



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



ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS Y TALLOS
DE *Thevetia peruviana*

www.bdigital.ula.ve

Autoras:

Betania Mora Castillo

C.I. V- 26.376.813

Leonymar Errante Sánchez

C.I. V- 26.299.486

Tutora:

Prof. Yndra Cordero

Mérida, Julio de 2024

DEDICATORIA

A Dios por cada oportunidad que me ha brindado. Su guía y sabiduría han sido fundamentales en cada paso del camino.

A mi madre Maibet Castillo y a mi padre Juan Mora por su amor incondicional, apoyo constante y guía durante todos estos años. Gracias por creer en mí y por ayudarme a crecer en conocimientos y en valores. Este trabajo no hubiera sido posible sin su presencia y dedicación.

A mis abuelos maternos Carmen Mora y Benjamin Castillo por su apoyo constante y amor incondicional a lo largo de este camino.

A mi compañero de vida Javier Calderón por estar a mi lado en cada paso de este viaje académico, porque en los momentos de frustración y cansancio su paciencia infinita y apoyo incondicional fueron clave.

A mis compañeras de aventuras académicas y de vida durante estos años en la facultad. Gracias por ser mis cómplices en tantas noches de estudio, de risas y de sueños compartidos (Estefany Ortega, Fabiana Suarez, Marlubis Rincon y Vianca Gelvez).

A mí querido grupo "Jaifai" ya que con su apoyo en muchos momentos de la carrera todo fue más fácil y divertido.

A mi querido profesor Luis Rojas, ya que fue él quien me dio la oportunidad de ser su tesista en el inicio de este trabajo; agradezco a mi querida tutora Yndra Cordero quien me adoptó como su tesista y me ha apoyado a lo largo de este camino.

Betania Mora

DEDICATORIA

A Dios y la Virgencita del Valle, por dame la salud, fortaleza, sabiduría y paciencia, de vencer todos los obstáculos que se presentaron en el camino y cumplir cada una de las metas que he me trazado

A mis padres, Maggi y Antonio, por ser mí pilar de apoyo e inspiración, gracias por ser el puerto seguro en todo momento a pesar de la distancia, creer en mis sueños y acompañarme en los buenos y malos momentos.

A mi hermana, Ana, por estar allí y demostrarme que cada una brilla a su manera con cada una de sus ocurrencias a la distancia. Te quiero Lu

A mis queridas mentoras, Profe Greana, Profe Rima y Profe Sarai, por orientarme en todo momento y brindar las herramientas necesarias para amar el Bioanálisis en todo sus facetas.

A mis incondicionales amistades en este recorrido, Yesica, Kevin y Gabriela, por todos esos momentos de aterrizaje forzado en la realidad, y de risas y cuentos cuando eran necesarios, son los mejores.

A mi grupito, y próximamente mis colegas; Yoltri, Hecmary, Williainis, Daniel y Viviana, por el apoyo en todas las aventuras y crisis de estudio, las risas nunca faltaron.

A mis 0800, German D., Isabel, Oneimar, Josemar, Dranyelis, Jorge L., Jen y Wendy, muchos tenkius, lo estamos logrando.

Leonymar Errante

AGRADECIMIENTOS

A la ilustre Universidad de Los Andes y a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, que serán por siempre nuestra alma mater y el pilar fundamental de nuestros principios morales y éticos en nuestra vida profesional y personal.

A nuestra tutora, Prof. Yndra Cordero, quien con paciencia y dedicación nos guio en esta experiencia, infinitas gracias por compartir sus conocimientos, consejos y orientaciones. Orgullosas de haber tenido el placer de lograr la presentación de nuestro trabajo de grado de su mano.

Al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por abrirnos las puertas para llevar a cabo la parte experimental de esta investigación.

A las profesoras Rosa Aparicio, Ysbelia Obregón y Alida Pérez, por su generosa y noble colaboración en todo momento para lograr los objetivos de nuestra investigación.

A la profesora Clara Díaz por su valiosa colaboración y aportes en la evaluación de la actividad antifúngica de esta investigación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	3
Planteamiento del Problema.....	3
Justificación e Importancia de la Investigación.....	5
Objetivos de la Investigación.....	7
<i>Objetivo General</i>	7
<i>Objetivos Específicos</i>	7
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	7
<i>Alcances de la Investigación</i>	7
<i>Limitaciones de la Investigación</i>	8
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	9
Trabajos Previos.....	9
Antecedentes Históricos.....	13
Bases Teóricas.....	16
Familia Apocynaceae.....	16
Género <i>Thevetia</i>	21
Especie <i>Thevetia peruviana</i>	25
Productos Naturales.....	28
Extractos Vegetales.....	32
Análisis Fitoquímico Preliminar.....	34
Hongos.....	37
Agentes Antifúngicos.....	41

ÍNDICE DE CONTENIDO
(Continuación)

Actividad Antifúngica.....	42
Definición Operacional de Términos.....	44
Operacionalización de las Variables.....	47
Hipótesis.....	49
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO.....	50
Tipo de Investigación.....	50
Diseño de Investigación.....	50
Población y Muestra.....	51
Selección del Tamaño de la Muestra.....	51
Sistema de variables.....	51
Instrumento de Recolección de Datos.....	52
Procedimiento de la Investigación.....	52
<i>Recolección de las muestras vegetales.....</i>	<i>52</i>
<i>Obtención de los extractos.....</i>	<i>53</i>
<i>Tamizaje fitoquímico de los extractos.....</i>	<i>53</i>
<i>Actividad antifúngica de los extractos de etanol de hojas y tallos de la especie Thevetia peruviana en dos cepas de Candida.....</i>	<i>57</i>
Diseño de Análisis.....	58
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	60
Resultados.....	60
Discusiones.....	70
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	73
Conclusiones.....	73
Recomendaciones.....	74
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

N°		Pág.
1	Primeros alcaloides aislados hasta el siglo XVII.....	15
2	Algunos representantes de la familia Apocynaceae.....	17
3	Metabolitos secundarios aislados de la familia Apocynaceae.....	19
4	Glucósidos cardiotónicos aislados del género <i>Thevetia</i>	22
5	Flor, hojas y tallos de la especie <i>Thevetia peruviana</i>	24
6	Glucósidos cardiotónicos aislados de <i>Thevetia peruviana</i>	26
7	Flavonoides aislados del látex de <i>Thevetia peruviana</i>	27
8	Metabolitos extraídos de extractos metanólicos de las hojas de <i>Thevetia peruviana</i>	28
9	Estructura química del ácido gálico.....	30
10	Estructura química de o-quinona.....	31
11	Estructura química de la escopoletina.....	31
12	Estructura química de lactonas sesquiterpénicas.....	32
13	<i>Candida albicans</i>	40
14	<i>Candida krusei</i>	40

ÍNDICE DE TABLAS

Nº		Pag.
1	Taxonomía de la Familia Apocynaceae.....	18
2	Taxonomía del Género <i>Thevetia</i>	22
3	Taxonomía de la especie <i>Thevetia peruviana</i>	25
4	Taxonomía de las especies <i>Candida albicans</i> y <i>Candida krusei</i> .	39
5	Clasificación de los Antifúngicos por su Estructura.....	41
6	Clasificación de los Antifúngicos por su Sitio de Acción en el Hongo.....	42
7	Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antifúngica de los extractos de las hojas y tallos de <i>Thevetia peruviana</i>	47
8	Operacionalización de la variable independiente: Composición química de los extractos de las hojas y tallos de <i>Thevetia peruviana</i>	48
9	Pesos de los extractos y sus rendimientos.....	60
10	Reporte de resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de <i>Thevetia peruviana</i>	61
11	Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos de las hojas de <i>Thevetia peruviana</i> ..	62
12	Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos de los tallos de <i>Thevetia peruviana</i> ..	65
13	Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de etanol de las hojas y los tallos de <i>Thevetia peruviana</i>	68
14	Reporte de resultados ilustrado de la actividad antifúngica de los extractos de etanol de las hojas y los tallos de <i>Thevetia peruviana</i>	69



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



ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS Y TALLOS DE *Thevetia peruviana*

Autores:

Betania Mora Castillo

C.I. V-26.376.813

Leonymar Errante Sanchez

C.I: V-26.299.486

Tutor: Prof. Yndra Cordero

RESUMEN

www.bdigital.ula.ve

Thevetia peruviana es una planta perteneciente a la familia Apocynaceae, que crece en San Juan de Lagunillas, Estado Mérida. Investigaciones previas han revelado su bioactividad como antifúngico, asociado con el contenido de fitoquímicos. El objetivo de esta investigación fue confirmar la composición química y la actividad antifúngica de los extractos de *Thevetia peruviana* frente a cepas de *Candida albicans* y *Candida krusei*. Los extractos de hexano y etanol se obtuvieron por el método de maceración. Una vez secos, se identificaron mediante tamizate fitoquímico: alcaloides, triterpenos, esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides, lactonas sesquiterpénicas y glucósidos cardiotónicos. La actividad antifúngica fue evaluada por el método de difusión en agar con disco (Kirby–Bauer), en donde los extractos resultaron resistentes a las cepas evaluadas. Este es el primer reporte de la actividad antifúngica de las hojas y los tallos de *Thevetia peruviana* del estado Mérida-Venezuela.

Palabras claves: actividad antifúngica, extractos vegetales, metabolitos secundarios, Apocynaceae, *Thevetia peruviana*, tamizaje fitoquímico, *Candida*

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han sido parte de la vida de la humanidad desde sus inicios, pues fueron ellas la primera fuente de cura y remedio para las diversas afecciones de la salud. Estas plantas tienen un alto potencial biológico, pero también pueden tener componentes tóxicos que de no usarse con cuidado afecten a la persona que las ingiera. Para evitar este tipo de problemas el hombre ha dedicado una variedad de estudios científicos destinados a comprender, separar y emplear aquellos componentes medicinales de los no medicinales (Bruneton, 2001).

La principal contribución la ha dado la fitoquímica, área del conocimiento que permite el estudio de los diversos compuestos vegetales, tanto primarios como secundarios. Esto lo logra mediante el aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de las diversas sustancias que producen las plantas y su posible uso en el área de la salud (Bruneton, 2001).

A partir de esta separación selectiva se pueden obtener extractos que concentren los elementos fitoquímicos de las plantas y con ellos diseñar sustancias con múltiples aplicaciones, entre ellas la actividad antifúngica, lo que resulta de gran aporte para la medicina, la farmacología y la botánica; ciencias que mantienen una búsqueda constante de agentes antimicrobianos, debido a la capacidad que tienen los microorganismos como bacterias y hongos para generar resistencia a los antibióticos y a los antifúngicos, respectivamente (Bruneton, 2001).

Los efectos quimioterapéuticos y farmacológicos obtenidos a partir de extractos y aceites vegetales de la familia Apocynaceae, contribuyen al desarrollo de síntesis de nuevas terapias (Goodman y Gilman, 2006), donde la especie *Thevetia peruviana* resalta al ser utilizada en la medicina popular con fines diuréticos, cardiotónicos, purgantes, catárticos y febrífugo, teniendo cuidado con las dosis administradas, ya que puede resultar tóxica y venenosa (Jiménez, Ríos., Mendoza, Arias y Arias, 2022).

De acuerdo con esto, se detalla lo importante que resulta el aportar con el estudio de los diversos fitoquímicos presentes en las plantas y la comprobación de sus efectos, por ello se valoró la necesidad de encontrar agentes antifúngicos que contribuyan con el combate de algunas cepas de *Candida* que afectan a la mayoría de la población (Pacheco, Taborda y De La Rosa, 2006).

El objetivo de esta investigación fue confirmar la composición química y la actividad antifúngica de los extractos de las hojas y los tallos de *Thevetia peruviana* frente a cepas de *Candida albicans* y *Candida krusei*, según las normas APA.

Este trabajo de investigación fue estructurado de la siguiente manera: El Capítulo I, denominado El Problema, formado por los siguientes subtítulos: Planteamiento del Problema, Justificación de la Investigación, Objetivos de la Investigación, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El Capítulo II, llamado Marco Teórico, en el que se describen los Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las Variables e Hipótesis. El Capítulo III, titulado Marco Metodológico, consta de los siguientes subtítulos: Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Selección del Tamaño de la Muestra, Instrumento de Recolección de Datos, Procedimiento de la Investigación y Diseño de análisis. En el Capítulo IV, se presentarán los Resultados y Discusiones, y finalmente, en el Capítulo V se presentan las Conclusiones y Recomendaciones. Además del apartado de Referencias Bibliohemerográficas.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

La resistencia de los hongos a los antifúngicos representa un problema de gran índole, dicha resistencia se debe principalmente al uso indebido y la prescripción descontrolada de los antimicóticos, así como la mala aplicación de tratamientos por parte de los pacientes; a esto se suma la capacidad de los hongos para adquirir mutaciones con facilidad, lo cual agrava el panorama (Prieto, 2021).

Según los reportes de la Fundación de Acción Global para las Infecciones Fúngicas (GAFFI, por sus siglas en inglés), alrededor de 30 especies de hongos causan el 99 % de las enfermedades fúngicas humanas y hay aproximadamente más de 1,6 millones de muertes cada año. El descontrol en el uso de antifúngicos, sumado a la adaptabilidad rápida de los hongos a los cambios, genera un serio problema de salud pública (Prieto, 2021).

En particular, *Candida auris* ha generado gran preocupación en entidades como los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) debido a su resistencia a múltiples antifúngicos. Esta especie fúngica, reportada por primera vez en Tokio en 2009, se ha propagado por diferentes continentes y ha sido identificada erróneamente en algunos laboratorios sin tecnología específica. Su resistencia a los antifúngicos comúnmente utilizados y su capacidad de causar brotes en entornos de atención médica la hacen una amenaza importante (Prieto, 2021).

Es por ello que actualmente se están diseñando e investigando alternativas como el estudio de los fitoconstituyentes en las plantas que ejerzan una actividad antifúngica para contrarrestar los perjuicios que causan los hongos al atacar al organismo. En este sentido, cabe señalar que las plantas pertenecientes a la familia Apocynaceae, originarias de Sur América y que proliferan en las regiones tropicales del mundo, han demostrado potente actividad antimicrobiana; especialmente, la especie *Thevetia peruviana* (Basille, Giordano y Castaldo, 1993; Pacheco y cols, 2006).

Es importante, conocer la acción antifúngica de los fitoquímicos de esta planta sobre una de las especies más comunes de hongos como lo es *Candida*, microorganismo que afecta comúnmente a los hombres, pues como señala Vazquez y Sobel, 2011 “Prácticamente, todos los hombres a lo largo de su vida padecerán alguna vez una enfermedad causada por el hongo *Candida*”. Además, este microorganismo produce “alrededor del 80 % de las micosis sistémicas mayores y son los productores más frecuentes de micosis en pacientes inmunodeficientes”, a la vez que las enfermedades candidiásicas se encuentran entre las infecciones intrahospitalarias más frecuentes (Vazquez y Sobel, 2011).

Atendiendo a estas consideraciones, es vital incluir el uso de los extractos de plantas medicinales en el tratamiento de infecciones causadas por *Cándida*, una vez demostrada y comprobada su capacidad antifúngica, puesto que al optar por esta alternativa natural se disminuye la exposición del paciente con fármacos sintéticos y tóxicos que comprometan su bienestar a largo plazo, tanto en espacios domésticos como hospitalarios. Esta actividad antifúngica se basa teóricamente en la bioactividad de los fitoquímicos sobre los hongos, atendiendo a los diferentes mecanismos de acción de los compuestos extraídos, es decir, si actúa sobre la membrana celular del hongo, sobre la pared o sobre el núcleo (Tello, 2011).

Después de describir la situación actual del problema las autoras de esta investigación presentan el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación que existe entre la actividad antifúngica de los extractos de las hojas y los tallos de *Thevetia peruviana* en dos cepas de *Candida*?

Justificación e Importancia de la Investigación

En la actualidad es necesario el diseño de compuestos químicos que tengan actividad antifúngica para contrarrestar los daños que causan los hongos al organismo, ya que éstos tienden a modificarse y generar resistencia frente a los fármacos; por lo que acceder a nuevos compuestos derivados de extractos naturales resulta vital en este combate (Prieto, 2021)

Conocer y comprobar esta acción antifúngica significaría un aporte para diversas áreas del conocimiento, tales como la medicina, la botánica y la microbiología. Comprobar la actividad antifúngica de los extractos de las hojas y los tallos de *Thevetia peruviana* en dos cepas de *Candida*, permitirá a los médicos disponer de un nuevo tratamiento para el control de las infecciones causadas por las mismas, en cepas que hayan desarrollado resistencia a los tratamientos convencionales empleados hasta ahora. De igual manera, favorecerá a los pacientes porque dispondrán de una alternativa natural, proveniente de una planta que abunda en Venezuela y la zona del Caribe, no será complicado conseguirla para su procesamiento en el laboratorio (Domingo y López, 2003).

Demostrar la propiedad antifúngica de *Thevetia peruviana*, permite a los botánicos conocer con mayor amplitud las características y compuestos de esta planta medicinal, así como los agentes antimicrobianos y sus mecanismos de acción contra los hongos. De la misma manera, es una oportunidad para destacar la importancia de las evaluaciones de la composición química de diversos compuestos biológicos, ya que gracias a

dichas evaluaciones se generan aportes científicos para la medicina, farmacología, botánica, entre otras áreas del saber (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

Por otra parte, las infecciones causadas por algunas especies de *Candida*, representa unas de las más comunes por su diversidad de cepas, por sus características biológico-adaptativas, por la capacidad para generar resistencia a los fármacos y la alta tasa de morbilidad entre los pacientes, sobre todo aquellos inmunosuprimidos u hospitalizados. Esto plantea la necesidad de encontrar un tratamiento no tóxico que logre cumplir con propiedades antifúngicas, que no represente un riesgo extra para la salud del paciente y a su vez sea capaz de evadir la resistencia de estos microorganismos (Revankar y Sobel, 2011).

Como puede apreciarse, en las plantas medicinales, específicamente en *Thevetia peruviana* se encuentra un valioso recurso para el tratamiento de diversas infecciones fúngicas gracias a los principios activos de sus compuestos fitoquímicos con alto potencial farmacológico (Neira, 2018). Sin embargo, es necesario comprobar cuáles de sus compuestos tienen una efectiva acción antifúngica sobre las cepas de *Candida*.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la presencia de metabolitos secundarios mediante el tamizaje fitoquímico de las hojas y los tallos de *Thevetia peruviana* y su actividad antifúngica frente a cepas de *Candida albicans* y *Candida krusei*.

Objetivos Específicos

- Obtener los extractos de hexano y etanol de las hojas y los tallos de *Thevetia peruviana*, mediante el método de extracción por maceración.
- Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios de los extractos de las hojas y los tallos de *Thevetia peruviana*, a través de pruebas químicas de coloración y/o precipitación.
- Evaluar la actividad antifúngica de los extractos de las hojas y los tallos por medio del método de difusión en agar con disco (Kirby-Bauer) frente a *Candida albicans* y *Candida krusei*.

Alcances y Limitaciones de la investigación

Alcances de la Investigación

El alcance de esta investigación fue conocer la actividad antifúngica que poseen los extractos de las hojas y los tallos de *Thevetia peruviana* en comparación a estudios previos de sus metabolitos, con la finalidad de promover una alternativa natural antifúngica en Venezuela y contribuir con la comunidad científica en futuras investigaciones.

Limitaciones de la Investigación

En cuanto a las limitaciones de la investigación, toma en cuenta el fundamento teórico y experimental existente para respaldar la investigación, así como los recursos, procedimientos y técnicas disponibles para alcanzar el objetivo planteado (Hernández, Fernández y Baptista, 2010). Algunas de las limitaciones que se presentaron en esta investigación, y que pudieron influir sobre los resultados, fueron las fallas constantes del suministro de energía eléctrica, agua, dificultad con el transporte público, limitaciones técnicas por la escasez, altos costos de reactivos y del material para llevar a cabo la parte experimental.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Ndung'u, Keriko, Kareru, Wanakai, Kisoï y Keddy (2024), en su investigación denominada “Análisis fitoquímico y CG-EM del extracto metanólico del fruto de *Thevetia peruviana* como potencial antirodenticida contra ratas balb C”, se tuvo como objetivo evaluar la actividad antirodenticida del extracto metanólico del fruto de *Thevetia peruviana*. Para realizar el estudio, se tomaron muestras del fruto de *Thevetia peruviana*, se secaron y se extrajeron utilizando metanol/agua en una proporción 3:1 en volumen.

El cribado fitoquímico de los componentes químicos del extracto del fruto de *T. peruviana* reveló la presencia de compuestos activos: fenoles, saponinas, taninos, flavonoides, y alcaloides, conocidos por sus actividades medicinales y fisiológicas, al aportar potente actividad antimicrobiana y antioxidante. Para la determinación de contenido total de los compuestos activos se requirió del uso de dos métodos: el espectrofotométrico (flavonoides, fenoles y taninos) y el gravimétrico (alcaloides y saponinas), arrojando como resultado la presencia de $125,13 \pm 1,04$ mg/g en compuestos fenólicos (ácido gálico), $87,70$ mg/g de peso seco de flavonoides (rutina), $10,50 \pm 0,01$ mg/g de taninos (ácido tánico), $16,50 \pm 0,21$ mg/g de alcaloides, y $8,28 \pm 0,11$ mg/g de saponinas.

Los autores concluyen que el extracto del fruto de *T. peruviana* contenía polifenoles y flavonoides, además, cantidades significativas de alcaloides, saponinas y taninos, así como cantidades considerables de glucósidos unidos que proporcionan valor medicinal y efecto tóxico, que pueden causar cambios fisiológicos en el hígado, bazo y corazón con necrosis asociada a infiltración de células inflamatorias. Por lo tanto, el extracto puede ser utilizado con fines antiodontocidas en la producción agrícola antes y después de las cosechas. La presencia de los fitoconstituyentes en los extractos de frutos de la especie que otorgan aportes al campo medicinal, probablemente se puedan obtener más extensas de la planta, como hojas y tallos, generando mayores beneficios.

Dash, Kumar, Mishra y Srivastava (2022), realizaron un estudio denominado “Evaluación fitoquímica y análisis fisicoquímico del extracto metanólico de hojas de *Thevetia peruviana* para futuras aplicaciones en terapia farmacológica”, el cual tuvo como objetivo analizar importantes fitoconstituyentes presentes en el extracto metanólico de las hojas de *Thevetia peruviana*, el cual fue obtenido por método de soxhlet. El análisis preliminar fue llevado a cabo a través de un cribado estándar de pruebas cualitativas, el cual confirmó la presencia de flavonoides, alcaloides, fenoles, saponinas, antraquinonas, fitoesteroles, cumarinas, glucósidos cardíacos y antocianinas, confirmado mediante el uso de cromatografía en capa fina (CCF).

El análisis por cromatografía líquida-espectrofotometría de masas (CL-EM) se demostró la presencia de amirina, acetato de amirina, calotropina, ácido ursólico y beta-sitosterol. En este mismo sentido, los autores concluyen que, el análisis fitoquímico es esencial para la estimación de los componentes bioactivos importantes como recursos herbarios, donde el extracto metanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* demostró ser rico en crisoeriol O-glucósido fenarimol manolilado, eriocitrina y gamma-glutamilvalina, lo que le permitiría poder desempeñar un rol importante en el descubrimiento de nuevos

fármacos, que contribuyan como una alternativa biomedicinal en la prevención y tratamiento de enfermedades.

Al-Rajhi, Yahya, Abdelghany, Fareid, Mohamed, Amin y Masrahi (2022), llevaron a cabo una investigación que se tituló “Actividades anticancerígena, anticoagulante, antioxidante y antimicrobiana del látex de *Thevetia peruviana* con acoplamiento molecular de la actividades antimicrobiana y anticancerígena”. Tuvo como objetivo el estudio de la actividad anticancerígena, anticoagulante, antioxidante y antimicrobiana del látex de *Thevetia peruviana*. Para la obtención del látex se cortó el tallo de los frutos de *Thevetia peruviana* en tubos que contenían agua destilada y esterilizada. La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) reveló que el contenido principal del látex de la especie fueron flavonoides, como rutina (11,45 µg/mL), quercetina (7,15 µg/mL), naringina (5,25 µg/mL), hesperidina (6,07 µg/mL); además de evidenciarse compuesto fenólicos, como ácidos clorogénicos (12,39 µg/mL), ácido siríngico (7,45 µg/mL), y ácido ferúlicos (5,07 µg/mL).

La actividad antimicrobiana fue evaluada bajo el método de difusión en pozo, utilizando 100 µL del látex en pozos de 6mm de diámetro; mientras que para la determinación de concentración mínima inhibitoria se utilizó el método de microdilución, donde el inóculo se preparó a partir de suspensión salina de bacterias/levaduras (2×10^8 UFC/mL), y donde se inóculo 100µL de la suspensión en cada pocillo. Se registró que los microorganismos estudiados con mayor sensibilidad al látex fueron *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*; con halos de inhibición de 31 mm y 30 mm, con una concentración mínima inhibitoria de 10,2 µg/mL y 12,51 µg/mL, respectivamente. Además, *Cándida albicans* fue sensible con un halo de inhibición de 28 mm al látex, en comparación a *Mucor circinelloides*. Los autores concluyeron que el látex obtenido de *Thevetia peruvina* es rico en flavonoides y compuestos fenólicos, y se considera una fuente prometedora que contribuye a combatir el cáncer y los microorganismos patógenos.

Abdelghany, Yahya, Bakri, Ganash, Amin y Qanash (2021), realizaron un estudio denominado “Efecto del extracto de semillas de *Thevetia peruviana* para el control de microbios patógenos y control de cáncer”. El objetivo fue evaluar la actividad farmacológica del extracto de *Thevetia peruviana*. Para la obtención del extracto se pulverizó la muestra y se llevó a maceración durante 10 horas. Los resultados indicaron que en la determinación del contenido total de fenoles y flavonoides, mediante el análisis fitoquímico por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM); mostró variación y diferencias en los perfiles químicos de los extractos metanólicos del núcleo de la semilla (NS) y pericardio de la semilla (PS) de *T. peruviana*. Entre los compuestos biológicos activos encontrados, se demostró la presencia de sesquiterpenos en el extracto metanólico del núcleo de la semilla, así como esteroides, ácidos, ésteres, alcoholes, alcaloides y nitrocompuestos.

Mediante el método de difusión en disco, se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos *in vitro* (20 µg) contra algunos microorganismos, entre ellos donde se evidencia mayor actividad en los extractos de NS, en distintos grados de inhibición según la especie. *Cryptococcus neoformans* no fue inhibido por los extractos, mientras que *Candida albicans* demostró ser altamente sensible al extracto NS de *T. peruviana* (30,4 mm) en comparación al extracto PS (0 mm). En cuanto a la actividad antimicrobiana con el extracto PS, *Klebsiella pneumoniae*, presenta mayor sensibilidad (20,4 mm), seguido de *Escherichia coli* (15,6 mm) y *Bacillus subtilis* (15,2 mm); sin embargo, el extracto PS solo mostró eficacia en *K. pneumoniae* (14 mm).

Los autores concluyeron, que el hallazgo obtenido sugiere que los extractos metanólicos de NS y PS son ricos en fitoconstituyentes y se consideran una nueva fuente prometedora, particularmente de NS con actividades biológicas que contribuyen al tratamiento de enfermedades humanas, que debe ser

utilizado con precaución, debido a la presencia de compuestos tóxicos como los glucósidos cardíacos.

Antecedentes Históricos

A lo largo de la historia de la medicina y la farmacología se han indagado numerosos compuestos químicos que permitan atacar a los hongos y disminuir su afección sobre los pacientes. Así se tiene que en los años 50 se da la aparición de los primeros antibióticos, antifúngicos y posteriormente, sustancias sintéticas con muy buena actividad antifúngica como talnoftato, imidazoles (Econazol®, Miconazol®, Clotrimazol®, Ketoconazol®), poliénicos (Nistatina®, Anfotericina B®, Natamicina®), entre otros (Prieto, 2021).

Evitar la proliferación de enfermedades fúngicas sigue siendo una ardua tarea para el siglo XXI, es por ello que continúa el desarrollo de nuevos antifúngicos cada vez más potentes. En la síntesis de estos fármacos es muy importante tener en cuenta la relación de su estructura-función, pues sobre la base de ellos se garantiza la muerte del hongo sin provocar graves daños al organismo hospedero (Prieto, 2021).

La búsqueda no cesa, ya que los hongos desarrollan mecanismos de resistencia que les permiten hacer frente a los diversos mecanismos que se emplean para combatirlos. Es decir, pueden generar una respuesta de resistencia a los antifúngicos, la cual se da mediante diversos mecanismos, ya sean intrínsecos (la especie no es sensible al fármaco o compuesto), poseer resistencia primaria (una cepa presenta resistencia natural sin haber estado en contacto con el compuesto) o resistencia secundaria (desarrollada por la cepa previamente sensible, que adquiere resistencia al compuesto después de que el hongo ha estado en contacto con él) (Tapia, 2004).

En vista de esto, la búsqueda de nuevas formas para contrarrestar a los hongos sigue vigente, pero cada vez se tiene más presente que el tratamiento

diseñado para combatir a los hongos no debe tomarse por períodos prolongados porque puede resultar tóxico y perjudicial para el paciente, resultando en un fracaso terapéutico. Es por ello que se han explorado alternativas naturales, basadas en la medicina tradicional y que consisten en tratar las infecciones microbianas con el extracto de sustancias antibióticas y antifúngicas de plantas medicinales (Tapia, 2004).

Esta búsqueda de extractos de sustancias en plantas no es algo nuevo, sino que es un proceso que se inició con el progreso de la fitoquímica en el año 1800. Pero fue con la ayuda del farmacéutico francés Nicolás Lémery (1645-1715) que se extendió el empleo de los procesos de extracción y utilizó alcohol como disolvente (Lizcano y Vergara, 2008); lográndose para 1803 aislar el primer alcaloide, la nicotina (1) y le siguieron muchos otros como morfina (2), estroscina (3) y emetina (4) (ver Figura 1). Para ese entonces las plantas con atributos medicinales fueron las primeras estudiadas y empleadas para la cura de enfermedades, pero fue hasta el siglo XVIII que se empezaron a emplear sustancias químicas para el tratamiento de enfermedades infecciosas. En este contexto el aporte de Paul Ehrlich fue muy valioso pues fue quien formuló los principios de toxicidad selectiva, reconociendo las reacciones químicas específicas entre microorganismos y medicamento, la aparición de la resistencia a estos, y el papel de la terapéutica combinada para combatirlos. Más adelante, se descubrieron las sulfonamidas y aparecieron los antibióticos, como la Penicilina®, Estreptomina®, Tetraciclina®, Cloranfenicol®, entre otras (Brenner y Stevens, 2023).

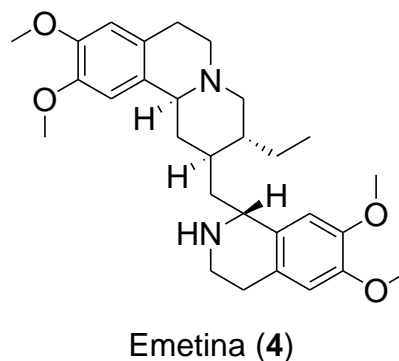
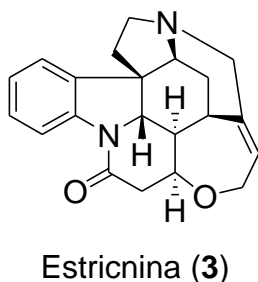
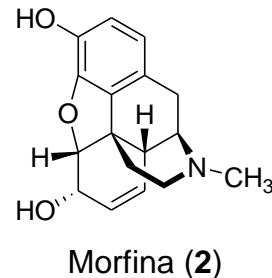
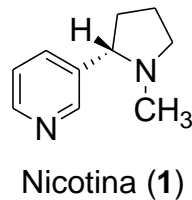


Figura 1. Primeros alcaloides aislados hasta el siglo XVII
Tomado y modificado de Manrique y Mosquera, 1997.

La síntesis de los antifúngicos como parte de estos compuestos comenzó en el siglo XX y desde entonces no ha cesado el diseño de nuevas moléculas para combatir a las infecciones fúngicas invasoras, las cuales han aumentado sustancialmente en las últimas 2 décadas en relación con la aparición de la epidemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), uso de quimioterapia intensiva en pacientes oncohematológicos, uso de fármacos antirrechazo en pacientes receptores de trasplante y la mayor utilización de dispositivos intravasculares. En esta búsqueda la fitoterapia ha obtenido un gran reconocimiento por provenir de fuentes naturales, por lo que se justifica su uso tanto por razones económicas, como por la disminución de efectos tóxicos crónicos muy frecuentes en sustancias químicas puras (Marinoff, 2006).

Bases Teóricas

Familia Apocynaceae

Descripción Botánica

Son árboles, arbustos erectos o escandentes, hierbas o lianas; tallos jóvenes teretes, subteretes, aplanados o alados o acostillados; el tronco inerme o armado con agujones, con secreción de látex al cortarse, algunas veces casi no evidente, el color variando desde blanco o crema, hasta rojizo o morado, en algunos géneros comestible (*Couma, Lacmellea*), coléteres inter e intrapeciolares ausentes o presentes, algunas veces muy desarrolladas (*Mandevilla, Mesechites*) y pareciendo pequeñas garras o espinas en los tallos viejos o estípulas en los tallos jóvenes (*Odontadenia*) (ver Figura 2) (Grant, Fosberg y Smith, 1974).

Sus hojas son simples, opuestas, verticiladas o alternas, algunas veces en espiral, iguales, imbricados; corola hipocraterimorfa, infundibuliforme o urceolada, constituidas por coronas anulares o una corona epiestaminal conformada por cinco lóbulos coronales libres, estos algunas veces reducidos a crestas callosas, limbo con cinco lóbulos o pétalos con 5 estambres incluidos o exsertos, filamentos cortos e inconspicuos a evidentes y conspicuos, anteras biloculares, introrsas, conniventes y aglutinadas a la cabeza estigmática; ovario superior, bilocular, con placentación axilar o parietal, los carpelos libres o unidos, óvulos 1 o varios por lóculo. Frutos apocárpicos o sincárpicos, foliculares, capsulares, abayados o drupáceo; semillas 1 a muchas, el endospermo en forma usual presente, en frutos foliculares usualmente comosas en el ápice, aladas, ariladas o secas (Grant y cols, 1974).



Figura 2. Algunos representantes de la familia Apocynaceae
Tomado y modificado de Alvarado, Lozada, Islas, Cortez, Maya y Chávez,
2020.

Distribución Geográfica

La familia Apocynaceae se encuentra distribuida en todo el mundo, pero principalmente en las áreas tropicales, subtropicales y templadas, donde cerca de 355 géneros y 3700 especies son encontradas (Alvarado y Ochoterena, 2007).

Taxonomía

Taxonómicamente se divide según lo indica la Tabla 1 (Herrera y Rivera, 2013).

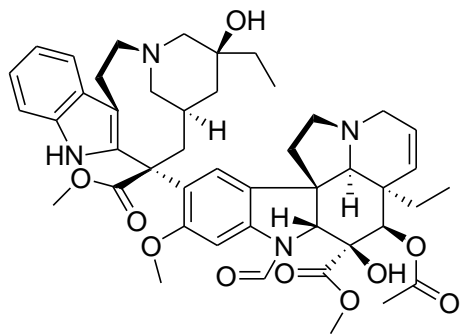
Tabla 1. Taxonomía de la Familia Apocynaceae

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida
Orden	Gentianales
Familia	Apocynaceae

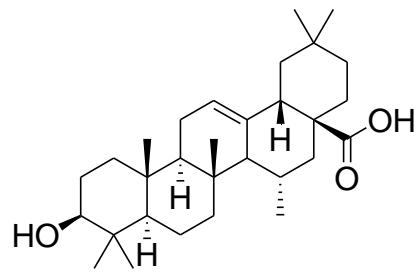
Tomado y modificado de Herrera y Rivera, 2013.

Metabolitos secundarios

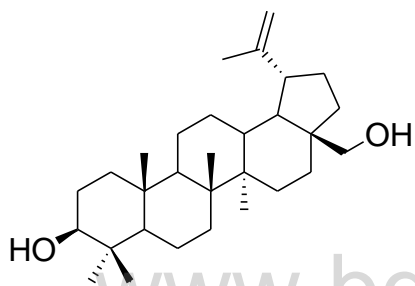
Las plantas que se encuentran dentro de la familia Apocynaceae son reconocidas por sus usos etnomedicinales de amplio espectro, propiedades que son otorgadas por el alto contenido en metabolitos secundarios presentes en su composición. Entre los metabolitos aislados de diferentes partes de las plantas Apocynaceae encontramos alcaloides indol, iboga y vinca, como la vincristina (5), terpenos como el ácido oleanólico (6) y la betulina (7), esteroides como estigmasterol (8), flavonoides como la rutina (9) y quercentina (10), glucósidos cardíacos como el kanerosido (11) y tevefolina (12), fenoles simples como el ácido vanílico (13), ácido clorogénico (14) y ácido ferúlico (15), lactonas e hidrocarburos (ver Figura 3) (Bhadane, Patil, Maheshwari y Patil, 2018).



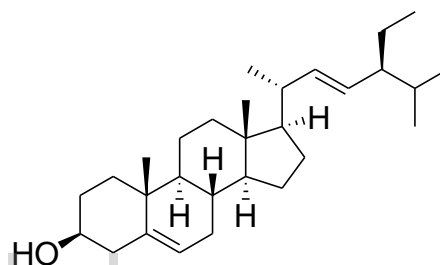
Vincristina (5)



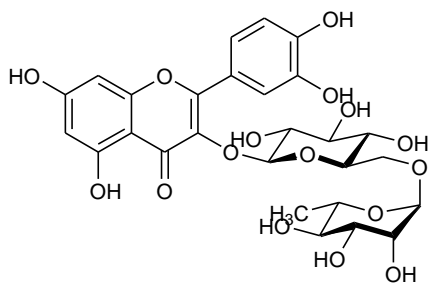
Ácido oleanólico (6)



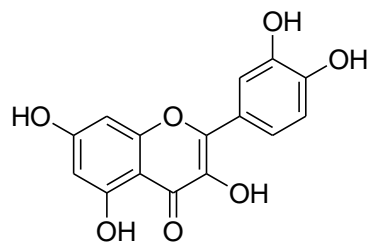
Betulina (7)



Estigmasterol (8)



Rutina (9)



Quercetina (10)

Figura 3. Metabolitos secundarios aislados de la familia Apocynaceae
Tomado y modificado de Bhadane y cols, 2018.

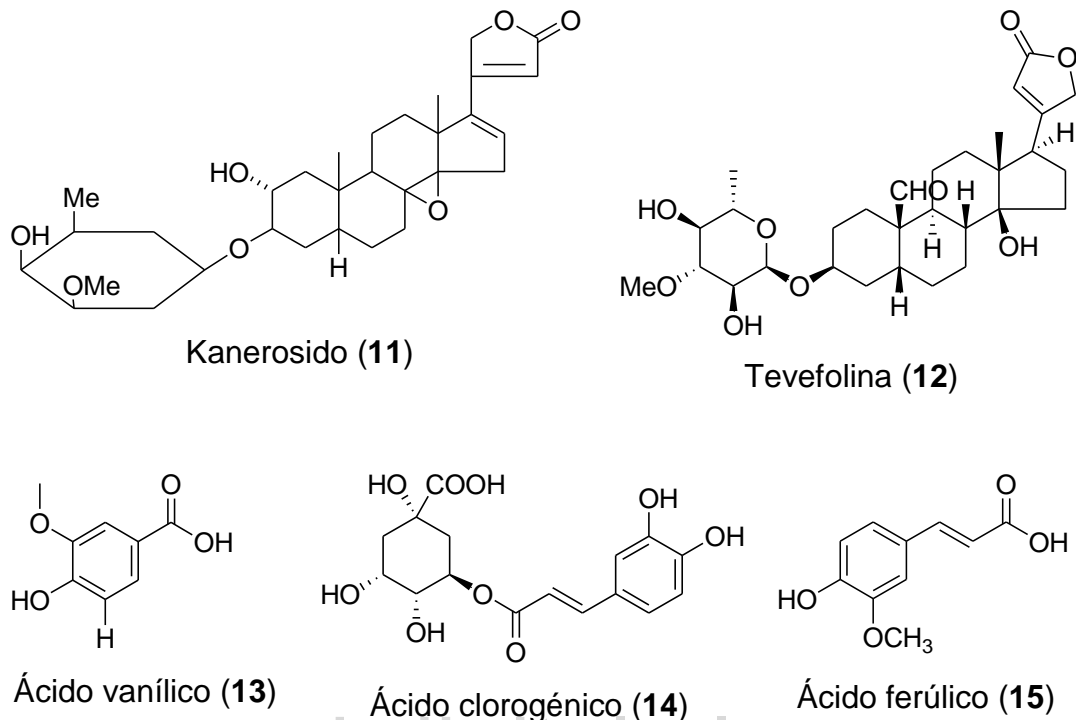


Figura 3(continuación). Metabolitos secundarios aislados de la familia Apocynaceae. Tomado y modificado de Bhadane y cols, 2018.

Actividad Farmacológica y/o Biológica

Estudios han informado diversas actividades como antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, citotóxicas y hepatoprotectora de extractos crudos, así como compuestos individuales aislados de varios miembros de la familia (Bhadane y cols, 2018).

Género *Thevetia*

Descripción botánica

Arbustos o árboles, tallos con secreción lechosa, glabros a puberulentos, los pecíolos con coléteres axilares pequeños e inconspicuos. Hojas alternas, usualmente dispuestas en espiral, lámina eglandular, sin coléteres, glabras o puberulentas en la superficie abaxial, membranáceas a firmemente membranáceas, sin domacios, márgenes no revolutos, sésiles, subsésiles a pecioladas. Inflorescencias corimbosas, axilares a terminales o subterminales, con pocas o muchas flores, glabrescentes o puberulentas, brácteas inconspicuas; cáliz con 5 sépalos, iguales, pequeños y más o menos triangulares a subfoliáceos, con numerosos coléteres en la base (Alvarado y Ochotorena, 2007).

Distribución Geográfica

Distribuido desde México, Bolivia, Argentina, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Brasil, Guatemala, Honduras, Panamá, Cuba, República Dominicana, Haití, Paraguay y Nicaragua; así como en las regiones tropicales del mundo (García, 1975; Alvarado y Ochotorena, 2007).

Taxonomía del Género *Thevetia*

Taxonómicamente se divide según lo indica la Tabla 2 (Herrera y Rivera, 2013).

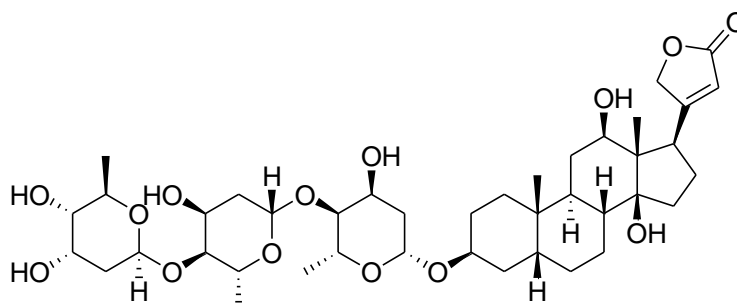
Tabla 2. Taxonomía del Género *Thevetia*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida
Orden	Gentianales
Familia	Apocynaceae
Género	<i>Thevetia</i>
Especies	<i>T. peruviana</i> , <i>T. ahouai</i>

Tomado y modificado de Herrera y Rivera, 2013.

Metabolitos Secundarios Aislados

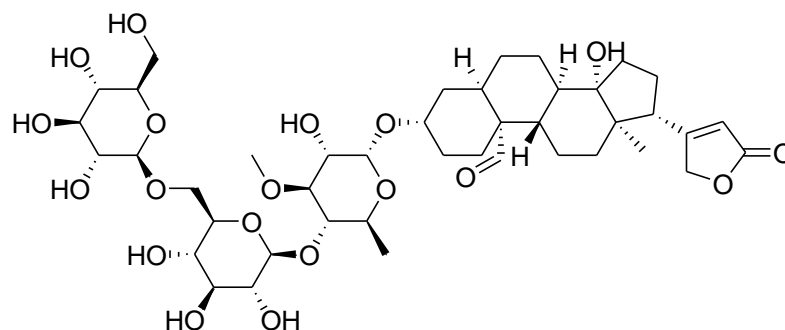
Del género *Thevetia* se han realizado múltiples estudios, donde se han aislado diversos metabolitos secundarios, siendo los más abundantes los glucósidos cardiotónicos como la digoxina (**16**), Thevetin A (**17**) y Thevetin B (**18**). Además se evidencia en menores proporciones la presencia de esteroides, flavonoides y algunos compuestos fenólicos simples (ver Figura 4) (Bhadane y cols, 2018).



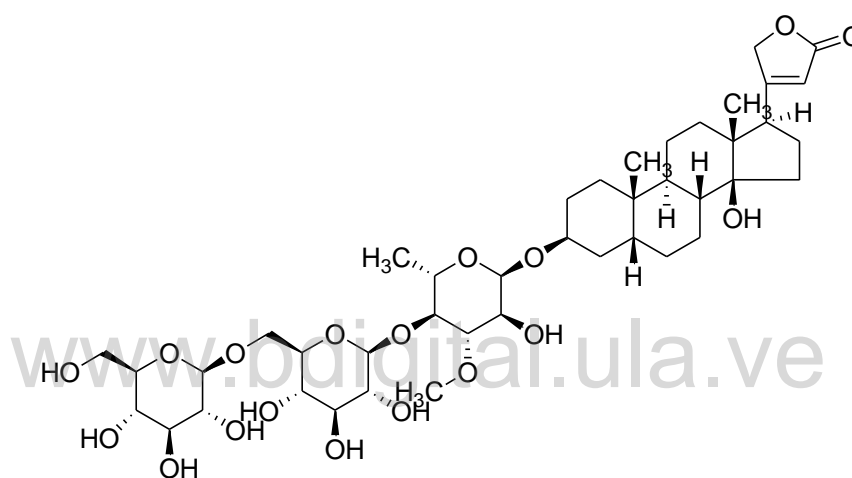
Digoxina (**16**)

Figura 4. Glucósidos cardiotónicos aislados del género *Thevetia*.

Tomado y modificado de Bhadane y cols, 2018



Thevetin A (17)



Thevetin B (18)

Figura 4 (continuación). Glucósidos cardiotónicos aislados del género *Thevetia*. Tomado y modificado de Bhadane y cols, 2018

Actividad Farmacológica y/o Biológica

Investigaciones recientes han mencionado que el género *Thevetia* posee actividad antibacteriana, antifúngica, anticoagulante, antioxidante y una fuerte citotoxicidad tumoral (Wen, Chen, Lu, Wang, y Jiang, 2016; Abdelghany y cols, 2021; Al-Rajhi y cols, 2022).

Especie *Thevetia peruviana*

Descripción Botánica

Es un árbol o arbusto pequeño de dos a cinco metros de altura, con látex blanco en todas las partes de la planta covalonga. Las hojas son simples y persistentes. Las flores son solitarias y se originan en la parte terminal de las ramas o en las axilas de las hojas. Las semillas son aplanadas, ciliadas, aladas y cubiertas por un arilo o desnudas. Los frutos son transversalmente oblongos, generalmente más o menos triangulares, verdosos, amarillentos o purpúreos. En su interior se encuentra una nuez o almendra (ver Figura 5) (Herrera y Rivera, 2013). En Venezuela sus nombres comunes son muy variados, entre los que se destacan: Adelfa amarilla, manzanito, manzanita del diablo y codo de fraile (Salinas, 2010).



Figura 5. Flor, hojas y tallos de *Thevetia peruviana*
Tomado y modificado de Herrera y Rivera, 2013.

Distribución Geográfica

Es originaria de Sur América y prolifera en las regiones tropicales del mundo; en Colombia se distribuye desde el nivel del mar hasta 1500 m s. n. m., crece en asocio con vegetación xerofítica en bosque muy seco tropical. Específicamente, se distribuye por México, Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Panamá, Cuba, República Dominicana, Haití, Guayana Francesa, Surinam, Venezuela, Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú, Brasil, Argentina, Paraguay y Nicaragua donde es ampliamente cultivada en todo el país en alturas desde 10 hasta 1.200 metros (García, 1975).

Taxonomía

Taxonómicamente se divide según lo indica la Tabla 3 (Herrera y Rivera, 2013).

Tabla 3. Taxonomía de la Especie *Thevetia peruviana*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Equisetopsida
Orden	Gentianales
Familia	Apocynaceae
Género	<i>Thevetia</i>
Especie	<i>Thevetia peruviana</i>

Tomado y modificado de Herrera y Rivera, 2013.

Metabolitos Secundarios Aislados

Varios estudios fitoquímicos realizados sobre la especie *Thevetia peruviana*, revelaron alto contenido en glucósidos cardiotónicos como Thevetin A, Thevetin B y Acetilthevetin A, donde además se evidencia la presencia de compuestos cardenólidos, principalmente en el extracto de las hojas y corteza de *T. peruviana*, como neriifolina (**19**), peruvósido (**20**), tevefolina (**21**) y (20S)-18,20-epoxidigitoxigenina R-L- tevetósido (**22**) (ver Figura 6) (Dash y cols,2022, 2018, Abrego y Honles, 2012).

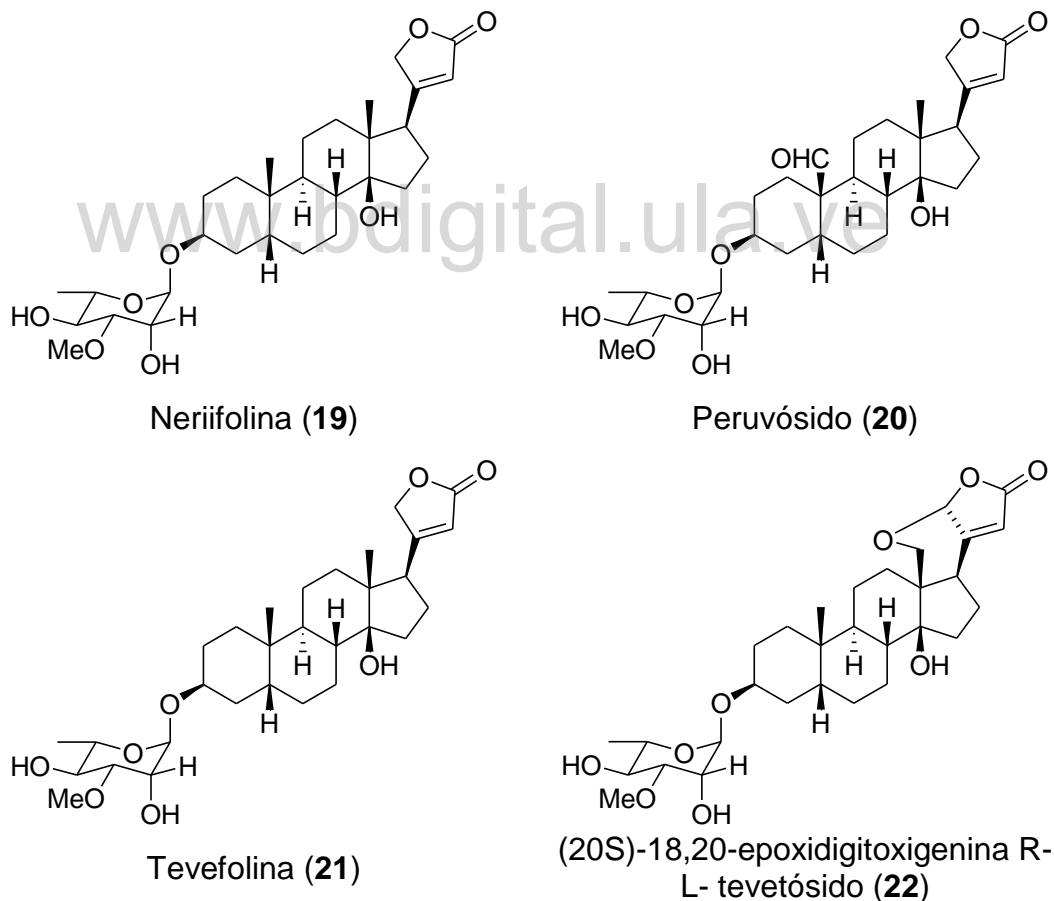
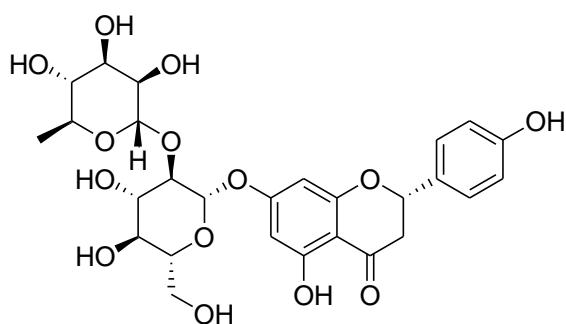
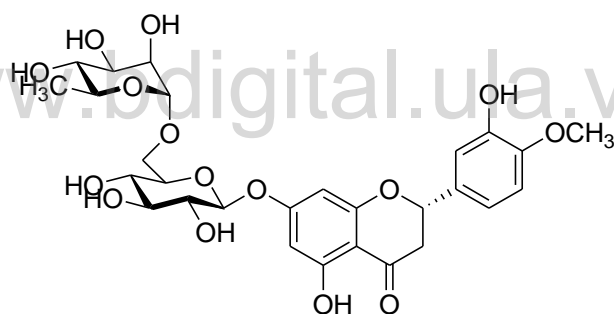


Figura 6. Glucósidos cardiotónicos aislados de *Thevetia peruviana*
Tomado y modificado de Abrego y Honles, 2012.

La determinación de presencia de flavonoides como rutina, quercetina, naringina (**23**), hesperidina (**24**) y ácido ferúlico, específicamente aislados del látex de *Thevetia peruviana* (ver Figura 7) (Al-Rajhi y cols, 2022).



Naringina (**23**)



Hesperidina (**24**)

Figura 7. Flavonoides aislados del látex de *Thevetia peruviana*

Tomado y modificado de Al-Rajhi y cols, 2022.

Algunos triterpenos importantes como α -amirina (**25**), β -amirina (**26**) y ácido ursólico (**27**), han sido extraídos de extractos metanólicos de las hojas de *Thevetia* (ver Figura 8) (Dash y cols, 2022).

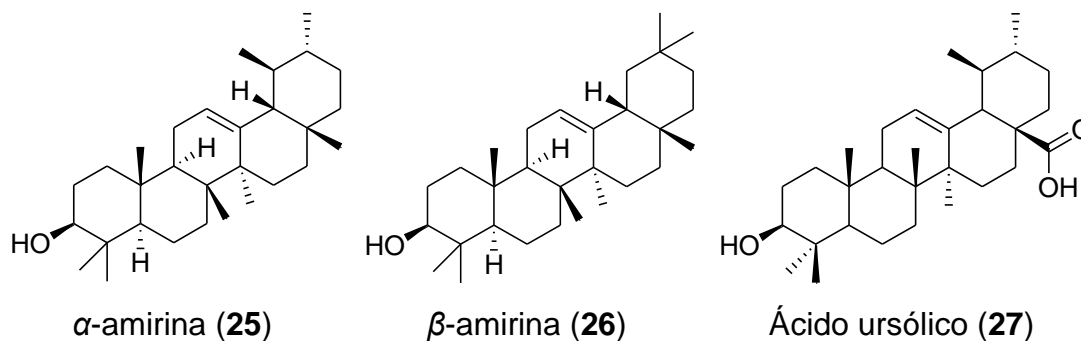


Figura 8. Metabolitos extraídos de extractos metanólicos de las hojas de *Thevetia peruviana*. Tomado y modificado de Dash y cols, 2022.

Actividad Farmacológica y/o Biológica de la Especie *Thevetia peruviana*

En México el látex se emplea contra las hemorroides, escabiosis, úlceras y llagas; el extracto de la planta entera se utiliza como antimálarico (Mendieta y Del Amo, 1981). Estudios recientes han demostrado, que la especie *Thevetia peruviana* posee actividad antibacteriana, antifúngica, anticancerígena, citotóxica, anticoagulante y antioxidante (Abdelghany y cols, 2021; Meena y cols, 2021; Al-Rajhi y cols, 2022).

Productos Naturales

Las plantas emplean una cantidad significativa del carbono asimilado y de energía a la síntesis de moléculas orgánicas que aparentemente no poseen actividad directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes, transporte de solutos o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, denominados metabolitos secundarios o productos naturales. Su síntesis se ve restringida a determinadas familias o géneros de plantas, o incluso algunas especies (Ávalos y Pérez, 2009).

Dentro de sus funciones ecológicas podemos encontrarlos como atrayentes de animales, al proporcionar pigmentos en flores y frutos, o repelentes de animales, al aportar sabor amargo y generar indigestión o envenenamiento al consumirlas. Poseen importante valor medicinal y económico, al ser de gran utilidad en la industria cosmética, alimentaria, y farmacéutica, ya sea en la elaboración de medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, entre otros (Ávalos y Pérez, 2009). Algunos metabolitos secundarios se mencionan a continuación:

- **Alcaloides:** Constituyen un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas nitrogenadas, aunque estrictamente se considera que los alcaloides deben tener al menos un átomo de nitrógeno heterocíclico, el nitrógeno puede formar parte de una amina primaria (RNH_2), de una amina secundaria (R_2NH), de una amina terciaria (R_3N) o de una amina cuaternaria. La nicotina, cafeína, codeína y vincristina son algunos de los alcaloides con usos terapéuticos más utilizados en la actualidad (Martínez, Valencia y Jiménez, 2008).
- **Saponinas:** Estructuralmente están constituidas principalmente por grupos hidroxilos y uniones de tipo éter y lactónicas; están compuestas por azúcares y agliconas. La β -amirina y el ácido oleanólico, son algunos representantes de este grupo (Martínez y cols., 2008).
- **Esteroles:** Son compuestos cuya estructura presenta el sistema anular del ciclopentano perhidrofenantreno, metilos en los carbonos 10 y 13 y un radical lineal en el carbono 17. Se clasifican en fitoesteroles (como el estigmasterol) y fitoestanoles (formas reducidas de los fitoesteroles),

presentan un estructura semejante al colesterol de origen vegetal, considerados triterpenos insaturados (Martínez y cols., 2008).

- **Terpenos:** Dentro de los terpenos, existe una subclase en donde se encuentran los carotenoides, fitoesteroles, capsaicina, saponinas. Se encuentran distribuidos uniformemente en todas las partes de las especies que los poseen. La betulina, el ácido oleanólico y el ácido ursólico son algunos ejemplos de triterpenoides con amplio poder medicinal (Aponte, Calderón, Delgado, Herrera, Jiménez, Ramírez, Rojas y Toro, 2008; Bhadane y cols., 2018).
- **Taninos:** Químicamente los taninos son polímeros de polifenoles, no nitrogenados, formados por la condensación de las catequinas, sustancias de alto peso molecular, solubles en agua y no en solventes orgánicos. Se encuentran principalmente en las maderas de plantas leñosas, siendo el ácido gálico (**28**) uno de los principales taninos en la naturaleza (ver Figura 9) (Bruneton, 2001).

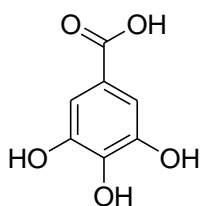


Figura 9. Estructura química del Ácido gálico (**28**)

Tomado y modificado de Bruneton, 2001.

- **Fenoles:** Consisten en una estructura bencénica polisustituida; pirogalol, timol, eugenol, apiol, anetol; son los compuestos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido. Compuestos como el ácido vanílico y el

ácido clorogénico han sido aislado en diversas especies con gran actividad biológica (Kennedy, 2019).

- **Quinonas:** Las quinonas son anillos aromáticos, poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función; gracias a lo antes mencionado, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio, siendo la O-quinona (**29**) el ejemplo más simple del mismo (ver Figura 10) (Domingo y López, 2003).

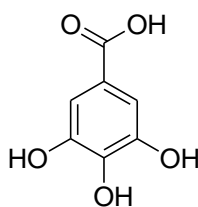


Figura 10. Estructura química de O-quinona (**29**)

Tomado y modificado de Domingo y López, 2003

- **Cumarinas:** Las cumarinas son un grupo muy amplio de principios activos fenólicos y tienen en común la estructura química de 1-benzopirán-2-ona. Se caracterizan porque presentan fluorescencia bajo la luz ultravioleta a 365 nm, la escopoletina (**30**) es un ejemplo de este grupo de fitoconstituyentes (ver Figura 11) (Bruneton, 2001)

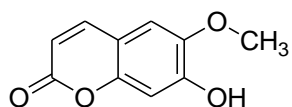
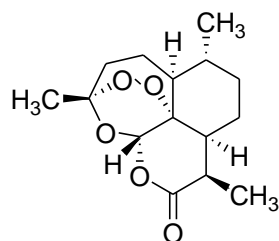


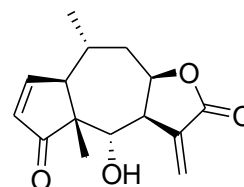
Figura 11. Estructura química de escopoletina (**30**)

Tomado y modificado de Bruneton, 2001.

- **Lactonas sesquiterpénicas:** Derivan de los sesquiterpenos, compuestos lactónicos que se clasifican con base en su esqueleto carbocíclico como germacranólidos, guaianólidos, eudesmanólidos y pseudo-guaianólidos entre otros (el sufijo ólido se refiere a la función lactona); la artemisinina (**31**) y la helenalina (**32**), son algunos ejemplos con gran importancia farmacológica (ver figura 12) (Lock, 1988).



Artemisinina (**31**)



Helenalina (**32**)

Figura 12. Estructura química de lactonas sesquiterpénicas
Tomado y modificado de Lock, 1988.

- **Glucósidos cardiotónicos:** son compuestos orgánicos carbonílicos (aldehídicos o cetónicos) polihidroxilados, así como sus derivados oxidados o reducidos (ácidos urónicos y polioles), ésteres, éteres y derivados aminados (osaminas). El kanerosido, la neriifolina y tevefolina son algunos glucósidos utilizados ampliamente en el tratamiento de insuficiencia cardíaca (Bruneton, 2001).

Extractos Vegetales

Son compuestos producidos de la obtención de sustancias biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, por el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado. De una misma planta, dependiendo de la parte de ella utilizada, del

solvente y de la técnica de extracción, podremos obtener diferentes sustancias (Sharapin, 2000).

Métodos de obtención de los extractos vegetales

Extracción por Reflujo: es una técnica para extraer y preservar los compuestos químicos en las especies vegetales; está formado por un condensador que se usa para condensar los mismos. Durante el reflujo, la evaporación de la mezcla que se hierve es seguida por la condensación de estos vapores sobre las paredes interiores de un condensador, éste se refrigera con el agua que fluye por una camisa envolvente a su alrededor (Sharapin, 2000).

Maceración: es un procedimiento en el que se coloca el material vegetal, desecado o no, en un recipiente adecuado con tapa. Se agrega suficiente cantidad de disolvente o mezcla de disolventes, hasta tapar totalmente el material vegetal. Se deja en reposo a temperatura ambiente o en un sitio tibio durante un tiempo indicado (3 a 7 días aproximadamente), hasta que el material soluble se disuelva. Se agita con frecuencia durante el tiempo de maceración. Seguidamente se filtra para retirar el disolvente. Para completar a volumen se hace pasar disolvente hasta alcanzar el volumen deseado (Nadinic, Bandoni, Martino y Ferraro, 2016).

Percolación: Se humedece 1 Kg del material vegetal con una cantidad suficiente del disolvente indicado para embeberla bien. Se deja en maceración en un recipiente por un tiempo específico, después se empaca un percolador de tamaño adecuado con el material vegetal. Se agrega suficiente disolvente hasta obtener una columna en el percolador, se tapa el orificio inferior, se cubre el percolador y se deja macerar durante 48 horas. Pasado este tiempo, se abre

la canilla inferior y se comienza a obtener el percolado, reservando las primeras fracciones. Se continúa la percolación agregando más cantidad de disolvente hasta el agotamiento del material vegetal (Nadinic y cols, 2016).

Decocción: Se obtiene por calentamiento a ebullición (100 °C) del material vegetal con el disolvente o con agua. Por lo general, se emplea para materiales vegetales cuyas partes usadas sean duras como cortezas, tallos, raíces y que contenga principios solubles en el disolvente (Nadinic y cols, 2016).

Análisis Fitoquímico Preliminar

El tamizaje fitoquímico es una herramienta en la investigación del potencial biológico y farmacológico que poseen las plantas. Consiste en la obtención de extractos de plantas con solventes apropiados, tales como agua, acetona, alcohol, cloroformo, éter, entre otros. El diclorometano, se usa específicamente para la extracción de terpenoides (Prashant, Bimlesh, Mandeep, Gurpreet y Harleen; 2011). Posterior a la extracción, se llevan a cabo pruebas cualitativas o reacciones de coloración, las cuales son reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Algunas de estas, evalúan grupos de sustancias y otros la presencia de otros compuestos como ácidos grasos, azúcares reductores, polisacáridos y mucílagos. Los resultados de las reacciones son reportados como (+) o (-) para el metabolito de que se trate (Sharapin, 2000). Descripción de los fundamentos de las pruebas que se realizaron en esta investigación:

Pruebas para determinar alcaloides

- ✓ **Ensayo de Wagner, Mayer y Dragendorff:** El reactivo de Dragendorff es una mezcla de yoduro de potasio y nitrato de bismuto, detectándose

el alcaloide al producirse un precipitado rojo-naranja; en la reacción de Mayer el yoduro de potasio y el bicloruro de mercurio junto con el alcaloide dan un precipitado de color blanco (Marcano y Hasewaga, 2002). Para el reactivo Wagner, el yoduro de potasio se visualiza un precipitado marrón (Domínguez, 1973; Bruneton, 2001).

Prueba para determinar triterpenos/esteroles

- ✓ **Ensayo de Lieberman-Bouchard:** Está compuesta por una mezcla de ácido sulfúrico y anhídrido acético, que producen sustancias cromóforas con el ciclopentano perhidrofenantreno. La positividad de la prueba se da al observar un color rojo, verde o azul (Domínguez, 1973; Bruneton, 2001).

Prueba para determinar compuestos fenólicos

- ✓ **Prueba de tricloruro férrico (FeCl_3):** Las sustancias precipitan en presencia de cloruro férrico, dicha respuesta se debe al efecto producido por el ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo; provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (Domínguez, 1973).

Prueba para determinar saponinas

- ✓ **Prueba de la espuma:** El extracto disuelto en agua, se agita vigorosamente; la aparición de espuma indica la presencia de saponinas (Marcano y Hasegawa, 2002).

Prueba para determinar taninos

- ✓ **Ensayo de la gelatina:** Permite reconocer la presencia de taninos, la positividad de este ensayo se observa con la aparición de un precipitado blanco (Bruneton, 2001).

Pruebas para determinar flavonoides

- ✓ **Ensayo de Shinoda:** El magnesio en polvo reacciona con ácido clorhídrico concentrado. El hidrógeno generado produce por reducción el ión flavilio, observándose un color rojo escarlata (varía desde un rosa débilmente hasta el rojo escarlata) (Domínguez, 1973; Bruneton, 2001).
- ✓ **Prueba de NaOH al 10 %:** La aparición de amarillo a rojo (xantonas y/o flavonas), café a púrpura rojizo (chalconas) y azul (antocianinas) (Domínguez, 1973; Bruneton, 2001).

Prueba para determinar cumarinas

- ✓ **Prueba de Hidróxido de Amonio concentrado (NH₄OH):** Las cumarinas al ser observadas bajo la luz ultravioleta, presentan una fluorescencia azul-violeta en presencia de amoniaco (Bruneton, 2001).

Prueba para determinar antraquinonas

- ✓ **Ensayo de Borntrager:** La naftoquinonas y antraquinonas libres, al ser tratadas con la solución de hidróxido amónico concentrado (NH₄OH []) forman complejos de color rojo cereza (Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011).

Prueba para determinar quinonas

- ✓ **Prueba de Ácido Sulfúrico concentrado (H_2SO_4 []):** Una pequeña porción de muestra se disuelve en ácido sulfúrico concentrado. La prueba es positiva al aparecer una coloración roja-púrpura (Domínguez, 1973).

Prueba para determinar lactonas sesquiterpénicas

- ✓ **Ensayo de Baljet:** Es útil para reconocer la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico. La prueba es positiva, cuando se observa una coloración o precipitado de color rojo (Domínguez, 1973).

Prueba para determinar glucósidos cardiotónicos

- ✓ **Ensayo de Keller's:** El desarrollo de una coloración violácea, persistente durante 1 a 2 horas, es indicativo de glucósidos cardiotónicos (Bruneton, 2001).

Hongos

Los hongos son organismos unicelulares o pluricelulares, con estructura celular eucariótica y con una pared celular con quitina, polisacárido constituido por el disacárido quitobiosa, que está compuesto por subunidades de N-acetil-glucosamina β -1-4. Carecen de diferenciación tisular, sin embargo, poseen nutrición heterótrofa de carbono de tipo absorptivo. Estos organismos son los responsables de diversidad de enfermedades micóticas como las micosis superficiales, micosis cutáneas, subcutáneas y sistémicas (Bonifaz, 2012).

En el caso de las micosis superficiales y cutáneas son las más comunes y están causadas en su mayoría por un grupo de hongos denominados

dermatofitos, entre estos *Candida albicans* se constituye como un hongo oportunista y el más común agente infeccioso de hombres y animales (Bonifaz, 2012).

El término levadura etimológicamente significa “organismo unicelular que se reproduce por brotación”. Esta definición no es totalmente correcta debido a que algunas levaduras se reproducen por fisión, otras producen micelio verdadero bajo ciertas condiciones nutricionales (dimorfismo) y ciertos hongos filamentosos pueden existir en forma unicelular o levaduriforme (dimorfismo). Son heterótrofas, que viven a expensas de otros seres vivos (levaduras parásitas) o sobre materia orgánica muerta (levaduras saprófitas) (Arenas, 2003; Pontón, Moragues, Gené, Guarro y Quindós; 2002).

Están ampliamente distribuidas en la naturaleza, se las encuentra en las frutas, granos, miel y otros alimentos que contienen azúcar, en el suelo, aire, mar, piel y mucosa de mamíferos. Muchas de ellas son útiles para el hombre, como las que se emplean en la producción de cerveza, vino y pan; otras son perjudiciales ya que descomponen alimentos, deterioran fibras textiles o causan enfermedades en las plantas, los animales y el hombre. Existen más de 600 especies conocidas de levaduras, distribuidas en 60 géneros taxonómicos, de las cuales solo unas pocas especies son capaces de producir enfermedades en humanos y animales (Bonifaz, 2012, Arenas, 2003). Dentro de ellas, las más aisladas como agentes causales de infecciones en el hombre son:

- ✓ *Candida albicans* y otras especies del género (se han descrito más de 190 especies): *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida dubliniensis*; responsables de la Candidiasis.
- ✓ *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* (criptococosis)
- ✓ Especies de *Malassezia* (pitiriasis, dermatitis, foliculitis, entre otras).
- ✓ Especies de *Trichosporon* (trichosporonosis)

- ✓ Especies de *Geotrichum* (geotricosis) (Arenas, 2003; Pontón, 2002).

Clasificación taxonómica: Taxonómicamente se dividen según lo indica la Tabla 4 (Bonifaz, 2012).

Tabla 4. Taxonomía de las especies *Candida albicans* y *Candida krusei*

Dominio	Eucarya
Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Blastomycetes
Familia	Cryptococaceae
Género	<i>Candida</i>
Especies	<i>Candida albicans</i> y <i>Candida krusei</i>

Tomado y modificado de Bonifaz, 2012.

Candida albicans

Es una levadura dimórfica, forma largas pseudohifas, hifas y blastoconidias, redonda u ovoide con 3 µm de diámetro, con o sin gemación, asimila y fermenta azúcares. El dimorfismo le permite evadir los mecanismos de defensa relacionados con la inmunidad celular del huésped. Es la especie patógena más frecuente en el hombre, vive como saprófito sobre la piel y las mucosas del tracto respiratorio y digestivo. Puede producir infecciones superficiales que afectan a piel, uñas y mucosas. La piel húmeda y las mucosas oral y vaginal son lugares donde la infección candidiásica es frecuente. Macroscópicamente, en agar Sabouraud crece formando colonias blancas, blandas, cremosas y lisas (ver Figura 13) (Arenas, 2003).



Figura 13. *Candida albicans*
Tomado y modificado de Arenas, 2003.

Candida krusei

Es una levadura, sus células mayores son cilíndricas, de hasta 25 mm de largo. Las colonias separadas exceden con frecuencia los 5 mm de diámetro sobre el agar malta-glucosa a 25 °C. En el medio cromogénico: CHROMagar Candida™ (CHROMagar, Paris, France), sus colonias son color rosa, secas y rugosas (ver Figura 14). Esta especie es intrínsecamente resistente al Fluconazol® (Arenas, 2003; Pontón y cols, 2002).



Figura 14. *Candida krusei* ATCC 14243 en Agar Cromogénico.
Tomado y modificado de Liofilchem ®, 2015.

Agentes Antifúngicos

El concepto de agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped (Gregorí, 2005).

Clasificación de los antifúngicos

Los antimicóticos incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. La clasificación se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura en: polienos, azoles, alilaminas, entre otros (ver Tabla 5).

Tabla 5. Clasificación de los Antifúngicos por su Estructura

Polienos	Nistatina®, Natamicina®, Anfotericina B®
Azoles	Imidazol: Miconazol®, Clotrimazol®
	Triazoles: Fluconazol®, Itraconazol®, Ketoconazol®
	Triazoles de segunda generación: Voriconazol®, Ravuconazol®, Posaconazol®
Alilaminas	Terbinafina®, Naftifina®
Lipopéptidos	Papulacandinas
	Triterpenos glicosilados
	Equinocandinas: Caspofungina®, Anidulofungina®, Micafungina®
Pirimidinas fluoradas	Flucitosina®

Tomado y modificado de Gregorí, 2005.

De acuerdo con su origen en sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química; de acuerdo con su espectro de acción en: amplio o restringido y de acuerdo con el sitio de acción (ver Tabla 6) (Gregorí, 2005).

Tabla 6. Clasificación de los Antifúngicos por su Sitio de Acción en el Hongo

Antifúngicos interactuando en pared celular	Lipopéptidos
Antifúngicos interactuando en membrana celular	Polienos, azoles, alilaminas
Antifúngicos interactuando en núcleo	Pirimidinas fluoradas

Tomado y modificado de Gregorí, 2005.

Actividad Antifúngica

Es aquella capaz de producir una alteración de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped, dicha actividad antifúngica se medirá mediante la difusión en agar con disco (Kirby-Bauer), que permite valorar la sensibilidad y resistencia del microorganismo frente al compuesto seleccionado (Pelczar, y Reid, 1992; Clavell, 1992).

Técnicas para la determinación de la actividad antifúngica

Entre los métodos más usados para evaluar la actividad antifúngica, se encuentran el método de difusión y el método de dilución.

Método de Difusión en disco: el método Kirby-Bauer (Método de difusión en agar) es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano

frente a un antibiótico o quimioterápico. Este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana o fúngica frente a drogas específicas (Ramírez, García, Longa, Sánchez, Nieves, Velasco, Araque y Mosqueda, 2010; Lizcano y Vergara, 2008).

En este método, el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico o antifúngico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35-37 °C. Durante la incubación, el antibiótico o antifúngico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico o antifúngico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos, por ejemplo, el Instituto de Normas de Laboratorios Clínicos (conocido por sus siglas en inglés como CLSI, 2020) (Ramírez y cols, 2010; Lizcano y Vergara, 2008).

Método de Difusión en pozo: se deposita el inóculo y se siembra sobre agar selectivo estipulado; seguido de ello se hacen los pozos sobre la superficie del agar (6 mm de diámetro) y en cada uno de ellos se deposita 25 µL de los extractos a evaluar, estándares (control positivo y negativo), se deja reposar por espacio de 30 min (para evaporar el líquido), se incuba con la caja invertida a 35 °C por 24 h para bacterias y a 29 °C por 48 h en caso de levaduras y posteriormente se miden los halos de inhibición (Sánchez, Castillo y García, 2016).

Métodos de Dilución: el método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración

bactericida mínima (CBM), y la concentración inhibitoria mínima (CIM) (Aberg, Goldman, Gray y Long, 2001; McDermott, Bodeis, Fritsche, Jones y Walker, 2005), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas, y la CBM como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado, estas variables son una herramienta para investigar nuevos antimicrobianos (Andrews, 2001).

En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la CIM es determinada después de la incubación (Wilkinson, 2007). En el método de dilución en agar, las cajas se siembran por profundidad con una determinada concentración de extracto vegetal, luego se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas, después de ésta, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas (Langfield, Scarano, Heitzman, Kondo, Hammond y Neto, 2004).

Definición Operacional de Términos

Candidiasis

Infección causada por la alteración de la presencia de hongos de *Candida* en diversos tejidos, generando erupciones, descamación, prurito e hinchazón en la zona afectada (Vazquez y Sobel, 2011).

Cromogénico

Un sustrato cromogénico puede ser definido como un compuesto o sustancia que contiene un grupo formador de color (Pontón y cols., 2002).

Dimorfismo

El término dimórfico, aplicado a los hongos, significa que determinadas especies pueden presentarse bajo dos tipos o aspectos morfológicos diferentes. Se conocen, respectivamente, como fase micelial y fase levadura (Pontón y cols., 2002).

Metabolismo

Conjunto de reacciones químicas que realizan las células de los seres vivos para sintetizar sustancias complejas a partir de otras más simples, o para degradar las complejas y obtener las simples (Ávalos y Pérez, 2009).

Micosis

Enfermedad infecciosa producida por hongos microscópicos que puede afectar a cualquier parte del organismo (Pontón y cols., 2002).

Patógeno

Agente infeccioso con capacidad de poder generar enfermedades y malestar al organismo que invade, alterando la fisiología del mismo (Pontón y cols., 2002).

Saprófito

Los saprófitos son organismos heterótrofos, lo que significa que no pueden producir su propio alimento y dependen de fuentes externas para obtener nutrientes (Pontón y cols., 2002).

www.bdigital.ula.ve

Operacionalización de las Variables

En las Tablas 7 y 8, se describen las variables que se asumieron en la presente investigación y los indicadores que las definen.

Tabla 7. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antifúngica de los extractos de las hojas y tallos de *Thevetia peruviana*

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición conceptual ¿Qué es?
Actividad antifúngica de los extractos de las hojas y tallos de <i>Thevetia peruviana</i>	Dependiente Cuantitativa	Engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped (Gregorí, 2005)
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
Método de difusión en agar con disco	Cepas ✓ <i>Candida albicans</i> CDC-B385 ✓ <i>Candida krusei</i> ATCC 6258	Presencia o ausencia del halo de inhibición Sensible Resistente

Elaborado por: Mora, Errante y Cordero, 2024.

Tabla 8. Operacionalización de la variable independiente: Composición química de los extractos de las hojas y tallos de *Thevetia peruviana*

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición conceptual ¿Qué es?
Composición química de los extractos de las hojas y tallos de <i>Thevetia peruviana</i>	Independiente Cualitativa	Los metabolitos secundarios son un grupo de compuestos que defienden a las plantas de los herbívoros y microbios patógenos, están implicados además en la interacción planta-animal, ayudando a atraer a animales por medio de señales visuales y olfativas (Taiz y Zeiger, 2006).
4. Definición operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
Pruebas Preliminares ó Tamizaje fitoquímico	Ensayo de Dragendorff	Alcaloides: precipitado anaranjado
	Ensayo de Mayer	Alcaloides: precipitado color crema
	Ensayo de Baljet	Compuestos lactónicos: color rojo
	Ensayo de Borntrager	Quinonas y Antraquinonas: color rojo
	Ensayo de Lieberman-Buchard	Triterpenos: coloración roja Esteroles: coloración verde-azulado
	Ensayo de espuma	Saponinas: formación de espuma
	Ensayo de cloruro férrico	Compuestos fenólicos y/o taninos: color azul, verde o negro)
	Prueba de NH ₄ OH	Cumarinas: Presencia de fluorescencia azul-violeta
	Ensayo de Shinoda	Flavonoides: rojo escarlata

Elaborado por: Errante, Mora y Cordero, 2024.

Hipótesis

Estudios recientes han demostrado que las especies del género *Thevetia* son una fuente de compuestos activos con actividades biológicas, por ende es posible que los extractos de las hojas y tallos de *Thevetia peruviana* presenten metabolitos secundarios con posible actividad antifúngica.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

El tipo de investigación es confirmatoria definida como aquella cuyo objetivo es comparar el comportamiento de uno o más eventos en los grupos observados. Requiere como logro anterior la descripción del fenómeno y la clasificación de los resultados (Hurtado, 2012). En este sentido, el objetivo de este estudio fue confirmar la actividad antifúngica de los extractos de las hojas y tallos de *Thevetia peruviana* frente a cepas de *Cándida albicans* y *Candida krusei*. Se orientó a destacar la forma diferencial en la que la actividad fúngica se manifiesta, sin establecer relaciones de causalidad.

Diseño de Investigación

Según Hurtado, 2010; el diseño de la investigación se debe precisar por medio de las estrategias que se implementan para recolectar la información en una fuente determinada, en un tiempo determinado y en una cantidad o amplitud asociada a lo que se quiere saber. La presente investigación, respecto al dónde, se llevó a cabo mediante un diseño experimental, puesto que las muestras se recolectaron en su hábitat natural, se mantuvo un diseño de campo y diseño de laboratorio, al trabajar con un grupo control y manipular la variable independiente con el fin de lograr un efecto sobre la variable dependiente.

Con respecto a su temporalidad, fue de tipo contemporánea y transeccional, al estudiar el evento en el presente en un único momento en el

tiempo. Además de esto, se contempló una amplitud de tipo unieventual, al estudiar una variable dependiente con una variable independiente.

Población y Muestra

La población se define como el conjunto de unidades de las que se desea obtener información y sobre las que se van a generar conclusiones (Arias, 2006) En este caso, la población estuvo representada por la planta *Thevetia peruviana*, ubicada en el Jardín Botánico "Ing. Carlos Liscano" de la Universidad de Los Andes, San Juan de Lagunillas estado Mérida.

Selección del Tamaño de la Muestra

La muestra estuvo representada por 100,07 gramos de hojas y 102,21 gramos de tallos de la especie *Thevetia peruviana* perteneciente a la familia Apocynaceae, que fueron analizados en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones "Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro" de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Sistema de variables

Un sistema de variables está compuesto por una serie de características a estudiar, definidas de manera operacional, es decir, en función de sus indicadores. Al mismo tiempo, se considera que una variable es una cualidad susceptible de experimentar cambios y permiten verificar el fenómeno de estudio en la unidad de investigación (Arias, 2006). Conforme a esto, las variables que se presentan en esta investigación fueron:

Variable Dependiente: Actividad antifúngica de los extractos de las hojas y tallos de *Thevetia peruviana*.

Variable Independiente: Composición química de los extractos de las hojas y tallos de *Thevetia peruviana*.

Instrumento de Recolección de Datos

En este proyecto de investigación se empleó la observación estructurada, la cual es una técnica de recolección de datos que permite acumular y sistematizar información sobre un hecho o fenómeno social que tiene relación con el problema que motiva la investigación (Hurtado, 2012). Mediante esta técnica, se registró la presencia o ausencia de los diferentes fitocompuestos en los extractos de la planta, a través de reacciones químicas cualitativas; de igual manera, se registró la sensibilidad o resistencia en las dos cepas de *Candida*, frente a la concentración de los extractos obtenidos de *Thevetia peruviana*, mediante la medición de los halos de inhibición.

Procedimiento de la Investigación

Recolección de las muestras vegetales

La muestra vegetal se recolectó en el Jardín Botánico "Ing. Carlos Liscano", San Juan de Lagunillas de la Universidad de Los Andes. Posteriormente se procesó e identificó taxonómicamente por el profesor Pablo Melendez en el Herbario M.E.R.F. "Dr. Luis Enrique Ruiz Terán" de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes, en el cual se depositó una muestra para obtener el voucher y el número de colección N°01.

Obtención de los extractos

La obtención de los extractos fue realizada en el Laboratorio “A” de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis bajo la asesoría de la Dra. Rosa Aparicio. Se seleccionaron las hojas y tallos verdes, frescos y en buen estado de la especie *Thevetia peruviana*, los cuales fueron colocados en estufa a 40 °C, y posteriormente triturados con la ayuda de un molino. A continuación se llevó a cabo el proceso de maceración para la extracción de los componentes de la planta, para el cual se pesaron 100 gramos del pulverizado de las hojas y de los tallos respectivamente, durante 72 horas, y utilizando como disolventes hexano y etanol.

Transcurrido el tiempo de la maceración, se filtró el líquido con papel de filtro para cada uno de los solventes empleados, los cuales se etiquetaron, como extracto de hexano y de etanol, según correspondió. Seguidamente, cada uno de ellos se concentró en el rotavapor a presión reducida y temperatura controlada no mayor de 45°C, eliminando los solventes. Finalmente, los extractos se colocaron en frascos color ámbar, y se llevaron a secar en la estufa a 40°C.

Tamizaje fitoquímico de los extractos

Las pruebas que se realizaron para detectar los metabolitos secundarios, presentes en los extractos (hexano y etanol) de las hojas y tallos de la especie *Thevetia peruviana* serán las descritas a continuación:

Pruebas para determinar alcaloides

- **Wagner/Mayer/Dragendorff:** Se tomó una porción de cada uno de los extractos de las hojas y tallos, en tubos de ensayo por separado y se agregaron 6 mL de HCl a cada tubo, se mezcló y se llevó a baño de María, y posteriormente se filtró y se separó cada extracto en 3 tubos de ensayo por separado, con la finalidad de agregar 2-3 gotas de sales de metales pesados contenidos en los diferentes reactivos (Dragendorff, Mayer y Wagner). Posteriormente se formó un precipitado de color naranja, el cual permitió detectar la presencia de alcaloides básicos (Domínguez, 1973).

Prueba para determinar triterpenos y esteroides

- **Lieberman-Bouchard:** A una pequeña porción de los extractos concentrados (hexano y etanol) de las hojas y tallos, se le añadió 1 mL de anhídrido acético y luego se estratificó con 2 gotas de H₂SO₄ concentrado, se dejó en reposo durante 5 minutos. Se consideró positiva la prueba con la aparición de coloraciones rojas, verdes o azuladas (Domínguez, 1973).

Prueba para determinar compuestos fenólicos

- **Prueba de tricloruro férrico (FeCl₃):** A los extractos de etanol (hojas y tallos), se le adicionaron algunas gotas de tricloruro férrico al 1 %. La formación de una coloración roja, azul, verde o púrpura indica la presencia de fenoles (Domínguez, 1973).

Prueba para determinar saponinas

- **Prueba de la Espuma:** Se preparó una solución acuosa de los extractos de etanol (hojas y tallos), posteriormente se añadió 1 mL de

cada uno en un tubo de ensayo y se agitó vigorosamente durante 1 minuto. Se considera la prueba positiva si la espuma se mantiene por 30 minutos a una altura de 8 a 10 mm (Domínguez, 1973).

Prueba para determinar taninos

- **Ensayo de la Gelatina:** Se disolvió 10 mg de los extractos de etanol (hojas y tallos) en 10 mL de una solución de gelatina (1 %) y una solución de cloruro de sodio al 10 %. La aparición de un precipitado blanco indica la presencia de taninos (Domínguez, 1973).

Pruebas para determinar flavonoides

- **Ensayo de Shinoda:** A 1 mL de los extractos (hexano y etanol de las hojas y tallos) diluidos, se les añadió una pequeña cantidad de magnesio metálico y 3 gotas de HCl concentrado. La positividad de la prueba está dada por la aparición de una coloración naranja o violeta (Domínguez, 1973).
- **Prueba de NaOH al 10 %:** Las soluciones de los extractos (hexano y etanol de las hojas y tallos) acuosos se trataron con 1 mL de una solución de hidróxido de sodio al 10 %. La aparición de coloraciones amarillas, rojas, café, púrpura y azul, se considera la prueba positiva (Domínguez, 1973).

Prueba para determinar cumarinas

- **Prueba de Hidróxido de Amonio (NH₄OH):** Los tubos de ensayo que contenían las soluciones de los extractos de etanol (hojas y tallos), se cubrieron con un círculo de papel de filtro, previamente tratado con solución de hidróxido de amonio 1 N; luego se colocaron durante unos minutos en agua hirviendo, posteriormente se retiró el papel filtro y se

examinarán bajo la luz ultravioleta. Se considera positiva la prueba si se presenta fluorescencia azul-violeta bajo la luz UV (Domínguez, 1973).

Prueba para determinar antraquinonas

- **Ensayo de Borntrager:** A 10 mg de los extractos de etanol (hojas y tallos), se le agrego 1 gota de hidróxido de amonio concentrado (NH_4OH). La positividad de dicha prueba está dada por la presencia de coloración roja (Domínguez, 1973).

Prueba para determinar quinonas

- **Prueba de H_2SO_4 concentrado:** A 10 mg de cada extracto (hexano y etanol) de las hojas y tallos, contenidos en una capsula de cerámica, se les agrego 1 gota de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de una coloración roja indica la positividad de la prueba (Domínguez, 1973).

Prueba para determinar lactonas sesquiterpénicas

- **Ensayo de Baljet:** Se disolvio 10 mg de los extractos (hexano y etanol) de las hojas, en 2 mL de HCl concentrado y se les adiciono 3 gotas del reactivo de Baljet. La formación de un color amarillo o naranja que se desvanece al agregar el HCl indica la presencia de un anillo lactónico y por ende la positividad de la prueba (Domínguez, 1973).

Prueba para determinar glucósidos cardiotónicos

- **Ensayo de Keller's:** Se disolvieron 10 mg de cada extracto (hexano y etanol) de las hojas y tallos, en el reactivo de Keller's, al mismo se le agrego unas gotas de H_2SO_4 concentrado. La formación de un anillo

marrón o verde en la interfase, evidenciara la presencia de glucósidos cardiotónicos (Domínguez, 1973).

Actividad antifúngica de los extractos de etanol de hojas y tallos de la especie Thevetia peruviana en dos cepas de Candida

La evaluación de la actividad antifúngica se realizó en el laboratorio de Micología “Dr. Corrado Capretti”, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la asesoría de los Profesores Clara Díaz y Alexander Moreno.

Preparación de la muestra:

Los extractos obtenidos de etanol, de las hojas y los tallos de *Thevetia peruviana*, se llevaron a una concentración de 10 mg/mL. El solvente utilizado fue dimetilsulfóxido (DMSO).

Evaluación de la actividad antifúngica:

La investigación se realizó por el método de difusión en agar con discos descrita por Martín, Péman y Rubio (2001), frente levaduras de referencia internacional: *Candida albicans* (CDC-B385) y *Candida krusei* (ATCC 6258).

Preparación de los Discos:

Los discos de papel de filtro de 2 mm de grosor por 6 mm de diámetro se organizaron en placas de Petri y se esterilizaron bajo luz ultravioleta (LUV), durante 90 minutos previos al ensayo. Posteriormente se impregnaron con 20 µL del extracto minutos antes del ensayo.

Preparación de los Inóculos

Los inóculos se prepararon a partir de un cultivo fresco de 24h, en agar Sabouraud dextrosa con Cloranfenicol, hasta que se logró una turbidez correspondiente para las levaduras al patrón de McFarland N° 1,5 (3×10^8 UFC/mL, UFC: unidades formadoras de colonias).

Preparación de las placas de Petri e inoculación

Se agregaron 20 mL de agar Müller-Hinton (HIMEDIA®), suplementado con 2 % p/v de glucosa y azul de metileno (0,05 µg/mL) (CLSI, 2020). Posteriormente se añadió el inóculo preparado anteriormente de cada cepa fúngica de referencia, se mezcló de forma envolvente y se dejó solidificar durante 15 minutos a temperatura ambiente, se les colocaron los discos en la superficie del agar previamente impregnados con el extracto (20 µL) y los antifúngicos como controles positivos (Fluconazol® para *Candida albicans* y Voriconazol® para *Candida krusei*) y dimetilsulfóxido (DMSO) como control negativo (Martín y cols, 2001).

Determinación de la actividad antifúngica

El agar Müller-Hinton modificado previamente inoculado se incubó en una estufa por 24 a 48 horas a 37 °C en aerobiosis. Posteriormente, se llevó a cabo a la medición de los halos de inhibición alrededor de los discos, expresando los datos en mm. El ensayo se realizó por duplicado.

Diseño de Análisis

Los resultados de la investigación, fueron analizados mediante un enfoque cuali-cuantitativo (Palella y Martins, 2010). En la presente investigación fue requerida la aplicación de un enfoque cualitativo según las características observadas durante el desarrollo de las pruebas ejecutadas, al aplicar criterios

de comparación y discriminación estructurada de acuerdo a los fundamentos establecidos para cada uno de los ensayos realizados. Además, como en este enfoque se pretende medir, los fenómenos estudiados deben poder observarse. Es por ello que, el análisis de los resultados de esta investigación, se enfocó además en un modelo cuantitativo, al identificar metabolitos secundarios mediante la continuación de protocolos estandarizados y observación y medición de halos de inhibición por efecto de la actividad antifúngica de las hojas y tallos de *Thevetia peruviana*.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Tamizaje fitoquímico

Las hojas y los tallos de *Thevetia peruviana* fueron sometidos al proceso de maceración con dos solventes orgánicos, hexano y etanol, posteriormente concentrados en rotavapor, obteniendo los extractos de hexano y de etanol de las hojas y tallos, respectivamente. A partir de esta técnica se obtuvieron de las hojas: 4,5 g de extracto de hexano y 2,5 g de extracto de etanol; mientras que de los tallos se obtuvieron 1,47 g de extracto de hexano y 3,40 g de extracto de etanol (ver Tabla 9). Todos los extractos presentaron un color verde intenso, olor característico y aspecto condensado.

Tabla 9. Pesos de los extractos y sus rendimientos.

Parte de la planta	Peso	Peso del extracto	Rendimiento del extracto
Hojas molidas	100,07 g	Hexano: 1,23 g	1,23 %
		Etanol: 3,93 g	3,93 %
Tallos molidos	102,21 g	Hexano: 1,59 g	1,55 %
		Etanol: 3,22 g	3,15 %

Fuente: Mora, Errante y Cordero, 2024.

Los extractos fueron sometidos al análisis fitoquímico, con el fin de conocer el grupo de metabolitos secundarios contenidos en cada una de las muestras. Siendo de forma cualitativa la aparición de cada uno de los componentes por

fenómenos químicos de reacción como: viraje de color, aparición de precipitados, turbidez del medio, producción de espuma por agitación y fluorescencia por exposición a la luz ultravioleta. Estos fenómenos fueron indicativos primordiales para la caracterización fitoquímica de las estructuras vegetales, señalados en las tablas 10 y 11:

Tabla 10. Reporte de resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Thevetia peruviana*

Metabolito y prueba	EHH	EEH	EHT	EET
Alcaloides				
Reactivo de Draggendorff	ND	+	ND	-
Reactivo de Mayer	ND	+	ND	-
Reactivo de Wagner	ND	+	ND	+
Triterpenos y Esteroles				
Liebermann-Bourchard	+	+	+	+
Compuestos fenólicos				
Prueba de FeCl ₃	ND	+	ND	+
Saponinas				
Prueba de la Espuma	ND	-	ND	-
Taninos				
Prueba de la Gelatina	ND	-	ND	-
Flavonoides				
Ensayo de Shinoda	-	-	-	-
Prueba de NaOH	ND	ND	-	+
Cumarinas NH₄OH []				
Fluorescencia UV	-	-	-	-
Antraquinonas				
Prueba de NH ₄ OH []	-	-	-	-
Quinonas				
Prueba de H ₂ SO ₄ []	-	-	-	-
Lactonas sesquiterpenicas				
Ensayo de Baljet	ND	+	-	+
Glucósidos cardiotónicos				
Ensayo de Keller's	ND	+	ND	+

Fuente: Mora, Errante y Cordero, 2024.

Leyenda: ND: No determinado, (-): Ausente, (+): Presente, **EEH:** Extracto de etanol de hojas de *Thevetia peruviana*, **EHH:** Extracto de hexano de hojas de *Thevetia peruviana*, **EET:** Extracto de etanol de tallos de *Thevetia peruviana*, **EHT:** Extracto de hexano de tallos de *Thevetia peruviana*.

Tabla 11. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos de las hojas de *Thevetia peruviana*

	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Alcaloides</p> <p><u>Prueba:</u> Reactivo de Dragendorff, de Mayer y de Wagner.</p> <p><u>Tubos:</u> Extracto de etanol.</p> <p><u>Reporte:</u> Positivo</p> <p>Formación de precipitados color naranja.</p>
	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Esteroles y Triterpenos</p> <p><u>Prueba:</u> Liebermann-Burchard</p> <p><u>Tubos:</u> A: Extracto de hexano B: Extracto de etanol</p> <p><u>Reporte:</u> Positivo</p> <p>Formación de anillo verde y coloración roja en ambos tubos.</p>
	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Fenoles</p> <p><u>Prueba:</u> Compuestos fenólicos</p> <p><u>Tubos:</u> A: Control positivo B: Extracto de etanol.</p> <p><u>Reporte:</u> Positivo</p> <p>Formación de coloración verde oscura o negra.</p>
	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Saponinas</p> <p><u>Prueba:</u> Prueba de espuma</p> <p><u>Tubos:</u> Extracto de etanol</p> <p><u>Reporte:</u> Negativo</p> <p>No hay formación de espuma</p>

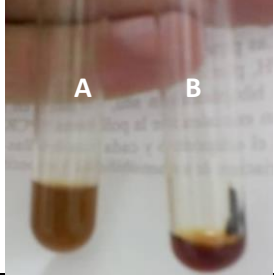
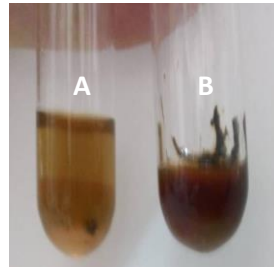
Fuente: Mora, Errante y Cordero, 2024.

Tabla 11. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos de las hojas de *Thevetia peruviana* (continuación).

	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Taninos</p> <p><u>Prueba:</u> Ensayo de la gelatina</p> <p><u>Tubos:</u> Extracto de etanol</p> <p><u>Reporte:</u> Negativo No hay formación de precipitado blanco</p>
	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Flavonoides</p> <p><u>Prueba:</u> Shinoda</p> <p><u>Tubos:</u> A: Extracto de hexano B: Extracto de etanol</p> <p><u>Reporte:</u> Negativo No hay presencia de color rojo intenso.</p>
	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Cumarinas</p> <p><u>Prueba:</u> Fluorescencia UV</p> <p><u>Tubos:</u> A: Control positivo B: Extracto de etanol</p> <p><u>Reporte:</u> Negativo No hay presencia de fluorescencia azul.</p>
	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Quinonas y antraquinonas</p> <p><u>Prueba:</u> NH₄OH []</p> <p><u>Tubos:</u> A: Extracto de hexano B: Extracto de etanol</p> <p><u>Reporte:</u> Negativo No hay presencia de color rojo.</p>


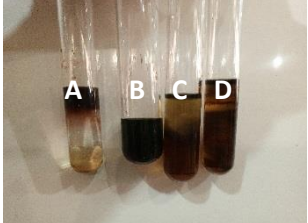
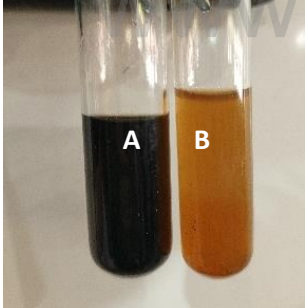
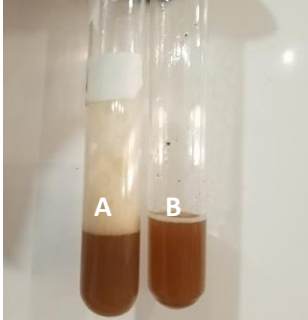
Fuente: Mora, Errante y Cordero, 2024.

Tabla 11. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos de las hojas de *Thevetia peruviana* (continuación).

	<p><u>Metabolito a determinar:</u> Lactonas sesquiterpénicas</p> <p><u>Prueba:</u> Reacción de Baljet</p> <p><u>Tubos:</u> A: Extracto diluido en etanol B: Extracto puro</p> <p><u>Reporte:</u> Positivo</p> <p>Presencia de color naranja-rojo.</p>
	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Glucósidos cardiotónicos</p> <p><u>Prueba:</u> Ensayo de Keller's</p> <p><u>Tubos:</u> A: Extracto diluido en etanol B: Extracto puro</p> <p><u>Reporte:</u> Positivo</p> <p>Presencia de color violáceo.</p>

Fuente: Mora, Errante y Cordero, 2024.

Tabla 12. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos de los tallos de *Thevetia peruviana*.

	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Alcaloides</p> <p><u>Prueba:</u> Reactivo de Dragendorff, Reactivo de Mayer y Reactivo de Wagner.</p> <p><u>Tubos:</u> Extracto de etanol.</p> <p><u>Reporte:</u> Negativo</p> <p>No hay formación de precipitados color naranja.</p>
	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Esteroles y Triterpenos</p> <p><u>Prueba:</u> Liebermann-Burchard</p> <p><u>Tubos:</u> A: Control positivo B: Control negativo C: Extracto de hexano D: Extracto de etanol</p> <p><u>Reporte:</u> Positivo</p> <p>Formación de anillo verde. Coloración roja.</p>
	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Fenoles</p> <p><u>Prueba:</u> Compuestos fenólicos</p> <p><u>Tubos:</u> A: Control positivo B: Extracto de etanol.</p> <p><u>Reporte:</u> Negativo</p> <p>No hay formación de coloración verde oscura o negra.</p>
	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Saponinas</p> <p><u>Prueba:</u> Prueba de espuma</p> <p><u>Tubos:</u> A: Control positivo B: Extracto de etanol.</p> <p><u>Reporte:</u> Negativo</p> <p>No hay formación de espuma</p>

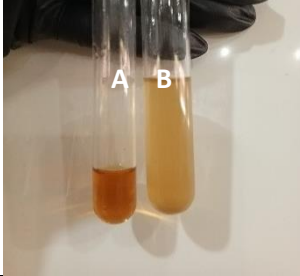
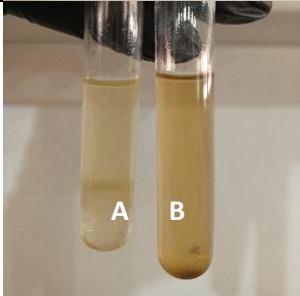
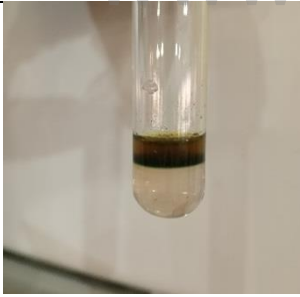
Fuente: Mora, Errante y Cordero, 2024.

Tabla 12. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos de los tallos de *Thevetia peruviana* (continuación).

	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Taninos</p> <p><u>Prueba:</u> Ensayo de la gelatina</p> <p><u>Tubos:</u> Extracto de etanol</p> <p><u>Reporte:</u> Negativo</p> <p>No hay formación de precipitado blanco</p>
	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Flavonoides</p> <p><u>Prueba:</u> Shinoda</p> <p><u>Tubos:</u> A: Control positivo B: Extracto de hexano C: Extracto de etanol</p> <p><u>Reporte:</u> Negativo</p> <p>No hay presencia de color rojo.</p>
	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Flavonoides</p> <p><u>Prueba:</u> NaOH al 10%</p> <p><u>Tubos:</u> A: Control positivo B: Extracto de hexano C: Extracto de etanol</p> <p><u>Reporte:</u> Negativo</p> <p>No hay presencia de color rojo intenso.</p>
	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Cumarinas</p> <p><u>Prueba:</u> Fluorescencia UV</p> <p><u>Tubos:</u> A: Control positivo B: Extracto de etanol</p> <p><u>Reporte:</u> Negativo</p> <p>No hay presencia de fluorescencia azul.</p>
	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Quinonas</p> <p><u>Prueba:</u> NH₄OH []</p> <p><u>Tubos:</u> A: Extracto de hexano B: Extracto de etanol</p> <p><u>Reporte:</u> Negativo</p> <p>No hay presencia de color rojo.</p>

Fuente: Mora, Errante y Cordero, 2024.

Tabla 12. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos de los tallos de *Thevetia peruviana* (continuación).

	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Antraquinonas</p> <p><u>Prueba:</u> NH₄OH []</p> <p><u>Tubos:</u> A: Control positivo B: Extracto de etanol</p> <p><u>Reporte:</u> Negativo</p> <p>No hay presencia de color rojo</p>
	<p><u>Metabolito a determinar:</u> Lactonas sesquiterpénicas</p> <p><u>Prueba:</u> Reacción de Baljet</p> <p><u>Tubos:</u> A: Extracto diluido en etanol B: Extracto puro</p> <p><u>Reporte:</u> Negativo</p> <p>No hay presencia de color naranja-rojo.</p>
	<p><u>Metabolitos a determinar:</u> Glucósidos cardiotónicos</p> <p><u>Prueba:</u> Ensayo de Keller's</p> <p><u>Tubos:</u> Extracto de etanol</p> <p><u>Reporte:</u> Positivo</p> <p>Presencia de color violáceo.</p>

Evaluación de la Actividad Antifúngica

Se determinó a través del método de difusión en disco, en el extracto de etanol, tanto de las hojas como de los tallos de *Thevetia peruviana*, con concentraciones madres de 10.000 ppm de solución, las cuales no presentaron actividad antibacteriana sobre las cepas CDC de *Candida albicans* y ATCC de *Candida krusei* (ver Tablas 13 y 14).

Tabla 13. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de etanol de las hojas y los tallos de *Thevetia peruviana*.

Microorganismos de ensayo	Halos de Inhibición en mm			
	Control positivo	Control negativo	Extracto de etanol de las hojas	Extracto de etanol de los tallos
		DMSO	10.000 ppm	10.000 ppm
<i>Candida albicans</i> CDC-B385	Fluconazol 25 µg 50	0	0	0
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	Voriconazol 25 µg 20	0	0	0

Fuente: Mora, Errante y Cordero, 2024.

Debido a la polaridad del extracto de hexano no compatible con soluciones acuosas, no fue posible realizar la evaluación antifúngica de los extractos de las hojas y los tallos de *Thevetia peruviana*.

Tabla 14. Reporte de resultados ilustrado de la actividad antifúngica de los extractos de etanol de las hojas y los tallos de *Thevetia peruviana*.

Prueba: Difusión en agar con disco (Kirby-Bauer)	
<i>Candida albicans</i> CDC-B385	<i>Candida krusei</i> ATCC 6258

Fuente: Mora, Errante y Cordero, 2024.

Leyenda: Disco #4: Extracto de etanol de tallos de *Thevetia peruviana* (EET), Disco #40: Extracto de etanol de hojas de *Thevetia peruviana* (EEH), FL: Fluconazol®, DMSO: Dimetilsulfóxido, V: Voroconazol®.

Discusiones

En la presente investigación se obtuvieron por maceración los extractos de hexano y etanol de las hojas y los tallos de *Thevetia peruviana*, los cuales por caracterización o tamizaje fitoquímico se evidenciaron componentes como alcaloides, triterpenos, esteroides, fenoles, glucósidos cardiotónicos y sesquiterpenlactonas. Al comparar el reporte de resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Thevetia peruviana* (Tabla 10) con los estudios anteriores, reflejó ser similar con respecto a los glucósidos cardiotónicos y otros compuestos de especies recolectadas en diferentes países.

Tal es el caso del estudio realizado por Dash y cols (2022), en el cual se reportan a partir de extractos de metanol de las hojas, obtenidos bajo el método de soxhlet, la presencia de flavonoides, fenoles, esteroides y glucósidos, así como alcaloides, saponinas, antraquinonas, cumarinas y antrocianinas, siendo esos últimos un diferimiento considerable con respecto al tamizaje realizado en esta investigación, los cuales arrojaron resultados negativos a los extractos de las hojas de *Thevetia peruviana*, los cuales se pueden atribuir a la polaridad de los solventes utilizados en ambos estudios.

Con respecto a la investigación realizada por Ndung'u y cols (2024), han de reportar la presencia de metabolitos importantes como fenoles, flavonoides, alcaloides, saponinas y taninos, en extractos de metanol de los frutos de *Thevetia peruviana*, a partir de la maceración en metanol-agua. En donde a través de Espectrofotometría y Gravimetría, se confirman gran cantidad de ácido gálico, ácido tánico y rutina, considerados fuentes naturales con actividad biológica. Considerando la polaridad del solvente utilizado, el cual posee la capacidad de arrastre de los metabolitos, al utilizar los extractos de etanol y hexano de *Thevetia peruviana* no se presentaron los resultados esperados de acuerdo a su actividad biológica.

En otro sentido, Al-Rajhi y cols. (2022), coinciden en la presencia de gran contenido de flavonoides y compuestos fenólicos en extractos obtenidos del látex de los tallos de los frutos de *Thevetia peruviana*; los cuales al evaluarlos mediante el método de difusión en pozo utilizando 100 μ L de dicho extracto, presentaron actividad antifúngica frente a *Candida albicans* (28 mm), en donde se tomó como control positivo ketoconazol (23 mm) y DMSO como control negativo; en comparación a nuestra investigación que arroja un resultado negativo ante la actividad antifúngica frente a *Candida albicans* y *Candida krusei*.

Por otro lado, Abdelghany y cols. (2021), realizaron el estudio de las semillas de *Thevetia peruviana*, utilizando el método de maceración y como solvente metanol, obteniendo gran contenido de fenoles y flavonoides, seguido de sesquiterpenos, esteroides, ácidos, alcaloides y nitrocianinas, lo cual los lleva a realizar la evaluación antimicrobiana con el método de difusión en disco a partir de 20 μ g de extracto, en donde *Candida albicans* presentó 30,4 mm de diámetro de sensibilidad; en comparación a nuestra evaluación de extractos etanólicos de hojas y tallos en la cual arrojé resultados resistentes a dicho microorganismo.

En consecuencia, comparando los estudios anteriores con esta investigación, por lo menos los extractos de las hojas de *Thevetia peruviana*, debieron haber tenido actividad frente a las cepas de *Candida albicans* y *Candida krusei*. Por ello es necesario resaltar que debido a las condiciones climáticas y geográficas donde fue recolectada la planta, esta influye químicamente en su composición botánica y por ende los resultados obtenidos al momento de realizar la actividad antifúngica (Bruneton, 2001).

Debe señalarse que, la planta recolectada en el jardín botánico Ing. Carlos Lizcano ubicada en Lagunillas, Estado Mérida se encuentra a una altitud de 800 m.s.n.m. a una temperatura que oscila entre los 18 a 24°C aproximadamente. Mientras que la especie de planta recolectada por Neira,

(2018), en Cajamarca, Perú se encuentra ubicada a una altitud de 2.654 m.s.n.m. con una temperatura promedio anual de 19°C, y la especie vegetal recolectada por Pacheco y cols. (2006) en Barranquilla, Colombia a una altitud de 18 m.s.n.m. con una temperatura promedio anual de 27°C.

Es de considerar la técnica utilizada para la determinación de la actividad antibacteriana, ya que se apreció poca difusión en el agar en todos los ensayos realizados, posiblemente debido a la retención de los metabolitos en el disco de filtro, que no permiten difundir debido a la polaridad de dichos metabolitos, al aplicar la técnica. Así mismo se deben considerar los solventes utilizados en el proceso de extracción de los metabolitos y la concentración de la solución madre empleada, lo que permitió una mayor superficie de contacto con el medio agarizado, hecho que garantizó un buen desarrollo del estudio realizado y así constatar resultados verdaderos (Apontes y cols, 2008, Ramírez y cols, 2010).

Sin embargo, se puede afirmar que, por las condiciones geográficas anteriormente descritas, los extractos obtenidos no tuvieron actividad alguna. También los componentes que cualitativamente fueron identificados pueden estar presentes en mínimas concentraciones y no fueron eficaces en el ensayo (Ávalos y Pérez, 2009).

Cabe considerar por otra parte que, las investigaciones realizadas a la especie en la actualidad representan una contribución mayor con respecto a las propiedades tóxicas de la misma, así como de sus beneficios antioxidantes. Sin embargo, esta investigación profundizó el estudio en relación a la actividad antifúngica; ya que, al poseer metabolitos como alcaloides, flavonoides, sesquiterpenos y fenoles; estos son potentes antimicrobianos y representan un punto de vital importancia para generar así aportes científicos novedosos para la sociedad.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

En los extractos de hexano y etanol obtenido de las hojas y los tallos de *Thevetia peruviana* se determinó de forma cualitativa la presencia de alcaloides, triterpenos, esteroides, compuestos fenólicos, quinonas, glucósidos cardiotónicos y lactonas sesquiterpénicas.

Los extractos de hexano y etanol de las hojas y tallos de *T. peruviana* no presentaron actividad antifúngica frente a la cepa CDC de *Candida albicans*, ni frente a la cepa ATCC de *Candida krusei*, reportando que dichas cepas son resistentes a los extractos estudiados.

Los resultados alcanzados en este trabajo de investigación representan un aporte científico en cuanto al tamizaje fitoquímico y la actividad antifúngica de los extractos de las hojas y los tallos de *T. peruviana*.

Este trabajo de investigación es el primer reporte de la actividad antifúngica en los extractos de las hojas y tallos de la especie en Venezuela

Se presume que la ubicación geográfica y las condiciones climáticas donde fue recolectada la planta, influyeron en la concentración en la que se encuentran los metabolitos secundarios y por ende intervino de forma negativa en la actividad antifúngica de los extractos.

Recomendaciones

Realizar investigaciones sobre los metabolitos involucrados en la actividad antifúngica, utilizando diferentes solventes polares como metanol y metanol-agua, entre otros.

Cuantificar e identificar los metabolitos secundarios de los extractos de las hojas y los tallos de *Thevetia peruviana*, empleando técnicas como cromatografía, cromatografía de gases / espectrofotometría de masas (CG/EM), entre otras.

Realizar la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos utilizando difusión en agar con pozo y concentración inhibitoria mínima.

Continuar con los estudios acerca de los metabolitos secundarios presentes en otras partes de la planta como raíces, frutos, semillas y flores.

Evaluar si los metabolitos secundarios de los extractos de las hojas y tallos de *T. peruviana* presentan actividad antioxidante, antiinflamatoria, antifúngica y citotóxica.

Incentivar el uso de las plantas medicinales como *T. peruviana*, por sus propiedades terapéuticas bajo estándares establecidos de seguridad y calidad de las plantas.

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRAFICAS

- Abdelghany, T., Yahya, R., Bakri, M., Ganash, M., Amin, B., y Qanash, H. (2021). Effect of *Thevetia peruviana* Seeds Extract for Microbial Pathogens and Cancer Control. *International Journal of Pharmacology.*, 17(8): 643-655.
- Aberg, J., Goldman, M., Morton, Gray, L., y Long, J. (2001). "Infectious Diseases Handbook including Antimicrobial Therapy & Diagnostic Test/Procedures. (6ª Ed.). Lexi-Comp Inc. Ohio, Estados Unidos.
- Abrego, C. y Honles, J. (2012). Identificación, cuantificación y determinación de la actividad citotóxica de los glicósidos cardiotónicos procedentes de las raíces y flores de *Plumeria rubra* (Flor de mayo), *Stemmadenia donnell-smithii* (Cojon de puerco) y *Thevetia ahouia* (Cojon de costa de hojas largas) de la familia Apocynaceae (Trabajo de grado para optar al grado de Licenciatura en Química y Farmacia). Universidad de El Salvador, San Salvador-El Salvador.
- Al-Rajhi, A., Yahya, R., Abdelghany, T., Fareid, M., Mohamed, A., Amin, B., y Masrahi, A. (2022). Anticancer, Anticoagulant, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Thevetia peruviana* Latex with Molecular Docking of Antimicrobial and Anticancer Activities. *Revista Molecules.*, 27(10): 3165.
- Alvarado, L., y Ochoterena, H. (2007). A phylogenetic analysis of the *Cascabela-Thevetia* species complex (Plumeriaceae, Apocynaceae) based on morphology. *Annals of the Missouri Botanical Garden.*, 94: 298-323.
- Alvarado, L., Lozada, L., Islas, C., Cortez, E., Maya, K., & Chávez, M (2020). Apocynaceae de ayer y de hoy. Conocimiento histórico y reevaluación

- de la diversidad y distribución de Apocynaceae en México. *Ciencias Botánicas*, 98 (2), 393-416.
- Andrews, J. (2001). "Determination of Minimum Inhibitory Concentration" of antibacterial agents by broth dilution". *Clinical Microbiology and Infection. Revista Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 (31): 5-16.
- Aponte, M., Calderón, M., Delgado, A., Herrera, I., Jiménez, Y., Ramírez, Z., Rojas, J., y Toro, Y. (2008). *Fitoquímicos. División de Nutrición en Salud Pública. Caracas, Venezuela.*
- Arenas, R (2003). *Micología médica ilustrada (6ª Ed.) McGraw-Hill Interamericana S.A.*
- Arias, F. (2006). *El Proyecto de Investigación: Introducción a la Metodología Científica. (5ª Ed.). Caracas-Venezuela, Editorial Episteme.*
- Ávalos, A y Pérez, E. (2009). *Metabolismo secundario de las plantas. Reduca: Serie Fisiología Vegetal*, 2 (3): 119-145.
- Basille, A., Giordano, S., y Castaldo, R. (1993). Antibiotic activity in *Thevetia neriifolia* and *Thevetia peruviana* (Apocynaceae). *Revista Pharmaceutical Research.*, (27): 99-100.
- Begum, S., Abil, O., Siddiqui, B., y Siddiqui, S. (1993). Constituents of the leaves of *Thevetia neriifolia*. *Journal of Natural Products*, 56(4): 613-617.
- Bhadane, B., Patil, M., Maheshwari, V., y Patil, R. (2018). Ethnopharmacology, phytochemistry, and biotechnological advances of family Apocynaceae: A review. *Phytotherapy Research.*, 32(7): 1181-1210.
- Bonifaz, A (2012). *Micología Médica Básica (4ª Ed.). México: Editorial Interamericana McGraw Hill.*
- Brenner y Stevens (2023). *Farmacología básica (6ª Ed.). España: Elsevier España.*

- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. (2ª Ed.). Zaragoza: Acribia S. A.
- Clavell, L. (1992). Pedrique de Aulacio, M. Microbiología. Manual de Métodos Generales. (2ª Ed.). Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2020). Performance Standards of Antimicrobial Susceptibility Testing; 30 th ed.
- Dash, P., Kumar, S., Mishra, A., y Srivastava, S. (2022). Phytochemical evaluation and physiochemical analysis of methanolic extract of *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum. for future application in drug therapy Annals of Phytomedicine 11(2): 643-653, Annals of Phytomedicine: An International Journal.
- Domingo, D., y López, M. (2003). Plantas con actividad antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia., 16(4): 385-393.
- Domínguez, X. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. México: Editorial Limusa.
- García, H. (1975). Flora medicinal de Colombia. Botánica médica. Tomo II. Instituto de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá: Imprenta Nacional.
- Goodman y Gilman (2006). Las bases farmacológicas de la terapéutica. (11ª Ed.). México: Editorial Mc Graw Hill. Interamericana.
- Gregorí, B. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. Instituto Cubano de Investigaciones de Derivados de la Caña de Azúcar. Revista Cubana Farmacéutica., 39(2).
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2010). Metodología de la Investigación. (2ª Ed.). México: Editorial Mc Graw Hill. Interamericana,
- Herrera, P., y Rivera, L. (2013). Caracterización de *Thevetia* spp., especies forestales con potencial económico en Yucatán. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias., (Vol 12): 7-16.

- Hurtado J. (2010). Guía para la comprensión holística de la ciencia. Caracas: Ediciones Quirón
- Hurtado, J. (2012). Metodología de La Investigación. (4ª Edición). Caracas: Quirón.
- Jiménez, S., Ríos, R., Mendoza, D., Arias, J., y Arias, M. (2022). POP-20 Actividad citotóxica in vitro de extractos etanólicos de células de *Thevetia peruviana* cultivadas en biorreactor. Revista Productos Naturales, 5(2), 67–69.
- Kennedy, D. (2019). Fitoquímicos derivados de plantas para mejorar la función cognitiva y la atención. Revista Sports Science Exchange., 29(193): 1-5.
- Langfield, R., Scarano, F., Heitzman, M., Kondo, M., Hammond, G., y Neto, C. (2004). "Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galiodes*". Revista Journal of Ethnopharmacology., 94(3): 279-281.
- Lizcano, A., y Vergara, J. (2008). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Esperomeles ferrugineas*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Lock, D. (1988). "Investigación Fitoquímica" Métodos En El Estudio De Productos Naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú, Perú.
- Manrique, E., y Mosquera, O. (1997). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones obtenidas a partir de *Espeletia murilloii* *cuatr* y *Espeletopsis guacharaca* (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). Productos naturales. En D. Marcano y Hasegawa. M (Eds.), Fitoquímica orgánica. Venezuela: Torino.

- Marinoff, M. (2006). Las Plantas Medicinales desde la Biblia a la actualidad. Universidad Nacional del Noreste, Argentina.
- Martín E., Péman F. y Rubio M. (2001). Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica (1a edición). Editorial: Revista Iberoamericana de Micología – Asociación Española de Micología. Bilbao – España.
- Martínez, A., Valencia, G., y Jiménez, U. (2008). Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica. Universidad de Antioquia, Medellín.
- McDermott, P., Bodeis, S., Fritsche, T., Jones, R., y Walker, R. (2005). “Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents. *Clinical Microbiology and Infection.*, 43: 6136.
- Meena, B., Meena, S., Chittora, D., y Sharma, K. (2021), Antifungal efficacy of *Thevetia peruviana* leaf extract against *Alternaria solani* and characterization of novel inhibitory compounds by Gas Chromatography-Mass Spectrometry analysis. *Revista Biochemistry and Biophysics Reports.*, 25(10): 1-9.
- Mendieta, R., y Del Amo, S. (1981). Plantas medicinales del estado de Yucatán. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. México: Editorial Continental.
- Nadinic, J., Bandoni, A., Martino, V., y Ferraro, G. (2016). Fitocosmética: Fitoingredientes y otros productos naturales. Buenos Aires: Argentina.
- Ndung'u, A. I., Keriko, J. M., Kareru, P. G., Wanakai, S. I., Kiso, G. K., & Keddy, G. G. (2024). Phytochemical and GC-MS analysis of *Thevetia peruviana* fruit methanol extract as an anti-rodenticide potential against balb C rats. *Heliyon*, 10(7), e29012.
- Neira, J. (2018). Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* (Pers) Schum (Maichil) frente a cepas de

- Enterococcus faecalis* (Tesis de pregrado). Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, Perú.
- Pacheco, D., Taborda, M., y De La Rosa, C. (2006). Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de hojas, cortezas y semillas de *Thevetia peruviana* (Persoon) Schum. *Revista Intrópica.*, 3(17): 5-12.
- Parella, S., y Martins, F. (2010). Metodología de la investigación cuantitativa. (3ª Ed.). Caracas: Fondo Editorial de la Universidad Pedagógica Experimental Libertador.
- Pelczar. J., y Reid, R. (1992). Microbiología. Habana, Cuba: Editorial Pueblo y Educación.
- Prashant, T., Bimlesh, K., Mandeep, K., Gurpreet, K. y Harleen, K. (2011). Phytochemical Screening and Extraction: a Review. *Revista Pharmaceutica Scientia.*, 1(1): 98-106.
- Prieto, J. (2021). El largo recorrido de los Antifúngicos. *Revista Española de Quimioterapia.*, 2: 515.
- Pontón, J., Moragues, M., Gené, J., Guarro, J., y Quindós, G. (2002). Hongos y actinomicetos alergénicos. *Revista Iberoamericana de Micología.*, 2(699): 1-4.
- Ramírez, A., García, E., Longa, A., Sánchez, K., Nieves, M., Velasco, J., Araque, M., y Mosqueda, N. (2010). Manual práctico de bacteriología general. Mérida-Venezuela: Colección Textos Universitarios de la Universidad de Los Andes.
- Revankar, S., y Sobel, J. (2011). Mucosal candidiasis. *Candida and candidiasis*, 417-427.
- Rivas, M., Oranday, C., y Verde, S. (2016). Investigación en Plantas de Importancia Clínica. Omnia Science: Nuevo León, México.

- Salinas, P. (2010). Plantas Tóxicas en el Estado Mérida, Venezuela. Primera parte: *Anacardiaceae*, *Apocynaceae* y *Asclepiadaceae*. Revista de la Facultad de Medicina., (1): 10-12.
- Sánchez, E., Castillo, S., y García, P. (2016). Actividad antimicrobiana. En C.Rivas. M, Oranda, y M, Verde (Eds.), Investigación en plantas de importancia clínica médica (pp. 77-100). España: Editorial OmniaScience.
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Colombia: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.
- Tamayo, R., Verdecia, A., y Mojera, I. (2011). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólicos, etéreo y acuosos de las hojas y tallo de la *Isocarpha cubana* B. Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal., 15(3): 322-347.
- Tapia, C. (2004). Resistencia a antifúngicos. Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Universidad de Chile.
- Tello, J. (2011). Acción antimicrobiana del *Anacardium occidentale* sobre *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*. Estudio in vitro Lima-Perú.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2006). Plant physiology Sinauer. USA: Associates inc Sunderland.
- Vazquez, J.A., Sobel, J.D. (2011). Candidiasis. In: Kauffman, C., Pappas, P., Sobel, J., Dismukes, W. (eds) Essentials of Clinical Mycology. Springer, New York, NY.
- Wen, S., Chen, Y., Lu, Y., Wang, Y., y Jiang, M. (2016). Cardenolides from the Apocynaceae family and their anticancer activity. Fitoterapia., 112 (2): 74-84.
- Wilkinson, M. (2007). "Methods for Testing the Antimicrobial Activity of Extracts". Modern Phytomedicine., 1(2):157-171.