



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



PERFIL FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS HOJAS
DE LA *Aldama dentata* La Llave & Lex.

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

www.bdigital.ula.ve

Tesistas:

Maria Gabriela Valero Albornoz

C.I: V- 22.659.351

Maria De Fatima Márquez

C.I: V- 25.004.799

Tutor:

Prof. Jhender Fernández

Mérida, Julio de 2024

DEDICATORIA

A Dios y a la virgen María de Guadalupe por darme la oportunidad de llegar hasta aquí, para alcanzar la meta anhelada con mucha fortaleza, sabiduría y entendimiento, porque cada día me bendice con sus planes dándome la certeza de que su tiempo es perfecto.

A mis padres María Auxiliadora y Ramón Valero por estar presente en cada momento, siendo pilares fundamentales, fuente de apoyo, motivación y amor en mi formación personal y profesional, sin ustedes esto no fuera posible. Dios los bendiga.

A mis hermanos Bezai y Alejandro, por creer en mí, apoyarme y animarme a seguir adelante, son mi motivo de superación. Los amooo.

A mi compañero de vida Jhoan Uzcategui, por ayudarme incondicionalmente a cumplir mis metas, confiando en mí y en mis capacidades, gracias por la espera y la paciencia. Te Amooo.

A mi abuela Emérita por su apoyo, cuidados y oraciones. Gracias por consentirme y demostrarme su amor día a día.

A mi tío Jesús por ser un segundo padre para mi y mis hermanos, ayudándonos en los momentos mas difíciles, gracias por hacerlo con el corazón.

A mi comadrita Yindriveth por sus sabios consejos que me han orientado por el camino del bien, gracias por estar siempre presente.

A mi compañera de tesis Fátima por el apoyo y la colaboración, gracias por todo. Lo estamos logrando.

María Gabriela Valero

DEDICATORIA

Agradezco a Dios primeramente por orientarme y nunca soltar mi mano en aquellos momentos de dificultad, tristeza, angustia y temor. Así mismo, agradezco a la virgen de Fátima, al Prof. Lino Valles y al Dr José Gregorio Hernández por acompañarme en obtener uno de los anhelos más deseados.

A mis padres Ymanuel Márquez David y a Yely Josefina Méndez, quienes con su amor, paciencia y esfuerzo me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí el ejemplo de esfuerzo, valentía perseverancia, y por confiar y creer en mis metas.

A mis hermanos: Manuel Carlos, Aurea y Estefani; por ser mi fuente de inspiración, por brindarme su cariño y apoyo incondicional.

A toda mi familia: abuelos, tíos, primos, sobrinos, cuñados, suegra y suegro (†) porque con su ayuda, oraciones, consejos, y palabras de aliento me acompañaron durante este proceso.

A mi novio Víctor Javier Arellano por su apoyo, amor y quien formo parte de este proceso para alcanzar la meta trazada y llegar juntos.

A mis amigos Gabriela, Pedro, Ronald, José Antonio y Karol por compartir conmigo risas, desafíos y momentos inolvidables que han hecho de este viaje una experiencia enriquecedora.

A mis profesores y mentoras por su paciencia, guía y conocimientos; que han sido fundamentales en mi formación académica y personal.

A todos aquellos que, de una u otra forma, contribuyeron a que este sueño se hiciera realidad. Con gratitud infinita, dedico este logro a todos ustedes.

María de Fátima Márquez Méndez

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarnos el don de la vida, por guiarnos en cada paso para lograr nuestras metas, fortaleciéndonos en los momentos de dificultades.

A la ilustre Universidad de Los Andes y a La Faculta de Farmacia y Bioanálisis por la oportunidad de estudiar y formarnos en tan prestigiosa institución, por el compromiso y lealtad a pesar de las adversidades, brindándonos las herramientas necesarias para llevar acabo nuestra investigación.

A nuestro tutor Prof. Jhender Fernández por aceptarnos como sus tesisas, apoyándonos y orientándonos para lograr los objetivos planteados.

A las profesoras Álida Pérez e Yndra Cordero por su asesoramiento, orientación y colaboración, siendo pilares fundamentales en el desarrollo de esta investigación.

A las profesoras Clara Díaz, Ysheth Millán, Rima Bahsas y Saraí Dugarte por su apoyo incondicional a lo largo de nuestra formación académica.

Tabla de contenido

Índice de Tablas.....	Pág. VIII
Índice de Figuras.....	IX
Índice de Esquema.....	X
Resumen.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	3
Planteamiento del Problema.....	3
Justificación de la Investigación.....	5
Objetivo de la Investigación	6
<i>Objetivo General</i>	6
<i>Objetivos Específicos</i>	6
Alcances y Limitaciones.....	7
<i>Alcances de la Investigación</i>	7
<i>Limitaciones de la Investigación</i>	7
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	8
Trabajos Previos.....	8
Antecedentes Históricos.....	10
Bases Teóricas.....	12
<i>Productos Naturales</i>	12
<i>Familia Asteraceae</i>	19
<i>Género Aldama</i>	21
<i>Especie Aldama dentata</i> La Llave & Lex.....	22
<i>Extractos Vegetales</i>	24
<i>Análisis Fitoquímico</i>	26
<i>Bacterias</i>	30
<i>Actividad Antibacteriana</i>	33
Definición Operacional de Términos.....	34

Operacionalización de las Variables.....	35
Hipótesis.....	38
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO.....	39
Tipo de Investigación.....	39
Diseño de Investigación	39
Población y Muestra.....	40
<i>Unidad de Investigación.....</i>	<i>40</i>
<i>Selección del Tamaño de la Muestra.....</i>	<i>40</i>
Sistema de Variables.....	40
Instrumento de Recolección de Datos.....	41
Procedimiento de la Investigación.....	41
<i>Recolección de la Planta.....</i>	<i>41</i>
<i>Preparación del Material Vegetal.....</i>	<i>42</i>
<i>Preparación del Extracto.....</i>	<i>42</i>
<i>Tamizaje Fitoquímico.....</i>	<i>46</i>
<i>Determinación de Actividad Antibacteriana.....</i>	<i>48</i>
Diseño de Análisis	51
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	52
Resultados	52
<i>Tamizaje Fitoquímico.....</i>	<i>53</i>
Actividad Antibacteriana.....	57
Discusiones.....	59
CAPÍTULO V. COMCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	63
Conclusiones.....	63
Recomendaciones.....	64
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS.....	65

INDICE DE TABLAS

Nº de Tabla		Pág.
1	Operacionalización de la variable dependiente. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de <i>Aldama dentata</i> La Llave & Lex.....	36
2	Operacionalización de la variable independiente. Composición química del extracto etanólico de las hojas <i>Aldama dentata</i> La Llave & Lex.....	37
3	Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).....	49
4	Resultados obtenidos del porcentaje de rendimiento	52
5	Características físicas del extracto etanólico de las hojas de la <i>Aldama dentata</i> La Llave & Lex.....	52
6	Resultados del análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico de las hojas de la <i>Aldama dentata</i> La Llave & Lex.....	53
7	Resultados ilustrados del análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico de las hojas de la <i>Aldama dentata</i> La Llave & Lex.....	54
8	Resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de la <i>Aldama</i> <i>dentata</i>	57

INDICE DE FIGURAS

N° de Figura		Pág.
1	Estructura química del fenol.....	13
2	Estructura química de umbeliferona.....	14
3	Estructura química del núcleo del flavano.....	14
4	Estructura química de las saponinas esteroideas.....	16
5	Estructura de la digitoxina	16
6	Estructura química de la amigdalina.....	17
7	Estructura química de la morfina.....	18
8	Formación de los complejos insolubles por reacción de los alcaloides con los metales pesados utilizados en los ensayos de precipitación.....	27
9	Reacción de formación de complejos coloreados de un compuesto fenólico con una sal de hierro III.....	28
10	Sistema benzopirona.....	29
11	Número de vaucher specimen.....	41
12	Extracción continua en caliente bajo reflujo.....	43
13	Filtración del extracto etanólico de las hojas de la <i>Aldama dentata</i> La Llave & Lex.....	43
14	Concentración del extracto en el rotavapor.....	44
15	Extracto etanólico de las hojas de la <i>Aldama dentata</i> La Llave & Lex.....	44
16	Resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas <i>Aldama dentata</i>	58

INDICE DE ESQUEMAS

Nº de esquema		Pág.
1	Procedimiento empleado para la obtención del extracto de las hojas la <i>Aldama dentata</i> La Llave & Lex.....	45

www.bdigital.ula.ve



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



**PERFIL FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS HOJAS
DE LA *Aldama dentata* La Llave & Lex.**

Tesistas:

Maria Gabriela Valero Albornoz

C.I: V- 22.659.351

Maria De Fatima Márquez

C.I: V- 25.004.799

Tutor: Prof. Jhender Fernández

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo determinar la composición química y la actividad antibacteriana de las hojas de la *Aldama dentata* La Llave & Lex (Asteraceae). El extracto etanólico de las hojas de dicha planta se obtuvo mediante la técnica de extracción de reflujo en caliente, se realizaron pruebas de tipo cualitativas para detectar los metabolitos secundarios, presentes en el extracto. La determinación de la actividad antibacteriana se llevó a cabo empleando la técnica de difusión de disco en agar. Los resultados de las pruebas de tamizaje fitoquímico revelaron la presencia de compuestos químicos como esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides, lactonas y glicósidos cardiotónicos. El mencionado extracto a una concentración de 10000 ppm mostro actividad inhibitoria en las bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (7 mm) y *Enterococcus faecalis* (7 mm); y en 3 cepas de bacterias Gram negativas *Klebsiella pneumoniae* (8 mm), *Escherichia coli* (7 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (7 mm). En este estudio se confirmó que la composición química del extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata* está estrechamente relacionado con la actividad antibacteriana ya que los metabolitos secundarios tienen potencial para inhibir bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Palabras clave: *Aldama dentata*, tamizaje fitoquímico, actividad antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son consideradas una fuente natural para el desarrollo de la terapéutica, debido a la gran variedad de propiedades que poseen, estas son empleadas en conjunto con diversas técnicas que nos indican la composición química de cada una de ellas y la efectividad que pueden presentar sus compuestos ante algún agente patógeno (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

En la actualidad podemos convertir los recursos biológicos en productos útiles para la preparación de medicamentos menos nocivos para la salud, ya que el uso indiscriminado de antibióticos en las últimas décadas ha generado la comparecencia de la resistencia bacteriana, la cual cobra importancia a nivel mundial en el área de salud pública debido a que los antibióticos tienen un efecto en el control de enfermedades, pero cuando no se emplean de manera correcta pueden prolongar las estadías de hospitalización, aumentando costos médicos e incluso generando mortalidad (García, 1975).

Por tal motivo, revisados los antecedentes antibacterianos de la familia Asteraceae, se realizó el estudio del extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata*.

De este modo, el presente trabajo está sistematizado en correspondencia con las normas de la Asociación Americana de Psicología (siglas en inglés APA) de la siguiente manera: El Capítulo I, denominado El Problema, consta de los siguientes subtítulos: Planteamiento del problema, Justificación, Objetivos de la investigación, tanto general como específicos, Alcances y Limitaciones de la investigación. El Capítulo II, denominado Marco Teórico, contiene los siguientes elementos: Trabajos previos, Antecedentes históricos, Bases teóricas, Definición operacional de términos, Operacionalización de

las variables e Hipótesis. El Capítulo III, denominado Marco Metodológico, comprende: Tipo de investigación, Diseño de la investigación, Población y muestra, Sistema de variables, procedimiento de la investigación y Diseño de análisis. El Capítulo IV, se refiere a Resultados y Discusiones. El Capítulo V, encontramos Conclusiones y Recomendaciones obtenidas con el desarrollo de la investigación en relación al logro de los objetivos planteados, posteriormente se reflejan las Referencias Bibliohemerográficas.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

La utilización terapéutica de los antibióticos a partir de 1940 con el descubrimiento y uso de la penicilina, ha sido uno de los logros más importantes. Desde entonces se han obtenido, comercializado y utilizado una gran cantidad de antimicrobianos, que contribuyen al control de las enfermedades infecciosas salvando millones de vidas y también han supuesto una revolución en la medicina (Daza, 1998). Sin embargo, la resistencia bacteriana es una amenaza creciente que ha deteriorado la eficacia de los antimicrobianos ya que tiene la capacidad de sobrevivir en concentraciones de antibióticos que inhiben o matan a otras de la misma especie (Giono, Santos, Rayo, Torres y Alcántar, 2020).

De tal modo, que la resistencia a los antibióticos se ha convertido en un problema global y complejo, el cual incluye un gran número de especies bacterianas de importancia médica y que es difícil de controlar por su multicausalidad. Por lo tanto, el consumo masivo de antibióticos en los últimos 50 años ha creado un ambiente favorable a la selección de bacterias que soportan los efectos tóxicos de los antimicrobianos, es por eso que entre los factores que han contribuido al aumento de la resistencia a los antibióticos están la concentración de la población en centros urbanos, el inadecuado control de las infecciones en los hospitales, la tendencia a internar en hospitales a los pacientes seriamente enfermos, la migración

masiva a través de las regiones del globo y el uso inadecuado de los antibióticos, entre otros (Benavides, Aldama y Vázquez, 2005).

En tal sentido, las bacterias patógenas de la época pre-antibióticos eran raramente resistentes, pero actualmente el 70 % de las bacterias responsables de las infecciones nosocomiales no son sensibles al menos a uno de los antibióticos más comúnmente utilizados para tratarlas debido al uso irracional de los antimicrobianos, generando esto una disminución del poder bactericida ya que los microorganismos se adaptan rápidamente a las condiciones de su medio, aún en la presencia de estos fármacos. De esta manera, la gran capacidad adaptativa de las bacterias es el resultado del efecto combinado de rápidos índices de crecimiento, de mutaciones genéticas y de la selección de las mismas, así como de su habilidad para intercambiar material genético horizontalmente (Benavides y cols., 2005).

Por lo tanto, en las últimas dos décadas se han incrementado las investigaciones para controlar o prevenir la resistencia a los antibióticos utilizando fuentes naturales como animales, plantas e incluso microorganismos ya que tienen propiedades beneficiosas para la salud y por presentar baja toxicidad y buen potencial terapéutico convirtiéndolos en alternativas alentadoras para el control de enfermedades como reemplazo a los antibióticos (Vivot, Sánchez, Cacik y Sequin, 2012). Una de las fuentes naturales para conseguir metabolitos con propiedades beneficiosas sería el extracto etanólico de *Aldama dentata* por lo cual se planteó el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química del extracto etanólico de las hojas de *Aldama dentata* La Llave & Lex?

Justificación de la investigación

La medicina es producto de la actividad del hombre, de su desarrollo social, y se origina cuando su instinto de conservar la vida y aliviar dolores lo impulsa a influir sobre la naturaleza. A lo largo de la historia, el hombre se ha planteado la problemática del equilibrio entre la salud y la enfermedad (Plain, Pérez y Rivero, 2019).

Siendo así, la utilización de las plantas como agentes terapéuticos en la atención de salud, se ha mantenido a lo largo del tiempo y puede afirmarse que aproximadamente el 60-80 % de la población mundial todavía depende en gran parte de los tratamientos tradicionales que implican el uso de extractos de plantas o de sus principios activos. Así mismo, la población de escasos recursos económicos que padecen la dificultad para recibir atención médica y al acceso de medicamentos, también recurren a la medicina tradicional (Carrillo y Moreno, 2006).

De este modo, el estudio científico de las plantas medicinales es una fuente relevante para el descubrimiento de nuevos fármacos que luego se sintetizan, ya que el aumento de las afecciones de origen bacteriano, fúngico y viral, en los últimos años, ha sido causado no sólo por la aparición de nuevas enfermedades sino también por la resistencia adquirida por las distintas cepas microbianas a los medicamentos tradicionalmente usados (Cabreras, Fadragas y Guerrero, 2005).

Esta situación ha conducido a la necesaria y urgente búsqueda de nuevos compuestos bioactivos. En ese sentido, las plantas constituyen una fuente inestimable de principios aún por descubrir (Vivot y cols., 2012). De acuerdo a lo descrito anteriormente, es de gran importancia confirmar la

relación entre la composición química y la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata* La Llave & Lex.

Objetivos de la Investigación

Objetivo general

Determinar la composición química y la actividad antibacteriana de las hojas de la *Aldama dentata* La Llave & Lex.

Objetivos específicos

- Obtener el extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata* La Llave & Lex por la técnica de extracción continua en caliente bajo reflujo con etanol como solvente.
- Identificar cualitativamente mediante pruebas químicas de precipitación y/o coloración los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata* La Llave & Lex.
- Comprobar la actividad antibacteriana del extracto previamente obtenido frente a cepas de referencia internacional utilizando el método de difusión en agar con discos (Kirby Bauer).

Alcances y Limitaciones

Alcances

En este sentido, el logro de esta investigación fue validar el uso etnobotánico de *Aldama dentata* como bactericida, puesto que se verificó que sus hojas contienen metabolitos secundarios con esta propiedad, demostrando así que esta planta una alternativa terapéutica natural frente a la resistencia bacteriana.

Limitaciones

Durante la investigación se presentaron limitaciones relacionadas con los aspectos teóricos, técnicos y recursos económicos (Hurtado, 2015). Adicionalmente los problemas relacionados con la situación país como lo son los cortes de electricidad, agua, gas e internet y paralización de actividades de la universidad.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos previos

Vieira, Nunes y Franca, (2022), publicaron un artículo titulado “Componentes fitoquímicos y actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Cnicus benedictus* Linneau, Asteraceae”. El objetivo fue evaluar la actividad antibacteriana y realizar el cribado fitoquímico del extracto etanólico de *Cnicos benedictus* Linneau. la recolección de las hojas de *Cnicos benedictus* Linneau se realizo en el municipio de Imperatriz, estado de Maranhão, Brasil, posteriormente se secaron en estufa con circulación de aire a 40 °C durante 48 h, se trituraron en un molino, para luego realizar la extracción con etanol por el método de maceración, se filtró y se concentró en rotavapor, luego se realizaron las pruebas fitoquímicas dando como resultado la presencia de azúcares reductores, alcaloides, esteroide, triterpenóides, taninos, flavonoides y saponinas, posteriormente se evaluó la actividad antibacteriana a una concentración de 250 a 500 µg/mL utilizando el método de difusión del disco en bacterias Gram positivas como *S. aureus* con un halo de inhibición de 30 mm, *Listeria monocytogenes* (11 mm), *Bacilus subtilis* (18 mm), *Bacilus cereus* (23 mm); y en bacterias Gram negativas no se observó actividad inhibitoria. De acuerdo a lo anterior, el presente estudio tiene similitud con la investigación realizada ya que la planta estudiada pertenece a la familia Asteraceae.

Isla y cols., (2020) publicaron un trabajo titulado: “Perfil fitoquímico, actividad biológica y fotoprotectora de las flores de *Aldama dentata* La Llave & Lex”. El objetivo fue determinar el perfil fitoquímico de esta planta y evaluar el potencial biológico y fotoprotector de los metabolitos secundarios

presentes en el extracto etanólico de sus flores. La recolección de las flores de la *Aldama dentata* se realizó en la ciudad de Mérida, para luego someterlas a un secado en estufa a 40 °C, posteriormente fueron molidas para realizar la doble extracción con etanol bajo la técnica de reflujo a 50 °C por 1 hora, se filtró y se llevó al rotavapor para concentrar el extracto, luego se realizaron los ensayos fitoquímicos obteniendo como resultado la presencia de triterpenos, compuestos fenólicos, taninos, glicósidos cardiotónicos, así como flavonoides y lactonas sesquiterpénicas en moderada cantidad y ausencia de alcaloides, saponinas, quinonas, antraquinonas y cumarinas; seguidamente se determinó el factor de protección solar demostrando tener un alto valor *in vitro* de 15, por último se evaluó la actividad antibacteriana a una concentración de 1000 ppm utilizando el método de difusión del disco frente a *S. aureus* con un halo de inhibición de 13 mm, *P. aeruginosa* (7 mm), *K. pneumoniae* y *E. coli* de (8 mm). Siendo este en primer reporte sobre las actividades anteriormente descritas. Por lo tanto, este trabajo guarda una relación con la investigación realizada ya que el estudio reveló que el extracto etanólico de las flores de la *Aldama dentata* La Llave & Lex presenta una importante actividad antibacteriana y metabolitos secundarios en común.

Camacho, Yunel, Ramírez y Gómez, (2019) publicaron un artículo titulado “Propiedades fitoquímicas y antibacterianas de extractos de *Tagetes erecta* L. (Asteraceae)”. El objetivo fue evaluar las propiedades fitoquímicas y antibacterianas de extractos de hojas y flores de *Tagetes erecta* L. El procedimiento comenzó con la recolección de las hojas y flores en el campus de la Universidad de Matanzas, Cuba, luego fueron lavadas con agua corriente y destilada, secadas en una estufa a 45 °C durante 72 h, y trituradas en un mortero hasta pulverizar para realizar la extracción con etanol por el método de maceración, se filtró a través de tres capas de papel

de filtro y se evaporo a 40 °C para tener un volumen final con el cual se llevaron a cabo estudios fitoquímicos y antibacterianos contra cepas de referencia usando el método de difusión del disco. Los resultados obtenidos fueron los siguientes, presencia de flavonoides, terpenoides, taninos, saponinas y glucósido cardiotónicos en hojas y flores, mientras que se detectaron únicamente cumarinas en las hojas y presencia de bajos contenidos de esteroides en las flores, con respecto a la actividad antibacteriana se utilizó el extracto etanólico de las hojas a una concentración de 200 mg/mL inhibiendo el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* con un halo de inhibición de 12 mm, *Klebsiella pneumoniae* (11 mm), *Staphylococcus epidermidis* (18 mm); así como también el uso del extracto etanólico de las flores a la misma concentración, mostrando una inhibición de (19 mm), (15 mm), (16 mm) y (24 mm), respectivamente. Siendo así, dicho estudio guarda relación con la investigación realizada ya que los autores buscan evaluar la actividad antibacteriana de una planta perteneciente a la misma familia en estudio.

Antecedentes Históricos

La Familia de plantas Asteraceae corresponde al Orden Asterales, Suborden Asteridae, y está caracterizada por sus inflorescencias racimosas en capítulos, con flores individuales, es considerada un grupo natural y uniforme, altamente evolucionado y recibe el nombre alternativo Compositae, algunas de ellas han sido sometidas desde la antigüedad al complejo proceso de domesticación luego del establecimiento de las prácticas agrícolas básicas, hoy son cultivo de importancia directa en alimentación humana e indirecta por productos obtenidos en la industria, muchas de ellas

son de interés médico y tecnológico ya que rinden metabolitos secundarios de uso farmacéutico (Vitto y Patenatti, 2009).

Las plantas se clasifican en sub-familias, tribus, sub-tribus, géneros y especies, dentro de la familia Asteraceae se encuentra la hierba *Aldama dentata* de origen americano, perteneciente a las sub-familia Asteroideae, tribu Heliantheae, sub-tribu Helianthinae, género *Aldama*, especie *Aldama dentata*, su nombre fue otorgado por Ignacio Aldama (1769-1811), estudiante de derecho mexicano que se dedicó a la agricultura y el comercio (Leal, Benitez, y Schnee, 2010). La hierba mencionada anteriormente se encuentra desde el centro de México hasta las tierras de Venezuela, está distribuida en toda Latinoamérica (Hokche, Berry y Huber, 2008).

Por lo tanto, en los últimos años se realizan con más frecuencia estudios en las plantas de la familia Asteraceae en distintos lugares de Latinoamérica, ya que se revelan como excelentes objetos de estudio y muchas de ellas han presentado actividad biológica y antimicrobiana por medio de diversos métodos científicos, generando una motivación a un mayor número de especialistas en diversas áreas de anatomía, biogeografía, ecología, fitoquímica entre otras, con la finalidad de dar un buen aporte a la sociedad (Villaseñor, 2018).

Bases Teóricas

Productos Naturales

Producto natural, es el nombre como se le conoce a los compuestos químicos elaborados, a través de reacciones enzimáticas por las plantas, los cuales utiliza para su desarrollo, reproducción y supervivencia, estos compuestos pueden ser metabolitos primarios que son todos aquellos compuestos que participan en los procesos químicos conocidos como, respiración, transporte de solutos, translocación, síntesis de proteínas, asimilación de nutrientes y diferenciación de tejidos; los cuales intervienen en forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas. Por otra parte, pueden ser los metabolitos secundarios que son los compuestos químicos biosintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales para el desarrollo de las mismas. Tienen la particularidad de presentar una distribución restringida en el reino vegetal, por lo que muchos de ellos son útiles en la Botánica Sistemática (Rojas, 2019).

Clasificación de los productos naturales

La clasificación de los productos naturales puede hacerse de acuerdo a sus estructuras, bioformación, fuente de producción o a su acción biológica, en todos estos casos es inevitable la superposición. Por ejemplo, por ser moléculas generalmente polifuncionales es difícil ubicarlas en un determinado grupo químico, o dos compuestos totalmente diferentes tienen la misma acción, o la misma fuente de producción puede originar simultáneamente compuestos muy distintos. Siendo así, las clasificaciones estructurales y biosintéticas son el criterio más apropiado, involucrando la

formación de los metabolitos primarios y secundarios (Marcano y Hasegawa, 2018). Por lo tanto, estos se agrupan en:

Terpenos: Los terpenos o terpenoides son compuestos que están contruidos de unidades de isopreno, por lo que sus estructuras se pueden dividir en unidades de cinco carbonos (C5) (Hanson, 2003). Son solubles en agua y se clasifican según el número de las unidades de isopreno como monoterpenos (2 unidades, C10), sesquiterpenos (3 unidades, 15C), diterpenos (4 unidades, 20C), triterpenos (6 unidades, 30C), tetraterpenos (8 unidades, 40C) y se habla de politerpenos cuando contiene mas de 8 unidades de isopreno (Ávalos y Pérez, 2009).

Compuestos fenólicos: Derivan del fenol, el cual se compone de un anillo aromático (fenil) unido a un grupo hidroxilo (OH). (Figura 1) (Peñarrieta, Tejeda, Mollinedo, Vila y Bravo, 2014).

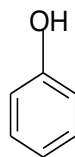


Figura 1. Estructura química del Fenol.

Tomado y modificado de Peñarrieta y cols., 2014.

Químicamente, los compuestos fenólicos son un grupo muy diverso que comprende desde moléculas sencillas hasta polímeros complejos (Martin, 2018). Entre estos tenemos, a las cumarinas que contienen un anillo aromático unido a un heterociclo oxígeno. Se consideran compuestos fenólicos, en particular, cuando un grupo hidroxilo está unido a un esqueleto de estructura cumarina, un ejemplo de esto es el compuesto umbeliferona (Figura 2). Así mismo, las ligninas son polímeros fenólicos complejos por lo

que sus estructuras químicas son muy heterogéneas, son consideradas como la segunda más abundante bio-polímeros en el reino vegetal después de la celulosa (Peñarrieta y cols., 2014).

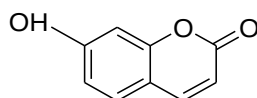


Figura 2. Estructura química de umbeliferona

Tomado y modificado de Peñarrieta y cols., 2014.

También se encuentran los flavonoides que, sin ser metabolitos primarios, están presentes en casi cualquier vegetal superior, hay más de 8000 compuestos conocidos de plantas vasculares, se consideran como antioxidantes y secuestradores de radicales libres, agentes antimicrobianos y antinutricionales, fotoreceptores y protectores contra la luz UV, agentes quelantes de metales, entre otros. La estructura general de los flavonoides comprende un anillo A derivado de la cadena del policétido, un anillo B, derivado del ácido shikímico y tres átomos de carbono que unen los anillos A y B. Es por ello que se les conoce como unidades: C15 - C6 - C3 - C6 y el esqueleto recibe el nombre de núcleo de flavano (Figura 3) (Marcano y Hasegawa, 2018).

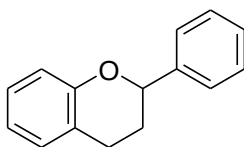


Figura 3. Estructura química del núcleo de flavano.

Tomado y modificado de Marcano y Hasegawa, 2018.

Y por último, los taninos son polímeros de alto peso molecular, con la particularidad que se unen a las proteínas y precipitan. El nombre taninos se

refiere al proceso de curtido en el que se convierte la piel de los animales en cuero. Originalmente son extraídos de las plantas, fueron utilizados para dicho proceso hasta que fueron remplazados por minerales durante el siglo pasado, están presentes en hojas, frutos y cortezas. Se encuentran en el roble (*Quercus* sp.), Castaño (*Castanea* sp.), entre otros. Estos compuestos complejos son parte de la protección de las plantas contra las infecciones y los herbívoros, se clasifican en tres grupos según su estructura química: condensada, hidrolizables y complejos (Peñarrieta y cols., 2014).

Glicósidos: Los glicósidos son metabolitos vegetales de gran importancia, su nombre hace referencia al enlace glicosídico que se forma cuando una molécula de azúcar se condensa con otra que contiene un grupo hidroxilo. Existen tres grupos de glicósidos de particular interés: saponinas, glicósidos cardíacos y glicósidos cianogénicos, una cuarta familia, los glucosinolatos, se incluyen en este grupo debido a su estructura similar a los glicósidos (Ávalos y Pérez, 2009).

Las saponinas son glicósidos terpenoides, se han estudiado dos grandes grupos como son las saponinas triterpenoides y las saponinas esteroides. Las primeras, son ampliamente distribuidas en las plantas, con propiedades hemolíticas y tóxicas contra hongos; se están estudiando por sus propiedades benéficas para la salud, como protección contra el riesgo de cáncer, la disminución de los niveles de colesterol y azúcar en la sangre, además de propiedades antiinflamatorias. Por otra parte, las saponinas esteroides (Figura 4), constituyen una materia prima importante para la producción de medicamentos esteroides, presentan actividades biológicas como: citotóxica, anticáncer, antiinflamatoria, antihongos, hemostática, etc. Tienen la propiedad de formar espuma abundante y estable al agitar sus soluciones acuosas (Martínez, 2020).

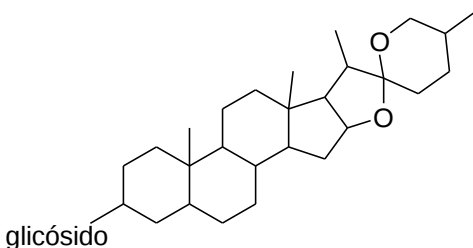


Figura 4. Estructura química de las saponinas esteroideas

Tomado y modificado de Martínez, 2020.

Por otro lado, los glicósidos cardíacos o cardenólidos son semejantes a las saponinas esteroideas, tienen también propiedades detergentes, pero su estructura contiene una lactona (Figura 5). Se encuentran de forma natural en forma de glicósidos o de agliconas. Quizá el más conocido sea la digitoxina o su análogo digoxina, aislada de *Digitalis purpurea* y utilizada como medicamento en el tratamiento de la insuficiencia cardiaca congestiva (Ávalos y Pérez, 2009).

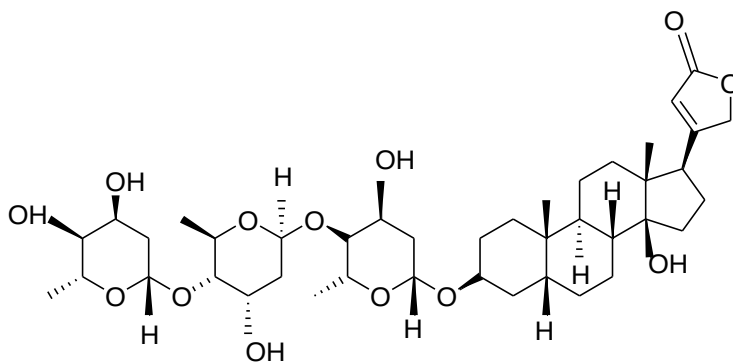


Figura 5. Estructura de la digitoxina.

Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

Y por último, los glicósidos cianogénicos son compuestos nitrogenados, que no son tóxicos por sí mismos pero se degradan cuando la planta es

aplastada liberando sustancias volátiles tóxicas como cianuro de hidrógeno (HCN). Un ejemplo es la amigdalina (Figura 6) que se encuentra en las semillas de almendra, albaricoque, cereza o melocotón (Ávalos y Pérez, 2009).

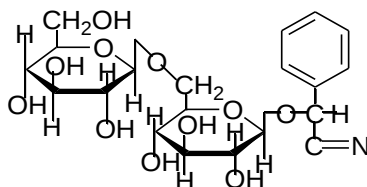


Figura 6. Estructura química de la amigdalina.

Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009

Alcaloides: son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos). Generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas a consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajante muscular, tranquilizante o analgésico. Algunos alcaloides son: cocaína, morfina (Figura 7), cafeína, nicotina entre otros (Ávalos y Pérez, 2009).

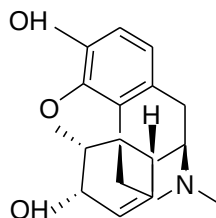


Figura 7. Estructura química de la morfina.
Tomado y modificado de Ávalos y Pérez, 2009.

Rutas Biosintéticas

Una ruta biosintética, es una secuencia de reacciones químicas que con pocas excepciones son mediadas por enzimas, siendo así, se han establecido tres rutas biosintéticas a través de las cuales se explica la formación de una variedad de compuestos. Estas rutas se conocen como; ruta del acetato, ruta del shikimato y ruta del mevalonato (Rojas, 2019).

Ruta del acetato: También conocida como ruta de los policétidos, es la vía por donde se forman una gran cantidad de compuestos como ácidos grasos, poliacetilenos, prostaglandinas, macrólidos, antibióticos y compuestos aromáticos como xantonas, antraquinonas, entre otros. La molécula intermediaria principal de esta ruta es el poli- β -ceto éster, el cual 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- β -ceto éster con el largo de cadena adecuado según el tipo de metabolito que se formará de acuerdo a los requerimientos de planta (Rojas, 2019).

Ruta del shikimato: Su nombre proviene del ácido shikímico, metabolito secundario aislado por primera vez de especies del género *Illicium* que en

japonés significa 'shikimi', se conoce que esta molécula, el ácido shikimico, se considera 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: También conocida como vía isoprenoide o vía HMG-CoA reductasa, es una vía metabólica esencial que se lleva a cabo en el citoplasma de las células, se utilizan para producir 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).

Familia Asteraceae

www.bdigital.ula.ve

Las Asteraceae (Compositae) o compuestas como se les denomina en español, son tal vez la más numerosa familia de plantas conteniendo más de 1.500 géneros y más de 25.000 especies, son fácilmente reconocibles por su inflorescencia típica. Son plantas de diversos hábitos ya que se encuentran como hierbas, arbustos y con menos frecuencia como árboles. Las inflorescencias es siempre el capítulo (cabezuela) donde se hallan directamente insertadas las flores (raras veces solo una) sobre el llamado receptáculo, sostenidas frecuentemente a su vez por brácteas, todo el conjunto de flores y receptáculos se halla rodeado de los filarios. Los capítulos se les denomina homógamos cuando todas sus flores son de similar sexo, o se les denomina heterógamos cuando sus flores son sexualmente diferentes (Badillo, 1996).

Distribución geográfica: La familia Asteraceae está presente en todo el mundo a excepción de la región antártica ya que suelen encontrarse principalmente en regiones con clima templado (Villaseñor, 2018).

Taxonomía: Taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera (Katinas, Gutiérrez, Grossi y Crisci, 2007).

División: Magnoliophyta

Clase : Magnoliopsida

Orden : Asterales

Familia: Asteraceae

Compuestos químicos: Esta familia resulta ser evolutivamente muy exitosa ya que ha desarrollado distintos mecanismo de defensa, propiciando la producción de diferentes metabolitos como ácidos clorogénicos, isoflavonoides, lactonas sesquiterpénicas, alcoholes triterpénicos pentacíclicos, aceites esenciales, alcaloides, glúcidos y diversos derivados acetilénicos (Cilia, Virginia, Cortés y Zurita, 2021).

Usos etnobotánicos y actividades biológicas: La presencia de metabolitos en Asteraceae como poliacetilenos y flavonoides con actividades antibacterianas y bacteriostáticas, confirman el uso de la medicina tradicional de la familia en el tratamiento de enfermedades infecciosas. En los estudios revisados se han identificado algunos compuestos con actividad antimicrobiana, especialmente contra bacterias causantes de enfermedades infecciosas, como diarrea, neumonía y tuberculosis. Otras actividades farmacológicas evaluadas en los estudios revisados fueron citotoxicidad, antiinflamatoria, analgésica, antioxidante, antifúngica y espasmolítica. Por otro lado, también se utilizan como plantas ornamentales (Cilia y cols., 2021).

Género *Aldama*

Aldama es un género de plantas perteneciente a la familia Asteraceae. Se encuentran más de 100 especies a nivel mundial (Garden, 2011). En Venezuela únicamente se localiza la *Aldama dentata* (Hokche y cols., 2008). Son herbáceas anuales con hojas opuestas en la parte inferior y alternas en la superior. Sus capítulos son radiados, con pedúnculos largos, solitarios o pequeños, corolas amarillas, aquenios escasamente estriados y envueltos (Badillo, 1996).

Distribución geográfica: se encuentran desde México hasta Venezuela (Badillo, 1996)

Taxonomía: Taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera (Katinas y cols., 2007).

División.	Magnoliophyta
Clase :	Magnoliopsida
Orden :	Asterales
Familia:	Asteraceae
Subfamilia:	Asteroideae
Tribu:	Heliantheae
Subtribu:	Helianthinae
Género:	<i>Aldama</i>

Compuestos químicos: Se ha revelado una ocurrencia de flavonoides, compuestos fenólicos, saponinas, cumarinas, alcaloides, Glicósidos

cardiotónicos, *diterpenos y lactonas sesquiterpénicas* (Isla y cols., 2020; Bombo, appezzato, Ascherbrenner, Spring, 2016).

Usos etnobotánicos y actividades biológicas: *Aldama* es un género con pocos estudios de los cuales se han obtenido como resultado el potencial antipirético, aromático y resinífero (Bombo y cols., 2017), así como también la actividad antioxidante, fotoprotectora y la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano (Isla y cols., 2020; Bombon y cols., 2016)

Especie *Aldama dentata*

Aldama dentata La Llave & Lex es una planta arvense tropical, comúnmente llamada “flor amarilla”, crece de forma ruderal en caminos, pero también se encuentra como arvense en cultivos como frijol, cacahuete y ajonjolí, su tiempo de vida es anual, posee inflorescencias en forma de capítulo y sus flores son hermafroditas rodeadas por 10 a 12 lígulas, su altura va de 1 a 2,5 m. Sus frutos son aquenios, lo cuales son secos. Sus semillas son elongadas y desnudas con una cubierta seminal delgada que se extiende desde el funículo hasta el micrópilo, mide de 2 a 3,5 mm de largo y posee un vilano como estructura de dispersión (Conanp, 2011).

Distribución geográfica: Es una maleza común ubicada en américa tropical y subtropical. En Venezuela muy frecuente en tierras cultivadas (Leal y cols., 2010).

Taxonomía: Taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera (Katinas y cols., 2007).

División.	Magnoliophyta
Clase :	Magnoliopsida
Orden :	Asterales
Familia:	Asteraceae
Subfamilia:	Asteroideae
Tribu:	Heliantheae
Subtribu:	Helianthinae
Género:	<i>Aldama</i>
Especie	<i>dentata</i>

www.bdigital.ula.ve

Compuestos químicos: Comparada con otras especies de Asteraceae, es insuficiente la información que existe sobre la fitoquímica de *Aldama dentata*; no obstante, se conoce que las flores de esta especie tienen terpenos, lactonas sesquiterpénicas, taninos, flavonoides y otros compuestos fenólicos (Isla y cols., 2020).

Usos etnobotánicos y actividades biológicas: *Aldama dentata* La Llave & Lex (Asteraceae) es una especie considerada maleza; no obstante, también es considerada importante en la flora melífera y como fuente de aceites esenciales, se ha investigado, además, su papel como fitorremediadora en suelos contaminados por cobre y se ha sugerido que posee propiedades antipiréticas (Bombo, Filartiga, García y Appezzato, 2017). Sin embargo, se ha estudiado que algunos compuestos de dicha planta tienen actividad microbiana, antioxidante y fotoprotectora (Isla y cols., 2020).

Extractos Vegetales

Son productos de sustancias biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, obtenidos por solventes como alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo y un proceso de extracción adecuado (Jazivon, Deniz, Mesquia, Oliveira, Costa, 2008).

Métodos de obtención de extractos

Extracción por Reflujo: en el proceso de reflujo, el material previamente mezclado con el solvente elegido, se somete a ebullición y se utiliza un sistema de reflujo que consiste en enfriar el vapor con un refrigerante y devolverlo al balón que contiene el material para continuar el proceso, esto además garantiza que no haya pérdidas de la mezcla durante el proceso de extracción. La temperatura elevada del disolvente permite una mejor extracción de los componentes deseados, ya que la solubilidad de la mayoría de las sustancias aumenta con la temperatura. Este método presenta el inconveniente de que muchos compuestos termolábiles se alteran o descomponen a la temperatura de ebullición del disolvente (Lamarque, Zygodlo, Labuckas, López, Torres, y Maestri, 2008).

Extracción por Maceración: Es una extracción que se realiza a temperatura ambiente. Consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente (agua, etanol o glicerina) hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles, es tapado y se deja en reposo por un período de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto (González, 2004).

Extracción por Percolación: Consiste en colocar el material fragmentado en un recipiente cónico o cilíndrico, haciendo pasar un disolvente apropiado

a través del mismo. El tamaño de las partículas del material a extraer no debe ser menos a los 3 mm, ya que el disolvente no percolará. El material debe estar lo suficientemente compacto para que el solvente fluya con lentitud dando el tiempo necesario para que el mismo pueda penetrar los tejidos y extraer los compuestos deseados. A diferencia de la maceración este proceso requiere la adición constante de solvente (Lamarque y cols., 2008).

Extracción en Soxhlet: Es un método de extracción continua que se lleva a cabo usando un disolvente orgánico, el cual fluye a través de la muestra contenida en un dedal poroso de celulosa o vidrio. Las ventajas más importantes de esta extracción son el contacto continuo de la muestra con una porción de disolvente, simplicidad, bajo costo de adquisición y la posibilidad de grandes cantidades de muestra (Canosa, 2008).

Extracción por Arrastre con Vapor: Es el método más antiguo y sencillo para obtener aceites esenciales a partir del material vegetal, lo más fresco posible. Este método permite la máxima difusión del vapor a través del material vegetal, reduciendo los daños que pudiesen sufrir los componentes de las esencias extraídas por otros métodos. Para dicha extracción, el material vegetal se corta en trozos pequeños y se coloca en la cámara de extracción, se calienta el agua hasta ebullición durante una hora, observándose la condensación de dos fases líquidas que posteriormente son retiradas y separadas (Lamarque y cols., 2008).

Decocción: Este procedimiento consiste en extraer los principios activos de una planta, la cual es sometida a la temperatura de ebullición del agua, manteniendo esta temperatura durante un período variable que suele oscilar de 15 a 30 minutos, se deja enfriar hasta unos 40 °C, se exprime y se cuela o filtra (Selles, Sánchez, Solan, Suiñe y Tico, 1992).

Infusión: Este es el método de extracción más antiguo que se conoce, consiste en agregar el agua hirviendo sobre la planta colocada en un recipiente de porcelana, vidrio o barro, a fin de evitar la pérdida de principios activos, y se deja en reposo de 5 a 15 minutos y se filtra (Valcárcel y Gómez, 1988).

Extracción con Fluidos Supercríticos: Es un proceso que utiliza un fluido supercrítico como agente de extracción, siendo este una sustancia que se encuentra en condiciones termodinámicas de presión y temperatura críticas, bajo estas condiciones, la sustancia o fluido se difunde como un gas a través de los sólidos, pero a su vez, se comporta como líquido con la capacidad de disolver y arrastrar los constituyentes presentes en la materia prima (Pico, Jaimes, López, Murillo, 2019).

La sustancia más utilizada para este propósito es el dióxido de carbono, el cual es una sustancia abundante en la naturaleza, es relativamente poco costoso y se puede comprimir adecuadamente a altas presiones (73 atm) y bajas temperaturas (31 °C). El proceso de extracción con CO₂ supercrítico, requiere de un montaje que incluye un cilindro con CO₂ gaseoso, conectado a un compresor de alta potencia y con control de la temperatura (Martínez, 2020).

Análisis Fitoquímico Preliminar

Es una de las etapas iniciales de la investigación Fitoquímica, estos procedimientos analíticos se han usado durante muchos años, para tratar de identificar en un solo proceso experimental y de manera preliminar en muestras vegetales, la presencia o no de diferentes metabolitos de interés farmacéutico como los alcaloides, los esteroides, los compuestos fenólicos,

los flavonoides, las quinonas, etc. Los más usados utilizan una secuencia de procedimientos experimentales relativamente simples, que incluyen técnicas como los ensayos de coloración con diferentes reactivos químicos, los cuales permiten el reconocimiento preliminar de diversas sustancias naturales, y se fundamentan en las propiedades ácido-base, la solubilidad y la polaridad de las clases principales de compuestos (Martínez, 2020). A continuación, se describe algunos de estos ensayos:

Ensayos de reconocimiento de alcaloides: Los alcaloides propiamente dichos, son de carácter alcalino, y pueden formar sales con ácidos diluidos. Estas sales de alcaloides son solubles en medio acuoso ácido, pero cuando reaccionan con sales de metales pesados tienden a insolubilizarse formando precipitados (Figura 8). Los ensayos químicos usados para el reconocimiento incluyen varios ensayos de precipitación, con diferentes reactivos como son el reactivo de Dragendorff, el reactivo de Mayer, el reactivo de Valser, el reactivo Reineckato de amonio, el reactivo de Wagner, entre otros (Martínez, 2020).

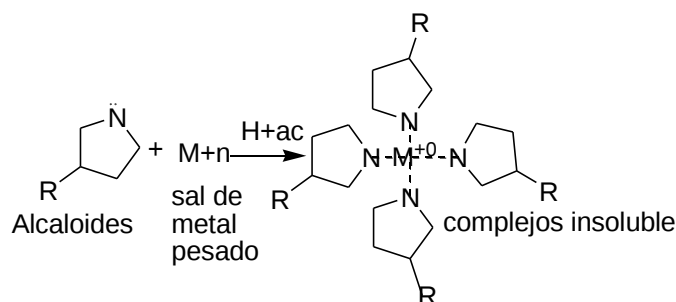


Figura 8. Formación de los complejos insolubles por reacción de los alcaloides con los metales pesados utilizados en los ensayos de precipitación.

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 diversos ensayos de coloración para su reconocimiento preliminar en muestras biológicas. El ensayo más utilizado es el del cloruro férrico (Figura 9), el cual consiste en emplear una solución acuosa o alcohólica de una muestra vegetal, que 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 Fe^{+3} , la formación de color o precipitados oscuros es aceptada como un resultado positivo sobre la presencia de compuestos fenólicos (Martínez, 2020).

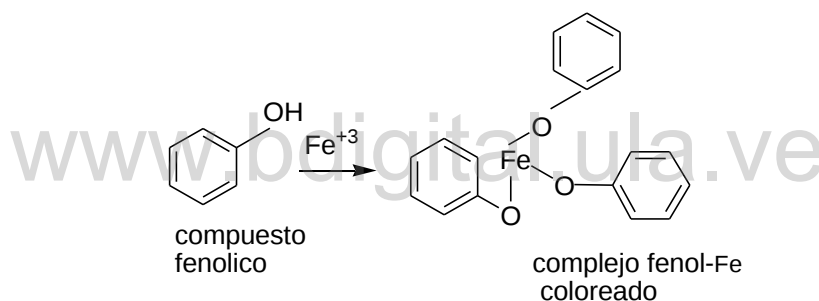


Figura 9. Reacción de formación de complejos coloreados de un compuesto fenólico con una sal de hierro III.

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 γ -benzopirona (Figura10), reaccionan con iones Mg^{+2} y ácido, para formar complejos coloreados de color rojo o violeta, que permite inferir la presencia de flavonoides en la muestra analizada. A este ensayo se le conoce como ensayo de Shinoda, entre otros. Es

importante mencionar que algunas clases de flavonoides como las chalconas y las catequinas, no dan resultado positivo con este ensayo (Martínez, 2020).

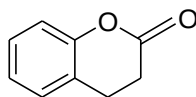


Figura 10. Sistema benzopirona.

Tomado y modificado de Martínez, 2020.

Ensayos de reconocimiento de cumarinas: las cumarinas son compuestos derivados de la α - benzopirona dado que en su estructura presentan un gran número de instauraciones, estos compuestos exhiben una fuerte fluorescencia azul o verde al ser irradiados con luz ultravioleta, propiedad que se aprovecha para su detección mediante el ensayo de hidróxido de amonio. Se basa en la apertura y solubilización en medio básico. Las cumarinas se caracterizan por su intensa absorción de la región UV del espectro, las cuales al ser examinadas a la luz ultravioleta presenta coloración exaltada en presencia de amoniaco, utilizando el reactivo de Erlich (Tamayo, Alba y Mojera, 2011).

Ensayos de reconocimiento para terpenoides: Los terpenoides que contienen en su estructura enlaces dobles carbono-carbono conjugados, se pueden reconocer mediante el ensayo de Liebermann-Burchard, en este ensayo, a una solución anhidra obtenida de la muestra vegetal, se le agrega en su orden anhídrido acético y una gota de ácido sulfúrico concentrado. La prueba se considera positiva, si se forman coloraciones verdes, azules, rojas, violetas, entre otras. Algunos terpenoides como el colesterol que no poseen en su estructura estos enlaces dobles conjugados dan resultado positivo debido a que pueden formar estos dienos conjugados durante la reacción, por deshidratación (Martínez, 2020).

Ensayos de reconocimiento de quinonas: Las quinonas tienden a dar colores rojos o púrpuras con álcalis concentrados y con ácido sulfúrico, lo que puede usarse para identificarlas. Y las **antraquinonas** y sus formas reducidas pueden reconocerse en muestras vegetales a través del denominado Ensayo de Bornträger, en este ensayo, una porción del material vegetal se pone en ebullición con una solución de KOH acuoso diluido, durante varios minutos se deja enfriar, se acidifica y se extrae con acetato de etilo (Martínez, 2020).

Bacterias

Son microorganismos unicelulares que se reproducen por división simple (forma asexual) e integran el reino procariota. Carecen de membrana nuclear, el ADN es circular y cerrado, poseen una pared celular compuesta por peptidoglicano, también la presencia de fimbrias o pilis y flagelos. Su tamaño oscila entre las 0,5 y 3 μm . Las bacterias de interés médico tienen un tamaño entre 0,4 y 2 μm , en el microscopio se diferencian según su forma en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral) (Pérez y Mota, 2006).

Por otro lado, las coloraciones que se usan para teñir los preparados de bacterias, se pueden dividir en: simples, diferenciales y especiales. Las primeras, como el azul de metileno, nos permiten observar la existencia de bacterias, su morfología, su agrupación, la presencia de esporas y la existencia de otros tipos celulares. Las diferenciales como la coloración de Gram y Ziehl Nielsen, además de lo anterior, permiten la diferenciación de las bacterias porque usan diferentes colorantes que se comportan distinto según el microorganismo en cuestión. Las tinciones especiales se emplean

para identificar la cápsula, el núcleo, los flagelos, los esporos, etc (Pérez y Mota, 2006).

Clasificación: Después de que Christian Gram en 1884 desarrollase la tinción que lleva su nombre, se comprobó que las bacterias podían clasificarse en dos grupos principales, según su respuesta a esta coloración. Las bacterias Gram positivas se tiñen de color azul violeta y las Gram negativas adquieren un color rosa o rojo. Las bacterias Gram positivas tienen una capa gruesa de peptidoglicano, mientras que las bacterias Gram negativas tienen una capa fina y una pared compleja de lípidos (Pérez y Mota, 2006).

Por otro lado, la estructura de la pared celular de las ácido-alcohol resistentes, además de presentar peptidoglicano, también posee arabinogalactano y ácidos micólicos, éstos últimos solo son encontrados en las *Mycobacterium* y las *Corynebacterium spp.* Esta gran cantidad de lípidos hace que este tipo de bacterias no se tiñan o lo hagan mal con la coloración de Gram. Para teñirlas, se recurre a coloraciones con fucsina (colorante rojo), con calentamiento del colorante y luego de este procedimiento resisten la decoloración de una mezcla de alcohol y ácido, que constituye la tinción de Ziehl Nielsen (Perez y Mota, 2006).

Mecanismo de resistencia: Las bacterias han desarrollado varios mecanismos para resistir la acción de los antibióticos. El primero de ellos es una especie de bomba expulsora que utilizan las bacterias para la excreción de productos residuales o tóxicos, con la que puede eliminar además muchos de estos agentes antibacterianos. El segundo, se realiza mediante la disminución de la permeabilidad de la pared bacteriana, con la pérdida o modificación de los canales de entrada (porinas). La producción de enzimas inactivantes de los antibióticos constituye el tercer mecanismo. Por último, algunos antibióticos ejercen su acción contra las bacterias uniéndose a una

proteína esencial para la supervivencia de estas (Fernández, López, Ponce y Machado, 2003).

Antibióticos y su clasificación: Los antibióticos son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos, y originan su destrucción. En los últimos tiempos, el uso del término se ha ampliado para incluir compuestos sintéticos, como las sulfonamidas y las quinolonas, que presentan también actividad antibacteriana (Cué y Morejón, 1998).

Siendo así los antibióticos se clasifican según (Cué y Morejón, 1998):

- Su efecto antimicrobiano, ya que pueden ser bacteriostático o bactericidas.
- Espectro de actividad bien sea amplio o reducido.
- Estructura química
- Mecanismo de acción

Mecanismos de acción: Los mecanismos por los que los antibióticos alteran la biología de los microorganismos son (Paredes y Roca, 2004):

- Inhibición de la síntesis de la pared celular que tiene lugar en diversas fases por la acción de los β -lactámicos, fosfomicina, cicloserina, vancomicina, bacitracina.
- Desorganización de la membrana citoplasmática por las Polimixinas, anfotericina B y nistatina ya que, si la integridad funcional de la membrana se altera, los iones y macromoléculas se escapan y la célula se lesiona y muere debido a que la membrana celular

constituye una barrera de permeabilidad y lleva a cabo funciones de transporte activo.

- Inhibición de la síntesis de proteínas, porque actúan sobre los ribosomas; en la subunidad 30 S: tetraciclinas; sobre la subunidad 50 S: cloranfenicol, eritromicina y lincosaminas; en ambas subunidades: aminoglucósidos.
- Interferencia en la síntesis o metabolismo de los ácidos nucleicos por la Rifampicina, quinolonas, metronidazol y antivirales que Interfieren en la replicación del ADN, Impiden la transcripción e Inhiben la síntesis de metabolitos esenciales.

Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se refiere a la acción de un compuesto químico, natural o sintético, sobre el crecimiento de bacterias (Usano, Palá y Díaz, 2014). Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *In vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos, dichos métodos están clasificados, en tres grupos principales: métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía. (Ramírez y Castaño, 2009).

Métodos de difusión: La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer y otros investigadores (método de Kirby-Bauer). El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro impregnado con una cantidad conocida de la sustancia inhibitoria (Ramírez y Castaño, 2009).

Métodos de dilución: El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas, y la concentración mínima bactericida subcultivo (CMBs) como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado, estas variables son una herramienta para investigar nuevos antimicrobianos. (Ramírez y Castaño, 2009).

Bioautografía: es una técnica sencilla y rápida que combina las ventajas de la cromatografía y la detección de actividad antimicrobiana. El método consiste en colocar las muestras a evaluar en placas de cromatografía de capa fina (CCF) y seleccionar la fase móvil adecuada, posteriormente la placa se coloca en forma invertida sobre una caja de Petri previamente inoculada con el microorganismo a evaluar, se deja de 8 a 12 horas en la nevera para facilitar la difusión de los extractos en el medio, luego se retira la placa y se lleva la caja a incubación según los requerimientos del microorganismo; seguidamente se observa el halo de inhibición donde está el compuesto activo (Ramírez y Castaño, 2009).

Definición Operacional de Términos

Planta medicinal

Es cualquier planta que en uno o más de sus órganos contiene sustancias que pueden ser utilizadas con finalidad terapéutica o que son precursores para la semisíntesis químico-farmacéutica (Cañigüeral, Dellacassa y Bandoni, 2003).

Cepas bacterianas

Son un conjunto de bacterias con igualdad en términos de sus características biológicas, es decir, bacterias de la misma especie, se llaman cepas o colonias bacterianas. (Picazo y García, 1999).

Halos de inhibición

Es la zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen, es una medida de la potencia del antibiótico frente al germen, si mide menos de 18 mm de diámetro indica resistencia y si su medida es mayor e igual a 26 mm de diámetro es sensible. (Forbes, 2009).

Operacionalización de las variables

Se emplea en la investigación científica para designar el proceso mediante el cual se transforma la variable de conceptos abstractos a términos concretos, observables y medibles, es decir, dimensiones e indicadores; por lo general se representa en un cuadro (Arias, 2006). Por lo que, en esta investigación se describen dos variables, la variable dependiente: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Aldama dentata* La Llave & Lex (Tabla 1); y la variable independiente: Composición química del extracto etanólico de las hojas *Aldama dentata* La Llave & Lex (Tabla 2).

Tabla 1. Operacionalización de la variable dependiente. Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Aldama dentata*.

Variable	Tipo de variable	Definición Conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas <i>Aldama dentata</i> .	Dependiente	Es la capacidad o propiedad que posee un agente, bien sea un compuesto químico, natural o sintético, de inducir la muerte o inhibir el crecimiento de bacterias (Usano y cols., 2014).
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
Método de difusión en agar con disco.	<u>Bacterias Gram positiva:</u> • <i>Staphylococcus aureus</i> • <i>Enterococcus faecalis</i> <u>Bacterias Gram negativas:</u> • <i>Escherichia coli</i> • <i>Klebsiella pneumoniae</i> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Halos de inhibición

Elaborado por: Valero, Márquez y Fernández (2024).

Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente. Composición química del extracto etanólico de las hojas *Aldama dentata*.

Variable	Tipo de variable	Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química del extracto etanólico de las hojas <i>Aldama dentata</i> La Llave & Lex.	Independiente	Los metabolitos secundarios son compuestos producidos por las plantas, y estos no son esenciales para su funcionamiento (Albornoz, 1980)
Definición operacional ¿Cómo se mide?	Dimensiones	Indicador
Tamizaje fitoquímico	-Alcaloides: reactivo de Wagner, Mayer y Dragendorff -Saponinas: formación de espuma -Taninos: prueba con gelatina -Flavonoides: prueba de Shinoda -Fenoles: prueba de cloruro férrico -Triterpenos: prueba de Liebermann-Burchard	-Alcaloides: precipitados. -Formación de abundante espuma, saponinas -Precipitado blanco indica presencia taninos. -Flavonoides: coloración naranja a rojo. -Compuestos fenólicos: coloración azul a negro. -Esteroles y/o triterpenos: coloración azul o verde para esteroides; coloración es rosa, rojo, magenta o violeta para triterpenos.

Elaborado por: Valero, Márquez y Fernández (2024).

Hipótesis

Estudios anteriores han confirmado la presencia de metabolitos secundarios que poseen diversas actividades biológicas en las flores de la *Aldama dentata*, por lo cual, es de esperar que el extracto etanólico de las hojas de esta especie presente componentes similares y con actividad antibacteriana frente a cepas de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

El tipo de investigación es confirmatoria, basándonos en que la misma tiene como objetivo buscar el porqué de los hechos mediante el establecimiento de relaciones causa-efecto y sus resultados y conclusiones constituyen el nivel más profundo de conocimientos (Arias, 2006). Siendo así, permite confirmar la relación entre la composición química y la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata* La Llave & Lex.

www.bdigital.ula.ve Diseño de la Investigación

El diseño de investigación es la estrategia general que adopta el investigador para responder al problema planteado y de acuerdo a la manipulación de las condiciones en las cuales se realiza el estudio se clasifica en experimental (Arias, 2006). Por lo tanto, dicha investigación es de diseño experimental, se somete a la variable independiente composición química del extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata* a determinadas condiciones, estímulos o tratamientos, para observar los efectos o reacciones que se producen en la variable dependiente actividad antibacteriana, es decir, se caracteriza por la manipulación y control de las variables.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

La unidad de investigación de este estudio está representada por la planta *Aldama dentata* La Llave & Lex, procedente del estado Mérida.

Selección del Tamaño de la Muestra

La muestra de este estudio está representada por las hojas de la *Aldama dentata* seleccionada de manera aleatoria, según la disponibilidad de la especie vegetal en el estado Mérida.

Sistema de Variable

www.bdigital.ula.ve

Es un conjunto de operaciones para la conversión de una variable en datos. Según su función las variables pueden ser dependientes e independientes (Arias, 2006).

Las variables relacionadas con esta investigación son las siguientes:

- Variable dependiente (VD): Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata*.
- Variable independiente (VI): composición química del extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata*.

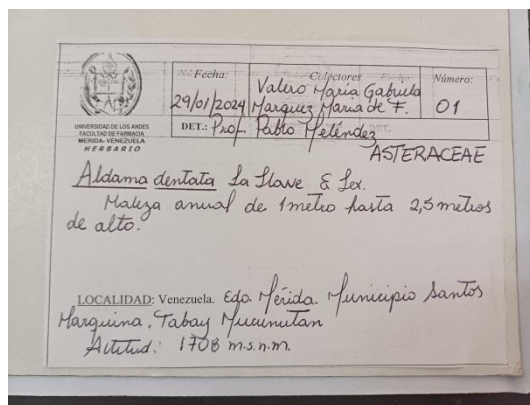
Instrumentos de recolección de datos

Son las distintas maneras o herramientas que un investigador utiliza para obtener la información que necesita, como lo son tablas de resultados, esquemas y registros fotográficos de los diversos procesos realizados para la determinación de la composición química y actividad antimicrobiana de las hojas de la *Aldama dentata*.

Procedimientos de la Investigación

Recolección de la planta

La planta fue recolectada en el Municipio Santos Marquina Tabay estado Mérida, luego se procedió a la identificación taxonómica en el Herbario MERF “Dr. Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, por el Director- Curador Herbario MERF Dr. Pablo Méndez González con el número Voucher Specimen 01 (Figura 11).



The image shows a handwritten voucher specimen form from the University of Los Andes, Faculty of Pharmacy and Bioanalysis, Herbario MERF. The form includes the following information:

No. Fecha:	Colectores:	Número:
29/01/2024	Valero María Gabriela Marquez Yana de F.	01

DET.: Prof. Pablo Méndez

ASTERACEAE

Aldama dentata Lalave & Lx.
Maleza anual de 1 metro hasta 2,5 metros de alto.

LOCALIDAD: Venezuela. Edo. Mérida. Municipio Santos Marquina, Tabay Mucumutan
Altitud: 1700 m.s.n.m.

Figura 11. Voucher de la muestra de la *Aldama dentata*.

Preparación del material vegetal

Para la preparación del material vegetal se recolectaron las hojas frescas de la planta, luego se pesaron en el Laboratorio A: Química de Productos Naturales Dr. Carl Seelkopf, del Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la asesoría de la profesora Árida Pérez, obteniendo un peso de 738 gramos, luego se procedió a secarlas en estufa a 40 °C, posteriormente se molió en un mortero y se pesaron nuevamente, obteniéndose la cantidad de 215,94 gramos del material vegetal seco y molido.

Preparación del extracto

La obtención del extracto se realizó en el Laboratorio A: Química de Productos Naturales Dr. Carl Seelkopf, del Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la asesoría de la profesora Árida Pérez, utilizando la técnica de extracción continua en caliente bajo reflujo y etanol como solvente. Así se colocaron 100,01 gramos del material vegetal pulverizado en un balón de destilación con etanol (Figura 12), conectándolo al sistema de reflujo durante una hora, transcurrido este tiempo se filtró (Figura 13) y se traspasó a un balón de destilación para llevar al rotavapor con el objetivo de recuperar el solvente y concentrar el extracto (Figura 14), posteriormente dicho extracto se almacenó en un envase de vidrio (Figura 15), y se llevó a estufa obteniéndose un extracto etanólico de 2,62 gramos (Esquema 1).



Figura 12. Extracción continua en caliente bajo reflujo



Figura 13. Filtración del extracto de las hojas de la *Aldama dentata* La Llave & Lex.

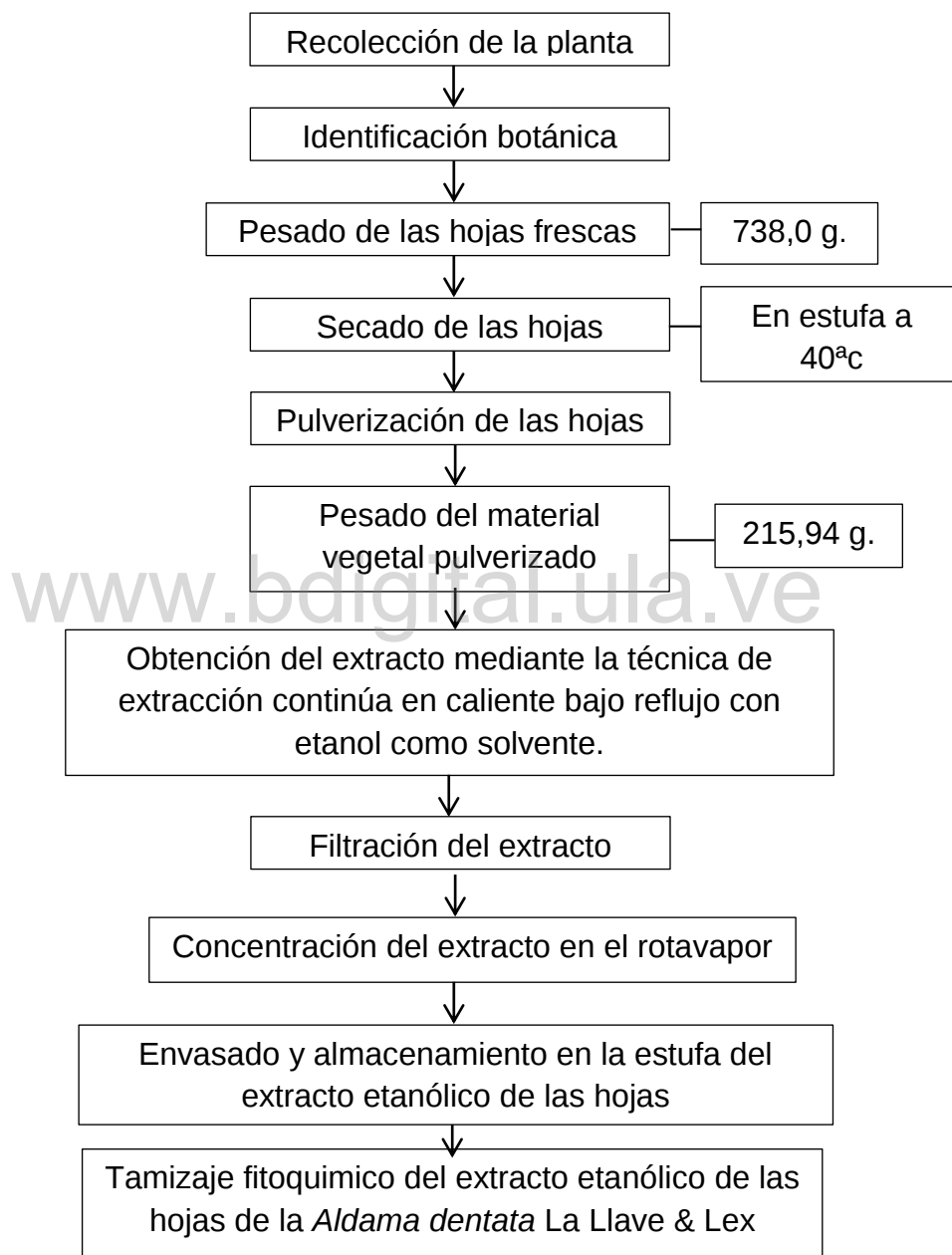


Figura 14. Concentración del extracto en el rotavapor.



Figura 15. Extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata* La Llave & Lex.

Esquema 1. Procedimiento empleado para la obtención del extracto de las hojas la *Aldama dentata* La Llave & Lex.



Fuente: Valero, Márquez y Fernández (2024).

Tamizaje fitoquímico

Una vez obtenido el extractos seco de las hojas de la *Aldama dentata*, se llevó a cabo el screening fitoquímico para la identificación de metabolitos secundarios por pruebas químicas cualitativas en el Laboratorio A: Química de Productos Naturales Dr. Carl Seelkopf, del Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la asesoría de la profesora Álida Pérez, evaluados de la siguiente forma (Martínez, 2020; Tamayo y cols., 2011):

Ensayo de Dragendorff, Mayer y Wagner (Alcaloides): Se disolvió una porción del extracto en 2 mL de HCl al 5 %, se agitó y se tomó una alícuota a la cual se le añadió gotas de los diferentes reactivos (Dragendorff, Mayer y Wagner).

Ensayo de Lieberman-Burchard (Esteroles/Triterpenos): se utilizó un tubo de ensayo limpio, seco e identificado y una pequeña cantidad del extracto, luego se adicionó 0,5 mL de solución clorofórmica anhidra, 0,5 mL de anhídrido acético y cuidadosamente por la pared del tubo una gota de ácido sulfúrico concentrado.

Ensayo de FeCl_3 (Compuestos fenólicos): La muestra se disolvió en agua y se agregaron unas gotas de solución de tricloruro férrico al 1 %.

Prueba de altura y estabilidad de espuma (Saponinas): Se preparó una solución acuosa del extracto etanólico, se colocó 1 mL en un tubo de ensayo, se agito vigorosamente durante 1 minuto y se observó la altura de la espuma.

Ensayo de gelatina (Taninos): Se disolvió la muestra en agua y se agregó la solución de gelatina al 1 %.

Ensayo de Shinoda (Flavonoides): A 1 mL del extracto diluido, se añadió algunas birutas de magnesio, se sujetó el tubo con una pinza y se adiciono cuidadosamente por la pared del tubo unas gotas de HCl concentrado.

Ensayo de hidróxido de sodio al 10 % (Flavonoides): La solución del extracto acuoso se trató con 1 mL de una solución de hidróxido de sodio al 10%.

Ensayo con hidróxido de amonio concentrado (Cumarinas): Se concentró una porción del extracto y se le adiciono 0,5 mL de etanol y dos gotas de hidróxido de amonio concentrado, luego se observa bajo la luz ultra violeta.

Reacción de hidróxido de amonio (Antraquinonas): Para esta prueba se adicionó una gota de hidróxido de amonio concentrado al extracto.

Reacción con ácido sulfúrico (Quinonas): Se agregó 1 gota de ácido sulfúrico concentrado a una porción del extracto en una cápsula de porcelana.

Prueba de hidróxido de sodio al 10 % con HCl (Sesquiterpenlactonas): Se colocaron 2 mg del extracto con solución de hidróxido de sodio al 10 %, observándose si un color amarillo o naranja se pierde al agregar una gota de HCl.

Prueba para glicósidos cardiotónicos (Glicósidos cardiotónicos): Para esta prueba se dispuso de un tubo con 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado y otro tubo al cual se le agregó el extracto con 2,5 mL de agua y 1 mL de ácido acético glacial más una gota de FeCl_3 , así, esta mezcla se adiciono al tubo que contiene ácido sulfúrico concentrado evidenciando la presencia de un anillo marrón que indica la positividad de la prueba.

Determinación de la Actividad Antibacteriana

La determinación de la actividad antibacteriana, se realizó por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer), originalmente descrito por Bauer y cols (1966), bajo la asesoría de las Profesoras Yndra Cordero e Ysbelia Obregón, y el auxiliar de Laboratorio TSU. José Emilio Salazar, en el Laboratorio de Actinomicetos, adscrito al IIFFB.

Bacterias Estudiadas

Para este estudio se seleccionaron cinco especies de bacterias: dos especies Gram positivas y tres Gram negativas, de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC por sus siglas en inglés), las cuales fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes (ULA), a cargo de la Licenciada Yacneli Infante (Tabla 3).

Tabla 3. Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC)

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

Fuente: Elaborado por Cordero y Obregón, 2021.

Preparación de las muestras

Se pesó 10 mg del extracto y se disolvió en 1 mL de dimetilsulfoxido (DMSO) para obtener una solución de una concentración de 10000 ppm (10mg/mL).

Preparación de los discos

Se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro, los cuales se esterilizaron bajo luz ultravioleta (LUV), por 24 horas. Posteriormente se impregnaron con 10 µL de la muestra en estudio (extracto etanólico), DMSO (como control negativo) y se utilizaron discos de antibióticos comerciales como control positivo con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar. En este caso se utilizó Ampicilina® 10 µg, Eritromicina® 15 µg y Piperacilina® 100 µg.

Preparación de los Inóculos Bacterianos

El inóculo bacteriano se preparó con la ayuda de un asa estéril, tomándose de esta manera, una pequeña cantidad de colonias, a partir de un

cultivo fresco y purificado de cada cepa bacteriana repicada en agar Müller-Hinton, para luego ser suspendidas en tubos, previamente estériles, que contienen 5 mL de una solución salina fisiológica estéril de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0,85 %, hasta que alcance una turbidez equivalente al patrón de Mac Farlán N° 0,5 (10^{6-8} UFC/mL).

Inoculación de las Placas y Determinación de la Actividad Antibacteriana

Se realizó la inoculación de las placas de agar Müller-Hinton, tomando un inóculo de cada bacteria con un hisopo estéril impregnado por la placa, rotando la misma sin dejar ningún espacio libre, hasta lograr una siembra uniforme, se dejó secar. Posteriormente se colocaron en forma equidistante los discos de papel, los cuales fueron impregnados con 10 µL de la solución en estudio, adicionalmente se colocaron los discos de los respectivos controles tanto positivo (Ampicilina®, Eritomicina® y Piperacilina®) como negativo (dimetilsulfóxido). Estas se dejaron en la nevera a 4 °C aproximadamente durante 30 minutos (pre-incubación), con la finalidad de que los discos impregnados con las diferentes muestras difundan a través del agar, para luego llevarlas a la estufa durante 24 horas a 37 °C en posición invertida, en atmosfera aeróbica.

Lectura de las Placas

Luego de ser incubadas cada una de las placas, por un lapso de tiempo de 24 horas, se realizó la lectura de las mismas con una regla milimétrica. Donde se consideró un resultado positivo o sensible (presencia de actividad antibacteriana) cuando se observó un halo de inhibición alrededor del disco, y se tomó como resultado negativo o resistente (sin actividad antibacteriana) la ausencia de dicho halo. El diámetro de la zona de inhibición producto de la

actividad antibacteriana de las muestras en estudio se expresó en milímetros (mm).

Diseño de análisis

Los datos que se recolectaron en el proceso de esta investigación fueron analizados a través de un enfoque cualitativo y cuantitativo, ya que se expresaron numéricamente y se realizaron descripciones u observaciones (Palella y Martins, 2010).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

RESULTADOS

Existen ciertas características que son propias del extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata* (Tabla 4).

Tabla 4. Características físicas del extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata*.

Características	Extracto etanólico de las hojas
Aspecto	Viscoso
Color	Verde intenso
Olor	Característico

Elaborado por: Valero, Márquez y Fernández, (2024).

Se realizó la determinación del % de rendimiento del extracto (Tabla 5) aplicando la siguiente formula:

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

Tabla 5. Resultados obtenidos del porcentaje de rendimiento

	Extracto etanólico
Peso inicial (g)	100,01 g
Peso final (g)	2,62 g
% de Rendimiento	2,61 %

Elaborado por: Valero, Márquez y Fernández, (2024).

Tamizaje fitoquímico

El extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata* se sometió a diferentes pruebas cualitativas (Tabla 6), evaluadas a partir de formación de precipitados, turbidez del medio, viraje de color, formación de espuma por agitación, fluorescencia por exposición a la luz ultravioleta (UV) (Tabla 7), determinando así la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, compuestos fenólicos, esteroides, lactonas y glicósidos cardiotónicos.

Tabla 6. Resultados del análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata* La Llave & Lex.

Metabolitos	Pruebas químicas	Extracto etanólico
Alcaloides	Dragendorff Wagner Mayer	- - -
Triterpenos/Esteroides	Libermann-Burchard	Verde esteroides +
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	+
Saponinas	Espuma	-
Taninos	Gelatina al 1 %	-
Flavonoides	Shinoda NaOH 10 %	- +
Cumarinas	NH ₄ OH	-
Antraquinonas	NH ₄ OH	-
Quinonas	Cápsula con H ₂ SO ₄	-
Lactonas (sesquiterpernos)	NaOH al 10 % con HCl	+
Glicósidos cardiotónicos	Prueba para glicósidos cardiotonicos	+
Presente: + Ausente: -		

Elaborado por: Valero, Márquez y Fernández, (2024)

Tabla 7. Resultados ilustrados del análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata* La Llave & Lex.

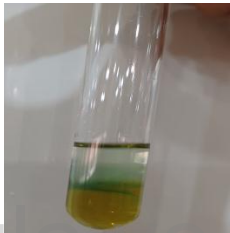
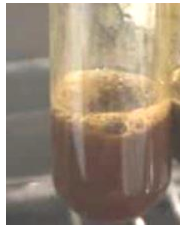
Metabolitos y pruebas químicas	Resultados
Alcaloides Dragendorff Wagner Mayer	Negativo  No se observa precipitado
Triterpenos/ Esteroles Liebermann-Burchard	Positivo  Anillo verde
Compuestos fenólicos FeCl_3	Positivo  Color verde oscuro
Saponinas Espuma	Negativo  Ausencia de espuma

Tabla 7. Resultados ilustrados del análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata* La Llave & Lex. (Continuación)

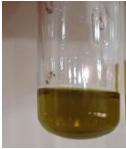
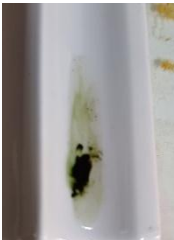
Taninos Gelatina al 1 %	Negativo  Ausencia de precipitado blanco
Flavonoides Shinoda	Negativo  No se observa cambio de color
NaOH 10. %	Positivo  Color amarillo
Cumarinas NH₄OH	Negativo  No se observa fluorescencia azul.
Antraquinonas NH₄OH	Negativo  No se observa cambio de color

Tabla 7. Resultados ilustrados del análisis fitoquímico preliminar del extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata* La Llave & Lex. (Continuación)

Quinonas Cápsula con H₂SO₄	Negativo  Ausencia de color rojo
Lactonas (sesquiterpenos) NaOH al 10 % con HCl	Positivo  Se pierde la coloración amarillo-naranja.
Glicósidos cardiotónicos Prueba para glicósidos cardiotónicos	Positivo  Anillo marrón

Elaborado por: Valero, Márquez y Fernández, (2024).

Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de la *aldama dentata* La Llave & Lex.

Los resultados obtenidos del extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata*, evaluados mediante la técnica de difusión de disco en agar, se encuentran en la tabla 8. El mencionado extracto a una concentración de 10000 ppm mostro actividad frente a las cepas de bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* con un halo de inhibición de 7 mm (Figura 16 y 17), así como también; en las bacterias Gram negativas *Klebsiella pneumoniae* (8 mm) (Figura 18), *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (7 mm) (Figura 19 y 20).

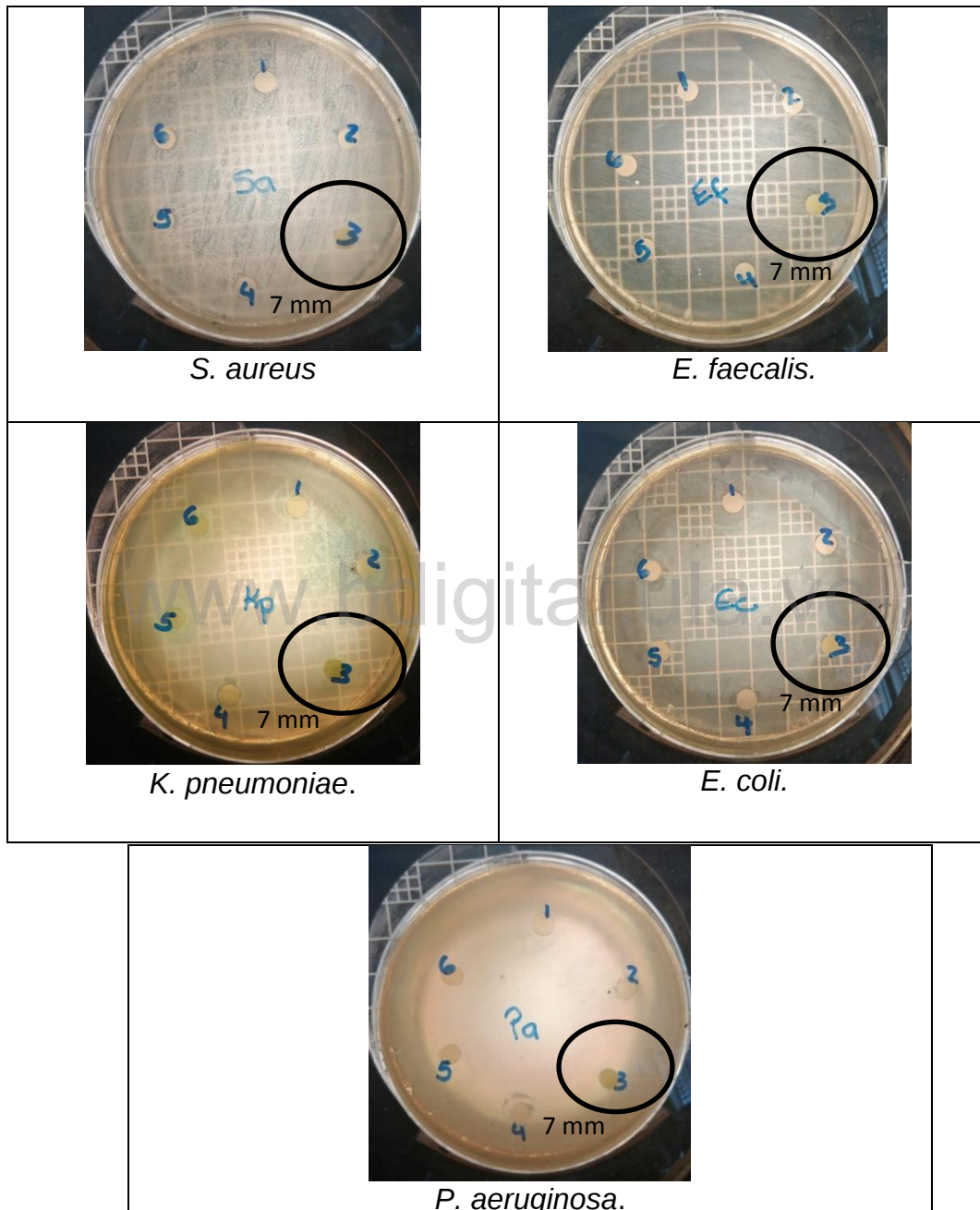
Tabla 8. Resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de la *Aldama dentata*.

Bacterias	[] (ppm)	Antibióticos de referencia			
		EEH (mm)	PIP (mm)	AM (mm)	ERI (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10000	7			32
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	10000	7		32	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10000	7	27		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	10000	8	27		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	10000	7	27		

Leyenda: []: concentración, **EEH:** extracto etanólico de hojas, **PIP:** Piperacilina ® 100 µg, **AMP:** Ampicilina ® 10 µg, **E:** Eritromicina ® 15 µg; **10000 ppm:** partes por millón; **mm:** milímetros.

Elaborado por: Valero, Márquez y Fernández, (2024)

Figura 16. Resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas *Aldama dentata*.



Leyenda: 3: extracto etanólico de las hojas *Aldama dentata*.

Discusiones

Los ensayos realizados al extracto etanólico de las hojas de *Aldama dentata* mediante el tamizaje fitoquímico demostraron la presencia de compuestos químicos como esteroides, fenoles, flavonoides lactonas sesquiterpénicas y glicósidos cardiotónicos, guardando relación con lo reportado por Isla y cols., (2020), estos autores determinaron en el extracto etanólico de las flores de *Aldama dentata*., la presencia de metabolitos secundarios como glicósidos cardiotónicos, flavonoides, compuestos fenólicos, lactonas sesquiterpénicas, triterpenos, quinonas, antraquinonas y cumarinas. Lo descrito anteriormente coincide con lo reportado para la familia Asteraceae ya que contiene metabolitos secundarios como glicósidos cardiotónicos, flavonoides, terpenoides, taninos, saponinas, cumarinas, alcaloides, esteroides, triterpenos, entre otros.

En consecuencia, los terpenos o terpenoides constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios, dentro de los cuales se incluyen los triterpenos/esteroides y las lactonas sesquiterpénicas, teniendo importancia medicinal por sus propiedades anticancerígenas, antiulcerosas, antimalaricales y antimicrobianas, entre otros (Ruiz y Suarez, 2015)

Así mismo, los compuestos fenólicos (fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides) se han asociado con una menor incidencia de enfermedades crónicas no transmisibles tales como diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares, también presentan propiedades antimicrobianas, antioxidantes, anticancerígenos, analgésicas, vasodilatadoras, antihipertensiva, antitrombótica, anticoagulante y antiinflamatorias (Albarca, 2017). Por otra parte, se encuentran los glicósidos

cardiotónicos o cardenólidos que son empleados en el tratamiento para la insuficiencia cardiaca congestiva (García y Carril, 2011).

En este sentido, la composición química detectada en las hojas de *A. dentata* sugiere que esta especie es una fuente de compuestos bioactivos.

En lo que respecta a la actividad antibacteriana, el extracto etanólico de las hojas de *Aldama dentata* a una concentración de 10000 ppm, inhibió bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* con un halo de inhibición de 7 mm, así como también; bacterias Gram negativas entre ellas *Klebsiella pneumoniae* (8 mm), *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (7 mm), teniendo similitud con el estudio realizado por Isla y cols., (2020), los cuales determinaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las flores de *Aldama dentata* a una concentración de 1000 ppm, obteniendo como resultando la inhibición de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* con halos de inhibición de 13 mm, 7 mm, 8 mm y 8 mm, respectivamente, en ambos estudios se utilizó el método de difusión en agar con disco.

En tal sentido, los resultados anteriormente descritos se debe a la composición química común entre los extractos, sin embargo, la actividad antibacteriana se puede ver afectada por la concentración empleada, y al uso del papel filtro Whatman, se compone de celulosa (uniones b-(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. Es

por ello que se recomienda utilizar la técnica de difusión en pozo, por su alta sensibilidad. (Ramírez y cols., 2009).

Los metabolitos secundarios ejercen su actividad antibacteriana a través de diferentes mecanismos. En general, el mecanismo de acción está relacionado con cambios en la morfología celular, alteración de la membrana asociada con fuga de iones, reducción del potencial de membrana, deterioro de la homeostasis del pH intracelular, cambios en el proteoma y transcriptoma, inhibición de la actividad ATP-asa, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, entre otros. Así, los compuestos bioactivos de las plantas provocan alteración considerable en las diversas funciones biológicas de las bacterias que conducen al deterioro de los procesos celulares vitales necesarios para la supervivencia de la misma (Prakash, Kumar, Singh, Sangachan, 2020).

Referente al mecanismo de acción antibacteriano de los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Aldama dentata*, se ha reportado que los terpenoides pueden actuar por al menos cinco mecanismos de acción; estos incluyen, daño en la estructura y función de la membrana, inhibición de la biosíntesis y función de los ácidos nucleicos, interferencia de procesos metabólicos esenciales, inducción de la coagulación de los componentes citoplásmicos y la interrupción en la comunicación celular normal (Gallegos, Bañuelos, Delgadillo, Meza, Echeverria, 2019). Por otra parte, los compuestos fenólicos al parecer producen inhibición enzimática, posiblemente mediante reacciones con los grupos sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas, mientras que los flavonoides actúan formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función (Domingo y Lopez, 2003). Todos estos mecanismos de acción pueden verse influenciados por varios factores, como las

características de las células bacterianas (bacterias Gram positivas y negativas), condiciones ambientales y fisicoquímicas (la hidrofobicidad, la concentración del compuesto, la temperatura y el Ph (Gallegos y cols., 2019).

En relación a lo descrito anteriormente, se infiere que los metabolitos secundarios detectados en las hojas de *Aldama dentata* poseen importantes propiedades farmacológicas, por lo cual, se puede considerar que esta especie es una fuente de metabolitos secundarios biológicamente activos.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

El tamizaje fitoquímico permitió determinar que en el extracto etanólico de las hojas de *Aldama dentata* predominan metabolitos secundarios como esteroides, fenoles, flavonoides, lactonas sesquiterpénicas y glicósidos cardiotónicos.

La evaluación de la actividad antibacteriana reveló la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* frente al extracto etanólico de las hojas de *Aldama dentata* a una concentración de 10000 ppm.

Se confirma la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química del extracto etanólico de las hojas de *Aldama dentata* en cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas de referencia internacional ya que el extracto posee metabolitos secundarios que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de las bacterias ensayadas.

Por otra parte, es importante mencionar que este es el primer reporte de la composición química y actividad antibacteriana de las hojas *Aldama dentata*, siendo el presente estudio un aporte para la fitoquímica y actividad biológica del género *Aldama* y especie *A. dentata*.

Recomendaciones

Evaluar actividad antifúngica en las hojas de la *Aldama dentata*.

Realizar un estudio de tamizaje y actividad antimicrobiana de la planta *Aldama dentata*, utilizando otras partes como tallo y raíz.

Llevar a cabo una investigación sobre la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de la *Aldama dentata*, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masa (CG/EM).

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICA

- Abarca, R. (2017). "Antioxidantes naturales-preventivos de enfermedades", Vórtice, año 4, núm. 14, 2017, pp.18-19.
- Albornoz, A. 1980. Productos Naturales: sustancia y drogas extraídas de plantas. Caracas: ediciones de La Universidad Central de Venezuela.
- Anon, A. (2003). Determination of minimum inhibitory concentration (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clinical Microbiology and Infection*, 9,1.
- Ávalos, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca Biología*. 2 (3),119-145.
- Arias, F. (2006) El Proyecto de Investigación, Instrucción a la metodología. Caracas -Venezuela. Epiteme. 57-63.
- Badillo, V.(1996). *Los géneros de las compositae (Asteraceae) de Venezuela: clave artificial para su determinación*. Ernstia.8 (2,3)52.
- Bauer, A., Kirby W., Sherris J., y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45, 493-496.
- Benavides, L., Aldama, A., Vázquez, H. (2005). Vigilancia de los niveles de uso de antibióticos y perfiles de resistencia bacteriana en hospitales de tercer nivel de la Ciudad de México. *Salud Pública de México*, 47, 219-226.
- Bombo, A. B., Filartiga, A. L., Garcia, V. L., y Appezzato-da-Glória, B. (2017). Secretory structures in *Aldama* species (Heliantheae–Asteraceae): morphology, histochemistry and composition of essential oils. *Flora*, 228, 39-49

- Bombo A, Appezzato B, Aschenbrenner A, Spring, O. (2016). Capitulate glandular trichomes in *Aldama discolor* (Heliantheae–Asteraceae) morphology metabolite profile and sesquiterpene biosynthesis. *Plant Biology*. 18(1) 455 – 462.
- Cabrera, C., Fadragas, A., Guerrero, L. (2005). Antibióticos naturales: Mito o realidad. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 21(3-4).
- Camacho, P., Yunel, A., Ramírez, H, Gómez, Le. (2019). Propiedades fitoquímicas y antibacterianas de extractos de *Tagetes erecta* L. (Asteraceae). *Revista Cubana de Química*, 31(1), 53-64.
- Canosa, M. (2008). Desarrollo de metodología analítica para determinación de Triclosán y Parabenos. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales (trabajo de investigación). Santiago de Compostela, España: Universidad Santiago de Compostela.
- Cañigual, 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.
- Carrillo, T., y Moreno, R. (2006). Importancia de las plantas medicinales en el autocuidado de la salud en tres caseríos de Santa Ana Trujillo, Venezuela. *Revista de La Facultad de Farmacia*, 48(2), 20-28.
- Cilia, L., Virginia, G., Cortés, R., Zurita, L. (2021). Ethnopharmacology of the Asteraceae family in Mexico. *Botanical Sciences*, 99(3), 455-486.
- Conanp. (2011). Programa de Manejo Parque Nacional El Tepozteco. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. 70 pp
- Cué, B., Morejón, M. (1998). Antibacterianos de acción sistémica: Parte I. Antibióticos betalactámicos. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 14(4), 347-361.

- Daza, R. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf Ter Sist Nac Salud*, 22(3), 57-67.
- Domingo, D., López, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Esp Quimioterap*, 16 (4), 385-393.
- Fernández, F., López, J., Ponce, L., Machado, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32(1), 10-20.
- Forbes, B. (2009). *Diagnostico microbiológico*, Buenos Aires, Bogota, Caracas, Madrid, Mexico, Porto Alegre. Panamericana. 195.
- Gallegos, P., Bañuelos, R., Delgadillo, L., Meza, C., Echavarría, F. (2019). Actividad antibacteriana de cinco compuestos terpenoides: carvacrol, limoneno, linalool, α -terpineno y timol. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 22(2), 241-248.
- García, H. (1975) Flora Medicinal de Colombia. Bogota - colombia. Tercer Mundo.
- García, A., Carril, E. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología)*, 2(3).
- Garden, M. B. (2011). Tropicos. org. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/>.
- Giono, S., Santos, J., Rayo, M., Torres, F., Alcántar, M. (2020). Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gaceta Médica de México*, 156(2), 172-180.
- Gonzalez, A. (2004). Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas amazónicas. Colombia: Universidad Nacional de Colombia.
- Hanson, J. R. (2003). Natural products: the secondary metabolites.
- Hokche, O, Berry, P, Huber, O. (2008). Nuevo catálogo de la flora vascular de Venezuela .Caracas, Venezuela. Fundación instituto botánico de Venezuela .227.

- Hurtado, J. (2015). El proyecto de investigación. Caracas, Venezuela. Quirón. 90.
- Isla, M., Pérez A., Obregón Y., Aparicio R., Cordero Y., Díaz C., Isla J., Chacón C., Fernández J., Rojas L. (2020). Perfil fitoquímico, actividad biológica y fotoprotectora de las flores de *Aldama dentata* La Llave et Lex. Facultad Farmacia, 62(Edición especial), 4-14.
- Jazivon, F., Deniz, E., Mesquia, L., Oliveira, A., Costa, T. (2008). Extractos vegetales en el control de plagas. *Revista Verde*. 3 (3).
- Katinas, L., Gutiérrez, D., Grossi, M., Crisci, J. (2007). Panorama de la familia Asteraceae (Compositae) en la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 42(1-2), 113-129.
- Lamarque, A., Zygadlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M., Maestri, D. (2008). Fundamentos Teórico-Prácticos de Química Orgánica (1° ed.). Córdoba, Argentina: Editorial Encuentro.
- Leal, F., Benítez, C., Schnee, L. (2010). *El manual de plantas comunes de Venezuela de Ludwig Schnee*. Maracay, Venezuela. Colección Botánica. 185.
- Marcano, D., Hasegawa, M. (2018). *Fitoquímica Orgánica*. Venezuela: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela.
- Martin, G. (2018). Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 84.
- Martínez, A. (2020). *Química de Productos Naturales*. Colombia: Universidad de Antioquia.
- Palella, S., y Martins, P. (2010). Metodología de la Investigación Cuantitativa. Caracas Venezuela. Fedupel.
- Paredes, F., y Roca, J. (2004). Acción de los antibióticos. *Offarm*, 23(3), 116-124.

- 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.
- Pérez, M., Mota, M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*, 23-42.
- Picazo, J, Garcia, J . (1999). *Comprendido de microbiologia medica*, Madrid ,España, Horcourt, 16.
- Pico, S., Jaimes, J., López, L., Murillo, C. (2019). Extracción supercrítica de compuestos bioactivos de la cascara de cacao: estudio de los principales parámetros. *Revista de la Facultad de ingeniería*. (91), 95-105.
- Plain, C., Perez, A., Rivero, Y. (2019). Medicina natural y tradicional como tratamiento alternativo de multiples enfermedades. *Revista cubana de medicina general integral*. 35 (2).754.
- Prakash, B., Kumar, A., Singh, P., Songachan, L. (2020). Antimicrobial and antioxidant properties of phytochemicals: Current status and future perspective. *Functional and preservative properties of phytochemicals*, 1-45.
- Ramirez, L. S., Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et technica*, 15(42), 263-268.
- Rivas, C., Oranday, M., Verde, M. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. México. Omniascience. 6. 351- 410.
- Rojas, J. (2019). *Los productos naturales y sus beneficios para el ser humano*. Ponencia presentada durante la incorporación como miembro correspondiente estatal de la Academia de Mérida, Mérida, (Venezuela).

- Ruiz, E., Suarez, M. (2015). Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 46(1), 9-24
- Selles, E., Sánchez, J., Solan, C., Suiñe, J., y Tico, J. (1992). *Tratado de Farmacia Galénica*. Madrid – España. Selsa.
- Sepúlveda, G., Porta, H., Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21 (3), 355-363.
- Tamayo, R., Alba, E., y Mojera, I. (2011). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólicos, etéreo y acuosos de las hojas y tallos de la *Isocarpha cubana* B. *Red de Revistas Científicas de América Latina el Caribe España y Portugal*, 15(3), 322-347.
- Usano, J., Palá, J., Díaz, S. (2014). Aceites esenciales: conceptos básicos y actividad antibacteriana. *Reduca (Biología)* (2): 60-70
- Valcárcel, M., y Gómez, A. (1988). *Técnicas analíticas de separación*. Barcelona: Editorial Reverte.
- Vieira, V., Nunes, C., Franca, J. (2022). Componentes fitoquímicos y actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Cnicus benedictus* Linneau, Asteraceae. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 27(1). 925.
- Villaseñor, J. (2018) Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en México. 96(2), 332-358.
- Vitto, L., Petenatti, E. (2009). Asteráceas de importancia económica y ambiental. primera parte. sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. 1(18), 87 – 115.
- Vivot, P., Sánchez, C., Cacik, F., Sequin, C. (2012). Actividad antibacteriana en plantas medicinales de la flora de Entre Ríos (Argentina). *Ciencia, Docencia y Tecnología*, (45), 131-146.