



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
“DR. ALFREDO NICOLÁS USUBILLA DEL HIERRO”



**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS  
EXTRACTOS DE LAS SEMILLAS DE *Pouteria sapota***

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

**www.bdigital.uia.ve**

**Tesistas:**

Ronald Adrián Lemus Debia.

CI: 20.395.425

Pedro David Pereira Vergara.

CI: 25.154.543

**Tutor:**

Prof. Joel Lara

Mérida, Julio de 2024

## **DEDICATORIA**

Agradezco primeramente a Dios, pues sin su presencia no se pueden lograr las grandes cosas en la vida, él es la brújula que me guía día tras día. Gracias por todo Señor.

A mi madre que me da la confianza necesaria para poder luchar y poder seguir adelante sin importar las adversidades con las que nos encontramos.

A mis hermanos que son mi fuente de inspiración.

***Ronald***

Agradezco primeramente a Dios por ser mi roca y mi refugio en los tiempos de dificultad y que me ha sostenido a lo largo de toda mi carrera universitaria. Gracias señor gracias.

Quiero darles las gracias a mis padres por siempre estar pendientes de mí durante todos estos años, por haberme ayudado a llegar a esta etapa de mi vida y poder alcanzar esta meta.

A mi familia, sobre todo a mi abuelo, tus palabras de aliento y tus consejos sabios han sido mi brújula en este viaje académico. Tu apoyo incondicional y tu fe en mí han sido un impulso constante para alcanzar mis metas.

***Pedro***

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de Los Andes y a nuestra casa de estudio la Facultad de Farmacia y Bioanálisis por ser parte de nuestra formación académica durante todo este tiempo y darnos todo lo necesario y requerido para poder llevar a cabo este trabajo de investigación.

A nuestro tutor, profesor Joel Lara por el apoyo durante el proceso de investigación para culminar con éxito nuestra tesis.

A las profesoras, Clara Díaz y Rosa Aparicio por su orientación, asesoramiento y colaboración para lograr cada objetivo de nuestro trabajo de investigación.

Al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” por permitirnos realizar nuestro trabajo de investigación.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
Índice de Tablas.....	vii
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Esquema.....	xi
Resumen.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....</b>	<b>5</b>
Planteamiento del Problema.....	5
Justificación e Importancia de la Investigación.....	7
Objetivo de la Investigación .....	9
<i>Objetivo General</i> .....	9
<i>Objetivos Específicos</i> .....	9
Alcances y Limitaciones.....	9
<i>Alcances de la Investigación</i> .....	9
<i>Limitaciones de la Investigación</i> .....	10
<b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>11</b>
Trabajos Previos.....	11
Antecedentes Históricos.....	16
Bases Teóricas.....	19
<i>Familia Sapotaceae</i> .....	19
<i>Género Pouteria</i> .....	21
<i>Especie Pouteria Sapota</i> .....	22
<i>Productos Naturales</i> .....	27
<i>Extractos Vegetales</i> .....	38
<i>Análisis Fitoquímico Preliminar</i> .....	44
<i>Hongos</i> .....	49

## ÍNDICE DE CONTENIDO (Continuación)

<i>Actividad Antifúngica</i> .....	54
Definición Operacional de Términos.....	65
Operacionalización de las Variables.....	66
Hipótesis.....	69
<b>CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO</b> .....	70
Tipo de Investigación.....	70
Diseño de Investigación .....	70
Población y Muestra.....	71
<i>Unidad de Investigación</i> .....	71
<i>Selección del Tamaño de la Muestra</i> .....	71
Sistema de Variables.....	71
Instrumento de Recolección de Datos.....	72
Procedimiento de la Investigación.....	72
Diseño de Análisis .....	83
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES</b> .....	84
Resultados .....	84
<i>Tamizaje Fitoquímico</i> .....	85
Actividad Antifúngica.....	94
Discusiones.....	97
<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	100
Conclusiones.....	100
Recomendaciones.....	102
<b>REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS</b> .....	103

## ÍNDICE DE TABLAS

Nº de Tabla		Pág.
1	Taxonomía de <i>Pouteria sapota</i> .....	23
2	Clasificación de los antifúngicos.....	58
3	Clasificación de los antifúngicos por su sitio de acción en el hongo.....	59
4	Operacionalización de la variable dependiente. Actividad antifúngica de los extractos de hexano y metanol de las semillas de <i>Pouteria sapota</i> .....	67
5	Operacionalización de la variable independiente. Composición química de los extractos de hexano y metanol de las semillas de <i>Potería</i> .....	68
6	Características físicas del extracto de hexano y de metanol de las semillas de <i>Pouteria sapota</i> .....	84
7	Resultados obtenidos del porcentaje de rendimiento (hexano y metanol ).....	85
8	Resultado del tamizaje fitoquímico de las semillas de <i>Pouteria sapota</i> .....	86
9	Resultados de actividad antifúngica del extracto de las semillas de <i>Pouteria sapota</i> .....	95

## ÍNDICE DE FIGURAS

Nº de Figura	Pág.
1 Estructura química de la morfina.....	29
2 Estructura química de las saponinas esteroidales.....	32
3 Estructura química del fenol.....	34
4 Estructura química de umbeliferona.....	36
5 Equipo de reflujo.....	41
6 Percolador.....	43
7 Equipo Soxhlet.....	44
8 Formación de los complejos insolubles por reacción de los alcaloides con los metales pesados utilizados en los ensayos de precipitación.....	45
9 Reacción de formación de complejos coloreados de un compuesto fenólico con una sal de hierro III.....	46
10 Sistema benzopirona.....	47
11 Vaucher de la muestra de <i>Pouteria sapota</i> .....	73
12 Extracción por reflujo.....	75
13 Proceso de filtrado.....	75
14 Rotavapor.....	75
15 Extracto de hexano .....	75
16 Extracto de metanol.....	76
17 Resultado de las pruebas Drangendorff, Wagner y Mayer para la detección de alcaloides.....	87
18 Resultado del ensayo de Liebermann- Burchard para la detección de triterpenos/esteroles.....	88

## ÍNDICE DE FIGURAS

### (Continuación)

<b>19</b>	Resultado de la prueba de altura y estabilidad de espuma para la detección de saponinas.....	89
<b>20</b>	Resultado de la prueba de gelatina al 1 %.....	89
<b>21</b>	Resultado del ensayo de $\text{FeCl}_3$ para la detección de compuestos fenólicos.....	90
<b>22</b>	Resultado del ensayo de shinoda para la detección de flavonoides.....	90
<b>23</b>	Resultado de la prueba confirmatoria de NaOH al 10 % para la detección de flavonoides.....	91
<b>24</b>	Resultado de la prueba de reacción de $\text{NH}_4\text{OH}$ para la detección de antraquinonas.....	91
<b>25</b>	Resultado de la prueba de reacción de $\text{NH}_4\text{OH}$ concentrado para la detección de cumarinas.....	92
<b>26</b>	Resultado de la prueba de reacción de $\text{H}_2\text{SO}_4$ para la detección de quinonas.....	93
<b>27</b>	Resultado de la prueba de reacción de NaOH al 10 % con HCl para la detección de lactonas sesquiterpenos.....	93
<b>28</b>	Resultado de la prueba Keller-Killiani para la detección de glucósidos cardiotónicos.....	94
<b>29</b>	Crecimiento de <i>Candida albicans</i> y <i>Candida krusei</i> .....	96
<b>30</b>	Ensayo con el extracto de hexano en <i>Candida albicans</i> .....	96
<b>31</b>	Ensayo con el extracto de hexano en <i>Candida krusei</i> .....	96
<b>32</b>	Ensayo con el extracto de (Dimetilsulfoxido) en <i>Candida albicans</i> .....	96

**ÍNDICE DE FIGURAS**  
**(Continuación)**

<b>33</b>	Ensayo con el extracto de (Dimetilsulfoxido) en <i>Candida krusei</i> .....	96
-----------	---	----

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## **ÍNDICE DE ESQUEMA**

<b>Nº de esquema</b>		<b>Pág.</b>
1	Proceso para la obtención de extractos.....	76

**www.bdigital.ula.ve**



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
“DR. ALFREDO NICOLÁS USUBILLAGA DEL HIERRO”



**Actividad antifúngica y tamizaje fitoquímico de los extractos de las semillas de *Pouteria sapota***

**Tesistas:**

Ronald Adrián Lemus Debía

C.I: V-20.395.425

Pedro David Pereira Vergara

C.I: V-25.154.543

**Tutor:** Prof Joel Lara

**RESUMEN**

*Pouteria sapota*, comúnmente llamado sapote mamey, se considera como una especie rica en propiedades curativas, por lo tanto, ha sido objeto de estudio a lo largo de la historia. Esta investigación tuvo como objetivo general, Confirmar la relación entre la composición química y la actividad antifúngica de los extractos de las semillas de la especie *Pouteria sapota*. Para ello se obtuvieron los extractos de hexano y metanol a través de la técnica de extracción continua por reflujo; se logró detectar los metabolitos secundarios contentivos en los extractos de hexano y metanol, dando como resultado la presencia de triterpenos/esteroles y quinonas; mientras que los alcaloides, compuestos fenólicos, saponinas, taninos, flavonoides, antraquinonas, cumarinas y lactonas fueron negativos. Asimismo, los extractos con una concentración de 10000 ppm fueron la base para evaluar su actividad antifúngica por el método de difusión en agar con disco frente a hongos del género *Candida*, expresando resistencia con el extracto de hexano para *Candida albicans* y sensibilidad con el extracto de metanol (7 mm), esto se determinó a través de la medición de los halos de inhibición en agar Müller Hinton modificado; *Candida krusei* inhibió su crecimiento con ambos extractos (hexano 10 mm; metanol 7 mm), por lo tanto, se considera sensible. Primer reporte de actividad antifúngica de las semillas de *Pouteria sapota*.

**Palabras Clave:** *Pouteria sapota*, Fitoquímica, Metabolitos secundarios, actividad antifúngica.

## INTRODUCCIÓN

La investigación científica para extraer y separar sustancias de las plantas, con actividad biológica o terapéutica ha demandado interés en las últimas décadas (Albornoz, 1980), puesto que este recurso natural se emplea, desde hace muchos años, como alternativa medicinal en el tratamiento de muchas enfermedades. El hombre ha logrado satisfacer sus necesidades fundamentales a través de las plantas, a mencionar, alimentación, abrigo, ornamento; además, como herramienta para el tratamiento de dolencias y enfermedades, por medio de formas rudimentarias, basado en creencias y costumbres. Es entonces que la composición química de los recursos naturales ha sido tema de investigación las últimas décadas por uso farmacológico (Ramírez y cols., 2012).

Los primeros escritos que se tienen del uso de las plantas con fines medicinales refieren a Hipócrates y Sócrates; incluso, Dioscórides (77 a.C.) escribió *Materia Médica*, una obra considerada durante 15 siglos como la cumbre de la botánica y farmacia, en ella registró todas las plantas y medicinas conocidas por los griegos e incluyó desde la simple descripción hasta su utilización (Marcano y Hasegawa, 1991). Desde la prehistoria, se conocen plantas cuyos extractos han sido usados en pócimas o en curaciones, y aún las plantas sin tratamiento se han empleado para los mismos fines (Ramírez y cols., 2012).

El nuevo mundo es particularmente rico en plantas, por ejemplo, hay 80-100 especies con características alucinógenas y probablemente más que no han sido descubiertas o de las que no se tiene registro (Marcano y Hasegawa, 1991).

Ramírez y cols., (2012), plantea que existe una vasta información sobre la flora americana y su uso, en Venezuela existen varias obras, pero la más famosa es la de Henry Pittier (1926) que describe las plantas de acuerdo con su clasificación botánica y su uso.

Domínguez (1973), estipula que la etnobotánica trata de recopilar los conocimientos sobre la composición precisa de las plantas, cubriendo aspectos referidos a la estructura de constituyentes químicos, actividad biológica, extracción y purificación, datos espectroscópicos, síntesis y biosíntesis, así como también análisis fitoquímicos con el fin de estudiar y aislar los componentes principales de las plantas. Es así que los métodos químicos para la determinación de las estructuras se han ido desarrollando en una serie de técnicas físicas de separación, purificación e identificación tales como: resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía infrarroja (IR), rayos ultravioleta (UV), Rayos X, técnicas cromatográficas, solas o combinadas con métodos espectroscópicos tales como la cromatografía líquida (High-Performance Liquid Chromatography - HPLC).

Tomando en consideración los incisos anteriores, hoy en día, las plantas siguen siendo tema de investigación por lo que se considera importante el estudio del género *Pouteria*, puesto que se trata de una planta empleada ampliamente en la industria alimentaria y farmacéutica, su interés dentro de este último apartado es debido al uso que en medicina tradicional se ha hecho de distintas especies del género *Pouteria* para el tratamiento de una amplia gama de afecciones contando en muchos casos con la validación científica de dichos usos terapéuticos, en países como México, El Salvador y Guatemala (Bayuelo, 2006).

De la *Pouteria* y de otras muchas plantas medicinales se utilizan sus aceites esenciales, sus extractos o sus partes (hojas, flores y raíces) como ingredientes de diversas preparaciones y productos comerciales para el

consumo humano. En la búsqueda de una caracterización fitoquímica y explicación molecular de la actividad biológica de la *Pouteria* se ha demostrado que en sus metabolitos secundarios se encuentran varios compuestos fenólicos solubles, polifenoles oxidasa y peroxidasa, carotenoides y proantociadiinas, que no han sido caracterizados en su mayoría, y algunos de estos compuestos son sustratos de enzimas relacionados con el pardeamiento de pulpa (Torres y cols., 2019).

Por esta razón, en este trabajo de investigación, se pretende ahondar en la evaluación fitoquímica y actividad antifúngica de las semillas de *Pouteria sapota*, ya que es una planta medicinal utilizada desde la antigüedad en países de Centroamérica y Suramérica, y ha llegado a nuestros días por todas las virtudes que se le atribuyen; es importante mencionar que los estudios, en su mayoría, se han basado en la caracterización de las hojas y fruto de *Pouteria sapota*, por tal motivo, se considera importante el análisis y caracterización de las semillas; aunado a esto, esta especie se encuentra en distintas regiones de Venezuela, por lo tanto se ha usado principalmente en áreas gastronómicas, y en pequeña escala, en el tratamiento de distintas enfermedades de manera popular, es decir, la población ha hecho uso de la planta (la fruta) sin poseer un conocimiento amplio sobre sus componentes, por lo tanto, demanda gran importancia apoyar tal uso pero bajo un criterio científico y ampliar el uso de las semillas de *Pouteria sapota*, que fue comprobado a través de técnicas de laboratorio que arrojen información veraz sobre la composición química de la especie vegetal.

Es así, que, partiendo de ciertos criterios como la historia, uso y características del género y especie, esta investigación pretende ofrecer un estudio preliminar comprobado por técnicas de extracción, separación y tratamiento de la semilla del mamey, asimismo, evaluar las propiedades como agente antimicrobiano que, permita un conocimiento objetivo sobre la

misma, a saber, composición química de las semillas de *Pouteria sapota* y su actividad antifúngica.

Por esto, este trabajo de investigación se encuentra estructurado de la siguiente manera: Capítulo I, en el que se plantea el problema de estudio, junto con los objetivos que se quieren alcanzar, la importancia del trabajo y los alcance y limitaciones del mismo; el Capítulo II muestra los antecedentes referidos a investigaciones en el que se apoyará este trabajo, asimismo, las teorías en las que se fundamentará este estudio; en el Capítulo III se encuentra el tipo de investigación y toda la metodología a emplearse, y los Capítulos IV y V basados en los resultados con su análisis y las conclusiones y recomendaciones respectivamente, así como también las referencias bibliohemerográficas que apoyan esta investigación.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## **CAPÍTULO I**

### **EL PROBLEMA**

#### **Planteamiento del Problema**

Las plantas medicinales se han usado desde la antigüedad para el tratamiento de diversas enfermedades. Su uso terapéutico ha sido sistemáticamente estudiado desde hace dos siglos bajo un enfoque científico. A pesar de que, con el descubrimiento de la penicilina, se pensaba que la fitoterapia pasaba a un segundo plano, ya que el uso de los antimicrobianos se volvió generalizado (Miguel y cols., 2011) hoy en día, las terapias naturales siguen siendo foco de investigación. Actualmente, existe un renovado interés por lo natural y lo orgánico y ha propiciado el surgimiento de los extractos naturales generando nuevas líneas de investigación y nuevas alternativas terapéuticas (De Paula y Martínez, 2000).

Esto hizo que se indagara y se estudiara de manera profunda y constante, el conocimiento de las composiciones químicas de las especies vegetales, que poseen propiedades farmacológicas y ampliar las diferentes funciones de los productos que de ellas se extraen, a saber, sus propiedades antimicrobianas, para el uso farmacológico propiamente dicho (Albornoz, 1980).

En lo que respecta a la investigación de productos naturales nuevos e innovadores se ha generado un número importante de publicaciones tanto nacionales como internacionales; se han aislado y caracterizado miles de sustancias químicas pertenecientes a diferentes familias de plantas que contienen metabolitos secundarios de importancia para la salud humana

tales como flavonoides, alcaloides y terpenoides, entre otras; compuestos con propiedades antimicrobianas que pueden ser empleados en el combate de diferentes enfermedades. Entre los metabolitos secundarios importantes relacionados con los mecanismos de defensa, destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Cowan, 1999).

En los últimos años se han hecho importantes contribuciones en la prospección de la actividad biológica de un importante número de estas sustancias. La mayoría se refieren a plantas terrestres incluidas las de uso medicinal, sin embargo; también se han estudiado los productos naturales de origen animal, que presentan propiedades terapéuticas (Sharapin, 2000).

El género *Pouteria* ha sido ampliamente estudiado en países de Centroamérica; son estudios limitados a la pulpa, las hojas y las semillas de la fruta. Además del uso gastronómico de la *Pouteria sapota*, por ejemplo, la pulpa es utilizada en jaleas, pastas y conservas; en México y Centro América las semillas molidas se utilizan para dar al chocolate un sabor amargo y un aroma característico (Lobato, 1998). Las semillas se usan también para combatir la sinusitis, bajar la fiebre y en alcohol combate la artritis (Quesada, 1996). El aceite extraído de la misma es empleado contra dolores musculares y afecciones reumáticas (Lobato, 1998). También se utiliza para la fabricación de cremas y jabones para proteger la cara (Quesada, 1996), en El Salvador y Guatemala se utiliza como un tónico para la piel y como revitalizador para evitar la caída del pelo (Lobato, 1998). Además, la corteza y las hojas en cocción se usan contra la arteriosclerosis y pueden servir para bajar la presión arterial; en países como Venezuela y Colombia, la fruta se usa principalmente con fines gastronómicos, sin embargo, en las creencias populares ha sido empleada como remedio natural (Quesada, 1996).

Por lo tanto, *Pouteria sapota*. resulta ser la unidad de estudio en esta investigación, partiendo de los enunciados expuestos anteriormente; con ésta, se persigue la evaluación fitoquímica preliminar de las semillas de la planta, para brindar información segura y verificada sobre la composición química de ésta y consecuentemente, indagar acerca de los elementos que la componen; del mismo modo, explorar en las propiedades terapéuticas realizando un estudio de la actividad antifúngica de los extractos de las semillas de *Pouteria sapota*. Por lo tanto, la presente investigación pretende profundizar en el tema a través de la siguiente interrogante:

¿Cuál es la relación entre la composición química de los extractos de hexano y metanol de las semillas de *Pouteria sapota* y su actividad antifúngica?

## www.bdigital.ula.ve

### Justificación e Importancia de la Investigación

La mayoría de las investigaciones fitoquímicas desarrolladas hasta hace unas décadas estaban dirigidas a determinar estructuras novedosas. Hoy día esos estudios se orientan hacia el aislamiento e identificación de compuestos biológicamente activos, especialmente encausados a atacar dolencias que afectan a toda la humanidad (Marcano y Hasegawa, 1991).

Son muchos los estudios relacionados con la evaluación de las propiedades de las plantas con fines terapéuticos, esto se debe a la alta demanda de fármacos en el mundo de hoy. Las enfermedades de cualquier índole cada vez son más frecuentes a nivel mundial, ya sea por factores ambientales o inmunológicos, sin embargo, existen, en la naturaleza, una gran variedad de especies de origen vegetal que han venido a reemplazar las terapias sistematizadas químicamente, por ejemplo, antibióticos

comerciales, que son altamente costosos y además, generan en el afectado complicaciones secundarias (Alonso, 2004).

Por este motivo, es importante el estudio de alternativas terapéuticas naturales, que, aunque se han implementado desde tiempos remotos, éstos han sido usados por la población sin el conocimiento de la composición química de las mismas (González y cols., 2004).

El género *Pouteria*, específicamente la especie *Pouteria sapota* ha sido empleada en la industria alimentaria, incluso en la industria cosmética, sin embargo, los estudios sobre las propiedades de la fruta, las hojas y la semilla han ido tomando relevancia en distintos países; los metabolitos secundarios encontrados en ellos han demostrado tener acción terapéutica para distintas enfermedades (Lobato, 1998).

Asimismo, cabe mencionar que en Venezuela se encuentra la especie *Pouteria sapota*, en regiones del occidente del país, por lo tanto conviene profundizar en estudios relacionados con las propiedades de productos de origen natural, ya que constituye un aporte a la salud de la población, por lo que afirman los estudios previos, se trata de una alternativa farmacológica de fácil adquisición y con resultados científicamente probados. Resulta indispensable aportar en la salud de los venezolanos; hoy en día, el control de enfermedades micóticas utilizando fármacos, se ha convertido en un problema de salud, por el escaso recurso terapéutico eficaz y por los elevados costos de la mayoría de los antimicóticos existentes en el mercado (Castillo, 2018).

## **Objetivos de la Investigación**

### **Objetivo General**

Confirmar la relación entre la composición química y la actividad antifúngica de los extractos de las semillas de la especie *Pouteria sapota*.

### **Objetivos Específicos**

- Obtener los extractos de hexano y metanol de las semillas de *Pouteria sapota* por el método de refluxo.
- Determinar cualitativamente los principales metabolitos secundarios presentes en los extractos de las semillas de la especie *Pouteria sapota*.
- Evaluar la actividad antifúngica de los extractos obtenidos de las semillas de *Pouteria sapota* usando el método de difusión en agar con disco (Kirby-Bauer)

## **Alcances y Limitaciones de la Investigación**

### **Alcances de la Investigación**

Los alcances de esta investigación están relacionados principalmente con la importancia que han adquirido las plantas con propiedades medicinales en los últimos años. La especie *Pouteria sapota* ha sido ampliamente investigada en países de Latinoamérica, por lo tanto, se considera como una fuente de recursos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades. Por tal motivo, aportar nuevos datos sobre las características fitoquímicas y bioactividad de las semillas de la especie *Pouteria sapota* es parte de los

alcances contemplados en esta investigación, así ofrecer a la población, una alternativa asequible como opción terapéutica.

### **Limitaciones de la Investigación**

Entre las limitaciones encontradas durante la investigación, resaltan las siguientes:

- Dificultad para la recolección del fruto, aunque es una especie que puede localizarse en la zona de Los Andes, es un hecho que no es una fruta común en el mercado merideño, por lo tanto, se trata de una especie protegida, cultivada y de difícil alcance.
- Disponibilidad del laboratorio para llevar a cabo el estudio.
- Intervención de variables externas como la falla de servicios públicos y transporte, que alteren el curso de la investigación.

## **CAPÍTULO II**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **Trabajos Previos**

Las siguientes investigaciones representan punto de referencia en este estudio destinado a la actividad antifúngica y tamizaje fitoquímico de los extractos de las semillas de *Pouteria sapota*.

En el año 2023, Rodríguez y Martínez, enfocaron su estudio en la actividad antifúngica de residuos de mamey contra *Alternaria* spp. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antifúngica de extractos vegetales de residuos de mamey (*Pouteria sapota* Jacq. HE Moore & Stearn) sobre el hongo fitopatógeno *Alternaria* spp. Siendo este uno de los géneros de hongos que provocan las mayores pérdidas durante pre y poscosecha, encontrándose también *Botrytis*, *Penicillium*, *Colletotrichum* y *Rhizopus*. Específicamente la presencia del género *Alternaria* representa una amenaza para la salud, ya que producen más de 70 metabolitos secundarios tóxicos, algunos de ellos actúan como micotoxinas para humanos y animales mostrando efectos genotóxicos, mutagénicos, cancerígenos y citotóxicos por lo que manejo y control es importante. Basándose en esto, se usaron frutos de mamey (*Pouteria sapota* Jacq. HE Moore & Stearn) provenientes de la región de Los Tuxtlas, Veracruz. Se seleccionaron piezas con una madurez comercial (18-25° Brix), sin daños físicos, libres de plagas y sin enfermedades evidentes. Los frutos se lavaron, mondaron y se separó la

cáscara de la semilla; estas se dividio en fracciones, la almendra y cascarilla de almendra. El hongo se cultivó en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) durante 4-7 días e incubó a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) para los ensayos posteriores. Los resultados de este estudio mostraron que los extractos de residuos de mamey pueden afectar crecimiento normal *in vitro* de *Alternaria* spp., el crecimiento radial del hongo en medio PDA fue 36,06 mm de diámetro en la caja de Petri después de 7 días de incubación. A excepción de la cascarilla de almendra, el resto de los tratamientos tuvieron una reducción en el crecimiento micelial que fue estadísticamente significativa ( $*=p\leq 0,05$ ) con respecto al control en PDA, así como un efecto inhibitorio que varió entre 18 y 46 % para almendra desgrasada y pericarpio respectivamente. Todos los extractos de residuos de frutos de *P. sapota* inhibieron el crecimiento micelial de *Alternaria* spp. En pruebas *in vitro*, pero la cascara y la fracción obtenida de la almendra desgrasada que se consideran especialmente un desecho, mostraron el mejor efecto antifúngico estadísticamente diferente, por lo que este estudio indica que los extractos de residuos de mamey podrían ser una alternativa en el desarrollo de fungicidas de origen natural.

El trabajo de Rodríguez y Martínez (2023) antecede a esta investigación por su relación con las variables usadas, a saber, la actividad antifúngica y los extractos de los residuos de *Pouteria sapota*, entre ellos, de la semilla. Aunque dirigieron su estudio hacia el tratamiento de hongos fitopatógenos, se logró obtener la actividad antifúngica presente en la misma.

Por su parte, Masullo, M., Cerulli, A., Pizza, C., y Piacente, S. (2021). En su estudio titulado Pulpa y piel de *Pouteria lucuma* perfil químico en profundidad y evaluación de la actividad antioxidante, desarrollaron una investigación donde tuvieron como objetivo principal determinar el contenido fenólico total de los extractos de la misma y también hacer énfasis en la

actividad antioxidante de la pulpa y piel de *Pouteria lúcumá*. Obtuvieron información importante ya que encontraron un total de 36 compuestos en el extracto de n-BuOH de la pulpa de *Pouteria lúcumá*, también se aislaron los compuestos fenólicos y se identificaron sus estructuras mediante experimentos de RMN (Resonancia Magnética Nuclear). Así mismo algunos de los compuestos aislados mostraron una actividad eliminadora de radicales; con base en los resultados obtenidos, demostrando que la lúcumá podría considerarse como una rica fuente de bioactivos con propiedades polares, además de compuestos fenólicos. Teniendo en cuenta las actividades biológicas reportadas para las clases de lípidos y sus efectos en la salud humana, estos datos refuerzan el uso de la lúcumá en la nutrición humana como un alimento rico en diferentes clases de lípidos bioactivos y saludables con efectos beneficiosos. Por otra parte el reciclaje y aprovechamiento de los subproductos de lúcumá es imprescindible ya que preliminarmente se evaluó en esta investigación el contenido fenólico total del extracto de la piel (560,69 mg GAE/g extracto) y con ello poder correlacionar el contenido fenólico total del extracto con su composición química, para esto se realizó un análisis de cromatografía líquida con espectrometría de masas en tandem (LC-ESI/LTQOrbitrap/MS/MS) en extracto de piel de *Pouteria lúcumá*, y se dieron cuenta que la taxifolina representa el compuesto predominante junto con el eriodictiol. Además, la taxifolina mostró una fuerte actividad eliminadora de radicales con un valor de TEAC de 3,53. Llegando a la conclusión que las pieles de lúcumá, que representan un residuo industrial del procesamiento de la lúcumá, podrían ser útiles para la preparación de complementos alimenticios. La investigación mencionada guarda relación con la que se desarrolló, puesto que se trata del mismo género y , además , los resultados de tal estudio orientan esta investigación en el perfil fitoquímico estudiado ; ya que los metabolitos

secundarios analizados podrían ser encontrados en los extractos de las semillas de *Pouteria sapota*.

Asimismo, Maza y Paucar (2020) desarrollaron un estudio titulado Lúcumá (*Pouteria lucuma*): Composición, componentes bioactivos, actividad antioxidante, usos y propiedades beneficiosas para la salud, en el que indican que la lúcumá (*Pouteria lucuma*) también llamada "*Lucuma obovata*" es un fruto originario de la zona andina de Ecuador, Chile y Perú, esta fruta ha ido ganando mayor popularidad en los últimos años debido al descubrimiento y difusión de sus componentes bioactivos como el ácido ascórbico, carotenos, polifenoles, vitaminas y minerales. El propósito de este trabajo fue dar a conocer las propiedades funcionales de la lúcumá, que hacen de ella una fruta exquisita y nutritiva, además de atractiva desde el punto de vista de su funcionalidad. El objetivo de este trabajo consistió en dar a conocer los componentes y propiedades beneficiosas de la lúcumá desde el punto de vista de la salud. Los componentes bioactivos detectados fueron esencialmente metabolitos secundarios que poseen propiedades beneficiosas para la salud humana. Estos fueron compuestos fenólicos, carotenoides y sus derivados. Uno de los aspectos más resaltantes de la lúcumá es sin duda su composición en fenoles totales, pues diversos estudios los han encontrado en sus distintos tipos como flavonoides, polifenoles y ácidos fenólicos; además identificaron fitoesteroles como  $\beta$ -sitosterol y cicloartenol. Determinaron, además, que la mayor parte de carotenoides en la lúcumá corresponde a  $\beta$ -carotenos de los tipos trans- $\beta$ -caroteno y 9-cis- $\beta$ -caroteno, los cuales tienen una actividad de provitamina-A elevada. Concluyeron que la lúcumá es una fruta con grandes beneficios para la salud evidenciados en sus componentes bioactivos y características organolépticas. Esta fruta debe verse como un potencial alimento medicinal aplicable que puede reemplazar los suplementos y medicinas.

En este orden, la investigación de Maza y Paucar (2020) es considerada como antecedente del estudio en curso, porque además de caracterizar fitoquímicamente a *Pouteria lucuma*; destacaron la presencia de metabolitos secundarios con bioactividad. Sin embargo, aunque la especie estudiada es distinta a *Pouteria sapota*, guarda relación con el género, entonces, orienta en la caracterización de *Pouteria sapota*.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## **Antecedentes Históricos**

Durante milenios las especies vegetales se han constituido como la principal fuente de medicamentos para tratar distintas enfermedades y en la actualidad son objeto de estudio en diferentes áreas del conocimiento científico, debido a sus aplicaciones y usos. En el siglo XX muchos fármacos fueron desarrollados a partir de fuentes naturales, particularmente de las plantas. Hoy, muchas enfermedades son tratadas gracias al descubrimiento de compuestos a partir de las plantas, lo que evidencia que estas juegan un papel significativo en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Los registros más antiguos del uso de las plantas inician con la farmacia China alrededor de 2100 a.C., con Shen Nung padre de la medicina y la agricultura, el cual fue un emperador que buscó, probó e investigó el valor medicinal de cientos de hierbas, cortezas y raíces traídas de los campos, pantanos y bosques de la China, escribiendo la primera “pluma T-Sao” a base de 365 hierbas (Mesa, 2017).

Por otra parte, existen registros egipcios en el “Papiro Ebers” que datan del año 1500 a.C, en donde se incluye una colección de 800 recetas con hierbas, mencionando aproximadamente 700 medicamentos. Allí, se iniciaron simples dispensadores de hierbas que tuvieron auge entre los árabes, civilización donde aparecieron también los primeros recetarios, listados de medicinas o primitivas farmacopeas. En Europa, los griegos y romanos se iniciaron con el estudio científico de las plantas medicinales, durante muchos siglos los herbolarios transfirieron los conocimientos teóricos y experiencias prácticas sobre las plantas medicinales para las próximas generaciones, sin embargo el descubrimiento de América abrió un nuevo mundo a la medicina natural con la llegada de la quina, la coca y el tabaco, lo que conllevó a la aparición de textos fundamentales de farmacología sobre las virtudes de dichas hierbas. El sueco farmacéutico Scheele preparó el camino para el

aislamiento de los ácidos orgánicos a partir de las plantas y demostró la importancia de una nueva clase de sustancias orgánicas denominada alcaloides. Con la morfina aislada por Sertürner y con unos doscientos alcaloides identificados al promediar el siglo XIX, la farmacia empezó a diferenciarse de la medicina (Mesa, 2017).

El mamey (*Pouteria sapota*), es originario de las partes bajas de América Central. Pertenece a la familia de los Sapotaceae, es un fruto exótico de clima tropical, que es considerado originario de las selvas del sur de México; actualmente se le encuentra en México, Florida, Sur de América, Filipinas, Vietnam y Bahamas. El mamey madura durante los meses de abril y mayo. El fruto es de forma baciforme, conteniendo normalmente de una hasta tres semillas, la pulpa es roja, de sabor dulce y de consistencia suave. Se consume como fruta fresca, generalmente mezclado con otros ingredientes para obtener batidos, helados, o bien para obtener jaleas, pastas y conservas, aunque sus variantes alimenticias son muy vastas. La semilla es elipsoidal de aproximadamente 10 cm en el eje mayor por 6 cm de ancho. El embrión carece de endospermo, los dos cotiledones son desarrollados y oleaginosos. El fruto presenta pigmentos principales de carotenoides en la cascara y la pulpa, mientras que en las semillas se han identificado compuestos bencenoides. Por otra parte, se han identificado compuestos con actividad que tienen también un papel importante en la protección contra enfermedades en humanos como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y en la actividad antinflamatoria; debido a ello el consumo de mamey representa ventajas nutricionales y saludables al ser humano (Bayuelo, 2006).

Esta especie se considera originaria de las selvas del sur de México y de América central dada la densidad de los tipos criollos que ahí se localizan, donde se le cultiva abundantemente en las tierras bajas, después se diseminó a toda la América tropical y a las Antillas, actualmente se le encuentra en México, Centroamérica, las Antillas, Sudamérica, Filipinas, Cuba y Florida (Velázquez y Alvarado, 2015).

*Pouteria sapota*, pertenece a la familia de los Sapotaceae, conocido como mamey-zapote que se originó de una confusión con el fruto del mamey (*Mammea americana* L.) ya que la capa externa de ambos frutos se parece, pero el color interno del mamey es amarillo y el del zapote es rojo, en varias tonalidades. El nombre científico del mamey es *Pouteria sapota* (Morton, 2005, citado en Velázquez y Alvarado, 2015).

Aunque su nombre ha experimentado varios cambios desde que se clasificó por primera vez en 1703 por Plumier, encontrando los siguientes sinónimos: *Pouteria mammosa* (L) Cronquist, *Lucuma mammos* Gaertn, *Achradelpha mammosa* Cook, *Calocarpum mammosum* Pierre, *Calocarpum sapota* Merriel, *Calospernum mammosum* Pierre, *Sapota mammosa* Jack. La razón es que a diferentes especies de la familia Sapotaceae se les ha ubicado en el mismo género (Morera, 1982).

## **Bases Teóricas**

### **Familia Sapotaceae**

La familia Sapotaceae se caracteriza por ser árboles, arbustos, raramente subarbustos, hermafroditas, monoicos, dioicos o polígamos, algunas veces espinosos, el indumento con frecuencia de pelos malpighiáceos. La familia Sapotaceae tiene importancia económica por la producción de madera, látex y aceites con varias aplicaciones y frutos comestibles. La familia tiene aproximadamente 800 especies de árboles perennes y arbustos. Es reconocida por presentar 10 géneros y 90 especies (León, 2006).

Según León (2006) la familia Sapotaceae se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Equisetópsida

Subclase: Magnoliidae

Orden: Ericales

Familia: Sapotaceae

Asimismo León (2006) afirma que los géneros más importantes dentro de esta familia son: *Pouteria*, *Palaquium*, *Madhuca*, *Manilkara*, *Sideroxylon*, *Chrysophyllum*, y *Mimusops*.

## **Distribución geográfica**

Sapotaceae es una familia de distribución pantropical, con 53 géneros y más de 1100 especies, de las que alrededor de 400 se encuentran en la región neotropical, unas 350 en África y otras tantas en Asia tropical. Prosperan principalmente en bosques húmedos, pero algunos géneros, como *Sideroxylon* y *Argania* se extienden a regiones áridas y semiáridas (Carranza, 2005).

## **Composición química**

En las determinaciones fisicoquímicas que se han hecho a distintas especies de Sapotaceae, se destaca la presencia de compuestos de naturaleza fenólica, saponinas, triterpenoides y sustancias reductoras, además, un alto contenido de hidratos de carbono, así como también proteína, grasa, fibra, nutrientes inorgánicos, vitaminas, aminoácidos y constituyentes volátiles como benzaldehído, hexanal y ácido hexadecanoico (Pino y cols., 2006).

## **Usos etnobotánicos y actividad biológica**

En la medicina popular, la familia Sapotaceae tiene muchos usos. Por ejemplo, desde tiempos remotos, distintas plantas pertenecientes a esta familia se han empleado como herramienta medicinal en afecciones estomacales y de garganta. Según el botánico Standley, el aceite de las semillas de las frutas de esta familia, era empleado por los indígenas de México para mejorar el cabello y para dar sabor al chocolate. Este mismo aceite es muy reputado en Cuba para el tratamiento de la calvicie, colitis y ciertas afecciones cardíacas. En Centro América, el mismo es utilizado en la fabricación de jabones, la elaboración de turrones chocolatados y para dar

brillo y alisar el cabello. La corteza se aplica para reducir los callos, y a la savia se atribuyen propiedades vomitivas y antihelmínticas (Hill, 1965).

### **Género *Pouteria***

Se caracteriza por ser arbustos o árboles, rara vez subarbustos con hojas arregladas en espiral, raramente opuestas, sin estípulas, venación eucamptódroma o broquidódroma, por lo general sin vena submarginal; inflorescencia axilar o ramiflora, fascículos solitarios, a veces dispuestos a lo largo de tallos hojosos cortos; flores con frecuencia unisexuales. *Pouteria* es un género de la familia Sapotaceae. Todos sus miembros son árboles. Muchas especies producen frutas comestibles. Algunas incluso son comercialmente recolectadas y vendidas en mercados locales o enlatadas para su venta (Carranza, 2005).

La taxonomía del género *Pouteria* se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Dilleniidae

Orden: Ericales

Familia: Sapotaceae

Subfamilia: Chrysophylloideae

Género: *Pouteria* (Kukachka, 1982).

## **Distribución geográfica**

Género de distribución pantropical, con alrededor de 188 especies en la región del Neotrópico, probablemente unas 150 en Asia tropical y en las islas del Pacífico.

## **Composición química**

Los estudios evidencian que esta fruta posee un alto potencial nutraceutico, porque es fuente en nutrientes y de diversos componentes bioactivos (fenoles, carotenos y vitaminas) (Malpartida y cols., 2021).

## **Usos etnobotánicos y actividad biológica**

Diversas frutas del género *Pouteria* se comercializan con fines gastronómicos, sin embargo, muchos estudios han determinado actividad antioxidante en distintas especies de *Pouteria*, así como también antihiperglucémico, antiinflamatorio y antimicrobiana; además su consumo coadyuva en tratamientos de enfermedades crónicas no transmisibles; su semilla también posee compuestos bioactivos (Malpartida y cols., 2021).

### **Especie *Pouteria sapota***

*P. sapota* pertenece a la familia Sapotaceae (tabla 1), que es miembro del Orden Ericales, compuesta de árboles y arbustos con 53 géneros y con más de 1250 especies. Se distribuyen en regiones tropicales y subtropicales (Swenson y Anderberg, 2005).

**Tabla 1. Taxonomía de *Pouteria sapota***

**Taxonomía**

Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Dilleniidae
Orden:	Ericales
Familia:	Sapotaceae
Subfamilia:	Chrysophylloideae
Género:	<i>Pouteria</i>
Especie:	<i>Pouteria sapota</i>

Tomado y modificado de: Swenson y Anderberg (2005)

**Descripción botánica**

*Pouteria sapota*, es una especie polimórfica y caducifolia. Por lo común, los árboles adultos alcanzan 30 m y tienen copa asimétrica (Quesada, 1996). Las hojas son largas y delgadas, agrupadas cerca del ápice, de 15-30 cm de largo, glabras y lustrosas en el haz, de color blanquecino, con nervios

laterales casi perpendiculares al centro; con pecíolos de 3 a 5 cm de largo, glabros o pubescentes (Azurdia, 2006).

Las inflorescencias se distribuyen en fascículos de 3-6 flores, agrupadas en las axilas de las hojas, con pedúnculos de 2,5 a 3 mm de largo. Las flores son actinomórficas con cáliz verde parduzco y numerosos sépalos; los inferiores poseen pubescencia en la superficie externa; tienen corona color crema verdoso de 7 a 8 mm de largo; son anchas de forma tubular en la parte inferior, con 4 a 5 lóbulos de 4 mm de largo; tienen 4-5 estambres de 4 mm de largo, insertos en la base de la corona y opuestos a los lóbulos de la corona; es notable la presencia de 5 estaminodios alternos a los estambres; también el ovario pubescente, el estigma pequeño y simple, usualmente por encima de la corona, tanto en estado de yema como de flor (Azurdia, 2006).

León y Poveda (2000) estipulan que el fruto en *P. sapota* varía de esférico a elipsoidal; es ancho en la base, angosto al eje apical, con 8-22 cm de largo, con la cáscara delgada, color canela, rugoso y con escamas. La pulpa, rojo fuego, uniforme y compacta, es muy dulce y ligeramente aromática. Las semillas de los zapotes, generalmente una sola en *P. sapota* y a veces 2 en *Pouteria viridis*, se llaman “zapoyolas” en América Central. Miden hasta 8 cm de largo y tienen la superficie dura y brillante, de color pardo-oscuro, excepto en una franja longitudinal, que es opaca, rugosa y más clara.

### Origen de cultivo

El mamey (*Pouteria sapota*) se considera originario de las selvas del sur de México y de América central dada la densidad de los tipos criollos que ahí se localizan, donde se le cultiva abundantemente en las tierras bajas, después se diseminó a toda la América tropical y a las Antillas (Guerrero),

actualmente se le encuentra en México, Centroamérica, las Antillas, Sudamérica, Filipinas, Cuba y Florida (Bayuelo, 2006).

*Pouteria sapota*, pertenece a la familia de los Sapotaceae, conocido como mamey-zapote que se originó de una confusión con el fruto del mamey (*Mammea americana* L.) ya que la capa externa de ambos frutos se parece, pero el color interno del mamey es amarillo y el del zapote es rojo, en varias tonalidades. El nombre científico del mamey es *Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore & Stern, aunque su nombre ha experimentado varios cambios desde que se clasificó por primera vez en 1703 por Plumier (Fouque, 1972).

### **Distribución geográfica:**

El mamey (*Pouteria sapota*) es originario de las partes bajas de América Central. Perteneciente a la familia de los sapotáceas, es un fruto exótico de clima tropical, que es considerado originario de las selvas del sur de México; actualmente se le encuentra en México, Florida, Panamá, Colombia, Venezuela, Ecuador, Filipinas, Vietnam y Bahamas. El mamey madura durante los meses de abril y mayo (Velázquez y Alvarado, 2015).

León y Poveda, (2000), se le denomina comúnmente con el nombre de “zapote”, palabra que viene de “tzapotl” de origen náhuatl que significa “fruta esférica, dulce y con semilla grande” *Pouteria sapota* recibe diversos nombres comunes como: Grand sapotillier (Haití), manzano mamey (Belice), mamey colorado, mamey de tierra (Panamá) mamey mata serrana (Ecuador), mammea sapota (Jamaica), sapote (general), sapote colorado (Honduras), sapote de montaña (Guatemala), zapote mamey (Colombia y Venezuela).

## **Contenido nutricional**

El fruto de mamey por cada 100 g de porción comestible se informa que está compuesto de la siguiente manera: 62,43 g de agua, energía 134 kcal (561 kJ), 2,12 g de proteína, lípidos totales (grasa) 0,60 g, ceniza 1,10 g, 33,76 g de hidratos de carbono (azúcares con poco o nada de almidón presente, glucosa, fructosa y sacarosa); fibra 2,6 g, minerales, vitaminas, aminoácidos y constituyentes volátiles (USDA, 2012).

## **Usos del zapote (*Pouteria sapota*)**

El fruto del zapote (*Pouteria sapota*) es dulce y aromático y es utilizado como alimento gracias al sabor agradable de su mesocarpio. Se come fresco en batidos, helados y dulces. Cocido, puede utilizarse en mermeladas y pasteles; también se emplea en la elaboración de dulces típicos que tienen gran demanda en el mercado local. Al fruto se le atribuye propiedades medicinales y es rico en vitamina A y C, calcio y fósforo (Radi, 1999).

La madera es de muy buena calidad, consistente y fuerte. Presenta las siguientes características: color rojizo moreno, ocráceo o rojizo brillante; es compacta, pesada y durable. Es apta para mueblería de lujo, gabinetes, decorados de interiores, columnas, vigas, artesanías, mangos de herramientas, molduras, tornerías, marimbas y tableros aglomerados. No soporta la humedad y se pudre fácilmente. Es moderadamente resistente al ataque de hongos e insectos. Sin embargo, es muy poco utilizada ya que existen pocos árboles disponibles y además se prefiere mantener el árbol en pie, para aprovechar la producción de frutos. El jugo que exuda la corteza del zapote, tiene cierta causticidad y se ha aplicado en medicina para destruir las verrugas de la piel y otras excrecencias anormales (Ramos, 1999).

Se les llama “sapuyules” o “sapuyulos” y se encuentra en los mercados, secada al sol y atravesada por pitas o palos. Molidas y tostadas se emplean para darle sabor al atole y otras mezclas de bebidas. Se utiliza también en la elaboración de una bebida refrescante denominada “súchiles”. La semilla se come tostada. Se mezcla con cacao, sirve para preparar chocolate, dándole un sabor amargo y un aroma característico. Por ser oleaginosas, el aceite se utiliza para la fabricación de jabón. En algunas regiones se tiene la creencia que previene la caída del cabello y promueve su crecimiento. Hace unos años las semillas más tersas y lisas eran usadas para suavizar la ropa almidonada. También se cree que tiene propiedades calmantes y expectorantes (Ibarra, 2005).

El aceite de la semilla es usado en medicina popular contra los resfriados y para estimular el crecimiento del cabello, así como para conservarlo unido y brillante. Tiene también diversas aplicaciones industriales, entre las que destaca la elaboración de jabones y otros productos para el cabello, y como ingrediente adicionado al chocolate, ya que le da un color y aroma especial (Ibarra, 2005).

### **Productos Naturales**

Un producto natural es un compuesto químico producido por un organismo vivo en la naturaleza. En un sentido amplio, los productos naturales incluyen cualquier sustancia producida por la vida. Por tanto, una definición amplia de producto natural es la de ser un compuesto orgánico, aislado por la mano del hombre, que es producido por un proceso metabólico primario o secundario. Una más restrictiva o específica quedaría limitada a la de ser un metabolito secundario. Los beneficios de los productos naturales y ecológicos son factores importantes para la vida humana porque excluyen

sustancias químicas. Además, contribuyen a detener o minimizar los daños al medioambiente. Los productos naturales orgánicos son sustancias derivadas del metabolismo primario de los organismos vivos, las cuales generalmente participan directamente en los mecanismos de defensa y supervivencia. De ahí que también se les denomine “metabolitos secundarios” (Delgado, 2005).

### **Clasificación de los productos naturales**

La clasificación de los metabolitos secundarios puede hacerse de acuerdo con su estructura, a su bioformación o biosíntesis y a la fuente de producción o a su acción biológica. Aunque ninguna de estas clasificaciones es exclusiva ni excluyente, pues un metabolito puede ser ubicado dentro de varios grupos. Aparentemente la forma más acertada de clasificación corresponde a las vías químicas, por las cuales un organismo los elabora dentro de lo que se denomina ruta biogénética o biosíntesis. En relación con el criterio biosintético, los metabolitos secundarios pueden ser clasificados de forma general en alcaloides, terpenos y terpenoides, compuestos fenólicos, aceites esenciales y compuestos nitrogenados, todos ellos, fabricados a partir del dióxido de carbono como fuente de carbono (Guarnizo y Martínez, 2000).

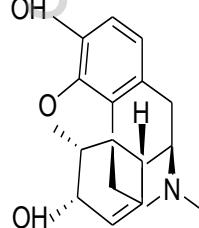
#### **Alcaloides**

Son bases orgánicas que se aíslan principalmente de las plantas superiores. Son sustancias nitrogenadas, producidas por las plantas como metabolitos secundarios y que presentan una acción fisiológica importante sobre los animales y los humanos aún en bajas dosis. De ahí, que muchas plantas que contienen estas sustancias han sido utilizadas por centenares de años como venenos. No obstante, pese a su efecto tóxico, muchos

alcaloides presentan invaluosas propiedades farmacéuticas. Sus estructuras químicas son variadas; Se considera que un alcaloide es, por definición, un compuesto químico que posee un nitrógeno heterocíclico procedente del metabolismo de aminoácidos (Bruneton, 2001).

Los compuestos nitrogenados son principalmente los alcaloides y glucósidos cianogénicos. Los alcaloides son un diverso grupo de compuestos con cerca de 4000 estructuras conocidas. Estos son fisiológicamente activos en humanos (cocaína), (nicotina), (morfina (1)) (figura 1) y por supuesto de gran interés en la industria farmacéutica. Por otra parte, los glucósidos cianogénicos, se consideran posiblemente; los metabolitos secundarios con mayor relación en las funciones de defensa (Pérez y Jiménez, 2011).

www.bdigital.ula.ve



Morfina (1)

**Figura 1.** Estructura química de la morfina.

Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

## Terpenos

Los terpenos se forman por la polimerización de unidades de isoprenos y esteroides (o 2-metilbuta-1,3-dieno). Los terpenos e isoprenoides son una vasta y diversa clase de compuestos orgánicos derivados del isopreno, un hidrocarburo de 5 átomos de carbono (Bruneton, 2001). Se dividen en seis

grupos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y esteroles, dentro de los cuales se encuentran los carotenos y los glicósidos cardiotónicos.

### **Triterpenos y esteroides**

Son compuestos de C<sub>30</sub>, procedentes de la ciclación del escualeno, los triterpenos poseen una estructura simple policíclica, normalmente tetra- o pentacíclica. Casi siempre hidroxilados en 3 presentan, al contrario de los demás terpenos, una unidad estructural bastante fuerte, siendo excepcionales las modificaciones profundas del esqueleto básico (cuasinoides) (Bruneton, 2001).

Además no existe una diferencia fundamental entre los triterpenos y esteroides, considerándose estos últimos triterpenos tetracíclicos que han perdido, como mínimo, tres metilos. El interés terapéutico e industrial de los triterpenos y de los esteroides como grupo de metabolitos secundarios de primera importancia es el siguiente:

- Interés de los glucósidos cardiotónicos, los cuales no se han podido todavía sustituir por ningún producto sintético.
- Interés de las sapogeninas espirostánicas, beta-sitosterol, estigmasterol, que son materias primas difícilmente reemplazadas para cubrir las necesidades de la industria farmacéutica en hormonas esteroideas.
- Interés terapéutico de numerosas drogas con saponósidos.
- Importancia económica del regaliz, edulcorante no azucarado y aromatizante
- Posible interés de los cuasinoides antitumorales.

## **Glucósidos cardiotónicos**

La principal propiedad de los glucósidos cardiotónicos es el incremento de la fuerza y velocidad de las contracciones cardíacas, la denominada acción inotrópica positiva. Su efecto en el miocardio se produce tanto en los pacientes enfermos como en los de corazón sano (Casamitjana, 2002).

Los glucósidos cardiotónicos poseen una estructura esteroidal que se caracterizan por llevar en el C-17 un anillo de lactona no saturado, los cardenólidos tienen específicamente un anillo pentagonal con un doble enlace conjugado con el grupo carbonilo (Bruneton, 2001).

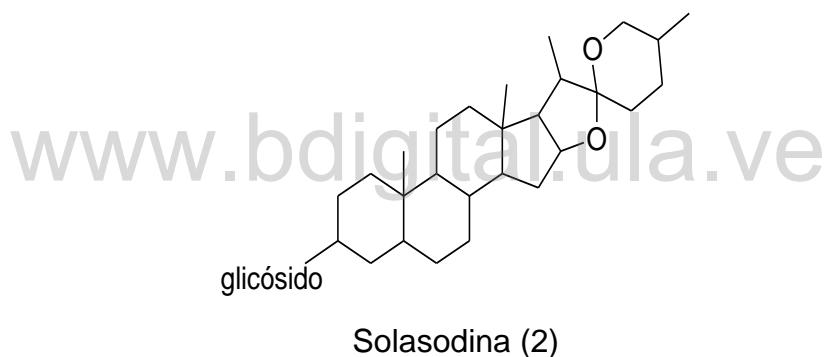
## **Saponinas**

Las saponinas (del latín *sapo*, "jabón"), son glucósidos de esteroidales o de triterpenoidales, tienen una estructura triterpénica tetracíclica llamadas así por sus propiedades semejantes a las del jabón: cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el azúcar), forman una espuma cuando se las agita en agua. Las saponinas son tóxicas y se cree que su toxicidad proviene de su habilidad para formar complejos con esteroles, por lo que podrían interferir en la asimilación de estos por el sistema digestivo, o romper las membranas de las células tras ser absorbidas hacia la corriente sanguínea. Existe una gran variedad de plantas que contienen saponinas en distintas concentraciones, como por ejemplo la Yuca, el ginseng, la quinua, el *Tribulus terrestris* o el quillay, entre otros (Bruneton, 2001).

Sin embargo, estas sustancias presentan una serie de características, tales como no ser nutritivas, además de ofrecer protección frente a agentes externos. Son nutrientes no esenciales, lo que significa que no son requeridos por el cuerpo humano para mantener la vida. Es bien sabido que las plantas producen estos productos químicos para protegerse a sí mismos,

pero investigaciones recientes demuestran que también pueden proteger a los humanos contra las enfermedades, efecto antimicrobótico y propiedades antibacterianas, e incluso estos principios activos son utilizados por la industria farmacéutica (Bruneton, 2001).

Se conocen más de 200 saponinas esteroidales (solasodina (2)) (figura 2), localizadas principalmente en las cotiledóneas como Liliáceas, Amarilidáceas y Dioscoreáceas, con excepción de las Escrofulariáceas. Otras saponinas triterpenoidales se han aislado principalmente en Dicotiledóneas (Marcano y Hasegawa, 1991).



**Figura 2.** Estructura química de las saponinas esteroidales

Tomado y modificado de Martínez, 2020.

### Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal; son compuestos orgánicos cuyas estructuras moleculares contienen al menos un grupo fenol, un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo (Bruneton, 2001). Los compuestos fenólicos representan uno de los principales metabolitos secundarios de las plantas. Los fenoles son sintetizados por las plantas y son regulados genéticamente, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, aunque

a este nivel también existen factores ambientales. Además, actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (por ejemplo, los antocianos son los responsables del color rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que encontramos en las pieles de las frutas y hortalizas). Por otro lado, cuando los fenoles son oxidados, dan lugar a las quinonas que dan un color pardo que muchas veces es indeseable (Gimeno, 2004).

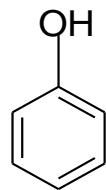
Existen diversas formas de clasificación de estos compuestos. Una de las formas más comúnmente utilizadas se basa en el número de carbonos que los conforman. Los compuestos fenólicos también pueden ser clasificados en función del número de grupos fenoles que poseen. En este sentido, se les denomina fenoles simples o monofenoles (si poseen solamente un grupo fenol (3)) (figura 3), o di- (bi), tri- y oligofenoles si poseen dos, tres o más grupos fenoles, respectivamente. Sin embargo, es posible clasificar estos compuestos desde otra perspectiva, que los divide en dos grandes grupos: No flavonoides y Flavonoides (Gimeno, 2004).

- No flavonoides: Ácidos fenólicos (serie benzoica y serie cinámica), Estilbenos y Taninos hidrolizables.
- Flavonoides: Flavonoles, Flavanoles, Antocianinas, Flavonas, Isoflavonas y Flavanonas.

Los compuestos fenólicos más estudiados son los flavonoides. Entre estos compuestos destacan flavonoles, flavonas, flavan-3-oles, flavanonas, antocianidinas e isoflavonoides. Durante los últimos años, se han realizado numerosos estudios sobre las propiedades beneficiosas de estos compuestos sobre la salud, especialmente de los compuestos flavan-3-oles (también llamados catequinas) (Harborne, 1980).

Entre los compuestos fenólicos se incluyen los ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides y taninos. Las aplicaciones farmacéuticas de estos

compuestos son considerables, se refieren sus efectos como analgésicos, antibacterianos, antihepatotóxicos, antioxidantes, antitumorales, inmunoestimulantes, entre otros (Pérez y Jiménez, 2011).



Fenol (3)

**Figura 3.** Estructura química del Fenol.

Tomado y modificado de Peñarrieta y cols., 2014.

## Flavonoides

Los flavonoides constituyen un grupo de compuestos naturales que tiene como estructura básica común dos anillos bencénicos unidos a través de un anillo heterocíclico pirano y pirona. Son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA, a través de lo que se conoce como "vía biosintética de los flavonoides", cuyo producto, la estructura base, se cicla gracias a una enzima isomerasa (Bruneton, 2001). Los flavonoides se encuentran de manera general en todas las familias de la plantas, sin embargo, hay ciertas estructuras de flavonoides que puede encontrarse de manera frecuente en una determinada familia y no en otra, de ahí que en ciertos casos han sido importantes para un criterio taxonómico aceptable (Abdala, 2000). Estos compuestos han sido aislados de diferentes partes de

la planta pero principalmente del pigmento de las flores donde cubren ciertos roles importantes (Harborne, 1989).

Los flavonoides están divididos en diferentes categorías tales como: flavonas, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, chalconas, y auronas. Muchos flavonoides han mostrado diversas actividades biológicas tanto *in vivo* como *in vitro* (Abdala, 2000).

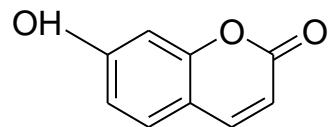
## Cumarinas

Las cumarinas toman su denominación de “coumarou” nombre vernáculo del “haba tonca”, de la cual se aisló, en 1820, la cumarina. Las cumarinas son 1,2 benzopirona o, sin prejuzgar mecanismos biosintéticos, las lactonas de los ácidos orto hidroxi (*Z*)-cinámicos, sus estructuras son muy variables: se conocen más de 800 en los vegetales superiores. De ellas, las más sencillas, se encuentran ampliamente distribuidas en todo el reino vegetal, si bien, determinadas familias contienen gran variedad de cumarinas: leguminosas, Compuestas y sobre todo en Umbelíferas y Rutáceas en las cuales se encuentran las estructuras más complejas (Bruneton, 2001).

La estructura química de las cumarinas se basa en que ellas se encuentran sustituidas en 7 por un hidróxilo. Esta sustitución en el anillo bencénico por hidróxilos, puede ser doble (6 y 7) o incluso triple. (6,7 y 8). Las cumarinas simples corresponden a estos compuestos hidroxilados y a sus ésteres; no es raro que uno de los hidróxilos fenólicos esté unido a un enlace heterosídico. Las tres cumarinas más repartidas son umbeliferona (4) (figura 4), esculetol y escopoletol (Bruneton, 2001).

El interés terapéutico de las cumarinas es limitado: el esculósido se presenta como venotónico y protector vascular y generalmente como factor vitamínico P, aunque este término, para algunos autores, no deba asociarse más que a los derivados del 2-fenil cromano. Los anticoagulantes

cumarínicos utilizados en la actualidad, se han sintetizado sobre el modelo del dicumarol, derivado cumarínico responsable de las hemorragias observadas en el ganado que consume forraje a base de meliloto mal conservado (*Melilotus officinalis* L) (Bruneton, 2001).



Umbeliferona (4)

**Figura 4.** Estructura química de umbeliferona

Tomado y modificado de Peñarrieta y cols., 2014.

## 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 animales y vegetales. El ejemplo más antiguo es la alizarina, una antraquinona usada desde hace de 2000 años, para teñir. Estos compuestos tienen afinidad por las zonas calcáreas y se fijan en ellas. Tomando en cuenta su estructura se puede clasificar en benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas y quinonas extendidas (Bruneton, 2001). Los ejemplos más frecuentes se refieren a estructuras p-quinoideas altamente hidroxiladas en cuyo caso pueden encontrarse en equilibrio varios tautómeros. Hay ejemplos de o-quinonas como lo es el hallocromo, un pigmento rojo que se aísla del gusano utilizado para pescar: *Lumbriconereis impatiens*. Como criterio

general, se acepta que las quinonas provenientes de los microorganismos se forman a partir de ácido acético y aquellas de los vegetales superiores son de ácido shikímico. No hay métodos especiales para el aislamiento de las quinonas. La extracción alcalina es a veces utilizada en el caso de las antraquinonas, que son las más abundantes en los vegetales superiores. Las antraquinonas se pueden diferenciar de las venzo y naftoquinonas por reducción con ditionito de sodio alcalino que origina soluciones rojas para las primeras mientras que para las segundas son incoloras o amarillo pardo. El color de la quinona en solución básica, y el máximo de absorción VIS indican el patrón de oxigenación (Marcano y Hasegawa, 1991).

### Rutas Biosintéticas

Se define como una secuencia de reacciones químicas catalizadas por enzimas, estableciendo así tres rutas biosintéticas mediante la formación de una variedad de compuestos. Las tres rutas metabólicas son: ruta del acetato, ruta del shikimato y ruta del mevalonato (Rojas, 2019).

**Ruta del acetato:** Es la vía de formación de una variedad de compuestos como ácidos grasos, poliacetilenos, prostaglandinas, macrólidos, antibióticos y compuestos aromáticos como xantonas, antraquinonas, entre otros. El poli- $\beta$ -ceto éster es la molécula intermediaria principal de esta ruta, este se forma por la unión de dos moléculas de acetil-CoA a través de una reacción de condensación de Claisen hasta obtener acetoacetil-CoA. Esta reacción se repite hasta generar el poli- $\beta$ -ceto éster con el largo de cadena adecuado según el tipo de metabolito que se formará de acuerdo con los requerimientos de planta (Rojas, 2019).

**Ruta del shikimato:** Se considera como el intermediario principal para la formación de un gran número de compuestos, tales como flavonoides, cumarinas, lignanos, antraquinonas, xantonas, cromenos, entre otros (Rojas, 2019).

**Ruta del mevalonato:** De las vías metabólicas más importantes, se lleva a cabo en el citoplasma de las células, está involucrada en la producción de isoprenoides, una clase diversa de más de 30.000 biomoléculas como el colesterol, la vitamina K, la coenzima Q10 y hormonas esteroideas (Sepúlveda, Porta y Rocha, 2003).

### **Extracto vegetales**

Un extracto vegetal es una combinación de varios componentes que contiene porciones de compuestos químicos, que se adquiere mediante métodos físicos, químicos y microbiológicos usando partes u órganos de especies vegetales (Zapata, 2002).

Se puede obtener extractos vegetales con múltiples principios activos y variadas concentraciones de una misma planta (Caldas, 2012).

### **Técnicas utilizadas para la preparación de extractos vegetales**

Los extractos vegetales se obtienen por un tipo de extracción llamada “sólido-liquido”. Este proceso consta de tres etapas:

- 1) Penetración del disolvente en los tejidos de los vegetales e hinchaón.
- 2) Disolución de las sustancias extraíbles.
- 3) Difusión de las sustancias extraíbles disueltas fuera de la célula vegetal (Marcano y Hasewaga, 1991).

En general, se denomina extracción sólido- líquido al procedimiento consistente en poner en contacto un sólido triturado (en el área de productos naturales, el material vegetal) con un líquido (disolvente de extracción) en el cual son solubles algunas de las sustancias que componen al sólido. Del proceso se obtiene un sólido, de empobrecida composición, y una disolución o extracto formado por el disolvente y las sustancias disueltas en él. Los factores más importantes a tener en cuenta en una extracción sólido- líquido son: la elección del disolvente de extracción, el método de contacto y la temperatura a la cual ocurre el proceso (Ortuño, 2006).

Existen varios métodos de extracción sólido –líquido, el método a emplear depende fundamentalmente de los objetivos del estudio de la planta. Si se persigue el aislamiento de sustancias sensibles al calor, deberán emplearse métodos de extracción en frío; si por el contrario no se posee información sobre la naturaleza química de las sustancias que se espera aislar, se debe seleccionar la técnica dependiendo de las observaciones sobre la marcha (Marcano y Hasewaga, 1991).

### **Métodos de extracción discontinua**

En este tipo de extracción, una sola porción del disolvente entra en contacto con el material vegetal a extraer. La extracción de los principios activos procede hasta la saturación del disolvente, de manera que el proceso culmina en este punto. No se logra una extracción cuantitativa de los principios activos presentes en el material vegetal (Casado, 2012).

- **Infusión**

Una infusión es una solución diluida de los componentes fácilmente solubles de una o varias partes vegetales. Se realiza sumergiendo las partes vegetales, preferiblemente troceadas o molidas, en una cantidad

determinada de agua a temperatura de ebullición; se deja reposar normalmente alrededor de 15 minutos, removiendo de vez en cuando, y a continuación se filtra. Las dosis generales son de aproximadamente un gramo de planta por cada diez gramos de agua. Por lo general, los extractos obtenidos mediante este método presentan muy bajas concentraciones de principios activos (Botella, 2003).

- **Decocción**

En este método, las partes vegetales se mantienen en el disolvente (generalmente agua) en ebullición durante 15-30 minutos. Posteriormente se filtra y se recoge el líquido resultante (extracto). Dado que la solubilidad de los principios activos generalmente aumenta con la temperatura, se logra extraer una mayor cantidad de los mismos en comparación con los métodos que se llevan a cabo a temperatura ambiente; sin embargo, presenta la desventaja de afectar sustancias termolábiles (Casado, 2012).

- **Maceración**

Consiste en dejar las partes vegetales sumergidas en un disolvente, a temperatura ambiente, durante un tiempo relativamente largo. Contrario al caso de la decocción, en este método las sustancias termolábiles no se ven afectadas; sin embargo, la solubilidad de los principios es menor a temperaturas más bajas y, así, se extrae una menor cantidad de principios activos en comparación a la que pudiera extraerse a una temperatura superior (Casado, 2012).

- **Digestión o Extracción por reflujo**

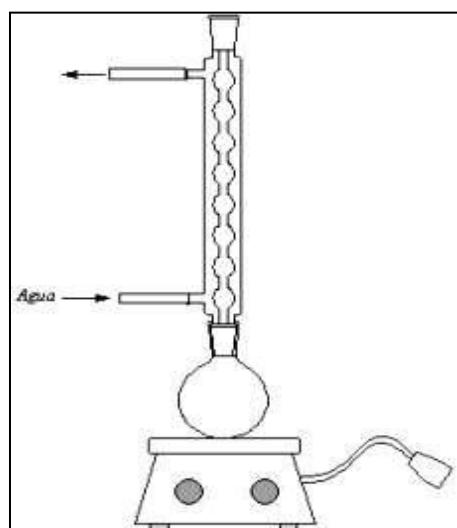
Se trata de una extracción a temperaturas superiores a la ambiental, entre 35 y 40°, e inferiores a los 50°C. Se introducen las partes vegetales a extraer en un recipiente que contiene el líquido previamente calentado a la temperatura deseada; se mantiene durante un período que puede oscilar entre media hora y veinticuatro horas, agitando regularmente el envase. Se separa

finalmente el líquido (extracto). Un moderado aumento de la temperatura, eleva un poco la solubilidad de los principios activos sin recurrir a calentamientos extremos (Casado, 2012).

Por otro lado, la técnica consiste en colocar las partes vegetales a extraer en un balón de destilación junto con el disolvente; la boca del balón se ajusta un refrigerante y se inicia entonces el calentamiento hasta que el disolvente alcanza su temperatura de ebullición (figura 5). Los vapores generados en el matraz condensan en el refrigerante y caen de nuevo en forma líquida en el matraz. Se mantiene el sistema a reflujo durante algunas (pocas) horas, se deja enfriar el sistema y se separa el líquido resultante (Sanz, 2002).

El reflujo evita la pérdida de disolvente en forma de vapor, de manera que el mismo no llega a agotarse y puede mantenerse el calentamiento durante más tiempo; sin embargo, las sustancias termolábiles resultan considerablemente afectadas (Sanz, 2002).

**Figura 5. Equipo de reflujo**



Tomado y modificado de Sanz, 2002.

## **Métodos de extracción continua**

En este tipo de extracción, el disolvente se renueva una vez que se ha saturado. En ese momento, el disolvente se cambia añadiendo disolvente puro, el cual extraerá más principios activos hasta saturarse. El proceso se repite hasta conseguir extraer la máxima cantidad de principios activos contenidos en el tejido vegetal. En este tipo de métodos, por tanto, se extrae una mayor cantidad de principios activos que la lograda a partir de métodos discontinuos (Casado, 2012).

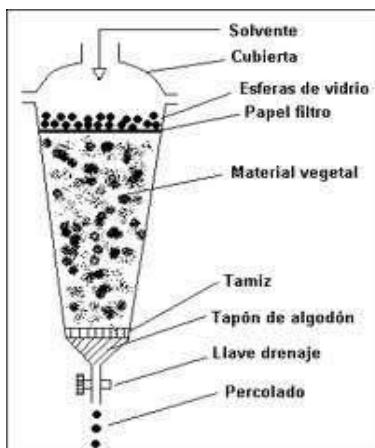
- **Percolación**

En este método las partes vegetales, finamente picadas o pulverizadas, se colocan en un recipiente en forma de columna (percolador, ver figura 6) donde también se añade el disolvente (Casado, 2012).

El disolvente recorre, por gravedad, la columna en sentido descendente, entrando en contacto con el tejido vegetal y arrastrando los principios activos que contiene. El percolador presenta en su parte inferior una apertura controlada por una llave, por donde sale el disolvente con los principios activos disueltos. Por la parte superior se añade disolvente puro, que compensará las salidas inferiores y continuará extrayendo principios activos (Casado, 2012).

Dado que el procedimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente, sustancias termolábiles no se ven afectadas; sin embargo, la renovación continua del disolvente constituye una desventaja, ya que el volumen final recolectado es generalmente grande, para lo cual, además, se gastan elevadas cantidades del solvente puro (Casado, 2012).

**Figura 6. Percolador**

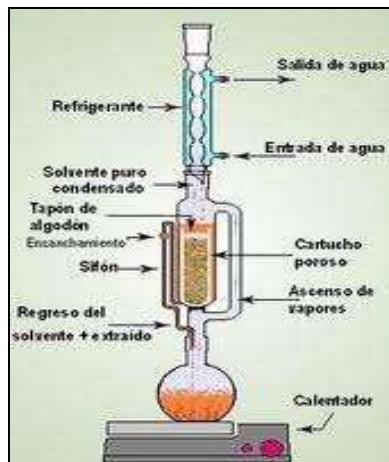


Tomado y modificado de Casado, 2012.

- **Extracción con Soxhlet**

Consiste en colocar el material a extraer, previamente molido o troceado en una cámara de extracción, la cual se conecta por una parte a un balón de destilación y por otra a un refrigerante (figura 7). El disolvente contenido en el balón se calienta a ebullición, el vapor asciende por el tubo lateral y se condensa en el refrigerante, cayendo sobre el material vegetal. Cuando alcanza el nivel conveniente, sifonea por el tubo regresando al balón. El proceso se repite hasta conseguir el agotamiento deseado del material, a pesar que el calentamiento se lleva a cabo en la parte baja del balón de destilación, el proceso de extracción ocurre a una temperatura superior a la ambiental, con lo cual aumenta la solubilidad de los principios activos; sin embargo, las sustancias termolábiles se ven considerablemente afectadas durante el proceso. La mayor ventaja de este método, la constituye el hecho de poder efectuar la extracción continua sin añadir nuevas cantidades del solvente puro, de manera que el volumen final del extracto obtenido, será igual a la cantidad inicial de solvente colocado en el sistema (Lamarque, 2008).

**Figura 7. Equipo Soxhlet**



Tomado y modificado de Lamarque, 2008

## www.bdigital.ula.ve

### Análisis Fitoquímico Preliminar

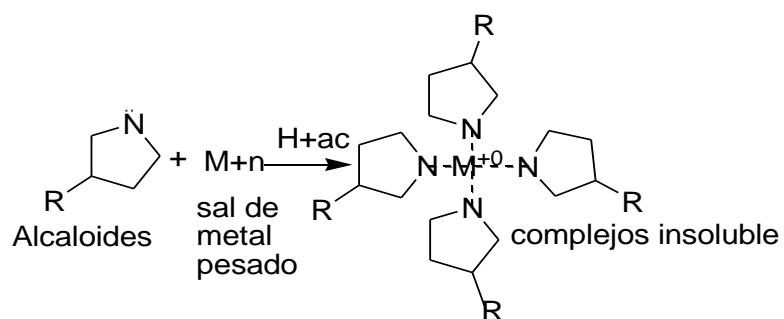
El tamizaje fitoquímico son ensayos *in vitro* que permiten evaluar el potencial terapéutico de las plantas y brindan la posibilidad de descubrir e identificar moléculas nuevas de interés farmacológico. Asimismo, contribuye a fomentar la conservación y la protección de los ecosistemas, en especial en hábitats poco perturbados y estudiados, como los afloramientos rocosos (Arones y cols., 2022).

Para determinar la composición química de las plantas medicinales y conocer sus constituyentes biológicamente activos pueden seguirse metodologías que van desde un análisis fitoquímico preliminar hasta estudios químicos sistemáticos bioguiados. El objetivo de un estudio fitoquímico es determinar la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos en una especie vegetal, a saber: alcaloides, antraquinonas y naftoquinonas, esteroides y triterpenos, flavonoides, taninos, saponinas, cumarinas, lactonas

terpélicas y cardiotónicos. Dado que cada uno de estos grupos de compuestos está relacionado con actividades biológicas específicas (Carvajal y cols., 2009).

### Ensayos de reconocimiento alcaloides

La detección de alcaloides se lleva a cabo con agentes reveladores que se basan en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal, obtenidos a partir de extractos ácidos, que al combinarse con el iodo y metales pesados como bismuto, mercurio, tungstenos, forman precipitados (figura 8) con coloraciones específicas. Los reactivos generales que se utilizan para detectar alcaloides son los descritos por: Wagner, Mayer y Dragendorff como prueba específica para el grupo pirrol (Crews y Berthiller 2010).

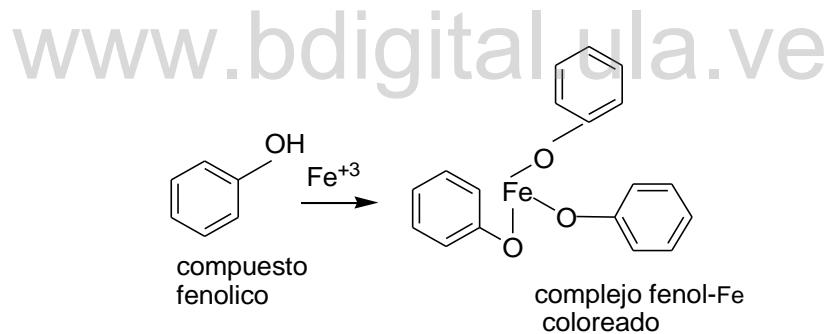


**Figura 8.** Formación de los complejos insolubles por reacción de los alcaloides con los metales pesados utilizados en los ensayos de precipitación.

Tomado y modificado de Martínez, 2020.

## Ensayos de reconocimiento para compuestos fenólicos

Debido a la gran cantidad y variedad estructural de las diferentes clases de compuestos fenólicos naturales, se utilizan diferentes ensayos de coloración para su reconocimiento preliminar en muestras biológicas. El ensayo más utilizado es el del cloruro férrico (figura 9). En este ensayo una solución acuosa o alcohólica de una muestra vegetal, se hace reaccionar con una solución de cloruro férrico acuoso o alcohólico, en concentración del 1%. Los compuestos fenólicos tienden a formar complejos de diferentes colores con el catión  $\text{Fe}^{+3}$ , la formación de color o precipitados oscuros es aceptada como un resultado positivo sobre la presencia de compuestos fenólicos (Martínez, 2020).

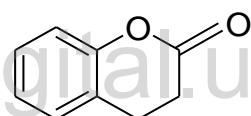


**Figura 9.** Reacción de formación de complejos coloreados de un compuesto fenólico con una sal de hierro III.

Tomado y modificado de Martínez, 2020.

### **Ensayo de reconocimiento de flavonoides**

Dentro de la gran cantidad de compuestos fenólicos, los flavonoides representan un grupo importante de sustancias con propiedades antioxidantes. Los flavonoides que contienen en su estructura un sistema anular  $\gamma$ -benzopirona (también denominado croman-4-ona) (figura 10) reaccionan con iones  $Mg^{+2}$  y ácido, para formar complejos coloreados de color rojo o violeta. Por tanto, la formación de coloraciones rojo o violeta, es considerada un resultado positivo que permite inferir la presencia de flavonoides en la muestra analizada. A este ensayo se le conoce como ensayo de Shinoda (Martínez, 2020).



**Figura 10.** Sistema benzopirona.

Tomado y modificado de Martínez, 2020.

### **Ensayo de reconocimiento para saponinas**

La reacción de identificación para estos metabolitos secundarios se realiza mediante el ensayo de la espuma se fundamenta en el reconocimiento de las saponinas tanto del tipo esteroidal como triterpénicas. Saponinas o Saponósidos, del latín *sapo* = jabón, son sustancias que tienen poder espumante en soluciones acuosas, y son tensoactivos naturales. (López, 2012).

### **Ensayo de reconocimiento de cumarinas**

Presentan un espectro ultravioleta característico, influido fuertemente por la naturaleza y posición de los sustituyentes, que se modifica profundamente en medio alcalino. A la luz ultravioleta, las cumarinas presentan fluorescencia variable de azul a amarillo y a purpura, exaltada en presencia de amoniaco (Herrera y cols., 2017).

### **Ensayo de reconocimiento de taninos:**

Los taninos son compuestos fenólicos solubles en agua, con pesos moleculares entre 500 y 3000, que además de dar las reacciones fenólicas usuales, tienen propiedades especiales tales como la habilidad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas (Isaza, 2007).

### **Ensayo de reconocimiento de quinonas y antraquinonas**

La prueba de Borntrager tiene como fundamento la hidrolisis de los enlaces glicósidos, donde se oxidan las antronas y los antranoles hasta antraquinonas generando la formación de un complejo que va desde el rosado y termina en un rojo intenso (Carvajal y cols., 2009).

### **Ensayo de reconocimiento para lactonas Sesquiterpenos**

Se fundamenta en la prueba de Baljet, donde se forma un complejo entre el ácido pícrico y la lactona alfa, beta y gamma insaturada, dicho complejo presenta coloración rojo claro a oscuro (Bruneton, 2001).

## **Hongos**

### **Generalidades de los hongos**

En la actualidad, los biólogos usan el termino hongo (*fungus=seta del Gr. Sphongus= esponja*) para designar a los organismos eucariotas, portadores de esporas, aclarofílicos, que por lo general se reproducen sexual y asexualmente y cuyas estructuras somáticas, ramificadas y filamentosas, están rodeadas por paredes celulares que contienen quitina o celulosa, o ambas sustancias, junto con otras moléculas orgánicas complejas. En otras palabras, esto significa que los hongos poseen núcleos verdaderos típicos en células, que se reproducen por medio de esporas y que no poseen clorofila. La mayoría de los hongos poseen un mecanismo sexual. También existen algunos organismos que los micólogos han estudiado por descuido, que probablemente no son hongos, son los mohos mucilaginosos o mixomicetes, celulares y plasmodiales (Herrera y Ulloa, 1998).

### ***Candida***

Los hongos del género *Candida* por lo común crecen como levaduras redondeadas, ovales o con forma de yema de 4 a 6  $\mu\text{m}$  que se reproducen por gemación (blastoconidios). A excepción de *C. glabrata*, el resto de las especies asociadas a candidosis pueden formar pseudomicelios; *C. albicans* y *C. dubliniensis* además son formadoras de hifas (Olivares ,2011).

### **Taxonomía del género *Candida***

Clase: Ascomycetes

Subclase: Hemyascomycetes

Orden: Saccharomycetales

Familia: Saccharomycetes

Género: *Candida*

*Candida* es un hongo que está presente en todos nosotros, se encuentra en las membranas superficiales y en las mucosas. En cantidades pequeñas es indemne pero cuando su crecimiento aumenta drásticamente puede estar devastando su salud. El hongo *Candida* suelta toxinas en el torrente sanguíneo que tiene un efecto devastador en el sistema nervioso y el sistema inmune (UNPA, 2012).

### Morfología

El género *Candida* comprende más de 200 especies, pero solo cerca de 50 tienen un interés médico, y, de estas, alrededor de ocho son las más frecuentes; sobresale *Candida albicans*, la que puede aislarse entre 40 hasta 85% de los casos. *Candida* spp., son levaduras que no producen pigmentos melánicos, y su forma puede variar según la especie: globosas, ovoides, elípticas y cilíndricas; su reproducción asexuada o anamórfica es por blastoconidias (holoblastica) (Bonifaz, 2012).

Los cultivos de *Candida* spp., son similares; se desarrollan en diversos medios, como Sabouraud dextrosa, papa dextrosa y extracto de levadura agar; su promedio de crecimiento es entre dos y tres días a temperatura de 25-35°C; algunas especies son 7 termoresistentes, la mayoría forma colonias cremosas, limitadas, planas, opacas, y en ocasiones rugosas o surcadas, de color blanco o blanco-amarillento, con excepción de *C. guilliermondii*, que es rosa-pálido. Todas las especies patógenas oportunistas de *Candida* presentan pseudohifas largas, ramificadas, con pequeños o grandes cúmulos de levaduras o blastoconidios (excepto *C. glabrata*). La formación de clamidoconidias se hace a partir del pseudomicelio y solo dos especies lo generan; *C. albicans* con estructuras terminales o intercalares de 10 y 12 µm

de diámetro, y *Candida dubliniensis*, con estructuras múltiples o en racimos del mismo tamaño (Bonifaz, 2012).

## Especies

Los agentes patógenos son levaduras del género *Candida* pertenecientes al Phylum Ascomycotina. Muchas especies se han aislado de vegetales, suelo, agua, aire, alimentos y algunas de ellas forman parte de la biota normal de la piel y membranas mucosas (boca, vagina, vías respiratorias altas, tracto gastrointestinal) de mamíferos (Olivares, 2011).

Las especies de *Candida* más importantes son:

- C. albicans*,
- C. glabrata*,
- C. tropicalis*,
- C. parapsilosis*,
- C. dubliniensis* (Bonifaz, 2012).

Aunque se han reportado más de 17 especies patógenas, el 90% de las infecciones se atribuyen a: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parasilopsis*, *C. tropicalis* (Olivares, 2011).

## Patogenicidad

Frecuentemente la candidosis de las mucosas (oral, gastrointestinal y vaginal), es el primer signo del deterioro de la función inmunológica; por lo tanto, los episodios de candidosis en las superficies mucosas son muy frecuentes y difíciles de tratar, el deterioro de la respuesta inmune y a los factores de virulencia que posee *Candida*, como la propiedad de adherencia, la habilidad de competir con otros microorganismos por nutrientes y la capacidad de evadir las defensas del hospedero, interactúan entre sí,

aumentando la frecuencia de la candidosis en el paciente inmunosuprimido (Panizo, 2011).

### Taxonomía de *Candida albicans*

Los microorganismos involucrados como agentes etiológicos de la Candidiasis, se encuentran actualmente clasificados taxonómicamente de la siguiente forma:

Reino: Fungi

División: Deuteromycota

Clase: Blastomycetes

Familia: Cryptococcaceae

Género: *Candida*

Especies: *albicans* (como la más frecuente y virulenta) y otras especies.

El género *Candida* comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual, con excepción de algunas especies micóticas. Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular (Hay, 1986).

Solamente una docena de las especies pertenecientes al Género *Candida* poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37°C. y pueden ser ocasionalmente patógenas para el hombre, estas son entre otras: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr* (*pseudotropicalis*), *C. krusei*, *C. guillermondi*, *C. parakrusei*, *C. zeylanides*, *C. stellatoidea* y *C. brumptii* (Volk y cols., 1989).

Estudios taxonómicos tratan de diferenciar las diversas especies del Género *Candida* de acuerdo a sus propiedades. *Candida paratropicalis* no ha

sido considerada distinta a *Candida tropicalis*. En el caso de *Candida clausenii* y *Candida stellatoidea* la similitud de su morfología y fisiología sobrepasan las diferencias que pueda haber entre estas especies. Diversos estudios sobre *C. albicans* y *C. stellatoidea* no consideran estas dos especies como distintas. Se ha demostrado por métodos electroforéticos que *C. albicans* y *C. stellatoidea* difieren en el número y patrón de cromosomas, pero también se han observado diferencias entre cepas de *C. albicans* en cuanto a este aspecto se refiere (Ginnis y Rinaldi, 1996).

A través de estudios de biología molecular mediante la prueba de Southern Blotting, utilizando enzimas de restricción para fragmentar el ADN, se demostró que *C. albicans* y *C. stellatoidea* son idénticas (Casas, 1989).

#### Taxonomía de *Candida krusei*

www.bdigital.ula.ve

Reino: Fungi

Filo: Ascomycota

Subfilo: Saccharomycotina

Clase: Saccharomycetes

Orden: Saccharomycetales

Familia: Saccharomycetaceae

Género: *Candida*

Especie: *C. krusei*

(Castellani) Berkhout

*Candida krusei* es una levadura del género *Candida*. Las células mayores son cilíndricas, de hasta 25 mm de largo. Las colonias separadas exceden con frecuencia los 5 mm de diámetro sobre malta-glucosa a 25 °C (Hautala, 2007).

Es un patógeno nosocomial que principalmente afecta a los pacientes inmunodeprimidos y aquellos con neoplasias hematológicas. Tiene una

resistencia natural a fluconazol, un agente antimicótico estándar. Se encuentra con mayor frecuencia en pacientes que han tenido exposición previa al fluconazol, aunque hay pruebas contradictorias acerca de si el fluconazol debe ser utilizado con fines profilácticos. La infección por *C. krusei* es una fungemia rara. El germe fúngico que más predomina es *C. albicans*. Otras especies de *Candida* que también encajan en este perfil son *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guillermondii*, además de la *C. rugosa* (Pfaller, 2008).

### **Actividad antifúngica**

Según Bidart (2004), un agente anfifúngico o antomicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped.

La síntesis de estos fármacos comenzó en el siglo XX y desde entonces no ha cesado el diseño de nuevas moléculas para combatir a las infecciones fúngicas invasoras, las cuales han aumentado sustancialmente en las últimas 2 décadas en relación con la aparición de la epidemia del SIDA, uso de quimioterapia intensiva en pacientes oncohematológicos, uso de fármacos antirrechazo en pacientes receptores de trasplante y la mayor utilización de dispositivos intravasculares (Avendaño, 1993).

### **Mecanismo de acción de los antifúngicos**

La gran similitud entre las células mamíferas y fúngicas resulta un problema a la hora de diseñar la molécula antifúngica, pues esta debe ser

selectiva de la célula patógena y no de la célula humana sana. Los agentes antifúngicos comúnmente son utilizados ante infecciones de las mucosas de las cuales unas de cuatro están relacionadas con hongos patógenos (Arenas, 2005).

El mecanismo de acción de los medicamentos que inhiben el crecimiento de hongos, depende del lugar en el que actúen, lo cual está relacionado con la estructura química del antifúngico (Diomedi, 2004).

### **Acción del antifúngico sobre la membrana celular del hongo**

Arenas (2005) expresa que la membrana celular de la célula humana así como la de los hongos, desempeña una importante función en la división celular y en el metabolismo. Las complejas partículas lipídicas llamadas esterolatos, son aproximadamente el 25 % de la membrana celular. Sin embargo, el contenido de esterol de la célula fúngica y mamífera es diferente. En las células de los mamíferos el colesterol es el esterol que predomina y en las células fúngicas el primario es el ergosterol. La diferencia del contenido de esteroles ha sido explotada como blanco de acción en los medicamentos antifúngicos. Dentro de ellos, según Arenas (2005), se tiene a los polienos, azoles y alilaminas:

- **Polieno.** Los medicamentos que se encuentran en este grupo, se unen al ergosterol presente en la membrana celular fúngica, donde se forman poros que alteran la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causas de la muerte celular.

- **Azoles.** Estos inhiben a la citocromo P-450-3-A de la célula fúngica, a través de la inactivación de la enzima C-14-a-dimetilasa, con lo cual se interrumpe la síntesis del ergosterol en la membrana celular. Debido a la falta de ergosterol se comienzan a acumular esteroles tóxicos intermedios, aumenta la permeabilidad de la membrana y se interrumpe el crecimiento del hongo.
- **Alilaminas.** Trabajan de forma similar a los azoles, conceptualmente ellas inhiben la síntesis del ergosterol. Sin embargo, este grupo actúa en un paso temprano de la síntesis del ergosterol.

Las alilaminas inhiben a la enzima escualeno epoxidasa, de esta forma disminuye la concentración de ergosterol, aumentan los niveles de escualeno, aumenta la permeabilidad de la membrana celular, se interrumpe la organización celular y disminuye el crecimiento del hongo (Gregorí, 2005).

### **Antifúngicos que actúan sobre la pared celular del hongo**

**Lipopéptidos.** La pared celular del hongo es fundamental en su viabilidad y patogenicidad. Esta sirve como cubierta protectora, le provee morfología celular, facilita intercambio de iones, la filtración de proteínas y participa en metabolismo y catabolismo de nutrientes complejos. La ausencia de pared celular es otro de los blancos de acción en la terapia antifúngica (Arenas, 2005).

Desde el punto de vista estructural, la pared celular de los hongos está compuesta de un complejo proteico y polisacarídico cuya composición varía en dependencia de la especie de hongo. La distribución de estas proteínas y carbohidratos en la matriz está en relación con la función de la pared celular

y los procesos de osmosis y lisis. Los antifúngicos que actúan sobre ella lo hacen inhibiendo la síntesis de los glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa. La falta de glucanos en la pared celular la vuelve débil e incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que muere (Valdés, 2005).

### **Antifúngicos que actúan sobre el núcleo de la célula fúngica**

- **Antimetabolitos.** Un clásico antimetabolito es la fluocitosina o 5-fluorocitosina. Este fármaco es transportado por la citosina permeasa en el citoplasma de la célula fúngica, donde se convierte en 5-fluorouracil (5-FU) por la citosina diaminasa. El 5-FU es fosforilado e incorporado dentro del ARN convirtiéndose en el dexosinucleotido, el cual inhibe a la timidilato sintetasa y de esta forma impide la síntesis de proteínas de la célula. También inhibe la síntesis de la proteína fúngica, reemplazando el uracil con 5-FU en el ARN fúngico.
- **Agentes misceláneos.** En esta clase se encuentra el griseofulvin, el cual inhibe la mitosis, al destruir el huso mitótico, necesario para efectuar la división celular (Valdés, 2005).

### **Clasificación de los antifúngicos**

El antimicótico incluye una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. La clasificación se realiza según criterios convencionales que atienden a su estructura en: polienos, azoles, alilaminas, entre otros (Tabla 2); de acuerdo con su origen en sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química (Tabla 3); de acuerdo con su espectro de acción en: amplio o restringido y de acuerdo con el sitio de acción.

**Tabla 2. Clasificación de los antifúngicos**

Polienos	Nistatina, natamicina, amfotericina B
Azoles	Imidazol: miconazol, clotrimazol
	Triazoles: fluconazol, itraconazol, ketoconazol
	Triazoles de segunda generación: voriconazol, raviuconazol, posaconazol
Alilaminas	Terbinafina, naftifina
Lipopéptidos	Papulacandinas
	Triterpenos glicosilados
	Equinocandinas: caspofungina, anidulofungina, micafungina
Pirimidinas fluoradas	Flucitosina
Otros	Yoduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvin

Tomado y modificado de Biasoli, 2008

**Tabla 3. Clasificación de los antifúngicos por su sitio de acción en el hongo**

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

Tomado y modificado de Biasoli, 2008.

### **Metodologías para evaluar la Actividad Antifúngica**

No existe una reglamentación y/o estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de extractos de plantas, como se establece para antibióticos. La mayoría de los métodos están basados en los métodos utilizados para evaluar la resistencia y/o susceptibilidad a antibióticos. Los métodos utilizados para evaluar actividad de extractos de plantas sobre bacterias y hongos suelen ser similares, variando la preparación del inóculo, medio de cultivo, temperatura y tiempo de incubación. Los métodos más comúnmente utilizados en laboratorio por su sencillez y rapidez, son: la técnica de difusión por discos en agar, es utilizada para generar datos cualitativos principalmente, y los métodos de dilución en medio líquido de cultivo y en agar, ambos métodos nos permiten conocer datos cuantitativos (Shiva, 2007).

#### **Técnica de difusión por discos en agar**

Según Rivas y cols., (2016), la metodología se enmarca en lo siguiente:

- **Material vegetal:** La planta colectada se debe secar en la sombra a temperatura ambiente, posteriormente la planta seca es triturada para llevar a cabo el proceso de extracción.
- **Microorganismos:** Es importante de establecer si estos provienen de muestras clínicas de paciente o si son cepas de referencia ATCC con la finalidad de conocer las condiciones físico-químicas específicas de cada uno de los microorganismos en estudio y que estos no sean factores que influyan de manera negativa en el procedimiento.
- **Medio de cultivo:** Cuando las cepas se encuentran liofilizadas se cultivan en caldo para posteriormente preservarse en agar inclinado en tubo. El tipo de agar para el tubo inclinado dependerá del tipo de microorganismo, aunque los medios más recomendados en el caso de los hongos y levaduras se recomienda agar Saboureaud-Dextrosa; en el caso de bacterias se recomiendan la infusión cerebro y corazón (ICC), agar soya tripticasa (AST), agar Mueller Hinton (MH) o agar nutritivo.

En el caso de hongos y levaduras, temperaturas de incubación, varían dependiendo del microorganismo en cuestión, siendo la temperatura de  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  para la mayoría de las bacterias mientras que para hongos y levaduras la temperatura recomendada es de  $29 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . El tiempo de incubación se recomienda de 5 a 7 días al tratarse de hongos; en el caso de bacterias puede variar de 24-48 h. Para las pruebas de actividad antimicrobiana se deben incubar según las condiciones descritas anteriormente aplicando el método de pozo o de disco (Rivas y cols., 2016).

**Preparación del inóculo:** Una vez cultivadas las cepas en el medio inclinado, se toman con el asa inóculos del cultivo colocándose en un tubo con solución salina (0,85 %) se debe ajustar el inóculo a 0,5 unidades ( $10^8$  cel/mL) según la escala de McFarland y se verifica con la absorbancia a 580 nm cercana al 25 % (Rivas y cols., 2016).

## Métodos en agar

- **Método de difusión por discos (Kirby-Bauer)**

Entre estos métodos el más utilizados por su sencillez y rapidez en la lectura de resultados es el método de difusión por discos, basados en la metodología utilizada por Bauer y col. El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de un antimicrobiano u otra sustancia en un sustrato (usualmente discos de papel) en la superficie del agar sobre el cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en estudio; se formará así, por difusión un gradiente de concentración del producto alrededor del disco y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento del microorganismo (Ramírez y Castaño, 2009).

El diámetro obtenido dependerá no sólo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa de agar, del pH y de la composición del medio de cultivo, de la capacidad de difusión del producto en ese medio, de la temperatura y de la atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana, y del tamaño del inóculo y fase de crecimiento del microorganismo en estudio (Ramírez y Castaño, 2009).

- **Método modificado agar en pozo**

Se deposita el inóculo y se siembra sobre las superficies del agar selectivo estipulado para este método; seguido de ello se hacen los pozos sobre la superficie del agar con el apoyo de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro y en cada uno de ellos se deposita de 10 a 25  $\mu\text{L}$  de los extractos a evaluar, estándares (control positivo y negativo) y blanco por triplicado, se deja reposar por espacio de 30 min (para evaporar el líquido), finalmente se incuba con la caja invertida a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 h para bacterias y a  $29 \pm 2^\circ\text{C}$  por 48 h en caso de levaduras, posteriormente se miden los halos de inhibición (Ríos y cols., 1988).

## **Métodos de dilución**

### **• Método de dilución en agar**

Otro método de evaluación en agar es el de dilución en agar, en éste método se incorpora el producto a evaluar a un medio con agar. El producto se añade cuando el medio aún está líquido. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de producto. Las placas se inoculan con un replicador una vez que se haya solidificado el medio de cultivo. Como medio de cultivo se suele utilizar el Agar Mueller Hinton como en el método de difusión por discos, aunque también se utilizan otros medios como AST, Agar nutritivo, Agar BH, etc. Los resultados de las pruebas de dilución en agar se expresan como concentración inhibitoria mínima (CIM) (Shiva, 2007).

- **Métodos en medio de cultivo líquido**

La cuantificación de la actividad *in vitro* se realiza habitualmente, mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. Estos métodos

se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes de la muestra, que se encuentra diluida en el medio de cultivo (caldo). Esta metodología es muy engorrosa, por la cantidad de material y de manipulaciones necesarias para su realización. La utilización de micropipetas y de placas de microtitulación facilita la utilización del método de microdilución en caldo (Shiva, 2007).

Este último método se ha venido usando para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de extractos de plantas, en el año 1995, describen la CIM como la menor concentración que mantiene o reduce la viabilidad del inóculo luego de 24 horas de contacto. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del producto a evaluar en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo (Shiva, 2007).

Teniendo en cuenta que la mayoría de microplacas tienen 96 pocillos (12x8) se puede aprovechar para ensayar hasta 11 diluciones de un producto, ya que la última columna se suele utilizar para controles de crecimiento microbiano y esterilidad del medio. El medio de cultivo estándar utilizado para la evaluación de antibióticos por el método de dilución en caldo es el Caldo Mueller Hinton aunque para la evaluación de CIM de extractos de plantas se utilizan caldo nutritivo, Caldo Tryptona Soja y en ocasiones añadiendo suplementos como suero (Shiva, 2007).

- **Método de Mitscher**

Existe un método para la determinación cuantitativa de la actividad antimicrobiana conocida como el Método de Mitscher. La actividad antimicrobiana se cuantifica *in vitro* para determinar la susceptibilidad o la

resistencia de un microorganismo determinado a diferentes concentraciones de un extracto. Esta técnica se fundamenta en cultivar las bacterias directamente sobre agar nutritivo mezclado con extracto a diferentes concentraciones y evaluar el grado de inhibición de estos extractos que ocasionan en el desarrollo bacteriano, correlacionando el blanco que está constituido por un crecimiento bacteriano total y el blanco positivo que es el agar nutritivo mezclado con el fármaco de referencia (Argueta y Vasquez, 2009).

El método consiste en colocar diferentes concentraciones del extracto en cápsula de Petri conteniendo agar tripticasa soya, en los cuales se procede a marcar con una línea el sitio donde será rallado cada uno de los microorganismos de prueba y luego con un asa de Henle estéril se toma una asada de la suspensión de cada microorganismo en turno. El asa con el microorganismo entonces es rayada en un patrón radial de cada cápsula de Petri siguiendo una plantilla. Una vez inoculada se incuban y luego se examina cada una de las placas y se determina si hubo o no actividad antimicrobiana por la presencia o no de colonias (Argueta y Vásquez, 2009).

### **Bioensayos para el análisis antimicrobiano**

La potencia de una sustancia antimicrobiana se define como: “la habilidad específica o capacidad de un producto de lograr su efecto planeado” y se basa en la medición de algún atributo del producto, por ejemplo, su efecto inhibitorio frente a un determinado microorganismo (halo de inhibición) se determina por el método analítico más adecuado, normalmente métodos de análisis microbiológicos. La potencia debe ser una propiedad o atributo definible y medible para un producto biológico o semisintético, y debe estar presente en los estudios de estabilidad, con el ánimo de verificar la conformidad del producto en lo que respecta su calidad (Martínez, 2005).

La actividad o potencia de un antifúngico, o antimicrobiano propiamente dicho, puede ser demostrada mediante el efecto inhibitorio de la sustancia en cuestión cuando es evaluado frente a un microorganismo. En los análisis de potencia, se compara cuantitativamente el efecto de una muestra sobre un sistema biológico con el efecto producido por una preparación estándar en las mismas condiciones y para la cual ya se ha determinado exactamente su actividad, obteniendo así un valor de potencia relativo al del estándar de referencia. Si se prueban las muestras en diferentes concentraciones se puede determinar una concentración mínima inhibitoria del antibiótico hacia ese microorganismo (Martínez, 2005).

### **Definición Operacional de Términos**

#### **Aceites Esenciales**

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles, principalmente terpenoides, que forman parte del metabolismo secundario de las plantas (Usano, Palá y Díaz, 2014).

#### **Extracto**

Mezcla compleja, con multitud de compuestos químicos, obtenibles por procesos físicos, químicos y microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología (Zapata, 2002).

#### **Estrés oxidativo**

Estado en el que la velocidad de generación de moléculas conocidas como radicales libres excede la capacidad de defendernos de las mismas (Abarca, 2017).

## **Antioxidante**

Un antioxidante es una sustancia, que retrasa, previene o anula significativamente la oxidación de otra sustancia por la acción de los radicales libres, aunque se presente en bajas concentraciones (Abarca, 2017).

## **Metabolismo**

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

## **Medios de cultivo**

Los medios de cultivo son una mezcla equilibrada de nutrientes, requeridos a concentraciones que permiten el crecimiento de los microorganismos. Deben contener todos los nutrientes necesarios en cantidades apropiadas a los requerimientos de los microorganismos, y en condiciones de pH, presión osmótica, oxígeno disuelto, etc., adecuados para el crecimiento (Pérez y Mota, 2006).

## **Fitoterapia**

Se define a la Fitoterapia como la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con una finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, atenuar o curar un estado patológico (Cañigueral, Dellacassa y Bandoni, 2003).

## **Operacionalización de las variables**

Consiste en un conjunto de técnicas y métodos que permiten medir la variable en una investigación, es un proceso de separación y análisis de la

misma en sus componentes que permitan medirla. Es un tecnicismo que se emplea en investigación científica para designar al proceso mediante el cual se transforma la variable de conceptos abstractos a términos concretos, observables y medibles, es decir, dimensiones e indicadores (Coronel, 2023). Por consiguiente en este trabajo de investigación quedó establecida la Operacionalización de las variables de la siguiente manera observada en las tablas 4 y 5 presentada a continuación:

**Tabla 4.** Operacionalización de la variable dependiente. Actividad antifúngica de los extractos de hexano y metanol de las semillas de *Pouteria sapota*.

Variable	Tipo de variable	Definición Conceptual ¿Qué es?
Actividad antifúngica de los extractos de hexano y metanol de las semillas de <i>Pouteria sapota</i>	Dependiente	Efecto inhibitorio de ciertos componentes frente a un determinado microorganismo (Martinez,2005)
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
Método de difusión en agar con disco.	<i>Candida albicans</i> CDC-385 <i>Candida krusei</i> ATCC-6258	Halos de inhibición en milímetros.

**Elaborado por:** Lemus, Pereira y Lara (2024).

**Tabla 5.** Operacionalización de la variable independiente. Composición química de los extractos de hexano y metanol de las semillas de *Pouteria sapota*.

<b>Variable</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Definición Conceptual ¿Qué es?</b>
Composición química de los extractos de hexano y metanol de las semillas de <i>Potería sapota</i>	Independiente	Son compuestos químicos sintetizados por las plantas, que son productos del metabolismo secundario (Bruneton, 2001)
<b>Definición operacional ¿Cómo se mide?</b>	<b>Dimensiones</b>	<b>Indicador</b>
Tamizaje fitoquímico	Alcaloides Triterpenos/esteroles Saponinas,Taninos Compuestos,fenólicos Flavonoides,Antraquinonas Cumarinas, Quinonas Glucósidos, Lactonas	Presencia o ausencia de los metabolitos secundarios

**Elaborado por:** Lemus, Pereira y Lara (2024).

## **Hipótesis**

Las especies de género *Pouteria* biosintetizan metabolitos secundarios como diterpenos, compuestos fenólicos, flavonoides, entre otros, con propiedades biológicas; entonces es de esperar que los extractos de hexano y metanol de las semillas de *Pouteria sapota*, resulten ser una fuente de compuestos con actividad antifúngica.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## **CAPÍTULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

A continuación, se describe detalladamente los aspectos metodológicos que se emplearon en el desarrollo de este estudio, referida a evaluar el perfil fitoquímico de las semillas de *Pouteria sapota* y su actividad antifúngica.

#### **Tipo de Investigación**

Este estudio se rigió bajo la investigación confirmatoria, establece relaciones para confirmar la veracidad o falsedad de la hipótesis que se maneja (Arias, 2012). Además, fue de tipo descriptivo, porque controla las variables que intervienen en el proceso de extracción, para así describir los resultados en la obtención del producto deseado y así posteriormente caracterizarlo.

#### **Diseño de la Investigación**

La presente investigación se basó en un estudio experimental, ya que la especie vegetal fue sometida a determinadas condiciones, estímulos o tratamiento, para observar reacciones y por consiguiente confirmar la hipótesis planteada. Asimismo, se analizó cualitativamente los resultados de cada ensayo fitoquímico y el análisis antifúngico fue cuantitativo, puesto que se utilizó la técnica de medición de halos de inhibición en mm por el método de difusión en agar con disco Kirby-Bauer.

## **Población y Muestra**

### **Unidad de investigación**

En este trabajo, la población estuvo representada por la especie vegetal *Pouteria sapota*. Éstas fueron recolectadas en la parroquia Santa Elena de Arenales, Municipio Obispo Ramos de Lora, del estado Mérida, Venezuela.

### **Selección del tamaño de la muestra**

La muestra que fue sometida a análisis la constituyen las semillas de la especie *Pouteria sapota*. Éstas fueron recolectadas en la parroquia Santa Elena de Arenales, Municipio Obispo Ramos de Lora, del estado Mérida, Venezuela.

### **Sistema de Variables**

Las variables planteadas en este trabajo contribuyeron a la evaluación fitoquímica preliminar y análisis de las semillas de *Pouteria sapota*. Por consiguiente, quedaron establecidas de la siguiente manera:

**Variable dependiente:** Actividad antifúngica de los extractos de hexano y metanol de las semillas de *Pouteria sapota*.

**Variable independiente:** Composición química de los extractos de hexano y metanol de las semillas de *Potería sapota*, Esta se presenta como variable independiente puesto que son los componentes de la especie los que otorgan la bioactividad a *Pouteria sapota*.

## **Instrumento de Recolección de Datos**

Los datos que se obtuvieron del análisis de las semillas de la especie estudiada (*Pouteria sapota*) y su actividad antifúngica, se organizaron en tablas en las cuales se depositaron los resultados obtenidos en cada ensayo.

## **Materiales y Equipos**

Los materiales que se usaron en este estudio comprenden aquellos necesarios para la extracción y análisis de los metabolitos secundarios, así como también, los necesarios para la evaluación de la actividad antifúngica de la planta. Tales se encuentran en el laboratorio en el que se desarrolló la investigación.

# **www.bdigital.ula.ve**

## **Procedimientos de la Investigación**

### **Recolección e identificación de las muestras**

La recolección del material vegetal se llevó a cabo en la población de Santa Elena de Arenales Mérida, Venezuela. La muestra fue identificada taxonómicamente por el Dr. Pablo Meléndez González con el número Voucher Specimen 01, en el Herbario MERF “Dr. Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (figura 11).



**Figura 11.** Vaucher de la muestra de *Pouteria sapota*.

### Preparación del material vegetal

- Obtención de las semillas.
- Identificación botánica.
- Pesado de las semillas en fresco (830,91 g).
- Secado de las semillas en estufa a 40 °C.
- Molienda.
- Secado del material molido en estufa a 40 °C.
- Pesado del material seco y molido (Peso Neto: 492,41 g).

### Obtención de los Extractos de las Semillas de *Pouteria sapota*

- La obtención de los extractos fue realizada en el laboratorio “A” Productos Naturales del Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usobilaga del Hierro” bajo la asesoría de la Dra. Rosa Aparicio y el TSU Emilio Salazar.
- Se manipula el material vegetal seco (492,41 g) para ser usado con hexano y metanol. Cabe mencionar que el procedimiento es el mismo, solo varía el solvente extractor.

- Se colocó el material vegetal en el balón de destilación.
- Se agregó 700 mL de cada solvente extractor (hexano y metanol) cada uno por separado (figura 12), se introdujo cinco perlas de ebullición para mantener estable el nivel de hervor.
- Se pone a funcionar el equipo con una temperatura de 60 °C hasta ebullición.
- Al observarse el goteo por las paredes del balón, se llevó la temperatura a 40 °C durante una hora.
- Pasada esa hora, se dejó enfriar y se filtró en un matraz con ayuda de papel filtro (figura 13).

### **Separación de los extractos del solvente**

- Se utilizó el rotavapor (figura 14) a presión reducida a 50 °C de temperatura para el hexano, y 65 °C para el metanol.
- El extracto obtenido en ambos casos, fue depositado en un vaso de vidrio previamente pesado (frasco con hexano: 42,53 g) (figura 15); frasco con metanol: 17,48 g) (figura 16).
- Se guardó el material resultante en una estufa, donde permaneció por una semana a 40 °C de temperatura para el secado del extracto.



**Figura 12.** Extracción por reflujo



**Figura 13.** Proceso de filtrado



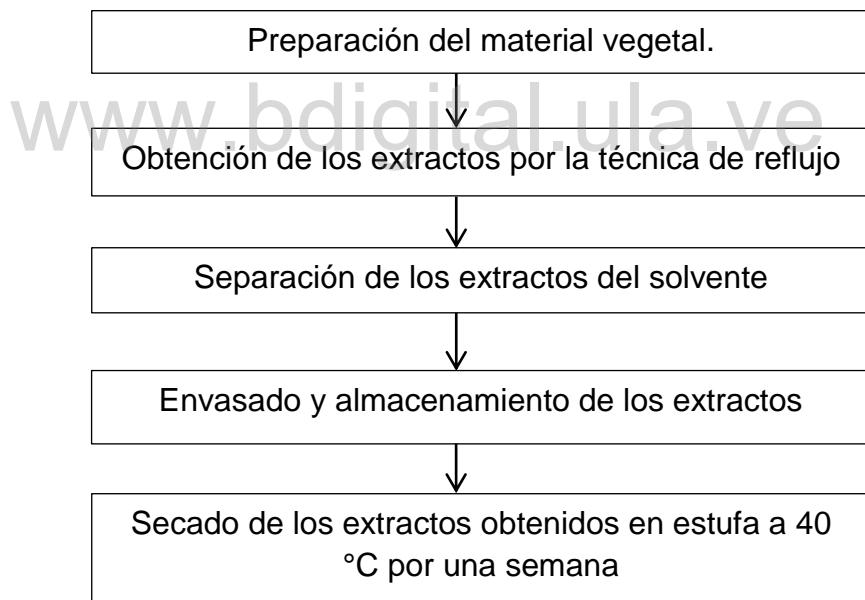
**Figura 14.** Rotavapor



**Figura 15.** Extracto de hexano



**Figura 16.** Extracto de metanol



**Esquema 1.** Proceso para la obtención de extractos.

**Tamizaje fitoquímico. Pruebas químicas cualitativas para determinar los metabolitos secundarios de los extractos de las semillas de *Pouteria sapota***

- **Alcaloides:** Se colocaron en dos tubos una porción del extracto de las semillas de hexano, y en el otro, una porción del extracto de semilla de metanol; se llevó a baño de María aproximadamente durante 4 horas, Transcurrido ese tiempo, el residuo se disolvió en 1 mL de HCl al 10 % en agua. Se filtró y se separó en partes iguales en 6 tubos (3 tubos para el filtrado con hexano y 3 para el filtrado con metanol). Luego a cada uno de los tubos se le agregó 0,5 mL de reactivo de Dragendorff, Mayer y Wagner.

La lectura se hace algunos días después, se vigila hasta poder observar el cambio de coloración para Dragendorff y Wagner, (color naranja/rojizo) indica ser positivo, y precipitado blanco para Mayer (Domínguez, 2016).

- **Triterpenos/esteroles** (Ensayo de Lieberman/Burchard): Se identificaron dos tubos de ensayo; en un tubo se colocó una porción del extracto de hexano y se agregó diclorometano y en el otro tubo se colocó extracto de metanol y se le añadió metanol. Se mezcló en Vortex. En campana de extracción se añadió 0,5 mL de anhídrido acético y unas gotas de  $H_2SO_4$ . La positividad la da una coloración verde (Bermejo, Pereira y Cabrera, 2014).
- **Saponinas** (Prueba de altura y estabilidad de espuma): En dos tubos identificados se colocó en cada uno, una porción de extracto de hexano y de metanol. Se les agregó agua destilada y se agitó vigorosamente y se llevaron al Vortex para terminar de agitar, hasta

observar la presencia de espuma, lo que expresa que la prueba es positiva (Bermejo, Pereira y Cabrera, 2014).

- **Taninos** (Ensayo de gelatina): Se colocó una porción de extracto de hexano y de metanol en dos tubos de ensayo cada una por separado y se disolvieron con agua destilada, luego se le agrego a ambos una solución de gelatina al 1 %. La presencia de taninos e incluso de pseudotaninos se considera positiva con la formación de un precipitado blanco (Garcia y cols., 2019).
- **Compuestos fenólicos** (Ensayo de  $\text{FeCl}_3$ ): Se utilizaron los mismos tubos de la prueba anterior, que contiene disueltos los extractos en agua destilada; se llevaron a campana de extracción para agregar  $\text{FeCl}_3$ . La formación de una coloración roja, azul, verde, o púrpura indica la presencia de fenoles (Guerrero, 2013).
- **Flavonoides** (Ensayo de Shinoda): En dos tubos se colocaron los extractos de hexano y metanol respectivamente. El tubo con extracto de hexano se disolvió con 1 mL de diclorometano, el tubo con extracto de metanol se disolvió con 1 mL de metanol. Se mezclaron en Vortex y en la campana de extracción se agregó unas virutas de magnesio, de 3-5 gotas de HCl. El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos (Guerrero, 2013).
- **Flavonoides** (Ensayo con NaOH al 10 %): En dos tubos se colocaron los extractos de hexano y metanol respectivamente. El tubo con extracto de hexano se disolvió con 1 mL de diclorometano, el tubo con

extracto de metanol se disolvió con 1 mL de metanol. Se mezclaron en Vortex, y en la campana de extracción se agregó unas gotas de NaOH al 10 %. Un cambio de color de amarillo a rojo (para saltonas flavonas), café a naranja (para flavonoides), púrpura a rojizo (para charconas) y azul (para antocianinas) expresa que es positivo (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

- **Antraquinonas** (Reacción de NH<sub>4</sub>OH): Se sigue el mismo protocolo que en la determinación de flavonoides, pero en la campana de extracción se le agregó NH<sub>4</sub>OH. Si es positivo, se observa la aparición del color rojo en los tubos que contiene los extractos al entrar en contacto con el NH<sub>4</sub>OH (Rivas, Oranday y Verde, 2016).
- **Cumarinas** (Ensayo de NH<sub>4</sub>OH concentrado): Se utilizaron los mismos tubos que en el ensayo anterior, pero se llevaron a la lámpara UV para observar una fluorescencia, lo que indicaría que la prueba es positiva (Domínguez, 2016).
- **Quinonas** (Ensayo de reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): Se tomó la cápsula de porcelana y se rotuló en cada extremo con las letras H de hexano y se colocó una porción del extracto de hexano; y el otro extremo se rotuló con la letra M de metanol, donde se agregó una porción de extracto de metanol. A cada porción se le añadió unas gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, es positivo cuando aparece un color rojo intenso (Domínguez, 2016).
- **Lactonas sesquiterpenos** (Prueba con NaOH al 10 %): Dos tubos contentivos de una porción del extracto de hexano y de metanol, fueron llevados a la campana de extracción para agregarle 1 mL de

NaOH al 10 % y HCl concentrado, para así observar que el color amarillo naranja desaparece y reconocer la prueba con resultado positivo (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

- **Glucósidos cardiotónicos** (Prueba de Keller-Kilani): Se tomaron dos tubos; un tubo con una porción de extracto de hexano y otro con extracto de metanol, y se disolvieron ambos con agua destilada; se llevaron a la campana de extracción.

Se tomaron dos tubos más y se les añadió 2 mL de  $H_2SO_4$ . A los tubos con los extractos respectivos y el agua destilada, se le añadió 2 mL de ácido acético glacial y unas gotas de  $FeCl_3$ . Con ayuda de una pipeta, se tomó de una porción de los tubos con ácido acético y  $FeCl_3$ , y se les agregó a los tubos que contienen  $H_2SO_4$ . La formación de un anillo verdoso-azul (en la interfase) indica que el ensayo es positivo (Veloza, Matulevich y Castrillón, 2014).

### **Determinación de la actividad antifúngica de los extractos de las semillas de *Pouteria sapota* por difusión en disco (Kirby-Bauer)**

La investigación se realizó en el Laboratorio de Micología “Dr. Corrado Capretti”, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, bajo la asesoría de los Profesores, Clara Díaz y Alexander Moreno.

#### **Preparación de la muestra**

Los extractos obtenidos de hexano y metanol, se llevaron a una concentración de 10 mg/mL o (10000 ppm). El solvente utilizado fue para el extracto de hexano (hexano) y el extracto de metanol (Dimetilsulfóxido, DMSO).

### **Preparación de los discos**

Los discos son papel de filtro de 6 mm de diámetro, se organizaron en placas de Petri y se esterilizaron bajo luz ultravioleta (LUV) durante 90 minutos previos al ensayo. Luego, se impregnaron con 10 µL de los extractos para el ensayo antifúngico.

### **Evaluación de la Actividad antifúngica del extracto de *Pouteria sapota***

La investigación se realizó por el método de difusión en agar con discos descrita por Martín, Péman y Rubio (2001), frente levaduras de referencia internacional: *Candida albicans* (CDC-B385) y *Candida krusei* (ATCC 6258). Merece importante mención que estas cepas fueron donadas por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

### **Preparación de los Inóculos**

Los inóculos se prepararon con las cepas de referencia internacional a partir de un cultivo fresco de 24 h, en un tubo con solución salina y se llevaron a una turbidez correspondiente al del patrón de McFarland Nº 0,5 ( $1,5 \times 10^{6-8}$  UFC/mL, UFC: unidades formadoras de colonias).

### **Preparación de las placas de Petri e inoculación**

Se agregaron 20 mL agar Müller-Hinton modificado (HIMEDIA®) suplementado con 2 % p/v de glucosa y azul de metíleno (0,05 µg/mL), se dejó solidificar y se les impregnó con un hisopo estéril el inóculo preparado anteriormente de cada cepa fúngica de referencia en forma uniforme por toda la placa, luego se le colocaron en la superficie del agar los discos impregnados con los extractos (10 µL) y los antifúngicos como controles positivos (Fluconazol® 25 µg para *Candida albicans* CDC385 y Voriconazol®

25 µg para *Candida krusei* ATCC 6258) y hexano y DMSO como control negativo.

### **Determinación de la actividad antifúngica**

El agar Müller-Hinton modificado se incubó en una estufa por 24 - 48 horas a 37 °C en presencia de oxígeno. Luego del periodo de incubación, se midieron los halos de inhibición alrededor de los discos, expresando los datos en mm, para determinar la sensibilidad o Resistencia, este ensayo se realizó por duplicado.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## **Diseño de Análisis**

Se refiere a la estrategia que adopta el investigador para responder al problema, dificultad o inconveniente planteado en el estudio (Palella y Martins, 2010). Los resultados que se obtuvieron en esta investigación son de tipo cualitativo puesto que se realizaron diferentes pruebas que arrojaron datos no numéricos ya que se basan en las descripciones y observaciones. Por otra parte se hizo uso de los halos de inhibición, los cuales se midieron dando un enfoque cuantitativo.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

En este capítulo se expresan los resultados del tamizaje fitoquímico y análisis de la actividad antifúngica de los extractos de las semillas de *Pouteria sapota*, además, describe las deducciones de la investigación, su debida interpretación y posterior análisis.

Estos resultados se presentan en tablas para una mejor comprensión; en el caso de los extractos obtenidos y sus metabolitos, se expresan cualitativamente, basado en la positividad o negatividad de la prueba, lo que indica la presencia o ausencia del metabolito secundario. Con referencia a la actividad antifúngica, los resultados se enuncian tomando en cuenta la sensibilidad o resistencia de las cepas de *Candida albicans* y *Candida krusei*, dado por la medición del halo de inhibición; quedando establecidos de la manera siguiente:

**Tabla 6.** Características físicas del extracto de hexano y de metanol de las semillas de *Pouteria sapota*.

Características	Hexano	Metanol
Aspecto	Aceitoso	Viscoso
Color	Naranja	Verde intenso
Olor	Característico	Característico

**Fuente:** Lemus, Pereira y Lara (2024).

Se realizó la determinación del % de rendimiento de los extractos (Tabla 7) aplicando la siguiente formula:

$$\%R = \frac{\text{Peso final del extracto obtenido}}{\text{Peso inicial de la muestra}} \times 100$$

**Tabla 7.** Resultados obtenidos del porcentaje de rendimiento (hexano y metanol)

	<b>Extracto de hexano</b>	<b>Extracto de metanol</b>
Material seco y molido	492,41 g	492,41 g
Peso más frasco	42,53 g	17, 48
% de rendimiento	8,64 %	3,55 %

#### **Resultados del análisis fitoquímico preliminar de los extractos de las semillas de *Pouteria sapota***

En el resultado del tamizaje de las semillas de *Pouteria sapota* (tabla 8), se puede observar que, de la variedad de metabolitos secundarios analizados, solo se reporta la presencia de triterpenos/esteroles para ambos extractos, y quinonas en cantidad abundante para el extracto de metanol.

**Tabla 8.** Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de las semillas de Pouteria sapota

Metabolitos	Pruebas químicas	Extracto hexano	Extracto metanol
Alcaloides	Dragendorff Wagner Mayer	- - -	- - -
Triterpenos	Libermann-	-	-
Esteroides	Burchard	+	+
Compuestos fenólicos	FeCl <sub>3</sub>	-	-
Saponinas	Espuma	-	-
Taninos	Gelatina al 1 %	-	-
Flavonoides	Shinoda NaOH 10 %	- -	- -
Cumarinas	NH <sub>4</sub> OH	-	-
Antraquinonas	NH <sub>4</sub> OH	-	-
Quinonas	Cápsula con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	+++
Lactonas (sesquiterpernos)	NaOH al 10 % con HCl	-	-
Glucósidos cardiotónicos	Keller-Kilan	-	-

Leyenda: Presente (+); moderado (++); abundante (+++); negativo (-)

Fuente: Lemus, Pereira y Lara, 2024.

Asimismo, para la identificación de los metabolitos secundarios se llevaron a cabo una serie de pruebas específicas para cada metabolito a detectar.

Se comenzó con la determinación de alcaloides mediante el uso de los reactivos de Dragendorff (tetrayodo bismuto de potasio), Wagner (yoduro de potasio) y Mayer (mercurio tetrayoduro de potasio), estos ensayos son los que permiten detectar alcaloides presentes en el material vegetal, al cabo de algunos días, se hizo la lectura obteniéndose que las semillas de *Pouteria sapota* no contiene alcaloides (figura 17), ya que no hubo cambio de reacción en las pruebas realizadas.

**Figura 17. Resultado de las pruebas Drangendorff, Wagner y Mayer para la detección de alcaloides.**



**Fuente:** Lemus, Pereira y Lara (2024).

En el caso de los triterpenos/esteroles, se determinó por el ensayo de Liebermann- Burchard que permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides,

El resultado, en este caso, fue positivo. Se observó una coloración verde, aunque sin intensidad, y esa coloración fue vista en ambos extractos (hexano

y metanol), lo que deja inferir que las semillas de *Pouteria sapota*, entre sus metabolitos secundarios, contiene triterpenos y esteroles; quizá en poca cantidad, ya que la positividad se expresó con una cruz (+) indicativo de la presencia de este metabolito en la especie vegetal analizada (figura 18).

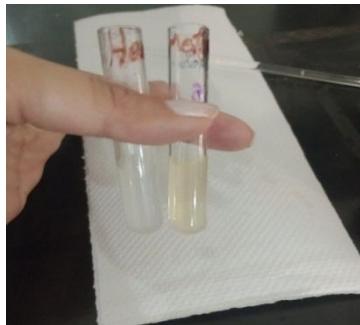
**Figura 18. Resultado del ensayo de Liebermann- Burchard para la detección de triterpenos/esteroles**



**Fuente:** Lemus, Pereira y Lara (2024).

En ese orden de ideas, para detectar saponinas se empleó la prueba de altura y estabilidad de espuma, esta permite reconocer la presencia de saponinas. En el caso de los extractos de las semillas de *Pouteria sapota* no hubo formación de espuma en ninguno de los tubos (figura 19), por lo tanto, el resultado es negativo. Puesto que la cantidad de espuma y altura no se formó.

**Figura 19. Resultado de la prueba de altura y estabilidad de espuma para la detección de saponinas**



**Fuente:** Lemus, Pereira y Lara (2024).

Con respecto a los taninos, se realizó el ensayo de gelatina al 1 %. En el caso de los extractos de las semillas de *Pouteria sapota* no hubo formación de precipitado blanco (figura 20), dando negativo la prueba.

**Figura 20. Resultado de la prueba de gelatina al 1 % para la detección de taninos**



**Fuente:** Lemus, Pereira y Lara (2024).

En cuanto a los compuestos fenólicos, se hizo el ensayo de  $\text{FeCl}_3$ ; la prueba del cloruro férrico es utilizada para determinar la presencia o ausencia de fenoles en una muestra. Para el caso de los extractos de las

semillas de *Pouteria sapota*, no hubo cambio en la coloración en los tubos (figura 21), por lo que resulta negativo para este metabolito.

**Figura 21. Resultado del ensayo de  $\text{FeCl}_3$  para la detección de compuestos fenólicos**



**Fuente:** Lemus, Pereira y Lara (2024).

Por otro lado, el ensayo de Shinoda, permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal. El resultado para el caso de las semillas de *Pouteria sapota* fue negativo (figura 22).

Se confirmó el resultado con el método de NaOH al 10 %; No hubo viraje en el color de los tubos por lo que el resultado fue negativo para la presencia de flavonoides en los extractos de semilla de *Pouteria sapota*.

**Figura 22. Resultado del ensayo de Shinoda para la detección de flavonoides**



**Fuente:** Lemus, Pereira y Lara (2024).

**Figura 23. Resultado de la prueba confirmatoria de NaOH al 10 % para la detección de flavonoides**



**Fuente:** Lemus, Pereira y Lara (2024).

Para determinar la presencia de antraquinonas se empleó la reacción de hidróxido amónico ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). En el caso de los extractos de las semillas de *Pouteria sapota* el resultado fue negativo porque no hubo cambio de color (figura 24).

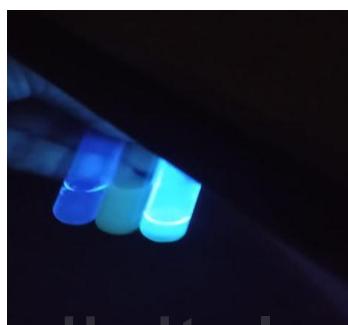
**Figura 24. Resultado de la prueba de reacción de  $\text{NH}_4\text{OH}$  para la detección de antraquinonas**



**Fuente:** Lemus, Pereira y Lara (2024).

En relación con las cumarinas, el ensayo para su determinación fue el NH<sub>4</sub>OH concentrado, mismo para detectar antraquinonas. Se hizo la lectura en presencia de luz UV, pero no se observó la fluorescencia, por lo tanto, el resultado es negativo (figura 25). Los extractos de las semillas de *Pouteria sapota* no presentan en su estructura metabólica las cumarinas.

**Figura 25. Resultado de la prueba de reacción de NH<sub>4</sub>OH concentrado para la detección de cumarinas**



Fuente: Lemus, Pereira y Lara (2024).

Asimismo, se realizó el ensayo de reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El resultado para el extracto de hexano de las semillas de *Pouteria sapota* fue negativo, pues no hubo cambio en la coloración; pero para el extracto de metanol se observó la aparición del color rojo intenso indicativo de una prueba positiva. En este caso, se expresó altamente positivo (+++) (figura 26).

**Figura 26. Resultado de la prueba de reacción de  $H_2SO_4$  para la detección de quinonas**



**Fuente:** Lemus, Pereira y Lara (2024).

Seguidamente, para detectar la presencia de lactonas sesquiterpenos se hizo uso de la prueba de NaOH al 10 % con HCl. En el caso de los extractos de las semillas de *Pouteria sapota*, se mantuvo el color amarillo naranja (figura 27), por lo tanto, se deduce que la prueba es negativa.

**Figura 27. Resultado de la prueba de reacción de NaOH al 10 % con HCl para la detección de lactonas sesquiterpenos**



**Fuente:** Lemus, Pereira y Lara (2024).

Por último, se llevó a cabo la prueba para glucósidos cardiotónicos y así determinar la presencia de este metabolito. En el caso de los extractos de las semillas de *Pouteria sapota* el resultado fue negativo (figura 28).

**Figura 28. Resultado de la prueba Keller-Killiani para la detección de glucósidos cardiotónicos**



**Fuente:** Lemus, Pereira y Lara (2024).

**Resultados de la determinación de la actividad antifúngica de los extractos obtenidos de las semillas de *Pouteria sapota***

Los compuestos antifúngicos de plantas y partes de ellas pueden encontrarse en tejidos vegetales externos, como corteza, cáscara y cutícula; otros están ubicados en toda la planta, y son tan diversos como fenoles simples, flavonoides, isoflavonoides, cumarinas, isocumarinas, sesquiterpenoides, polienos, estilbenos, furanoterpenoides y han llamado la atención como una alternativa natural al uso de componentes de origen sintético para el control de hongos (Kuc 1992 citado en Rodríguez y

Martínez, 2023); desde este apartado se interpreta el resultado de esta investigación.

A continuación, se encuentran los resultados de esta fase de la investigación (tabla 9). Se especifican las cepas, los extractos a una concentración de 10000 ppm, los controles, y la susceptibilidad.

**Tabla 9.** Resultados de la actividad antifúngica de los extractos de las semillas de *Pouteria sapota*.

Microorganismos (Hongos)	Zona de inhibición (mm *)					
	[ ] 10 mg/ml		Controles (+)		Controles (-)	
	EHPS	EMPS	FLU	VOR	EH	DMSO
<i>Candida albicans</i>						
CDC-B385	—	7*	50*		—	—
<i>Candida krusei</i>						
ATCC-6258	10*	7*		20*	—	—

**Leyenda:** [ ]: concentración, **EHPS:** Extracto de hexano de *Pouteria sapota*, **EMPS:** Extracto de metanol de *Pouteria sapota*, **FLU:** Fluconazol, **VOR:** Voriconazol, **EH:** Extracto hexano, **DMSO:** Dimetilsulfoxido.

**Elaborado por:** Lemus, Pereira y Lara, (2024)

## Cepas de la actividad antifúngica

*Candida albicans* (CDC-B385) y *Candida krusei* (ATCC 6258).



**Figura 29.** Crecimiento de *Candida albicans* y *Candida krusei*



**Figura30.** Ensayo del extracto de hexano en *Candida albicans*



**Figura 31.** Ensayo del extracto de hexano en *Candida krusei*



**Figura 32.** Ensayo del extracto de metanol en *Candida albicans*



**Figura 33.** Ensayo del extracto de metanol en *Candida krusei*

## Discusiones

Se logró identificar en los extractos de hexano y de metanol de las semillas de *Pouteria sapota* solo la presencia de quinonas y triterpenos, al contrario de los estudios realizados utilizando la pulpa de la fruta, donde se ha reportado la presencia en cantidades considerables de carotenoides y compuestos fenólicos, estos metabolitos se han asociado con la disminución de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Alia y cols, 2005).

De igual modo, conviene citar a Torres y cols (2019), quienes extrajeron y cuantificaron los compuestos fenólicos (proantocianidinas) en grandes cantidades de la pulpa de *Pouteria sapota*. En su estudio, reportaron la presencia de estos compuestos para luego analizar su actividad enzimática, lo que lleva a mencionar que los estudios sobre esta especie se ha limitado al análisis de la pulpa y residuos de la fruta como la cáscara y las hojas, como fue el caso de Rodríguez y Martínez (2023), quienes, sin caracterizar los metabolitos encontrados, extrajeron los extractos y analizaron su actividad antimicrobiana, resultando en la presencia de metabolitos en los residuos utilizados, dada por la actividad encontrada. Cabe mencionar a Maza y Paucar (2020), los cuales en su trabajo de investigación dieron a conocer las propiedades funcionales de *Pouteria lucuma* y sus componentes bioactivos como fenoles, carotenoides y sus derivados, estos fueron analizados del fruto. En su estudio, reportaron la presencia de estos metabolitos secundarios para luego concluir que dichos compuestos poseen propiedades benéficas como antioxidantes, anticancerígenos entre otros. Cabe destacar que el estudio reportado por estos autores sirven de base para esta investigación ya que la especie de *Pouteria sapota* también contiene diversos metabolitos secundarios en algunas partes de la planta

Además, los reportes encontrados sobre los estudios de *Pouteria sapota*, se basan en otras estructuras de esta especie, no en la semilla, a pesar de ser una planta ampliamente usada en distintos países de Latinoamérica, con fines gastronómicos y farmacológicos de manera tradicional (Ibarra, 2005). Por lo tanto, los resultados de esta investigación podrían ser el punto de partida para profundizar sobre la detección de otro tipo de compuestos que se encuentren en la semilla de *Pouteria sapota*; aunque solo se tenga resultados positivos para triterpenos y quinonas.

Por otro lado, basado en las investigaciones que preceden a esta, y en las teorías consultadas, los efectos biológicos correspondientes a este tipo de compuestos como los triterpenos son muy diversos y pueden ser resumidos como, anti-tumorales, anti-inflamatorios, anti-VIH, antimicrobianos, cardioprotectores, analgésicos, anti-micóticos, anti-quimiopreventivos, entre otros (Cano, 2013). Cabe destacar que en los extractos de hexano y de metanol de las semillas de *Pouteria sapota* a una concentración de 10000 ppm tenían este metabolito; y los resultados de la actividad antifúngica de los mismos constataron que la cepa de *C. krusei* presenta sensibilidad ante ambos extractos, y *C.albicans* es sensible solo en presencia del extracto con metanol, pues resistente para el caso del hexano. Por lo tanto los triterpenos hoy en día están siendo tendencia por las grandes farmacéuticas que quieren obtener compuestos farmacológicamente activos.

Tal sensibilidad y resistencia se obtuvo luego de la medición de los halos de inhibición por el método de difusión en agar con disco, que al ser igual o mayor a (7 mm) se debe considerar sensible Araque y cols (2007). En este caso, el extractos de hexano de las semillas de *Pouteria sapota* inhibió a *Candida krusei* ya que al medir el halo de inhibición dio una medida de (10 mm) de diámetro, mientras que para *Cándida albicans* dio resistencia a tal

extracto. En cuanto al extracto de metanol al medir dichos halos arrojaron el mismo resultado, (7 mm) para ambas cepas, lo que da a entender de que esto pudo ser gracias al uso de papel filtro Whatman ya que se componen de celulosa (uniones  $\beta$ -(1-4) de monómeros de glucosa), los cuales tienen muchos grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa, haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica, interviniendo directamente con algunos compuestos polares de los productos naturales, absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión de estos en el agar, los compuestos apolares pueden no ser influenciados por dichos grupos hidroxilos y difundir fácilmente en el agar y eso se puede constatar ya que el extracto de hexano pudo difundir de manera más fácil y por ende inhibir a *Candida krusei* puesto que al medir el halo este nos dio un valor de (10 mm). Entonces, se debe mencionar que en la investigación de Rodríguez y Martínez (2023) todos los extractos de residuos de frutos de *P. sapota* inhibieron el crecimiento micelial de *Alternaria* spp. En pruebas *in vitro*, pero la cascara y la fracción obtenida de la almendra desgrasada que se consideran especialmente un desecho, mostraron el mejor efecto antifúngico estadísticamente diferente, apoyados en esto, se deduce entonces que los extractos de la semilla de *P. sapota* podrían ser una alternativa en el desarrollo de fungicidas de origen natural. Aunque se tratan de especies de hongos distintas, está el precedente de que la semilla de mamey presentó actividad antifúngica contra *Alternaria* spp, por lo tanto, también puede inhibir el crecimiento de *Candida albicans* y *Candida krusei*.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones:

La actividad antifúngica de los extractos de plantas han sido reconocidos durante años. En el presente estudio se investigó la actividad antifúngica de los extractos de hexano y de metanol de las semillas de *Pouteria sapota*, dejando las siguientes conclusiones:

- De la especie *Pouteria sapota* se logró obtener los extractos de hexano y de metanol mediante el método de extracción por reflujo proveniente de la semilla de esta, donde los mismos mostraron un rendimiento de 8,64 % y 3,55 % para hexano y metanol.
- En el tamizaje fitoquímico de los extractos de las semillas de *Pouteria sapota*, los metabolitos secundarios detectados en los extractos de hexano y de metanol de *Pouteria sapota* fueron esteroles en escasa cantidad (+), y quinonas en cantidad abundante (+++), asimismo se estableció la ausencia de alcaloides, saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, antraquinonas, cumarinas y glicósidos cardiotónicos.
- El extracto de hexano de las semillas de *Pouteria sapota* a una concentración de 10000 ppm fue inactivo frente a la cepa *Candida albicans*, por lo tanto, se considera resistente; mientras que con la cepa de *Candida krusei* el mismo presento actividad antifúngica (10 mm), y el extracto de metanol a la misma concentración reportó actividad antifúngica (7 mm) frente a ambas cepas lo que demuestra sensibilidad frente a este extracto.

- Además con este estudio, se aportan nuevos datos sobre la fitoquímica y actividad biológica de la especie *Pouteria sapota*.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## **Recomendaciones**

- Profundizar en el estudio de los componentes químicos de los extractos de *Pouteria sapota*.
- Ampliar la investigación en la búsqueda de otros metabolitos secundarios de la especie estudiada.
- Emplear otro tipo de metodologías más precisas y sensibles para la determinación de los metabolitos secundarios de *Pouteria sapota*.
- Investigar la actividad antifúngica de la especie *Pouteria sapota* con cepas de otra especie de hongos.
- Extraer el aceite esencial de *Pouteria sapota* e investigar su actividad antimicrobiana y así ampliar los estudios sobre la especie estudiada.

**www.bdigital.ulav.ve**

## REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Abarca, R. (2017). "Antioxidantes naturales-preventivos de enfermedades", *Vórtice*, 4(14) 18-19.
- Abdala, L. (2000). Flavonoids of *Tagetes stenophylla* Robinson (Asteraceae) as taxonomic markers. *Biochemical Systematics and Ecology*. 9:62-64
- Albornoz, A. (1980). Productos naturales, sustancias y drogas extraídas de las plantas. Caracas. Universidad Central de Venezuela.
- Alia, T., Soto, R. Hernández, Colinas M. (2005). Análisis preliminar de carotenoides y compuestos fenólicos en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore & Stearn I. *Revista chapingo serie horticultura*, 11(2) 225-231.
- Alonso, J. (2004). Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos (Primera Edición) Rosario-Argentina. CORPUS.
- Amaringo, F., Hormaza, A. y Arias, M. (2011). *Thevetin* B: glicósido cardiotónico predominante en *Thevetia peruviana*. *Scientia Et Technica*, 16(49) 298-303.
- Araque, M., Longa, A., Ramírez, A. y Velazco, E. (2007). Manual práctico de microbiología clínica aplicada. Mérida-Venezuela:ULA
- Arenas E. (2005). Antifúngicos de uso clínico. Análisis de un laboratorio de Micología. *Revista Ciencia y Trabajo*. 15(1):52-67.
- Argueta, Z., y Vásquez, M. (2009). Aplicación del método Mitscher en la determinación de la actividad antimicrobiana de un preservante natural patentado sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*

*aeruginosa* y *Candida albicans*. (Trabajo de investigación). El Salvador. Universidad del Salvador.

Arias, F. (2012). El proyecto de investigación. Introducción a la metodología científica. Caracas-Venezuela. Episteme. 21-28.

Aronés, M., Cárdenas, E., Luna, H., Barbarán., y Gómez, M. (2022). Tamizaje fitoquímico contenido de compuestos fenólicos y potencial antioxidante de trece plantas medicinales de los afloramientos rocosos del Bosque de Piedras de Huaraca en Perú: *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 88(2) 165-179.

Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reducta Biología*. 2 (3),119-145.

Avendaño M. (1993). Introducción a la Química Farmacéutica. 2da ed. Madrid: Elsevier.

Azurdia, C. (2006). Tres especies de zapote en América tropical (*Pouteria campechiana*, *P. sapota* y *P. viridis*). In Ch. Clement, J. Williams, R. Smith & N. H. Southampton (eds). Inglaterra. Center for Underutilised Crops, Universidad de Southampton, Southampton, UK.

Bayuelo J. (2006). Caracterización morfológica del sapote mamey (*Pouteria sapota*) del centro occidente de Michoacan, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29(1) 9-17.

Bermejo, A., Pereira, S., y Cabrera, I. (2014). Determinación de parámetros químico-físico de las tinturas al 20% obtenidas de las hojas, tallos y frutos de *Melia azedarach* L (Pursiana), Cuba. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 13(5) 670-680.

Biasoli, M. (2008). Estructura y actividad de los antifúngicos, Cuba. *Revista cubana de Farmacia*, 39(2), 1-1.

- Bidart T. (2004). Lo antiguo y lo nuevo en antifúngicos y antivirales. *Revista Chilena Infecto*, 22:40-5.
- Bonifaz, A. (2012). Micología Médica Básica. 4th Edition, Editorial McGraw Hill, México, 61-97
- Botella A. (2003). Manual del auxiliar de farmacia, módulo I. Editorial Mad. España. 479.
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, Fotoquímica Plantas Medicinales (Segunda Edicion ed.). Zaragoza: Editorail Acribia S.A.
- Caldas, A. (2012). Optimización, escalamiento y diseño de una planta piloto de extracción sólido líquido (Trabajo de grado), España, Universidad de Cuenca.
- Cañigueral, S., Dellacassa, E., y Bandoni, A. (2003). Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 22(3), 265-278.
- Carranza, E. (2005). Sapotaceae. Mexico. Conacyt.
- Carvajal, L., Hata, Y., Sierra, N., y Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá: *Revista Colombia Forestal*, 12(1), 161-170.
- Cano-Flores, A., (2013). Biotransformación de triterpenos con diferentes microorganismos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 44(2), 7-16.
- Casado, E. (2012). Operaciones básicas de laboratorio. Editorial Paraninfo. España.
- Casamitjana, N. (2002). Glucósidos cardiotónicos. Acción y usos Centro de Información del Medicamento. España. 16(4) 90-94.

- Casas, G. (1989). Micología General. Caracas. Universidad Central de Venezuela. Ediciones de la Biblioteca, pp. 247.
- Castillo, J. (2018). Enfermedades causadas por hongos. *Revista de Salud*. 4: 6-8.
- Coronel, C. (2023). Las variables y su operacionalización. *Archivo Medico Camagüey*. Cuba, 27(1).
- Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. American Society for Microbiology. 12: 564-565.
- Crews, C., y Berthiller, R., (2010). Update on analytical methods for toxic pyrrolizidine alkaloids. *Analítica Bioanalítica Chemistry*, 396(1), 32-38.
- De Paula, J. y Martínez, A. (2000). Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rosaceae urticaefolius*. En *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 5(1), 26-29.
- Delgado, G. (2005). Los productos naturales orgánicos: su diversidad estructural y origen químico. México. Revista ciencia, 7(1),1-1.
- Diomedi A. (2004). Nuevos antifúngicos: las equinocandinas. Chile. *Revista Chilena Infectol.* 21(2), 89-101.
- Domínguez, A. (2016). Etnobotánica aplicada: extractos naturales utilizados en agricultura ecológica (Trabajo de investigación). Ecuador, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Domínguez, X. (1973). Métodos de investigación fitoquímica. México. Limusa.
- Fouque, A. (1972). "Famille des Sapotacees." *Fruit*, 27, 675-703

- García, R., Cruz, F., Alarcon, F., Nieto, A., y Gallegos, M. (2019). Análisis fitoquímico cualitativo de los extractos acuosos de *Thalassia Testudinum* Banks ex koning et sims de la localidad de Champotón, Campeche, Mexico, Polibotánica, 48, 151-168.
- Gimeno, E. (2004). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. Ámbito Farmacéutico. Nutrición, 23(6) ,80-84.
- Ginnis, M. y Rinaldi, M. (1996). Selección de Hongos de Importancia Médica y algunos sinónimos Comunes y Nombres Obsoletos. Las Micosis en Venezuela. 10 (28), 49-53.
- González, E., López, E., González, E. y Tena, F. (2004). Plantas medicinales del estado de Durango. México. 25-31.
- Gregorí, V. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. Cuba. *Revista Cubana de Farmacia*. 39(2), 1-1.
- Guarnizo, A., y Martínez, P. (2000). Experimentos de química orgánica Con enfoque en ciencias de la vida. Armenia, Colombia: Ediciones Elizcom.
- Guerrero, C. (2013). Principios de química orgánica. Guía de laboratorio. Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Química.
- Harborne, J. (1980). Plant phenolics. Encyclopedia of Plant Physiology.New York: Springer-Verlag.
- Harborne, J. (1989). General procedure and measurement of total phenolics. In: Methods in plant biochemistry. Academic Press, USA.
- Hautala T. (2007). Cluster of *Candida krusei* infections in a haematological unit. BMC Infectious Diseases, 7(97), 10-20.

- Hay, R. (1986): Systemic candidiasis in heroin addicts. *British Medical Journal*. 292(6528), 1096.
- Herrera T. y Ulloa, M. (1998), El reino de los hongos micología básica y aplicada, Mexico. Editorial fondo de cultura económica, segunda edición UNAM.
- Herrera, I., Quimis, K., Sorroza, N., García, F., Mariscal, W. y Mariscal, R. (2017). Determinación de taninos y cumarinas presente en la planta tres filos (Trabajo de investigación). Guayaquil, Ecuador Universidad de Guayaquil.
- Hill, A. (1965). Botánica Económica, plantas útiles y productos vegetales. Barcelona. Omega.
- Ibarra, E. (2005). Morfología de hojas y fenología en selecciones de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. Moore y Stearn) de Alpoyeca, Gro., y Cazones (Trabajo de investigación). Mexico. Colegio de postgraduados.
- Isaza, J. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et technica*, 1(33), 13-18.
- Kukachka, B (1982). *Wood anatomy of the neotropical Sapotaceae. XXXIV, Franchetella-Eremoluma*. Forest Products Laboratory.
- Lamarque, A. (2008). Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica. (1º ed). Córdoba, Argentina. Editorial Encuentro.
- León, A. y L. Poveda. 2000. Los nombres comunes de las plantas de Costa Rica. In P. Sánchez (ed.) 1a ed. Guayacán, San José, Costa Rica.
- León, B. (2006) El libro rojo de las plantas endémicas del Perú. *Revista Perú*. 13(2) 9-22.

Lobato, S. 1998. Desarrollo de métodos de propagación para la conservación y propagación de *Pouteria sapota* (Jacq). (trabajo de grado). Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza para el Desarrollo y la Conservación (CATIE).

López, M. (2012). Manual de Plantas Medicinales Para Guinea Ecuatorial. España. Fundación de Religiosos para la salud (FRS).

Lyss G, Knorre A, Schmidt T, Pahl H y Merfort I. (1998). The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor NF-kappa B by directly targeting p65. *Journal of Biological Chemistry.* 273(50), 33508-33516.

Malpartida, R, Chagua, P. Echevarría J. y Adama, J. (2021). Lúcuma (*Pouteria lúcuma*): Potencial bioactivo y agroindustrial del valle interandino peruano. *Revista Científica Multidisciplinaria,* 5(2), 1250-1266.

Marcano, D. y Hasegawa, M. (1991). Fitoquímica orgánica. Universidad Central de Venezuela. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Caracas

Masullo, M., Cerulli, A., Pizza, C., & Piacente, S. (2021). *Pouteria lucuma* Pulp and Skin: In Depth Chemical Profile and Evaluation of Antioxidant Activity. *Molecules* (Basel, Switzerland), 26(17).

Martín E., Péman F. y Rubio M. (2001). Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. *Revista Iberoamericana de Micología,* 28(1), 36-42.

Martínez, A. (2020). *Química de Productos Naturales.* Colombia: Universidad de Antioquia.

Martínez, R. (2005). Estudio Comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibiótico de administración intravenosa a través de métodos in vitro. Cefepime Clorhidrato. (Trabajo de Grado). Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.

Maza, R., y Paucar, L. (2020). Lúcuma (*Pouteria lucuma*): Composición, componentes bioactivos, actividad antioxidante, usos y propiedades

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.

beneficiosas para la salud. *Scientia Agropecuaria* 11(1), 135-142.

Miguel, G., Cruz, C., Faleiro, M., Simões, M., Figueiredo, A., Barroso, J., y Pedro, L. (2011). Aceites esenciales de *Salvia officinalis* L.: efecto del tiempo de hidrodestilación sobre la composición química, actividades antioxidantes y antimicrobianas. *Investigación en productos naturales* , 25 (5), 526-541.

Mora, J. (2007). Implementación y desarrollo de la técnica de potencia microbiológica de antibióticos y su impacto económico en la empresa Calox S.A. Trabajo de Investigación (Ingeniería en Biotecnología). Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Morera, J. (1982). El zapote. Unidad de Recursos Genéticos. Turrialba, Costa Rica. *Unidad de Recursos Genéticos*.

Olivares., D. (2011). Candidiasis o Candidosis. Universidad Autónoma de México.

- Ortuño M. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Editorial Aiyana. España. 223-224
- Palella, S., y Martins, P. (2010). Metodología de la Investigación Cuantitativa. Caracas Venezuela. Fedupel.
- Panizo, M. y Reviakina, V. (2001). Candida albicans y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21(2), 38-45.
- Peñarrieta, J., Tejeda, L., Mollinedo, P., Vila, J., Bravo,J.(2014). Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Revista Boliviana de Química*, 31 (2) ,68-81.
- Perez, A. y Jimenez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro* Instituto de Biotecnología de las Plantas (trabajo de grado). Cuba. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas.
- Pérez, M., y Mota, M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 23-42.
- Pfaller, M., Diekema, D., Gibbs, D., Newell, V., Nagy, E. y Dobiasova, S. (2008). Candida krusei, un patógeno fúngico oportunista resistente a múltiples fármacos: tendencias geográficas y temporales del Programa de Vigilancia Antifúngica ARTEMIS DISK, 2001 a 2005. *Journal of clinical microbiology* , 46 (2), 515-521.
- Pino, J., Marbot, R., Sauri, E., y Zumárraga, C. (2006). Volatile components of sapote [*Pouteria sapota* (Jacq.) HE Moore et Stern] fruit. *Journal of Essential Oil Research*, 18(1), 22-23.
- Quesada, P. (1996). Inventario de la variabilidad genética del zapote (*Pouteria sapota*) en Costa Rica. BOLTEC 29: 48-67.

- Radi A. 1999. Estudio de la agroindustrialización del zapote. (trabajo de grado) Guatemala. Universidad del Valle de Guatemala.
- Ramírez, E., Árias, A., Vásquez, E., Martínez, J., y Stashenko E. (2012). Rendimiento y capacidad antioxidante de extractos de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia officinalis* y *Psidium guajava* obtenidos con CO<sub>2</sub> supercrítico. Academia Colombiana de ciencia 36(140), 305-316
- Ramírez, S., y Castaño, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15(42), 263-266.
- Ramos, S. (1999). Caracterización morfológica y fenológica in situ de materiales genéticos del injerto (*Pouteria viridis*) y zapote (*Pouteria sapota*) en cuatro municipios del departamento de Quiche. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Rios, J, Recio, M, y Villar, A. (1988). Métodos de detección de productos naturales con actividad antimicrobiana: una revisión de la literatura. *Revista de Etnofarmacología*. 23 (2-3), 127-149.
- Rivas, C., Oranday, M., y Verde, M. (2016). Investigación en plantas de importancia clínica. México. *Omniascience*.6. 351-410.
- Rodríguez, V. y Martinez, N. (2023). Actividad antifúngica de residuos de mamey contra *Alternaria* spp. *Pádi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 10(20), 40-43.
- Rojas, J. (2019). Los productos naturales y sus beneficios para el ser humano. Ponencia presentada durante la incorporación como miembro correspondiente estadal de la Academia de Mérida, Mérida, (Venezuela).

- Sanz, I. (2002). Prácticas de química orgánica: experimentación y desarrollo. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. España.
- Sepúlveda, G., Porta, H., y Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología, 21 (3),355-363.
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos (Primera Edicion ed.). Santafé de Bogotá: CYTED.
- Shiva, C. (2007). Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibioticos promotores de crecimiento. (Trabajo de investigación). España. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Swenson, U. y A. Anderberg. (2005). Phylogenetic, character, evolution and classification of Sapotaceae (Ericales). Cladistic 21:101-130
- Torres, A., Salinas, M, Valle, S., Soto, R, y Alia, I. (2019). Proantocianidinas y actividad enzimática en frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota*) durante la maduración. *Revista Bio ciencias*, 6-16
- UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PATAGONIA AUSTRAL. (2012) Microbiología y Parasitología.
- Usano, J., Palá, J., Díaz, S. (2014). Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacterian. *Reduca (Biología)* (2): 60-70
- USDA. (2012). Evaluation of the USDA Fruit and Vegetable Pilot Program. National Agricultural Statistics Service. News Releases
- Valdés, G. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39(2), 1-1.

Velázquez, K., y Alvarado, B. (2015). Historia del mamey *Pouteria sapota*. Revista Iberoamericana de Ciencias. 2(3), 1-9.

Veloza, W., Matulevich, J., y Castrillón, W. (2014). Triterpenos y esteroles de *Salvia leucantha* (Lamiaceae) y evaluación de su capacidad antioxidante. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 10(1), 68-79.

Volk, W., Benjamin, D., Kadner, R., y ParsonS, J. (1989). Microbiología Médica. Interamericana Mc Graw-Hill. 3ra Edición.

Zapata, J. (2002). Patentabilidad de los extractos vegetales. (Trabajo de grado). España. Universidad de Barcelona.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)