



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



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS
EXTRACTOS DE *Eucalyptus pulverulenta* EN CEPAS DE REFERENCIA
INTERNACIONAL**

Tesista:

Br. Ronald A. Figueira D.

CI: 19.583.901

Tutora: Dra. Rosa L. Aparicio Z.

Mérida, Julio de 2024

DEDICATORIA

Esto es para todas las personas que me han ayudado a estar donde estoy hoy, cada palabra, cada consejo y cada animo que me han dado, a mi familia que ha creído y ha puesto su fe en mí, a mis maestros por todas sus enseñanzas y a mis amigos que sus sonrisas y buenos deseos siempre me han acompañado.

www.bdigital.ula.ve

Ronald Figueira

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, a Dios padre todo poderoso que me ha acompañado en cada paso y en cada tropiezo.

A la Universidad de Los Andes por darme las herramientas para convertirme en el profesional que un día soñé ser.

Al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”, a los Laboratorios de Micología y Actinomicetos por permitirme realizar la parte experimental de esta investigación.

A mi tutora Dra. Rosa Aparicio por su infinita paciencia y por su enorme ayuda, por todo su cariño y dedicación.

A mi mamá y a mi hermano que me han demostrado a no rendirme y ser perseverante frente a todas las adversidades que me presenta la vida.

Al Kenpo, que me ha demostrado que con constancia se logra los mas grandes sueños y Anny Campos que me ha acompañado en tantas ocasiones y demostrado que aun con el mundo encima se puede lograr lo que tanto se desea y anhela.

Al Wushu, arte que me ha enseñado que con disciplina siempre se obtendrá grandes resultados y al profesor Delfín Morantes, a la Lic. María Contreras y a Ender Guillen, con sus palabras me han dado aliento y enseñado tanto.

A mis amigos y muchos maestros que he tenido el gusto de conocer durante mi formación profesional, que me han ayudado y acompañado en momentos difíciles, sus palabras aún resuenan en mi memoria.

ÍNDICE GENERAL

	Pag
VEREDICTO.....	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I EL PROBLEMA.....	3
Planteamiento del problema	3
Justificación e importancia de la investigación	5
Objetivos de la investigación	6
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos	6
Alcances y limitaciones de la investigación	7
Alcances de la investigación	7
Limitaciones de la investigación	7
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	8

ÍNDICE GENERAL (CONTINUACIÓN)

	Pag
Trabajos previos	8
Antecedentes históricos	11
Productos naturales	12
Bases teóricas	19
Aspectos botánicos de la familia Myrtaceae	19
Distribución geográfica de la familia Myrtaceae	20
Compuestos químicos aislados en la familia Myrtaceae	21
Usos de la familia Myrtaceae	21
Aspectos botánicos del género <i>Eucalyptus</i>	22
Distribución geográfica del género <i>Eucalyptus</i>	22
Compuestos químicos aislados del género <i>Eucalyptus</i>	23
Usos del género <i>Eucalyptus</i>	24
Aspectos botánicos de la especie <i>Eucalyptus pulverulenta</i>	24
Distribución geográfica de la especie <i>Eucalyptus pulverulenta</i>	25
Taxonomía de la especie <i>Eucalyptus pulverulenta</i>	26
Usos de <i>Eucalyptus pulverulenta</i>	26
Extractos de plantas	27
Tamizaje fitoquímico	28

ÍNDICE GENERAL (CONTINUACIÓN)

	Pag
Microorganismos.....	30
Bacterias.....	31
Clasificación bacteriana	32
Clasificación de las bacterias usadas en el estudio.....	33
Mecanismos de resistencia bacteriana	35
Antibióticos	37
Cepas de referencia.....	41
Actividad antibacteriana.....	42
Métodos para evaluar la actividad antibacteriana	43
Definición de operacional de términos.....	45
Operacionalización de las variables.....	46
Hipótesis	48
CAPÍTULO III MARCO METODOLÓGICO	49
Diseño de investigación	49
Población y muestra	50
Sistema de variables.....	50
Procedimientos de la investigación.....	51
Preparación de los discos.....	54

ÍNDICE GENERAL (CONTINUACIÓN)

	Pag
Preparación de los extractos	55
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIONES	57
Resultados.....	57
Análisis fitoquímico del <i>Eucalyptus pulverulenta</i>	57
Actividad antibacteriana de <i>Eucalyptus pulverulenta</i>	61
Discusión	64
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	67
Conclusiones	67
Recomendaciones	69
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS	70

ÍNDICE DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Mecanismos de resistencia desarrollados por bacteria.....	36
Tabla 2. Clasificación de acuerdo a la interacción de los fármacos.....	37
Tabla 3. Clasificación según el espectro de acción.....	38
Tabla 4. Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción sobre la estructura bacteriana.....	38
Tabla 5. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular.....	39
Tabla 6. Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas.....	40
Tabla 7. Antibióticos con función dependiente del sitio de acción.....	41
Tabla 8. Cepas de referencia.....	42
Tabla 9. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de <i>Eucalyptus pulverulenta</i> ...	46
Tabla 10. Operacionalización de la variable independiente: Composición química de los extractos de las hojas de <i>Eucalyptus pulverulenta</i>	47
Tabla 11. Características físicas de los extractos de las hojas de <i>Eucalyptus pulverulenta</i>	57
Tabla 12. Resultados del análisis fitoquímico de los extractos de las hojas de <i>Eucalyptus pulverulenta</i>	58
Tabla 13. Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de <i>Eucalyptus pulverulenta</i> frente cepas de referencia internacional.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag
Figura 1. Metabolitos secundarios obtenidos de las plantas.....	18
Figura 2. Distribución geográfica de la familia Myrtaceae.....	20
Figura 3. Algunos compuestos aislados de la familia Myrtaceae.....	21
Figura 4. Estructuras químicas obtenidas del género <i>Eucalyptus</i>	23
Figura 5. Especie <i>Eucalyptus pulverulenta</i>	26
Figura 6. Diferencias entre bacterias grampositivas y gramnegativas.....	31
Figura 7. Análisis fitoquímico de los extractos de las hojas de <i>Eucalyptus pulverulenta</i>	59
Figura 8. Actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de <i>Eucalyptus pulverulenta</i> frente a cepas de referencia internacional.....	62



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



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS EXTRACTOS DE *Eucalyptus pulverulenta* EN CEPAS DE REFERENCIA INTERNACIONAL

Tesista:

Br. Ronald A. Figueira D.

CI: 19.583.901

Tutora: Dra. Rosa L. Aparicio Z

RESUMEN

En la presente investigación se determinó la actividad antibacteriana y la composición química de la especie *Eucalyptus pulverulenta*. Las hojas fueron recolectadas en la ciudad de Mérida, estado Mérida. El objetivo de esta investigación fue confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* en cepas de referencia internacional. Los extractos de las hojas de hexano y etanol se prepararon mediante la técnica de extracción a reflujo. La composición química se determinó mediante el análisis fitoquímico. La actividad antibacteriana se realizó mediante el método de difusión en agar con disco. El resultado del análisis fitoquímico reveló la presencia de terpenos, esteroides, saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas y lactonas sesquiterpénicas; la actividad antibacteriana se evidenció frente a *Staphylococcus aureus* (Hex: 7 mm y EtOH: 8 mm), *Enterococcus faecalis* (EtOH: 7 mm), *Escherichia coli* (Hex: 7 mm y EtOH: 8 mm), *Klebsiella pneumoniae* (Hex: 7 mm y EtOH: 8 mm), y *Pseudomonas aeruginosa* (EtOH: 7 mm), a una concentración de 10 mg/mL. Este es el primer reporte de la actividad antibacteriana y composición química de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* del estado Mérida-Venezuela.

Palabras clave: Myrtaceae, *Eucalyptus pulverulenta*, actividad antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, con la creciente incidencia de resistencia a los antimicrobianos, se han llevado a cabo muchos estudios sobre la actividad de estos compuestos, ya que presentan una bioactividad frente a microorganismos. Los compuestos naturales extraídos de diversas plantas, alimentos y bebidas, podrían proporcionar posibles alternativas a los ya conocidos antimicrobianos (Marchese y cols., 2017).

El término antibacteriano o antibiótico se refiere a cualquier sustancia química natural o semisintética que sea capaz de producir la muerte de las bacterias, o inhibir su multiplicación a pesar de que la bacteria permanezca con vida (Paredes y Roca, 2004).

Entre la familia de plantas Myrtaceae, existen las especies del género *Eucalyptus*, entre este gran número se encuentra el *Eucalyptus pulverulenta*, también conocido como gum de montaña de hojas plateadas, es una especie de árbol o mallee endémico del sur de Nueva Gales del Sur, Australia. El árbol tiene una corteza lisa, posee hojas en forma de huevo, forma de corazón o redondas, dispuestas en pares opuestos, y flores blancas. La altura del árbol varía entre 5 y 9 metros y forma un lignotúber, este clasificado como "vulnerable" bajo la Ley Australiana de Protección del Medio Ambiente y la Conservación de la Biodiversidad 1999. En horticultura, se cultiva una variedad conocida como 'Baby Blue', que es una forma enana del *Eucalyptus pulverulenta* (Sims, 1819). Es de hacer notar que no se han realizados investigaciones o experimentos con extractos de ningún tipo de esta especie.

Las razones que dieron origen a esta investigación están relacionadas a que históricamente el hombre siempre ha optado por el uso de plantas, es especial sus extractos. Además, actualmente muchos de los fármacos contienen principios activos de origen vegetal que son de carácter

irremplazable. Por otro lado, la mayor parte de la población no tiene acceso a medicamentos industrializados, optando por el uso de extractos de plantas (Fonnegra y Jiménez, 2007). Así mismo, los métodos de extracción y tamizaje fitoquímico siempre han sido los más sencillos, económicos y confiables para realizar un análisis cualitativo de los extractos (Prashant, Bimlesh, Mandeep, Gurpreet y Harleen, 2011). Finalmente, el interés por la actividad antibacteriana deriva de la posibilidad de ofrecer un tratamiento alternativo que permita ofrecer soluciones para la creciente incidencia de infecciones causadas por bacterias.

El presente trabajo esta sistematizado por las normas de la Asociación Americana de Psicología (APA), organizada en 3 capítulos, capítulo I: El problema, desarrollándose en Planteamiento del problema, Justificación de la investigación, Objetivos de la investigación y Alcances y Limitaciones de la investigación, capítulo II: Marco teórico incluyendo: Trabajos previos, Antecedentes históricos, Bases teóricas, Operacionalización de las variables, Hipótesis y Definición de términos, el capítulo III: Marco metodológico que incluye: Tipo de investigación, Diseño de investigación, Población y Muestra, sistema de variables, procedimiento de investigación y diseño de análisis, capítulo IV: Resultados y Discusiones y así mismo el capítulo V: Conformado por las Conclusiones, Recomendaciones y las Referencias Bibliohemerográficas.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del problema

La mayor parte de las enfermedades causadas en el humano se deben a la infección por microorganismos presentes en la flora habitual, cuando diseminan a zonas del organismo donde pueden causar un daño, generalmente en condición de inmunosupresión, aunque existen otros microorganismos de origen exógeno que al estar expuesto a ellos causaran una enfermedad (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2017).

Para estas infecciones causadas por bacterias se han utilizado antibióticos como tratamiento, estos han logrado reducir de forma significativa las muertes por contagios bacterianos (Maguiña, 2016), a pesar de esto, la población general ha hecho uso de estos antibióticos de forma desmedida causando el desarrollo de mecanismos de resistencia (Pachay, 2018).

La resistencia bacteriana constituye una amenaza grave y cada vez mayor para la salud pública e involucra cada día nuevas especies bacterianas produciendo diferentes situaciones clínicas debido a la modificación de la ecología bacteriana y el surgimiento de nuevos microorganismos con resistencia natural a estos compuestos (Romeu, Salazar, Lugo, Rojas y Eslava, 2012).

El aumento de dicha resistencia frente a determinados antibióticos ha sido motivo de preocupación y análisis de muchos investigadores, casi desde el momento del descubrimiento de estos productos, ya sean de origen natural, semi-sintéticos o sintéticos (Rodríguez, Delgado, Mora, González y Guardia, 2006).

Lo anteriormente planteado expresa la necesidad del desarrollo de nuevos antibacterianos, tomando en cuenta la revisión bibliográfica realizada en especies del *Eucalyptus* que demuestran una actividad antibacteriana, además el aporte farmacéutico que brinda el investigar, analizar y experimentar con especies nuevas. En consecuencia, de esta investigación deriva el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* en cepas de referencia internacional?

www.bdigital.ula.ve

Justificación e importancia de la investigación

La familia Myrtaceae es la novena familia de plantas con flores más grande; incluye árboles y arbustos en los trópicos húmedos, distribuida en 130 géneros y unas 5900 especies. Económicamente, es una familia de plantas muy importante; algunas especies se cultivan, como el *Eucalyptus* spp., cuya madera se usa para producir papel, lámparas y carbón vegetal; otras especies son ornamentales y algunas se utilizan como especias, como *Syzygium aromaticum*, conocido como clavo. Varias especies producen frutos comestibles para hacer jugo, gelatinas y dulces, como *Psidium guajava* L. (guayaba), pero no todos son cultivados. Las especies de esta familia también se emplea en la medicina popular para tratar varias enfermedades, especialmente trastornos gastrointestinales, enfermedades hemorrágicas e infecciosas (Cascaes, Guilhaon, Andrade, Zoghbi y Santos, 2015).

También, existen actualmente técnicas avanzadas para determinar la naturaleza química de los metabolitos de las plantas, sin embargo, se usa mucho los ensayos fitoquímicos tradicionales. Debido a que es una forma confiable, económica y más sencilla de realizar un análisis cualitativo de los extractos. Además, se puede utilizar una amplia variedad de solventes que poseen baja toxicidad, acción conservante y no disocian las moléculas (Prashant y cols., 2011).

La intención de la actual investigación fue la de evaluar la actividad antibacteriana de esta especie poco estudiada como es el *Eucalyptus pulverulenta*, ya que otras variedades de su mismo género han sido ensayadas preliminarmente por tener principios de importancia biológica, esto con la finalidad de conseguir una opción terapéutica ante alguna afección por causa bacteriana.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Determinar la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos de las hojas del *Eucalyptus pulverulenta*.

Objetivos específicos

Obtener los extractos de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* por el método de reflujo con hexano y etanol.

Determinar la composición química del *Eucalyptus pulverulenta* a través del análisis fitoquímico.

Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de *Eucalyptus pulverulenta* mediante el método de difusión en agar con disco (Kirby – Bauer) en cepas de referencia internacional.

Alcances y limitaciones de la investigación

Según Hurtado (2010), los alcances y limitaciones hacen referencia al grado de aplicabilidad de la investigación. En ese sentido, los alcances implican explicar de manera precisa y clara hasta donde llegará el estudio, que tan confiable es y aspectos relevantes bajo el punto de vista metodológico. Por otra parte, las limitaciones refieren a elementos o situaciones que impidieron la óptima realización del trabajo de investigación, la obtención de los datos o expresión de los resultados propiamente.

Alcances de la investigación

La causa motivante de estudiar el *Eucalyptus pulverulenta* se basa en los estudios con otras especies del mismo género, de esto se quiere obtener la cura de infecciones bacterianas a un bajo costo, y en ese sentido se conoció la composición química de esta, con la idea de que alguno de sus compuestos pueda ser usado en la fabricación de medicamentos que sirvan como una alternativa mas natural.

Limitaciones de la investigación

Las limitaciones que fueron encontradas están la falla del servicio eléctrico y del servicio de internet para la búsqueda de información, además de los costos en los reactivos necesarios para realizar el análisis fitoquímico.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos previos

Kwansa, Okine, Dayie, Tetteh, Kotey, Donkor y Dayie (2023), publicaron un trabajo con el título: efectos *in vitro* de los extractos de éter de petróleo, diclorometano, metanol y acuoso de hojas de *Eucalyptus grandis* en bacterias seleccionadas resistentes a múltiples fármacos. El objetivo de este trabajo fue el de encontrar nuevos y más efectivos antimicrobianos para combatir infecciones causadas por bacterias multiresistentes a medicamentos, para esto se obtención de los extractos se utilizaron las hojas de *Eucalyptus grandis*, por el método de extracción por Soxhlet, usando éter de petróleo, diclorometano, metanol y agua. A los extractos se les aplicó análisis fitoquímicos para determinar la presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas, terpenoides y taninos. El método elegido para determinar la actividad antibacteriana fue el de difusión en agar con disco (Kirby – Bauer), a una concentración de 0,1 g/mL para cada extractos, los microorganismos utilizados son bacteria grampositiva (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM)) y dos bacterias gramnegativas (*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*), como controles positivos la ampicilina, tetraciclina, gentamicina, amoxicilina – ácido clavulanico, trimetropin – sulfametoxaxol, penicilina, ciprofloxacina y cloxacilina, antibióticos que son de uso convencional, además que las bacterias ya presentan mecanismos de resistencia ante ellos, como control negativos el DMSO. En el análisis fitoquímico se determinó que el extracto de éter de petróleo contenía alcaloides, flavonoides, taninos y terpenos, el extracto de diclorometano: alcaloides, taninos y terpenos y el extracto de metanol: alcaloides y saponinas. Los resultados por el método de difusión en agar con disco

demonstraron que los extractos de las hojas de *Eucalyptus grandis* presentaron actividad antibacteriana, con halos de inhibición para SARM, con el extracto de éter de petróleo (24,33 mm), el de diclorometano (16,67 mm) y el de metanol (17,67 mm), frente a *Escherichia coli*, el éter de petróleo (20,33 mm), el diclorometano (15,67 mm) y el de metanol (17,33 mm) y con *Pseudomonas aeruginosa*, éter de petróleo (19,33 mm), diclorometano (14,33 mm) y de metanol (16,33 mm), el extracto acuoso no presento halos en inhibición. Como conclusión los extractos de esta especie poseen metabolitos secundarios que presentan actividad antimicrobiana contra bacterias grampositivas y gramnegativas, este trabajo se relaciona con la investigación en cuanto al género utilizado, el análisis fitoquímico y la actividad antibacteriana.

Por otra parte, Sukhikh, Ivanova, Babich, Larina, Krol, Prosekov, Popov y Kriger (2022). Publicaron un trabajo bajo el título: Detección de las propiedades antimicrobianas y fungicidas de los extractos ultrasónicos del *Eucalyptus globulus*. El objetivo de la investigación fue determinar las propiedades antimicrobianas y antifúngicas de los extractos de las hojas del *Eucalyptus globulus* obtenidos usando ultrasonido (US). Para la obtención de los extractos se utilizó la maceración con alcohol etílico al 70 % como solvente, se tomaron alícuotas por duplicado al pasar 10 min, 15 min, 20 min, 25 min y 30 min, donde se le aplicó tratamiento US a la mitad de las alícuotas, se realizó un estudio usando cromatografía líquida de alta resolución para detectar sustancias biológicamente activas (SBA) donde se reporto que al pasar 20 min (alícuotas con US) y 25 min (alícuotas sin US) hubo mayor concentración de SBA. El método para determinar la actividad antibacteriana fue el de difusión en agar con disco (Kirby - Bauer), midiendo los halos de inhibición observados en mm, contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, como control positivo se utilizo ampicilina a 2,5 µg/10 µL, fluconazol a 10 mg/mL y como control

negativo etanol. Como resultado, se demostró que frente a *Bacillus subtilis* los extractos obtenidos con US a diferentes tiempos, presento mejor actividad antimicrobiana: a los 10 min (10 mm), 15 min (11 mm), 20 min (10 mm), 25 min (9 mm) y a 30 min (10 mm), que los obtenidos con maceración: 20 min (9 mm), a los 25 min y 30 min (7 mm), para *Pseudomonas aeruginosa*, los extractos tomados al pasar 10 min, 15 min y 20 min con maceración presento mejor efecto antimicrobiano (halos 11 mm, 13 mm y 14 mm respectivamente), mientras que los extractos obtenidos con US (13 mm a los 10 min y 11 mm a los 15 y 20 min), pero los extractos obtenidos con US a los 25 min y 30 min presentaron mejor efecto antimicrobiano (halos de 11 mm para ambos), que los obtenidos con maceración (10 mm y 7 mm respectivamente), se utilizó como control positivo la ampicilina a una concentración de 2,5 µg/10 µL (32,5 mm). Para *Candida albicans* las alícuotas obtenidas con US, en todos los tiempos presentaron mejor actividad antifúngica: a los 10 min (12,50 mm), 15 min (9,5 mm), 20 min (12,50 mm), 25 min (15,50 mm) y a 30 min (11 mm), que los obtenidos con maceración: a los 10 min (10,50 mm), 15 min (8,5 mm), 20 min (7,50 mm), 25 min y 30 min (8,50 mm), como control positivo se empleó el fluconazol a una concentración de 10 mg/mL (31 mm). De lo que se concluyó, que los extractos de las hojas *Eucalyptus globulus* presenta propiedades antibacterianas contra *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*, este trabajo se relaciona con la investigación por la actividad antibacteriana que presenta frente bacterias grampositivas y gramnegativas.

En otra investigación, Uriol y Espinoza (2021), publicaron un trabajo con el título: Actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos de frutos de "aguaymanto" (*Physalis peruviana* L.) y de hojas de "eucalipto" (*Eucalyptus globulus* Labill.) frente a *Staphylococcus aureus*. El objetivo fue determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de los frutos de "aguaymanto" (*Physalis peruviana* L.) y de

las hojas de “eucalipto” (*Eucalyptus globulus* Labill.) en concentraciones al 40 %, 70 % y 100 % frente a *Staphylococcus aureus* resistente a la oxacilina. Para evaluar la actividad antimicrobiana se utilizó el método de difusión con disco (Kirby – Bauer). El método para obtener los extractos fue a reflujo usando metanol al 50 %, a partir del obtenido se diluyó con agua destilada hasta alcanzar concentraciones de 70 % y 40 %. Los resultados arrojaron que los halos de inhibición a concentraciones de 100 %, 70 % y 40 % del extracto hidroalcohólico de *Physalis peruviana* L. no mostraron un efecto antimicrobiano significativo así mismo con el extracto hidroalcohólico al 40 % de *Eucalyptus globulus* Labill., al 70% se observó un halo de inhibición de 12,53 mm y al 100 % un halo de 16 mm, este último presentó una actividad similar al control con vancomicina (16,30 mm), contra *Staphylococcus aureus* resistente a la oxacilina. En conclusión y en base a los resultados obtenidos podemos decir que el extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* a una concentración del 100 % fue el que presentó mayor actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*. El trabajo demuestra que a altas concentraciones se espera una actividad antibacteriana similar al antibiótico de referencia.

Antecedentes históricos

La historia de los productos naturales se remonta a la antigüedad, donde el ser humano utilizaba diversos recursos aborígenes para su supervivencia. Restos arqueológicos demuestran que el hombre utilizaba ciertas plantas y hongos con propiedades alimenticias, terapéuticas, relajantes e inclusive alucinógenas. En las tribus y en las más antiguas civilizaciones, las especies vegetales se han constituido como la principal fuente de medicamentos para tratar distintas enfermedades. En la actualidad, siguen siendo una fuente importante de medicamentos para tratar diversas

enfermedades. Muchas sustancias químicas que se obtienen de fuentes nativas han estado estrechamente asociadas a la vida de los pueblos, de todos los países y en todos los tiempos. La mayoría de los fármacos originados a partir de las plantas siguen teniendo una posición destacada pese al increíble desarrollo de la síntesis, la química combinatoria y los procesos biotecnológicos de fermentación microbiana. En la actualidad, se han encontrado una gran cantidad de estructuras químicas, las cuales han sido un importante factor para el descubrimiento de potentes fármacos, así como también, en diversas aplicaciones en la agricultura, como es el desarrollo de pesticidas y herbicidas (Mesa, 2017).

La medicina natural es una práctica que se ha utilizado desde tiempos antiguos para tratar enfermedades y dolencias. Como tal es un sistema de conocimiento armónicamente estructurado que contribuye al conocimiento del mundo circundante, en este caso, de forma especial a la salud humana (Guerra, Padilla y Guerrero, 2016). Esta se basa en el uso de plantas, hierbas y otros remedios naturales para tratar enfermedades y dolencias.

El *Eucalyptus* se cree que se originó hace 35 a 50 millones de años, poco después de que Australia y Nueva Guinea se separaran de Gondwana (Granados y López, 2007). El género *Eucalyptus* fue descrito formalmente por primera vez en 1789 por Charles Louis L'Héritier de Brutelle, quien publicó la descripción en su libro *Sertum Anglicum*, junto con una descripción de la especie tipo *Eucalyptus obliqua* (L'Héritier, 1788).

Productos naturales

Los seres vivos son capaces de sintetizar una gran variedad de compuestos, pero se define “producto natural” o “metabolito secundario”, que se usa como sinónimo, aquél que es propio de una especie, se le conoce

también como producto químico y en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza, a diferencia de los metabolitos primarios o productos bioquímicos que presentan una utilidad definida y que son comunes a todos los seres vivos: carbohidratos, lípidos, proteínas, entre otros (Marcano y Hasegawa, 2018).

La clasificación de los metabolitos secundarios puede hacerse de acuerdo a sus estructuras, su bioformación, fuente de producción o a su acción biológica. En todos estos casos es inevitable la superposición. Por ejemplo, por ser moléculas generalmente polifuncionales es difícil ubicarlas en un determinado grupo químico, o dos compuestos totalmente diferentes tienen la misma acción, o la misma fuente de producción puede originar simultáneamente compuestos muy distintos. Aparentemente el criterio más acertado es aquél que usa la biosíntesis como denominador común, la cual, en su esquema básico, engloba la formación de los metabolitos primarios y secundarios (Marcano y Hasegawa, 2018).

Todos los compuestos orgánicos están constituidos por carbono e hidrógeno, a menudo contienen oxígeno y nitrógeno y menos frecuentemente, azufre, fósforo y halógenos. La formación de los productos naturales comienza con la fotosíntesis que tiene lugar en plantas superiores, algas y algunas bacterias. Es un proceso endotérmico que requiere de la luz solar. Los fragmentos pequeños se recombinan para generar las grandes moléculas (Marcano y Hasegawa, 2018), por mencionar algunas rutas de síntesis están la ruta del ácido mevalónico que reacciona hasta la producción de isopentil difosfato (IPP) y la ruta del etilritritol fosfato que también tiene como producto de reacciones el IPP que sirve como paso para sintetizar compuestos terpénicos, la ruta del ácido shikímico que a partir de derivados de este ácido se producen aminoácidos aromáticos y luego compuestos fenólicos (Ávalos y Pérez, 2009). Los metabolitos secundarios que han sido extraídos son:

Alcaloides: Son bases orgánicas que se aíslan principalmente de las plantas superiores y se han encontrado en más de 100 familias de fanerógamas (órganos de reproducción de las plantas en forma de flor) y animales (peces, sapos). Su actividad fisiológica, principalmente a nivel de sistema nervioso, fue el motor de las primeras investigaciones en productos naturales. Algunos se han manifestado como altamente tóxicos y otros en dosis apropiadas son conocidas como drogas comúnmente usadas en medicina, algunos compuestos alcaloides obtenidos de plantas son la nicotina (1) y la cafeína (2) (Figura 1) (Marcano y Hasegawa, 2018).

Esteroles: También conocidos como esteroides, triterpenos tetracíclicos que tienen de 27 a 30 átomos de carbono, estos poseen una importancia farmacológica muy grande debido a que compone la estructura de sustancias vitales, entre estas: hormonas sexuales, vitamina D, hormonas corticoides, compuestos cardiotónicos, hormonas de muda de los insectos, antibióticos, toxinas y otros, se ha desarrollado un gran número de análogos sintéticos con intenciones, entre otras cosas, de suplantar, modificar o comprobar las estructuras de aquéllos aislados de la naturaleza, por mencionar un esteroide obtenido en plantas están el sitosterol (3) (Figura 1) (Marcano y Hasegawa, 2018).

Terpenos: Los terpenos pueden encontrarse en fuentes de origen vegetal solos o formando glicósidos. La unidad fundamental que caracteriza estos esqueletos se basa en cinco átomos de carbono y se le conoce como isopreno, sin embargo, esta molécula como tal no es frecuente en las plantas, sino que está asociada a otras unidades iguales o a otras moléculas, entre los terpenos encontrados en plantas está la Giberilinas (4) (Figura 1) (Marcano y Hasegawa, 2018).

Saponinas: Son glucósidos de esteroides o de triterpenoides, que pertenecen a un grupo de sustancias glicosiladas que se disuelven en agua y poseen la propiedad de formar espuma al agitar la solución. Existen las saponinas clásicas, que están conformadas por azúcares y una aglicona, saponinas triterpenoidales, por mencionar un ejemplo de saponinas obtenidas de plantas está el dioscina (5) (Figura 1) (Marcano y Hasegawa, 2018).

Fenoles: Los compuestos aromáticos naturales incluyen derivados simples de benceno, anillos bencénicos condensados, monómeros, dímeros o polímeros de alto peso molecular, como lo son ligninas y taninos, que se encuentran prácticamente en todas las plantas superiores y por ello se los considera productos universales. Generalmente presentan grupos funcionales oxigenados que en la mayoría de los casos son fenoles y por lo que se les conoce con el nombre genérico de compuestos fenólicos, estos son más frecuentes en el reino vegetal que en el animal, en este último se presenta generalmente una función metabólica definida, por ejemplo, el ácido *p*-cumarico (6) (Figura 1) (Marcano y Hasegawa, 2018).

Taninos: Los taninos son sustancias que producen el endurecimiento del cuero, están ampliamente distribuidos en dicotiledóneas leñosas; su función en las plantas no está clara, pero debido a su abundancia en tejidos jóvenes y en las heridas causadas en el tallo, particularmente aquéllas cerca del suelo, se cree que son utilizados por el vegetal como protección contra infecciones de hongos y parásitos (los árboles pobres en taninos se pudren rápidamente), por mencionar un ejemplo está la Procianidina B1 (7) (Figura 1) (Marcano y Hasegawa, 2018).

Flavonoides: Los flavonoides sin ser metabolitos primarios, se encuentran casi en cualquier vegetal superior, hay más de 8000 compuestos conocidos

de plantas vasculares mientras que en los vegetales inferiores: algas, hongos, bacterias, los compuestos fenólicos principales son quinonas y xantonas y a éstos deben su color. La función de los flavonoides en la planta son varias. Así, se consideran como antioxidantes, secuestradores de radicales libres, agentes antimicrobiales, antinutricionales, fotoreceptores y protectores contra la luz UV, agentes quelantes de metales, atractores visuales para los insectos, entre otros, de los compuestos flavonoides está la apigenina (8) (Figura 1) (Marcano y Hasegawa, 2018).

Antraquinonas: Las antraquinonas se localizan principalmente en vegetales superiores, hay ejemplos de compuestos provenientes de insectos y de microorganismos. También se aislaron derivados reducidos de antraquinonas como antranas y sus enoles respectivos: antranoles. El ácido acético es aceptado como su precursor biogenético casi exclusivo, como ejemplo de algunas antraquinonas está el ácido carmínico (9) (Figura 1) (Marcano y Hasegawa, 2018).

Quinonas: Entre los productos naturales, las quinonas están ampliamente representadas, bien sea como núcleo principal de una estructura o formando parte de moléculas complejas aromáticas o aromáticas-alifáticas y a veces diméricas. Las quinonas constituyen un grupo importante de pigmentos vegetales y animales, un ejemplo de quinonas está la alizarina (10) (Figura 1) (Marcano y Hasegawa, 2018).

Cumarinas: Las α -pironas que se generan por lactonización del ácido o-cumárico se conocen como cumarinas y están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. La estructura más sencilla, la cumarina misma, es utilizada como aromatizante en confitería. se encuentran en su mayoría oxigenadas en C-7 (por ejemplo, umbelliferona, muy frecuente en las plantas de la familia Umbellíferas), presentan a menudo, una o varias unidades de isopreno en

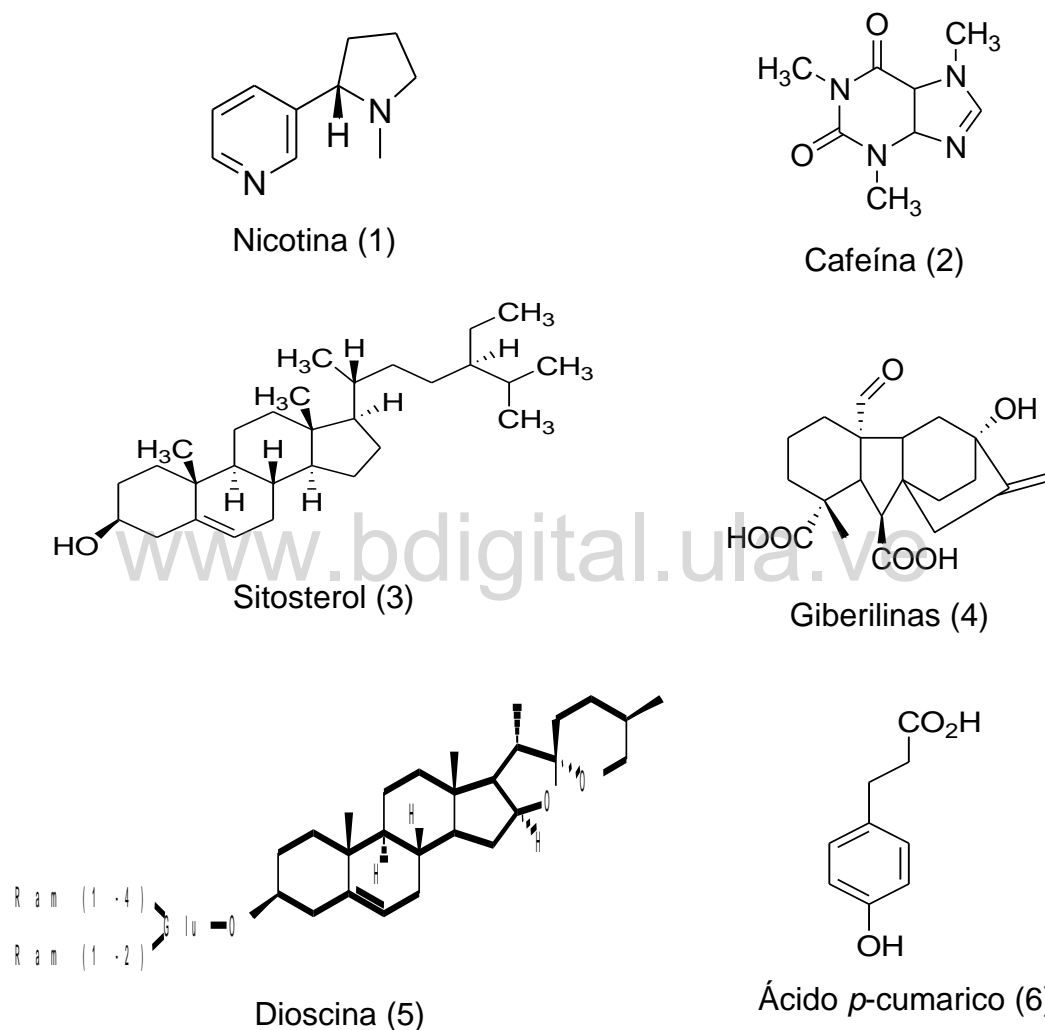
posiciones orto al oxígeno fenólico. Son compuestos altamente fluorescentes bajo luz UV y aún en la región del visible, particularmente cuando se rocían con ácido sulfúrico, de las cumarinas que han sido obtenidas de plantas está la xantiletina (11) (Figura 1) (Marcano y Hasegawa, 2018).

Lactonas sesquiterpénicas: Muchos sesquiterpenos presentan diversas actividades biológicas que parecen asociarse a una estructura parcial común: una γ -lactona- α , β -insaturada, o más estrictamente: una α -metilen- γ -lactona. Aunque no se conoce bien la relación existente entre la estructura química y actividad biológica de estos metabolitos, se presume que el mecanismo operante es el ataque nucleofílico de ciertos centros activos de las proteínas sobre el sistema α -metilen- γ -lactona en una reacción del tipo Michael. Los centros nucleofílicos principales de una cadena proteica son grupos amino, imidazol y tiol, siendo los últimos los más reactivos. Poseen funciones Actividad antitumoral (anticancerígena, antineoplásica) y citotóxica, así mismo como actividad antimicrobiana, antibacteriana y fungicida, este compuesto químico se caracteriza por presentar un enlace con oxígeno, un ejemplo de lactona obtenida de plantas esta la partenina (12) (Figura 1) (Marcano y Hasegawa, 2018).

Glicósidos cardiotónicos: Los oligosacáridos son polímeros de sacáridos que contienen un pequeño número de monosacáridos (azúcares simples) unidos mediante enlaces glicosídicos. Estas moléculas tienen muchas funciones, incluyendo el reconocimiento celular y la adhesión celular. Los oligosacáridos se presentan normalmente como glicanos: cadenas de oligosacáridos están unidas a lípidos o a cadenas laterales de aminoácidos compatibles en proteínas, por enlaces *N*- o *O*- glicosídicos. Los oligosacáridos *N*-enlazados son siempre pentasacáridos unidos a asparagina mediante un enlace beta al nitrógeno amino del grupo lateral. Por otro lado, los oligosacáridos *O*-enlazados se unen generalmente a treonina o serina en

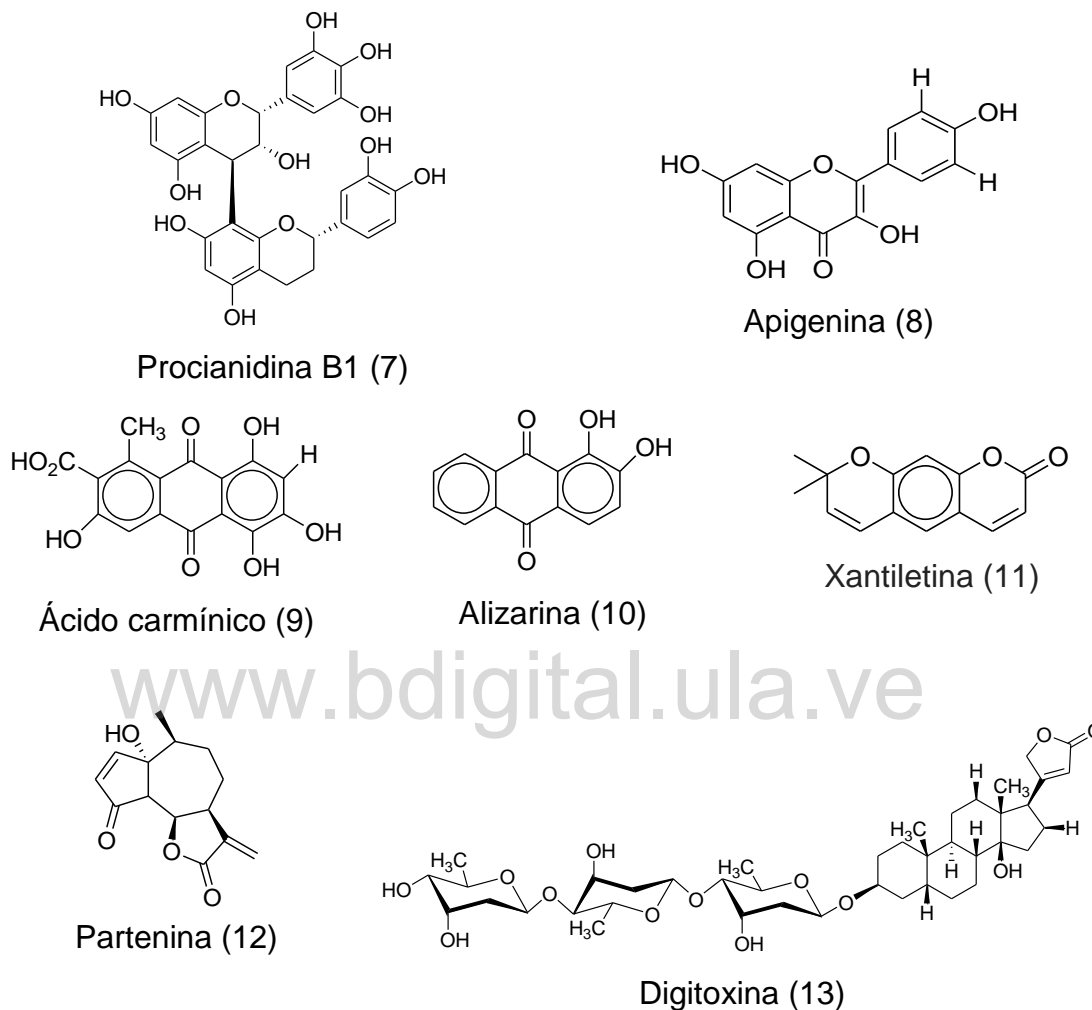
el grupo hidroxilo del grupo lateral, algunos glicosacaridos obtenidos de plantas están la digitoxina (13) (Figura 1) (Merchán, Gómez y Vélez, 2005).

Figura 1. Metabolitos secundarios obtenidos de las plantas



Tomadas y modificado de Marcano y Hasegawa, 2018; www.scielo.org

Figura 1. Metabolitos secundarios obtenidos de las plantas (continuación)



Tomado y modificado de Marcano y Hasegawa, 2018; www.scielo.org

Bases teóricas

Aspectos botánicos de la familia Myrtaceae

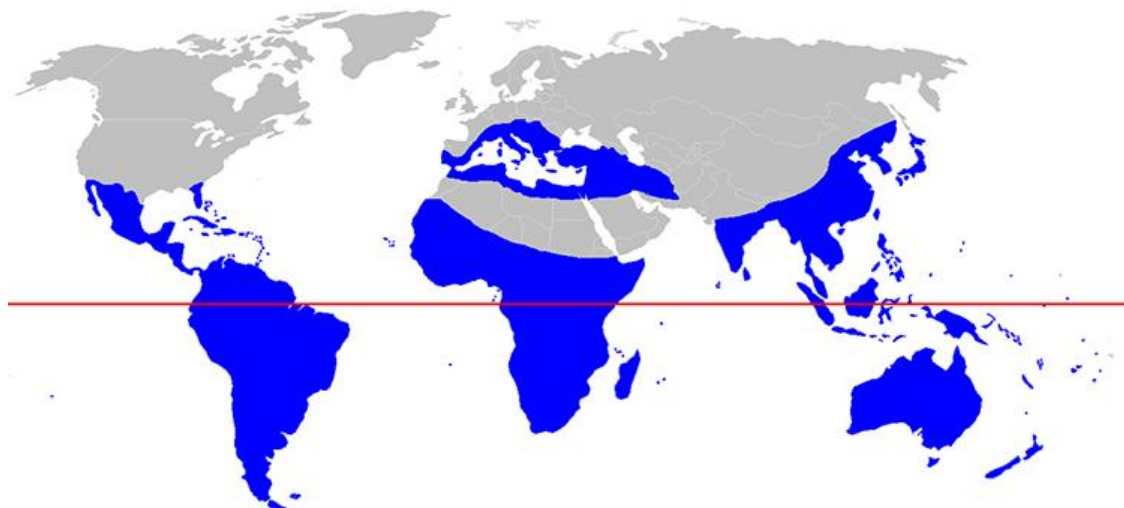
La familia Myrtaceae es un grupo de plantas arbóreas o arbustivas, generalmente perennifolias y aromáticas, que pertenecen al orden Myrtales,

tiene 132 géneros aceptados y unas 5671 especies admitidas, de las casi 14.000 descritas, la familia agrupa plantas excepcionales, tales como las eudicotiledóneas más altas (110-140 m) del planeta (*Eucalyptus*) y el género específicamente más prolífico (1200-1800 especies) que existe (*Syzygium*) las hojas, eventualmente heteromorfas, opuestas o alternas, pero raramente verticiladas, son caracterizadas por sus puntos glandulares hialinos y son muy variables, pero siempre simples y enteras, aunque sentadas o pecioladas y con o sin estípulas (Parra, 2014).

Distribución geográfica de la familia Myrtaceae

Se ubica principalmente en el hemisferio sur (especialmente en Australia y América tropical), abarca además todos los continentes, excepto la Antártida (Figura 2) (Parra, 2014).

Figura 2. Distribución geográfica de la familia Myrtaceae

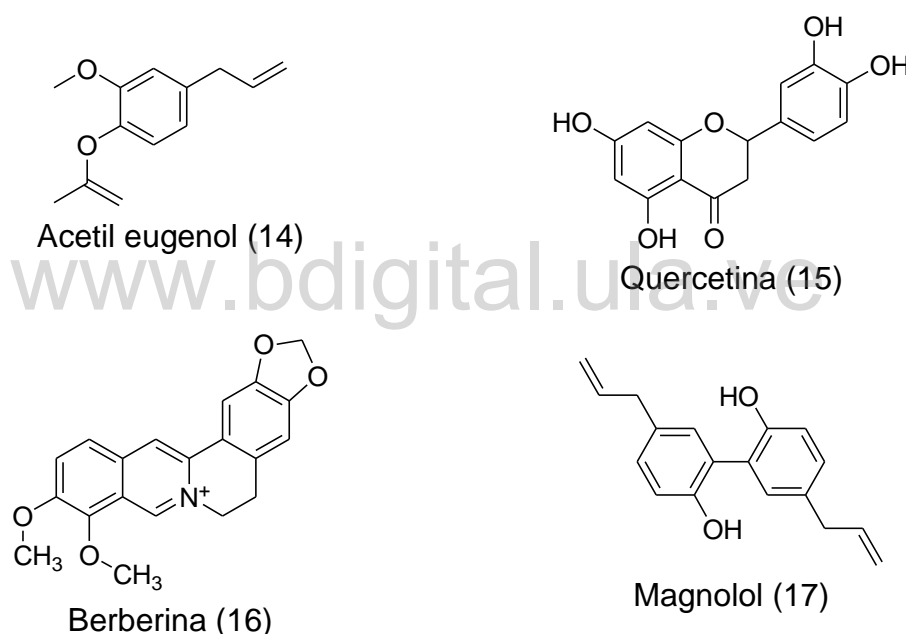


Tomado y modificado de www.raiz-iifp.pt

Compuestos químicos aislados en la familia Myrtaceae

Algunos de los compuestos químicos que se han logrado extraer en la gran variedad de plantas que pertenecen a la familia Myrtaceae están: el éster acetil eugenol (14), el flavonoide quercetina (15), el alcaloide isoquinolínico berberina (16) y el fenol magnolol (17) (Figura 3) (Bravi y del Valle, 2021)

Figura 3. Algunos compuestos aislados de la familia Myrtaceae.



Tomada y modificado de Bravi y del Valle, 2021

Usos de la familia Myrtaceae

Esta familia, compuesta de un gran número de plantas, ha sido estudiada debido a su gran cantidad de usos, esto para determinar con mayor precisión varias de sus muchas funciones, entre estas están la acción

antiinflamatoria, actividad antibacteriana y antifúngica, antioxidante, antiviral, antialérgico, es protector hepático y cardíaco, tiene acción antagónica contra *Giardia intestinalis*, hipoglucémico, antidiarreico, anticancerígeno, tiene actividad neuroprotectora y es un anticonvulsivante (Teixeira, Pereira y Pasqualotto, 2021).

Aspectos botánicos del género *Eucalyptus*

El género *Eucalyptus*, cuyo nombre deriva de las palabras griegas “eu” (que significa “bien”) y “kalypteim” (que significa “cubierto”), es un grupo de árboles y arbustos perennes que desempeñan un papel crucial en los bosques cerrados de Australia meridional. Estas plantas pueden alcanzar alturas considerables llegando a medir de 50 a 100 metros. Su corteza exterior puede ser de color gris azulado y se despega en tiras, sus hojas cuando son jóvenes tienen como característica ser sésiles, ovaladas, grisáceas y de forma falciforme. A medida que maduran, se tornan de un verde azulado brillante. Contienen aceites esenciales con olor característico (balsámico) que actúa como un poderoso desinfectante natural, además poseen tolerancia al frío, de las más de 500 especies de *Eucalyptus*, por mencionar una como el *Eucalyptus coccifera* que puede tolerar temperaturas cercanas a los -13 °C, mientras que la gran mayoría, sino todas, tolera altas temperaturas por ser originarias de Australia que es conocida por presentar altas temperaturas (Granados y López, 2007).

Distribución geográfica del género *Eucalyptus*

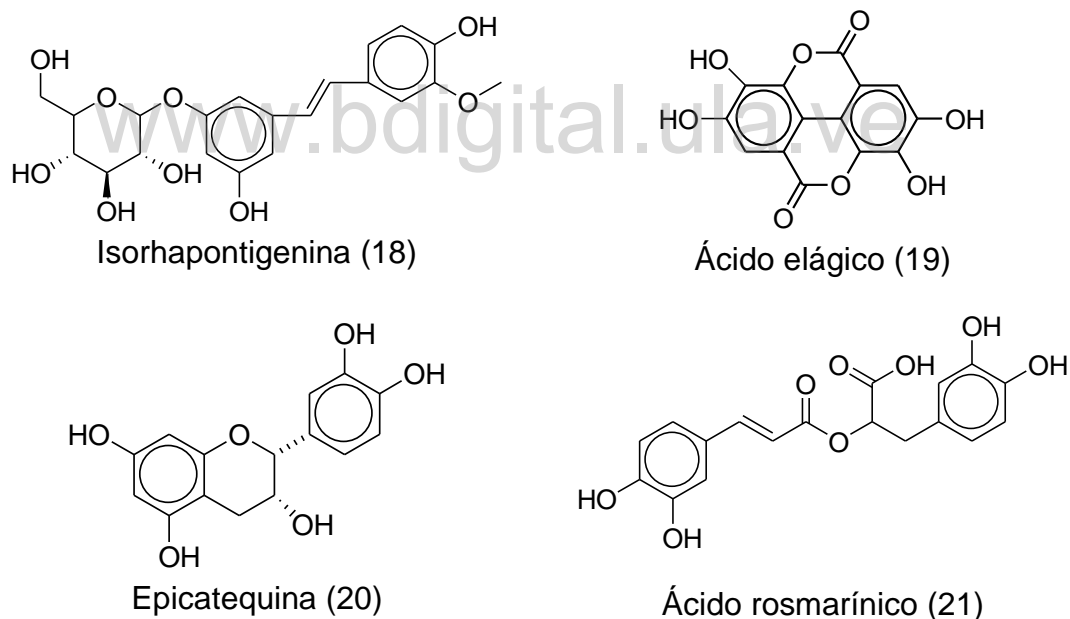
La mayoría de los *Eucalyptus* se encuentran de forma natural en Australia. Diez especies son comunes en el sur de Nueva Guinea y el norte de Australia, también logra ser ubicada en parte del continente suramericano y África, aunque depende del clima en que se encuentre. Los *Eucalyptus*

habitan desde los 9° de latitud norte donde se encuentra el *Eucalyptus deglupta* hasta los 44° sur donde se encontraría el *Eucalyptus obliqua* (Granados y López, 2007).

Compuestos químicos aislados del género *Eucalyptus*

Entre los compuestos químicos que han sido extraídos de plantas pertenecientes del género *Eucalyptus*, está la isorhapontigenina (18), ácido elágico (19), la epicatequina (20) y el ácido rosmarínico (21) (Figura 4) (Palma, Ruiz, Díaz, Giráldez y Morales, 2023).

Figura 4. Estructuras químicas obtenidas del género *Eucalyptus*



Tomado y modificado de Palma y cols., 2023

Usos del género *Eucalyptus*

El género *Eucalyptus* posee una amplia gama de aplicaciones tanto en su forma natural como en extractos. Entre sus usos generales encontramos que las hojas y cortezas se emplean para tratar afecciones respiratorias como tos, bronquitis y asma, debido a sus propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y expectorantes. Así mismo para aliviar dolores musculares y articulares, combatir infecciones urinarias y fúngicas y el extracto de *Eucalyptus* se ha demostrado que es efectivo como biopesticida para controlar plagas y enfermedades en cultivos (Carbay, 2023). El *Eucalyptus globulus* es la especie más utilizada por sus propiedades medicinales y antisépticas, *Eucalyptus citriodora* se destaca por su contenido en citronela, lo que la convierte en un efectivo repelente de mosquitos y el *Eucalyptus camaldulensis* posee propiedades antibacterianas y antifúngicas, siendo utilizado para tratar infecciones de la piel y del tracto respiratorio (Núñez y Valladares, 2001).

Aspectos botánicos de la especie *Eucalyptus pulverulenta*

El *Eucalyptus pulverulenta* fue descubierto por primera vez por el investigador Jhon Sims, es una especie de árbol o mallee que es endémica del sur de Nueva Gales del Sur, Australia (Sims, 1819). Tiene una corteza lisa, de color verde a gris o marrón, a veces colgando en cintas cortas. La copa del árbol tiene casi exclusivamente hojas juveniles que son ovadas a redondas o cordadas, glaucas, sésiles, de 15–50 mm de largo, 20–50 mm de ancho y dispuestas en pares opuestos. El perianto tiene un cáliz imbricado con 3-10, habitualmente 4-5 sépalos, libres o soldados a los pétalos para formar un opérculo (caliptra) que se desprende en la madurez. La corola,

algo fugaz, cuenta con 3-6, generalmente 4-5 pétalos libres o soldados a la caliptra caduca. El androceo está constituido, en la mayoría de los casos, por numerosos (20-150) estambres, raramente 5 o 10, libres o reunidos en 4-5 fascículos, con los filamentos libres hasta casi la base, y, a veces con algún estaminodio; sus anteras son ditecas, con dehiscencia longitudinal o foraminal. El estilo es simple, con un estigma capitado o lobulado. El fruto es una baya, una drupa o una cápsula loculicida, septicida o valvar, a veces con el cáliz persistente. Las semillas son numerosas o solitarias, con o sin endospermo, con un embrión recto o curvo (Vega y Ortega, 2016).

Distribución geográfica de la especie *Eucalyptus pulverulenta*

Se logra ubicar en Australia, Inglaterra, sur de Brasil y California, Costa central de Nueva Gales del Sur y cordilleras de la costa. Crece en las bajas colinas y escarpas, no siendo exigente con respecto a suelos (FAO, 1981), de momento se logra ubicar en Venezuela, estado Mérida.

Taxonomía de la especie *Eucalyptus pulverulenta*

Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Rosidae
Orden: Myrtales
Familia: Myrtaceae
Subfamilia: Myrtoideae
Tribu: Eucalypteae
Género: *Eucalyptus*
Especie: *Eucalyptus pulverulenta*
(Sims, 1918)



Figura 5. Especie *Eucalyptus pulverulenta*

Tomada y modificada de www.theoriginalgarden.com

www.bdigital.ula.ve

Usos de *Eucalyptus pulverulenta*

Eucalyptus pulverulenta posee una madera de buena calidad, en la industria papelera como suministro de celulosa, sus hojas como complemento en arreglos florales y de la misma forma se cultiva en jardines como árbol decorativo (Morales, 2023). A diferencia de otras especies estudiadas, como por ejemplo el *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus pulverulenta* no posee estudios ni actividades antibacterianas conocidas, se espera que el *Eucalyptus pulverulenta* pueda presentar los mismos usos de otras especies de *Eucalyptus* ya estudiadas.

Extractos de plantas

Los extractos son preparaciones que se obtienen a partir de una o varias partes de una planta, como hojas, flores, raíces, semillas, frutos o cortezas. Estos se utilizan en la medicina tradicional y moderna para tratar diversas enfermedades y dolencias. Según su uso, en este caso terapéutico, se aplica desde la antigüedad para curar o aliviar las enfermedades (Gallegos, 2016).

Métodos de obtención

Extracción por reflujo: La extracción por reflujo es una técnica de laboratorio que sostiene compuestos de mezclas usando un solvente en caliente que se evapora y refluye sobre la mezcla, maximizando el contacto y extrayendo los compuestos de una manera eficiente, siendo útil en química orgánica, farmacéutica, bioquímica y la industria alimentaria (Cabello y Belloso, 2009).

Extracción en Soxhlet: O “extracción continua en soxhlet”, consiste en situar el material seco en una cámara central que estará conectada a un balón con un solvente y a una columna de refrigeración, el solvente se hace evaporar a alta temperatura para que ascienda al condensador, se condense para luego caer sobre el material vegetal, una vez la cámara central se haya llenado de solvente, este volverá a caer por sifoneo al balón (Arévalo y Enciso, 1996).

Extracción por maceración: Consiste en poner en contacto la matriz sólida con el solvente durante un tiempo determinado y a temperatura ambiente. La matriz sólida es el material vegetal seco en polvo. Los solventes usados pueden ser alcoholes alifáticos de hasta tres carbonos (por lo general etanol)

o la mixtura de alcohol y agua. La mezcla de la matriz sólida con el solvente se denomina tintura (Duarte, Jiménez, Pineda, González, García, 2020).

Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico consiste en la obtención de extractos de plantas con solventes apropiados, tales como agua, acetona, alcohol, cloroformo y éter, entre otros. Aunque en la actualidad existen técnicas avanzadas para determinar la naturaleza química de los metabolitos de las plantas, los ensayos fitoquímicos tradicionales aún constituyen una forma confiable de realizar un análisis cualitativo de los extractos, ya que arrojan información preliminar acerca de su composición. Cuando se investigan muchos extractos de plantas, esto constituye una ventaja ya que permite descartar todas aquellas especies que no tienen potencial para ser utilizadas para algún beneficio farmacológico, quedando solamente las que sí lo tienen (Castillo, Zavala y Carrillo, 2017). Entre las pruebas que se pueden realizar para identificar metabolitos secundarios están:

- **Ensayo de Dragendorff, Mayer y Wagner para alcaloides:** Las pruebas de detección para alcaloides consisten en hacer reaccionar los extractos obtenidos de plantas con reactivos específicos para detección de este metabolito secundario, la prueba se fundamenta en la acidificación de la solución y luego su reacción química en los compuestos nitrogenados habidos en las estructuras químicas de las plantas, como respuesta se forma una sal y se genera una precipitación naranja, crema o marrón, respectivamente del reactivo utilizado (Arango, 2008, Domínguez, 1979).
- **Ensayo de Liebermann – Burchard para esteroides y terpenos:** Se fundamenta en que el extracto obtenido entre en contacto con un

reactivo que consiste en la mezcla de anhídrido acético con cloroformo y ácido sulfúrico, si aparece una coloración azul, verde, rojo o anaranjado indicara la presencia de esteroides o terpenos, la prueba es positiva con esteroides que contienen dos enlaces dobles conjugados (Domínguez, 1979, Martínez, Valencia, Jiménez, Mesa y Galeano, 2008).

- **Prueba de altura y estabilidad de espuma para saponinas:** Consiste en agitar vigorosamente el extracto hasta formar espuma, esta se forma debido a un grupo de glicósidos que se diluyen en agua y disminuyen la tensión superficial del extracto (Domínguez, 1979).
- **Ensayo con cloruro férrico (FeCl_3) para fenoles:** Los compuestos fenólicos tienen la capacidad de reaccionar con el cloruro férrico, produciéndose una coloración azul oscuro, verde, azul-verdoso o negro (Albornoz, 2001), esta depende de donde son derivados, por ejemplo, una coloración verde deriva del catecol, una coloración azul deriva del pirogalol y una coloración negra deriva del ácido gálico (Domínguez, 1979).
- **Ensayo de la gelatina al 1 % para taninos:** Esta se utiliza debido a la capacidad de precipitar de los taninos, se agrega una solución de agua que contenga 1 % de gelatina al extracto, de haber taninos presentes se observara un precipitado (Palacios, 2013).
- **Ensayo de Shinoda para flavonoides:** En la reacción de Shinoda, el magnesio metálico es oxidado por el ácido clorhídrico (HCl) concentrado, dando como productos al hidrogeno molecular (H_2), que es eliminado en forma de gas y el cloruro de magnesio (MgCl_2), que es el que forma complejos con los flavonoides dando coloraciones

características. El magnesio bajo esas condiciones intensificara la coloración que se produzca, pueden aparecer una coloración anaranjada, roja, verde, azul o violeta en prueba positiva (Domínguez, 1979).

- **Ensayo de Bornträger para antraquinonas:** Es una técnica analítica utilizada para detectar la presencia de quinonas en extractos vegetales. Esta reacción se basa en la formación de complejos de color rojo cereza cuando las naftaquinonas y antraquinonas reaccionan con una solución de hidróxido de amonio (Barrese, Hernández y García, 2005).
- **Ensayos para quinonas:** Las quinonas, cuando se solubilizan en álcalis, producen coloraciones que van desde el anaranjado al rojo, o color violeta (Albornoz, 2001).
- **Ensayo por fluorescencia para cumarinas:** Las cumarinas son compuestos derivados de la α -benzopirona. Dado que en su estructura presentan un gran número de insaturaciones, estos compuestos exhiben una fuerte fluorescencia azul o verde al ser irradiados con luz ultravioleta, propiedad que se aprovecha para su detección (Domínguez, 1979).

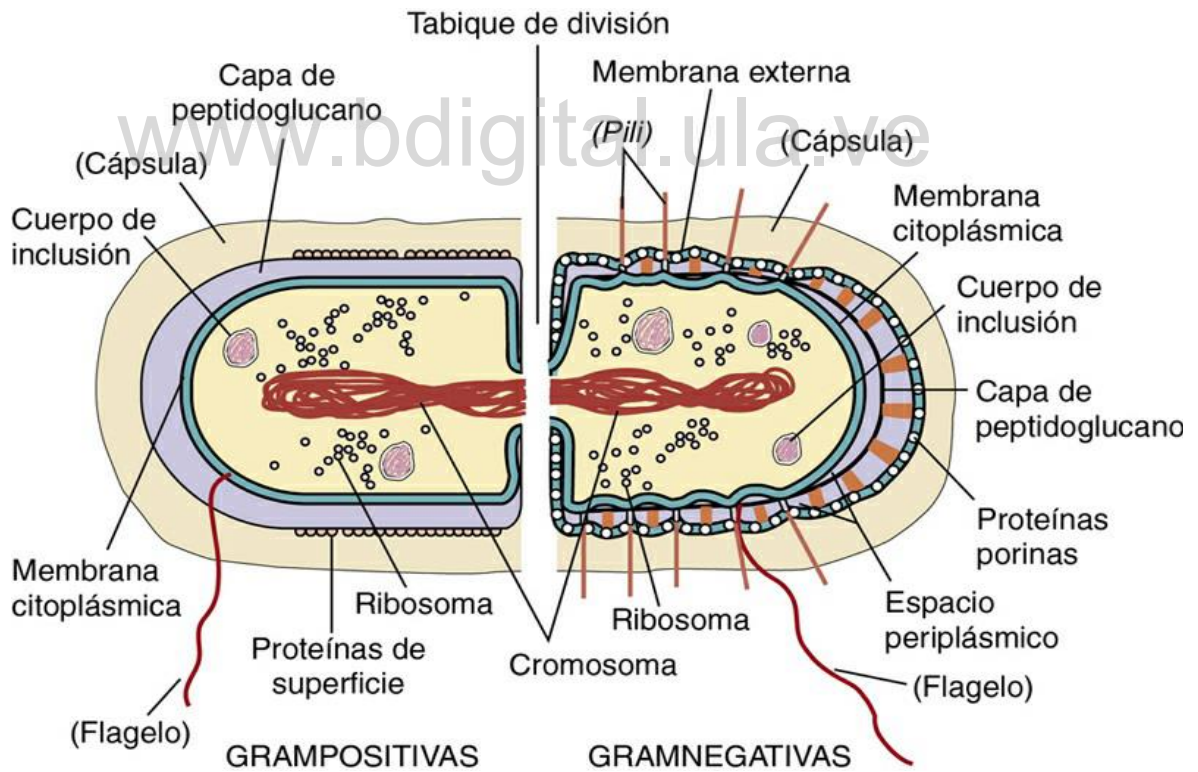
Microorganismos

Los microorganismos en general son procariotas unicelulares de material genético que no está encerrado en una membrana nuclear especial, entre ellos tenemos a las bacterias, hongos, parásitos y virus los cuales pueden ser causantes de cuadros clínicos importantes para el hombre (Madigan, Martinko, Parker y Brock, 2004).

Bacterias

Las bacterias poseen una estructura relativamente simple. Son microorganismos procariotas, unicelulares, sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias órgano de Golgi ni retículo endoplásmico, que se reproducen por división asexual. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja y existen dos formas básicas: una pared grampositiva con una gruesa capa de peptidoglucano y una pared celular gramnegativa con una delgada capa de peptidoglucano, así como una membrana externa (Figura 6) (Murray y cols., 2017).

Figura 6. Diferencias entre bacterias grampositivas y gramnegativas



Tomada y modificada de Murray y cols., 2017.

Clasificación bacteriana

Las bacterias se pueden clasificar según su aspecto macroscópico y microscópico, según su crecimiento y sus propiedades metabólicas características, por su antigenicidad y, por último, por su genotipo (Murray y cols., 2017).

La distinción inicial entre las bacterias se puede realizar en función de las características de crecimiento en distintos nutrientes y medios de cultivos selectivos, las bacterias crecen en colonias y cada una de ellas equivaldría a una ciudad con un millón o más de organismos. La suma de sus características condiciona los rasgos que definen a una colonia, como color, tamaño, forma, u olor. La capacidad de resistir frente a determinados antibióticos, de fermentar azúcares específicos, de lisar los eritrocitos o de hidrolizar los lípidos, se determina también mediante el uso de los medios de cultivos adecuados (Murray y cols., 2017).

El aspecto microscópico, incluido tamaño, forma y configuración de las bacterias (cocos, bacilos, espirales), y la capacidad de captar el colorante de Gram (grampositivo o gramnegativo) son el principal modo de distinguirlas. Una bacteria esférica, como *Staphylococcus* es un coco, mientras que una en forma de bastón, como *Escherichia coli*, es un bacilo; la *treponema* que adopta una forma serpenteante es un espirilo. Además, *Nocardia* y *Actinomyces* tienen un aspecto filamentosos ramificados similares a algunos hongos. Algunas bacterias forman agregados, como los cúmulos a modo de racimos de uvas de *Staphylococcus aureus* o los diplococos (dos células juntas) que se observan en las especies de *Neisseria* o *Streptococcus* (Tortora, Funke y Case, 2007).

La tinción de Gram es una prueba rápida, potente y sencilla que permite al clínico distinguir entre dos clases fundamentales de bacterias.

Establecer un diagnóstico inicial e iniciar el tratamiento basándose en las diferencias inherentes entre bacterias (Tortora y cols., 2007).

Clasificación de las bacterias usadas en el estudio

Las bacterias son microorganismos unicelulares procariotas que carecen de un núcleo delimitado por una membrana, aunque presenta un nucleoide que contiene una molécula circular de ADN; su citoplasma carece de organelos. Allí se puede apreciar plásmidos (moléculas circulares de ADN que coexisten con el nucleoide; además contiene genes que son usados por estos microorganismos en la conjugación) presenta también vacuolas y ribosomas. La membrana citoplasmática está compuesta de lípidos que rodean al citoplasma. Algunas presentan una segunda membrana lipídica (membrana externa característica de las bacterias gramnegativas). El espacio comprendido entre la membrana citoplasmática y la pared celular o membrana externa se denomina espacio periplásmico. La mayoría de las bacterias presentan una cápsula que le permite protegerse de las células fagocitadoras y de los agentes antibacterianos; otras son capaces de evolucionar a endosporas (Estadios latentes capaces de resistir condiciones extremas). Entre las formaciones exteriores propias de la célula bacteriana destacan los flagelos y los pilis (Prescott, Harley y Klein, 2004).

La clasificación de las bacterias radica en su pared celular donde se pueden diferenciar por la coloración del Gram, un método tradicionalmente empleado para la clasificación de las especies bacterianas. Así, las bacterias gramnegativas tienen una pared relativamente fina, consistente en unas pocas capas de peptidoglucano rodeada por una segunda membrana lipídica (membrana externa) que contiene lipopolisacáridos y lipoproteínas. En cambio, las bacterias grampositivas tienen una pared gruesa que contienen

numerosas capas de peptidoglucano en las que se inserta el ácido teicoico (Tortora y cols., 2007).

Muchas de las especies de bacterias son gramnegativas, debido a que ellas poseen un complejo de lipopolisacáridos cuya parte lipídica actúa como endotoxina y es responsables de la capacidad patógena del microorganismo. Las especies bacterianas gramnegativas *Klebsiella pneumoniae*, son responsables por enfermedades del tracto respiratorio superior e inferior; y la *Escherichia coli*, causante de enfermedades urinarias y de tipo gastrointestinal. Todas estas cepas son de morfología bacilar, mientras que las cepas grampositivas como el *Staphylococcus aureus* es responsable de causar septicemia, impétigo, entre otras y la *Enterococcus faecalis*, agente causal de infecciones urinarias (Prescott y cols., 2004).

Staphylococcus aureus es un coco grampositivo causante de enfermedades mediante la producción de toxinas o a través de la invasión directa y la destrucción del tejido. Las enfermedades que puede producir son de carácter supurativo, sea a nivel de la piel, de órganos y sistema óseo, esto lo logra mediante la producción de toxinas (Tortora y cols., 2007).

Enterococcus faecalis son cocos grampositivos que generalmente se disponen en pares y en cadenas cortas (Murray y cols., 2017), causante de infecciones nosocomiales, en tracto urinario, en heridas, en el sistema biliar y en sangre, siendo capaz de causar meningitis, bacteriemias en recién nacidos y endocarditis en adultos, tienen un carácter de alta importancia debido a la gran resistencia que tiene a los antibióticos (Brooks, Morse, Carroll, Mietzner y Butel, 2010).

Klebsiella pneumoniae, son bacilos gramnegativos que poseen una capsula predominante que confiere el aspecto mucoso y mayor virulencia, puede producir neumonía lobular y endocarditis (Murray y cols., 2017).

Escherichia coli es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo, fermentadores, oxidasa negativos. Poseen un lipopolisacárido que consiste

en un polisacárido externo somático O, un núcleo polisacárido (antígeno común) y el lípido A (endotoxina). Mayormente conocida por producir enfermedades gástricas (Tortora y cols., 2007).

Pseudomonas aeruginosa, son bacilos gramnegativos pequeños que se disponen habitualmente en parejas, son aerobio obligados; oxidador de la glucosa, posee una capsula mucoide de polisacáridos. Algunas de las enfermedades que puede causar incluyen infecciones respiratorias, urinarias, de piel y tejidos blandos, oculares, auditivos y también bacteriemias y endocarditis (Murray y cols., 2017).

Mecanismos de resistencia bacteriana

Las bacterias, por su tremenda capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. Existe una resistencia natural o intrínseca en las bacterias si carecen de diana para un antibiótico (como la falta de pared en el micoplasma en relación con los betalactámicos), y la resistencia adquirida que es la realmente importante desde un punto de vista clínico, esta es debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. En el primer caso, la resistencia se trasmite de forma vertical de generación en generación. En el segundo, la transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético movable como integrones y transposones; esto último no solo permite la transmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas (Tabla 1) (Fernández, López, Ponce y Machado, 2003).

Tabla 1. Mecanismos de resistencia desarrollados por bacterias

Sistema de expulsión activa del antimicrobiano	Una especie de bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que puede eliminar además muchos de estos agentes antibacteriano.
Disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana	Con la pérdida o modificación de los canales de entrada (porinas).
Producción de enzimas inactivantes	De esta forma son inhibidos los aminoglucósidos, el cloranfenicol por la acetiltransferasa, 7 y el caso más típico, el de la betalactamasas, para el grupo de los Betalactámicos.
Modificación de la proteína diana	Algunos antibióticos ejercen su acción contra las bacterias uniéndose a una proteína esencial para la supervivencia de estas. La resistencia se produce cuando el germen modifica la proteína diana, y cambia su función.

Tomado y modificado de Fernández y cols., 2003.

Una misma bacteria puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o muchos antibióticos y del mismo modo un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos de diversas especies bacterianas, todo lo cual complica de sobremanera el estudio de las resistencias de las bacterias a los distintos antibacterianos (Daza, 1998).

Antibióticos

Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva para nuestro organismo. El objetivo de la antibioticoterapia es controlar y disminuir el número de microorganismos viables, de modo que el sistema inmunológico sea capaz de eliminar la totalidad de los mismos, estos actúan de diferentes formas (Tabla 2 y 3), (Seija y Vignoli, 2006), estos se clasifican según el mecanismo de acción, inhibición de la síntesis de la pared celular, proteínas, ácidos nucleicos, actividad enzimática y los que alteran la integridad de la membrana (Tabla 4 al 7) (Chambers, 2003).

Tabla 2. Clasificación de acuerdo a la interacción de los fármacos

Bactericidas	Su acción es letal, llevando a la lisis bacteriana.
Bacteriostáticos	Impiden el desarrollo y multiplicación bacteriana, pero sin llegar a destruir las células. De hecho, cuando se retira el antibiótico, el microorganismo se puede multiplicar de nuevo.

Tomado y modificado de Seija y Vignoli, 2006.

Tabla 3. Clasificación según el espectro de acción

Amplio	Aquellos antibióticos que son activos sobre un amplio número de especies y géneros diferentes.
Reducidos	Antibióticos solo activos sobre un grupo reducido de especies.

Tomado y modificado de Seija y Vignoli, 2006

Tabla 4. Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción sobre la estructura bacteriana

I. Inhibición de la síntesis de la pared celular	Penicilinas, Cefalosporinas, Vancomicina, Fosfomicina, Tercoplanina, Bacitracina.
II. Lesión en la permeabilidad de la membrana celular	Colistinas, Nistatina.
III. Inhibición de la síntesis proteica	Cloranfenicol, Tetraciclina, Aminoglucósidos, Lincomicinas, Eritromicina.
IV. Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos	Quinolonas, Sulfonamidas, Rifampicina, Trimetropín.

Tomado y modificado de Jackson, Reyes y Hamilton, 1998

Tabla 5. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular

β -Lactámicos: Impiden la transpeptidación del peptidoglicano por unión del PBP (Proteínas ligadoras de penicilina que corresponde a enzimas transpeptidasas)	Carbapenémicos, Penicilinas, Cefalosporinas y Monobactámicos e Inhibidores de β -Lactamasa (1ª, 2ª, 3ª generación)
No β -Lactámicos: Inhiben enzimas biosintéticas	Fosfomicina: Bloquea la formación del ácido N-acetilmurámico.
	Cicloserina: inhibe la incorporación de D-alanil-D-alanina.
Los combinados con moléculas "Carrier"	Bacitracina: Se une al Bactoprenol (molécula lipídica de membrana que transporta las subunidades del peptidoglicano hacia la cara externa de la membrana).
Los combinados con sustratos de la pared	Vancomicina: Forma un complejo con los residuos de D-alanina, que impide la transferencia de los precursores desde el Carrier lipídico.

Tomado y modificado de: De la Rosa y Prieto, 2006; Prats, 2008.

Tabla 6. Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas

Actúan sobre la unidad 30S:	Aminoglucósidos: Estos se unen a la proteína S12 en la subunidad 30S del ribosoma bloqueando de esta manera la formación del complejo de iniciación, lo que hace que se produzca lectura errónea del mensaje, originando una proteína defectuosa y el resultado será la muerte de la bacteria.
	Tetraciclinas: Bloquean la inserción del aminocil-ARNt.
Actúan sobre la unidad 50S:	Cloranfenicol: Se une a la enzima peptidil transferasa inhibiendo la acción del enlace peptídico, de tal manera que detiene la síntesis de proteínas.
	Macrólidos y Lincosaminas: Inhiben la enzima peptidil transferasa y la translocación, deteniendo la síntesis de proteínas.

Tomado y modificado de: De la Rosa y Prieto, 2006; Prats, 2008.

Tabla 7. Antibióticos con función dependiente del sitio de acción

Antibióticos que Inhiben la Síntesis de ARN	Rifampicina: Se une a la ARN polimerasa bloqueando la síntesis del ARN mensajero (ARNm)
Antibióticos que inhiben la Síntesis de ADN mensajero (ADNm)	Quinolonas: Inhiben el ADN girasa.
Antibióticos que Inhiben la Actividad Enzimática	Sulfonamidas y Trimetoprim: Interfieren con el metabolismo del ácido fólico, que es un precursor de la síntesis de purinas, pirimidinas y aminoácidos. Se bloquea la síntesis de ácidos nucleicos y pared celular, asimismo las sulfonamidas inhiben la enzima dihidropteroato sintetasa y el Trimetoprim inhibe la enzima dihidrofolato reductasa.
Antibióticos que Alteran la Integridad de la Membrana	Polienos: Producen poros en la membrana. Polimixinas: Desorganizan la membrana citoplasmática

Tomado y modificado de: De la Rosa y Prieto, 2006; Prats, 2008.

Cepas de referencia

Las cepas de referencia son cultivos microbianos autenticados y bien caracterizados que se conservan y distribuyen por colecciones de cultivos reconocidas. Estas cepas actúan como patrones comparativos para diversos propósitos en microbiología, entre estos están la del control de calidad e

investigación, su importancia radica en la estandarización de métodos, garantizar la calidad de los datos obtenidos y promover la comparación de resultados entre laboratorios. Las American Type Culture Collection (ATCC) que son la colección de referencia internacional con una amplia variedad de cepas microbianas (Tabla 8), (Krieg, Holt y Bergey, 2010). Las cepas ATCC® básicas recomendadas por la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2020) para el método de difusión con disco son las siguientes:

Tabla 8. Cepas de referencia

Cepa de referencia	Nº ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25922
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 25923
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 27853
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 23357
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 29212

Tomado y modificado de www.clsi.org

Actividad antibacteriana

Se refiere a la presencia de cualquier agente que tiene la capacidad de interferir con el crecimiento y la actividad de las bacterias, si se describe a distintos grupos de microorganismos se emplean los términos antibacterianos o antifúngicos. El espectro de actividad antibacteriana comprende bacterias grampositivas y bacterias gramnegativas (Murray y cols., 2017).

La efectividad de la actividad antibacteriana de los extractos de plantas está directamente relacionada con la concentración y tipo de constituyentes activos presentes en la especie. Esta se logra observar debido a la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y taninos (Martínez y López, 2018).

Métodos para evaluar la actividad antibacteriana

La sensibilidad *in vitro* de las bacterias a los agentes antibacterianos se puede ensayar mediante varios métodos disponibles en el laboratorio y la intención de los mismos es evaluar cómo reacciona un microorganismo ante la presencia de un agente inhibitorio. Entre estos métodos se tienen:

- Prueba de difusión en agar (Prueba de Kirby - Bauer): El principio de esta técnica se basa en colocar un disco impregnado de antibiótico en agar, en el que previamente se ha inoculado la bacteria objeto de la prueba, el disco va a captar humedad y el antibiótico difunde radialmente hacia fuera a través del agar, produciendo un gradiente de concentración de antibiótico. Es empleada en patógenos aerobios o facultativos de crecimiento rápido y así ahorrar tiempo y medios de cultivo. Si el agente inhibe el crecimiento bacteriano, en torno al disco se forma un anillo claro. Cuanto más ancha es la zona que rodea al disco más sensible es el patógeno (Prescott y cols., 2004). Este método, aunque sencillo y fácil de realizar en los laboratorios de rutina brinda información cualitativa o semi-cuantitativa sobre la sensibilidad de un microorganismo a un antibiótico determinado, se puede decir que los resultados obtenidos son de gran valor clínico para iniciar, mantener o modificar una antibioticoterapia (Ramírez y cols., 2006).

- Pruebas de sensibilidad por dilución (Puede ser en caldo o en agar): Se emplea para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Letal (CML) se puede realizar tanto en agar como en tubo (Prescott y cols., 2004).
 - Prueba de Dilución en Tubo: Para esta prueba se prepara una serie de tubos de caldo de cultivo (comúnmente se utiliza caldo Müller-Hinton) que van a contener concentraciones de antibióticos entre 0,1 y 128 µg/mL y se inocula con cantidades estándar del microorganismo objeto de la prueba. La concentración mínima del antibiótico a la que no se produce crecimiento del microorganismo tras 16 a 20 horas de incubación es la CMI; mientras que la CML se puede determinar tras sub-cultivar los tubos que no muestren crecimiento en un medio nuevo desprovisto de antibiótico (Prescott y cols., 2004).
 - Prueba de Dilución en Agar: Es muy similar a la prueba de dilución en tubo. Se inoculan placas que contienen agar Müller-Hinton con diversas cantidades de antibiótico y se examina si se produce o no crecimiento (Prescott y cols., 2004).

Definición de operacional de términos

Termolábiles: Se refiere a una sustancia susceptible a la descomposición, destrucción o cambio debido al calor (Real Academia Española, 2023).

Fitoquímico: Un compuesto químico presente en las plantas. Son responsables de diversos aspectos como el color, sabor, aroma y propiedades medicinales (Nelson y Cox, 2017).

Metabolitos: Cualquier sustancia producida o utilizada durante el metabolismo, que es el conjunto de reacciones químicas que ocurren en un organismo vivo (Stryer, Berg y Tymoczko, 2018).

Bacteriemias: Presencia de bacterias en el torrente sanguíneo (Tortora y cols., 2007).

Patógeno: Agente infeccioso que puede originar enfermedades y malestar al organismo en el que se encuentre (Madigan y cols., 2004).

Concentración mínima inhibitoria: Mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba (Murray y cols., 2017).

Concentración mínima letal: Dosis más baja por la que una sustancia administrada produce la muerte de un individuo (Klaassen, 2019).

Operacionalización de las variables

Hernández, Fernández, y Baptista (2010), afirmaron que una variable es una propiedad que puede variar y cuya variación es susceptible de medirse. Por lo tanto, en el siguiente punto se establecen las variables a desarrollar en el proyecto de investigación (Tabla 9 y Tabla 10):

Tabla 9. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta*.

1- Variable	2- Tipo	3- Definición
Actividad antibacteriana de los extractos de <i>Eucalyptus pulverulenta</i>	Dependiente	Se refiere a la presencia de cualquier agente que tiene la capacidad de interferir con el crecimiento y la actividad de las bacterias (Murray y cols., 2017)
4- Definición operacional	5- Dimensiones	6- Indicador
Método de difusión en agar con disco (Método de Kirby Bauer)	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Sensible • Resistente • Se mide mm

Fuente: Figueira y Aparicio, 2024.

Tabla 10. Operacionalización de la variable independiente: Composición química de los extractos de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta*.

1- Variable	2- Tipo	3- Definición
Composición química de los extractos de <i>Eucalyptus pulverulenta</i> .	Independiente	Se refiere a la identificación y cuantificación de los componentes químicos de una sustancia (Domínguez, 1979).
4- Definición operacional	5- Dimensiones	6- Indicador
Tamizaje fitoquímico: Pruebas químicas de coloración o precipitación como resultado.	Presencia o ausencia de: -Alcaloides -Terpenos -Saponinas -Fenoles -Taninos -Flavonoides -Antraquinona -Quinonas -Cumarinas -Lactonas sesquiterpénicas -Glicósidos cardiotónicos	Precipitado Color azul o verde Espuma Color azul/negro Precipitado Color naranja Color rojo Color rojo Fluorescencia Color naranja o rojo oscuro Anillo marrón

Fuente: Figueira y Aparicio, 2024.

Hipótesis

Estudios previos del género *Eucalyptus*, perteneciente a la familia Myrtaceae, han reportado que poseen metabolitos secundarios con amplias actividades biológicas, es de esperarse que los extractos de *Eucalyptus pulverulenta* posean compuestos con actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

Hurtado en el año 2010, expone que su selección está íntimamente relacionada con el objetivo general, proveniente del enunciado holopráxico. Además, se toma en cuenta las variables y como están relacionadas entre sí, que tanto intervendrá el autor y los resultados que se desean obtener. En consecuencia, existen 10 tipos de investigación, siendo la exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. Entre ellas existe la investigación confirmatoria, que tiene como finalidad confirmar que se cumpla una o más hipótesis. Por ende, en esta investigación se confirmó la relación entre la composición química de los extractos de *Eucalyptus pulverulenta* y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional. Por lo que, considerando lo anteriormente expuesto, se definió esta investigación como confirmatoria.

Diseño de investigación

Se definió en base al procedimiento por el cual se recolectaron los datos, abarcando los aspectos operativos o experimentales de la investigación. Igualmente, está relacionado con el cómo, cuándo, cuánto y dónde se recolectarán los datos de investigación (Hurtado, 2010). En tal sentido, este trabajo de investigación tiene un diseño de campo y de laboratorio, contemporáneo, transversal y bivariable respectivamente. Es de campo y de laboratorio debido a que la muestra fue recolectada de fuentes vivas y procesada en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. También, es

contemporáneo, transversal y bivariable debido a que los datos se obtuvieron en la actualidad, solamente se recolectó la muestra una vez y posee tanto una variable dependiente como independiente.

Población y muestra

La unidad de investigación estuvo representada por la especie *Eucalyptus pulverulenta*.

Selección del tamaño de la muestra

La muestra se define como un subconjunto representativo y finito que proviene de la población (Arias, 2006). La “n” muestral fue representado por hojas de *Eucalyptus pulverulenta*. El tipo de muestra es no probabilística debido a que se desconoce los elementos que contiene la población y que integrarían la muestra (Arias, 2006).

Sistema de variables

Lo conformo la variable independiente: Composición química de los extractos de *Eucalyptus pulverulenta*; y la variable dependiente: La actividad antibacteriana de los extractos de *Eucalyptus pulverulenta*.

Instrumento de recolección de datos

Los resultados de la investigación fueron recolectados mediante el uso de fotografías referentes a las distintas reacciones observadas durante las pruebas para identificación de la composición química y actividad antibacteriana.

Procedimientos de la investigación

Recolección del material vegetal

Las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* fueron recolectadas en la calle Loma redonda, urbanización Santa María norte, quinta María Juncal, nº 0-63, en la ciudad de Mérida, Edo. Mérida

Preparación del material vegetal

Se tomaron 210 g y se llevó a sequedad en una estufa a 40 °C., el material vegetal seco y molido (174,91 g), se procedió a realizar la extracción mediante la técnica de reflujo, usando como solventes hexano y etanol, en cada caso se filtró para separar la fase sólida de la líquida, la fase líquida se llevo a rota vapor, esto para evaporar el hexano y etanol que había en exceso. Todo el procedimiento se realizó en el Laboratorio “A” de Productos Naturales, bajo la asesoría de la Dra. Rosa Aparicio y el auxiliar de laboratorio Emilio Salazar.

Análisis fitoquímico preliminar

Para determinar la presencia de los fitoquímicos en los extractos de *Eucalyptus pulverulenta* se llevó a cabo una serie de pruebas químicas cualitativas en el laboratorio “A” de productos naturales del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (IIFFB). Entre estas pruebas se encuentran:

Ensayo de Dragendorff, Mayer y Wagner (Alcaloides): Se tomó una alícuota del extracto y se disolvió en 10 mL de HCl al 5 %, se colocó en baño de maría para acidificar la solución, la solución se filtra y se dividió en tres tubos y luego se añaden 0,5 mL del reactivo correspondiente (Dragendorff,

Mayer, Wagner); el resultado es positivo si hay una presencia de un precipitado naranja, crema o marrón (Domínguez, 1979).

Ensayo de Liebermann - Burchard (Terpenos y/o Esteroides): se tomaron dos tubos de ensayos y se adicionaron pequeñas cantidades de los extractos y se adicionó 0,5 mL de solución clorofórmica anhidra, para luego añadir 0,5 mL de anhídrido acético y cuidadosamente por la pared del tubo una gota de ácido sulfúrico concentrado. Se consideró positiva la prueba si aparecen coloraciones rojas, verdes o azuladas (Domínguez, 1979).

Prueba de altura y estabilidad de espuma (Saponinas): En un tubo de ensayo se colocó una porción del extracto con agua, luego se agito vigorosamente y se observó si hay presencia de espuma a la altura de los ojos. Se considera positiva la prueba si la espuma alcanza una altura de 8 a 10 mm y se mantiene por 30 minutos (Domínguez, 1979).

Ensayo con FeCl_3 (Compuestos fenólicos): La muestra se disolvió en agua y se le adicionaron unas gotas de solución de cloruro de hierro (III) diluido. La formación de una coloración roja, azul, verde, o púrpura indica la presencia de fenoles (Domínguez, 1979).

Ensayo de gelatina al 1 % (Taninos): Se disolvió la muestra en agua y luego se adicionó una parte de esta en reactivo de gelatina. Si hay la formación de un precipitado blanco indica la presencia de taninos (Domínguez, 1979).

Ensayo de Shinoda (Flavonoides): Se procedió a tomar 1,0 mL de los extractos, luego se añadió algunas limaduras de magnesio (Mg) y se adicionó cuidadosamente por las paredes de los tubos unas gotas de HCl concentrado. La aparición de una coloración naranja o violeta, se considera la prueba como positiva (Domínguez, 1979).

Solubilidad en solución de hidróxido de sodio al 5 % (Quinonas y Antraquinonas): En dos tubos de ensayo, se colocó 10 mg de la muestra, 0,2 mL de etanol y 0,4 mL de una solución acuosa de hidróxido de sodio al 5 %. Si se observa formación de coloración roja, indica la positividad de la prueba (Domínguez, 1979).

Ensayo con hidróxido de amonio (Cumarinas): A una porción de los extractos se le adicionó, 0,5 mL de etanol y dos gotas de hidróxido de amonio concentrado. Se considera positiva la prueba si se presenta una fluorescencia azul-violeta bajo la luz UV (Domínguez, 1979).

Prueba para lactonas sesquiterpénicas: Se colocó 2 mg del extracto con una solución de hidróxido de sodio al 10 %, se formará un color amarillo o naranja que se pierde al adicionar una gota de ácido clorhídrico indicando la presencia del anillo lactónico y dando positiva la prueba (Domínguez, Monroy y Hernández, 2017).

Prueba de glicósidos cardiotónicos: Se preparó en un tubo de 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado; en otro tubo se colocó los extractos con 2,5 mL de agua, se adicionó 1 mL de ácido acético glacial y adicionar una gota de tricloruro férrico, se mezcló y se adicionó al tubo con ácido sulfúrico previamente preparado. La presencia de un anillo marrón indica positividad del ensayo (Domínguez y cols., 2017).

Evaluación de la actividad antibacteriana de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta*

La actividad se realizó por el método de difusión en agar con discos (Kirby – Bauer), frente a cepas de referencia internacional, en el laboratorio de Actinomicetos Dr. José A. Serrano de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo la asesoría de la Profesora Yndra Cordero y el Auxiliar de Laboratorio Emilio Salazar.

Cepas de referencia internacional

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Preparación de los discos

Se utilizaron discos de papel de filtro Whatmann n° 1, se organizaron en placas de Petri y se esterilizaron bajo luz ultravioleta (LUV) durante 24 horas previos al ensayo. Luego, se impregnaron con 10 µL del extracto a una concentración de 10 mg/mL.

Preparación de los Inóculos

Estos se prepararon a partir de un cultivo fresco de menos de 24 horas a una temperatura de 37 °C, luego en un tubo con solución salina, las cepas de referencia internacional se llevaron a una turbidez correspondiente al del patrón de McFarland N° 0,5 ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL, UFC: unidades formadoras de colonias) (Narváez, Gómez, Martínez, 2008).

Actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta*

Preparación de las placas de Petri

Se utilizó 20 mL de agar Müller-Hinton (HIMEDIA®) por placa (Clinical and Laboratory Standards Institute [NCCLS], 2020). Posteriormente las placas se dejaron solidificar a temperatura ambiente y se conservaron a 4 °C hasta su uso.

Preparación de los extractos

Tomando 10 mg de cada extracto, se disolvieron en 1 mL de hexano para el extracto obtenido con hexano y dimetilsulfoxido (DMSO) para el extracto con etanol.

Inoculación bacteriana

Se realizó mediante un hisopado en forma de colchón sobre el agar Müller - Hinton. Luego se colocó en la superficie los discos de papel de filtro previamente impregnados con los extractos a una concentración de 10 mg/mL, además, se colocaron los discos de eritromicina 15 µg, ampicilina 100 µg y piperacilina 10 µg para cada cepa como controles positivos y como controles negativos se utilizó hexano y DMSO ya que se utilizaron como solventes para reconstituir los extractos

Determinación de la actividad antibacteriana

Se llevo el agar Müller - Hinton previamente inoculado a incubación en una estufa por 24 horas a 37 °C en presencia de oxígeno. Posteriormente se midieron los halos de inhibición alrededor de los discos, expresando los datos en mm.

Diseño de análisis

Los datos que se recolectaron en esta investigación fueron analizados desde un punto de vista cuantitativo. Palella y Martins (2010), refirieron que un enfoque cuantitativo se debe cuando los datos se expresan en números y su análisis a través de operaciones matemáticas, siendo estudiadas las características que se midan según su naturaleza cuantitativa o cualitativa.

En tal sentido, las características cuantitativas de este trabajo son discretas, y a su vez tienen una escala de medida de intervalo y de razón. Por otro lado, las características cualitativas tienen una escala de medida nominal y ordinal.

El universo de esta investigación es representado por plantas dentro de la familia Myrtaceae. Así mismo, la población es representada por la especie vegetal *Eucalyptus pulverulenta*. Para finalizar, la muestra de este trabajo de investigación fueron las hojas de *Eucalyptus pulverulenta*.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* se obtuvieron mediante el método de extracción a reflujo y se observaron las siguientes características físicas (Tabla 11):

Tabla 11. Características físicas de los extractos de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta*

Extractos Hojas		
Características	Hexano	Etanol
Aspecto	Viscoso	Viscoso
Color	Negro	Negro
Olor	Característico	Característico
Peso del material seco	174,91 g	174,91 g
Peso del extracto	56,63 g	118,28 g
Rendimiento	32,37 %	76,65 %

Fuente Figueira y Aparicio, 2024.

Análisis fitoquímico del *Eucalyptus pulverulenta*

El análisis de fitoquímico de los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta*, se realizó mediante pruebas químicas cualitativas, para determinar la presencia de metabolitos secundarios se adicionaron diferentes reactivos químicos observándose reacciones de

coloración, precipitación, fluorescencia y producción de espuma. Los resultados se resumen a continuación (Tabla 12 y Figura 7).

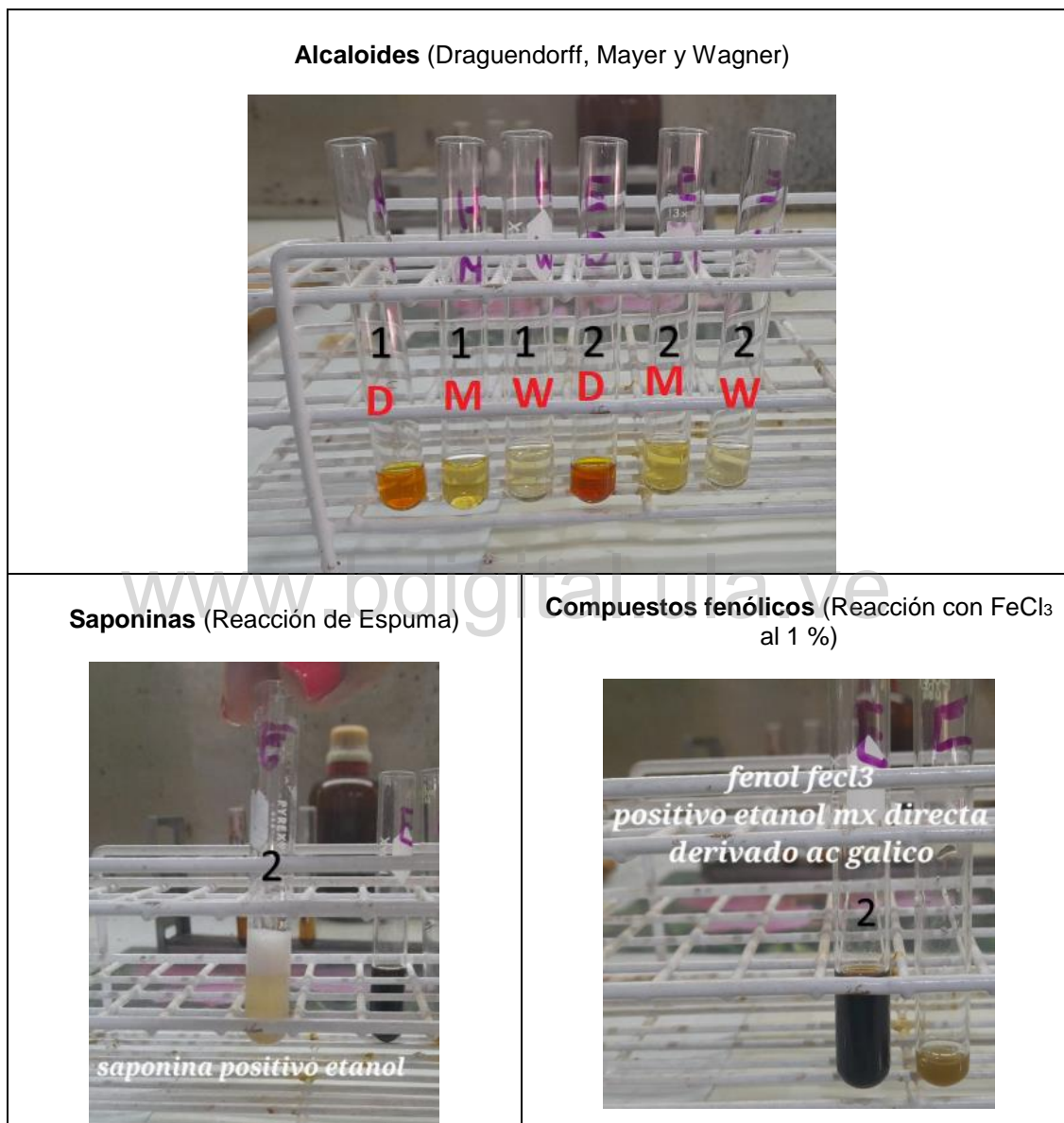
Tabla 12. Resultados del análisis fitoquímico de los extractos de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta*

Metabolitos	Pruebas	Extracto de hexano	Extracto de Etanol
Alcaloides	Mayer	-	-
	Dragendorff	-	-
	Wagner	-	-
Esteroles y Triterpenos	Reacción de Liebermann-Burchard	(Verde) +++	(Rojo) +++
Saponinas	Reacción de Espuma	-	+
Compuestos fenólicos	Reacción con FeCl ₃ al 1 %	-	(Negro) +++
Taninos	Reacción Gelatina 10 %	-	-
Flavonoides	Reacción de Shinoda	-	-
Quinonas y/o Antraquinonas	Reacción con NH ₄ OH	(Rojo) +	(Rojo) +
	Reacción con H ₂ SO ₄	-	-
Cumarinas	Reacción con NH ₄ OH conc.	-	-
Lactonas sesquiterpénicas	Reacción de Baljet	-	(decoloro de rojo a amarillo) +
Glicósidos cardiotónicos	Reacción de Keller-Killiani	-	-

+++ Abundante; ++ Moderado; + Bajo; - Negativo.

Fuente Figueira y Aparicio, 2024.

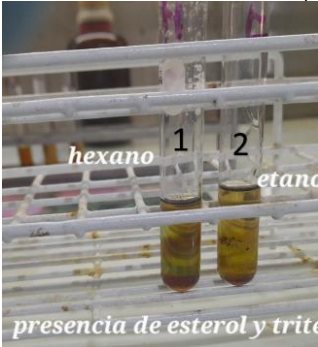
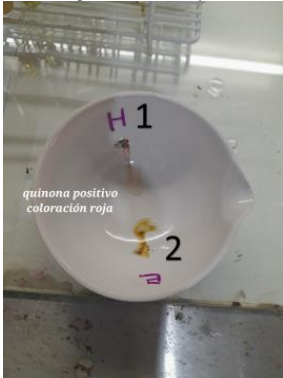



Figura 7. Análisis fitoquímico de los extractos de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta*



1: Extracto de hexano; 2: Extracto de etanol.

Fuente Figueira y Aparicio, 2024

Figura 7. Análisis fitoquímico de los extractos de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* (Continuación).

<p>Esteroles y Triterpenos (Reacción de Liebermann-Burchard)</p>  <p>hexano 1 2 etanol</p> <p>presencia de esterol y triterpenos</p>	<p>Quinonas y/o Antraquinonas (Reacción con NH_4OH)</p>  <p>quinona positivo coloración roja</p> <p>1 2</p>
<p>Cumarinas (Reacción con NH_4OH conc.)</p>  <p>1 2</p>	<p>Flavonoides (Reacción de Shinoda), NaOH 10 % negativo</p>  <p>1 1 2 2</p> <p>flavonoides</p>
<p>Lactonas sesquiterpénicas (Reacción de Baljet)</p>  <p>2 1 etanol</p> <p>lactonas positivo</p>	

1: Extracto de hexano; 2: Extracto de etanol.

Fuente Figueira y Aparicio, 2024

Actividad antibacteriana de *Eucalyptus pulverulenta*

Se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* en cepas de referencia internacional a través del método de difusión en agar con discos (Kirby – Bauer), utilizando agar Müeller-Hinton, con los procedimientos descritos anteriormente, obteniendo así los siguientes resultados (Tabla 13 y Figura 8).

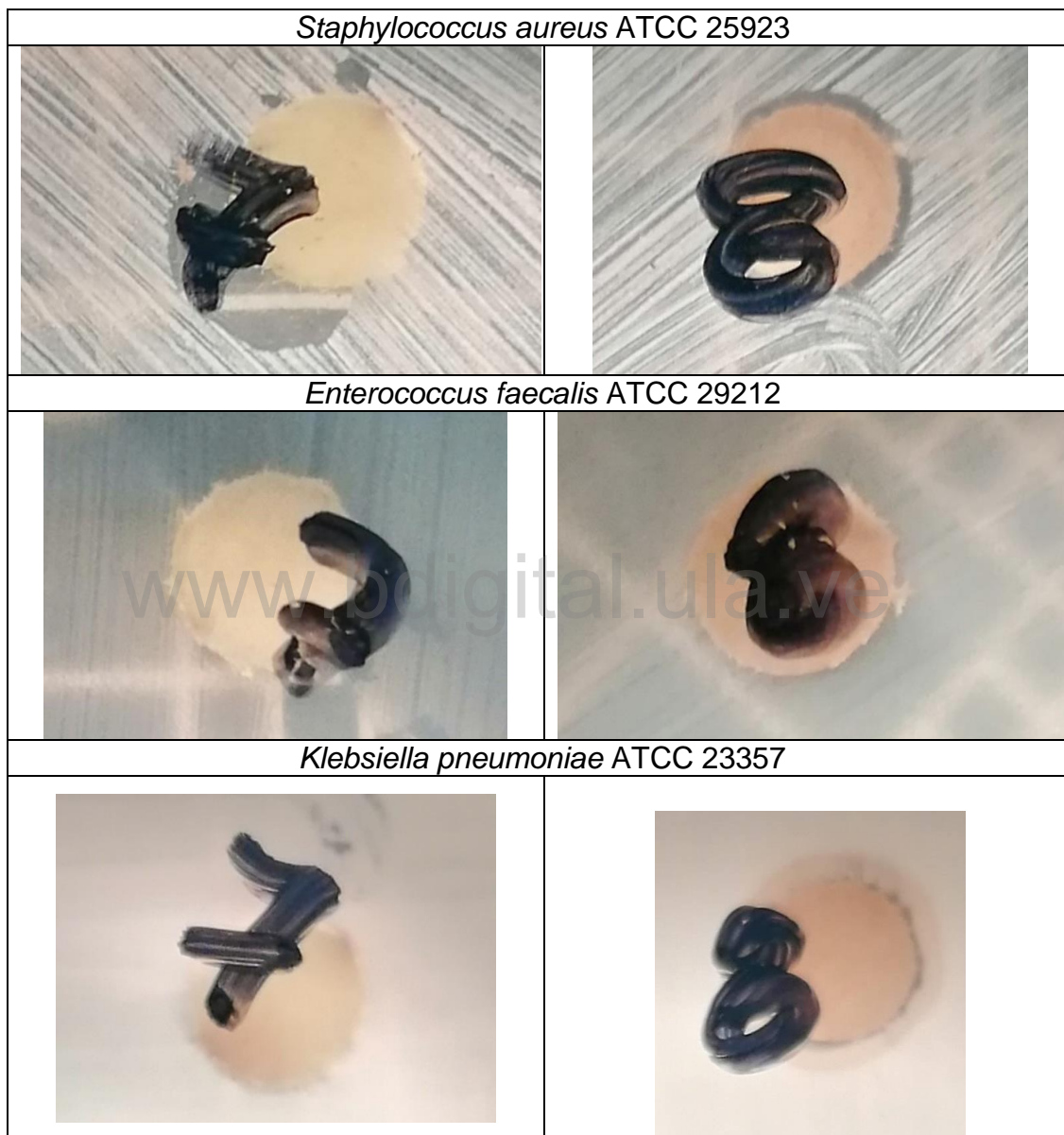
Tabla 13. Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* frente cepas de referencia internacional.

Halo de Inhibición (mm)							
Microorganismos	Extracto (10 mg/mL)		Controles				
	EPHHe	EPHEt	ERI	AMP	PIP	HEX	DMSO
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	7*	8*	32*	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	7*	-	32*	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	7*	8*	-	-	27*	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	7*	8*	-	-	27*	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	7*	-	-	27*	-	-

Legenda: EPHHe: *Eucalyptus pulverulenta* hojas hexano; EPHEt: *Eucalyptus pulverulenta* hojas etanol; ERI: Eritromicina® 15 µg; AMP: Ampicilina® 10 µg; PIP: Piperacilina® 100 µg; DMSO: Dimetilsulfoxido; HEX: hexano; mm: Milímetros

Fuente Figueira y Aparicio, 2024.

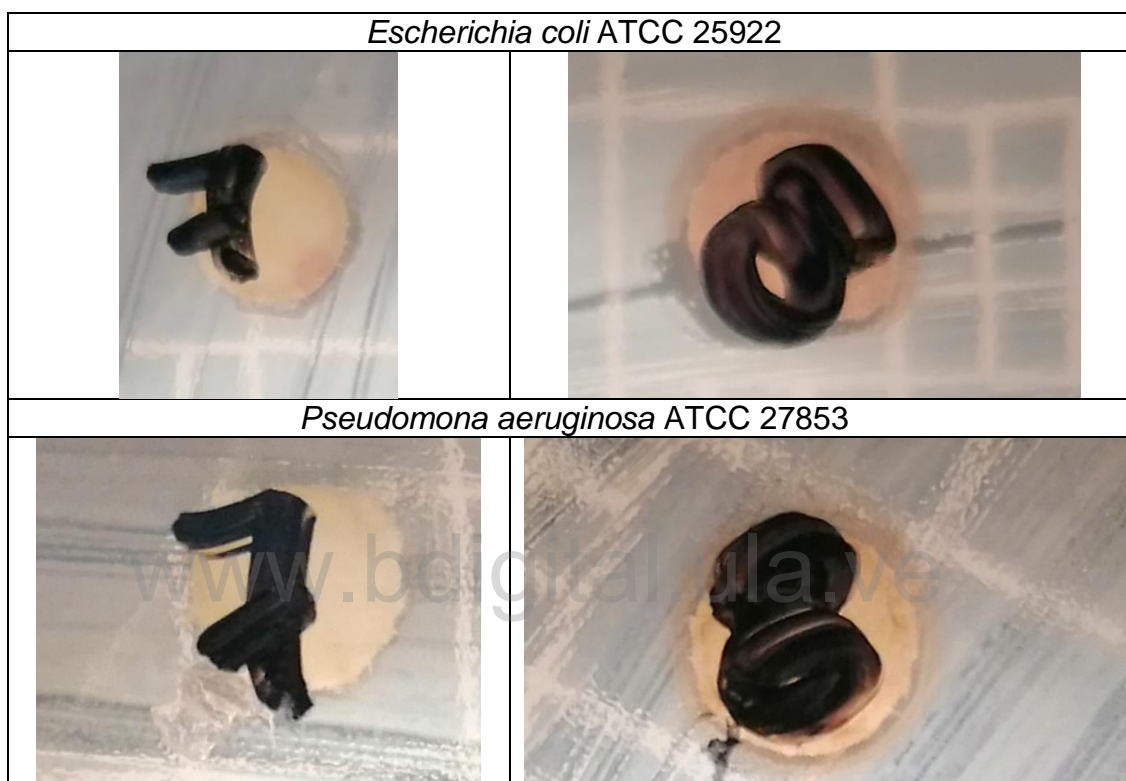
Figura 8. Actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* frente a cepas de referencia internacional.



7: Extracto de hexano; 8: Extracto de etanol.

Fuente Figueira y Aparicio, 2024.

Figura 9. Actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* frente a cepas de referencia internacional (continuación)



7: Extracto de hexano; **8:** Extracto de etanol.

Fuente Figueira y Aparicio, 2024.

Discusión

En la presente investigación se obtuvo como resultado del análisis fitoquímico que los extractos de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* poseen terpenos, esteroides, saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas y lactonas sesquiterpénicas, siendo el extracto de etanol el que presenta mayor presencia de metabolitos secundarios en comparación con el extracto de hexano (Tabla 12). Estos resultados fueron comparados con los realizados anteriormente por: Palma y cols. (2023), utilizaron la extracción por ultrasonido con etanol en hojas de *Eucalyptus globulus*, donde se obtuvo polifenoles y terpenos. El trabajo más similar de Kwansa y cols. (2023), reportaron en los extractos a una concentración de 0,1 g/mL de las hojas de *Eucalyptus grandis*, usando diferentes solventes (éter de petróleo, diclorometano y metanol), la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas y terpenoides. Por otra parte, Osipov, Koivuniemi, Mizina y Salminen (2020), por medio de la maceración con etanol para la obtención del extracto de las hojas de *Eucalyptus viminalis*, se reportaron compuestos fenólicos y terpénicos, al hacer la comparación de los resultados de estos estudios se llega a concluir que los resultados de la investigación se asemejan a los reportados anteriormente.

En cuanto a la actividad antibacteriana, los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* fueron analizados para medir su respuesta ante bacterias mediante el método de difusión en agar con discos a una concentración de 10 mg/mL, con halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* (Hex: 7 mm y EtOH 8 mm), *Enterococcus faecalis* (Hex: No hubo actividad y 7 mm con etanol), *Klebsiella pneumoniae* (Hex: 7 mm y EtOH 8 mm), *Escherichia coli* (Hex: 7 mm y EtOH: 8 mm) *Pseudomonas aeruginosa* (Hex: no presenta actividad y EtOH: 7 mm) (Tabla 13), al compararlos con el trabajo de Kwansa y cols. (2023), reportaron con

los extractos de éter de petróleo, diclorometano y metanol, de las hojas de *Eucalyptus grandis*, por medio del método de difusión en agar con disco (Kirby – Bauer), actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus* resistente a la meticilina (24,44 mm, 16,67 mm, 17,67 mm respectivamente), *Escherichia coli* (20,33 mm, 15,67 mm, 17,33 mm respectivamente) y *Pseudomonas aeruginosa* (halos de 19,33 mm, 14,33 mm, 16,33 mm respectivamente). Por otra parte, Sukhikh y cols. (2022), con el extracto obtenido empleando ultrasonido y maceración con etanol, de las hojas de *Eucalyptus globulus*, por el método de difusión en agar con disco (Kirby – Bauer), donde se tomaron alícuotas a diferentes tiempos en minutos (10, 15, 20, 25, 30) reportaron que hubo actividad antibacteriana, esta se visualizó por el halo de inhibición, frente a *Bacillus subtilis* usando ultrasonido (10 mm, 11 mm, 10 mm, 9 mm, 10 mm respectivamente) y maceración (10 y 15 min no hubo actividad, 9 mm a 20 min y 7 mm a 25 y 30 min), *Pseudomonas aeruginosa* con ultrasonido (a 10 y 15 min no hubo actividad, 13 mm a 20 min , 11 mm a 25 y 30 min) y maceración (11 mm, 13 mm, 14 mm, 10 mm y 7 mm respectivamente), *Candida albicans* con ultrasonido (12,5 mm , 9,5 mm, 12,5 mm, 15,5 mm y 11 mm respectivamente) y maceración (10,5 mm, 8,5 mm, 7,5 mm, 8,5 mm, 8,5 mm respectivamente). Además, en el trabajo de Villacrés y Barreto (2022), reportó que los extractos acuosos de las hojas de *Eucalyptus globulus* y la corteza de *Cinnamomun zeylanicum* a diferentes concentraciones (600 mg/mL, 700 mg/mL y 800 mg/mL), presento actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* (15,33 mm, 15,16 mm y 15,66 mm para las hojas de *Eucalyptus globulus* y 8 mm, 9 mm y 9 mm para la corteza de *Cinnamomun zeylanicum*), *Enterococcus faecalis* (15 mm, 15,33 mm, 16,33 mm para las hojas de *Eucalyptus globulus* y 16,16 mm, 12 mm, 11 mm para la corteza de *Cinnamomun zeylanicum*) y *Staphylococcus aureus* (14,66 mm, 14,66 mm, 15 mm para las hojas de *Eucalyptus globulus* y 10 mm, 13 mm y 12,50 mm para la corteza de *Cinnamomun zeylanicum*).

La composición química de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* es similar a diferentes especies en muchos países, pero la presencia o ausencia de diferentes metabolitos secundarios se debe en gran medida a que se usaron diferentes solventes en algunos casos, donde al tener polaridades distintas pudo afectar los resultados, además de las distintas condiciones climatológicas, altitud y calidad de suelos donde se encontraban estas plantas (Li, Li, Zhang, Wang y Zhou, 2013).

Finalmente, es de notar que el extracto de hexano obtenido de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* no presento actividad frente a *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*, esto pudo ser debido a que los metabolitos secundarios son apolares y no tienen la capacidad de penetrar la membrana de las bacterias mientras que el extracto con etanol debido a la polaridad presente en sus metabolitos logro penetrar la membrana de las bacterias, presentando actividad frente a todas las cepas de referencia utilizadas, se llega a concluir que los extractos de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* presentan actividad antibacteriana (Domingo y López, 2003).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

El análisis fitoquímico de los extractos de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* reveló la presencia de esteroides, terpenos y quinonas en el extracto de hexano, mientras que en el de etanol hubo esteroides, terpenos, saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, lactonas sesquiterpénicas.

Los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* a una concentración de 10 mg/mL mostraron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (Hex: 7 mm y EtOH: 8 mm), *Enterococcus faecalis* (EtOH: 7 mm), *Klebsiella pneumoniae* (Hex: 7 mm y EtOH: 8 mm), *Escherichia coli* (Hex: 7 mm y EtOH: 8 mm) y *Pseudomonas aeruginosa* (EtOH: 7 mm).

Las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* contienen distintos metabolitos secundarios de interés, además de una amplia actividad antibacteriana, siendo una especie vegetal de interés farmacéutico.

Este es el primer reporte de la actividad antibacteriana y composición química de las hojas de *Eucalyptus pulverulenta* del estado Mérida-Venezuela.

El aislamiento y/o síntesis de los metabolitos secundarios ampliarían el espectro de sustancias que pueden ser potenciales candidatos para el desarrollo de nuevos fármacos. Por lo tanto, se requieren de antimicrobianos con concentraciones inhibitorias lo suficientemente bajas, toxicidad mínima y

biodisponibilidad fácil para un uso eficiente y seguro en humanos con infecciones por patógenos farmacorresistentes (Gonzales y cols., 2023)

www.bdigital.ula.ve

Recomendaciones

Realizar el análisis fitoquímico con otros solventes que presenten mayor polaridad a fin de apreciar posibles nuevos metabolitos secundarios presentes.

Aislar y evaluar la actividad antimicrobiana de cada metabolito secundario encontrado para determinar el responsable de dicha actividad.

Utilizar diferentes partes de la especie tallos, raíces, frutos y flores para determinación de metabolitos secundarios.

Determinar la concentración mínima de cada uno de los extractos de *Eucalyptus pulverulenta*.

Evaluar otras actividades como antifúngica, antiparasitaria, antioxidante, actividad antagonista frente malaria, FPS, entre otros.

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Albornoz, A. (2001). Medicina Tradicional Herbaria. Caracas-Venezuela: Instituto Farmacoterápico Latino S.A.
- Arango, J. (2008). Alcaloides y compuestos nitrogenados. Universidad de Antioquía.
- Arévalo, A y Enciso, R. (1996). Determinación de la actividad antimicrobiana (bacterias, hongos y levaduras) de algunas especies de *Espeletias* encontradas en el páramo de Guasca. Trabajo de Pregrado. Bogotá D.C., Universidad Javeriana.
- Arias, F. (2006). El Proyecto de Investigación. Introducción a la metodología científica. Caracas, Venezuela: Editorial Episteme, C.A.
- Ávalos, A y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca. Biología, Serie Fisiología Vegetal, 2(3), 119-145.
- Barrese, Y., Hernández, M y García, O. (2005). Desarrollo de una técnica analítica para cuantificar las antraquinonas presentes en la *Senna alata* (L.) Roxb. (*Guacamaya francesa*). Revista Cubana de Plantas Medicinales, 10(3-4).
- Bravi, S y del Valle, E. (2021). Revisión de constituyentes químicos y propiedades biológicas en especies del género *Eugenia* (Myrtaceae). Dominguezia, 37(1), 5–19.
- Brooks, G., Carroll. K., Butel, J., Morse, S y Mietzner, T. (2010) Medical Microbiology. Jawetz, Melnick and Adelbergs, 25th Edition, McGraw-Hill companies.
- Cabello, M y Belloso, G. (2009). Comparación de dos equipos de extracción por reflujo en la actividad antibacteriana de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de *Piper nigrum* L. Revista Científica UDO Agrícola, 9(3), 705-710.

- Carbay, L. (2023). Uso de extracto alcohólico de las plantas tomillo (*Thymus vulgaris*), guayaba (*Psidium guajava*) y eucalipto (*Eucalyptus melliodora*) frente a la vibriosis en acuicultura. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 7(1), 179-190.
- Cascaes, M., Guilhon, G., Andrade, E., Zoghbi, M y Santos, L. (2015). Constituyentes y actividades farmacológicas de Myrcia (Myrtaceae): Una revisión de un grupo de plantas aromáticas y medicinales. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 23881-23904.
- Castillo, G., Zavala, D y Carrillo, L. (2017). Análisis fitoquímico: Una herramienta para develar el potencial biológico y farmacológico de las plantas. *Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. México.* (24),71-86.
- Chambers, H. (2003) Antimicrobianos, consideraciones generales. En Hardman, J. y Limbird, L. (eds). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. México, D.F.: McGraw-Hill.
- Daza, R. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Revista Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 22(3), 57-67.
- De la Rosa, M y Prieto, J. (2006). *Microbiología en ciencias de la salud, conceptos y aplicaciones*. Madrid: ELSEVIER España S.A.
- Domingo, D y López, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(4), 385-393.
- Domínguez M., Monroy I. y Hernández V. (2017). Caracterización Fitoquímica de *Samanea saman* (Jacq) Merr. (Algarrobo). *Revista Cubana de Ciencias Forestales*, 5(1): 49-61.
- Domínguez, X. (1979). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. México. Editorial Limusa.
- Duarte, A., Jiménez, J., Pineda, J., González, C y García, M. (2020). Extracción de sustancias bioactivas de *Pleurotus ostreatus*

- (Pleurotaceae) por maceración dinámica. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), 61-74.
- FAO. (1981). El eucalipto en la repoblación forestal. Roma, Italia. Editorial Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Fernández, F., López, J., Ponce, L. y Machado, C. (2003). Resistencia Bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32(1), 44-48.
- Fonnegra, G y Jiménez, R. (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia (2. ed.). Medellín, Colombia. Editorial Universidad de Antioquia.
- Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de la Facultad de Medicina*, 77(4), 327-332.
- Gonzalez, R., Carrera, S., Zúñiga, J., Rodríguez, C., Mayorga, A., Guamán, L., Barba, C. (2023). Current Landscape of Methods to Evaluate Antimicrobial Activity of Natural Extracts. *Molecule*. 28(1068): 1-25.
- Granados, D y López, G. (2007). Fitogeografía y ecología del género *Eucalyptus*. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 13(2), 143-152.
- Guerra, V., Padilla, E y Guerrero, M. (2016). La medicina natural y tradicional y su relación con las ciencias básicas. *Educación Médica*, 34(3), 26-32.
- Hernández, S., Fernández, C y Baptista, L. (2010). Metodología de la investigación (5a edición). México: Editorial Mc Graw Hill education.
- Hurtado, J. (2010). Metodología de la Investigación Holística Guía para la comprensión holística de la ciencia. (3a edición). Ediciones Quirón S.A. Cooperativa Editorial Magisterio: Bogotá, Colombia.
- Jackson, L., Reyes, L y Hamilton, M. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica*, 8(1), 13-27.

- Klaassen, C. (2019). Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons (9th Edition). McGraw-Hill Education.
- Krieg, N., Holt, J y Bergey, D. (Eds.). (2010). Bergey's manual of systematic bacteriology (2nd ed., Vol. 1-5). New York: Springer.
- Kwansa, B., Okine, B., Dayie, A., Tetteh, P., Kotey, F., Donkor, E y Dayie, T. (2023) *In Vitro* effects of petroleum ether, dichloromethane, methanolic and aqueous leaf extracts of *Eucalyptus grandis* on selected multidrug-resistant bacteria. PLoS ONE 18(3): e0283706.
- L'Heritier, C. (1788). Sertum Anglicum, seu, Plantae rariores quae in hortis juxta Londinum: imprimis in horto regio Kewensi excoluntur, ab anno 1786 ad annum 1787 observatae. Londini: Typis Petri Francisci Didot.
- Li, X., Li, S., Zhang, Y., Wang, H y Zhou, G. (2013). Influence of altitude and climate on the chemical composition of alcoholic extracts from *Melaleuca quinquenervia* (F. Muell.) Domin leaves. PLoS One, 8(12), e82719.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J y Brock, T. (2004) Biología de los microorganismos. 8ª edición, Prentice Hall, Madrid, España.
- Maguiña, V. (2016). Infecciones nosocomiales. Acta medica peruana. 33(3):175.
- Marcano, D y Hasegawa, M. (2018). Fitoquímica orgánica, Editorial Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico – Universidad Central de Venezuela, 3ra edición, Venezuela.
- Marchese, A., Arciola, C., Barbieri, R., Silva, A., Nabavi, S., Tsetegho, A., Izadi, M., Jafari, N., Suntar, I., Daglia, M y Nabavi, S. (2017). Update on Monoterpenes as Antimicrobial Agents: A Particular Focus on *p*-Cymene. Materials. Basel, Switzerland. 10(8), 947.
- Martínez, J y López, R. (2018). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos frescos de hojas de *Morus alba* L. contra bacterias patógenas. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 23(3), 393-402.

- Martínez, M., Valencia, P., Jiménez, U., Mesa, M y Galeano, J. (2008). Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica 2008. Universidad de Antioquia, Facultad de Química Farmacéutica, Departamento de Farmacia. Medellín, Colombia.
- Merchán, O., Gómez, A y Vélez, C. (2005). Identificación cualitativa de carbohidratos. Laboratorio de Bioquímica.
- Mesa, A. (2017). Una visión histórica en el desarrollo de fármacos a partir de productos naturales. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 48(3), 16-27.
- Morales, J. (2023). El eucalipto baby blue: un árbol ornamental y útil. Infojardín, 25(3), 18.
- Murray, P., Rosenthal, K y Pfaller, M. (2017) Microbiología médica. Editorial ELSEVIER. 8^{va} edición. Barcelona, España.
- Narváez, S., Gómez, L y Martínez, M. (2008). Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aislados a partir de sedimentos del Caribe Colombiano. Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras - INVEMAR. 37(1). 61-75.
- Nelson, D y Cox, M. (2017). Lehninger principles of biochemistry (7th ed.). New York: W. H. Freeman and Company.
- Núñez, C y Valladares, L. (2001). Actividad antibacteriana de extractos de plantas medicinales sobre bacterias Gram negativas. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 6(2), 82-86.
- Ossipov, V., Koivuniemi, A., Mizina, P y Salminen, J. (2020). UPLC-PDA-Q Exactive Orbitrap-MS profiling of the lipophilic compounds product isolated from *Eucalyptus viminalis* plants. Heliyon, 6(12), e05768.
- Pachay J. (2018). Las Infecciones Bacterianas y su Resistencia a los Antibióticos. Caso de Estudio: Hospital Oncológico “Dr. Julio Villacreces Colmont Solca”, Portoviejo. Universidad y Sociedad, 10(5): 219-223.

- Palacios, M. (2013). Texto digital de Farmacognosia y Fitoquímica. Chimbote: Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. Chimbote. Perú.
- Palella, S y Martins, F. (2010). Metodología para un estudio cuantitativo. 3a edición. Editorial Fedupel. Caracas – Venezuela.
- Palma, A., Ruiz, M., Díaz, M., Giráldez, I y Morales, E. (2023). Optimization of bioactive compounds by ultrasound extraction and gas chromatography-mass spectrometry in fast-growing leaves. *Microchemical Journal*, 193, 109231.
- Paredes, F y Roca J. (2004). Acción de los Antibióticos: Perspectiva de la Medicación Antimicrobiana. *Offarm: Farmacia y Sociedad*, 23(3): 116-124.
- Parra, C. (2014). Sinopsis de la familia Myrtaceae y clave para la identificación de los géneros nativos e introducidos en Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 38(148), 261-327.
- Prashant, T., Bimlesh, K., Mandeep, K., Gurpreet, K y Harleen, K. (2011). Phytochemical screening and extraction. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 1(1): 98-106.
- Prats, G. (2008). Microbiología clínica. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- Prescott, L., Harley, J y Klein, D. (2004). Microbiología (5ª ed.). Madrid: McGraw-Hill Interamericana. España.
- Ramírez, A., García, E., Longa, A., Sánchez, K., Nieves, M., Velasco, J., Araque, M y Moqueda, N. (2006). Manual práctico de bacteriología general. Mérida, Venezuela: Publicaciones vicerrectorado Académico CODEPRE.
- Real Academia Española. (2023). Diccionario de la lengua española (24.^a ed.). Madrid, España.

- Rodríguez, A., Delgado, M., Mora, R., González, Y y Guardia, A. (2006). Infección hospitalaria. Resistencia bacteriana *in vitro* a los antimicrobianos en uso de instituciones de salud de Ciudad de la Habana durante el año 2003. Revista Mexicana de Patología Clínica, 53(1), 46-51.
- Romeu, B., Salazar, P., Lugo, D., Rojas, N. y Eslava, C. (2012) Susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *Escherichia coli* procedentes de ecosistemas dulceacuicolas. Revista Cubana de Medicina Tropical, 64:132-141.
- Seija, V y Vignoli, R. (2006). Tema de bacteriología y virología médica. Principales grupos de antibióticos. FEMUR, 2^{da} edición, Montevideo, Uruguay.
- Sims, J. (1819). *Eucalyptus pulverulenta*. Heart-leaved Eucalyptus. Botanical Magazine 46: t. 2087.
- Stryer, L. W., Berg, J. M y Tymoczko, J. L. (2018). Bioquímica (7^a ed.). New York: W. H. Freeman and Company.
- Sukhikh, S., Ivanova, S., Babich, O., Larina, V., Krol, O., Prosekov, A., Popov, A y Kriger, O. (2022). Antimicrobial screening and fungicidal properties of *Eucalyptus globulus* ultrasonic extracts. Plants (Basel), 11(11), 1441.
- Teixeira, G., Pereira, K y Pasqualotto, V. (2021), Ethnobotanical and ethnopharmacological survey of medicinal species utilized in the Coqueiros Community, Brazil, Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 21 (6): 671 - 715.
- Tortora, G., Funke, B y Case, C. (2007) Introducción a la microbiología. 9^{na} edición. Editorial medica panamericana. Madrid, España.
- Uriol, D y Espinoza, M. (2021). Actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de frutos de “aguaymanto” (*Physalis peruviana* L.) y

de hojas de “eucalipto” (*Eucalyptus globulus* Labill.) frente a *Staphylococcus aureus*. Arnaldoa, 28(1), 115-124.

Vega y Ortega R. (2016). Ciencia y ambiente en la aclimatación del eucalipto en el Valle de México a través de la prensa, 1869-1880. *Historia y Sociedad*, 30, 237-264.

Villacrés, J y Barreto, C. (2022). Actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos acuosos de *Eucalyptus globulus* Labill. y *Cinnamomum zeylanicum* Blume sobre *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. *Rev Peru Med Integrativa*. 7(1):22-27.

www.bdigital.ula.ve