides: prueba Shinoda y NaOH al 10 %. -Cumarinas: prueba con hidróxido de amonio. -Antraquinonas: prueba con hidróxido de amonio. -Quinonas: prueba con ácido sulfúrico concentrado. -Lactonas: ensayo de Baljet. -Glucósidos cardiotónicos: prueba Keller-Kilani	-Alcaloides: aparición de turbidez o precipitado. -Triterpenos y/o Esteroles: coloración azul o verde y rojo para triterpenos. -Compuestos fenólicos: coloración de azul a negro. -Saponinas: formación de abundante espuma. -Taninos: precipitado blanco. -Flavonoides: coloración naranja a rojo para flavonas; rojo para flavonoles y magenta para flavononas. -Cumarinas: La presencia de fluorescencia azul violeta. -Antraquinonas y quinonas: coloración roja. -Lactonas: coloraciones roja, violeta o rosa. -Glucósidos cardiotónicos: anillo marrón o violeta.

Fuente: Contreras, Soto y Lara, 2024.

Hipótesis

Estudios anteriores de especies del género *Amaranthus*, han reportado la presencia de diferentes metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, flavonoides, taninos y alcaloides; además de mostrar diversas actividades biológicas, por lo que es de esperar que el extracto de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart presente una composición química similar y posea actividad antibacteriana frente a cepas Gram positivas y Gram negativas de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Existen varios tipos de investigación, los cuales revelan el grado de elaboración del proceso indagatorio. Específicamente, los tipos pueden ser: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa (Hurtado, 2010). En tal sentido, esta investigación fue confirmatoria ya que se confirmó la relación causa-efecto entre la composición química y la actividad antibacteriana de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart en cepas bacterianas de referencia internacional.

Diseño de Investigación

Para recolectar los datos se requiere métodos que refieran el diseño de investigación. Específicamente estas estrategias están relacionadas con el dónde, cuándo, se recolectaran los datos y con la amplitud de la información. En tal sentido, el diseño de esta investigación fue mixto, siendo por lo tanto de campo (porque las hojas frescas de *Amaranthus dubius* Mart se recolectaron directamente en el Municipio Tovar, Estado Mérida) y de laboratorio (porque las muestras de hojas se procesaron en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, con el fin de obtener extractos de las hojas de *Amaranthus* mediante reflujo), además, el diseño fue contemporáneo y transversal, ya que los datos se obtuvieron en el

presente y se tomaron una sola vez. También fue bivariable, debido a que hay una variable dependiente y otra independiente.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

La unidad de investigación estuvo representada por las hojas de la especie *Amaranthus dubius* Mart.

Selección del Tamaño de la Muestra

La muestra es un subconjunto o parte del universo o población en que se lleva a cabo la investigación es decir, una parte representativa de la población (Arias, 2004). En este caso la muestra fue no probabilística, la N muestral fue 1,75 kilogramos de hojas frescas de *Amaranthus dubius* Mart.

Sistema de Variables

Las variables de esta investigación son: Actividad Antibacteriana y composición de las hojas de *Amaranthus dubius*. Están sistematizadas como variables dependiente e independiente. La variable dependiente es: actividad antibacteriana. La variable independiente es: La composición química.

Instrumentos de Recolección de Datos

Un instrumento de recolección de datos es un recurso que permite registrar y almacenar información del proceso de investigación, las técnicas de recolección de datos se basan en las distintas formas de obtener la información verbal o escrita (Arias, 2006). En esta investigación se utilizaron tablas y fotografías que permitieron clasificar las variables del estudio y reportar los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico, así como, la presencia de halos de inhibición microbiana en la prueba de susceptibilidad.

Procedimiento de la Investigación

Para este estudio, se utilizó 1,75 kilogramos de hojas de *Amaranthus dubius* Mart., posteriormente se procedió secarlas en estufa, se molieron y se sometieron a un proceso de extracción en caliente por reflujo. El solvente que se utilizó fue etanol, con el fin de obtener un extracto, luego se aplicó el tamizaje fitoquímico para identificar los grupos químicos y se empleó el método de Kirby-Bauer para determinar la actividad antibacteriana presente en dichos extractos. A continuación se describen los procedimientos que se realizaron en esta investigación:

Recolección del material vegetal

Se recolectaron 1,75 Kg de hojas de la planta de estudio en el sector El Llano del Municipio Tovar del Estado Mérida.

Obtención de los extractos de la especie vegetal

Las hojas seleccionadas para el estudio se colocaron a secar en la estufa a 40 °C posteriormente se molieron obteniendo un peso de 241,40 g, para la obtención de los extractos se pesaron 100 g del material vegetal, los cuales, se agregaron en un balón redondo, seguidamente, se añadieron 750 mL del solvente extractor (etanol) y 5 perlitas de ebullición, después la mezcla se sometió a un proceso de extracción por reflujo (con un refrigerante de reflujo), a una temperatura de 50 °C hasta ebullición, luego se disminuyó la temperatura y se mantuvo dicho proceso durante una hora (hasta observar goteo de solvente por la superficie del balón), pasada la hora se dejó enfriar para proceder a filtrar en un matraz haciendo uso de un papel de filtro (Salazar, Jaime y Baca, 2010).

El siguiente procedimiento que se realizó fue la concentración del extracto, para lo cual se utilizó un rotavapor a presión reducida y a una temperatura de 60 °C, con la finalidad de separar el extracto del solvente extractor (ver Figura 10), y en un frasco de vidrio, el cual se pesó obteniéndose 98,64 g, se colocó el extracto, éste se llevó a la estufa durante una semana a una temperatura de 40 °C para el secado del extracto, luego se pesó obteniéndose 106,16 g, los cuales corresponden al frasco de vidrio vacío más el extracto de etanol (Delgado y Romo, 2022).



Figura 10. Extracción por reflujo.

Fuente: Contreras, Soto y Lara, 2024.

Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en el extracto de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart

La evaluación fitoquímica se realizó bajo la asesoría de la Prof. Alida Pérez, aplicando un conjunto de pruebas cualitativas para conocer los principales grupos de compuestos químicos (metabolitos secundarios) presentes en las hojas de la planta de interés que posee el extracto obtenido en la extracción previa. Las pruebas realizadas se describen a continuación:

Reconocimiento de Alcaloides

En este ensayo se utilizaron los reactivos de Mayer, Wagner y Dragendorff. Se tomó una porción del extracto etanólico, se le adiciono ácido clorhídrico (HCl) 0,1 N se calentó en baño de María y se esperó a que tomara temperatura ambiente (enfriamiento), esto para que se liberen las

sales presentes en los alcaloides; luego se tomaron tres tubos de ensayo debidamente identificados con cada reactivo, se adicionó cierta cantidad de muestra en cada tubo junto con los reactivos de Mayer, Wagner y Dragendorff hasta la aparición de turbidez o precipitado. Se considera como positiva las pruebas que formen un precipitado de naranja a rojo (Wagner), precipitado de blanco a naranja (Mayer y Dragendorff) (Carvajal, Hata, Sierra y Rueda, 2009).

Reconocimiento de esteroides y/o triterpenos

Se empleó la reacción de Lieberman Burchard; para lo cual se colocó una pequeña porción del extracto en un tubo para realizar una dilución de la siguiente forma: Cloroformo (70): Metanol (30). Luego, se agregó una pequeña cantidad de la dilución a un tubo previamente rotulado y se llevó al ultrasonic para que se disolviera la muestra, posteriormente, se agregó anhídrido acético al tubo y por las paredes del tubo con cuidado se adicionó ácido sulfúrico observando el cambio de color de la reacción, tomando en cuenta el color rojo positivo para triterpenos y el color verde positivo para esteroides (Salazar, Jaime y Baca, 2010).

Reconocimiento de compuestos fenólicos

A un tubo de ensayo con extracto etanólico se le agregó una pequeña cantidad de solvente (etanol) y se llevó al ultrasonic una vez se sacó de allí se le añadió al tubo cloruro férrico (FeCl_3), la formación de coloración indica presencia de compuestos fenólicos. La coloración verde oscura o negra indica la positividad de la prueba (Bermejo, Pereira, Cintra y Morales, 2014).

Reconocimiento de saponinas

Para la determinación de saponinas se realiza la prueba de altura y estabilidad de espuma, para ello, se tomó un tubo de ensayo con muestra del extracto etanólico, se agitó vigorosamente para ver la presencia de espuma y tamaño indicando la positividad, de lo contrario si no se forma espuma es negativo (Colina y Huamán, 2016).

Reconocimiento de taninos

Se realizó la prueba de la gelatina, para lo cual una pequeña porción del extracto diluido se mezcla con una solución acuosa de gelatina, la aparición de un precipitado o rompimiento del medio indica la positividad del ensayo (Colina y Huamán, 2016).

Reconocimiento de flavonoides

Se empleó la reacción de Shinoda, para lo cual se utilizaron virutas de magnesio, ácido clorhídrico concentrado y el extracto de la especie, en otro tubo se agregó una pequeña cantidad de hidróxido de sodio al 10 % y una porción del extracto etanólico, la aparición de una coloración de naranja a rojo es indicativo de la presencia de flavonoides (Carvajal, Hata, Sierra y Rueda, 2009).

Reconocimiento de cumarinas

Se usó la reacción con hidróxido de amonio concentrado, se agregó a un tubo el extracto de la planta y gotas de disolvente etanol, luego se agregó el

hidróxido de amonio concentrado, la presencia de fluorescencia azul indicaría la positividad de la prueba, esta se observó en un cuarto oscuro con una lámpara ultravioleta (Salazar, Jaime y Baca, 2010).

Reconocimiento de antraquinonas

Se empleó el hidróxido de amonio concentrado el cual se agregó al extracto en un tubo de ensayo previamente identificado y se observó si había o no viraje de color rojo, lo que indica positividad para antraquinonas (Carvajal, Hata, Sierra y Rueda, 2009).

Reconocimiento de quinonas

Se colocó una pequeña porción del extracto en una placa y se le agregó ácido sulfúrico concentrado, luego se procedió a observar si en la superficie de la placa se tornaba una coloración rojo lo cual indica la presencia de quinonas (Salazar, Jaime y Baca, 2010).

Reconocimiento de lactonas y sesquiterpenos

Para dicha determinación una porción del extracto se colocó en un tubo y se llevó al ultrasonic, luego se le agregó hidróxido de sodio al 10 % y ácido clorhídrico, se evidencia la aparición de un precipitado o coloración (Pereira, Vega, Almeida y Morales, 2009).

Determinación de la Actividad Antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart por el Método de Difusión en disco (Kirby-Bauer)

Se utilizó la técnica de difusión en disco en agar Müeller- Hinton, método originalmente descrito por Bauer y colaboradores (método de Kirby-Bauer). Esta prueba se desarrolló en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigación de la Universidad de Los Andes (ULA). Bajo la asesoría de la Prof. Yndra Córdero y el auxiliar de laboratorio Emilio Salazar.

Bacterias Estudiadas

Para esta investigación se utilizaron 5 especies de bacterias, 2 especies pertenecientes a las bacterias Gram positivas y tres de tipo Gram negativas, estas bacterias son cepas de la Colección de Cultivos de Tipo Americano (ATCC), se obtuvieron del Cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (Tabla 5).

Tabla 5. Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).

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

Fuente: Tomado y modificado de CLSI, 2020.

Preparación de Placas

El medio de cultivo se preparó en placas de Petri, se colocó aproximadamente 20 mL de agar Müeller- Hinton estéril y se dejó solidificar a temperatura ambiente.

Preparación de pre-inóculos bacterianos

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

Preparación de los inóculos bacterianos

Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas, se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa estéril, tomándose de esta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en tubos 13x100 previamente estéril que contenían 5 mL de una solución de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0,9 % hasta que alcanzó una turbidez equivalente al patrón de McFarland ($0,5 \times 10^8$ UFC/mL).

Inoculación de las placas

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

Preparación y colocación 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 (UV), durante toda una noche. Previo a la preparación del inóculo se impregnaron los discos de papel con 10 µL de la dilución 10 mg/mL. También se utilizaron discos de antibióticos comerciales (Eritromicina, Ampicilina y Piperacilina) (Tabla 6) 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) (Anon, 2003).

Tabla 6. Antibióticos empleados como control positivo para el estudio de la actividad antibacteriana.

Bacterias (ATCC)		Antibióticos comerciales		
		E (15 µg)	AMP (10 µg)	PIP (100 µg)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	32 mm	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	-	32 mm	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	-	-	27 mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 23357	-	-	27 mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	-	-	27 mm

Leyenda: Lectura de los halos de la inhibición de los antibióticos realizados en el laboratorio frente a cepas ATCC: Eritromicina ® (**E**), Ampicilina ® (**AMP**), Piperacilina ® (**PIP**), Milímetros (**mm**).

Tomado y modificado de CLSI, 2020.

Pre-incubación e incubación de las placas

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

Lectura de las placas

Luego de ser incubadas cada una de las placas por un lapso de tiempo de 24 horas 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. El diámetro de la zona de inhibición producto de la actividad antibacteriana de las muestras en estudio se expresó en milímetros (mm) (Bauer, Kirby, Sherris y Turck, 1966).

Diseño de Análisis de los Datos

Existen dos tipos de enfoques de investigación: Cuantitativa y cualitativa, según lo han referido Palella y Martins (2010). En esta investigación se utilizaron ambos enfoques, a través de los cuales se analizaron los datos obtenidos. El enfoque cuantitativo es secuencial y probatorio, estuvo dado por la actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de

Amaranthus dubius Mart, aquí se analizaron numéricamente los datos recolectados de la unidad de investigación en cuanto a al diámetro del halo de inhibición, sin requerir análisis estadístico. Por otra parte, el enfoque cualitativo no se basa en expresiones numéricas ni mediciones, sino en características, cualidades y observaciones de la unidad de investigación, en este caso estuvo representado por las características químicas observadas en las reacciones o pruebas de identificación que se realizaron en el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart las cuales se basan en reacciones de color y precipitación par indicar la presencia de los compuestos químicos estudiados.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Las hojas de *Amaranthus dubius* Mart, fueron sometidas a un proceso de extracción por reflujo, realizando un extracto con un solvente orgánico (etanol) que fue concentrado hasta la sequedad con la implementación de un rotavapor a presión y temperatura controlada, obteniéndose 7,52 gramos del extracto de etanol (Tabla 7).

Tabla 7. Pesos obtenidos y porcentaje de rendimiento del extracto vegetal de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart.

Parte de la planta	Peso	Peso del Extracto	Rendimiento del extracto
Hojas secas molidas	100 gramos	7,52 gramos	7,52 %

Fuente: Contreras, Soto y Lara, 2024.

Según afirman Ortega, Carretero y Villar (2002), una cantidad superior a 1,5 gramos del extracto debe ser considerada como óptima para el análisis de la muestra, es decir, que se logró obtener una cantidad de extracto vegetal suficiente para la evaluación, luego, fue necesario calcular el porcentaje de rendimiento de la misma. De acuerdo a Martínez, Ruíz, Arias y Stashenko (2014), el porcentaje de rendimiento varía de acuerdo con el tratamiento de la planta, es decir, que de acuerdo con su origen, los

extractos naturales, artificiales y sintéticos difieren en el porcentaje de rendimiento, en este caso, con base en lo estipulado por los autores, por tratarse de un extracto de origen natural el rendimiento normalmente será bajo.

Estudio fitoquímico preliminar

El extracto de etanol obtenido de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart fue sometido a las pruebas químicas preestablecidas para conocer los grupo de metabolitos secundarios presentes en la muestra, la revelación de cada uno de los componentes químicos fue cualitativa y se pudo observar mediante reacciones químicas como: viraje de color, precipitados, turbidez del medio, producción de espuma y fluorescencia por exposición a la luz ultravioleta (UV), lo cual fue el principal indicativo de la presencia de metabolitos secundarios presentes en la especie (Tabla 8 y 9).

Tabla 8. Reporte de los resultados del estudio fitoquímico realizado al extracto de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart.

Metabolitos secundarios y pruebas químicas	Extracto de etanol
Alcaloides	
Dragendorff	(+) Precipitado naranja
Wagner	-
Mayer	-
Triterpenos/esteroles	
Lieberman-Burchard	(+) verde → esteroles (+) rojo → triterpenos

Leyenda: Negativo: (-), Positivo: (+), Moderado: (++)

Fuente: Contreras, Soto y Lara, 2024.

Tabla 8. Reporte de los resultados del estudio fitoquímico realizado al extracto de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart (continuación).

Metabolitos secundarios y pruebas químicas	Extracto de etanol
Compuestos fenólicos	
Tricloruro férrico	(+) verde
Saponinas	
Altura de la espuma	-
Taninos	
Prueba de la gelatina	-
Flavonoides	
Shinoda	-
Hidróxido de Sodio 10 %	-
Cumarinas	
Hidróxido de Amonio concentrado	-
Antraquinonas	
Hidróxido de Amonio	-
Quinonas	
Ácido Sulfúrico concentrado	-
Lactonas/ sesquiterpenos	
Hidróxido de Sodio + Ácido Clorhídrico	-

Leyenda: Negativo: (-), Positivo: (+), Moderado: (++)

Fuente: Contreras, Soto y Lara, 2024.

Tabla 9. Reporte ilustrado de los resultados (positivos) obtenidos del estudio fitoquímico del extracto de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart.

Prueba	Reporte
	Prueba: Dragendorff Metabolito determinado: Alcaloides Reporte: Positivo, formación de precipitado naranja.
	Prueba: Lieberman-Burchard Metabolito determinado: Triterpenos/ esteroides. Reporte: viraje de color verde para esteroides rojo para triterpenos.

Fuente: Contreras, Soto y Lara, 2024.

Evaluación de la Actividad Antibacteriana

La actividad antibacteriana se determinó mediante el método de difusión en disco en agar (Kirby-Bauer), en el extracto etanólico de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart, a una concentración de 10 mg/mL, frente a las diferentes cepas bacterianas ATCC: dos especies Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), y tres especies Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

Los resultados de la actividad antibacteriana se muestran en la (Tabla 10 y 11).

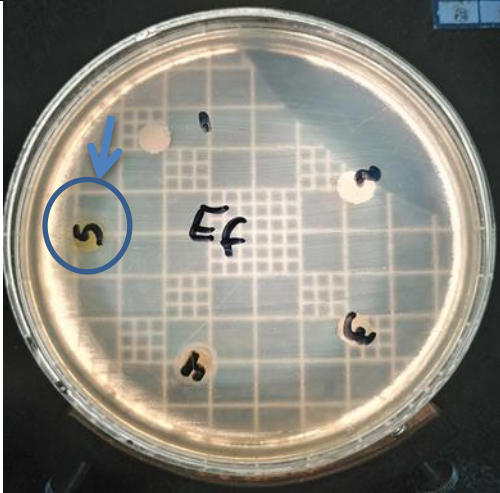
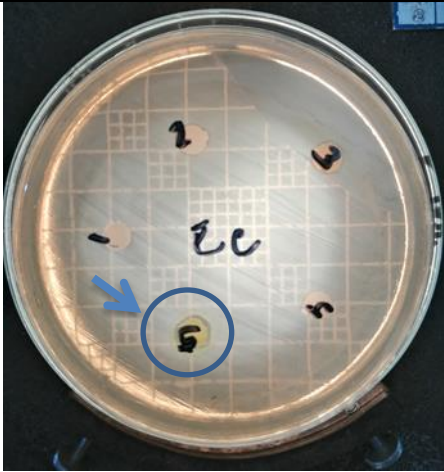
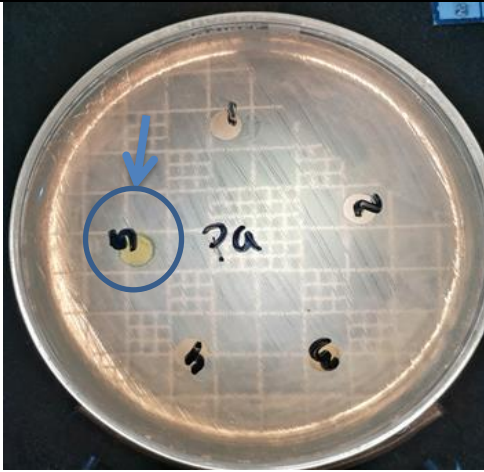
Tabla 10. Resultados obtenidos en la determinación de la Actividad Antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart.

	Halos de inhibición en milímetros de bacterias ATCC				
Muestras ensayadas [] 10 mg/mL	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357
EEH	10	8	8	7	8
Controles positivos					
Eritromicina (E)	32	-	-	-	-
Ampicilina (AMP)	-	32	-	-	-
Piperacilina (PIP)	-	-	27	27	27
Control negativo					
DMSO	0	0	0	0	0

Leyenda: **(EEH)**: Extracto de etanol de hojas, **(DMSO)**: dimetilsulfóxido.

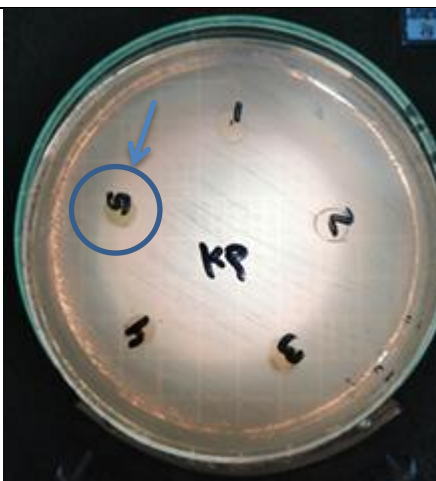
Fuente: Contreras, Soto y Lara, 2024.

Tabla 11. Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart.

Prueba: Difusión en disco en agar (Kirby- Bauer)	
 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 Disco N° 5	 <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 Disco N° 5
 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 Disco N° 5	 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 Disco N° 5

Fuente: Contreras, Soto y Lara, 2024.

Tabla 11. Reporte ilustrado de los resultados de la actividad antibacteriana del extracto de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart (continuación).



Klebsiella pneumoniae

ATCC 23357

Disco N° 5

Fuente: Contreras, Soto y Lara, 2024.

Discusiones

En esta investigación se obtuvo mediante la técnica de reflujo en caliente un extracto de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart, dichos extractos evidenciaron a través de pruebas químicas cualitativas la presencia de algunos metabolitos secundarios como esteroides, compuestos fenólicos y alcaloides (Tabla 8). Así mismo se estudió la actividad antibacteriana mediante la técnica de difusión en disco en agar Müeller-Hinton. Los resultados obtenidos en los estudios anteriores con respecto a la caracterización fitoquímica y la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de especies de la familia Amaranthaceae presentaron similitudes con respecto a esta investigación.

El estudio realizado por Bari y Alfaki en 2023 para examinar los efectos antibacterianos de un extracto de semillas de *Amaranthus caudatus* sobre *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae*, reveló la presencia de taninos, flavonoides, fenoles y proteínas, utilizando como método para el análisis fitoquímico cromatografía de gases/espectrometría de masas, la obtención del extracto se realizó mediante el aparato de soxhlet utilizando metanol como disolvente. La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó mediante la técnica de difusión en pozo y dilución en caldo obteniendo como resultado la inhibición del crecimiento de los microorganismos a prueba, *Acinetobacter baumannii* 22 mm a 500 mg, 17 mm a 250 mg, 14 mm a 125 mg y *Klebsiella pneumoniae* 24 mm a 500 mg, 18 mm a 250 mg y 15 mm a 125 mg. En relación a nuestra investigación, el análisis fitoquímico preliminar se realizó mediante pruebas colorimétricas, logrando evidenciar la presencia de esteroides, compuestos fenólicos y alcaloides en el extracto de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius*, el cual se obtuvo mediante la técnica de reflujo en caliente. La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de difusión en disco en agar

(Kiby-Bauer) obteniendo un halo de inhibición de 8 mm frente a *Klebsiella pneumoniae*, a una concentración de 10 mg/mL.

El estudio realizado por Díaz y Tineo (2022), demostró que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* contiene metabolitos bioactivos como compuestos fenólicos, quinonas, triterpenos y alcaloides, con respecto a la actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* determinaron que el extracto de hojas presentó actividad antibacteriana a diferentes porcentajes de concentración. Los halos de inhibición que demuestran la actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* fueron de $13,13 \pm 0,26$ mm al 100 %, de $12,62 \pm 0,32$ mm al 75 % y de $11,11 \pm 0,28$ mm al 50 %, para el control positivo (ciprofloxacino) fue de $26,63 \pm 0,26$ mm. En esta investigación se determinó mediante ensayo fitoquímico la presencia de compuestos fenólicos, esteroides y alcaloides en las hojas de *Amaranthus dubius* Mart, en relación a la actividad antibacteriana en nuestra investigación se obtuvo un halo de inhibición de 8 mm frente a *Escherichia coli*.

Asimismo, Guzmán, Rodríguez y Rojas (2021), en su investigación obtuvieron un extracto etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* al cual le realizaron tamizaje fitoquímico y determinación de actividad antibacteriana, obteniendo compuestos fenólicos, quinonas, triterpenos y alcaloides en el ensayo fitoquímico, en referencia a la actividad antibacteriana el extracto a 500 mg/mL mostró actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* presentando un halo de inhibición de $8,86 \pm 0,25$ mm. Al establecer comparaciones, con nuestra investigación se evidenció la presencia de compuestos fenólicos, esteroides y alcaloides una vez realizado el tamizaje fitoquímico, en lo que respecta a la actividad antibacteriana se observó cierta sensibilidad, puesto que el extracto presentó un halo de

inhibición de 10 mm para *Staphylococcus aureus* a una concentración 10 mg/mL.

Por otra parte, Cardona, Hincapié y Marín (2020), en su investigación sobre actividad antibacteriana de extractos de semillas de *Chenopodium quinoa* Wild. Determinaron que el extracto metanólico de la planta en estudio a una concentración de 20 mg/mL generó diámetros promedio de inhibición de 28,33 mm para *S. aureus* y 30 mm para *E. coli* lo cual se catalogó como baja sensibilidad, como control positivo utilizaron ampicilina (1 g/mL). En esta investigación el halo de inhibición del extracto etanólico de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart frente a *S. aureus* fue de 10 mm usando como control positivo eritromicina (15 µg) y 8 mm para *E. coli* usando peracilina (100 µg) como control positivo, teniendo en cuenta la diferencia en la especie, el solvente, la concentración y la parte de la planta utilizada para la investigación.

La actividad antibacteriana del extracto de hojas de *Amaranthus dubius* puede estar relacionada con los compuestos fenólicos presentes en el extracto de la planta debido a sus propiedades prooxidativas. Se observó que las bacterias Gram positivas son más sensibles al extracto de etanol de las hojas de *A. dubius* que las bacterias Gram negativas. Debido a que las bacterias Gram negativas tienen una membrana celular compleja que limita la entrada de sustancias antibióticas, impidiendo el acceso a la membrana celular (Shegebayev y cols., 2023).

Los compuestos fenólicos son los fitoquímicos más simples constituidos por un grupo fenol, los lugares y el número de grupos hidroxilo (OH) en el anillo parecen estar directamente relacionados con la toxicidad frente a los microorganismos, de tal manera que un aumento la hidroxilación está ligado a una mayor toxicidad. El mecanismo de acción parece estar ligado con la inhibición enzimática de los compuestos oxidados, posiblemente mediante

reacciones de los grupos sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas (Domingo y López, 2003).

De acuerdo a su diversidad química los fenoles tienen funciones muy diversas en las plantas, muchos tienen funciones citotóxicas importantes en la defensa de las plantas. Están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Por lo tanto, juegan una serie de diferentes funciones como: la metabólica, de crecimiento, de reproducción y de protección frente a organismos patógenos: virus, bacterias, hongos, protozoarios y nematodos, depredadores: insectos y herbívoros, y de condiciones ambientales estrés y radiación ultravioleta. Muchos de estos compuestos son los responsables del color de las plantas y de algunos de los efectos benéficos en la salud. Asimismo tienen potencial en la industria alimentaria y farmacéutica, al contener moléculas con diversas actividades biológicas como antioxidantes y antimicrobianos, entre otras (Albarca y Petricevich, 2017).

Para realizar el estudio de la actividad antibacteriana en extractos de plantas es necesario tener en cuenta la naturaleza del extracto, para seleccionar la metodología a emplear, así para extractos no polares o sustancias que no difundan bien en el agar es recomendable técnicas de dilución y no de difusión, así mismo, la composición química del medio de cultivo puede influir en la actividad del extracto estudiado (Ramírez y Marin, 2009).

En esta investigación se utilizó la técnica de difusión en disco en agar este método de sensidiscos presenta varias desventajas, una de ellas es la composición química del papel de filtro whatman el cual está compuesto por celulosa (uniones β -(1-4) de monómeros de glucosa), los cuales tienen muchos grupos hidroxilo libres presentes en cada glucosa haciendo que la superficie sea hidrofílica intervinendo con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión de estos en el agar, los compuestos apolares pueden

no ser influenciados y difundir con mayor facilidad en el agar (Ramírez y Marín, 2009).

Por su parte, las técnicas de dilución en agar o en caldo empleadas en algunos trabajos previos son útiles para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y presentan la ventaja de tener mayor sensibilidad para cantidades o concentraciones pequeñas (Ramírez y Marín, 2009).

La elección de un solvente apropiado es un paso fundamental ya que debe mostrar una alta selectividad en el proceso de extracción. La eficiencia tanto en términos cuantitativos como cualitativos de la extracción está altamente influenciada por la polaridad del solvente seleccionado, el solvente debe tener la capacidad de disolver el analito y minimizar la extracción simultánea de otros componentes presentes en la muestra. La extracción con solventes orgánicos es eficiente. Además, la temperatura desempeña un papel significativo en la velocidad de extracción. La extracción de compuestos fenólicos está condicionada por la textura y contenido acuoso de material vegetal. Para sustancias de alta y mediana polaridad se utilizan solventes como acetato de etilo (medianamente polar) etanol (polar) y metanol (altamente polar), por lo tanto, a mayor polaridad del solvente mayor será la efectividad de la extracción de compuestos bioactivos del material vegetal (Sailema, Salazar, Palacios, Carrera y Zambrano, 2023).

Por lo cual, existe la posibilidad de que los resultados obtenidos no hayan sido más significativos debido al solvente, el método de extracción, y la ubicación geográfica de la planta, ya que esta debe adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes (Alcamo, Floerke y Maerker, 2007). Para la obtención de mayor sensibilidad frente a las cepas bacterianas estudiadas, se pudo haber utilizado mayor concentración del extracto, además de aplicar los métodos de dilución para determinar la concentración

mínima inhibitoria (CMI), lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales (Ramírez y Marín, 2009).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

1. La composición química de los extractos se analizó mediante el ensayo fitoquímico preliminar (Screening fitoquímico) logrando la identificación de metabolitos bioactivos como: compuestos fenólicos, esteroides y alcaloides en el extracto de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart, se obtuvo un porcentaje de rendimiento del extracto de 7,52 %.
2. El extracto de etanol de las hojas de *Amaranthus dubius* Mart presentó actividad antibacteriana contra las cepas *S. aureus* (10 mm), *E. faecalis* (8 mm), *E. coli* (8 mm), *K. pneumoniae* (7 mm) y *P. aeruginosa* (8 mm), a una concentración de 10 mg/mL.
3. Este trabajo representa la primera investigación realizada sobre tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana de *Amaranthus dubius* Mart en la ciudad de Mérida, Venezuela.

Recomendaciones

1. Analizar la composición química de otras partes de la planta como tallos, flores y raíces.
2. Estudiar la actividad antibacteriana frente a otras cepas bacterianas nosocomiales.
3. Utilizar otras técnicas como cromatografía de gases y espectrometría de masas para la determinación de metabolitos secundarios.
4. Analizar la actividad antibacteriana mediante otros métodos como difusión en pozo, métodos de dilución en agar o caldo nutritivo para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI).
5. Evaluar la actividad antifúngica, antiparasitaria, antiinflamatoria, antioxidante de los extractos de *Amaranthus dubius* Mart. Así como su valor nutricional.
6. Utilizar diferentes solventes para la obtención de extractos vegetales y establecer comparaciones en base a los resultados obtenidos.
7. Estudiar diferentes especies del genero *Amaranthus* que se encuentran en el estado Mérida.

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Albarca, R y Petricevich. (2017). Importancia biológica de los compuestos fenólicos. *Inventio* 14 (34), 33-38.
- Albornoz, A. (1980). *Productos Naturales: Estudio de las Sustancias y Drogas Extraídas de las Plantas*. Caracas: Publicaciones de la Universidad Central de Venezuela.
- Agudelo, H. (1996). Importancia económica y etnobotánica de *Amaranthaceae* en Colombia. *Revista Facultad de Formación Avanzada e Investigaciones*, 6 (1), 45-74.
- Agudelo, C. (2008). *Amaranthaceae: Flora de Colombia*. Bogotá, Colombia: ARFO Editores.
- Alcamo, J., Floerke, M., y Maerker, M. (2007). Future long-term changes in global water resources driven by socio-economic and climate changes. *Hydrological Sciences*, 52 (2), 247-275.
- Alonso, J. (2004). *Tratado de Fitofármacos y Nutraceuticos*. Primera Edición ed. Rosario, Argentina: CORPUS.
- Anaya, A. (2003). *Ecología Química*. México: Editorial Plaza y Valdés.
- Anon, A. (2003). Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9 (1), 1-2.
- Aragón, O., Córdoba, I., Díaz, L., Franco, S., Isordia, M., Pozos, A., Soto, T., Serafín, N., y Martínez, F. (2016). Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de *Salvia apiana* frente a Microorganismos de importancia clínica. *Revista Argentina de Microbiología*, 48 (3), 217-221.
- Arias, F. (2004). *El proyecto de la investigación. Introducción a la metodología científica*. Caracas, Venezuela: Editorial Episteme.

- Arias, F. (2006). El Proyecto de Investigación. Introducción a la metodología. Caracas, Venezuela: Editorial Episteme.
- Arias, F. (2012). El proyecto de la investigación. Introducción a la metodología científica. Caracas, Venezuela: Editorial Episteme.
- Ávalos, A., y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Revista de Recursos Educativos, 2 (3), 119-114.
- Balseca, R. (2017). Screening fitoquímico y evaluación de la actividad antimicrobiana de *Catharantus roseus* (L.) G. Don, *Justicia pectoralis* Jacq y *Scoparia dulcis* L. Revista de la Facultad de Ingeniería en Geología, Minas, Petróleos y Ambiental de la Universidad Central de Ecuador, 1 (2), 68-78.
- Bari, M., y Alfaki, M. (2023). Actividad antimicrobiana de *Amaranthus caudatus* tratamiento contra *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae* resistentes a múltiples drogas. The New Armenian Medical Journal, 17 (2), 118-126.
- Barrera, A. (1982). La Etnobotánica: Tres puntos de vista y una perspectiva. Revista Etnobiología, 10 (4), 91-93.
- Barrientos, Z. (2003). Zoología General. Primera Edición. Editorial Universidad Estatal a Distancia: San José, Costa Rica.
- Bauer, A., Kirby W., Sherris J., y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. American Journal of Clinical Pathology, 45 (4), 493-496.
- Bermejo, A., Pereira, S., Cintra, M., y Morales, G. (2014). Determinación de parámetros químico-físicos de las tinturas al 20 % obtenidas de las hojas, tallos y frutos de *Melia azedarach* (pursiana). Revista Habanera de Ciencias Médicas, 13 (5), 670-680.
- Betés, M., Durán, M., Mestres, C., Wogues, R. (2008). Farmacología para Fisioterapeutas. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.

- Bruneton, J (2001). Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia. Segunda Edición. España: Editorial Acribia S. A.
- Cabrera, J. (2005). Las Plantas y sus usos en las Islas de Providencia y Santa Catalina. Colombia: Editorial del Valle.
- Cardona, M., Hincapié., C y Marín, B. (2020). Actividad Bactericida *in vitro* de *Chenopodium quinoa* Wild y *Artemisia dracunculus* L sobre bacterias patógenas. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 25 (3), 9-11.
- Carmona, A., Gil, R., y Rodríguez, M. (2008). Descripción taxonómica, morfológica y etnobotánica de 26 hierbas comunes que crecen en la ciudad de Mérida– Venezuela. Boletín Antropológico, 26 (73), 113-119.
- Carmona, W., y Orsini, G. (2010). Sinopsis del subgénero *Amaranthus* (*Amaranthus*, *Amaranthaceae*) en Venezuela. *Acta Botánica Venezuelica*, 33 (22), 329-356.
- Carrillo, M., Aguilar, M y Alvarado, B (2012). Actividad Antibacteriana de Plantas Medicinales: las plantas más usadas en la Huasteca Potosina. Sexta Edición. México D.F: Editorial Académica Española.
- Carvajal, L., Hata, Y., Rueda, D. y Sierra, N. (2009). Análisis Fitoquímico Preliminar de Hojas, Tallos y Semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana krukoff*). *Revista Colombiana Forestal*, 12 (1), 161-170.
- Casado, E. (2012). Operaciones básicas de laboratorio. Editorial Paraninfo. España.
- Colina, A., y Huamán J. (2016). Análisis fitoquímico, determinación cualitativa de flavonoides y taninos, actividad antioxidante, antimicrobiana de las hojas de *Muehlenbeckia hastulata* de la zona de Yucay (Cusco). (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de San Marcos. Lima, Perú.
- Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). (2020). Performance Standards for Anti-Microbial Susceptibility Testing. 30th Edition, M100. Disponible en: https://clsi.org/media/3481/m100ed30_sample.pdf

- Delgado, G., y Romo, A. (2022). Temas selectos de química de productos naturales. México: Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Díaz, S., Palá J., Usano, J. (2014). Aceites Esenciales: Conceptos y Actividad Antibacteriana. *Revista de Recursos Educativos*, 7 (2), 66-68.
- Díaz, B y Tineo, J. (2022). Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *chenopodium ambrosioides* L. (paico) frente a *escherichia coli* ATCC ® 25922 (Tesis de Pregrado). Universidad María Auxiliadora. Lima, Perú.
- Domínguez, X. (1979). Métodos de Investigación Fitoquímica. México: Editorial Limusa.
- Domingo, M., y López, M. (2023). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Especial Quimioterapia*, 16 (4). 385-393.
- García, P., Fernández, M y Paredes, F. (1994). Microbiología Clínica Práctica. Segunda Edición. Cádiz, España: Editorial UCA.
- García, D. (2015). Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de dos especies de plantas del género *Amaranthus* aplicado sobre cepas de interés clínico en el periodo de diciembre de 2013- mayo 2014 (Tesis de Grado). Universidad Nacional de Chimborazo, Quito. Ecuador.
- Gómez, C. (2010). Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de *Myrciastes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo), especies reportadas en Peguche-Imbabura, sobre *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* causantes de enfermedades bucofaríngea. (Tesis de Grado). Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí, Ecuador.
- Gómez, E., y Bethsua, E. (2014). *Extracción de Compuestos Bioactivos a partir de Fuentes Naturales*. México: Handbook -©ECORFAN.

- Guzmán, L., Rodríguez, E y Rojas, O. (2021). Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Chenopodium ambrosioides* L “paico” y *Schinus molle* “molle” frente a cepas de “*Staphylococcus aureus*”. (Tesis de Pregrado). Universidad Privada de Huancayo “Franklin Roosevelt”. Perú.
- Hernández, J., Zaragoza, A., López, G., Peláez, A., Olmedo, A. y Rivero, N. (2018). Actividad antibacteriana sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: enfoque en Medicina Veterinaria. *Abanico Veterinario*, 8 (1), 14-27.
- Hurtado, J. (2010). El Proyecto de Investigación. 6ta Edición. Caracas, Venezuela: Editorial Quirón.
- Hurtado J. (2012). El “Acerca de” sobre que Investigar. En: El Proyecto de Investigación, comprensión holística de la Metodología y la Investigación. Caracas: Ediciones Quirón.
- Jácome, G., y Paucar, D. (2019). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos proteicos inhibidores de tripsina provenientes de semillas de Sangorache (*Amaranthus hybridus* L.) (Tesis de Grado). Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.
- Juárez, J. (2018). Estudio de las características fisicoquímicas y fitoquímicas de las hojas de *Eucaliptus globulus* Labill (Eucalipto) (Tesis de grado), Universidad Católica de los Ángeles de Chimbote, Perú.
- Laguna, C. (2006). Medicina Tradicional. México: Publicaciones UAEMÉX.
- Lamarque, A., Zygadlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M y Maestri, D. (2008). Fundamentos Teórico-prácticos de Química Orgánica. Argentina: Editorial Encuentro.
- Leal, F., y Benítez, C. (2010). El manual de plantas comunes de Venezuela de Ludwig Schnee. Venezuela: Ediciones de la Facultad de Agronomía UCV.

- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G y Franco, R. (2004). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en Discapacidad*, 3 (1), 10-18.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Segunda Edición, Caracas: Editorial Torino.
- Martínez, J., Ruiz, C., Arias, G., y Stashenko, E. (2014). Optimización de la extracción de antioxidantes de *Salvia officinalis* L. con CO₂ supercrítico. *Revista De La Academia Colombiana De Ciencias Exactas, Físicas Y Naturales*, 38 (148), 237–249.
- Martínez, L. (2016). Detección de microorganismos multiresistentes. *Revista Médica Valdecilla*, 1 (1), 19-21.
- Matías, L., Hernández, R., Torres, N., Espinoza, V y Ramírez, L. (2018). Usos actuales y potenciales del Amaranto (*Amaranthus* spp.). *Journal of Negative & No Positive Results*, 3 (6), 423-436.
- Matteuci, S., Pla, L y Colma, A. (1999). Recolección sistemática de germoplasmas de *Amaranthus* spp. En ecosistemas secos del Estado Falcón, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia*, 16 (2), 356-370.
- Meesakul, P., Shea, T., Fenstemacher, R., Wong, S., Kuroki, Y., Wada, A y Cao, S. (2023). Phytochemistry and biological studies of endemic Hawaiian plants. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 24 (16), 1-33.
- Miguel, M. (2018). Betalaínas en algunas especies de la familia *Amaranthaceae*. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, 7 (53), 1-33.
- Mollinedo, M., y González, C. (2014). Bacterias Gram Negativas. *Revista de Actualización Clínica Médica*, 49 (1), 2609-2613.

- Montero, K., Moreno, R., Molina, E., y Sánchez, A, (2011). Composición química del *Amaranthus dubius*: una alternativa para la alimentación humana y animal. Revista Facultad de Agronomía, 28 (1), 619-627.
- Moyón, M. (2015). Determinación de la actividad antifúngica de los extractos del Escancel (*Aerva sanguinolenta*), Teatina (*Scoparia dulcis* L.), Sangorache (*Amaranthus hybridus* L.) frente a *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*. (Tesis de Pregrado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2007). Informe del taller interregional de la OMS sobre el uso de medicina tradicional en la atención primaria de salud. Ginebra, Suiza. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44146>
- Oromí, J. (2000). Resistencia bacteriana a los antibióticos. Medicina Integral. ELSEVIER, 36 (10), 367-370.
- Ortega, T., Carretero, M. E., y Villar, A. (2002). Salvia. Fitoquímica, Farmacología y Terapéutica. Farmacia profesional, 16 (7), 60-63.
- Palacios, M. (2008). Curso de Farmacognosia y Fitoquímica. Escuela de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú: Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote.
- Palella, S., y Martins, F. (2010). Metodología de la Investigación Cuantitativa. Tercera Edición. Caracas, Venezuela: Editorial Fedupel.
- Prats, G. (2007). Microbiología clínica. Buenos Aires, Madrid: Médica Panamericana.
- 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), 192- 199.

- Ramírez, S., y Marín, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15 (42), 263-268.
- Rivas, H. (2020). Eficacia Antibacteriana *in vitro* de extractos de *Chenopodium ambrosioides* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con Oxacilina (Tesis de grado). Universidad César Vallejo, Trujillo, Perú.
- Rodríguez, E. (2008). Caracterización de ácidos fenólicos y flavonoides presentes en hojas de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.). (Tesis de Maestría). Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnología, México.
- Romero, C. (2007). Microbiología y Parasitología Humana. Tercera Edición. México D.F: Editorial Médica Panamericana.
- Sailema, M., Salazar, E., Palacios, R., Carrera, W., y Zambrano, C. (2023). Efecto del solvente y temperatura para la extracción de compuestos fenólicos en hojas de fresa. *Revista Científica Multidisciplinaria*, 7 (3), 256-267.
- Salazar, F., Jaime, M., y Baca, F. (2010). Tamizaje Fitoquímico en las hojas frescas de laurelillo. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. Nicaragua.
- Sánchez, C. (2006). Antibióticos, ayer, hoy y mañana. *Revista Química Viva*, 2 (5), 1-15.
- Sandoval, M y Siqueiros, M. (2019). Plantas útiles de la familia Amaranthaceae en el estado de aguas calientes. *Tecnociencia Chihuahua*, 13 (1), 2-10.
- Sauer, J. (1967). The Grain Amaranths and their Relatives: a Revised Taxonomic and Geographic Survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 54 (2), 103-137.

- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Primera Edición. Bogotá, Colombia.: Convenio Editorial Andrés Bello.
- Shegebayev, Z., Turgumbayeva, A., Datkhyev, U., Zhakipbekov, K., Kalykova, A., Kartbayeva, E., Beyatli, A., Tastambek, K., Altynbayeva, G y Dilbarkhanov, B. (2023). Propiedades farmacológicas de cuatro especies vegetales del género *Anabasis*, Amaranthaceae. *Molecules*. 28 (44), 1-26.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal*. Tercera Edición. España: Publicaciones de la Universitat Jaume.
- Velázquez, L. (2008). *Farmacología básica y clínica*. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve