



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



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL
EXTRACTO DE LAS HOJAS DE *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.**

www.bdigital.ula.ve

Autor:

Cortez, María

CI V-25419349

Tutor:

Dra. Aparicio, Rosa

Mérida, abril de 2021.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradecida de mi Dios por el amor, que aun antes de nacer ya me había amado y por la bendición de permitirme estudiar en la mejor Universidad de Venezuela

A la Ilustre Universidad de los Andes, por abrir sus puertas y brindarme su magnífica enseñanza de calidad, además a todo aquel personal universitario que labora con sacrificio y realiza su trabajo con amor. Muchas gracias.

Al Instituto de investigaciones «Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga de Hierro», por abrirme sus puertas y permitirme realizar este trabajo en sus laboratorios. Muchas Gracias.

A mi tutora, profesora Rosa Aparicio por la dedicación, responsabilidad, compromiso incondicional, paciencia y creer en mí. Mil Gracias.

A mi profesor, Luis Rojas por ser una de las mejores personas de la facultad, que con paciencia y mucho amor por los alumnos nunca decías que no, mi agradecimiento especial porque aunque físicamente no estés dejaste enseñanza en mi vida. Mil Gracias.

A el profesor, Alfredo Usubillaga por su dedicación profesional.

A mis padres por darme la vida y con amor estuvieron en los días buenos y malos, a mi madre por las inmensas e incansables oraciones, por cada llamada y cada palabra de aliento, los Amo. Mil Gracias.

A mis hermanos, Mayra, Isol, Rocky, Aidalth por el apoyo incondicional, por estar allí siempre, por la paciencia y cada consejo, los Amo. Mil Gracias.

A mis amigos, Luisana, Kimberly, Gilber, Gerson, Rafael, Luis, Carla, Uver y Eduardo, por el si puedes que muchas veces necesitaba y fue tan importante, por la risa, la amistad y el amor, los Quiero. Mil Gracias.

A mis compañeros de estudio, Eduardo, Daniela, Alida, Belkys, Rebeca, Mili, por la paciencia, la enseñanza, el compartir y la alegría. Los Quiero, muchas Gracias.

Muchas gracias

DEDICATORIA

Principalmente a Dios, por el amor, bendiciones, cuidado y provisión.

A mi Madre, María Pérez por el amor, el apoyo incondicional, las constantes oraciones, mi mejor ejemplo a seguir de constancia, dedicación, valentía, amor a Dios y responsabilidad, de quien he aprendido muchas cosas y le agradezco por ser quien soy hoy en día, Te Amo.

A toda mi familia, tía América, Mayra, Isol, Rocky, Aidalith por el apoyo, el amor y la paciencia, mis sobrinos Josué, Josías, Milan, Samantha y Jesús por la ternura y el amor.

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	3
Planteamiento del problema	3
Justificación e importancia de la investigación	4
Objetivos de la investigación	5
Objetivo general	5
Objetivos específicos	5
Alcances y limitaciones de la investigación	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	7
Trabajos previos	7
Antecedentes históricos	10
Bases teóricas	11
Familia Asteraceae	11
Género <i>Espeletiopsis</i>	13
Especie <i>Espeletiopsis pannosa</i>	23
Productos naturales	24
Extractos vegetales	29
Screening Fitoquímico	33
Bacterias	35
Definición operacional de Términos	44
Operacionalización de las variables	45
Sistema de hipótesis	47
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	48

Tipo de investigación	48
Diseño de investigación	48
Población y muestra	49
Unidad de la investigación	49
Selección del tamaño de la muestra	49
Sistema de variables	49
Técnica e Instrumentos de recolección de datos	50
Procedimiento de la investigación	50
Diseño de análisis	54
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	56
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y	69
RECOMENDACIONES	
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

N°		Pág.
1	Estructuras químicas de algunos fenoles de <i>Solidago graminifolia</i> L.	8
2	Estructura química de los kaurenos aislados <i>Coespeletia moritziana</i> (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec	9
3	Estructuras Químicas de la especie <i>Artemisia annua</i>	13
4	Estructura química de los kaurenos aislados de la especie <i>Espeletiopsis angustifolia</i>	17
5	Estructuras Química de algunos compuestos de las 5 especies de <i>Espeletiopsis</i> .	18
6	Estructura química del ácido 3- β -Hidroxi-Kaurénico	22
7	Especie <i>Espeletiopsis pannosa</i>	23
8	Estructura química del ácido isovaleroxikaurénico	24
9	Estructuras químicas de algunos alcaloides	25
10	Estructuras químicas de algunos triterpenos	26
11	Estructuras químicas de algunas saponinas	26
12	Estructura química de los taninos	27
13	Estructuras químicas de algunos flavonoides	28
14	Estructuras químicas de algunas cumarinas	28
15	Estructura químicas de algunas quinonas en especies vegetales	29
16	Extracción continúa en soxhlet	31
17	Extracción de Reflujo	31
18	Extracción por Maceración	32
19	Extracción por Infusión	32
20	Diferencias en la estructura de la pared celular entre	36

	microorganismos grampositivos y gramnegativos	
21	<i>Staphylococcus aureus</i>	37
22	<i>Enterococcus faecalis</i>	37
23	<i>Escherichia coli</i>	39
24	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40
25	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
26	Determinación de Alcaloides del Extracto Hexano-Éter	58
27	Determinación de Compuestos Fenólicos	58
28	Determinación de Taninos y Flavonoides	59
29	Determinación de Esteroles y/o Triterpenos	59
30	Quinonas y Antraquinonas	60
31	Sesquiterpenos (Cumarinas)	60
32	Saponinas	60
33	Halos de inhibición del extracto Hexano-éter <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	61
34	Halos de inhibición del extracto Hexano-éter <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)	62
35	Halos de inhibición del extracto Hexano-éter <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 23357)	62
36	Halos de inhibición del extracto Hexano-éter <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	63
37	Halos de inhibición del extracto Hexano-éter <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	63

ÍNDICE DE TABLAS

N°		Pág.
1	Taxonomía	12
2	Clasificación Taxonómica del Género <i>Espeletiopsis</i> .	14
3	Distribución Geográfica y nombre común de las Especies del Género <i>Espeletiopsis</i>	15
4	Operacionalización de la variable dependiente actividad antibacteriana del extracto de las hojas de <i>Espeletiopsis pannosa</i>	45
5	Operacionalización de la variable independiente del extracto de las hojas de <i>Espeletiopsis pannosa</i>	46
6	Características físicas del extracto hexano-éter de <i>E. pannosa</i>	56
7	Resultados del Screening Fitoquímico del Extracto Hexano-Éter de las Hojas de <i>Espeletiopsis pannosa</i>	57
8	Resultados de la actividad antibacteriana del Extracto hexano-éter de las Hojas de <i>Espeltiopsis pannosa</i> .	64



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



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL
EXTRACTO DE LAS HOJAS DE *Espeletiopsis pannosa* (Standl.) Cuatrec.
Trabajo de Grado II

Autor:

Cortez, María
CI V-25419349

Tutor(a):

Dra. Aparicio, Rosa

www.bdigital.ula.ve
RESUMEN

En el presente escrito se describe la actividad antibacteriana y la composición química del extracto de las hojas de *Espeletiopsis pannosa*. El extracto se obtuvo por el método de extracción a reflujo, a una temperatura de 50 °C. Los resultados obtenidos del screening fitoquímico del extracto de las hojas hexano-éter (3:1), se observó la presencia de compuestos alcaloides y triterpenos. La actividad antibacteriana se evaluó en una concentración de 1000 ppm, a través del método de difusión en agar, indicando una sensibilidad para las bacterias ensayadas de *E. aureus* (7 mm), *P. aeruginosa* (6 mm), *E. coli* (7 mm) y *K. pneumoniae* (7 mm), mientras que para el *E. faecalis* no se observó inhibición del halo. Este es el primer estudio del screening fitoquímico y la actividad antibacteriana del extracto de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* y del género *Espeletiopsis*.

Palabras claves: Asteraceae, *Espeletiopsis*, *Espeletiopsis pannosa*, screening fitoquímico, actividad antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

Los productos naturales según una definición amplia son compuestos que se originan en la naturaleza, pueden ser considerados como productos para la adaptación de un organismo a sobrevivir en un ecosistema particular. A partir de esta fuente natural ya sea las partes de una planta seca o fresca (hojas, tallos, raíces) se pueden obtener extractos, mezcla compleja de compuestos químicos, obtenibles por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos utilizable en cualquier campo de la tecnología (Lizcano y Vergara, 2008).

Estos productos, se usan como una alternativa terapéutica ya que poseen actividad antibacteriana, siendo ésta definida como una sustancia empleada para el tratamiento de enfermedades infecciosas. En diversas investigaciones se ha demostrado, la gran variedad de géneros que poseen propiedades antibacterianas; entre ellas la especie *Espeletiopsis pannosa*, conocida como frailejón plateado, perteneciente a la familia Asteraceae. Es una planta arrosetada, con hojas lineales, se encuentra a 3.500 m sobre suelos que contienen abundante aguas, distribuidas en los páramos de Venezuela. Sus hojas y partes aéreas han sido usadas en comunidades para tratar enfermedades respiratorias y de la piel (Hidalgo, Ricardi, Gaviria y Estrada; 1999). Esta especie, se caracteriza por contener en su mayoría sustancias tipo diterpenos, en menor proporción triterpenos y sesquiterpenos (Hidalgo y cols., 1999; Usubillaga, Romero y Aparicio; 2003).

Este proyecto de investigación estará estructurado por cinco capítulos. El primero titulado El Problema, subtítulo de la siguiente manera: Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia de la Investigación y objetivos. El segundo capítulo, titulado Marco Teórico, estará conformado por los Antecedentes Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Operacionalización de las variables y Sistema de Hipótesis. Tercer capítulo,

titulado Marco Metodológico, ordenado con los siguientes subtítulos, Tipo de Investigación, Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Procedimientos de la Investigación y Diseño de Análisis. Cuarto capítulo, comprendido por Resultados y Discusiones. Quinto capítulo Conclusiones y Recomendaciones.

Finalmente, el objetivo de esta investigación será confirmar la actividad antibacteriana y la composición química del extracto de las hojas de *Espeletiopsis pannosa*.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

En los últimos años investigaciones realizadas de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2016), han reconocido la necesidad de incorporar los recursos y técnicas de la medicina tradicional para contribuir con la solución de los distintos problemas de salud. El uso inadecuado e indiscriminado de antibióticos en el control y prevención de enfermedades ha provocado la aparición de nuevas formas clínicas, así como localizaciones no habituales y diseminación de nuevos mecanismos de resistencia antimicrobiana, esto conlleva a un problema que va cada vez en aumento y que plantea una grave amenaza a la salud pública. En la actualidad, las posibilidades terapéuticas se ven notablemente menguadas por la ausencia de nuevos medicamentos que actúen frente a diversos patógenos; y a pesar de la disponibilidad de fármacos para el tratamiento de estas infecciones, se presenta problemas de resistencia. En virtud de estas razones, se debe orientar los esfuerzos a la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos que superen dichas limitaciones (Nazar, Lavados, Daher y Bischoff, 2010; Pemán y Cantón, 2005; Torres, 2014).

Debido a esta problemática, se ha implementado el estudio fitoquímico de los extractos de las plantas para conocer los metabolitos secundarios que la conforman y estudiar si dichos compuestos presentan actividad antibacteriana que pudiera aportar la solución al problema planteado. De lo

antes expuesto se deriva la siguiente interrogante ¿Cuál es la relación entre la actividad antibacteriana y el extracto de las hojas de *Espeletiopsis pannosa*?

Justificación e Importancia de la Investigación

El empleo de remedios naturales y sobre todo de plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde hace mucho tiempo y que ha crecido continuamente en años recientes (Bruneton, 2001).

A nivel mundial, se viene explorando el uso de los productos naturales como fuente de nuevos agentes antimicrobianos; aproximadamente el 80 % de la población mundial utiliza productos naturales con fines medicinales. Sus derivados como aceites esenciales y sus extractos orgánicos, podrían proporcionar metabolitos bioactivos como una alternativa de tratamiento o prevención a las infecciones causadas por bacterias (OMS, 2007; Torres, 2014).

La resistencia de los microorganismos a gran variedad de antimicrobianos, ha sido originada por el uso excesivo e inadecuado de los mismos. Sin embargo, muchos microorganismos han sido siempre no susceptibles y por lo tanto intrínsecamente resistentes, a un agente en particular por su naturaleza fisiológica o bioquímica (Tortora, Funke y Case, 2007).

Por ello, a través del presente trabajo se pretendió demostrar la actividad antibacteriana del extracto de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* comúnmente conocida como frailejón, utilizada para infecciones respiratorias y digestivas.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y composición química del extracto de las hojas de *Espeletiposis pannosa*.

Objetivos específicos

Obtener el extracto hexano-éter 3:1 de las hojas de *Espeletiposis pannosa*, mediante la técnica de extracción con Soxhlet.

Reconocer cualitativamente mediante el screening fitoquímico los metabolitos secundarios del extracto obtenido previamente.

Evaluar la actividad antibacteriana del extracto hexano-éter de las hojas de *Espeletiposis pannosa*, empleando el método de difusión en agar con disco.

Alcances y limitaciones de la investigación

Alcances de la investigación

Según Hernández, Fernández y Baptista. (2010). El alcance de una investigación está relacionado con la profundidad del conocimiento que se adquirió, sobre la problemática de estudio durante el proceso de investigación. Es por ello que la profundidad del conocimiento que se pretendió, fue determinar la composición química del extracto hexano-éter de las hojas de *Espeletiposis pannosa* y la actividad antibacteriana.

Limitaciones de la investigación

Son obstáculos que eventualmente pudieran presentarse durante el desarrollo del estudio y que escapan del control del investigador (Arias, 2006). En cuanto a las limitaciones para el desarrollo de esta investigación, se presentaron los siguientes: dificultad para la recolección de la especie *Espeletiopsis pannosa*, en la parte del laboratorio deficiencia en equipos y materiales; así como los cortes de luz eléctrica, lo que conllevó a un retraso en el desarrollo del mismo.

www.bdigital.ula.ve

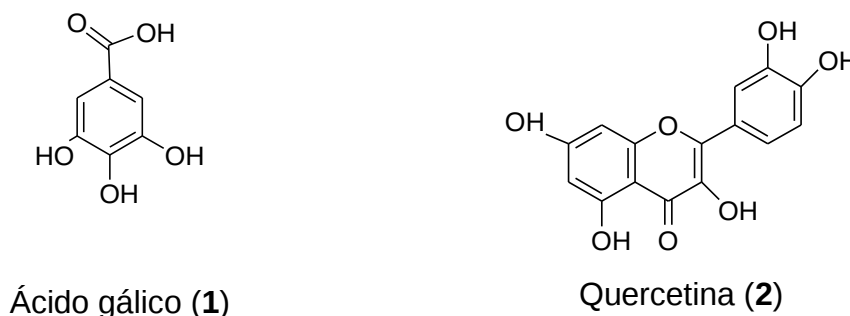
CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Toiu, Vlase, Vodnar, Gheldiu y Oniga. (2019), publicaron un trabajo titulado *Solidago graminifolia* L., Salisb. (Asteraceae) fuente valiosa de polifenoles bioactivos: perfil de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), potencial antioxidante y antimicrobiano *in vitro*. Los extractos hidroalcohólicos, se evaluaron para determinar el contenido total de fenoles y flavonoides, mediante el método de cromatografía de líquidos de alto rendimiento; con espectrómetro de masas (CLAR-EM). El efecto antibacteriano y antifúngico, se evaluó mediante ensayos de dilución, calcularon la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Los resultados mostraron que las partes aéreas de *Solidago graminifolia* L., contienen una cantidad importante de fenoles totales 192,69 mg GAE/mg (ácido gálico **1**, por miligramos de extracto) y quercetina (**2**) como componentes principales (ver Figura 1). Los extractos hidroalcohólicos revelaron un potencial antioxidante y antimicrobiano, entre ellos la actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e importante efecto antifúngico contra *Cándida albicans* y *Cándida parapsilosis*. Por lo cual, concluyeron que las partes aéreas de *Solidago graminifolia* L., podrían utilizarse como nuevo recurso de fitoquímicos en preparaciones a base de hierbas con actividad antioxidante y antibacteriana. Este trabajo fue de gran importancia, ya que del mismo se derivó la propuesta de esta investigación.

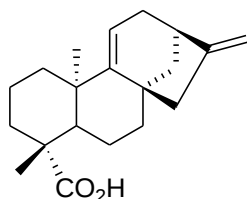
Figura N° 1. Estructuras Químicas de Algunos Fenoles de *Solidago graminifolia* L.



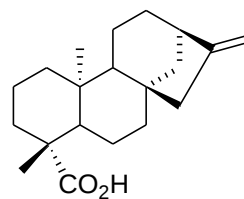
Tomada y modificada de Toiu, y col, 2019.

Cordero de Rojas, Ustáriz, Araujo, Usubillaga, Rojas y Moujir. (2017), desarrollaron la investigación “Actividad antibacteriana de diterpenos del kaurano aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec”; en el cual establecieron como objetivo, determinar la actividad antibacteriana de diterpenos del kaurano aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec. La concentración inhibitoria mínima (CIM) fue determinada por el método de microdilución en caldo, en placas de 96 pozos; por medio del cual demostraron que, el ácido grandiflorénico (3) presentó actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* (CIM 20 µg/mL), *Bacillus subtilis* (CIM 5 µg/mL) y *Enterococcus faecalis* (CIM 10 µg/mL), mientras que; el ácido kaurénico (4) mostró actividad únicamente sobre *Bacillus subtilis* (CIM 10 µg/mL), al igual que el ácido 15 α -acetoxi-kaurénico (5) y el kaurenol (6) (ver Figura 2) (CIM 40 µg/mL). Como conclusión, indicaron que el mismo representa un aporte al estudio de la composición química de *Coespeletia* y la actividad antibacteriana de los kaurenos aislados. Este estudio fue de gran relevancia, porque de sus resultados procedió la proposición del proyecto llevado a cabo.

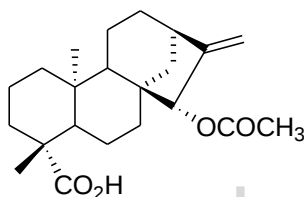
Figura N° 2. Estructura Química de los Kaurenos Aislados *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec.



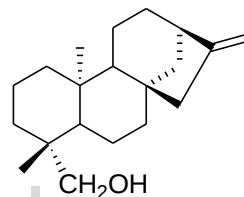
Ácido grandiflorénico (3)



Ácido kaurénico (4)



Ácido 15α-acetoxi-kaurénico (5)



Kaurenol (6)

Tomada y modificada de Cordero de Rojas y cols., 2017.

Velázquez, (2017), desarrolló el trabajo titulado: “Evaluación de la actividad antimicrobiana, antioxidante y citotoxicidad de los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth “chinche”. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión de pozo en agar, la actividad antioxidante por el método de DPPH, mientras que la actividad citotóxica por el bioensayo de citotoxicidad en *Artemia salina* (CYTED). Obtuvieron que el extracto etanólico presentó actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* (halo de inhibición de 11,33 mm); *Pseudomonas aeruginosa* (halo de inhibición de 13 mm) y *Staphylococcus aureus* (halo de inhibición de 15,67 mm), actividad antioxidante y alta actividad citotóxica; en cuanto al extracto acuoso, presentó actividad antimicrobiana frente a

Aspergillus niger (halo de inhibición de 13,67 mm). Como conclusión denotaron que, el extracto etanólico presentó mayor actividad antibacteriana, antioxidante y citotóxica que el extracto acuoso. Este trabajo fue de gran interés, debido a que sus resultados condujeron a la elaboración de este proyecto.

Antecedentes Históricos o Epistemológicos

La historia del uso de las plantas medicinales nació casi con el hombre, desde los tiempos prehistóricos hasta principios del siglo XIX, este a través de los elementos que la tierra le brindaba y por ensayo y error, utilizó las plantas para curar sus enfermedades incluyendo mejorar el estado de ánimo, esta práctica médica pasada se denominó medicina tradicional (Fonnegra y Jiménez, 2007).

Los estudios fitoquímicos de los frailejones se iniciaron a principio de 1970, en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, los primeros trabajos fueron realizados en la determinación de aceites esenciales presentes en diferentes especies y luego estudiaron las fracciones menos polares obteniéndose en la mayoría de las especies una alta concentración de diterpenoides, siendo estos compuestos encontrados en gran proporción en la subtribu Espeletiinae (Pinto y Toro, 2013).

La subtribu Espeletiinae (Astereaceae) fue creada en 1976 por Cuatrecasas con aproximadamente ciento ochenta especies que ocupan a nivel altitudinal desde los 2000 m s.n.m en adelante, incluyendo el bosque alto-andino; el subpáramo y páramo. El género *Espeletia* fue identificado por Mutis al Virrey Don José Ezequiel de Espeletia de Nueva Granada. Este género abarcaba todos la especies conocidas como frailejones hasta su revisión taxonómica por Cuatrecasas, lo que condujo a su división en ocho

géneros: *Carramboa*, *Coespeletia*, *Espeletia*, *Espeletiopsis*, *Libanothamnus*, *Ruilopezia*, *Tamania* y *Paramiflos* (Cuatrecasas, 1996). Desde el siglo XVIII se han empleado sustancias químicas para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Paul Ehrlich, quien formuló los principios de toxicidad selectiva, reconoció las reacciones químicas específicas entre microorganismos y medicamentos, la aparición de la resistencia a estos y el papel de la terapéutica combinada para combatirlos (Lizcano y Vergara, 2008). El género *Espeletiopsis* está distribuido entre Colombia y Venezuela, integrado por 25 especies del cual 20 de ellas son endémicas de Colombia (Meccia, Quintero, Rojas, Usubillaga y Carmona. 2010).

Bases teóricas

Características de la familia Asteraceae

De todas las especies de Angiospermas (plantas con flores), la familia de las Asteraceae (Compositae) (ver Tabla 1), es la más grande y ha sido objeto de numerosos estudios (Katinas, Gutiérrez, Grossi, y Crisci, 2007). El nombre común de esta familia es Compuestas y hace referencia a la disposición de las flores en capítulos compactos, inflorescencia que funcionalmente se comporta como una flor. Hojas sin espículas, generalmente alternas, en ocasiones en roseta basal, además pueden presentar espinas. La inflorescencia es un capítulo que consiste en una estructura ensanchada (receptáculo) donde se sitúan desde una a cientos de flores, rodeados por las brácteas del involucrado. El receptáculo puede ser plano, cóncavo o convexo y tener escamas o pelos entre las flores. Además las flores pueden ser hermafroditas, unisexuales o estériles. Sin cáliz o con este reemplazado por vilanos de pelos o escamas, los pelos pueden ser lisos, escábridos o plumosos. Corola formada de cinco pétalos soldados, puede ser tubulosa o

con forma de lengüeta con tres o cinco dientes. Fruto tipo aquenio o cipsela. Puede presentar en su extremo superior vilano, ocasiones sobre una prolongación estrecha o pico. Puede almacenar inulina un polisacárido como sustancia de reserva en órganos subterráneos (Peralta y Royuela, 2018). Las asteráceas comprenden más de 1700 géneros y unas 24.000-30.000 especies distribuidas por todo el mundo, excepto en la Antártida (Katinas y cols., 2007).

Tabla 1. Taxonomía

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae

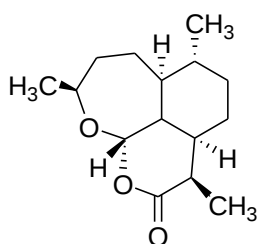
Tomada y modificada de Tapia, 2010.

En Venezuela se conocen cerca de 760 géneros y 210 especies. Con respecto a la distribución geográfica esta se encuentra desde el nivel del mar como la cordillera de la costa, donde crece la *Espeletia neriifolia*, hasta los sitios más elevados de los páramos andinos. En la zona andina y alto Guayana existe una elevada concentración de especies de las Astereaceas (Pinto y Toro, 2013).

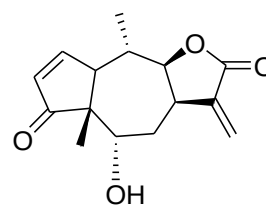
Algunos de los compuestos químicos secundarios presentes en la familia Asteraceae son: sesquiterpenos, flavonoides, diterpenos, triterpenos, cumarina y alcaloides. El premio Nobel en medicina del año 2015, fue otorgado en parte a la Prof. Youyou Tu, por el descubrimiento y desarrollo de la artemisinina (7) y una sesquiterpenlactona como la helenalina (8),

encontradas en la especie *Artemisia annua* (ver Figura 3), con propiedades muy efectivas contra el parásito causante de la malaria (Coy, Parra y Cuca, 2014).

Figura N° 3. Estructuras Químicas de la especie *Artemisia annua*.



Artemisina (7)



Helenalina (8)

Tomada y modificada de Coy, Parra y Cuca, 2014.

Las especies mencionadas anteriormente, son usadas para el tratamiento de diversas afecciones de salud como diurética, depurativa, adelgazante, antidiabética, antiinflamatorio, antibiótico, regulador hormonal y de grasas, tratamiento de problemas hepáticos y alérgicos. También se usa para tratar enfermedades como pulmonía, pleuresía, estimulante, digestiones difíciles, dolor estomacal, estimulante del apetito y de la función biliar, fatiga, falta de ánimo y para la caída de cabello o calvicie prematura. Incluyendo, su empleo para tratar afecciones de la piel como el acné, dermatitis, infecciones urinarias, antimalárico, antioxidante (Purizaca y Condori, 2018).

Características del género *Espeletiopsis*

Este género (ver Tabla 2), presenta un crecimiento característico, las hojas en rosetas grandes, en el extremo del tronco, ya sea corto y con la roseta a ras el suelo, o bien largo que pueden alcanzar varios metros. Sin

florescencia numerosa, axilares de las hojas de la roseta. Sin florescencia de tipo monocasial y definida, es decir; que termina siempre en una flor o un capitulo, con hojas, ramas, pedúnculos y brácteas alternas. El tipo de sinflorescencia en *Espeletiopsis* es en verdad un corimbo, aunque en pocos casos se vea deformado a consecuencia de un alargamiento proximal, causado por pedúnculos floríferos inferiores adicionales (Cuatrecasas, 1996).

Tabla 2. Clasificación Taxonómica del Género *Espeletiopsis*.

Familia	Asteraceae
Tribu	Heliantheae
Subtribu	Espeletiinae
Género	Espeletiopsis

Tomada y modificada de Cuatrecasas, 1996.

Este género produce principalmente diterpenos del tipo kaureno, los cuales tienen interés desde el punto de vista químico, botánico y medicinal, ya que han manifestado actividad citotóxica en diferentes líneas de células de carcinoma, efectos esteroideogénicos y efectos pro-apoptóticos en humanos contra líneas celulares como cáncer de próstata (PC-3). En menor proporción producen triterpenos, sesquiterpenos y aceites esenciales. Este género se encuentra distribuido en Colombia y Venezuela (ver Tabla 3) (Meccia y cols., 2010).

Tabla N° 3. Distribución Geográfica y Nombre Común de algunas Especies del Género *Espeletiopsis*.

Especie	Nombre común	Distribución Geográfica
<i>E. angustifolia</i>	Frailejón blanco	Mérida (Venezuela)
<i>E. caldasii</i>	Frailejón enano	Norte de Santander (Colombia)
<i>E. colombiana</i>	Frailejón colombiano	Boyacá (Colombia)
<i>E. corymbosa</i>	Frailejón liso	Cundinamarca (Colombia)
<i>E. funckii</i>	Frailejón de Funk	Norte de Santander (Colombia)
<i>E. garciae</i>	Frailejón de Arcabuco	Boyacá (Colombia)
<i>E. guacharaca</i>	Frailejón Guacharaco	Boyacá (Colombia)
<i>E. insignis</i>	Frailejón de Chitagá	Norte de Santander (Colombia)
<i>E. jimenez-quesadae</i>	Frailejón negro	Boyacá (Colombia)
<i>E. meridensis</i>	Frailejón de Mérida	Mérida (carretera andina) (Venezuela)
<i>E. muiska</i>	Frailejón de los muiskas	Boyacá (Colombia)
<i>E. pannosa</i>	Frailejón plateado	Trujillo (Páramo del Jabón) (Venezuela)
<i>E. petiolata</i>	Frailejón de Almorzadero	Santander (Colombia)

Tomada y modificada de Cuatrecasas, 1996.

Tabla N° 3. Distribución Geográfica y Nombre Común de Algunas Especies del Género *Espeletiopsis* Continuación...

Especie	Nombre común	Distribución Geográfica
<i>E. pozoensis</i>	Frailejón chirique	Mérida (Venezuela)
<i>E. purpurascens</i>	Frailejón purpúreo	Norte de Santander (Colombia)
<i>E. rabanalensis</i>	Frailejón de Rabanal	Boyacá (Colombia)
<i>E. sanchezii</i>	Frailejón de Tierra negra	Norte de Santander (Colombia)
<i>E. santanderensis</i>	Frailejón	Santander (Colombia)
<i>E. sclerophylla</i>	Frailejón hojiduro	Santander (Colombia)
<i>E. trianae</i>	Frailejón de Triana	Norte de Santander (Colombia)

Tomada y modificada de Cuatrecasas, 1996.

Composición química del género *Espeletiopsis*

Meccia, y cols. (2010), a través del Análisis por Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (CG-EM) de la fracción ácida metilada, identificaron varios diterpenos de tipo kaureno presentes en la resina de la especie *Espeletiopsis angustifolia*. Entre los ácidos kaurénicos estuvieron el ácido *ent*-kaur-9(11)-16-dieno-19-oico (ácido grandiflorénico (**3**)), ácido *ent*-kaur-16-eno-19-oico (ácido kaurénico (**4**)), ácido *ent*-kaur-19-oico (ácido kauránico) (**9**), ácido *ent*-15 α -hidroxi-kaur-16-eno-19-oico (ácido grandiflorólico) (**10**) (ver Figura 4); representaron los principales

componentes de la fracción ácida (56,8 % del total de la misma) y a partir de la fracción neutra del extracto de las hojas, lograron identificar el kaurenol, todos ellos han sido reportados en varias especies de los géneros *Espeletia*, *Coespeletia*, *Libanothamus* y *Ruilopezia* de la subtribu Espeletiinae, lo que indica la estrecha relación existente entre los diferentes tipos de frailejones.

Figura N°4. Estructura química de los kaurenos aislados de la especie.
Espeletiopsis angustifolia.



Tomada y modificada de Meccia, y cols, 2010.

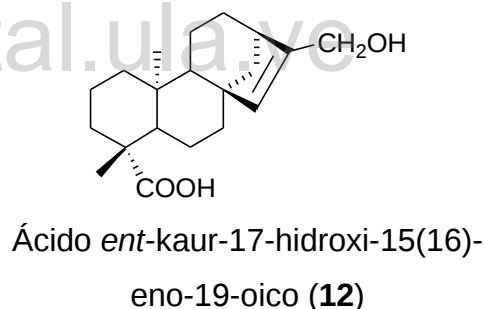
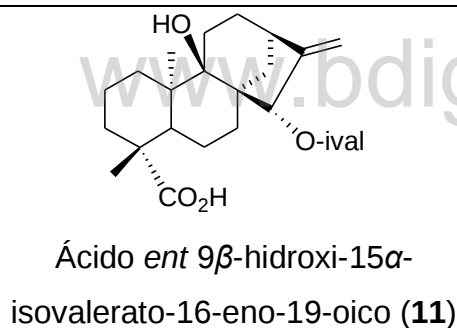
Por otra parte, Bolhmann, Suding, Cuatrecasas, Robinson y King en 1980, publicaron sesquiterpenos tricíclicos y otros diterpenos de especies de *Espeletiopsis*. Estudiaron 5 especies de *Espeletiopsis* y 2 de *Coespeletia*. Logrando identificar numerosos compuestos conocidos y nuevos derivados tipo kaureno, de estas especies se utilizaron los tallos, el extracto fue obtenido con una mezcla de éter dietílico y éter de petróleo en proporción de 1:10. En todas las especies de *Espeletiopsis* se encuentra derivados del ent-kaureno tales como: Ácido kaurénico, ácido grandiflorénico, ácido grandiflorónico, ácido 15 α -acetoxi-kaurénico, ácido 15 α -isovaleroxi-kaurénico, kaurenol, entre otros. Por otra parte de las especies *Coespeletia marcana* y

moritziana igual hubo la presencia de derivados tipo kaureno. En la Figura 5, se muestra algunos compuestos identificados de las 5 especies *Espeletiopsis*.

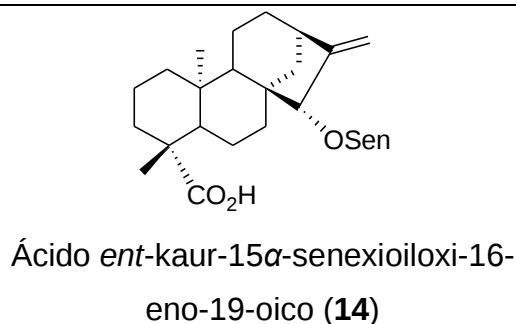
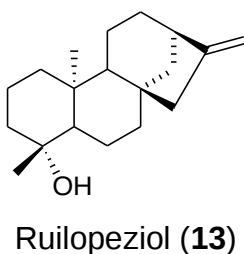
En la subtribu Espeletiinae, la química es similar en todos los géneros, ya que se caracterizan por la aparición de grandes cantidades de derivados kaurenos, sólo se diferencian que las concentraciones son diferentes (Bolhmann y cols., 1980).

Figura N° 5. Estructuras Química de algunos compuestos de las 5 especies de *Espeletiopsis*.

Espeletiopsis guacharaca



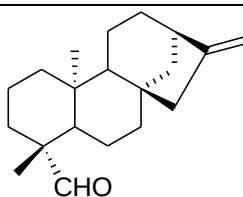
Espeletiopsis glandulosa



Tomada y modificada de Bolhmann y cols., 1980

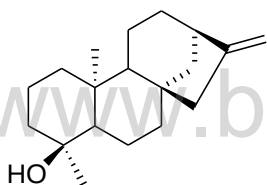
Figura N° 5. Estructuras Químicas de algunos compuestos de las 5 especies de *Espeletiopsis*. Continuación...

Espeletiopsis garciae

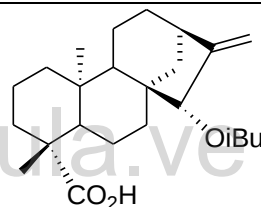


Kaurenal (15)

Espeletiopsis purpurascens

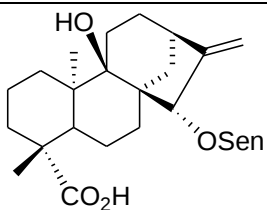


Epi-ruilopeziol (16)

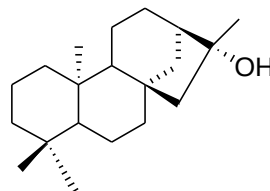


Ácido *ent*-kaur-15 α -isobutiriloxy-16-eno-19-oico (17)

Espeletiopsis tachirensis



Ácido *ent*-kaur-9 β -hidroxi-15 α -senexioiloxy-16-eno-19-oico (18)



16 α -hidroxi-kaureno (19)

Tomada y modificada de Bolhmann y cols., 1980

Usos tradicionales o etnobotánicos del género *Espeletiopsis*

Se usa en infusiones como antitusivo, para tratar afecciones de artritis, dolor de oído y contra enfermedades respiratorias como la bronquitis y el asma, así como enfermedades de la piel, entre otros. Todas estas propiedades de deben a los kaurenos presentes en dicho género (Galvis y Torres, 2017).

Estudios biológicos de los kaurenos

Los derivados del kaureno, actualmente son compuestos de gran interés para los científicos de diferentes partes del mundo, debido a las numerosas actividades biológicas que se les han reportado últimamente, por tal son considerados productos naturales muy importantes (De Los Ríos, Hidalgo, Contreras, Crescente y Caserta; 1999). A continuación, se presenta una breve reseña a cerca de algunas propiedades que se le han atribuido a derivados del ácido *ent*- kaurénico.

Actividad antibacteriana

De las partes aéreas de *Espeletia schultzei* Wed., específicamente de la fracción obtenida del acetato de etilo, se logró aislar el ácido grandiflorénico; así como también en hojas de *Espeletia barclayana* Cuatrec., y a su vez en esta, se encontró el ácido kaurénico, los cuales mostraron actividad antibacteriana frente a *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus*, ambas con un halo de inhibición de 14 mm y una CIM de 80,5 mg/mL; para el primer metabolito y el segundo metabolito frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* (Gutiérrez, Fuentes, Tellez, Torrenegra, R; 1998; De Los Ríos, Hidalgo, Contreras, Crescente y Caserta; 1999).

Actividad antineoplásica

Una de las más interesantes propiedades del ácido kaurénico, aislado de hojas de la especie *Laetia thamnia* L., es su moderada actividad *in vitro*, frente a ciertas líneas celulares cancerígenas; del pulmón (A-549), sistema nervioso central (XF498), ovarios (SK-OV-3), piel (SK-MEL-2), colon (HCT15) y próstata (22Rv1) (Henry, Adams, Rosales, Jacobs, Heber y Seeram; 2006).

Actividad para el sistema cardiovascular

Ensayos biológicos han demostrado que los diterpenos del tipo kauranos tienen acción antiespasmódica y relajante del músculo liso. El ácido kaurénico y algunos derivados, tienen efecto vaso relajante, su posible mecanismo de acción no se ha demostrado completamente, aunque se dice que su acción es debida al bloqueo de los canales de calcio extracelular y que puede actuar por otros mecanismos, ya que inhibe la acción vaso constrictora inducida por diferentes sustancias como la fenilefedrina, prostaglandina $F_{2\alpha}$, acetilcolina y oxitocina; de esta manera se dice que también actúa sobre los canales de potasio sensibles al ATP (Tirapelli, Ambrosio, Coutinho, De Oliveira, Da Costa y De Oliveira, 2005).

Actividad antimicótica

Cotoras, Folch y Mendoza. (2004), realizaron un estudio donde probaron la actividad del ácido kaurénico y el ácido 3β -hidroxi-kaurénico (**20**) (ver Figura 6), contra *Botrytis cinerea* encontrando que ambos eran potentes inhibidores del desarrollo miscelar y que esta actividad, se debía a que ambos compuestos inducen la producción de *p*-Nitrofenilbutirasa, mientras que la enzima lacasa es inducida solamente por el ácido 3β -hidroxi-

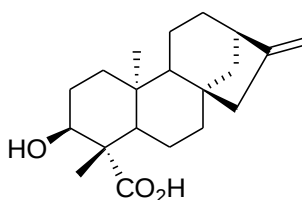
kaurénico, este disminuye en un 80,8 % el desarrollo miscelar en dosis de 40 $\mu\text{g/mL}$.

Actividad antiinflamatoria

Ríos, Villalobos, Rojas-Fermín, Aparicio, Usubillaga, Mitaine-Offer y cols. (2017), determinaron la actividad antiinflamatoria del ácido kaurénico (AK) y el ácido grandiflorénico (AG), aislados de la *Coespeletia moritziana* y *Espeletia semiglobulata*. Esta actividad fue evaluada *in vivo* en ratones no consanguíneos *Mus musculus* (BIO:NMRI), por los métodos siguientes: edema de oreja inducido por xilol y edema de pata inducido con carragenina, a dosis de 16, 32 y 64 mg/Kg.

La actividad antiinflamatoria fue estudiada mediante comparación con fármacos de actividad antiinflamatoria reconocida: dexametasona (1 mg/Kg), diclofenac (25 mg/Kg) y ketoprofeno (10 mg/Kg). El índice del edema y el porcentaje de inhibición fueron determinados después del tratamiento con xileno o carragenina. La administración intramuscular del AG mostró mayor actividad antiinflamatoria que el AK a dosis de 64 mg/Kg. Este es el primer estudio del efecto antiinflamatorio *in vivo* del AG.

Figura N° 6. Estructura Química del Ácido 3- β -Hidroxi-Kaurénico.



Ácido 3- β -Hidroxi-Kaurénico (20)

Tomada y modificada de Cotoras, Folch y Mendoza, 2004

Espeletiopsis pannosa

La especie *Espeletiopsis pannosa* también conocida como frailejón plateado, es una planta arrosetada, con hojas lineales poco angostadas hacia la base, aproximadamente entre 25-45 cm de largo y 4-10 mm de ancho, densamente vellosa, inflorescencias corimbo ramificadas, ramas alternas, subtendidas por pequeñas brácteas (ver Figura 7). Encontrándose a 3.500 m sobre suelos con buen contenido de aguas (Cuatrecasas, 1996)

Figura N° 7. Especie *Espeletiopsis pannosa*.



Tomada y modificada de Cuatrecasas, 1996.

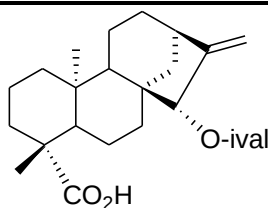
Distribuidas en los páramos de Venezuela, en el Estado Trujillo en el páramo de El Jabón, y en el Estado Mérida en el páramo de Sierra Nevada de Mérida, páramo de Los Conejos, Mucurubá, La Culata, faldas superiores del pico El Toro y páramo de Timotes (Aristeguieta, 1964). Esta especie de frailejón tanto las hojas y partes aéreas han sido usadas en comunidades para tratar diversas enfermedades respiratorias como el asma, además

empleado como expectorante y antitúxico. Incluyendo enfermedades de la piel (Hidalgo, Ricardi, Gaviria, Estrada, 1999).

Composición química del género *Espeletiopsis pannosa*

Usubillaga, Romero y Aparicio. (2003), mediante el análisis de Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (CG/EM) de la fracción ácida se lograron identificar diterpenos pertenecientes al grupo de los kaurenos, a partir del extracto de las hojas de *Espeletiopsis pannosa*. Estos compuestos fueron: ácido *ent*-kaur-9(11)-16-dieno-19-oico (ácido grandiflorénico), ácido *ent*-kaur-16-eno-19-oico (ácido kaurénico), ácido *ent*-15 α -hidroxi-kaur-16-eno-19-oico (ácido grandiflorólico) y ácido *ent*-15-O-iso-valeroxy-kaur-16-eno-19-oico (ácido isovaleroxikaurénico) (**21**) (ver Figura 8).

Figura N° 8. Estructura química del ácido isovaleroxikaurénico.



Ácido Isovaleroxikaurénico (**21**)

Tomada y modificada de Usubillaga, Romero y Aparicio, 2003.

Productos naturales

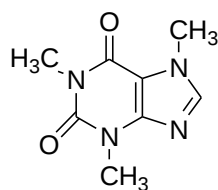
También denominados metabolitos secundarios, son todas aquellas moléculas activas generadas por diversas especies vegetales, que no son necesarias para el crecimiento y la reproducción de las plantas, pero cumplen con roles muy importantes en el reino vegetal (Lizcano y Vergara,

2008). Dichas funciones se encargan del mecanismos de defensa, agentes polinizadores, sustancias de reserva y cicatrizantes para sus propias heridas (Domínguez, 1973).

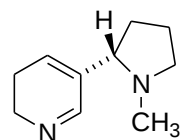
La clasificación de los productos naturales puede hacerse de acuerdo con sus estructuras, bioformación, fuente de producción y acción biológica. Donde el criterio más acertado es aquel que usa la biosíntesis como denominador común, la cual; comprende la formación de metabolitos primarios y secundarios (Torres, 2014). Los metabolitos secundarios más importantes extraídos de plantas son:

Alcaloides: son compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno básico, muchos de ellos son insolubles o poco soluble en agua y reaccionan con los ácidos para formar sales (Anaya, 2000). Entre estos, se encuentran la cafeína (**22**) y la nicotina (**23**) (ver Figura 9) (Bañuelos, 2006).

Figura N° 9. Estructuras Químicas de Algunos Alcaloides.



Cafeína (**22**)

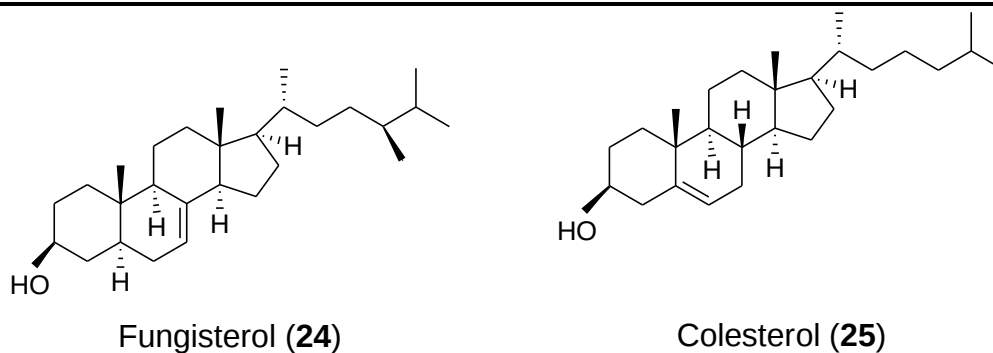


Nicotina (**23**)

Tomada y modificada de Bañuelos, 2006.

Triterpenos: Son terpenos con 30 carbonos cuyo esqueleto está constituido por seis unidades de isopreno, la ciclación de los triterpenos se produce de formas muy diversas y están relacionados con los esteroides y saponinas, entre ellos el fungisterol (**24**) y colesterol (**25**) (ver Figura 10) (Primo, 1995).

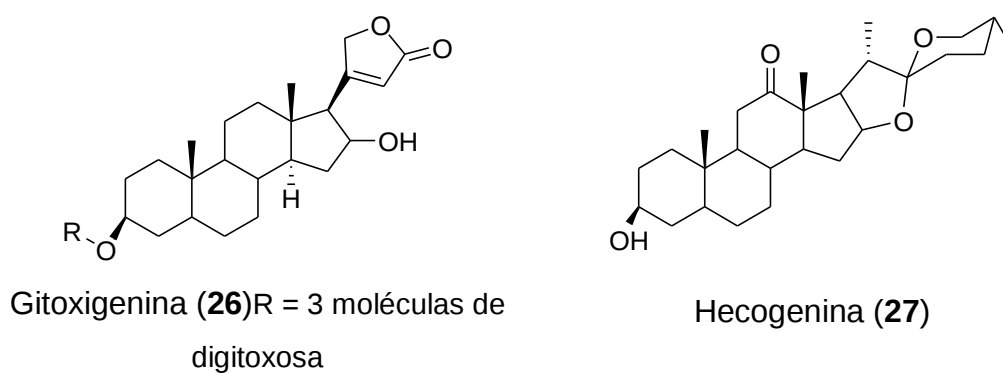
Figura N° 10. Estructuras Químicas de Algunos Triterpenos.



Tomada y modificada de Primo, 1995.

Saponinas: Su nombre se debe a sus propiedades jabonosas. Son estructuras formadas por una parte glucosídica y una parte no glucosídica (aglicón), entre ellas la Gitoxigenina (26) y Hecogenina (27) (ver Figura 11), (Carrión y García, 2010).

Figura N° 11. Estructuras Químicas de Algunas Saponinas.

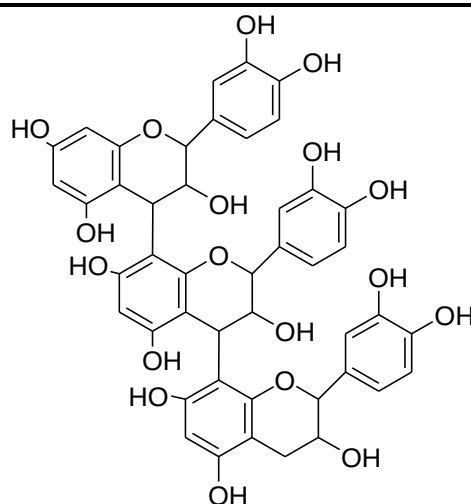


Tomada y modificada de Carrión y García, 2010.

Taninos: Las plantas presentan una mezcla compleja de compuestos fenólicos, entre ellos los flavonoides poliméricos de alto peso molecular y estructuras mal definidas que por hidrólisis producen antocianidinas y flavanoles. Este grupo de sustancias se conoce como proantocianidinas y forma parte de los llamados taninos condensados **(28)** (ver Figura 12). Estas sustancias son de origen vegetal, no nitrogenadas, solubles en agua, alcohol y acetona (Marcano y Hasegawa, 2002).

Flavonoides: Son metabolitos secundarios de las plantas, generalmente amarillos, que se encuentran en los jugos celulares y en los pétalos de las flores de algunas plantas en forma de glucósidos de diversos azúcares (glucosa, galactosa, pentosa), otros tienen carácter vitamínico y aplicaciones terapéutica (Quercetina **(2)** y Luteolina **(29)**, ver Figura 13) (Primo, 1995).

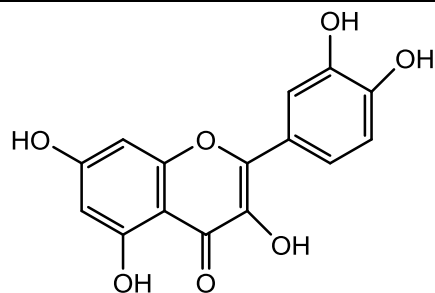
Figura N° 12. Estructura Química de los Taninos.



Proantocianidinas **(28)**

Tomada y modificada de Marcano y Hasegawa, 2002.

Figura N° 13. Estructuras Químicas de Algunos Flavonoides

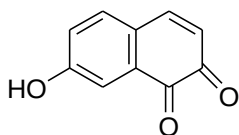


Luteolina (**29**)

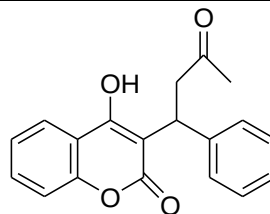
Tomado y modificado de Primo, 1995.

Cumarinas: Son productos naturales, pertenecen al grupo de compuestos conocidos como benzopironas, consistentes en un anillo bencénico unido a una pirona, la fluorescencia de la cumarina es muy sensible a la posición y la naturaleza de los constituyentes sobre el anillo de benzopiranona (Umbeliferona (**30**) y Warfarina (**31**), ver Figura 14) (Reija, 2007).

Figura N° 14. Estructuras Químicas de Algunas Cumarinas.



Umbeliferona (**30**)

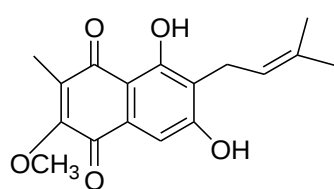


Warfarina (**31**)

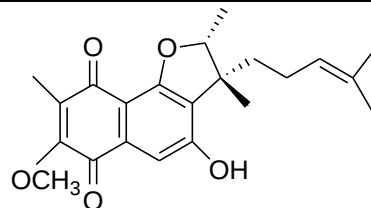
Tomado y modificada de Reija, 2007.

Quinonas: Se considera dentro de la serie aromática, las quinonas dependen exclusivamente del sistema de dobles enlaces conjugados y son extraordinariamente variadas (Fumaquinona (**32**), furaquinona C (**33**), ver Figura 15) (Klages, 2006).

Figura N° 15. Estructura Químicas de Algunas Quinonas.



Fumaquinona (**32**)



Furaquinona C (**33**)

Tomado y modificado de Klages, 2006.

Extracto vegetal

Se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con solventes apropiados tales como agua, etanol o éter, de elementos solubles, constituidos con una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca (Lizcano, y Vergara, 2008). Los extractos según su consistencia y concentración de principio activo se clasifican en extractos fluidos, secos, blandos y crioextractos (Castillo y Martínez, 2007).

Extractos Fluidos: Son extractos de drogas que con la concentración prescrita de etanol, están preparados de forma que una parte de droga corresponde a una parte o dos partes del extracto fluido; teniendo en cuenta que 85 partes de droga seca corresponden a 100 partes de planta fresca (Voigt, Bornschein y Núñez, 1982).

Extractos Secos: Son aquellos que tienen una consistencia seca y son fácilmente pulverizables, se obtienen por evaporación del disolvente y desecación del residuo (Voigt y cols., 1982).

Extractos Blandos: Poseen una concentración de principio activo superior a la de la droga original y tienen consistencia semisólida. El disolvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas. Los extractos blandos son poco estables y resultan difíciles de manipular; por lo que no se utilizan (Carrión y García, 2010).

Crioextractos: Se obtiene por molturación de la droga vegetal correctamente desecada, sometida a condiciones de congelación (-196°C), mediante inyección de nitrógeno líquido, de forma que los principios activos no se ven alterados por la acción del calor desprendido en un proceso de molturación y que dependiendo de la droga vegetal, puede llegar a ser hasta 70°C (Castillo y Martínez, 2007).

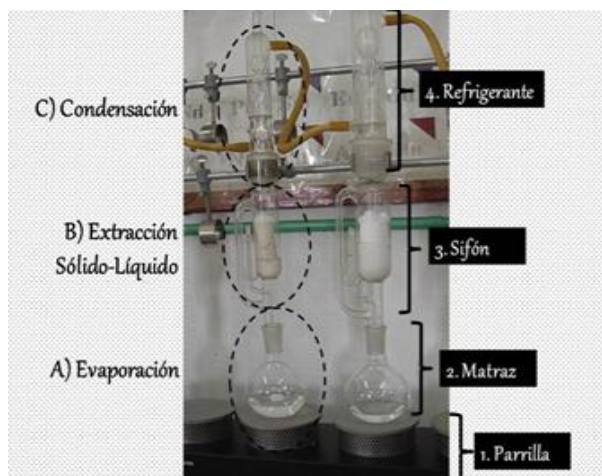
www.bdigital.ula.ve Métodos de obtención de los extractos

Frecuentemente se usa la extracción con solventes orgánicos de bajo punto de ebullición tales como alcohol, acetato de etilo y además con baja reactividad. Algunas veces es conveniente extraer los compuestos lipídicos del material vegetal con éter de petróleo (extracto etéreo) o hexano (Domínguez, 1973).

El alcohol es más eficaz para recuperar metabolitos secundarios. En el caso de extracción con agua, los extractos son evaporados bajo presión reducida o liofilizados (Domínguez, 1973). Los extractos se pueden obtener a través de:

Extracción continua en soxhlet: Donde el material seco se posa en una cámara central y el solvente se hace evaporar en caliente, en un recipiente inferior, el vapor del solvente asciende al condensador y gotea sobre el material vegetal (ver Figura 16) (Bruneton, 2001).

Figura N° 16. Extracción Continúa en Soxhlet.



Tomado y modificado de Domínguez, 1973.

Reflujo: El material vegetal y el solvente se colocan en un balón el cual tiene acoplado un refrigerante, se calienta, el solvente evaporado se condensa y vuelve a mezclarse con el material vegetal (ver Figura 17) (Domínguez, 1973).

Figura N° 17. Extracción de Reflujo



Tomado y modificado de Domínguez, 1973.

Maceración: Consiste en el contacto prolongado durante cierto tiempo de la especie vegetal con el solvente, donde este ejerce su acción sobre toda la fracción vegetal. Circulando en todas las direcciones y extrayendo sus principios activos hasta producirse una concentración en equilibrio con la del contenido celular (ver Figura 18) (Domínguez, 1973).

Figura N° 18. Extracción por Maceración



Tomado y modificado de Domínguez, 1973.

Infusión: Es una solución diluida de constituyentes fácilmente solubles de la droga vegetal cruda. Se realiza sumergiendo las partes a utilizar de la planta en una cantidad de agua hirviendo, se deja reposar unos 15 minutos y se filtra a través un tamiz o papel de filtro (ver Figura 19) (Domínguez, 1973).

Figura N° 19. Extracción por Infusión



Tomado y modificado de Domínguez, 1973.

Análisis fitoquímico

Consisten en pruebas sencillas, sensibles y rápidas, que mediante una reacción química produce la alteración rápida en la estructura molecular del compuesto y permiten identificar grupos químicos. Estas reacciones pueden ser la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular, la formación de un complejo; lo cual da como resultado una manifestación sensible como el cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas, mediante la utilización de reactivos específicos (Bruneton, 2001).

Pruebas químicas y fundamentos

Para determinar ciertos compuestos activos de una planta se realiza una serie de pruebas que van a depender de las características estructurales y la solubilidad. Tales pruebas son:

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

Ensayo de Shinoda (flavonoides): El magnesio en polvo reacciona con ácido clorhídrico concentrado. El hidrógeno generado produce por reducción el ión flavilio, observándose un color rojo escarlata (varía desde rosa muy débil hasta el rojo escarlata) (Domínguez, 1973; Bruneton, 2001).

Ensayo de Dragendorff, Wagner y Mayer (alcaloides): Se basa generalmente en la combinación de los alcaloides con metales pesados. El reactivo de Dragendorff es una mezcla de yoduro de potasio y nitrato de bismuto, detectándose el alcaloide al producirse un precipitado rojo-naranja; en la reacción de Mayer el yoduro de potasio y el bicloruro de mercurio junto con el alcaloide arrojan un precipitado de color blanco (Marcano y Hasewaga, 2002). Para el reactivo Wagner, el yoduro de potasio se evidencia con un precipitado marrón (Domínguez, 1973; Bruneton, 2001).

Ensayo de Hidróxido de Amonio (cumarinas): Las cumarinas al ser examinadas en luz ultravioleta presentan coloración exaltada en presencia de amoniaco (Bruneton, 2001).

Ensayo de Borntrager (quinonas): La naftoquinonas y antraquinonas libres al ser tratadas con la solución de hidróxido amónico forman complejos de color rojo cereza (Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011). Solubilidad en solución de hidróxido de sodio al 5 % (quinonas): Las quinonas α - y β -hidroxiladas con las solución de hidróxido de sodio al 5 % dan soluciones coloreadas, que van del amarillo pasando por el rojo al violeta (Thompson, 1958).

Prueba de tricloruro férrico (compuestos fenólicos y taninos): Las sustancias precipitan en presencia de cloruro férrico. Esta respuesta se debe al efecto producido por el ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo, provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (Coy y cols., 2014; Domínguez, 1973).

Prueba de la espuma (saponinas): El extracto disuelto en agua se agita vigorosamente, la aparición de espuma es indicio de la presencia de saponinas (Marcano y Hasegawa 2002).

Generalidades de las bacterias

Son microorganismos unicelulares, relativamente simple, debido a que su material genético no está encerrado por una membrana nuclear especial, las células bacterianas se denominan procariontes y suelen presentar diversas formas, la forma de bastón de los bacilos, esférica u oval de los cocos y la forma de tirabuzón o curva de los espirilos, son los más comunes (Granados y Villaverde, 2003).

Las bacterias según la coloración de Gram se clasifica en bacterias Gram positivas, que presentan una pared compuesta por varias capas de peptidoglicano; conformando una estructura gruesa y rígida, además contienen ácido teicoico. Mientras que las Gram negativas, presentan una capa fina de peptidoglicano unido a la lipoproteína de la membrana externa y se encuentra en el periplasma, una sustancia gelatinosa localizada entre la membrana externa y la membrana plasmática (ver Figura 20) (Granados y Villaverde, 2003).

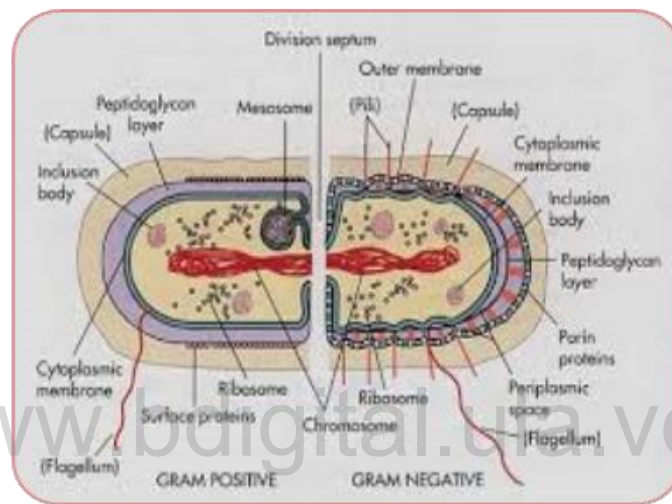
Bacterias ensayadas:

Staphylococcus aureus

Son bacterias grampositivas en forma de coco o esféricas dispuestas en racimos, catalasa positiva, inmóviles, no esporulados, de crecimiento rápido (18- 24 horas). Son resistentes al calor y desecación, además pueden crecer en medios con elevada salinidad (7,5 % de cloruro de sodio), por ser una

bacteria grampositiva presenta una pared celular rica en peptidoglicano y ácido teicoico.

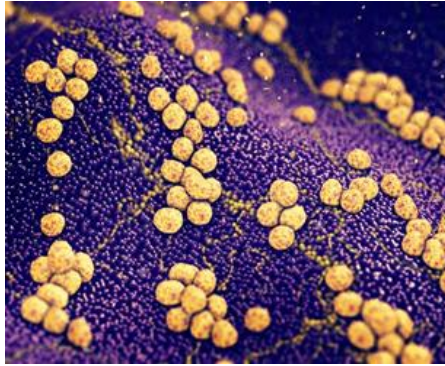
Figura N° 20. Diferencias en la Estructura de la Pared Celular entre Microorganismos grampositivos y gramnegativos.



Tomado y modificado de Tortora, Funke y Case; 2007.

La mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus* (pero no las *Staphylococcus cuagulasa* negativo) están recubiertas por una proteína, denominada proteína A, la cual se utiliza para la identificación de la especie. Aproximadamente un 20 % de la población es portadora permanente de *Staphylococcus aureus* en las fosas nasales y un 30 % lo es de manera intermitente. Además puede colonizar la piel y el tracto gastrointestinal. Cuando la barrera mecánica se rompe, estos microorganismos pueden alcanzar tejidos más profundos y producir infección (ver Figura 21) (Tortora, Funke y Case, 2007; Pahissa, 2009).

Figura N° 21. *Staphylococcus aureus*

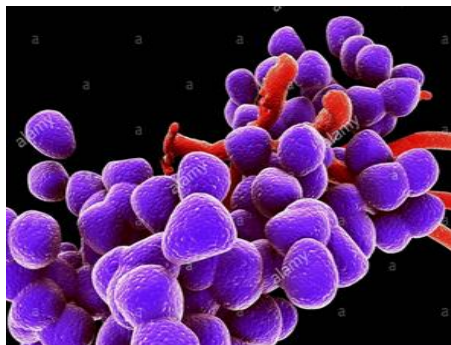


Tomado y modificado de: Tortora, Funke y Case, 2007.

Enterococcus faecalis

Son cocos grampositivos que se disponen en pareja, crecen en medios usuales, son aerobios y anaerobios facultativos, generalmente no hemolíticos, catalasa negativa, crecen en caldo de 6,5 % de cloruro de sodio, hidrolizan la esculina y crecen en presencia de 40 % de sales biliares. Los (*Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*), ocasionan bacteriemias primarias en pacientes granulopénicos y endocarditis bacteriana, además de producir infecciones urinarias y abdominales (ver Figura 22) (Tortora, Funke y Case, 2007).

Figura N° 22. *Enterococcus faecalis*.



Tomado y modificado de: Tortora, Funke y Case, 2007

Escherichia coli

Es un bacilo corto gramnegativo, catalasa positivo, oxidasa negativo y anaerobio facultativo. La mayoría de las cepas fermentan la lactosa, aunque algunas son fermentadoras lentas de este azúcar y algunas son anaerogénicas.

Las cepas de *E. coli* se pueden diferenciar serológicamente en relación con los antígenos somáticos (O), flagelares (H), capsulares (K), además, pueden hallarse fimbrias y estructuras emparentadas que desempeñan un papel en la patogenia. Se reconocen cinco grupos de *E. coli* productoras de diarrea, cuyas diferencias están modificadas por plásmidos (ver Figura 23) (Sánchez, Serrano, Marfil y Jodral; 2011). A continuación se describen algunas variedades de *E. coli*:

- *E. coli* enteropatógena (**EPEC**): responsable de la diarrea acuosa de los lactante, con producción de mucus pero no de sangre, fiebre y vómito, además coloniza las microvellosidades de todo el intestino (Sánchez y cols., 2011).
- *E. coli* enterotoxigénica (**ETEC**): responsable de la llamada vulgarmente diarrea del viajero, causa una diarrea acuosa como agua de arroz y poca fiebre, coloniza la porción proximal del intestino delgado (Sánchez y cols., 2011).
- *E. coli* enteroinvasor (**EIEC**): Origina fiebre y diarrea profusa, con heces que contienen mucus y estrías sanguinolentas (Sánchez y cols., 2011).
- *E. coli* enterohemorrágica (**EHEC**): Origina diarrea sanguinolenta, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y purpura trombocitopénica (Sánchez y cols., 2011).
- *E. coli* enteroagregativo (**EAggEC**): origina diarrea acuosa y vómito (Sánchez y cols., 2011).

Figura N° 23. *Escherichia coli*



Tomado y modificado de: Tortora, Funke y Case, 2007.

Klebsiella pneumoniae

Son bacilos gramnegativos causantes de enfermedades infecciosas oportunistas y los principales causantes de infecciones nosocomiales, se aíslan con frecuencia en pacientes que se encuentran hospitalizados en unidad de cuidados intensivos (UCI) y que su enfermedad de base sea la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), diabetes mellitus, en aquellos que tienen un daño en el parénquima pulmonar, esta bacteria es causante de absceso pulmonar y neumonía grave. La colonia de esta bacteria es fermentadora, su característica principal es tener una consistencia gelatinosa (ver Figura 24) (Tortora, Funke y Case, 2007; Munive, 2013).

Pseudomonas aeruginosa

Bacilo gramnegativo que se caracteriza por tener un brillo metálico en el agar sangre, chocolate y MacConkey no fermenta la lactosa, causante de

múltiples procesos infecciosos en los pacientes que tienen una larga estancia en unidades intensivos (ver Figura 25) (Munive, 2013).

Figura N° 24. *Klebsiella pneumoniae*



Tomado y modificado de: Tortora, Funke y Case, 2007).

Figura N° 25. *Pseudomonas aeruginosa*



Tomado y modificado de: Tortora, Funke y Case, 2007.

Resistencia antimicrobiana

Es la capacidad de un microorganismo de tolerar o resistir ciertas concentraciones físico-químicas y biológicas. Donde quiera que exista un

cambio de susceptibilidad bacteriana que ha sido poco efectivo, en contra de ciertos microorganismos, este se considera como resistente (Medina, 2000).

Mecanismos de resistencia

Inactivación por destrucción o modificación: Producción de β -lactamasas, enzimas inactivantes de aminoglucósidos (Medina, 2000).

Inaccesibilidad al lugar de acción, bien por la disminución de la permeabilidad o por expulsión activa: Resistencia a Tetraciclina® por expulsión del antibiótico de la bacteria, resistencia a los β -lactámicos por disminución de la permeabilidad (Medina, 2000).

Alteración en el lugar de acción: Modificación del ribosoma por el tipo de acción (resistencia a macrólidos), producto de una enzima con poca afinidad por el antibiótico (Medina, 2000).

Antibiótico

Se puede definir como toda sustancia química derivada o producida por microorganismos que tiene la capacidad, a bajas concentraciones, de inhibir el desarrollo o disminuir otros microorganismos (De Ahumada, Santana y Serrano, 2002). Los antibióticos pueden actuar de dos maneras: como microbicidas, es decir, que aniquilan las formas vegetativas de los gérmenes, específicamente se denominan bactericidas. Como microbiostático, donde inhibe el crecimiento de microorganismos (Tortora, Funke y Case, 2007).

Clasificación de los antibióticos

Los antibióticos se pueden clasificar según su mecanismo de acción:

Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared bacteriana: La desaparición de esta pared conduce al estallido de la bacteria. Los antibióticos utilizados pertenecen al grupo de penicilinas, cefalosporinas, Vancomicina®, quinolonas y Fosfomicina® (De Ahumada y cols., 2002).

Antibióticos que alteran la permeabilidad de la membrana celular de los microorganismos: Permite la salida de compuestos indispensables para la sobrevivencia de la bacteria. Los antibióticos son: polimixinas, y los antifúngicos Nistatina® y Anfotericina® B (De Ahumada y cols., 2002).

Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas en las bacterias: Como consecuencia, estas no crecen ni se reproducen. Entre ellos se encuentra el Cloranfenicol®, las tetraciclinas y los macrólidos (De Ahumada y cols., 2002).

Antibióticos que dan lugar a la formación de proteínas que no son útiles para el germen: Pertenecen los aminoglucósidos y las quinolonas (De Ahumada y cols., 2002).

Actividad antimicrobiana

Corresponde al efecto de ciertas sustancias químicas, empleadas para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. El mismo se debe al ataque que estos ejercen a los microorganismos, ejecutándose de diferentes maneras: por inhibición de la síntesis de la pared celular, funciones de la

membrana celular, traducción de material genético y de la síntesis de ácidos nucleicos (Tortora, Funke y Case, 2007).

Técnicas que se usan para determinar la actividad antibacteriana

Método de difusión en placa: También conocido como técnica de Kirby-Bauer, determina la susceptibilidad a las drogas utilizando discos de papel impregnados con una cantidad conocida de antibiótico. La droga difunde desde el disco a través del gel de tal manera que las concentraciones más altas se encuentran en las proximidades del disco. La placa se incuba durante un tiempo estimado para que las bacterias crezcan. Después del crecimiento bacteriano, algunos discos de antibióticos estarán rodeados por un halo claro lo que indica que no hubo crecimiento bacteriano, producido por el agente antimicrobiano. El tamaño de cada halo se mide y se compara con patrones de susceptibilidad para cada droga. A partir de esa comparación, se clasifican en sensibles, intermedias o resistentes (Ingraham y Ingraham, 1998).

Método de dilución en caldo: Se emplea para el estudio de la susceptibilidad de los antibióticos, mediante el cultivo de las bacterias en medios líquidos que contienen concentraciones progresivamente más altas de un determinado antimicrobiano. Una vez que se produce el crecimiento, algunos tubos presentarán turbidez, a partir de allí se hace la interpretación de los resultados. El crecimiento tiene lugar en los tubos que no contienen droga o que presentan una concentración baja. El tubo transparente que contenga la concentración más baja (máxima dilución) se corresponde a la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la droga (Ingraham y Ingraham, 1998).

Método en dilución en placa de agar: Es un método cuantitativo, donde la placa de agar contiene concentraciones conocidas de antibiótico, se siembra con los microorganismos que han de examinarse y se observa la inhibición del crecimiento (García y Córdoba, 1988).

Definición operacional de términos.

Corola: Verticilo interno de las flores que tienen perianto heteroclámideo, puede ser dialipétala o gamopétala. Presenta una textura más fina y colores más brillantes que el verticilo externo (cáliz) (Bruneton, 2001).

Inflorescencia: Forma de agruparse las flores en una planta, los principales tipos de inflorescencia son racimos, espiga, umbela, capítulo y cima (Bruneton, 2001).

Pedúnculo: Es una ramita que se prolonga de la hoja, flor o fruto (Bruneton, 2001).

Receptáculo: Extremo de la flor donde descansan los diversos verticilos. En una inflorescencia, parte engrosada del pedúnculo en el que se asientan las flores (Bruneton, 2001).

Taxonomía: Ciencia que trata de los principios, métodos y fines de la clasificación, se aplica en particular dentro de la biología, para la ordenación jerarquizada y sistemática, con sus nombres, de los grupos de animales y vegetales (Bruneton, 2001).

Microorganismo: Seres microscópicos y unicelulares que nace y se desarrolla en el aire, agua y en toda clase de organismos (Tortora, Funke y Case, 2007).

Operacionalización de las variables

Para operacionalizar el sistema de variables o el evento de estudio con el respectivo criterio de análisis, es necesario la definición conceptual y operacional de las mismas. En tal sentido, las variables se operacionalizan con la finalidad de identificar los elementos y datos empíricos que expresan su presencia (Hurtado, 2010).

Tabla 4. Operacionalización de Variables de la Actividad Antibacteriana del Extracto Hexano-Éter de las Hojas de *Espeletopsis pannosa*.

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición conceptual
Actividad antibacteriana del extracto hexano-éter de las hojas de <i>Espeletopsis pannosa</i>	Dependiente	La actividad antibacteriana es la capacidad que poseen las plantas de producir una sustancia capaz de eliminar los microorganismos o inhibir su crecimiento (Tortora, Funke y Case, 2007).
4. Definición operacional	5. Dimensiones	6. Indicador
Método de difusión de agar en disco.	Cepas Grampositivas: - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> Cepas Gramnegativas: - <i>Escherichia coli</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Klebsiella pneumoniae</i>	- Sensible - Intermedio - Resistente -Tamaño del halo de inhibición del crecimiento bacteriano en milímetros (mm)

Fuente: Cortez y Aparicio, 2021.

Tabla 5. Operacionalización de Variable Independiente: Extracto Hexano-Éter de las Hojas de *Espeletiopsis pannosa*.

1. Variable	2. Tipo de variable	3. Definición conceptual
Extracto hexano-éter de las hojas de <i>Espeletiopsis pannosa</i>	Independiente	Son todas aquellas moléculas activas generadas por las plantas, que no son necesarias para su crecimiento y reproducción. Se caracteriza por contener en su mayoría sustancias tipo diterpenos, en menor proporción triterpenos y sesquiterpenos (Hidalgo y cols., 1999; Usabillaga, Romero y Aparicio; 2003; Lizcano y Vergara, 2008).
4. Definición operacional	5. Dimensiones	6. Indicador
Pruebas químicas cualitativas también conocidas como Tamizaje fitoquímico.	Para las pruebas químicas cualitativas puede haber presencia y ausencia de:	Alcaloides: turbidez o precipitados.
	- Alcaloides.	
	- Esteroles y/o triterpenos	Esteroles y/o triterpenos: coloración azul o verde para esteroides; coloración es rosa, rojo, magenta o violeta para triterpenos.
	- Saponinas	Saponinas: espuma.
	- Compuestos fenólicos simples.	Compuestos fenólicos: coloración de azul a negro
	- Taninos	Taninos: precipitado blanco
	- Flavonoides	Flavonoides: coloración naranja a rojo, para flavonas; si es rojo flavonoles y magenta flavononas
	- Quinonas y Antraquinonas	Antraquinonas y quinonas una coloración roja.
	- Cumarinas	Cumarinas: La presencia de fluorescencia azul-violeta.

Fuente: Cortez y Aparicio, 2021.

Sistema de hipótesis

En vista que diferentes especies pertenecientes a la familia botánica Asteraceae, han presentado actividad desde el punto de vista biológico y/o farmacológico, es posible encontrar relación directa entre la composición química del extracto hexano-éter de las hojas de *Espeletiaopsis pannosa* y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional (ATCC).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de investigación

La determinación del tipo de investigación se basa en los métodos, tácticas, técnicas y estrategias que son diferentes para cada tipo de investigación (Hurtado, 2015). Por lo tanto esta investigación es de tipo confirmatoria, ya que se pretende confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y el extracto de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* en cepas de referencia internacional (ATCC).

Diseño de investigación

El diseño de la investigación se refiere a la estrategia que adopta el investigador para responder al problema, dificultad o inconveniente planteado en el estudio (Palella y Martins, 2012). Por lo tanto esta investigación cuenta con un diseño experimental, mixto, evolutivo, transversal y univariable. Ya que, es un proceso de búsqueda de campo y laboratorio (natural y artificial) en el páramo Sierra Nevada de Mérida y en la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, en el Laboratorio de Productos Naturales, en un solo momento y con un solo evento de estudio. Como en toda investigación el propósito de este diseño es el aporte de nuevos conocimientos.

Población y muestra

Unidad de investigación

La población se define como la totalidad del fenómeno a estudiar donde las unidades de población poseen una característica común, que se estudia y da origen a los datos de la investigación (Palella y Martins, 2012). La unidad de investigación de este estudio está representada por la especie *Espeletiopsis pannosa*.

Selección del tamaño de la muestra

La muestra es un subconjunto representativo de un universo o población (Arias, 2006). La población de esta investigación son las hojas de *E. pannosa* y el criterio de inclusión y exclusión es donde se va a buscar, en el páramo Sierra Nevada en la ciudad de Mérida y posteriormente medido en las bacterias.

Sistemas de variables

Una variable es una cualidad susceptible de sufrir cambios. Un sistema de variables consiste en una serie de características por estudiar, definidas de manera operacional, es decir, en función de sus indicadores (Arias, 2006). En la presente investigación, la variable dependiente corresponde a la actividad antibacteriana del extracto hexano-éter de las hojas de *Espeletiopsis pannosa*, definiéndose como una sustancia química que impide o inhibe el desarrollo de microorganismos (Tortora, Funke y Case, 2007). Mientras que la variable independiente es el extracto hexano-éter de las hojas de *Espeletiopsis pannosa*, los cuales se han definido como todas

aquellas moléculas activas generadas por las plantas, que no son necesarias para su crecimiento y reproducción. Se caracteriza por contener en su mayoría sustancias tipo diterpenos, en menor proporción triterpenos y sesquiterpenos (Hidalgo y cols., 1999; Usubillaga, y cols; 2003; Lizcano y Vergara, 2008).

Técnica e Instrumentos de Recolección de Datos

Según Arias, (2006), la observación consiste en visualizar, en forma sistémica cualquier hecho, fenómeno o situación que se produzca en la naturaleza, en función de objetivos preestablecidos. La presente investigación está relacionada con la visualización de un halo claro alrededor de discos impregnados del extracto hexano-éter de las hojas *E. pannosa*, extendido en placas previamente inoculadas con bacterias tales como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*.

La lista de cotejo es herramienta en la que se va a indicar la presencia o no de un aspecto o conducta que será visualizada (Arias, 2006). En esta investigación se utilizaron como instrumento las tablas de resultados y fotografías, las cuales pudieron indicar la presencia o no de actividad antibacteriana del extracto hexano-éter de las hojas de *E. pannosa*.

Procedimientos de la investigación

El procedimiento de la investigación se llevó a cabo a través de una serie de pasos:

Recolección de la planta: La *Espeletiopsis pannosa* fue recolectada en la Laguna de Mucubají, Páramo Sierra Nevada, en la ciudad de Mérida. Por el

Dr. Alfredo Usubillaga e identificada por el Prof. Pablo Meléndez del Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis

Preparación de la planta: Las hojas frescas fueron pesadas (3,0 Kg), se sometieron a un secado en una estufa a 40 °C y luego fueron molidas.

Obtención del extracto: El material seco y molido (450 g) se sometió a una extracción con soxhlet a una temperatura de 40 °C con hexano-éter 3:1 (500 mL) hasta agotamiento del material vegetal, una vez obtenido el extracto se sometió a rotaevaporador hasta tres partes de su contenido, se guardó en un frasco para su posterior análisis.

Identificación mediante el screening fitoquímico de los componentes del extracto hexano-éter:

El extracto hexano-éter obtenido, se le realizó los ensayos correspondientes al tamizaje fitoquímico, con el fin de determinar de forma cualitativa los grupos de metabolitos secundarios, realizando las siguientes pruebas:

Alcaloides: Se usó una pequeña porción del extracto hexano-éter de las hojas de la *planta E. pannosa*, llevándolo a Baño de María aproximadamente por 1 hora. Pasado el tiempo se le agregó 2 mL de Ácido Clorhídrico (HCL al 5 %), seguidamente se filtró y se dividió en tres tubos, por último se le agregó 3 gotas a cada tubo de los reactivos de Mayer, Dragendorff y Wagner. Este procedimiento fue realizado bajo campana de flujo laminar.

Triterpenos: El extracto fue dispuesto en un tubo seco y se le añadió diclorometano hasta cubrirlo completamente, se mezcló y se le agregó 0,5 mL de anhídrido acético y 2 gotas ácido clorhídrico (HCL) concentrado.

Taninos y compuestos fenólicos: Al extracto se le adicionó, algunas gotas de cloruro férrico al 1 % para evidenciar compuestos fenólicos. Por otra parte, para la identificación de taninos se usó una solución de gelatina al 1 % con agua tibia.

Flavonoides: En la ejecución de esta prueba fue utilizada cierta cantidad del extracto hexano-éter de las hojas de *E. pannosa*, agregándole 2 gotas de HCl concentrado y virutas de magnesio metálico (Reacción de Shinoda).

Saponina: Se preparó una solución acuosa del extracto y se agitó vigorosamente durante un minuto.

Detección de quinonas y antraquinonas: Pequeñas porciones del extracto hexano-éter de las hojas, fueron colocadas en una capsula de cerámica, a las que se le adicionó una gota de hidróxido de amonio concentrado, de tal manera se identificaron antraquinonas. Luego para la identificación de quinonas se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente para antraquinonas, pero esta vez añadiendo una gota de ácido sulfúrico (H₂SO₄).

Presencia de cumarinas: El extracto de las hojas, se disolvió en un solvente miscible (etanol). Posteriormente se le adicionó una gota de hidróxido de amonio y se llevó bajo luz ultravioleta para observar una fluorescencia.

Actividad antibacteriana del extracto hexano-éter de las hojas de *E. pannosa*

La actividad antibacteriana se llevó a cabo mediante el ensayo de difusión en disco, descrita por Velasco, Araque, Araujo, Longa, Nieves y Ramírez; 2008. Esta prueba se realizó en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de La Universidad de Los Andes, bajo la asesoría de la Prof. Yndra Cordero, Prof. Ysbelia Obregón y la colaboración del auxiliar de Laboratorio TSU. Emilio Salazar.

Preparación de las Muestras: Se realizó con el extracto hexano-éter mediante una dilución de 1000 ppm. El solvente usado fue dimetilsulfóxido (DMSO). Los microorganismos a estudiar en la evaluación de la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar, fueron 5; 2 especies de bacterias grampositivas (*S. aureus*, *E. faecalis*) y 3 de ellas gramnegativas (*E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*) de referencia internacional pertenecientes a la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), provenientes del Cepario del Departamento de Microbiología y Parasitología de La Facultad de Farmacia y Bioanálisis de La Universidad de Los Andes.

Preparación de las Placas: A cada placa se le agregó 15 mL aproximadamente del agar Müeller-Hinton (HIMEDIA®), previamente preparado y esterilizado, se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial, posteriormente se dejó solidificando a temperatura ambiente.

Preparación de los inóculos bacterianos: Las cepas frescas purificadas se mantuvieron en un medio de cultivo de agar Müeller-Hinton, con un tiempo de incubación no mayor a 24 horas, de estas se tomó una pequeña

cantidad de colonias con un asa en aro, para luego ser suspendidas en una solución de cloruro de sodio al 0,85 % estéril; ajustando el inóculo hasta una concentración de bacterias equivalente a 0,5 en la escala de McFarland N° 0,5 (10^{6-8} UFC/mL).

Inoculación: Las cepas bacterianas fueron inoculadas en la superficie del agar Müller-Hinton, correspondiente con un hisopo estéril, mezclando en forma envolvente con la finalidad de depositarlos en la placa de Petri. Luego se colocaron en la superficie del agar inoculado, los discos de papel de filtro previamente impregnados con los extractos hexano-éter de las hojas, además se ubicaron discos de antibióticos de referencia para cada microorganismo como controles positivos.

Incubación: Posteriormente, las placas de agar Müller-Hinton se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos, luego se incubaron a 37 °C durante 24 horas, en atmósfera aeróbica. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se procedió a realizar la lectura, se consideró un resultado positivo o sensible (actividad antibacteriana) cuando se observó un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del disco. La ausencia de dicho halo, se interpretó como negativo o resistente (sin actividad antibacteriana). Los halos de inhibición alrededor de los pozos fueron expresados en milímetros (mm).

Diseño de análisis

Existen tres tipos de enfoque, tales como: cualitativo, cuantitativo y mixtos, siendo estos constituyentes de posibles elecciones para enfrentar un problema de investigación (Hernández, Fernández y Baptista, 2010). El análisis de los resultados de esta investigación se enfocó a través de un

modelo cualitativo, debido a que se identificaron metabolitos secundarios mediante la observación de los colores del screening fitoquímico del extracto de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* y cuantitativo, porque se midieron los halos de inhibición.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

El extracto obtenido de las hojas de *E. pannosa* presentó las siguientes características macroscópicas (Tabla N ° 6):

Tabla N° 6. Características Físicas del Extracto Hexano-Éter de *E. pannosa*

CARACTERÍSTICAS	EXTRACTO HEXANO-ÉTER HOJAS
Aspecto	Viscoso
Color	Verde
Olor	Característico
Peso del material seco	450 g
Peso del extracto	14,72 g

Screening Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico del extracto hexano-éter de las hojas de la especie *E. pannosa*, permitió revelar la presencia de compuestos tales como: alcaloides con el reactivo de Drangendorff, así como esteroides y triterpenos, con la reacción de Liebermann-Burchard; mientras que no se encontraron saponinas, fenoles, taninos, flavonoides, quinonas, lactonas y cumarinas, por lo que podría inferirse que, estos metabolitos no se encuentran en la parte aérea de la *E. pannosa* o que quizá estén pero en baja concentración (ver Tabla 7).

Tabla N° 7. Resultados del Screening Fitoquímico de los Extractos Hexano-Éter de las Hojas de *Espeletiopsis pannosa*.

Metabolito	Prueba	Extracto hexano-éter Hojas
Alcaloides	Mayer	-
	Dragendorff	+
	Wagner	-
Esteroles y Triterpenos	Reacción de Liebermann-Burchard	+++
Saponinas	Reacción de Espuma	-
Compuestos fenólicos	Reacción con FeCl_3 al 1 %	-
		-
	Reactivo Gelatina	-
Flavonoides	Reacción de Shinoda	-
Taninos	NaOH 10 %	-
Quinonas y/o Antraquinonas	Reacción con NH_4OH	-
	Reacción con H_2SO_4	-
Cumarinas	Reacción con NH_4OH conc.	-
	Reacción con H_2SO_4 y anhídrido acético	-
+++ : Abundante; + : Presente; - : Ausente		

Alcaloides: Al agregar el reactivo de Dragendorff, se observó un pigmento de color rojo, indicando una reacción positiva, mientras que para los reactivos de Mayer y Wagner, fue negativo; porque no hubo cambio de coloración (ver Figura 26).

Figura N° 26. Determinación de Alcaloides del Extracto Hexano-Éter



Compuestos fenólicos: En el extracto de hexano-éter de las hojas, no se observó cambio de coloración, lo cual refirió la ausencia de compuestos fenólicos (ver Figura 27).

www.bdigital.ula.ve

Figura N° 27. Determinación de Compuestos Fenólicos



Taninos: Esta prueba fue negativa, debido a que no se formó el precipitado blanco (ver Figura 28).

Flavonoides: Esta prueba resultó negativa ya que, no se visualizó la aparición de una coloración naranja roja, ni magenta (ver Figura 28).

Figura N° 28. Determinación de Taninos y Flavonoides



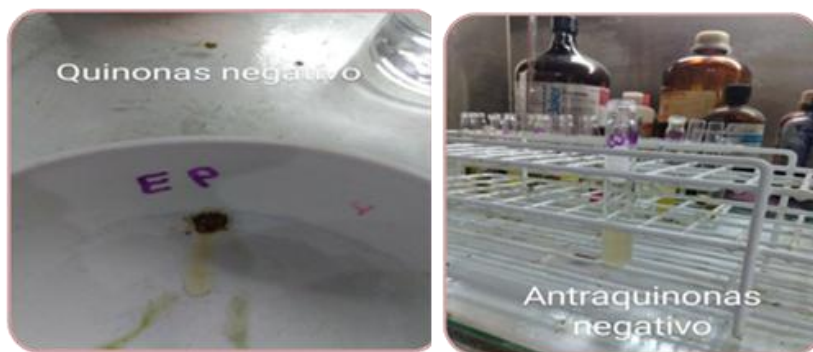
Esteroles y/o Triterpenos: Al agregar el HCl concentrado, se pudo observar una coloración verde, lo cual indicó la presencia de triterpenos y/o esteroides (ver Figura 29).

Figura N° 29. Determinación de Esteroides y/o Triterpenos



Quinonas y/o Antraquinonas: Al tratar los extractos de las hojas, con hidróxido de amonio e hidróxido de sodio al 5%, no se evidenció la formación de complejo rojo-cereza y el color amarillo pasando por el rojo al violeta, respectivamente; resultando ambas pruebas negativas (ver Figura 30).

Figura N° 30. Quinonas y Antraquinonas.



Cumarinas: Al examinar, el extracto hexano-éter bajo la luz ultravioleta, no se observó ninguna fluorescencia (ver Figura 31).

Figura N° 31. Sesquiterpenos (Cumarinas)



Saponinas: No se logró visualizar la formación de espuma, siendo negativo para los extractos hexano-éter de las hojas (ver Figura 32).

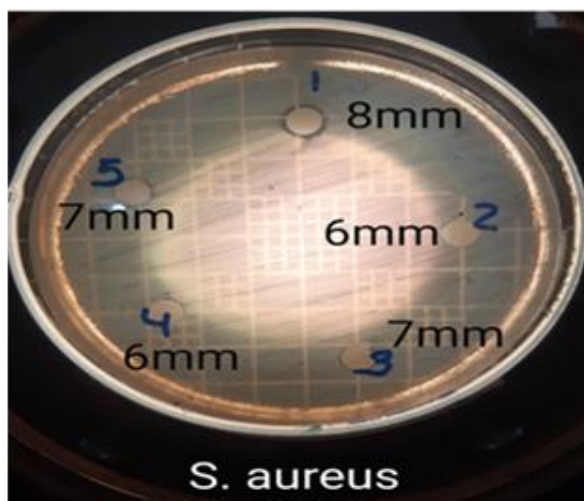
Figura N° 32. Saponinas.



Actividad antibacteriana

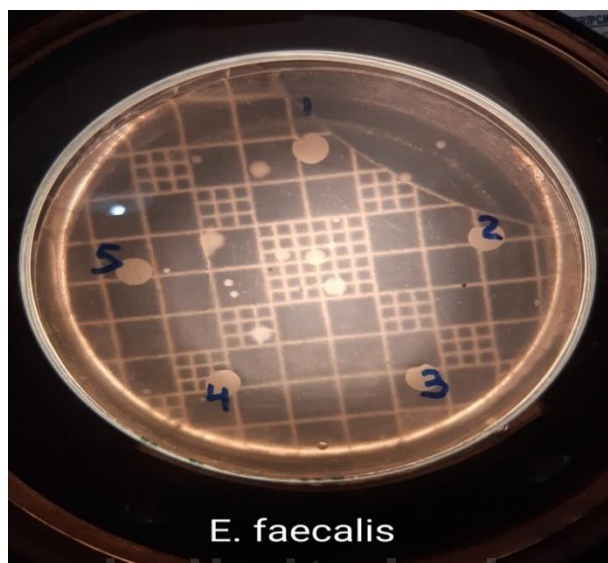
En la tabla 8, se muestran los resultados obtenidos para el extracto hexano-éter de las hojas de la especie *E. pannosa*, evaluado mediante la técnica de difusión en agar con disco frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, en una concentración de 1000 ppm; estos indicaron una sensibilidad para la mayoría de las bacterias ensayadas. Tal es el caso de *S. aureus*, *K. pneumoniae* y *E. coli*; todas ellas con un halo de inhibición de 7 mm (ver Figuras 33, 35 y 36) y *P. aeruginosa* con 6 mm (ver Figura 37). Mientras que, para el *E. faecalis* no se observó inhibición del halo (ver Figura 34).

Figura N° 33. Halos de Inhibición del Extracto hexano-éter *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) (*5).



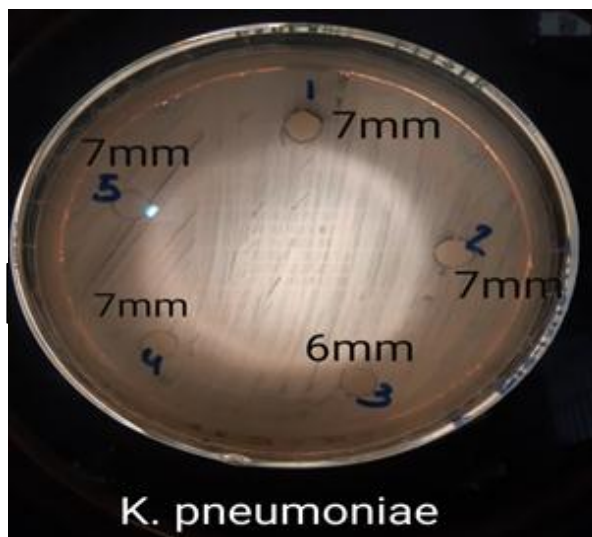
*1,2,3,4: otros extractos. ** 5: extracto hexano-éter de *E. pannosa*

Figura N° 34. Halos de Inhibición del Extracto Hexano-Éter *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) (*5).



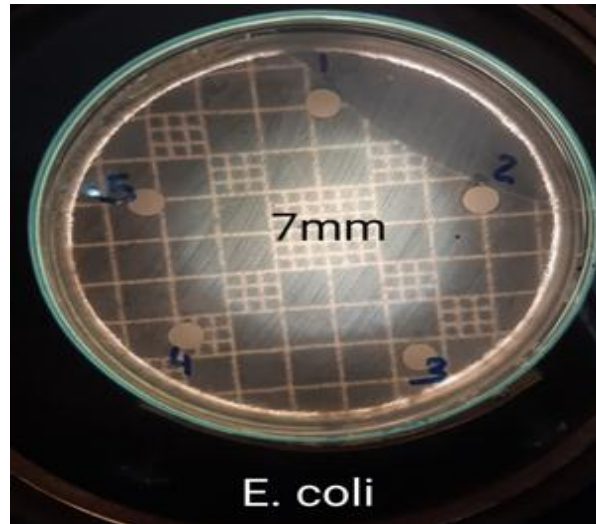
*1,2,3,4: otros extractos ** 5: extracto hexano-éter de *E. pannosa*

Figura N° 35. Halos de Inhibición del Extracto Hexano-Éter *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) (*5).



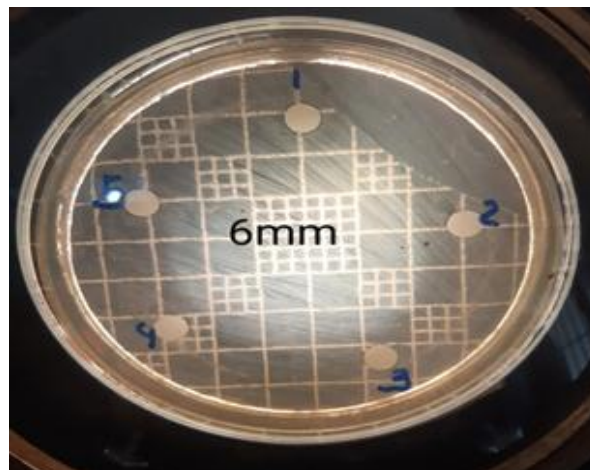
*1,2,3,4: otros extractos ** 5: extracto hexano-éter de *E. pannosa*

Figura N° 36. Halos de Inhibición del Extracto Hexano-Éter *Escherichia coli* (ATCC25922) (*5)



*1,2,3,4: otros extractos ** 5: extracto hexano-éter de *E. pannosa*

Figura N° 37. Halos de Inhibición del Extracto Hexano-Éter *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) (*5)



*1,2,3,4: otros extractos ** 5: extracto hexano-éter de *E. pannosa*

Tabla 8. Resultados de la actividad antibacteriana del Extracto Hexano-Éter de las Hojas de *Espeltiopsis pannosa*.

Halos de inhibición en mm					
Microorganismos	Concentración (ppm)	Extracto	Antibióticos de referencia		
		EHHE	PIP	AM	ERI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1000	7	-	-	23
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	1000	0	-	17	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	1000	7	21	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	1000	7	21	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1000	6	21	-	-

Leyenda: **EHHE:** Extracto de hojas hexano-éter, **PIP:** Piperacilina® 100 µg; **AM:** Ampicilina® 100 µg; **ERI:** Eritromicina® 15 µg; **ppm:** partes por millón; **mm:** Milímetros.

DISCUSIÓN

Los diferentes mecanismos de acción antibacteriana de las plantas y los posibles metabolitos implicados han sido estudiados mediante ensayos de susceptibilidad antibacteriana y análisis fitoquímicos, debido a los potenciales usos contra las enfermedades infecciosas (Pesewu, Cutler, Humber2008). Es por ello, que en el presente trabajo se persiguió confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y composición química del extracto de las hojas de *Espeletiopsis pannosa*.

Los resultados cualitativo del análisis fitoquímico del extracto hexano-éter de las hojas de *Espeletiopsis pannosa*, evidenciaron la presencia de alcaloides con el reactivo de Dragendorff y triterpenos y/o esteroides con el reactivo de Liebermann-Burchard (ver Tabla 5). Sin embargo, en el extracto de las hojas de hexano-éter (3:1), a pesar de que se obtuvo un resultado positivo para alcaloides con el reactivo de Dragendorff, se consideró como un falso positivo. Esto puede corresponder con la presencia de compuestos que reaccionan al reactivo, entre los cuales se encuentran los esteroides, triterpenos, estructuras con grupos carbonilo o lactonas α,β -insaturados, las cuales causan interferencias con el ensayo de alcaloides produciendo un precipitado. Asimismo, otro postulado considera que para que ocurra la reacción la molécula debe contar con un grupo oxigenado rico en electrones y que grupos donadores de electrones en el C β que aumentan la densidad electrónica sobre el oxígeno aumentan la reactividad, mientras que grupos aceptores la disminuyen o la hacen desaparecer (Miranda y Cuéllar, 2012, Vázquez, 1989, Habib, 1980).

En referencia a la composición química, Usubillaga y cols. En el 2003, identificaron por primera vez, a través de cromatografía de gases-masas (CG/EM), del extracto hexano:éter (3:1) de las hojas de *Espeletiopsis*

pannosa, la presencia de ácido kaurénico, ácido gradiflorénico, ácido 15 α -hidroxi-kaurénico, ácido 15 α -isovaleroxi-kaurénico.

Asimismo Bolhmann y cols. en 1980, del extracto éterdietílico-éter de petróleo de los tallos de *Espeletiopsis guacharaca* determinaron (19-acetoxi-kaureno, ácido 17-hidroxi-ent-kaur-15(16)-eno-19-oico), de *Espeletiopsis glandulosa* (ruilopeziol, ácido ent-kaur-15 α -senexioxi-16-eno-19-oico), de *Espeletiopsis garciae*, (Kaurenal), de *Espeletiopsis purpurancens* (epi-ruilopeziol, ácido ent-kaur-15 α -isobutiriloxi-16-eno-19-oico) y de *Espeletiospsis tachirensis* (ácido ent-kaur-16 α -hidroxi-19-oico, ácido ent-kaur-17-hidroxi-15(16)-eno-19-oico). Por su parte, Meccia y cols. en el 2007, comprobaron en el extracto de hojas de *Espeletiopsis angustifolia* la presencia de (Ácido kauránico y ácido gradiflorónico). También, Aparicio, Villasmil, Peña, Roja y Usubillaga en el 2013, obtuvieron del extracto de las hojas de *Espeletia semiglobulata* (ácido kaurénico, ácido isokaurénico, 16 α -kaurénico y dos ceras) y Morillo, Rojas, Aparicio y Usubillaga en el 2017, lograron identificar del extracto de las hojas de *Coespeletia thyrsoformis* (ácido grandiflorénico, ácido 15 α -isovaleroxikaurénico, ácido 17-al-isokaurénico, 19-nor-kaureno).

Como se evidencia en todas las especies mencionadas de la subtribu Espeletiinae, los componentes principales son los diterpenos del tipo kaureno, a los que se le han atribuido diversas propiedades biológicas tales como: anti-inflamatoria, antipirética, antibacteriana, citotóxica y antiparasitaria (Ghisalberti 1997, Hueso, Cuadrado, Cidre, Amaro, Ravelo, Estévez, De las Heras, Hortelano.2011, Cordero, Corao, Cova, Usubillaga, 2012).

Estos resultados son concordantes con muchas investigaciones en donde se ha comprobado la acción antibacteriana de estos metabolitos frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* (Gutiérrez y cols., 1998).

En cuanto a la actividad antibacteriana se pudo constatar que el extracto hexano-éter de las hojas de *E. pannosa*, inhibió a *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*, exceptuando *E. faecalis* (ver Tabla 6), lo cual concuerda con la investigación llevada a cabo por Ávila, Baquero, Viña, y Murillo. (2006); donde estudio la actividad antibacteriana *in vitro* de *Diplostephium tolimense* (Asteraceae), siendo positiva frente a *Staphylococcus aureus* (halo de inhibición 19 mm). Así también, tiene relación con el estudio realizado por Velásquez (2017), quien evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y acuoso (los dos a una concentración de 100 mg/mL) de *Tagetes multiflora* Kunth (Asteraceae), resultando sensibles las cepas de *Escherichia coli* (halo de inhibición de 11,33 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (halo de inhibición de 13 mm), *Staphylococcus aureus* (halo de inhibición de 15,67 mm), incluyendo la cepa *Aspergillus niger* (halo de inhibición de 13,67 mm) que fue sensible al extracto acuoso fresco.

Igualmente, Cordero de Rojas y cols., (2017); comprobaron la actividad antibacteriana del ácido kaurénico y sus derivados, dicha actividad fue determinada por el método de microdilución en caldo en placas de 96 pozos, uno de los metabolitos secundarios encontrados fue el ácido grandiflorénico, el cual presentó actividad sobre *Staphylococcus aureus* (CIM 20 µg/mL), *Bacillus subtilis* (CIM 5 µg/mL) y *Enterococcus faecalis* (CIM 10 µg/mL). No obstante, el ácido kaurénico mostró actividad únicamente sobre *Bacillus subtilis* (CIM 10 µg/mL), al igual que el ácido 15 α -acetoxi-kaurénico y el kaurenol (CIM 40 µg/mL).

Además, Padla, Solis y Ragasa, (2012); estudiaron la propiedad antibacteriana y antifúngica del ácido kaurenico del extracto (1000 µg/mL a 100 µg/mL) de diclorometano de la especie *Smallanthus sonchifolius*, en la que hubo actividad antibacteriana contra todos los organismos grampositivos

probados *S. aureus* (halo de inhibición 9,70 mm), *S. Epidermidis* (halo de inhibición de 9,80 mm) y *B. subtilis* (halo de inhibición 8,60 mm) en la concentración inhibitoria más baja 100 µg/mL, sin embargo; resultó inactivo frente a las cuatro bacterias gramnegativas de prueba *E. coli*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*; tal diferencia podría deberse al género y especie estudiada.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIÓN

- De acuerdo con los resultados obtenidos, en este trabajo fueron identificados metabolitos en el extracto hexano-éter de las hojas de la *Espeletiopsis pannosa*. Revelando la presencia de alcaloides con la prueba Dragendorff, esteroides y/o triterpenos con la reacción de Liebermann-Burchard.
- El estudio de sensibilidad *in vitro* llevado a cabo a través del método de difusión en disco, del extracto hexano-éter de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* a una concentración de 1000 ppm, reveló una sensibilidad frente a la cepa grampositiva *S. aureus* y las cepas gramnegativas *E. coli* y *K. pneumoniae*, todas ellas con un halo de inhibición de 7 mm; en el caso de *P. aeruginosa* mostró un halo de inhibición de 6 mm.
- Las propiedades antibacterianas encontradas en la especie *Espeletiopsis pannosa*, podrían representar un aporte al estudio de su composición química y además; ser útil a futuro en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos que permitan tratar las infecciones causadas por tales bacterias.
- Este es el primer estudio del screening fitoquímico y la actividad antibacteriana del extracto de las hojas de *Espeletiopsis pannosa* y del género *Espeletiopsis*, lo cual representa un gran aporte para futuras investigaciones.

RECOMENDACIONES

- Ampliar el estudio de la capacidad antibacteriana de la *Espeletiopsis pannosa* de las hojas u otras partes de la planta, a través de otros métodos de evaluación, así como la determinación de sus principios bioactivos.
- Realizar el estudio citotóxico y antifúngico en el extracto hexano-éter de la *Espeletiopsis pannosa* utilizando otros bioensayos, además de realizar un estudio de toxicidad *in vivo*.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria y antioxidante, ya que los extractos poseen compuestos polares interesantes que podrían resultar activos.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anaya, A. (2000). Ecología Química (1ª edición). México, México: Plaza y Valdés Editores.
- Aparicio, R., Villasmil, T., Peña, A., Rojas, L., y Usubillaga, A. (2013). Estudio fitoquímico de las hojas de *Espeletia semiglobulata* Cuatrec. *Revista de la Facultad de Farmacia.*, 55 (2), 2-5.
- Arias, F. (2006). El proyecto de investigación: Introducción a la metodología científica (7ª edición). Caracas: Episteme. (pp. 37-41).
- Aristeguieta L. 1964. Compositae. Flora de Venezuela 10 (1): 43–61.
- Ávila, L., Baquero, E., Viña, A., y Murillo, E. (2006). Actividad antibacteriana de *Diplostephium tolimense* Cuatrec. (Asteraceae) Frente a *Staphylococcus aureus*. *Revista de la Facultad de Química de Farmacéutica.*, 13(1), 55-60.
- Bañuelos, J. (2006). Lupinos del occidente de México. Recuperado de: <https://books.google.co.ve/books?id=tnpS1sn>.
- Bohlmann, F., Suding, H., Cuatrecasas, J., Robinsón, H. y King, R. (1980). Tricyclic sesquiterpenes and further diterpenes from *Espeletopsis* species. *Phytochemistry*, 19:2399-2403.
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, Fitoquímica, *Plantas Medicinales* (2ª edición). Zaragoza: Acribia.
- Carrión, A., y García, C. (2010). Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia metódica (Tesis de Pregrado). Universidad de Cuenca, Repositorio Institucional. Cuenca, Ecuador.
- Castillo, E., y Martínez, I. (2007). Manual de Fitoterapia. Barcelona, España, Elsevier Masson.
- Cordero, Y., Corao, G., Cova, J. y Usubillaga, A. (2012). Effect of some *ent*-kaurenes on the viability of human peripheral blood mononuclear cells. *Nat. Prod. Comm.* 7(1): 563-564.

- Cordero de Rojas, Y., Ustáriz, L., Araujo, L., Usubillaga, A., Rojas, F., y Moujir, L. (2017). Actividad antibacteriana de diterpenos del kaurano aislados de *Coespeletia moritziana* (Sch. Bip. ex Wedd.) Cuatrec. *Revista de la Facultad de Farmacia.*, 59(2), 03-07.
- Cotoras, M., Folch, C., y Mendoza, L. (2004). Characterization of the antifungal activity *Botrytis cinerea* of the natural, diterpenoids kaurenoic acid and 3- β -Hydroxy-kaurenoic acid. *J. Agriculture Food Chemical.* 52, 2821-2826.
- Coy, C., Parra, J., y Cuca, L. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (Rutaceae). *Revista Fundación Dialnet.*, 4(4), 31-39.
- Cuatrecasas, J. (1996). Clave provisional de las especies del Género *Espeletiopsis* Cuatrec. (Espeletiinae, compositae). *Anales Jardín Botanical.*, 54, 370-377.
- De Ahumada, I., Santana, L., y Serrano, J. (2002). Farmacología práctica para diplomaturas. En Ciencias de la Salud. Enfermería. Fisioterapia. Podología. Madrid, España: Editorial Díaz de Santos.
- De Los Ríos, C., Hidalgo, B., Contreras, Q., Crescente, O., y Caserta, A. (1999). Evaluación fitoquímico y actividad antibacteriana de las inflorescencias de *Espeletia schultzii* (Asteraceae). *Ciencia-Maracaibo.*, 7, 72-77.
- Domínguez, X. (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. México. Editorial Limusa. 69-76.
- Fonnegra, R y Jiménez, S. (2007). Plantas medicinales aprobadas en Colombia. (2da Edición). Editorial universidad de Antioquia. Colombia.
- Galvis, M., y Torres, M. (2017). Etnobotánica y usos de las plantas de la comunidad rural de Sogamoso, Boyacá, Colombia. *Revista de*

- Investigación Agraria y Ambiental.*, 8(2), 187–206. Recuperado de: <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/2045/2255>.
- García, R y Córdoba, R. (1988). Manual ilustrado de técnicas de laboratorio utilizadas en bacteriología y microbiología veterinaria. México.
- Ghisalberti, E. (1997). The biological activity of naturally occurring kaurene diterpenes. *Fitoterapia*. 68(1): 303-325.
- Granados, R y Villaverde, C. (2003). Microbiología. (Tomo 1). Editorial Paraninfo. España.
- Gutiérrez, S., Fuentes, O., Tellez, A., Torrenegra, R. (1998). Principios activos antibacterianos de *Espeletia barclayana*. *Revista Latinoamericana de Química.*, 26(3), 71-74.
- Habib, A. (1980). False-Positive Alkaloid Reactions. *J. Pharm. Sci.* 69: 37-43.
- Henry, G., Adams, L., Rosales, J., Jacobs, H., Heber, D., y Seeram, M. (2006). Kaurane diterpenes from *Laetia thamnina* inhibit the growth of human cancer cells *In Vitro*. *Cancer letter.*, XX, 1-5.
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2010). Metodología de la Investigación. (5ª edición). México: McGraw Hill.
- Hidalgo, D., Ricardi, M., Gaviria, J., y Estrada, J. (1999). Contribución a la Etnofarmacología de los Páramos Venezolanos. *Ciencia*, 7(1). Recuperado de <https://produccioncientificaluz.org/index.php/ciencia/article/view/8861>
- Hueso, I., Cuadrado, I., Cidre, F., Amaro, J., Ravelo, A., Estévez, A., de las Heras, B. y Hortelano, S. (2011). Synthesis and anti-inflammatory activity of the *ent*-kaurene derivatives. *Eur J Med Chem.*; 46: 1291-1305.
- Hurtado, J. (2010). Guía para la Comprensión Holística. (3ª edición). Caracas, Venezuela.
- Hurtado, J. (2015). El proyecto de investigación en: comprensión holística de la metodología y la investigación Bogotá-Caracas: Ediciones Quirón.

- Ingraham, J., y Ingraham, C. (1998). Introducción a la Microbiología. (Vol. 2). Barcelona, España. Editorial Reverté, S.A.
- Katinas, L., Gutiérrez, D., Grossi, M., y Crisci, J. (2007). Panorama de la familia Asteraceae (Compositae) en la República Argentina. *Boletín Sociedad Argentina Botánica.*, 42, 113-129.
- Klages, F. (2006). Tratado de química orgánica: Química orgánica sistemática. Barcelona (1ª edición). España: Editorial Reverté, S.A.
- Lizcano, A., y Vergara, J. (2008). Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruinea*, *Myrcianthes rophaloides* y *Pasiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos (Tesis de Maestría). Pontificia Universidad Javeriana Pontificia, Bogotá, Colombia.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). Productos naturales. En D. Marcano y Hasegawa. M (Eds.), Fitoquímica orgánica Venezuela: Torino. (pp. 30-32).
- Meccia, G., Quintero, P., Rojas, B., Usubillaga. A., y Carmona, J. (2010). Análisis de los ácidos kaurénicos presentes en *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec de Los Andes Venezolanos. *Avances en Química.*, 5(1), 45-49.
- Medina, J. (2000). Guía de antimicrobianos y tratamiento de las infecciones. Madrid, España. Editorial Díaz de Santos, S.A
- Miranda, M. y Cuéllar, A. (2012). Farmacognosia y productos naturales. 2da edición. La Habana: Editorial Félix Varela. 135-158.
- Morillo, M., Rojas, L., Aparicio, R., y Usubillaga, A. (2017). *Ent*-Kaurene diterpenes and *n*-alkanes isolated from the leaves of *Coespeletia thyrsoformis* (A.C.SM.) CUATREC. *Biointerface research in Applied Chemistry.*, 7(6), 2226 – 2229.

- Munive, A. (2013). Microbiología Aplicada al Paciente Crítico. Bogotá, Colombia. Distribuna Editorial.
- Nazar, J., Lavados, A., Daher, O., y Bischoff, M. (2010). Análisis microbiológico, epidemiológico y evolución clínica de los pacientes con bacteriemia en el Hospital Zonal de Esquel en el período 2007-2009. *Revista Argentina de Microbiología.*, 42(3),151-164.
- Organización Mundial de la Salud, OMS. (2007). Informe del taller interregional de la OMS sobre el uso de medicina tradicional en la atención primaria de salud. Recuperado de: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16202s/s16202s.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (2016). Plan de acción mundial sobre la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra: Organización Mundial de la Salud [citado 5 de Septiembre de 2017]. Recuperado de: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/255204/1/9789243509761-spa.pdf>
- Padla, E., Solis, L., y Ragasa, C. (2012). Antibacterial and antifungal properties of *ent-kaurenic acid* from *Smallanthus sonchifolius*. *Chinese Journal of Natural Medicines.*, 10(6), 408–414.
- Pahissa, A. (2009). Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* (1era edición). Recuperado de: <https://books.google.co.ve/books>.
- Palella, S y Martins, F. (2012). La metodología o el marco metodológico. En la metodología de la investigación educativa. (3ª edición). Caracas: FEDUPEL, 86-126.
- Peña, A., Alarcón. L., Baptista, J., Aparicio, R., Villasmil, T., Usubillaga, A. (2012). A phytochemical analysis of *Espeletia nana* Cuatrec. A midget *Espeletia* from Páramo Ortiz, Venezuela. *Avances en Química.*, 7(3), 187-192
- Peralta de A, y Royuela, M. (2018). Flora Arvense de Navarra. Recuperado de: <https://www.google.com/search?q=flora+arvense+de+navarra>

- Pemán, J., y Cantón, E. (2005). Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: results of a 2-year multicentre study in Spain. *Europe Journal Clinic Microbiologycal Infectology Disease*. 24(1), 23-30.
- Pesewu, G., Cutler, R. y Humber, D. (2008). Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. *J Ethnopharmacol*; 116(1): 102- 111.
- Pinto, E., y Toro, K. (2013). Estudio fitoquímico y determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica de la *Coespeletia timotensis* Cuatrec (Tesis de Pregrado). Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- Primo, E. (1995). Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. Barcelona. España: Reverté. Aristeguieta, L. (1964). *Compositae*. Caracas, Venezuela, Edición Especial del Instituto Botánico.
- Purizaca, K., y Condori, L. (2018). Actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de las hojas, flores, tallo y raíz de *Schkuhria pinnata* (Lanm.) Kuntze ex Thell “canchalagua” frente a *Propionibacterium acnés* (Tesis de Pregrado). Universidad Wiener, Lima, Perú.
- Reija, B. (2007). Estudio estructural y dinámico de sistemas organizados mediante sondas fluorescentes. Recuperado de: minerva.usc.es/bitstream/9788497509398_content
- Ríos, N., Villalobos, D., Rojas-Fermín, L., Aparicio, R., Usubillaga, A., Mitaine-Offer, A., Lacaille-Dubois, M., Deffieux, D., Peixoto, P., Pouységu, L., y Quideau, S. (2017). *In vivo* anti-inflammatory activity of grandiflorenic acid and kaurenic acid isolated from *Coespeletia moritziana* and *Espeletia semiglobulata*. *Revista de la Facultad de Farmacia.*, 59(1),17-21.

- Sánchez, J., Serrano, S., Marfil, R., y Jodral, M. (2011). Patógenos emergentes en la línea de sacrificio de porcino. Fundamento de seguridad alimentaria. Madrid, España: Editorial Díaz de Santos.
- Tamayo, R., Verdecia, A., y Mojera, I. (2011). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólicos, etéreo y acuosos de las hojas y tallo de la *Isocarpha cubana* B. *Red de Revistas Científicas de América Latina, El Caribe, España y Portugal.*, 15(3), 322-347.
- Tapia, J. (2010). La familia Asteráceae. *Herbario City*, 2, 82-84.
- Thompson, M. (1958). Naturally occurring quinones. *Academic press*, Nueva York., 6(2), 1-32.
- Tirapelli, C., Ambrosio, S., Coutinho, S., De Oliveira, D., Da Costa, F., y De Oliveira, A. (2005). Pharmacological comparison of vasorelaxant action displayed by kaurenoic acid and pimaradienoic acid. *Journal Pharmaceutical Pharmacology.*, 57(8), 997-1004.
- Toiu, A., Vlase, L., Vodnar, D., Gheldiu, A., y Oniga, I. (2019). *Solidago graminifolia* L., Salisb. (Asteraceae) as a Valuable Source of Bioactive Polyphenols: HPLC Profile, *In Vitro* Antioxidant and Antimicrobial Potential. *Molecules*, 24, 2666. doi: 10.3390/molecules24142666. Recuperado de: <https://doi.org/10.3390/molecules.24142666>.
- Torres, J. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán" frente a patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Lima – Perú (Tesis de grado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima Perú.
- Tortora, G., Funke, B., y Case, C. (2007). Introducción a la Microbiología. (9ª edición), Editorial Médica Panamericana. 988.
- Usubillaga, A., Romero, M., y Aparicio, R. (2003). Kaurenic Acid In Espeletiinae. *Acta Horticulture*. 597, 129-130. DOI:

10.17660/ActaHortic.2003.597.17. Recuperado de:
<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.597.17>

- Vázquez, A. (1989). Interacción de Derivados Polioxietilénicos con el Reactivo de Dragendorff. *Acta Fann. Bonaerense*; 8 (2): 125-6.
- Velasco, J., Araque, M., Araujo, E., Longa, A., Nieves, B., y Ramírez, A. (2008). Manual práctico de bacteriología clínica. (1era edición). Venezuela. Publicaciones Vicerrectorado Académico.
- Velázquez, D. (2017). Evaluación de la actividad antimicrobiana, antioxidante y citotoxicidad de los extractos etanólico y acuoso de *Tagetes multiflora* Kunth “*chinche*” (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
- Voigt, R., Bornschein, M., y Núñez, A. (1982). Tratado de Tecnología Farmacéutica (1ª edición). España: Acriba.

www.bdigital.ula.ve