



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



**CARACTERIZACIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LAS
HOJAS Y FRUTOS DE *Phyllanthus acidus* L.**

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

www.bdigital.ula.ve

Autores:

Dennys L. Herrera Meneses

CI: V-20.518.758

Marialis Contreras Mora

C.I: V-18.425.427

Tutor:

Prof. Alida A. Pérez C.

Mérida, Abril de 2021

DEDICATORIA

Primeramente dedico este logro a Dios, nuestro padre quien es el creador de todo y quien permite cada momento que vivimos.

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño a mis padres, por su sacrificio y esfuerzo, por darme una carrera para mi futuro, por creer en mi capacidad y por todo el apoyo incondicional que me han brindado desde el inicio de mi carrera, quienes con sus palabras de aliento no me dejaron decaer para que siguiera adelante sin rendirme desde el primer momento en que dude de mí capacidad, de no ser por ellos no lo habría logrado.

Así que no es mi logro sino el de Uds. papá y mamá.

A mi pequeño hijo por ser mi fuente de motivación para terminar con este proyecto ya iniciado.

www.bdigital.ula.ve

Dennys Herrera

DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a mi Dios quien supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la fe.

A mi hijo Santiago, que es el motivo y la razón que me ha llevado a seguir superándome día a día, para alcanzar mis más apreciados ideales de superación, y dejarle una enseñanza que cuando se quiere alcanzar algo en la vida, no hay tiempo ni obstáculo que lo impida para poderlo lograr.

Posiblemente en este momento no entiendas mis palabras, pero para cuando seas capaz, quiero que te des cuenta de lo que significas para mí. Eres la razón de que me levante cada día a esforzarme por el presente y el mañana.

Este trabajo de tesis está dedicado para aquellas personas importantes en mi vida, que siempre me brindaron su apoyo y estuvieron conmigo desde el inicio y culminación de mi carrera profesional.

Marialis Contreras

AGRADECIMIENTOS

Primeramente le doy gracias a Dios por haberme guiado en este camino y haberme dado la paciencia, sabiduría y constancia para llegar hasta aquí.

A mis padres, porque sin ellos no lo hubiese logrado, a ellos agradezco la vida y la oportunidad de estudiar, la educación que me han brindado hasta ahora, agradezco por su comprensión, paciencia y enseñanzas a lo largo de la vida, porque todo eso ayudó a ser quien soy y a tomar decisiones, agradezco por su sacrificio para poder lograr esta meta.

Papi y mami muchas gracias, sin Uds. no lo hubiese logrado, su sacrificio fue mi mayor motivación, nunca me cansare de agradecerles todo lo que hacen por mí.

A mis familiares, los que siempre de alguna u otra manera me dieron ánimos para seguir y culminar cuando estuve a punto de desistir, a los que trataron de ayudarme y apoyarme a lo largo de este camino, a todos y cada uno de ellos gracias.

A mi esposo, por su gran motivación y apoyo en lo que estuvo a su alcance para lograr terminar este proyecto.

A mi tutora de tesis, sencillo no ha sido el proceso, pero gracias a las ganas de transmitirme sus conocimientos y dedicación que la ha regido he logrado importantes objetivos como lograr el desarrollo de mi tesis con éxito y obtener una valiosa mención profesional.

Dennys Herrera

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Índice de Tablas.....	vii
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Esquemas.....	x
Resumen.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	3
Planteamiento del Problema.....	3
Justificación e Importancia de la Investigación.....	5
Objetivos de la Investigación.....	8
Objetivo General.....	8
Objetivos Específicos.....	8
Alcances y Limitaciones de la Investigación.....	9
Alcances de la Investigación.....	9
Limitaciones de la Investigación.....	9
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	10
Trabajos Previos.....	10
Antecedentes Históricos.....	12
Bases Teóricas.....	14
Productos naturales.....	14
Extractos vegetales.....	19
Análisis fitoquímico.....	21
Técnicas cromatográficas.....	26
Familia Euphorbiaceae.....	29
Género <i>Phyllanthus</i>	44

	Pág.
TABLA DE CONTENIDO (continuación)	
<i>Phyllanthus acidus</i>	53
Bacterias.....	60
Antibióticos.....	64
Resistencia bacteriana.....	67
Actividad antibacteriana.....	70
Definición Operacional de Términos.....	75
Operacionalización de las Variables.....	76
Hipótesis.....	79
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	80
Tipo de Investigación.....	80
Diseño de Investigación.....	80
Población y Muestra.....	81
Unidad de Investigación.....	81
Selección del Tamaño de la Muestra.....	81
Sistema de Variables.....	82
Instrumentos de Recolección de Datos.....	82
Procedimiento de la Investigación.....	82
Diseño de Análisis.....	94
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	95
Resultados.....	95
Discusión.....	111
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	120
Conclusiones.....	120
Recomendaciones.....	121
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	122

ÍNDICE DE TABLAS

Nº	Tabla	Pág.
1	Operacionalización de la variable independiente: Caracterización química de las hojas y frutos de <i>Phyllanthus acidus</i>	77
2	Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana presente en las hojas y frutos del <i>Phyllanthus acidus</i>	78
3	Cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC).....	88
4	Antibióticos empleados como control positivo para el estudio de la actividad antibacteriana.....	91
5	Fracciones obtenidas por la cromatografía de columna al vacío de los extractos metanólicos de hojas y frutos de <i>Phyllanthus acidus</i>	95
6	Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos y fracciones obtenidos de las hojas de <i>Phyllanthus acidus</i>	97
7	Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos y fracciones obtenidos de los frutos de <i>Phyllanthus acidus</i>	102
8	Resultados obtenidos para la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones de las hojas de <i>Phyllanthus acidus</i>	107
9	Resultados obtenidos para la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones de los frutos de <i>Phyllanthus acidus</i>	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Figura	Pág.
1	Fundamento químico de la reacción de Lieberman-Bourchard...	22
2	Fundamento químico de la reacción de Shinoda.....	23
3	Fundamento químico de la reacción de Erlich.....	24
4	Fundamento químico de la reacción de Borntrager.....	25
5	Fundamento químico de la reacción con FeCl ₃	26
6	Algunos triterpenos de la familia Euphorbiaceae.....	33
7	Derivados diterpénicos del género <i>Euphorbia</i>	35
8	Algunos flavonoides de la familia Euphorbiaceae.....	36
9	Alcaloides del género <i>Croton</i> (Euphorbiaceae).....	37
10	Ácidos fenólicos aislados de algunas especies de la familia Euphorbiaceae.....	38
11	Taninos obtenidos de <i>Phyllanthus niruri</i> (Euphorbiaceae).....	40
12	Algunos fenilpropanoides del género <i>Phyllanthus</i>	48
13	Triterpenos aislados de algunas especies de <i>Phyllanthus</i>	49
14	Compuestos fenólicos de varias especies de <i>Phyllanthus</i>	50
15	Árbol y frutos de <i>Phyllanthus acidus</i>	54
16	Algunos terpenoides obtenidos de <i>P. acidus</i>	56
17	Flavonoides aislados de <i>P. acidus</i>	57
18	Componentes volátiles reportados para <i>P. acidus</i>	58
19	Procedimiento para la extracción y fraccionamiento de hojas y frutos de <i>Phyllanthus acidus</i>	84
20	Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos y fracciones de las hojas de <i>Phyllanthus acidus</i>	98

ÍNDICE DE FIGURAS (Continuación)

Nº	Figura	Pág.
21	Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos y fracciones de los frutos de <i>Phyllanthus acidus</i>	103
22	Reporte de resultados ilustrados de la Actividad antibacteriana de los extractos y fracciones de las hojas y frutos de <i>Phyllanthus acidus</i>	109

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Nº	Esquema	Pág.
1	Procedimiento empleado para la caracterización cualitativa de los metabolitos secundarios de los extractos y fracciones de <i>Phyllanthus acidus</i>	88
2	Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones de <i>Phyllanthus acidus</i> por el método de difusión en agar mediante la técnica de disco (Kirby-Bauer).....	94

www.bdigital.ula.ve



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



Caracterización química y actividad antibacteriana de las hojas y frutos de
Phyllanthus acidus L.

Autores: Dennys L. Herrera Meneses
Marialis Contreras Mora

Tutor: Prof. Alida A. Pérez C.

RESUMEN

En la presente investigación se determinó la composición química y la actividad antibacteriana de las hojas y frutos de *Phyllanthus acidus*. Los extractos metanólicos se prepararon mediante la técnica de maceración en frío, posteriormente fueron fraccionados con solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano y metanol) a través de cromatografía al vacío. Las soluciones se concentraron hasta sequedad. La determinación cualitativa de metabolitos secundarios, se realizó mediante el tamizaje fitoquímico, indicando en el extracto metanólico y las fracciones de hexano, diclorometano y metanol de las hojas *P. acidus* la presencia de esteroides, alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides y taninos, mientras que el extracto metanólico y las fracciones obtenidas de los frutos de *P. acidus* presentaron esteroides, alcaloides, compuestos fenólicos, y flavonoides. La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de Kirby-Bauer (difusión en agar con disco) frente a cepas ATTC de *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *E. coli*, las muestras analizadas tuvieron una actividad antibacteriana leve, con una concentración mínima inhibitoria que varió entre 40-100 mg/mL, siendo las bacterias grampositivas las que fueron más sensibles. Se evidenció que es necesario la utilización de concentraciones elevadas de los extractos y fracciones para producir la inhibición del crecimiento de las bacterias ensayadas.

Palabras clave: Euphorbiaceae, *Phyllanthus*, *Phyllanthus acidus*, Tamizaje fitoquímico, Actividad antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

En los años recientes la producción de nuevos antibióticos ha disminuido de forma considerable y ha surgido como un problema de consecuencias impredecibles la resistencia a estos, por la aparición en las bacterias, virus, hongos y protozoarios de mecanismos defensivos con el fin de evadir la acción destructiva de dichas sustancias. Actualmente las enfermedades infecciosas siguen siendo un problema serio de salud con una tendencia hacia el aumento debido a la aparición de cepas resistentes a los antibióticos convencionales (Fernández, López, Ponce y Machado, 2003).

En tal sentido, las plantas medicinales han sido utilizadas desde la antigüedad para el tratamiento, curación y prevención de diversas enfermedades, práctica que se ha ido incrementado con el paso de los tiempos por varias causas, principalmente se pueden citar la falta de accesibilidad a los medicamentos de última tecnología, la resistencia a los antibióticos y la pobreza de la población en los países en vías de desarrollo (Calixto, 2000). Los productos naturales tales como los extractos de plantas y/o sus compuestos puros proveen oportunidades ilimitadas para el desarrollo de nuevas drogas que puedan ser utilizadas para el control microbiano (Sánchez-García, Castillo-Hernández y García-Palencia, 2016).

Es por esto, que el presente estudio se basó en el análisis de la composición química y determinación de la actividad antibacteriana de *Phyllanthus acidus* L. con el fin de confirmar que los metabolitos secundarios presentes en los extractos de hojas y frutos poseen actividad antibacteriana.

Al respecto, el siguiente trabajo de investigación está estructurado en V Capítulos. El *Capítulo I*, denominado El Problema, contiene los siguientes elementos: Planteamiento del Problema, Justificación e Importancia, Objetivos, Alcances y Limitaciones de la Investigación. El *Capítulo II*, llamado Marco Teórico abarca: Trabajos Previos, Antecedentes Históricos, Bases Teóricas, Definición Operacional de Términos, Operacionalización de las Variables e Hipótesis. El *Capítulo III*, titulado Marco Metodológico comprende los siguientes puntos: Tipo y Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Sistema de Variables, Instrumento de Recolección de Datos y Procedimientos de la Investigación y Diseño de Análisis. El *Capítulo IV*, denominado Resultados y Discusión. El *Capítulo V*, llamado Conclusiones y Recomendaciones.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Las enfermedades infecciosas siguen siendo, a principios del siglo XXI, una de las causas más importantes de muerte en la humanidad (Lozano y col., 2012), aunque su contribución relativa ha ido disminuyendo desde el siglo XIX. La introducción de los antibióticos en la práctica clínica en la década de los cuarenta del siglo XX supuso una de las intervenciones más importantes para su control y aumentó en varios años la esperanza de vida de la población. Sin embargo, desde hace pocos años, una amenaza creciente deteriora la eficacia de estos fármacos: la resistencia bacteriana a los antibióticos, que se define como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben/matan a otras de la misma especie (Alós, 2015).

Las bacterias no respetan fronteras y actualmente el mundo está hiperconectado (comercio de alimentos y animales, viajes de turismo, salud y negocios, emigración, refugiados, misioneros, militares en misiones en el exterior, cooperantes), en la misma forma, las cepas resistentes alcanzan cualquier lugar, por lo que el problema es global (Rogers, Aminzadeh, Hayashi y Paterson, 2011; Kennedy y Collignon, 2010). Al mismo tiempo, el uso de antibióticos en humanos es frecuentemente excesivo e inadecuado, siendo uno de los factores que contribuye al problema de la resistencia (Alós,

2015). Sin embargo, en la actualidad uno de los mayores problemas para la salud mundial son los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos desarrollados por las bacterias, siendo los más importantes la inactivación del agente antimicrobiano mediante actividad enzimática, la modificación del sitio diana, así como la disminución en la captación del antibiótico y las bombas de eflujo (Hans, 1992).

Debido a estas causas la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2004), orienta sus esfuerzos hacia la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos que superen dichas limitaciones. Razón por la cual, recomienda y promueve el uso de productos naturales con fines medicinales, ya que éstos han demostrado ser eficaces y además presentan un riesgo mínimo para la salud del hombre. Dichos productos naturales aportan una gran cantidad de compuestos químicos con carácter antibacteriano, como los metabolitos secundarios, algunos de los cuales muestran actividad *in vitro* comparable a la de los antibacterianos utilizados en la terapéutica. Éstas sustancias pueden ser utilizadas directamente o como base para la síntesis de nuevos principios útiles en el tratamiento de las infecciones (León, Tomas y Torres, 2017).

Una vez descrita la situación actual del problema de estudio, las autoras de esta investigación formulan el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación entre la composición química del *Phyllanthus acidus* L. y la actividad antibacteriana frente a cepas grampositivas y gramnegativas de referencia internacional?

Justificación e Importancia de la Investigación

Las plantas han constituido desde la antigüedad un recurso inapreciable para cuidar y preservar la salud. La Organización Mundial de la Salud (OMS, 2004) ha considerado que aproximadamente el 80 % de la población mundial utiliza la medicina tradicional para su atención primaria de salud y con frecuencia subestimada. El consumo de plantas como un recurso para proveer salud, ha aumentado a nivel mundial en las últimas 2 décadas. La publicidad que se ha dado a los productos a base de plantas, ha introducido la falsa idea de que ser naturales es sinónimo de inocuos, sin embargo, los estudios científicos de plantas, nos muestran desde hace más de 50 años, que los extractos vegetales contienen una gran variedad de compuestos químicos, entre los que pueden encontrarse algunos tóxicos (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

En la investigación de plantas medicinales es necesario considerar los siguientes aspectos: la documentación del conocimiento tradicional; la taxonomía de las plantas, a fin de una correcta identificación; las características ecológicas de las especies útiles, la evaluación fitoquímica, farmacológica y toxicológica de las especies medicinales identificadas; de tal manera que la etnobotánica podrá transformarse realmente en un factor de desarrollo sostenible para las comunidades depositarias del conocimiento tradicional, en particular en los países en desarrollo (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

Las especies vegetales tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna como son: fuente directa de agentes terapéuticos, materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la

elaboración de drogas sintéticas y tales principios se puedan utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

Más del 25 % de los medicamentos utilizados durante los últimos 20 años se derivan directamente del reino vegetal, mientras que otro 25 % son derivados de productos naturales, químicamente modificados. Cabe mencionar que tan sólo entre el 5 al 15 % de las aproximadamente 250.000 plantas de uso medicinal, han sido investigadas para compuestos bioactivos (Ringuelet y Viña, 2013).

Actualmente, especies de plantas promisorias de uso etnofarmacológico son fuentes de información para el descubrimiento de posibles sustancias con importante actividad biológica (OMS, 2004). Las sustancias derivadas de dichos géneros han alcanzado una gran proyección, propio de sus aplicaciones versátiles (Baris y col., 2006). La emergencia de la resistencia bacteriana ha generado nuevos intereses en la búsqueda de medicamentos con poder antibacteriano, prueba de ello es el aumento en los últimos años del número de publicaciones, relacionando productos naturales y actividad antimicrobiana, centrándose las investigaciones en los productos naturales como fuentes de moléculas bioactivas (Redo, Ríos y Villar, 1989; Silver y Bostian, 1993).

Varias especies de la familia Euphobiaceae han sido utilizadas para el cuidado de la salud y constituyen una alternativa terapéutica en los países en desarrollo. El aumento de la población, el suministro insuficiente de medicamentos, el costo inaccesible de los tratamientos, los efectos secundarios de varios medicamentos alopáticos y el desarrollo de resistencia a los medicamentos utilizados actualmente para las enfermedades han

llevado a un mayor énfasis en el uso de materiales vegetales como fuente de sustancias terapéuticas para una amplia variedad de dolencias en los seres humanos (Islam, Arai, Ahmad, Uddin, 2019).

Sobre la base de lo antes descrito, se planteó el estudio de los extractos de hojas y frutos de *Phyllanthus acidus*, en la búsqueda de nuevas fuentes de sustancias con propiedades antibacterianas y de este modo hacer un aporte al conocimiento químico y farmacológico del género *Phyllanthus*.

www.bdigital.ula.ve

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Confirmar la relación entre la composición química de los extractos de *Phyllanthus acidus* y la actividad antibacteriana sobre cepas grampositivas y gramnegativas de referencia internacional.

Objetivos Específicos

Obtener mediante maceración los extractos metanólicos de las hojas y frutos de *Phyllanthus acidus*.

Separar en fracciones los extractos metanólicos obtenidos previamente mediante la técnica de cromatografía de columna al vacío utilizando solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano y metanol).

Identificar a través de pruebas químicas cualitativas los metabolitos secundarios presentes en los extractos y fracciones anteriormente mencionados.

Determinar la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones de *P. acidus* frente a cepas de referencia internacional de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357) por el método de difusión en agar en disco.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación

El estudio permitió confirmar la relación existente entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos y fracciones de hojas y frutos de *Phyllanthus acidus* en cepas de referencia internacional; por tal motivo el alcance de la investigación es confirmatorio.

Limitaciones de la Investigación

Las limitaciones que se presentaron durante el desarrollo de la investigación estuvieron dadas por las fallas en cuanto a la disponibilidad del servicio de agua, luz y gas que afectaron la realización de los análisis químicos y microbiológicos. Por otra parte, es importante señalar que los altos costos para la adquisición de los medios de cultivo que se necesitan para las pruebas de la actividad antibacteriana junto con la falta del servicio eléctrico e interrupción del internet obstaculizaron notablemente la investigación y redacción del manuscrito.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Ashna y Suganthi (2019), realizaron un trabajo denominado análisis fitoquímico y actividad antimicrobiana de la pulpa del fruto de *Phyllanthus emblica* (L.), este estudio reporta la presencia de alcaloides, carbohidratos, glucósidos, flavonoides, proteínas, aminoácidos, taninos, compuestos fenólicos, esteroides, aceites fijos, grasas y resinas en los extractos de cloroformo y metanol de los frutos de *P. emblica*. El extracto metanólico presentó el contenido más elevado de metabolitos secundarios por lo que su actividad antibacteriana fue evaluada a las siguientes concentraciones de 1000, 500, 250, 100, 50 y 25 mg/mL contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* utilizando el método de difusión en agar en pozo, la concentración mínima inhibitoria (CMI) fue de 250 mg/mL para *S. aureus* y 100 mg/mL para *P. aeruginosa*.

Por otra parte, Ajibade, Oluwasusi, Ibiyemi, Ajenifuja y Famurewa (2019), aislaron dos saponinas denominadas filagenin-13-O- α -D-glucopiranosido y filagenin-25-O- β -D-glucopiranosido de las hojas de *Phyllanthus niruri* y ensayaron la actividad del extracto crudo de saponinas a un rango de concentración de 0,625 a 10 μ g/mL contra *Staphylococcus*

aureus resistente a la meticilina (SARM) por el método de difusión en agar demostrando que dicha bacteria es susceptible en un 60 %, confirmando el uso etnobotánico de esta planta contra afecciones de la piel producidas por SARM.

Asimismo, Mehta y Jain (2018), evaluaron la actividad antibacteriana del extracto de los frutos de *Phyllanthus fraternus* a una concentración de 100 mg/mL contra las cepas de *E. coli*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *C. glutenicum*, *S. aureus*, *S. typhi*, *S. typhi* A, *S. typhi* B, *P. aeruginosa* y *P. vulgaris* por el método de difusión en disco, el volumen del extracto que impregnó los discos varió entre 10 y 50 μ L. Los resultados obtenidos muestran que el extracto *P. fraternus* es activo contra todas las cepas ensayadas, sin embargo, destaca que utilizando un volumen de 50 μ L de la muestra los halos de inhibición de mayor tamaño fueron de 28, 27 y 25 mm contra *Bacillus cereus*, *Corynebacterium glutamicum* y *Salmonella typhi* A, respectivamente. Adicionalmente, los investigadores señalan la presencia de alcaloides, taninos, flavonoides y terpenoides en el extracto analizado.

De igual modo, Sirajudeen, Muneer, Abdul, Manivel, Pravin y Elamparithi (2017), realizaron el estudio fitoquímico y microbiológico del extracto metanólico de las hojas de *Phyllanthus niruri*, encontrando compuestos fenólicos, saponinas, flavonoides, terpenoides, alcaloides, taninos, esteroides y quinonas. La actividad antimicrobiana fue determinada mediante el método de difusión en agar (disco) contra *Coney lunata* y *Salmonella typhi*, las concentraciones de extracto ensayadas estuvieron fueron de 40 μ g/mL; 30 μ g/mL; 20 μ g/mL y 10 μ g/mL. Se observaron halos de inhibición entre 18-4 mm para *C. lunata* y 17-10 mm para *S. typhi* en

todas las concentraciones, validando de este modo el uso tradicional de esta planta frente a diversas afecciones micobacterianas.

Antecedentes Históricos

El uso de las medicinas herbolarias es una de las prácticas más antiguas del hombre y gran cantidad de especies han aprobado su eficacia empíricamente (Martin del Campo, 1976). Los primeros antecedentes sobre plantas medicinales se remontan a la prehistoria, se encuentran estudios realizados en Shanidar Irak con 60.000 años de antigüedad, donde se encontraron restos de 8 especies de plantas posiblemente empleadas como medicina. También se han reportado plantas en cuevas de Perú que datan de 45.000 años. En refugios prehistóricos de Coahuila, México con antigüedad de 8000 años, se localizaron restos de peyote, mezcal y otras especies (Schultes, 1981).

El primer antecedente escrito pertenece a los Sumerios; en la cultura China, la medicina se practicó desde el año 2500 aC; los antiguos egipcios desarrollaron una rica tradición en herbolaria. En la India y Grecia también se elaboraron documentos escritos sobre plantas medicinales. En Europa entre los siglos XVI y XVII se difundió la idea de que las plantas o partes de las mismas, habían sido creadas para el beneficio del hombre, solo se debía observar cuidadosamente sus características para descubrir su utilidad médica (Porter, 1967; Schultes, 1981).

Del conocimiento empírico de los beneficios del uso de plantas para fines terapéuticos, surgieron los primeros fármacos sintéticos, como ejemplo:

la aspirina, su estructura y síntesis fue inspirada en los componentes de la corteza del sauce blanco *Salix alba*, de la misma manera se ha procedido para copiar estructuras de origen natural en laboratorios farmacéuticos y aplicar estos productos para tratar diversas afecciones (Lambert, Srivastava y Vietmeyer, 1997; Butler, 2004; Mishra y Tiwari, 2011).

A partir del conocimiento etnobotánico y herbolario se iniciaron las investigaciones para conocer los principios activos presentes en las plantas más conocidas y esto dio origen a la rama de la Ciencia que es la Fitoquímica. Una diferencia importante entre el reino vegetal y el animal es la capacidad de las plantas y los hongos para producir sustancias que no le son esenciales para sobrevivir, la determinación de la presencia de estas sustancias, su análisis y la búsqueda de su actividad biológica constituyen el objetivo de la Fitoquímica (Valencia 1995; Sarker, Latif y Gray, 2005).

www.bdigital.ula.ve

Bases Teóricas

Productos Naturales

Todos los organismos vivos sintetizan compuestos orgánicos denominados metabolitos primarios para el mantenimiento de la vida, como los azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos y polímeros derivados de ellos (polisacáridos, lípidos, proteínas). Como subproductos de las rutas metabólicas primarias se derivan otros compuestos llamados metabolitos secundarios, los cuales representan una característica fundamental de la especialización, es decir, que el compuesto resultante, puede no ser importante para la célula, pero si para el organismo como un todo, siendo particulares dentro de un grupo taxonómico, estado de vida o tejido. Su ocurrencia depende de condiciones externas tales como ataques patógenos, depredadores, cambios térmicos o lumínicos, deficiencias nutricionales o presencia de otros organismos intra o interespecíficos (Márquez, Galeano y Martínez, 2003).

Con pocas excepciones, los metabolitos secundarios pueden ser clasificados dentro de cinco grupos, de acuerdo a su origen biosintético: fenilpropanos, acetogeninas, terpenoides, esteroides y alcaloides. En plantas se han encontrado principalmente las siguientes clases de metabolitos secundarios: compuestos fenólicos, quinonas, flavonoides, taninos, terpenoides, alcaloides y cumarinas (Márquez, Galeano y Martínez, 2003).

Clasificación de los metabolitos secundarios

La formación de los metabolitos secundarios en la Naturaleza tiene lugar a partir de los metabolitos primarios. La síntesis de los productos naturales comienza con la fotosíntesis que tiene lugar en plantas superiores, algas y algunas bacterias. Es un proceso endotérmico que requiere de la luz solar. Aquellos organismos incapaces de absorber la luz obtienen su energía de la degradación de carbohidratos. Existen tres intermedios químicos principales como son el acetil-CoA, el ácido shikímico y el ácido mevalónico, a partir de estos compuestos se biosintetizan los principales grupos de productos naturales como son los ácidos grasos, antraquinonas, terpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas, lignanos, etc. Algunos esqueletos de productos naturales se biosintetizan utilizando fragmentos que provienen de más de una ruta específica tal es el caso de los flavonoides que se forman a partir de la ruta del acetato y del ácido shikímico, a estos compuestos se les denomina de biogénesis mixta (Gutiérrez y Estévez, 2009).

La clasificación de los metabolitos secundarios puede hacerse de acuerdo a sus estructuras, biosíntesis, fuente de producción o a su acción biológica. En estos casos es inevitable la superposición. Por ejemplo, por ser moléculas generalmente polifuncionales es difícil ubicarlas en un determinado grupo químico, debido a que dos compuestos totalmente diferentes tienen la misma acción, o la misma fuente de producción puede originar simultáneamente compuestos muy distintos (Marcano y Hasegawa, 2002).

Aparentemente el criterio más acertado es aquel que usa la biosíntesis como denominador común, la cual, en su esquema básico engloba la formación de los metabolitos primarios y secundarios (Marcano y Hasegawa,

2002). A fin de establecer un ordenamiento, estos compuestos se clasificarán teniendo en cuenta: su origen biosintético, las características estructurales comunes y las propiedades de solubilidad. Los grandes grupos de metabolitos secundarios se mencionan a continuación (Ringuelet y Viña, 2013):

Compuestos nitrogenados y azufrados: caracterizados por poseer nitrógeno y/o azufre en su estructura, de solubilidad y origen biosintético diverso, pero mayoritariamente derivados de aminoácidos.

Alcaloides: son sustancias básicas que contienen nitrógeno en un anillo heterocíclico, son derivados de aminoácidos, presentan distribución taxonómica limitada. Atendiendo a su solubilidad, propiedad empleada para extraerlos y purificarlos, la base del alcaloide es soluble en solventes orgánicos y pueden formar sales solubles en solventes polares cuando se encuentra en ácidos minerales diluidos (Pérez, 2013).

Compuestos fenólicos: con al menos un grupo hidroxilo unido a uno o más anillos aromáticos en su estructura química, la mayoría hidrosolubles y derivados biosintéticamente del ácido shikímico.

Fenoles: consisten en una estructura bencénica polisustituida como: pirogalol, timol, eugenol, apiol, anetol; son los compuestos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido. Poseen características asépticas y citotóxicas; ya que aquellos son clorados pueden atravesar las membranas celulares (Marcano y Hasewaga, 2002).

Flavonoides: son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en las plantas superiores. La estructura general comprende un anillo A derivado de la ruta acetato polimalonato (policétido), un anillo B y tres

átomos de carbono que unen los anillos A y B, correspondientes a la parte alquílica del fenilpropano, derivado de la ruta del ácido siquímico. Forman quelatos coloreados con Al, Fe y Pb. El núcleo básico es denominado flavano ($C_6-C_3-C_6$), el cual por lo general se encuentra hidroxilado, en forma libre o como glicósido. Muchos flavonoides tienen propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antibacterianas, fungicidas, etc (Pérez, 2013).

Terpenoides: con la molécula de isopreno como unidad estructural, liposolubles, y biosintéticamente asociados a la vía del ácido mevalónico o a la vía gliceraldehído fosfato - ácido pirúvico, dependiendo de la clase de terpenoides en cuestión.

Se sabe que la concentración de ciertos metabolitos aumenta cuando el vegetal se encuentra en estado de estrés. Las condiciones biomiméticas: condiciones de laboratorio que tratan de imitar a las producidas por el sistema enzimático, pueden representar ese estado de estrés en el organismo vivo y generar ciertos esqueletos no abundantes y a veces específicos, para la especie bajo estudio. Las plantas sintetizan cientos de compuestos, encontrándose en estos los metabolitos secundarios, dentro de los cuales se pueden mencionar los siguientes (Marcano y Hasegawa, 2002):

Terpenos: estos son compuestos no saturados constituidos por C é H ó C, H, O, de estructura no aromática, los cuales se forman a través de la ruta de condensación isoprénica del ácido mevalónico. Se clasifican por el número de unidades de C5 que forman la estructura del isoprenoide: Hemiterpenos C5, de escaso valor farmacológico; Monoterpenos C10, fuentes de aceites esenciales; Sesquiterpenos C15, se encuentran libres formando parte de aceites esenciales o como lactonas sesquiterpénicas; Diterpenos C20, giberelinas y el fitol, de cadena abierta que forma parte de la

estructura de las clorofilas; Triterpenos C30, fuentes del reino vegetal; Tetraterpenos C40, carotenoides; poliisoprenoides, hidrocarburos de alto peso molecular caucho y gutapercha (Marcano y Hasegawa, 2002).

Esteroles: el nombre genérico esteroles se emplea para designar sustancias con estructura ciclopentanoperhidrofenantrenica, con dos restos de metilo en las posiciones 10 y 13. Los esteroides son derivados de los esteroides alcohólicos, poseen cadena lateral de 8, 9, ó 10 átomos de carbono, siempre con un grupo hidroxilo en posición 3; los más abundantes en plantas son el estigmasterol y el sitosterol, que sólo difiere del estigmasterol en la ausencia del doble enlace entre C22 y C23 (Marcano y Hasegawa, 2002).

Taninos: el término “tanino” determina ciertas sustancias presentes en extractos vegetales capaces de combinarse con proteínas de la piel animal evitando así su putrefacción y convirtiendo la piel en cuero. Se clasifican en: taninos hidrolizables y taninos condensados. Los hidrolizables están formados por varias moléculas de ácidos fenólicos, los cuales se encuentran unidos a un azúcar a través de un enlace éster y son hidrolizados por ácidos o enzimas. Los condensados están constituidos por unidades de catequinas y sus isómeros, unidas entre sí por enlaces C-C. Los taninos precipitan con proteínas, metales pesados y alcaloides. Forman complejos coloreados con cloruro férrico. En la Industria farmacéutica y cosmética se emplean como astringente y antidiarreico, mientras que en la industria textil para curtir el cuero (Pérez, 2013).

Saponinas: son un grupo de glicósidos solubles en agua, que tienen la propiedad de hemolizar la sangre y disminuir la tensión superficial del agua, formando espuma abundante. Las saponinas por hidrólisis se

desdoblan en carbohidratos y una aglicona llamada sapogenina (Martínez, Valencia, Jiménez, Mesa y Galeano, 2008).

Antraquinonas: constituyen el grupo más numeroso de quinonas. Son compuestos aromáticos polihidroxilados más o menos metoxilados, en la naturaleza se hallan generalmente en forma glicosídicas. Muestran coloración roja con soluciones alcalinas o acetato de magnesio. Biosintéticamente derivan de la ruta del acetato polimalonato. Las propiedades tintóreas y laxantes de muchas plantas superiores están relacionadas con su contenido de antraquinonas (Pérez, 2013).

Cumarinas: son α -pironas que se generan por la lactonización del ácido cumárico, están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. Las cumarinas bajo luz UV muestran fluorescencia (azul, amarilla, verde), la cual es exaltada en presencia de hidróxido de potasio, amoníaco. Muchas son anticoagulantes, fotosensibilizantes, antibióticas, etc (Pérez, 2013).

Extractos Vegetales

El término extracción se refiere, a la separación de sustancias biológicamente activas de los materiales inertes o inactivos de una planta mediante la utilización de un disolvente seleccionado y de un proceso de extracción adecuado, donde generalmente se obtienen dos componentes; el extracto (solución extraída de un disolvente) y el residuo o bagazo (Valcarcel y Gómez 1988).

En la extracción y purificación de compuestos orgánicos mediante el empleo de solventes, se suelen seguir ciertas reglas basadas en las

analogías estructurales existentes entre la sustancia a extraer y el disolvente que se empleará para tal fin. De este modo, para la extracción de glúcidos, lípidos, alcaloides, pigmentos, etc., a partir de los tejidos vegetales o animales que los contienen (o de los líquidos orgánicos provenientes de ellos) se emplearán disolventes cuya estructura sea semejante o afín a la de las sustancias que se quieren extraer (Ringuelet y Viña, 2013).

A nivel popular basta muchas veces con extraer los principios activos de: raíz, hojas, flores, tallos, de acuerdo a los antecedentes encontrados, de la manera más sencilla, como puede ser por medio de una infusión o decocción. En cambio, para analizar las propiedades medicinales de una droga vegetal, en muchos casos se recurrirá a métodos de extracción más complejos, que permitan obtener métodos reproducibles, con cuantificación de principios activos en lo posible. Los métodos extractivos más empleados son: Maceración (frio o en calor), Lixiviación, Soxhlet y Arrastre por vapor de agua (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

Extracción por maceración: este es un método de extracción sólido-líquido donde el material vegetal que se pretende extraer contiene compuestos solubles en el líquido de extracción. Para realizar este proceso el material vegetal se corta en pequeños trozos o molido, fresco o seco se coloca en recipientes adecuados, añadiendo el solvente seleccionado por polaridad: hexano (o éter de petróleo), cloroformo y finalmente metanol o etanol en reposo o en un equipo con agitación continua, a temperatura ambiente durante 3-5 días cada extracción, hasta agotamiento del material vegetal (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

Extracción por lixiviación: en este método de extracción se produce el desplazamiento de sustancias solubles por medio de un disolvente líquido,

este proceso se utiliza industrialmente para preparar elixires; el material vegetal fresco se coloca en un recipiente a temperatura ambiente, durante 3 días, con acetona o algún otro solvente o mezcla de solventes, sin ser necesario cortar en trozos dicho material. Después de este tiempo se decanta y se evapora el solvente (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

Extracción por Soxhlet: este es un proceso de extracción continua de un material sólido que contiene algunos de los compuestos deseados, se coloca dentro de un dedal de papel filtro grueso, que se carga en la cámara principal del extractor Soxhlet, donde se hace pasar el solvente, este ciclo puede repetirse muchas veces, durante horas o días, a una temperatura controlada (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

Arrastre por vapor: se utiliza principalmente para aceites esenciales. Los aceites esenciales (AE) contienen compuestos orgánicos volátiles o aromáticos, que pueden ser alcoholes, cetonas, éteres, aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. Se les extrae preferentemente por arrastre de vapor mediante el uso de vapor saturado a presión atmosférica (Rivas, Oranday y Verde, 2016).

Análisis Fitoquímico

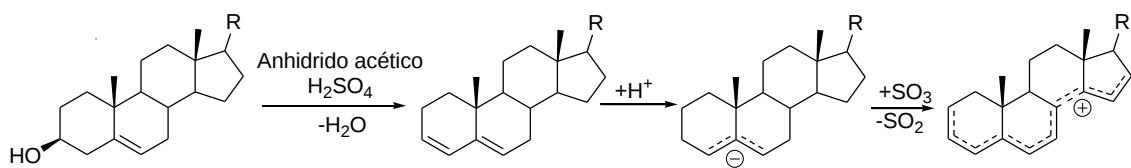
El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales metabolitos secundarios presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Consiste en la extracción de la planta con solventes apropiado y la aplicación de reacciones

de color y precipitación, debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente en una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico (Domínguez, 1979).

Para determinar la presencia de ciertos grupos químicos en una planta se efectúan una serie de pruebas, que dependiendo de las características estructurales y solubilidad pueden realizarse la identificación de los mismos. Entre estas pruebas se encuentran (Rivas, Oranday y Verde, 2016):

Ensayo de Lieberman-Bouchard (Triterpenos y/o esteroides): permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por poseer ambos un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo β y en la posición 5-6. Esta prueba colorimétrica utiliza una mezcla compuesta ácido sulfúrico y anhídrido acético que producen sustancias cromóforas con el ciclopentano perhidrofenantreno, por el incremento de los dos dobles enlaces conjugados formados por la deshidratación e isomerizaciones en los terpenos y esteroides (Figura 1) Se considera positiva la prueba cuando aparecen coloraciones roja o verde (Domínguez, 1979).

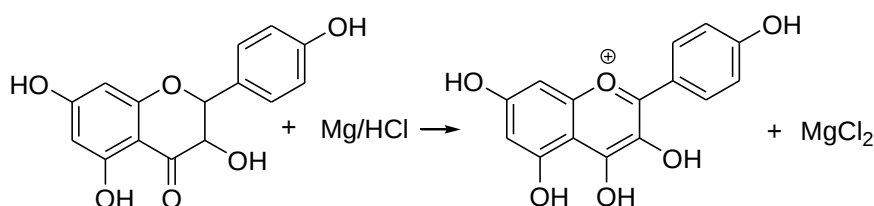
Figura 1. Fundamento químico de la reacción de Lieberman-Bouchard



Tomado y modificado de Domínguez, 1979.

Ensayo de Shinoda (flavonoides): el magnesio en polvo reacciona con ácido clorhídrico concentrado. El hidrógeno generado produce por reducción el ión flavilio (Figura 2) de color rojo escarlata (Varia desde rosa muy débil hasta el rojo escarlata). Todos los flavonoides, excepto chalconas, auronas e isoflavonas dan positiva esta reacción (Domínguez, 1979).

Figura 2. Fundamento químico de la reacción de Shinoda



Tomado y modificado de Domínguez, 1979.

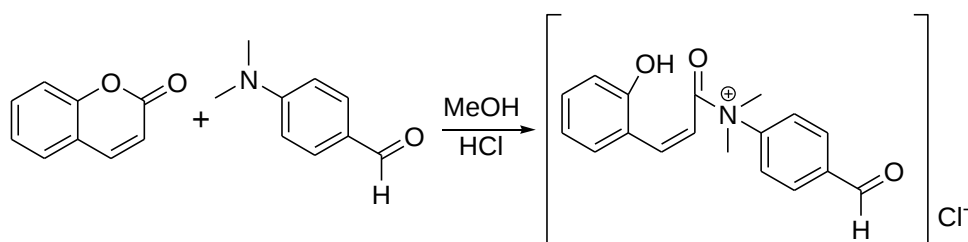
Ensayo de Dragendorff, Wagner y Mayer (alcaloides): Se basa generalmente en la combinación de los alcaloides con metales pesados. Se llevan a cabo en solución acuosa ácida. Los reactivos más utilizados para la precipitación de los alcaloides son ácidos de elevado peso molecular. Como el reactivo yodado de Dragendorff (yodo bismutato pótasio, precipitado rojo-naranja); el reactivo de Mayer (mercurio tetrayodado pótasio, precipitado blanco-amarillento) y el reactivo Wagner (yoduro de potasio, precipitado marrón) (Domínguez, 1979). En el análisis fitoquímico preliminar las técnicas de reconocimiento son basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados formando precipitados con reactivos como el mercuriyoduro de potasio (Mayer) y el yoduro de bismuto (Dragendorff), estas reacciones se basan en los siguientes comportamientos (Coy, Parra y Cuca, 2014):

El yoduro de potásico cuando reacciona con cloruro mercúrico, forma un precipitado rojo de yoduro mercúrico: $[\text{HgCl}_2 + 2\text{I}^- \longrightarrow 2\text{Cl}^- + \text{HgI}_2]$ soluble en exceso de iones de yoduro con formación de un anión complejo incoloro: $[\text{HgI}_2 + \text{I}^- \longrightarrow \text{HgI}_2^{2-}]$. La solución alcalina de este complejo sirve para descubrir indicios de amoníaco. En esta reacción se forma el compuesto de color pardo oxiyoduro mercuri amoníaco, que es soluble en exceso de complejo $[\text{HgI}_2^{2-}]$, generando intenso color amarillo.

Los alcaloides por su carácter nitrogenado pueden comportarse de forma similar al amoníaco, ante estos reactivos (Reactivo de Mayer); muchos alcaloides presentes en un material vegetal forman con el bismuto, yoduros dobles insolubles (Reactivo de Draggendorf) (Coy y col., 2014).

Ensayo de Hidróxido de Amonio (cumarinas): se basa en la apertura y solubilización en medio básico. Las cumarinas se caracterizan por su intensa absorción de la región UV del espectro, las cuales al ser examinadas a la luz ultravioleta presenta coloración exaltada en presencia de amoniaco. A continuación, en la Figura 3 se presenta el fundamento químico de la determinación de cumarinas utilizando el reactivo de Erlich (Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011).

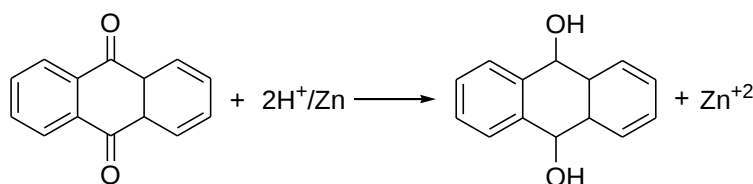
Figura 3. Fundamento químico de la reacción de Erlich



Tomado y modificado de Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011.

Ensayo de Borntrager (naftoquinonas y antraquinonas): La naftoquinonas y antraquinonas libres al ser tratadas con la solución de hidróxido amónico forman complejos de color rojo cereza. Al extracto se le adiciona peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico y se procede a calentar; bajo estas drásticas condiciones, se hidrolizan los enlaces glicosídicos y se oxidan las antronas y los antranoles hasta antraquinonas, las cuales al ser extraídas con tolueno y agitadas en presencia de una solución de hidróxido de sodio al 5 % que contiene hidróxido de amonio al 2 %, presentan coloraciones que van del rosado al rojo intenso, dependiendo de la concentración de estos compuestos en la muestra (Carvajal, Uribe, Sierra y Rueda, 2009). Esta reacción es utilizada para la detección directa de quinonas en los extractos vegetales (Figura 4) (Tamayo, Verdecia y Mojera 2011).

Figura 4. Fundamento químico de la reacción de Borntrager

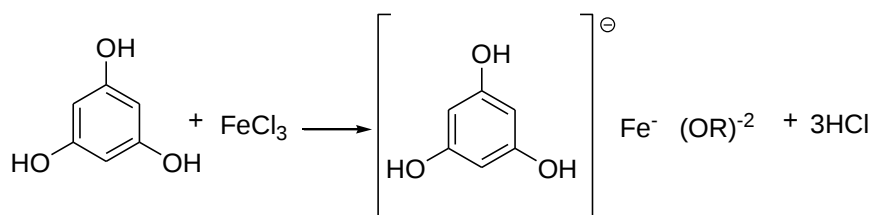


Tomado y modificado de Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011.

Prueba de triclورو férrico (compuestos fenólicos y taninos): Químicamente los taninos son polímeros de polifenoles con 1 a 2 % de hidróxidos fenólicos libres, los flavonoides son compuestos polifenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en plantas. Estas sustancias precipitan en presencia de cloruro férrico. Esta respuesta se debe al ataque producido por el ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo provocando una

ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (Figura 5) (Domínguez, 1979; Coy y col., 2014).

Figura 5. Fundamento químico de la Reacción con FeCl_3



Tomado y modificado de Domínguez, 1979; Coy y col., 2014.

Prueba de la espuma (saponinas): las saponinas son glicósidos cuya aglicona consiste en un núcleo esteroideal o triterpénico; esta característica estructural les confiere un carácter anfótero que les permite actuar como tensioactivos. Aprovechando esta propiedad, las dos pruebas más empleadas en la detección de saponinas son la de hemólisis y la de formación de espuma, el extracto disuelto en agua se agita, vigorosamente, la aparición de espuma es indicio de la presencia de saponinas, ésta debe ser estable por lo menos 30 minutos (Carvajal, Uribe, Sierra y Rueda, 2009).

Técnicas Cromatográficas

Son técnicas que se basan en la separación de sustancias que se encuentran presente en una mezcla compleja, entre dos fases inmiscibles, una móvil y otra estacionaria. Las moléculas pertenecientes al soluto de la mezcla son retenidas por la fase estacionaria y arrastradas por la fase móvil, de modo que, si los componentes de la mezcla presentan afinidades diferentes por algunas de las fases, sus velocidades medias de avance a lo

largo del sistema serán diferentes. Ya que la afinidad será determinada por la fuerza de tipo Van der Waals, puentes de hidrógenos o transferencia de cargas. Los componentes que sean retenidos fuertemente por la fase estacionaria migraran más lento a lo largo de dicha fase que aquellos que se unen débilmente. Las consecuencias de esta diferencia de movilidad de los componentes de las mezclas logran la separación de bandas discretas las cuales pueden analizarse cualitativa o cuantitativamente mediante el uso de detectores adecuados (Skoog, 2008).

La cromatografía es una técnica muy versátil, que permite la separación tanto de mezcla como la purificación de los productos, la determinación del grado de pureza de un compuesto, el seguimiento de reacciones o la detección y caracterización de compuestos. Su principal ventaja frente a otros métodos de separación y purificación es que las técnicas cromatográficas se pueden clasificar atendiendo varios criterios: naturaleza de las fases (las cuales son sólido, líquido, gas), relación de polaridad de las fases (fase normal, fase inversa), mecanismo de separación (absorción, exclusión, intercambio iónico, reparto, afinidad), disposición de las fases (en columna en plano) y forma del desarrollo del proceso (frontal, de desplazamiento, de elución). Los métodos más utilizados son la cromatografía de columna (CC), cromatografía en capa fina (CCF) cromatografía de gases (CG) y la de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) (Dean, Merritt, Settle y Willard, 1990). A continuación, describiremos la técnica de cromatografía de columna empleada en esta investigación:

Cromatografía en columna: consta de una fase estacionaria que consiste en sólido adsorbente empaquetado en una columna de vidrio. La

mezcla que se desea separar (la muestra) se deposita sobre la superficie de la fase estacionaria quedando adsorbida a ella. Seguidamente se permite el paso de la fase móvil (eluyente) a lo largo de la columna a través de la fase estacionaria (Abbott, 1973).

En el proceso cromatográfico los componentes de la muestra serán arrastrados por la fase móvil a velocidades diferentes para efectuar la separación. La velocidad de arrastre de cada uno de ellos va depender de su grado de adsorción en la fase estacionaria y su afinidad por la fase móvil. Para la efectiva separación de las sustancias de la mezcla, es necesario que la velocidad de migración a lo largo de la columna sea eficazmente diferente y la longitud de la columna adecuada. Los adsorbentes usados por lo general son: gel de sílice, alúmina, sacarosa, y almidón. La fase móvil debe consistir en un disolvente o mezcla de disolvente, que debe seleccionarse en base a su polaridad con el fin de optimizar la separación de los componentes de la muestra en la columna. La fase móvil se desplaza a lo largo de la fase estacionaria debido a la fuerza de la gravedad (Abbot, 1973).

Cromatografía en columna al vacío: básicamente se aplica una succión a la base de la columna para forzar el flujo de la fase móvil a través de una columna empacda con una fase estacionaria para cromatografía de 10 – 40 μm de tamaño de partículas por lo que bajo vacío logra la máxima densidad. En general las columnas son de poca longitud, pero de mayor diámetro (columnas de vidrio cortas y anchas), semejantes a un embudo separador, se empacan en seco, luego se aplica solvente de baja a mediana polaridad, se aspira a seco con vacío y estará lista para sembrar la muestra e iniciar el proceso cromatografico. La muestra puede estar seca o recubierta con el adsorbente o disuelta o suspendida en un pequeño volumen de la fase móvil.

El principio fundamental es emplear presión de aproximadamente 25 mm de Hg, es decir reducir a condiciones de vacío para así acelerar el flujo de la fase móvil, por lo que el tiempo de desarrollo se limita de 2 a 3 horas como máximo (Flores, 2010).

Familia Euphorbiaceae

La familia de las Euphorbiáceas comprende 322 géneros y alrededor de 8910 especies siendo una de las más diversas entre las Magnoliophytas, después de las Orchidaceas, Asteráceas, Fabáceas, Poáceas y Rubiáceas. Las especies son originarias, en su mayoría, de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Presenta 5 sub-familias: Acalyphoideae, Crotonoideae, Euphorbioideae, Oldfieldioideae, y Phyllanthoideae, la primera de las mencionadas es la que contiene mayor número de especies (Keller, Stampella, Delucchi y Hurrell, 2013).

Aspectos botánicos

La familia Euphorbiaceae se encuentra en América y África tropical. El rango de variación morfológica es enorme y por lo tanto difícil de caracterizar, hecho que ha sugerido que las especies de la familia tengan un origen polifilético (Heywood, 1985; Trease y Evans, 1986). Las plantas se caracterizan por ser arbóreas, arbustivas o herbáceas, generalmente con látex. Sus hojas son simples o, rara vez, compuestas, alternas opuestas o verticiladas, de margen entero, dentado o lobulado, sésiles o pecioladas. Inflorescencias racimosas o cimosas, diclinomonoicas o dioicas. Perianto simple y calicoide, estambres en número de uno o muchos, el gineceo con

los estilos en igual número al de carpelos, libres o connados, ovario supero trilocular. El ciato es la inflorescencia del género *Euphorbia*, es una estructura diminuta en forma de copa, que consiste en un involucre con glándulas variadas en el borde, dentro del cual hay numerosas flores estaminadas (reducidas a un estambre que se hallan rodeando a una única flor pistilada central). El fruto generalmente una capsula tricoca, con apertura valvica, en algunas especies es carnoso. Las semillas con endosperma oleaginoso (Thakur y Patil, 2011). Taxonómicamente la familia se clasifica de la siguiente manera:

- ✓ **Reino:** Plantae
- ✓ **División:** Magnoliophita
- ✓ **Clase:** Magnoliopsida
- ✓ **Orden:** Euphorbiales
- ✓ **Familia:** Euphorbiaceae
- ✓ **Sub-familias:** Acalyphoideae, Crotonoideae, Euphorbiodeae, Oldfieldioideae, Phyllanthoideae.

Cabe destacar que la subfamilia Phyllanthoideae, ha sido incluida en los tratados sobre Euforbiáceas desde 1890, sin embargo, en años recientes, estudios filogenéticos confirman y separan los géneros ubicados taxonómicamente dentro de esta subfamilia y los reagrupa como familia Phyllanthaceae (Novara, 2012). Esta nueva clasificación realizada por Hoffmann, Kathriarachchi y Wurdack (2006) obtuvo reconocimiento mundial cuando fue aceptada por el APG III (Angiosperm Phyloeny Group, 2010) y en la base del Angiosperm Phylogeny Website, los cambios de la morfología del polen, de los óvulos y las semillas, de las hojas y de la madera, además de considerar los estudios cromosómicos sustentan esta teoría. La Familia

Phyllanthaceae es de antigua data, fue publicada por Ivan Ivanovič Martinov en 1820, pero en la mayoría de los tratados sobre Euforbiáceas se la incluía como subfamilia Phyllanthoideae, propuesto por Ferdinand Albin Pax en 1890 (Novara, 2012).

En relación a lo anteriormente expuesto, la familia Phyllanthaceae comprende especies distribuidas en regiones pantropicales (Stevens, 2001), está compuesta por 2 subfamilias, 9 tribus, 56 géneros y unas 1725 especies de regiones tropicales de todo el mundo (APG III, 2010), se caracteriza por especies de hierbas anuales o perennes, arbustos, lianas o bejucos, árboles hasta de gran porte, hojas simples de lámina entera, raro dentada, dispuestas sobre ejes plagiotrópicos, en 2 hileras opuestas sobre el tallo, u ortotrópicos, a menudo reducidas, flores diclinas, mayormente monoicas, muy pequeñas, sin corola, y con 2-8 (-12) sépalos libres o apenas connados en la base, estambres 3 ó 6, ovario (2-) 3-locular, óvulos 2 en cada lóculo y frutos con 6 semillas, raro 4 por aborto (Novara, 2012).

En la presente investigación se reportarán los antecedentes de la familia Euphorbiaceae, debido a que la reciente clasificación botánica de la familia Phyllanthaceae limita la búsqueda de información, ya que en la mayoría de las publicaciones aún mantienen al género *Phyllanthus* ubicado taxonómicamente dentro de la familia Euphorbiaceae.

Importancia de la Familia Euphorbiaceae

Es una de las más importantes desde el punto de vista económico ya que muchos de sus miembros se cultivan por su uso medicinal, industrial, alimenticio y ornamental (Steinmann, 2002). Estudios etnobotánicos revelan que en la medicina tradicional se utilizan las plantas de la familia Euphorbiaceae con fines terapéuticos (Mwine y Van Damme, 2011), dentro

de las aplicaciones tradicionales, se distingue su utilización para dolores abdominales, antihistamínico, afrodisíacos, bronquitis, diabetes, enemas y enfermedades urinarias entre otras (Salamanca, 2002). En la medicina ancestral, las especies de esta familia han sido usadas en dermatología, como fungicida y antimicrobiano, para tratamiento de enfermedades gastrointestinales y enfermedades bacterianas como la gonorrea (Azuaje, Villarreal, Rojas, Díaz y Rodríguez, 2017).

Otras plantas de esta familia presentan reportes de su utilización para el tratamiento de cáncer, tumores y verrugas desde el tiempo de Hipócrates y las referencias sobre su uso han aparecido en numerosas literaturas del mundo (Kupchan, Nelida, Branfman, Dailey y Fei, 1976; Evans y Kinghorn 1977). Por ejemplo, la especie *Euphorbia fischeriana* ha sido usada en la medicina tradicional China por muchos años como una droga anticancerígena (Pan, Hu, Chang, 1991; Schoeder, Rohmer, Beck y Anton, 1980). Adicionalmente sobre el género *Jatropha* han descrito su aplicación para tratar en enfermedades de la piel, como infecciones e inflamaciones (Sabandar, Jaafar y Sahidin, 2013).

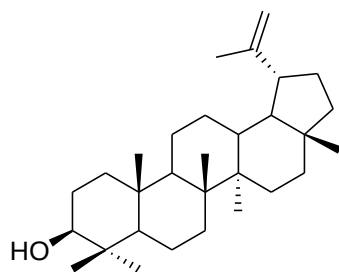
Desde el punto económico, el cultivo de varias especies, a lo largo de los años, ha sido importante debido a que son utilizadas en diferentes áreas. Por ejemplo, en la industria farmacéutica, como medicinas, el *Croton* spp. y *Jatropha* spp.; para gomas la *Hevea brasiliensis*. En la industria alimenticia, como frutas, nueces y vegetales las especies *Phyllanthus* spp., *Barcaurea* spp., *Antidesma bunius*, *Caryodendron* spp., *Sauropus androgynus* y la *Cnidoscolus chayamansa* respectivamente y como aceites se encuentran el *Ricinus communis*, *Aleurites* spp., *Sapium sebiferum* y la *Jatropha curcas* (Heller, 1996).

Composición Química

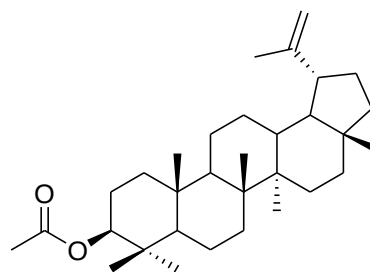
Un gran número de metabolitos secundarios se han aislado a partir de plantas de la familia Euphorbiaceae siendo algunos de los compuestos destacados por sus propiedades terapéuticas o tóxicas (Jasbbi, 2006), a continuación, se presentan de manera general algunos compuestos reportados:

Terpenoides: en las especies de la familia Euphorbiaceae se han identificado más de 55 triterpenoides (tetra y pentacíclicos), principalmente del látex, pero también presentes en otras partes de la planta como corteza, flores, hojas, raíces, etc. Algunos de ellos se encuentran libres y otros en forma de ésteres (acetatos) o glicósidos (Pascual y Correa, 1992). A partir del género *Cnidoscolus* spp. se han obtenido triterpenos (Figura 6) como el lupeol (1), acetato de lupeol (2), germanicol (3) y 3- β -acetilgermanicol (4) (Delgado, Hernández y Aguilar, 1994). Entre los componentes de látex de estas plantas se han encontrado otros triterpenos, por ejemplo, de *Euphorbia pulcherrima* se aislaron β -sitosterol (5), β -amirina (6), acetato de β -amirina (7) y cicloartenol (8).

Figura 6. Algunos triterpenos de la familia Euphorbiaceae

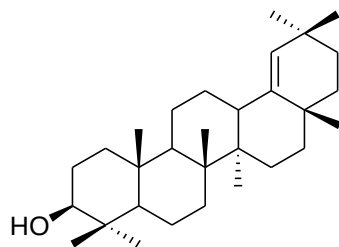


Lupeol (1)

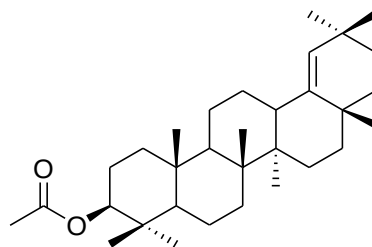


Acetato de lupeol (2)

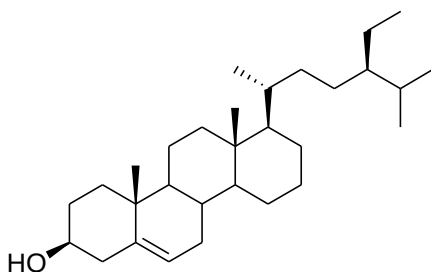
Figura 6. Algunos triterpenos de la familia Euphorbiaceae
(Continuación)



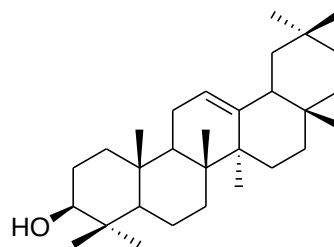
Germanicol (3)



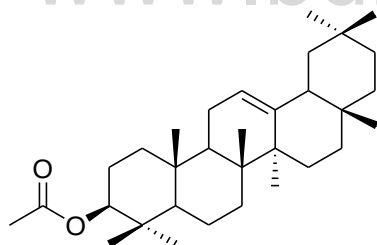
3-acetato de germanilo (4)



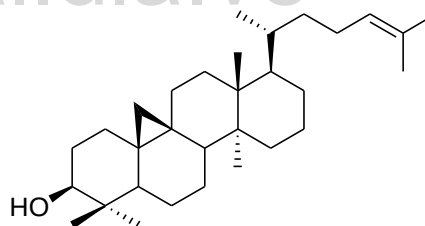
β -sitosterol (5)



β -amirina (6)



acetato de β -amirina (7)



Cicloartenol (8)

Tomado y modificado de Delgado, Hernández y Aguilar, 1994.

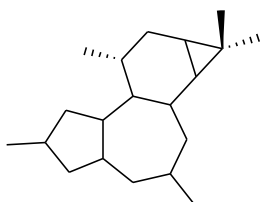
Se han encontrado diterpenoides en los tallos, hojas y látex de algunas especies de la familia Euphorbiaceae, dentro de los reportes se encuentran estructuras con una gran diversidad de esqueletos macrocíclicos y policíclicos. Algunos de estos compuestos han presentado actividad

antimicrobiana y otros han resultado tóxicos e irritantes de la piel (Rebouças, Da Silva, Groff, Nunes, Lanistcki y Ferraz, 2012).

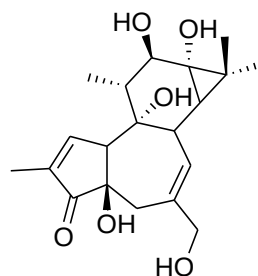
Sin embargo, en otras especies del género *Euphorbia*, los principios activos del látex producen efecto irritante y con actividad carcinogénica en piel de ratón, son principalmente, ésteres de forbol, ingenos y sus derivados (Figura 7) (Roe y Peirce, 1961). El forbol (**9**) es un polialcohol diterpénico precursor de los compuestos promotores de tumores, derivado del esqueleto básico tetracíclico denominado tigliano (**10**). Se ha informado la presencia de forboles tóxicos en diversas especies como *Sapium indicum*, *S. japonicum*, *Euphorbia frankiana*, *E. crocuescence*, *E. ticulli*, *Croton spareiflorus*, *C. tiglium*, *C. ciliatoglandulifer*, *Jatropha curcas*, *Excoecaria agallocha* y *Homalanthus nutans* (Beutler, Ada, McCloud y Cragg, 1989).

www.bdigital.ula.ve

Figura 7. Derivados diterpénicos del género *Euphorbia*



Forbol (**9**)



Tigliano (**10**)

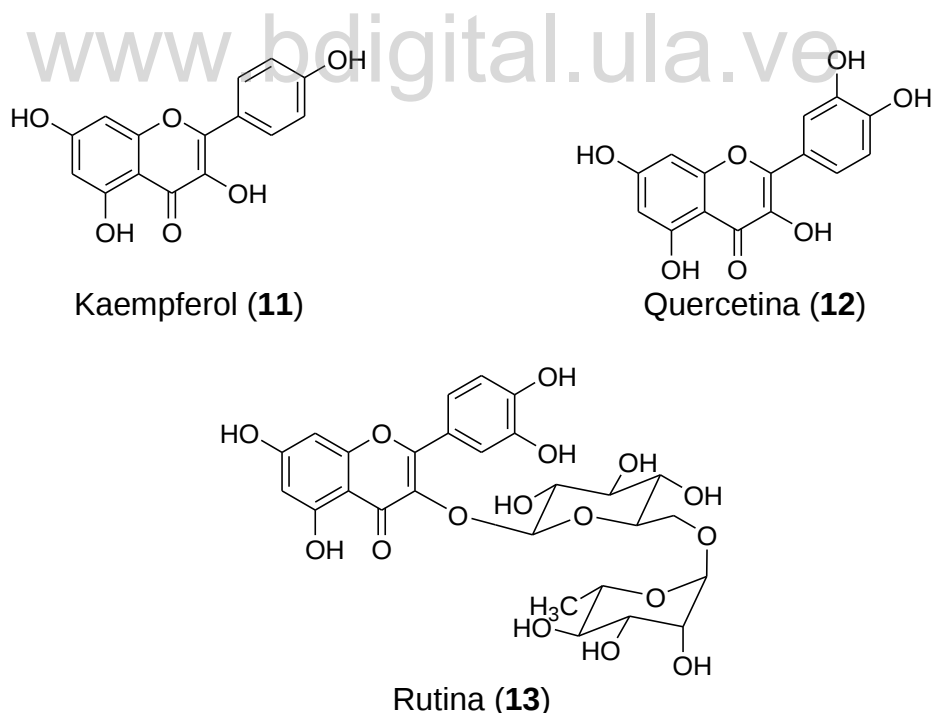
Tomado y modificado de Beutler, Ada, McCloud y Cragg, 1989

Flavonoides: la familia Euphorbiaceae es rica en flavonoides (Figura 8), particularmente flavonas y flavonoles, que se han identificado en varios

géneros. Estos se presentan como O- y C-glicósidos y como metil ésteres. También se han encontrado flavononas, pero en relativamente pocas especies. Los flavonoles comunes, kaempferol (**11**), quercetina (**12**) y rutina (**13**) son los más ampliamente distribuidos en los diferentes géneros de la familia (Bittner y col., 2001).

En *Euphorbia palustris* y *E. stepposa* se identificó robidanol (3, 7, 3', 4', 5'-pentahidroxifalveno). En *E. palustris* también se encontró robidanol-3-galactosa. De la madera del tallo de *Excoecarla agalloche* se aisló una chalcona identificada como 2', 4', 6', 4- tetrahidroxichalcona. En varias especies de *Euphorbia* se han identificado diversas antocianinas (cianidina, delphinidina y pelargonidina glucósidos).

Figura 8. Algunos flavonoides de la familia Euphorbiaceae



Tomado y modificado de Bittner y col., 2001

Alcaloides: se han detectado diversas clases de alcaloides, que se encuentran principalmente en los géneros *Croton*, *Phyllanthus* y *Securinega*. Los imidazol alcaloides sólo se han detectado en el género *Glochidion*. Las especies de *Croton* contienen varios tipos de alcaloides, isoquinolinas, morfinandienonas, quinolinas y pirrolidina (Figura 9). Los alcaloides de pirimidina y guanidina sólo se aislaron de una especie, *Alchorrea javanensis*, mientras que, los alcaloides con núcleo purina sólo se identificaron en *Jatropha basiacantha* Pax. & K. Hoffm. Varios alcaloides de quinolizidina se identificaron en la familia, pero principalmente en especies de *Phyllanthus* y *Securinega* (Salamanca, 2002).

Del estudio de la especie *Croton chilensis* se aislaron, principalmente, derivados de alcaloides del tipo morfinandienona: isosalutaridina (**14**), flavinantina (**15**), metilflavinantina (**16**) y un alcaloide aporfínico: isocoridina (**17**), por otra parte, del extracto metanólico de *Croton macrobothrys* se obtuvo la acoridina (**18**) (Motta y col., 2011).

Figura 9. Alcaloides del género *Croton* (Euphorbiaceae)

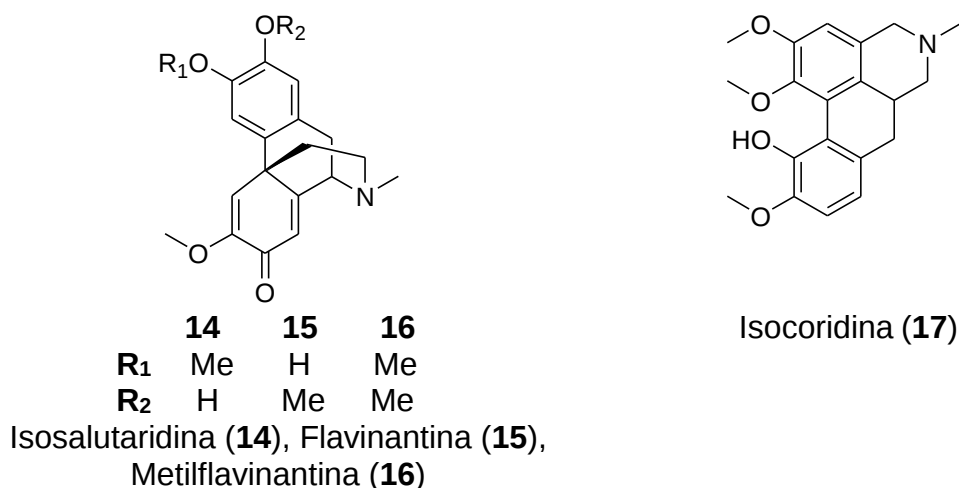
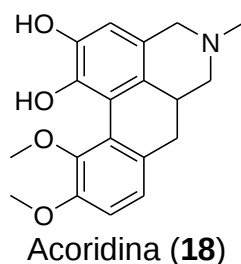


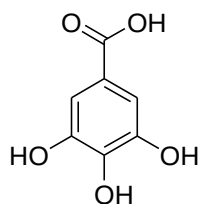
Figura 9. Alcaloides del género *Croton* (Euphorbiaceae)
(Continuación)



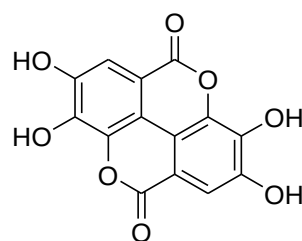
Tomado y modificado de Motta y col., 2011

Ácidos fenólicos: algunos compuestos fenólicos como el ácido gálico (19), ácido elágico (20), ácido tánico y otros ácidos fenólicos fueron identificados en las euphorbiaceas (Figura 10). Ejemplos de estos ácidos son el vanílico (21) y verátrico (22) de *Euphorbia resinífera*, ácido *p*-cumárico (23) de *Euphorbia acanthothamnus*, ácidos clorogénico (24) y neoclorogénico de *Recinus communis* y *Mercurialis perennis* y el ácido *m*-hidroxibenzóico de *Euphorbia royleana* (Motta y col., 2011).

Figura 10. Ácidos fenólicos aislados de algunas especies de la familia Euphorbiaceae.

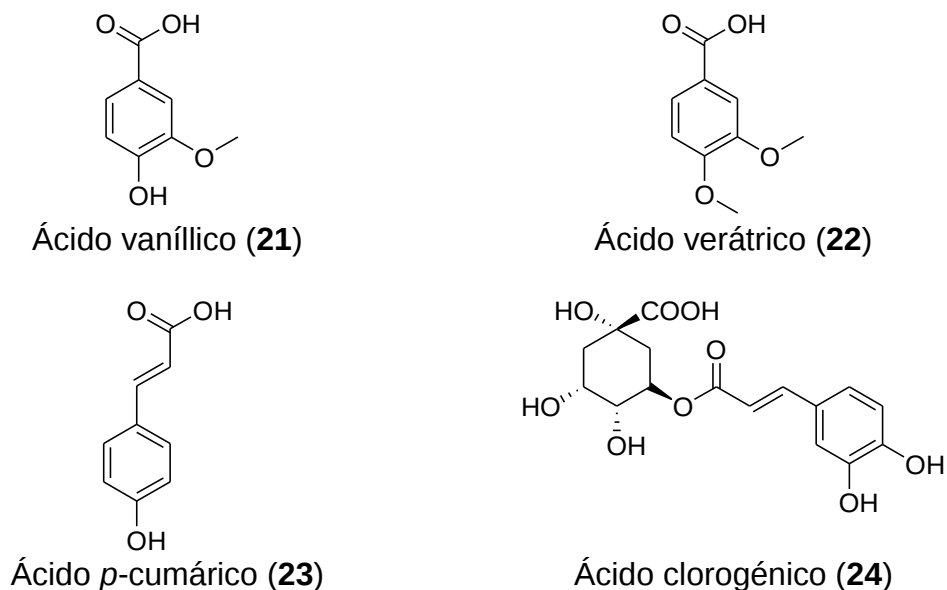


Ácido gálico (19)



Ácido elágico (20)

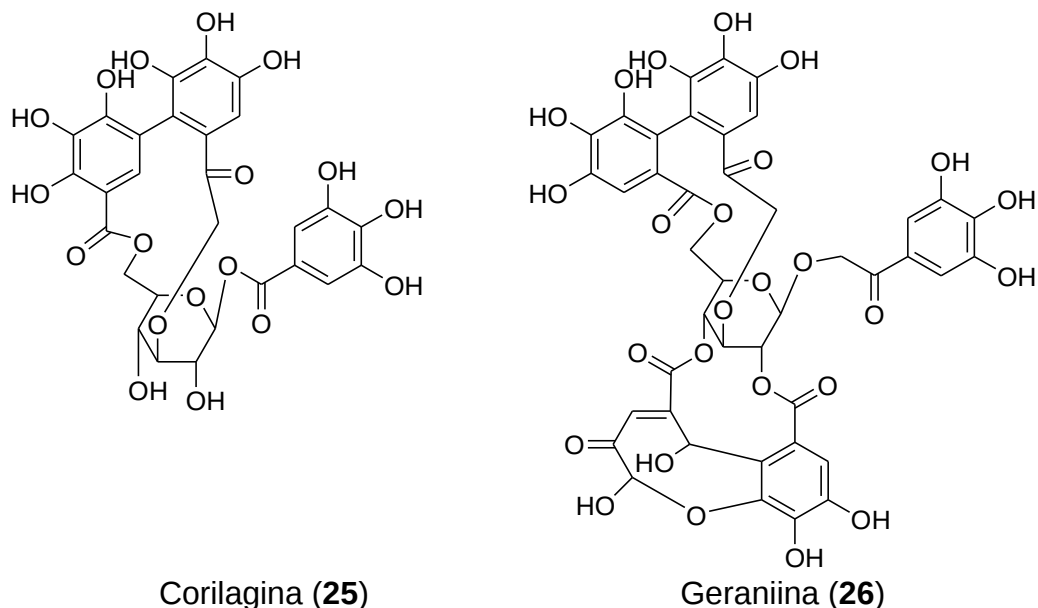
Figura 10. Ácidos fenólicos aislados de algunas especies de la familia Euphorbiaceae. (Continuación)



Tomado y modificado de Motta y col., 2011

Taninos: Algunos taninos (Figura 11) se han detectado en varias especies de las euphorbiaceas, tales como, *Euphorbia maculata*, *Gleditsia japónica*, *Mallotus japonicus*, *Phyllanthus emblica* y *Sapium sebiferum*. Por ejemplo, *Phyllanthus niruri*, se obtuvieron los ácidos gálicos (19), elágico (20) y los taninos corilagina (25) y geraniina (26) (Markoma, Hasan, Wan, Singh y Jahim, 2006).

Figura 11. Taninos obtenidos de *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae).



Tomado y modificado de Markoma y col., 2006

Glucósidos cianogénicos: varias especies de la familia Euphorbiaceae se han señalado como cianofóricas, aún que son pocos los glucósidos cianogénicos identificados, se han reportado en algunas plantas de los géneros *Euphorbia*, *Hevea*, *Jatropha*, *Manihot* y *Mercurialis* (Hill, Dominicis, Mayor, Oquendo y Sarduy, 2001).

Cumarinas: estos compuestos se han aislado de relativamente pocas especies de esta familia, sin embargo, se identificaron en las semillas de *Euphorbia lathyris* dos bicumarinas (euforbetina e isoenforbetina), de la corteza de *Mallotus japonicus* se aislaron tres derivados de bergeninas y se identificaron como 11-O-galoilbergenina, 4-O-galoilbergenina y 11-O-galoildemetilbergenina. Por otra parte, para *Euphorbia royleana* se reportan tres benzocumarinas identificadas como 7-hidrox-3,4-benzocumarina, 7-

metoxi-3,4-benzocumarina y 2, 7-dihidroxi-3,4-benzocumarina (Salamanca, 2002).

Lignanos: los lignanos han sido, hasta ahora, identificados en sólo dos géneros de la familia: *Jatropha* y *Phyllanthus*. Las hojas de *Phyllanthus niruri*, contienen filantina e hipofilantina. De igual modo, de los tallos y raíces de *Jatropha glandulifera* se aisló un cumarino-lignano que incluye una unión de tipo dioxano entre una cumarina y un fenilpropano, precursor similar al que se encontró en los flavanolignanos, similarina e hindocarpina (Salamanca, 2002).

Actividad farmacológica de la familia Euphorbiaceae

Esta familia heterogénea de plantas tiene importancia en diferentes áreas, experimentalmente numerosos trabajos resaltan la actividad de sus especies en la medicina. Como, por ejemplo, *R. communis* ha mostrado actividad insecticida y actividad contra promastigotes de *L. major*, cuando es utilizado como parte de la dieta del vector *Phlebotomus papatasi*. Por otra parte, extractos o componentes del látex de *Euphorbia splendens* han presentado actividad contra los moluscos hospederos intermediarios de los esquistosomas; siendo según sus autores uno de los más potentes y específicos molusquicidas descubiertos hasta la fecha, asimismo, extractos de *Euphorbia prostrata* han mostrado actividad antiinflamatoria, antiglicemiante, insecticida y antihelmíntica y especies del género *Croton* han presentado propiedades antiinflamatorias, antitumorales, leishmanicidas y antimalárica (Neira, Stashenko y Escobar, 2014).

Por otra parte, Mongalo, Opoku y Zobolo (2013), ensayaron los extractos de acetona, metanol y acetato de etilo de hojas y raíces de *Jatropha zeyheri*, contra 14 cepas bacterianas patógenas humanas, utilizando el método de difusión en disco. Los extractos de acetato de etilo exhibieron actividad contra 11 de las cepas seleccionadas y mostraron una zona de inhibición de 10,7 mm contra *Klebsiella pneumoniae*. La mayor zona de inhibición fue de 12 mm se obtuvo con el extracto de las hojas de acetona contra *Enterobacter cloacae* y *Acinetobacter calcoaceticus* y el extracto de metanol de las hojas contra *Enterococcus faecalis*. El extracto de acetona de la raíz exhibió una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 0,39 mg/mL contra *Salmonella* spp, seguido de extractos de la raíz de metanol y acetona (0,78 mg/mL) contra *Serratia marcescens*. El extracto metanólico de las hojas exhibió un CIM de 3,13 mg/mL contra *Staphylococcus aureus*. Este estudio valida el uso de *Jatropha zeyheri* en el tratamiento de diversas enfermedades.

De igual modo, la actividad antiviral está demostrada para *Croton lechleri* y *Phyllanthus niruri*, esta última fue efectiva contra los virus VIH, Hepatitis B y es considerada como hepatoprotectora y contra la Hepatitis C (virus HCV), además posee potencial actividad inmunomodulante. Mientras que la especie *Croton lechleri* mostró actividad antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana, antitumoral, antidiarréica, antifúngica y antiviral mostrando actividad contra la diarrea producida por el virus VIH, contra la influenza y parainfluenza, el virus del herpes simplex I y II, contra la Hepatitis A y B y contra el herpes genital en pacientes con SIDA (Vaisberg y col., 1989; Williams, 2001; Nisar, He, Ahmed, Yang, Li y Wan, 2018).

Toxicidad de la familia Euphorbiaceae

La concentración de toxinas en las diferentes especies de plantas dependen de varios factores que incluyen: estrés ambiental al que es sometida la planta, la edad, la susceptibilidad individual, el órgano de la planta que es consumido (raíz, tallo, hojas y semillas), y la temporada del año; mientras que el efecto de la toxicidad de cada especie depende de: el organismo expuesto, la fuerza de la toxina, el tiempo de exposición, el clima, el suelo, la cantidad que se consume y las diferencias genéticas dentro de la especie de planta. Algunas de las toxinas pueden producir daños irreparables a los depredadores, mientras que otras ejercen efectos transitorios (Rakshit, Devappa y Klaus, 2010).

La familia Euphorbiaceae es conocida por el alto potencial tóxico que tienen varias de sus especies, esto se debe a la complejidad de muchos de sus compuestos bioquímicos, que son perjudiciales para una gran variedad de especies que incluyen bacterias, hongos, insectos y humanos (Webster, 1986; Rakshit y col., 2010). La diversidad de compuestos bioquímicos que poseen son especialmente ricos en alcaloides y terpenoides que son en ocasiones promotores de la toxicidad de la planta; esta diversidad de sustancias son el resultado de la selección natural a través del tiempo para impedir el ataque de animales herbívoros (Webster, 1986; Rakshit y col., 2010; Worbs, Kölher, Pauly, Avondet y Schaer, 2011).

En algunas especies del género *Euphorbia* y algunos otros géneros de la subfamilia Euphorbioideae, se ha encontrado que las resinas son muy tóxicas y potencialmente cancerígenas en animales a causa de las concentraciones de los diterpenos. Las semillas de *Croton*, *Euphorbia*, *Jatropha*, y *Ricinus* presentan actividades purgantes. Se ha reportado

envenenamiento en humanos y ganado por ingerir plantas de la familia Euphorbiaceae que incluyen los géneros: *Excoecaria*, *Hyaenanche*, *Manihot*, y *Sapium* (Hecker y Schmidt, 1974; Rakshit y col., 2010).

En la literatura se encuentran diversos ejemplos de especies de la familia Euphorbiaceae utilizadas en medicina popular (Beyra y cols, 2004; Muthu, Ayyanar, Raja, Ignacimuthu, 2006), muchas de éstas especies se han clasificado como tóxicas (Webster, 1986). La actividad biológica de extractos y compuestos de algunas especies contrasta su toxicidad con sus propiedades terapéuticas. Varias especies de la familia Euphorbiaceae son importantes como fuentes de medicamentos, por ejemplo, algunos diterpenoides son potencialmente perjudiciales y otros presentan un potencial terapéutico como antihipertensivos, antirretrovirales, anti-inflamatorios, fármacos analgésicos y antibacterianos. Además, a estas propiedades, estos compuestos pueden funcionar como antioxidantes, alucinógenos, y edulcorantes, y pueden estimular la contracción de del útero (Kapil, Coul, Banergee, Gupta, 1993; Bruneton, 1999; Niu, Li, Zhao y Lin, 2002; Kumari y col., 2003).

Género *Phyllanthus*

Phyllanthus es uno de los géneros más grandes de la familia Phyllanthaceae (anteriormente Euphorbiaceae), con 11 subgéneros que comprende más de 700 especies bien conocidas y su distribución es cosmopolita, principalmente en los trópicos y subtrópicos, las especies más importantes utilizadas tradicionalmente para el tratamiento de diversas dolencias humanas pertenecen a los subgéneros *Cicca*, *Kirganelia* y

Phyllanthus. Las plantas de este género han sido usadas en formulaciones a base de hierbas durante siglos en muchos países del sudeste asiático, Brasil, India y China (Nisar y col., 2018), seguidamente se presentan los aspectos botánicos, químicos y farmacológicos más resaltantes de este género:

Aspectos botánicos

El género *Phyllanthus* tiene una notable diversidad de formas de crecimiento que incluyen plantas herbáceas anuales, perennes, arborescentes, trepadoras y acuáticas flotantes. Las hojas son estipuladas simples, alternas, sésiles o brevemente pecioladas, con lámina entera. Las flores estaminadas, poseen entre 3-6 estambres libres entre sí. Las flores pistiladas generalmente con un disco anular en la base del ovario, 3 carpelos con un lóculo 2 óvulos en cada uno; estilo trifido. La cápsula tricoca, con cada carpelo bilobulado y con 2 semillas lisas o diversamente estriadas, albuminadas y sin carúncula basal (Webster, 1955; Hunziker, 1967).

Phyllanthus, comprende más 700 especies, su distribución es cosmopolita, principalmente en los trópicos y subtrópicos, como África tropical, América tropical, Asia y Oceanía. Linneo describió este género por primera vez en 1737, se subdivide en 11 subgéneros (*Isocladius*, *Kirganelia*, *Cicca*, *Emblica*, *Conani*, *Gomphidium*, *Phyllanthodendron*, *Xylophylla*, *Botryanthus*, *Ericocus*, *Phyllanthus*). Las 24 especies más populares pertenecen principalmente a los subgéneros *Kirganelia*, *Cicca* y *Phyllanthus*, son utilizadas en la medicina tradicional en diferentes naciones (Unander, Webster y Blumberg, 1995; Mao y col., 2016), taxonómicamente se clasifica de la siguiente manera (trópicos.org):

- ✓ **Reino:** Plantae
- ✓ **División:** Magnoliophita
- ✓ **Clase:** Magnoliopsida
- ✓ **Familia:** Phyllanthaceae
- ✓ **Género:** *Phyllanthus*

Usos etnobotánicos

Numerosas especies de *Phyllanthus* se han utilizado en la medicina tradicional para tratar enfermedades como paperas, viruela, peste bovina, varicela, herpes, dengue, gripe y erupciones cutáneas, posiblemente de origen viral (Unander y col., 1995; Thyagarajan, Thirunalasundari, Subramanian, Venkateswaran y Blumberg, 1988). Se han atribuido varias propiedades terapéuticas a este género, como antipirético, antibacteriano (Vinayagamoothy, 1982), antiparasitario (Omukokoli, Khan y Chabra, 1997), antinociceptivo (Filho y col., 1996) y actividades antivirales (Ott, Thyagarajan y Gupta 1997).

Según Roig (1974), en la India las especies de este género se usaban contra afecciones venéreas. Las raíces, después de raspada o molinada en leche de vaca, han sido utilizadas con éxito para curar la ictericia, como tónico, antidiabética y contra cólicos nefríticos. Específicamente los frutos de *P. emblica* son empleados como purgantes, en otros casos como remedio refrescante en las afecciones biliares, en las náuseas y en infusiones contra la fiebre y la diabetes.

En Brasil, las infusiones de hojas, tallos y raíces de *P. niruri*, *P. urinaria*, *P. corcovadensis*, *P. amarus*, *P. tenellus*, *P. caroliniensis* y *P. sellowianus*, son utilizadas para el tratamiento de disfunciones renales y

urinarias, infecciones intestinales, diabetes y hepatitis B (Morton, 1981; Oliver, 1983; Unander, Webster y Blumberg, 1992; Calixto, Adair, Valdir y Rosendo, 1998). La decocción de algunas plantas del género, en América Central y las Antillas se utiliza como depurativa y diurética. En el caso particular de *P. acidus*, las hojas son consideradas sudoríficas, diaforéticas, las semillas son catárticas y la raíz es un purgante violento (Roig, 1974; Morton, 1981).

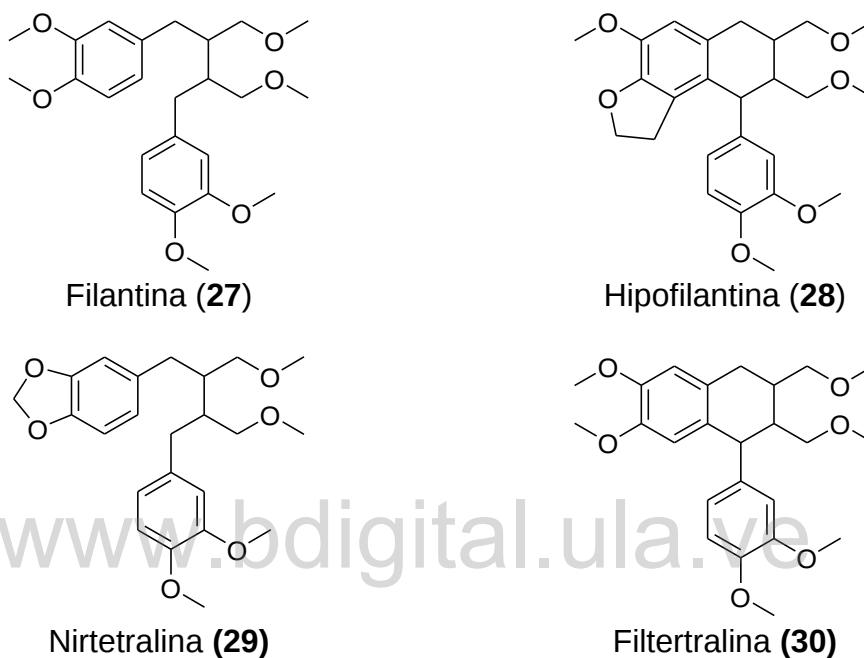
Composición química

Las especies del género *Phyllanthus* han sido extensamente estudiadas desde el punto de vista fitoquímico, conduciendo la investigación al aislamiento y caracterización de muchas clases de metabolitos secundarios como fenilpropanoides, terpenoides, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, alcaloides, glucósidos, taninos y saponinas (Mao y col., 2016; Calixto y col., 1998). A continuación, se mencionan algunos compuestos obtenidos de este género:

Fenilpropanoides: los fenilpropanoides constituyen la clase de compuestos más prevalentes en el género *Phyllanthus*, se han aislado lignanos, neolignanos, norlignanos y sesquinelignanos (**27-30**, Figura 12) en *P. glaucus* (Wu y col., 2016), *P. amarus* (Pereira, García, Rodríguez y Martínez, 2016) *P. urinaria* (Muthusamy, Prasad, Sanjay, Rao y Satyamoorthy, 2016) y *P. brasiliensis* (Borges y col., 2018). Del grupo de los lignanos se destacan la filantina (**27**) (Satyanarayana Subrahmanyam y Viswanatham, 1988) y la hipofilantina (**28**); los mismos han sido identificados por cromatografía líquida de alta resolución en especies como *P. amarus*, *P. fraternus*, *P. niruri*, *P. urinaria*, *P. maderaspatensis*, *P. virgatus* y se

consideran marcadores químicos del género (Dhalwa, Biradar y Rajani, 2006; Murugaiyah y Chan, 2007).

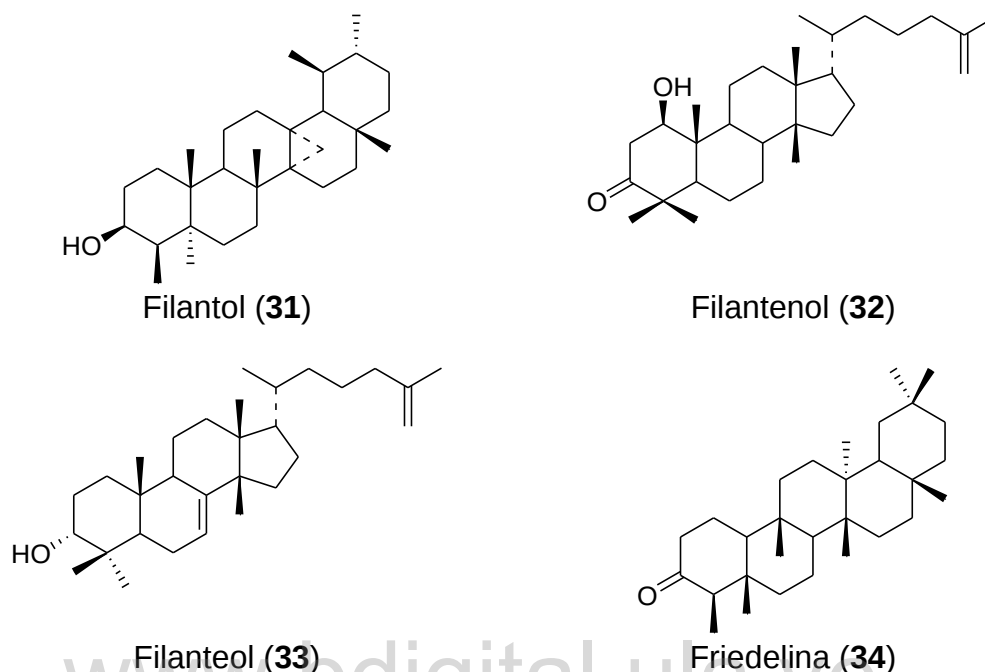
Figura 12. Algunos fenilpropanoides del género *Phyllanthus*



Tomado y modificado de Dhalwa y col., 2007.

Terpenoides: Los terpenoides (triterpenos, diterpenos, monoterpenos y esteroides) son otra clase importante de productos químicos en el género *Phyllanthus*. Se han reportado en *P. hainanensis* (Fan y col., 2017), *P. urinaria* (Wu y col., 2017) y *P. acidus* (Duong y col., 2017), pudiendo destacar los triterpenos pentacíclicos lupeol (**1**) y filantol (**31**), sin restarle importancia a los esteroides β -sitosterol (**5**) y estigmasterol, presentes también en muchas especies y muy abundantes en la naturaleza (Nisar y col., 2018). En la figura 13 se presentan algunos triterpenos aislados de *Phyllanthus* (**31-34**).

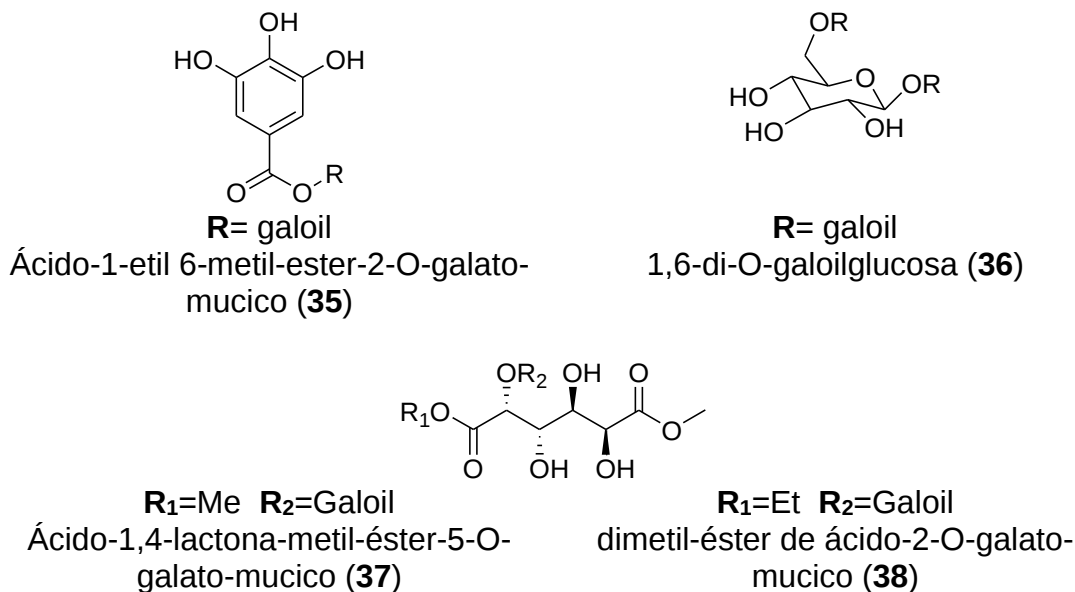
Figura 13. Triterpenos aislados de algunas especies de *Phyllanthus*



Tomado y modificado de Nisar y col., 2018

Compuestos fenólicos: Varios compuestos fenólicos han sido reportados para *Phyllanthus* (Figura 14), por ejemplo, de los frutos de *P. emblica* (Zhang y col., 2017); se obtuvo un nuevo metabolito llamado ácido-1-etil-6-metil-éster-2-O-galato-mucico (**35**), junto con otras sustancias fenólicas conocidas como el ácido gálico (**19**), ácido elágico (**20**), 1,6-di-O-galoilglucosa (**36**), ácido-1,4-lactona-metil-éster-5-O-galato-mucico (**37**), y el dimetil-éster de ácido-2-O-galato-mucico (**38**). Por otra parte, de *P. muellerianus* y *P. niruri* se obtuvieron los gallotaninos corilagina (**25**) y geraniina (**26**) respectivamente (Boakye-Gyasi, Kasange, Biney, Boadu-Mensah, Agyare y Woode, 2016; Zhao, Liu y Chen, 2016).

Figura 14. Compuestos fenólicos de varias especies de *Phyllanthus*



Tomado y modificado de Boakye y col., 2016; Zhao y col., 2016.

Flavonoides: algunos flavonoides como el kaempferol (**11**) y sus glicósidos han sido aislados de *P. acidus* (Tram, Son, Thao y Cuong, 2016), asimismo, la quercetina (**12**) y rutina (**13**) se ha reportado en *P. niruri* y *P. amarus* (Putakala, Gujjala, Nukala, Bongu, Chintakunta y Desiredy, 2017), por otra parte, dos chalconas denominadas emblirol A y B se obtuvieron de *P. emblica* (Yan, Han, Zhang y Feng, 2017).

Actividad biológica

Los diversos usos tradicionales del género *Phyllanthus* han estimulado las investigaciones de actividades biológicas, como antivirales, antioxidante, antidiabético, anticancerígeno e inmunomodulador (Nisar y cols, 2018). A

continuación, se presentan algunas actividades que han sido reportadas para varias especies de este género:

Actividad antiviral: varias plantas de *Phyllanthus* tienen un fuerte potencial antiviral contra el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), citomegalovirus (CMV), virus del herpes simple (VHS) y el virus de hepatitis B (VHB). El extracto acuoso de *P. emblica* redujo la carga viral del VIH significativamente a una dosis de 400 µg/mL (Bothiraja, Shinde, Rajalakshmi, Pawar, 2011). Asimismo, se determinó la actividad viral anti-hepatitis B *in vitro* de las fracciones de etanol *P. niruri* y resultó que inhibieron con éxito el crecimiento de células de carcinoma hepato celular humano (HepG2/C3A) infectadas con VHB. De igual modo, *P. amarus* se ha usado tradicionalmente para tratar una variedad de enfermedades incluyendo trastornos hepáticos debido a la presencia de compuestos virales antihepáticos como la fililantina e hipofilantina. Por otra parte, el extracto acuoso de *P. orbicularis* produjo la inhibición de la replicación del CMV, VHB y VHS a concentraciones medias de 57,7; 28,8; 25,7 y 21,3 µg/mL, respectivamente (Mao y col., 2016).

Actividad antioxidante: los extractos metanólicos y acuosos de este género tienen una notable actividad antioxidante, que puede correlacionarse con las composiciones elevadas en compuestos fenólicos. El extracto de metanol de *P. debilis* mostró una fuerte actividad antioxidante cuando se evaluó por varios ensayos, además, estudios posteriores demostraron que la cantidad de fenoles totales se correlacionó con la actividad antioxidante. Adicionalmente el extracto hidrometanólico de *P. virgatus* exhibió sustancialmente capacidad antioxidante con una concentración media de 30,4 µg/mL (Poompachee y Chudapongse, 2011). *P. acidus*, *P. polyphyllus* y *P. fraternus* mostraron una notable actividad hepatoprotectora contra la

toxicidad hepática que fue inducida por acetaminofen, tetracloruro de carbono, bromobenceno y tioacetamida (Kumaran y Karunakaran, 2007; Rajkapoor, Venugopal, Anbu, Harikrishnan, Gobinath y Ravichandran, 2008; Gopi y Setty, 2010; Jain y Singhai, 2011).

Actividad antidiabética: varias especies de *Phyllanthus* como *P. emblica*, *P. reticulatus*, *P. niruri*, *P. amarus*, *P. urinaria*, *P. acidus*, *P. debilis*, *P. virgatus*, *P. sellowianus*, *P. rheedii*, *P. orbicularis*, y *P. hookeri* se emplean tradicionalmente en muchos países para la diabetes. Investigaciones recientes revelan el efecto hipoglicemiante de *P. emblica*, *P. niruri*, *P. reticulatus*, *P. sellowianus*, *P. virgatus*, y *P. simplex* (Mao y col., 2016).

Actividad antiinflamatoria: en los últimos años, se han realizado diferentes pruebas para evaluar el efecto antiinflamatorio de *Phyllanthus*, el extracto acuoso de *P. amarus*, disminuyó los índices de artritis, articulación el diámetro y el volumen de la pata, así como los umbrales de hiperalgesia mecánica y nociceptivo se incrementaron (Mali, Sinnathambi, Kapase, Bodhankar y Mahadik, 2011), también se reporta que la fracción de etanol de *P. simplex* mejoró los parámetros de edema de la pata y granuloma y sustancialmente inhibió la producción de óxido nítrico (Chouhan y Singh, 2011).

Actividad antibacteriana: los extractos de *P. niruri*, produjeron la inhibición del 65 % del crecimiento del *Mycoplasma galisepticum*, por lo cual se sugiere que puede ser utilizado como alternativa terapéutica para el tratamiento de la enfermedades respiratorias producidas por esta bacteria, adicionalmente se ha demostrado que dichos extractos son activos frente a *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, los triterpenoides activos en el extracto de

cloroformo de la corteza de *P. niruri* poseen una fuerte actividad antibacteriana e inhiben el crecimiento de *S. aureus* a una concentración de 1000 ppm, evidenciada por un halo de inhibición de 12 mm. De igual modo, los extractos de las hojas de *P. amarus* mostraron efectos inhibitorios sobre *Streptococcus pyrogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* (Nisar y col., 2018).

Phyllanthus acidus

Phyllanthus acidus es una planta usada en la medicina tradicional para tratar diversas afecciones como catártico, emético, tos, hipertensión, asma y enfermedades de la piel (Hossen y col., 2015) a continuación se presenta una revisión que refleja la importancia etnobotánica, química y biológica de esta especie, se muestran algunos datos relacionados con los trabajos científicos realizados con la planta y los compuestos bioactivos aislados de la misma.

Aspectos botánicos

Phyllanthus acidus es una hierba pequeña ramificada erecta anual, 10-50 cm de alto 18-20. Es completamente verde, incluidas las flores. Las hojas son simples, oblongas, agudas u obtusas, ligeramente oblicuas de 14 mm de largo y 6 mm de ancho y llevan las flores discretas en pares en sus axilas. Cada par de flores se compone de un macho y una hembra. La cápsula es un globo globoso aplanado de aproximadamente 2 mm de diámetro ver Figura 15 (Jagessar, Mars, Gomes, 2008). La clasificación taxonómica se presenta a continuación (trópicos.org):

- ✓ **Reino:** Plantae
- ✓ **Subreino:** Tracheobionta
- ✓ **Superdivisión:** Spermatofita
- ✓ **División:** Magnoliofita
- ✓ **Clase:** Magnoliopsida
- ✓ **Familia:** Phyllanthaceae (anteriormente Eupobiaceae)
- ✓ **Género:** *Phyllanthus*
- ✓ **Especie:** *Phyllanthus acidus*

Figura 15. Árbol y frutos de *Phyllanthus acidus*



Tomado y modificado de <https://www.alamy.es/imagenes/phyllanthus-acidus.html>

Usos Etnobotánicos

Phyllanthus acidus se conoce comúnmente como grosella, es un árbol bastante común que se encuentra distribuido en los trópicos, es utilizado en la medicina tradicional para los trastornos del tracto gastrointestinal, en el

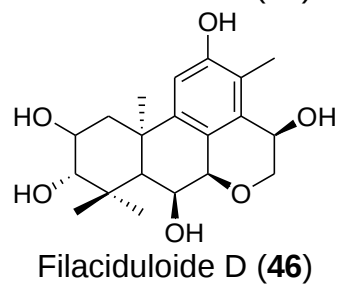
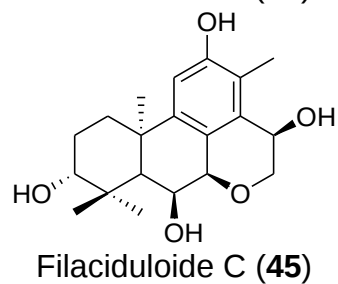
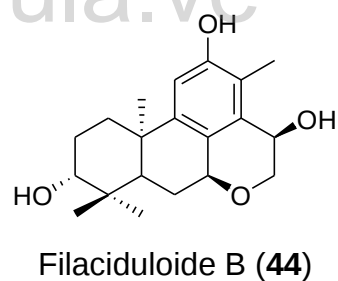
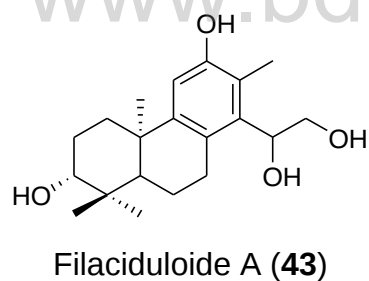
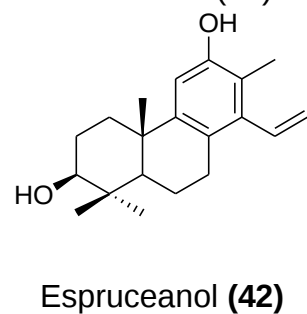
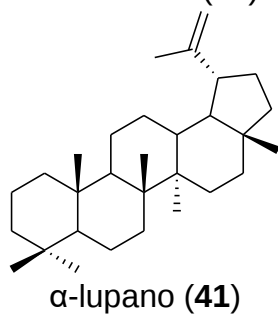
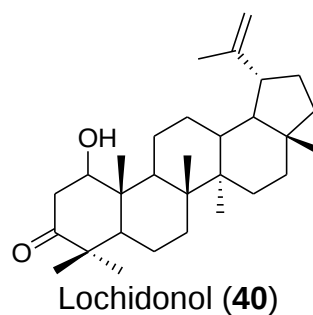
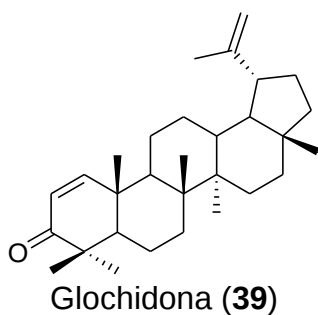
tratamiento de condiciones dolorosas, estrés inflamatorio y oxidativo. Las hojas trituradas de *P. acidus* se usan en el tratamiento del lumbago y el reumatismo. La raíz es significativamente purgante y se usa para tratar la psoriasis. El jugo de la corteza de la raíz se utiliza como agente de bronceado en la India (Wahed, Islam, Alam y Yasmin, 2014). Los frutos contienen altos contenido de vitamina C y se han utilizado para mejorar la vista y memoria, prevenir la diabetes y aliviar la tos (Unander, Webster y Blumberg, 1990).

Composición química

Estudios previos de *Phyllanthus acidus* revelan la presencia triterpenos, fitosteroles, compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides y sesquiterpenos del tipo norbisabolenos (Calixto y col., 1997; Leeya, Mulvany, Queiroz, Marston, Hostettmann y Jansakul, 2010; Ly y col., 2014). A continuación, se mencionan algunos compuestos aislados de esta especie:

Terpenoides: diversos compuestos de este tipo se han obtenido de *P. acidus* (Figura 16), tal como lo reportan Huy, Hung, Tuyet y Hao (2018), quienes aislaron 6 triterpenos del extracto etanólico de las raíces de esta planta, así lograron caracterizar el filantol (**31**), glochidona (**39**), lupeol (**1**), lochidonol (**40**), α -lupano (**41**) y espruceanol (**42**). De igual modo, Zheng y col (2018) trabajaron con el extracto metanólico de las raíces y tallos de *P. acidus* obteniendo 4 diterpenos que denominaron filaciduloides A-D (**43-46**).

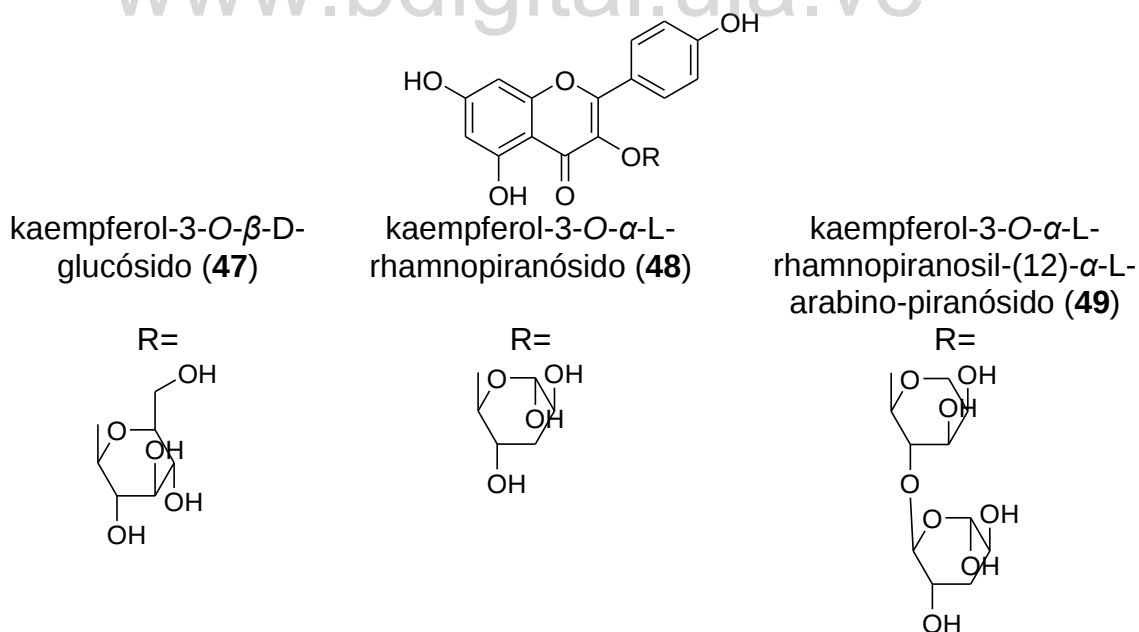
Figura 16. Algunos terpenoides obtenidos de *P. acidus*



Tomado y modificado de Huy y col., 2018.

Flavonoides: varios flavonoides han sido reportados de diversas partes de la planta de *P. acidus*, Tram y col (2017) trabajaron con el extracto de acetato de etilo de esta especie y lograron el aislamiento y caracterización estructural de 7 flavonoides glicosidados que identificaron como kaempferol-3-O-[α -L-rhamnopyranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- β -D-galactopiranosido, kaempferol-3-O-(2- α -L-rhamnopyranosil)- β -D-glucuronopiranosido, kaempferol-3-O-(2- α -L-rhamnopyranosil)- β -D-glucuronopiranosil-metil-ester, isoquercitrina, quercitrina, miricitrina y rutina (13). Asimismo, Tram, Son, Thao y Cuong (2016) obtuvieron del extracto metanólico de las hojas de *P. acidus* el kaempferol (11), y algunos de sus glicósidos, como el kaempferol-3-O- β -D-glucósido (47), kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranósido (48) y el kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosil-(12)- α -L-arabino-piranosido (49) (Figura 17).

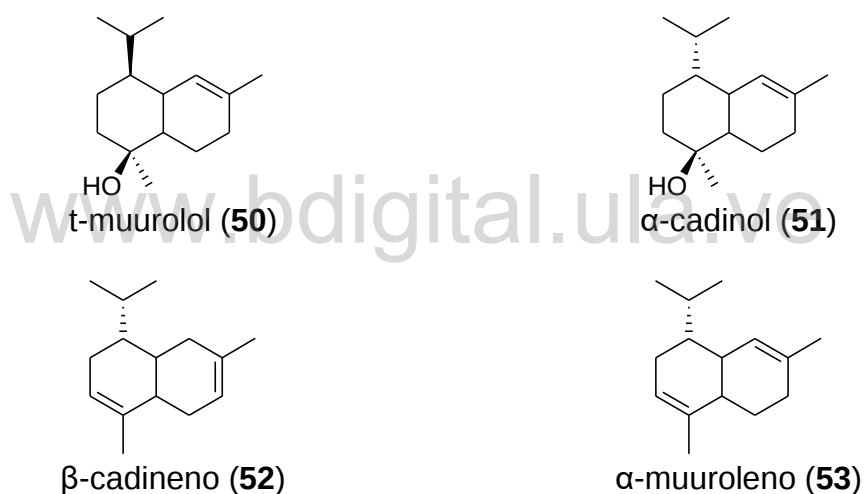
Figura 17. Flavonoides aislados de *P. acidus*



Tomado y modificado de Tram y col., 2016.

Componentes volátiles: el aceite esencial de las hojas de *P. acidus* fue obtenido por hidrodestilación y su composición química reporta como componentes mayoritarios (Figura 18) el t-muurolol (20,4 %) (**50**), α -cadinol (14,6 %) (**51**), β -cadineno (8,9 %) (**52**) y α -muuroleno (7,5 %) (**53**) (Pérez, Obregón, Rojas, Aparicio, Carmona y Usubillaga, 2018). Por otra parte, los análisis de los constituyentes volátiles de los frutos indican que los terpenos (100,1 mg/Kg) y ácidos grasos (6,7 mg/Kg) son los componentes más abundantes (Pino, Cuevas, Marbot y Fuentes, 2008).

Figura 18. Componentes volátiles reportados para *P. acidus*



Tomado y modificado de Pérez, Obregón, Rojas, Aparicio, Carmona y Usubillaga, 2018.

Actividad biológica

La actividad biológica de *P. acidus* ha sido estudiada por diversos investigadores a nivel mundial, destacándose por exhibir efectos antioxidantes, antiinflamatorios, antinociceptivos y antibacterianos, seguidamente se presentan algunos estudios realizados sobre esta especie:

La actividad antioxidante del extracto de cloroformo de los frutos de *Phyllanthus acidus* se evaluó usando 1,1-difenil-2-picrilhidracilo radical (DPPH), se encontró que el valor de la concentración inhibitoria media (CI₅₀) fue de 2745,86 µg/mL en comparación con el ácido ascórbico de 13,37 µg/mL. La actividad antibacteriana del extracto de la planta se llevó a cabo utilizando el método de difusión de disco con once bacterias patógenas. Este extracto mostró un espectro bajo de actividad frente a *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Sarcina lutea* en concentraciones de 500 µg/mL en comparación con la kanamicina estándar. El rango de zona de inhibición del extracto de cloroformo fue de 0,5 a 2,5 mm (Habib, Rahman, Mannan, Zulfiker, Uddin y Sayeed, 2011).

Por otra parte, Rahman, Habib, Hasanb, Sayeeda y Rana (2011), analizaron el extracto metanólico de los frutos de *P. acidus* y determinaron la actividad antibacteriana frente a 13 bacterias patógenas (*Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Sarcina lutea*, *Shigella sonnei*, *Bacillus megaterium*, *Proteus sp*) mediante el método de difusión en agar, las concentraciones evaluadas del extracto fueron de 400 y 800 µg/mL, los halos de inhibición variaron entre 8-12 mm contra *B. megaterium* y *B. subtilis* *S. typhi* y *S. dysenteriae*. Por otra parte, la actividad antioxidante determinada por el método del DPPH, presentó una CI₅₀ de 2063,42 µg/mL en comparación con el ácido ascórbico de 52 µg/mL.

De igual modo, se reporta la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la corteza de *P. acidus*, por el método de difusión en agar en disco, frente a microorganismos grampositivos (*Bacillus megaterium*, *Bacillus*

subtilis, *Staphylococcus aureus*) y gramnegativos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*), presentando actividad significativa solo contra bacterias gramnegativas como *E. coli* ($19,25 \pm 0,54$ mm), *S. typhi* ($32,08 \pm 0,51$ mm) y *Vibrio cholerae* ($16,42 \pm 0,42$ mm) a una concentración de 500 µg/mL. Los resultados obtenidos mostraron una fuente potencial de compuestos biológicamente activos que pueden usarse como agentes antibacterianos (Biswas, Chowdhury, Das, Karmakar, Shill y Raihan, 2011).

Adicionalmente, evaluaron los extractos de éter, acetato de etilo y metanol de las hojas de *P. acidus*, demostrando que presentan importantes actividades antiinflamatorias y analgésicas de manera dosis-dependiente. El extracto de metanol a una dosis de 500 mg/kg mostró una actividad superior que era comparable con los medicamentos estándar, mientras que el extracto de acetato de etilo presentó actividad moderada y el extracto de éter de petróleo exhibió menor actividad (Chakraborty, Biplabb, Devannac y Sen, 2012).

Bacterias

Pertenecen al grupo de organismos considerados como procariotas, carecen de un núcleo limitado por una membrana y de mitocondrias entre otras características. Sin embargo, tienen una estructura superficial compleja que rodea a la membrana celular y le da rigidez, por lo que se le denomina “pared celular bacteriana”. Su membrana proporciona una barrera osmótica y de transporte activo que mantiene las concentraciones de iones apropiadas evitando su rotura con los cambios de iones (Castro, 2014).

Estas suelen presentar diversas formas; la forma de bastón de los bacilos, la forma esférica u oval de los cocos y la forma de tirabuzón o curva de los espirilos son las más comunes, pero algunas bacterias presentan formas estrelladas o cuadradas. Las bacterias individuales pueden formar pares, cadenas, racimos u otros agrupamientos; estas formaciones suelen ser características de un género o especie de bacteria en particular (Tortora, Funke y Case 2007). En microbiología, las bacterias se pueden clasificar en dos grandes grupos según la estructura de la pared celular: las bacterias grampositivas y las bacterias gramnegativas (Spicer, 2009).

Bacterias gramnegativas

Son aquellas bacterias que no se tiñen de violeta por la tinción de Gram, y lo hacen de un color rosado tenue. La característica clave que diferencia una bacteria gramnegativa de una bacteria grampositiva, es la composición y estructura de la pared celular. Estas bacterias están formadas por dos membranas lipídicas, una interna (citoplasmática) y otra externa, con un espacio entre ellas denominado espacio periplasmático. En dicho espacio, se dispone una capa de una sustancia llamada peptidoglicano, la cual es más delgada que en grampositivas (Spicer, 2009). Las cepas gramnegativas que se utilizaron para llevar a cabo este estudio son: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*.

Klebsiella pneumoniae

Es la especie de mayor relevancia clínica dentro del género bacteriano *Klebsiella*, que además desempeña un papel importante como causa de las enfermedades infecciosas oportunistas. Es un bacilo que fermenta la lactosa, la mayoría produce colonias sumamente mucoides en placas, debido a la

producción de polisacáridos abundantes. Todas son inmóviles e indol negativas y son característicamente resistentes a múltiples antibióticos. Además de la resistencia natural de este microorganismo a la ampicilina y a la carbenicilina (García, 2005).

Pseudomonas aeruginosa

Es un bacilo gramnegativo, oxidasa positiva y puede crecer a temperaturas superiores a 42 °C. Las cepas de esta especie presentan un característico color verde brillante, debido a la producción de pigmentos piocianina, de color azul, y pioverdina, de color amarillo fluorescente, los cuales juntos le dan dicha coloración. Es un habitante común de agua, suelos y plantas. En los hospitales pueden ser encontrados en respiradores, humidificadores, verteros, duchas, piscinas de hidroterapia y ocasionalmente en las manos de los trabajadores de la salud. Es un patógeno oportunista, responsable de una alta gama de infecciones, principalmente nosocomiales (Lujan, 2014).

Escherichia coli

Es el microorganismo de vida libre que mejor se ha estudiado. Son bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, fermentadores y oxidasa negativa. Pueden ser móviles la mayoría o inmóviles, son parte de la familia Enterobacteriaceae. La mayor parte de ellas fermentan la lactosa y son capaces de producir indol a partir de triptófano (García, 2005).

Bacterias grampositivas

Son aquellas que poseen una pared celular interna y una pared de peptidoglucano, ésta última forma el exoesqueleto que da consistencia y forma esencial para la replicación y supervivencia a la bacteria. No poseen membrana externa, presentan aproximadamente 25 láminas de glicano de 20 a 80 nm de grosor, está compuesta por otras sustancias como ácidos teicóicos y lipoteicóicos. Se tiñen de color morado, ya que retienen el colorante. Estas bacterias son más sensibles a los antibióticos que las gramnegativas (Murray, 2009). Las cepas que se utilizaron para llevar a cabo este estudio son: *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*.

Staphylococcus aureus

Son cocos grampositivos, con un diámetro de 0,5 a 1,5 μm ; están agrupados formando racimos de uvas. Estas son bacterias inmóviles, no esporuladas y no poseen cápsula, además son anaerobias facultativas. La especie *Staphylococcus aureus* produce catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno libre), característica que se utiliza para diferenciar éste género de los *Streptococcus* y *Enterococcus* los cuales son catalasa negativa (Cervantes, García y Paz, 2014).

Enterococcus faecalis

Son células bacterianas esféricas y ovoides, de tamaño 0,6 a 2,5 μm , son cocos grampositivos no formadores de endosporas. Se presentan en forma de pares o de cadenas cortas. Son no motiles y anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, con metabolismo fermentativo. Son más abundantes en el tracto gastrointestinal de los humanos, lo cual podría explicar su prevalencia

en los aislamientos clínicos, además de su virulencia incrementada (Díaz, Rodríguez y Zhurbenko, 2010).

Antibióticos

Se definen como moléculas naturales (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintéticas o semisintéticas, capaces de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias. Para que un antibiótico sea ideal debe presentar ciertas características dentro de las cuales se encuentran: solubilidad en agua, no debe ser tóxico, ser activo en el medio común de las enfermedades infecciosas, debe tener amplio espectro antibacterial, ser activo a pH neutro, no ser proteico y no debe inducir resistencia en los microorganismos infecciosos (Barrios, 1988).

Clasificación de los Antibióticos

Éstos se clasifican de acuerdo a diferentes criterios, según el organismo que lo produce, estructura química, mecanismo de acción y espectro de actuación (Barrios, 1988).

Según el organismo que lo produce

- Bacterianos: cuando son producidos por bacterias como la Colimicina y Gramicidina.
- Micóticos: producidos por hongos como la Penicilina.
- Antimicóticos: producidos por actinomicetales como la Eritromicina y Cloranfenicol.

Según su estructura química

- Polipéptidos

- Aminoglucósidos
- Tetraciclinas
- Cloranfenicol
- Macrólidos
- Lincomicina
- Penicilinas
- Cefalosporinas
- Rifampicinas
- Sulfonamidas
- Cicloserina
- Vancomicina
- Novobiocina

Según el espectro de acción

- *De amplio espectro*: cuando tienen actividad contra una amplia gama de bacterias, tanto grampositivas como gramnegativas.
- *De pequeño espectro*: cuando tienen acción sobre un grupo reducido de microorganismos, algunas veces una sola especie bacteriana.

Según el mecanismo de acción

- *Inhibidores de la síntesis de la pared bacteriana*: este mecanismo actúa inhibiendo la síntesis del peptidoglicano, compuesto fundamental para la integridad de la pared celular bacteriana. Son efectivos cuando la bacteria se encuentra en división y se está sintetizando la pared celular. Dentro de ellos contamos con las Penicilinas, Cefalosporinas, Cicloserina, Bacitracina, Vancomicina (Barrios, 1988). Estos antibióticos son llamados Beta lactámicos, ya

que comparten una estructura común de anillo beta lactámico. Generalmente actúan como fármacos bactericidas (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

- *Inhibidores de la síntesis proteica:* estos antibióticos afectan las etapas fundamentales en el proceso de síntesis proteica como: la transcripción del mensaje genético del ADN para formar el ARN mensajero o la traducción de dicho mensaje y formación de la cadena polipeptídica, llevada a cabo en los ribosomas, en la cual intervienen las subunidades 30S y 50S del ribosoma. Dentro de ellos se encuentran: Macrólidos, Tetraciclinas, Lincomicina, Aminoglucósidos, Cloranfenicol (Barrios, 1998).
- *Antibióticos que bloquean la síntesis de ácidos nucleicos:* los antibióticos que afectan la función y replicación del ADN son agentes antimicrobianos muy eficaces. Sin embargo, su uso es limitado puesto que alteran el ADN de las células eucariotas, lo cual se traduce en daños severos al organismo. Estos pueden interactuar con las bandas de ADN impidiendo su replicación o con las enzimas que intervienen en este proceso. Dentro de este grupo están: Rifamicinas, Ácido nalidíxico, Novobiocina, Gliseofulvina y Mitomicina (Barrios, 1998).
- *Antibióticos que alteran la permeabilidad de la membrana:* como ésta es una estructura esencial para la célula bacteriana, los antibióticos que la lesionan ocasionan su muerte por pérdida de sustancias nutritivas o acumulación de productos tóxicos. Aunque estos antibióticos tienen un gran efecto antimicrobiano, no son de mucha

aplicación ya que no tienen toxicidad selectiva, sobre las células de los microorganismos pudiendo lesionar las del hospedador. Dentro de estos se encuentran: Polimixinas, Nistatina, Gramicidinas (Barrios, 1998).

Resistencia bacteriana

Son estrategias que generan las bacterias para disminuir o inactivar la acción de los agentes antimicrobianos, ante el ataque de estos y así poder persistir dentro del hospedero. Estos mecanismos pueden ser intrínsecos, es decir, que los posee la bacteria en su interior de manera natural o extrínseca, si la bacteria los adquiere del medio por mutación cromosómica o recombinación genética. Los cambios genéticos son relativamente fáciles en bacterias, dada la simplicidad de su ADN y la facilidad con la que pueden adquirir ADN de otras bacterias. Estos cambios genéticos producen cambios biológicos en la bacteria, y son esos cambios los responsables de la resistencia. Las bacterias susceptibles a un antibiótico pueden adquirir resistencia, ya sea por mutación de sus genes o aceptando genes de resistencia de otra bacteria (Mendoza, 2008).

Mecanismos de resistencia

Se pueden clasificar en cuatro mecanismos básicos, por medio de los cuales las cepas bacterianas pueden adquirir resistencia a los antibióticos de acuerdo al mecanismo expresado y el mecanismo de acción del antibiótico. Los mecanismos de resistencia son: inactivación del antibiótico, alteración del sitio blanco del antibiótico, alteración de barreras de permeabilidad y las bombas de eflujo. Cabe resaltar que los cuatro mecanismos pueden ocurrir simultáneamente (Giedraitienė, Vitkauskienė, Naginienė y Pavilionis, 2011).

- *Inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química:* El fenotipo de resistencia antibiótica por destrucción o modificación de la estructura química es un proceso molecular caracterizado por la producción de enzimas que van a llevar a cabo esta función. Las enzimas que destruyen la estructura química, más conocidas, son las beta-lactamasas que se caracterizan por hidrolizar el núcleo beta-lactámico rompiendo el enlace amida, otra enzima es la eritromicina esterasa que cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico. Entre las enzimas que se encargan de la modificación de la estructura podemos mencionar al cloranfenicol acetiltransferasa y también a las enzimas que modifican a los aminoglucósidos, lincosamidas y estreptograminas (acetilasas, adenilasas y fosfatasas) (Fuchs, Chihu, Conde, González, Noguez, Calderon, y col., 1994; Giedraitienė y col., 2011).
- *Alteración del sitio blanco del antibiótico:* La resistencia bacteriana conferida por la alteración del sitio en donde actúa el antibiótico consiste en la modificación de algunos sitios específicos de la célula bacteriana como la pared celular, la membrana celular, la subunidad 50S o 30S ribosomales, entre otras. Por ejemplo, la modificación por mutación de los genes GyrA y GyrB que codifican para las topoisomerasas II y IV respectivamente, ofrecen resistencia bacteriana a *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa* y *E. coli* frente a las quinolonas (De la Fuente, Dauros, Bello, Domínguez, Mella, Sepúlveda y col., 2007; Mosquito, Ruiz, Bauer y Ochoa, 2011).

En cuanto a las modificaciones a nivel ribosomal podemos mencionar los cambios que ocurren en las subunidades 30S y 50S los cuales son los sitios de acción de aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y lincosamidas. Por ejemplo, la metilación del ARN ribosomal de la subunidad 50S confiere resistencia a *S. aureus* y *S. epidermidis* frente a tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos. La resistencia bacteriana contra gentamicina, tobramicina y amikacina consiste en una mutación de la subunidad ribosomal 30S (Giedraitienė y col., 2011; Lim, Hanifah, Yusof y Thong, 2012).

- *Alteración en las barreras de permeabilidad:* Este mecanismo se debe a los cambios que se dan en los receptores bacterianos específicos para los antimicrobianos o por alteraciones estructurales en los componentes de envoltura de la célula bacteriana (membrana o pared celular) que influyen en la permeabilidad, así como a la pérdida de la capacidad de transporte activo a través de la membrana celular o la expresión de bombas de eflujo las cuales se activan en el momento en que el antibiótico se introduce a la célula bacteriana (Fernández, López, Ponce y Machado, 2003).

La membrana celular de las bacterias gramnegativas contiene un alto contenido de lípidos con respecto a las grampositivas, presenta una membrana externa con un 40 % de lipopolisacárido lo cuál le proporciona una barrera efectiva contra la entrada de antibióticos, dependiendo de la composición química de estos. La internalización de compuestos hidrófilos se lleva a cabo por canales denominados porinas, que se encuentran en la membrana interna, estos canales

están llenos de agua por lo que la penetración de los antibacterianos en este caso dependerá del tamaño de la molécula, hidrofobicidad y carga eléctrica (Giedraitienė y col., 2011).

- *Bombas de eflujo*: En la membrana celular se encuentran las llamadas bombas de eflujo que llevan a cabo la internalización y expulsión de los antimicrobianos. Una amplia variedad de bombas de eflujo provee resistencia antimicrobiana tanto en bacterias grampositivas como en gramnegativas. El eflujo activo de antibióticos es mediado por proteínas transmembranales. En el caso de las bacterias gramnegativas involucra también componentes en la membrana externa y citoplasma. Estas proteínas forman canales que exportan activamente a un agente antimicrobiano fuera de la célula tan rápido como entra. Este mecanismo confiere resistencia a tetraciclinas, quinolonas, cloranfenicol, beta lactámicos, así como a los antisépticos y desinfectantes de tipo amonio cuaternario utilizado para la limpieza de superficies (Fernández, López, Ponce y Machado, 2003; Giedraitienė y col., 2011; Lim, Hanifah, Yusof y Thong, 2012).

Actividad antibacteriana

Es la capacidad que tiene una sustancia de inhibir o destruir un microorganismo patógeno. Se puede evaluar mediante el método de difusión en agar con disco o pozo, permite determinar en forma cualitativa el efecto antimicrobiano y los métodos de dilución para determinar en forma cuantitativa el efecto antimicrobiano (Sánchez, Castillo y García, 2016).

Dentro de los principales métodos de evaluación preliminar de la actividad antibacteriana se encuentran los métodos de difusión en disco y

difusión del pozo en agar, los de dilución y métodos bioautográficos (Ramírez y Marin, 2009), mediante los cuales se determina en forma cuali-cuantitativa el efecto antimicrobiano de los extractos de plantas sobre los microorganismos de interés, los resultados obtenidos se expresan midiendo el diámetro de los halos de inhibición producido por los extractos (Sánchez, Castillo y García, 2016).

Una vez que se ha establecido de forma cualitativa y cuantitativa el efecto antimicrobiano de los extractos es conveniente determinar el compuesto responsable de dicha actividad. Dicho compuesto puede ser obtenido en cantidades suficientes, utilizando técnicas como la cromatografía en columna y la cromatografía en capa preparativa para realizar diferentes bioensayos o para caracterizarlo mediante técnicas espectroscópicas (Choma y Jesionek, 2015).

Metodologías para evaluar la actividad antibacteriana

Método de difusión: El método de difusión en agar, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles. La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer y col (1996) (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos. El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos (Barry, Amsterdam, Coyle, Gerlach y Thornsberry, 1979; National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997).

El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (Hacek, Dressel y Peterson, 1999).

En el caso de evaluar varias sustancias los discos de papel filtro o los pozos deben ponerse en forma equidistante. A continuación, se procede a su incubación a la temperatura adecuada por 24 horas, luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos de las distintas sustancias sobre el microorganismo estudiado, con el antibiótico control. La lectura de los resultados representa la actividad *in vitro* de la sustancia. Algunos autores refrigeran las cajas a 4 °C para permitir la predifusión de los extractos antes de la incubación (Tepe, Daferera, Sökmen y Polissiou, 2004; Mbata, Debiao y Saikia, 2006).

La técnica con sensidiscos presenta varias desventajas; una de ellas es la composición del papel filtro Whatman el cual se compone de celulosa (uniones β -(1-4) de monómeros de glucosa), los cuales tienen muchos grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa, haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica, interviniendo directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión de estos en el agar, los compuestos apolares pueden no ser influenciados por dichos grupos hidroxilos y difundir fácilmente en el agar. Esto puede explicar en parte la más alta sensibilidad detectada cuando el método se utiliza directamente en

pozo (Grant-Burgess, Jordan, Bregu, Mearns-Spragg y Boyd, 1999; Valgas, Souza y Smânia, 2007).

Métodos de dilución: El método de dilución en agar o en caldo como test de susceptibilidad microbiana es utilizado para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas, y la CMB como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado, estas variables son una herramienta para investigar nuevos antimicrobianos (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997; Andrews, 2001; Isada, Bernard, Goldman, Gray y Aberg, 2001; McDermott, Bodeis-Jones, Fritsche, Jonesn y Walker, 2005).

En la técnica de dilución en caldo, son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la CMI es determinada después de la incubación (Wilkinson, 2007).

En el método de dilución en agar, las cajas se siembran por profundidad con una determinada concentración de extracto vegetal, luego se inoculan con el microorganismo en estudio y se incuban por 24 horas, después de ésta, se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas, la principal desventaja de este método es la cantidad necesaria de muestra a evaluar. Los métodos de microdilución en caldo son una técnica útil para determinar CMI, en un gran número de muestras. La ventaja

sobre los métodos de difusión radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales, además permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático (Langfield, Scarano, Heitzman, Kondo, Hammond y Neto, 2004).

Bioautografía: Este método es una variante del de difusión en agar, con la premisa de que el extracto crudo al que se le evaluará las propiedades antibacterianas, es colocado sobre una placa de cromatografía en capa fina (CCF), posteriormente es eluído con una mezcla apropiada de solventes, permitiendo la separación de los diferentes componentes del extracto (Ncube, Afolayan y Okoh, 2008). La CCF es un método ideal para la separación de compuestos naturales debido a que después de eluir la cromatografía se evapora el solvente, evitando así la posible actividad de el mismo (Cretu y Morlock, 2014; Jesionek, Choma, Majer-Dziedzic y Malinowska, 2014).

La bioautografía es empleada como una técnica preliminar de tamizaje fitoquímico, para detectar compuestos que afectan las tasas de crecimiento de microorganismos en mezclas y matrices complejas, como los extractos de plantas (Choma y Jesionek, 2015), se conoce como purificación guiada por bioensayos (Schmourlo, Mendonça-Filho, Alviano y Costa, 2005). Esta técnica tiene un gran número de ventajas ya que simplifica el proceso de aislamiento e identificación de compuestos antimicrobianos a partir de extractos crudos, utiliza relativamente muy poca cantidad de muestra, lo cual es ideal cuando se trabaja con extractos de plantas, además da una idea precisa de la polaridad de los compuestos activos (Runyoro, Matee, Ngassapa, Joseph y Mbwapbo, 2006); es un ensayo práctico, fácil de

realizar y es sumamente reproducible, una vez que se ha estandarizado la técnica (Silva, Simas, Batista, Cardarelli y Tomassini, 2005).

Definición Operacional de Términos

Agar: Es un polisacárido complejo proveniente de un alga marina que se utiliza como agente para producir la solidificación en los medios de cultivo (Tortora, 2007).

Cepas: Las cepas son células genéticamente diferentes dentro de un clon, es decir una población de células derivadas de una única célula parental, que en algunos casos en los cultivos puros de la misma especie no son idénticos en todos los aspectos; estas suelen identificarse por números, letras, o nombres que siguen al epitelio específico (Tortora, 2007).

Cepas de referencia internacional: Las cepas de referencia internacional son microorganismos conservados y distribuidos por colecciones de cultivo; que se encuentran definidos como mínimo a nivel de género y especie. Éstos se encuentran certificados para el control de calidad en microbiología. Son utilizados en disciplinas como la clínica, alimenticia, farmacéutica, cosmética, ambiental, y principalmente en estudios para la determinación de la actividad antibacteriana (Koneman, 2008).

Etnobotánica: Es el campo científico que estudia las interrelaciones que se establecen entre el hombre y las plantas, a través del tiempo y en diferentes ambientes. El desarrollo de la etnobotánica es estudiado por disciplina científicas tales como la propia botánica, sociología, psicología, antropología, ecología e historia (Albornoz, 1992).

Fitoquímica: Es la ciencia que se encarga del estudio de las sustancias vegetales: extracción, separación, purificación y elucidación de estructuras moleculares (Albornoz, 1998).

Tinción Gram: Es una prueba potente y rápida que nos permite diferenciar dos clases de bacterias estas son: Bacterias grampositivas y los gramnegativos. Las grampositivas se tiñen de morado ya que el colorante se queda atrapado en la capa gruesa de peptidoglucanos que rodea a la célula. Las gramnegativas tienen una capa de peptidoglucano mucho más delgada es por ello que no retiene el violeta cristal y por esto las células se tiñen con safranina y las observamos rojas (Murray, 2009).

Operacionalización de las Variables

En este estudio por ser una investigación de causa y efecto (confirmatoria), las variables son de tipo independiente (cualitativa y discreta) y dependiente (cuantitativa y continua), sus indicadores derivan de las bases teóricas (Tabla 1 y 2). Este proceso de operacionalización de las variables asegura que las metas propuestas en los objetivos puedan alcanzarse (Hurtado, 2010).

Tabla 1. Operacionalización de la variable independiente: Caracterización química de las hojas y frutos de *Phyllanthus acidus*.

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Caracterización química de las hojas y frutos de <i>Phyllanthus acidus</i> .	Independiente Cualitativa Discreta	Metabolito secundario es aquel que es propio de una especie, se le conoce también como producto químico y en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza (Marcano y Hasegawa, 2002).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
Pruebas químicas cualitativas preliminares también conocidas como Tamizaje fitoquímico.	Presencia y ausencia de: Alcaloides: reacciones de Dragendorff, Wagner y Mayer.	Aparición de turbidez o precipitados.
	Esteroles y/o triterpenos: Reacción de Lieberman Bouchard.	Coloración verde para esteroles; o rojo para triterpenos.
	Saponinas: prueba de espuma.	Formación de abundante espuma, para saponinas.
	Compuestos fenólicos: con triclورو férrico.	Coloración de azul a negro
	Taninos: prueba de gelatina.	Un precipitado blanco indica presencia de taninos.
	Flavonoides: Reacción de Shinoda.	Coloración naranja a rojo, para flavonas; si es rojo flavonoles y magenta flavononas.
	Antraquinonas: con hidróxido de amonio.	Aparición de una coloración roja.
	Quinonas: con ácido sulfúrico concentrado	
	Glicósidos cardiotónicos: Ensayo de Kedde	Coloración púrpura o violácea.
	Cumarinas: Hidróxido de amonio.	La presencia de fluorescencia azul-violeta.
	Sesquiterpenlactonas: con Hidroximato férrico	Coloraciones roja, violeta o rosa

Fuente: Herrera, Contreras y Pérez, 2020.

Tabla 2. Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana presente en las hojas y frutos del *Phyllanthus acidus*.

1.Variable	2.Tipo de variable	3.Definición Conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana presente en las hojas y frutos del <i>Phyllanthus acidus</i> .	Dependiente Cuantitativa Continua	Es la capacidad de ciertas sustancias de eliminar o inhibir el crecimiento de agentes bacterianos (Prats, 2007).
4.Definición operacional ¿Cómo se mide?	5.Dimensiones	6.Indicador
La actividad antibacteriana se puede medir por: - Método de difusión en Disco (Kirby-Bauer).	Cepas grampositivas: - <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) - <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212) Cepas gramnegativas: - <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853) - <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 23357)	Presencia o ausencia del halo de inhibición (mm) frente a cepas grampositivas y gramnegativas.

Fuente: Herrera, Contreras y Pérez, 2020.

HIPÓTESIS

Estudios previos reportan la presencia de diversos metabolitos secundarios biológicamente activos en el género *Phyllanthus* (terpenos, alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides) por lo cual es de esperar que los extractos de hojas y frutos de *Phyllanthus acidus* posean actividad antibacteriana frente a cepas grampositivas y gramnegativas de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

La investigación en general responde a ciertos objetivos. De acuerdo a cada uno de estos objetivos, es posible derivar un tipo particular de esta. Para identificar el tipo de exploración es importante conocer la relación que se quiere estudiar (Hurtado, 2010). En este caso la investigación que se estudia es de tipo confirmatoria. De tal modo en esta, se quiere confirmar la relación causa-efecto, respondiendo como causa la caracterización química de las hojas y frutos del *Phyllanthus acidus* y como efecto la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional.

Diseño de la Investigación

La presente investigación presenta un diseño de campo, debido a que las hojas y frutos de *Phyllanthus acidus* se recolectaron en las zonas sector Pao de Zárata, La Victoria, Municipio José Félix Rivas, Estado Aragua. Además, es experimental, porque las hojas y frutos fueron trabajados en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, de la Universidad de Los Andes. El diseño también es de tipo contemporáneo y transeccional, ya que los datos

se obtuvieron en el presente y una sola vez. Finalmente es bivariable, ya que el evento de estudio está conformado por dos variables.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

La población es el conjunto de elementos, de los cuales se quiere conocer o investigar algunas de sus características. La muestra es un subconjunto representativo de un universo o población (Arias, 2006). La unidad de investigación es la especie en estudio *Phyllanthus acidus* L.

Selección del Tamaño de la Muestra

La “n” muestral está representada por las hojas y frutos de la especie en estudio *Phyllanthus acidus* L. El tipo de muestra utilizada es no probabilística, respecto a que la elección de los elementos no depende de la probabilidad, sino de causas relacionadas con las características de la investigación o de quien hace la muestra. Aquí el procedimiento no es mecánico ni con base en fórmulas de probabilidad, sino que depende del proceso de toma de decisiones de un investigador o de un grupo de investigadores y desde luego, las muestras seleccionadas obedecen a otros criterios de investigación (Hernández, Fernández y Baptista, 2010).

Sistema de Variables

Las variables de esta investigación fueron sistematizadas en dependiente, la cual está representada por la actividad antibacteriana y depende de los metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos a partir de la especie en estudio; y la variable independiente que corresponde a la caracterización química de los extractos de hojas y frutos de *Phyllanthus acidus* L.

Instrumento de Recolección de Datos

Son los recursos de los cuales se puede valer el investigador para acercarse a los fenómenos de su evento de estudio. En esta investigación se empleó el uso de tablas que permitieron clasificar ambas variables de estudio, y además poder llevar cabo la observación directa la cual permitió identificar los metabolitos secundarios presentes en las hojas y frutos del *Phyllanthus acidus* L., así como la presencia de los halos de inhibición en las pruebas de susceptibilidad pudiendo clasificar a los microorganismos como sensibles o resistentes, frente a los extractos obtenidos de las hojas y frutos.

Procedimientos de la Investigación

Recolección de la planta y preparación del material vegetal: La planta se recolectó sector Pao de Zárata, La Victoria, Municipio José Félix Rivas, del Estado Aragua, fue identificada botánicamente en el herbario

M.E.R.F. “Dr. Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, por el Ingeniero Forestal Juan Carmona.

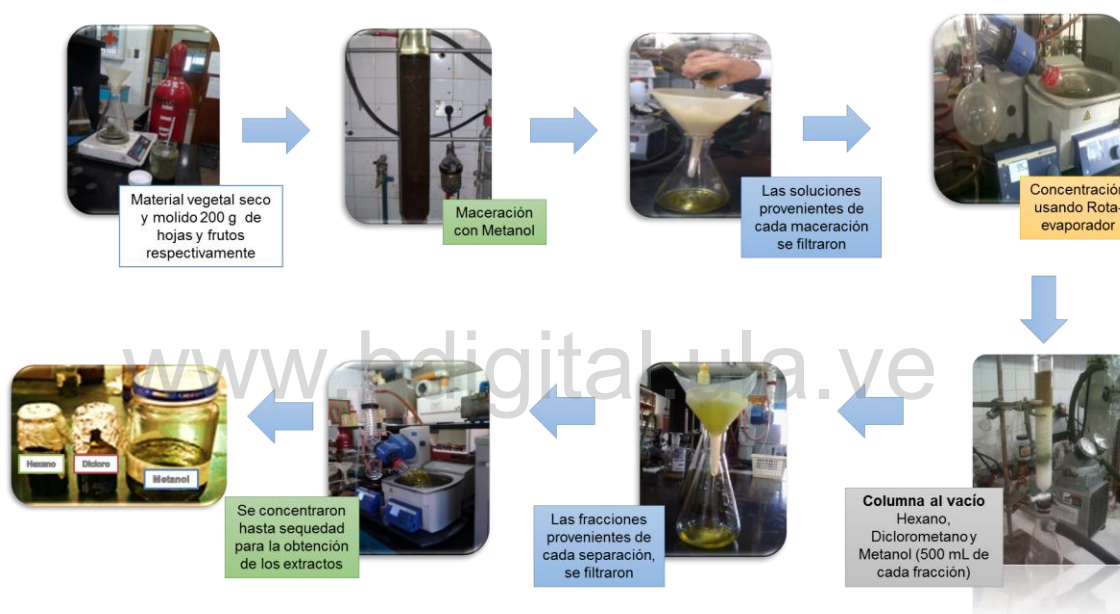
Obtención de los Extractos: se utilizaron las hojas y los frutos por separados, posteriormente se cortaron en trozos pequeños, colocados en la estufa a 40 °C hasta completa sequedad; luego fueron molidos y se obtuvo 390 g (hojas) y 370 g (frutos) de material vegetal seco y molido. Para llevar a cabo el proceso de extracción de los componentes de la planta, se pesaron aproximadamente 200 g de hojas (secas y molidas) y frutos (secos y molidos) y se empleó la maceración usando metanol como solvente de extracción, hasta agotamiento del material vegetal.

Transcurrido el tiempo de la maceración se filtraron los líquidos con papel de filtro, estos se concentraron por separado hasta sequedad utilizando el equipo rota-vapor a presión reducida y temperatura controlada no mayor a 45 °C. Finalmente, los extractos debidamente identificados se colocaron en frascos de color ámbar, y se llevaron a secar en la estufa a 40 °C hasta alcanzar peso constante, obteniendo 77,70 g y 62,45 g para los extractos metanólicos de las hojas y frutos, respectivamente (Figura 18).

Obtención de las fracciones: seguidamente se prepararon dos columnas de cromatografía en columna al vacío para cada uno de los extractos metanólicos obtenidos de las hojas y frutos, utilizando solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano y metanol; 500 mL c/u) para obtener las siguientes fracciones: 0,71 g de hexano, 5,43 g de diclorometano y 29,25 g de metanol respectivamente de la columna con el extracto de las hojas; por otra parte, de los frutos se obtuvo 1,17 g de hexano, 2,35 g de

diclorometano y 21,39 g de metanol; las soluciones provenientes de cada separación se concentraron hasta sequedad en el rotavapor a presión reducida y temperatura controlada no mayor a 45 °C (Figura 19).

Figura 19. Procedimiento para la extracción y fraccionamiento de hojas y frutos de *Phyllanthus acidus*.



Elaborado por Herrera, Contreras y Pérez, 2020.

Análisis Fitoquímico: Una vez obtenidos los extractos secos se procedió a realizar el tamizaje fitoquímico que busca caracterizar de manera cualitativa los componentes y se evaluaron de la siguiente manera (Esquema 1) (Domínguez, 1979; Rivas, Oranday y Verde, 2016):

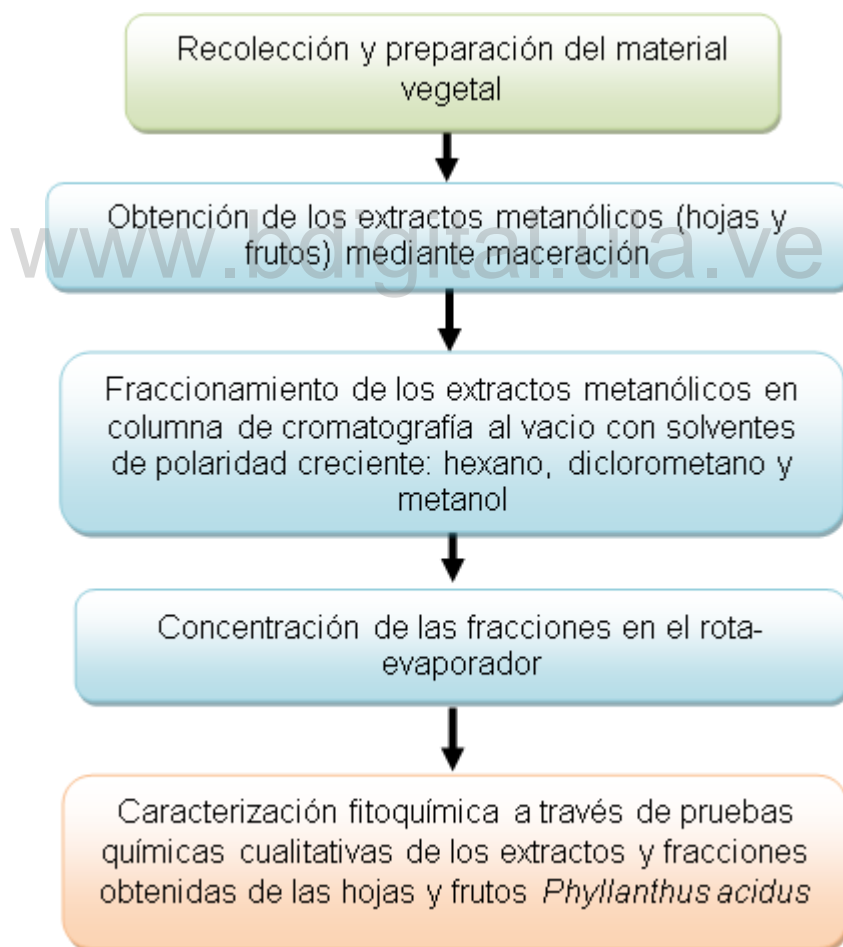
- **Alcaloides:** En este ensayo se utilizarón los reactivos de: Mayer, Wagner y Dragendorff. En tres tubos se disolvieron de 1-2 mg de la muestra del extracto etanólico en 5 mL de ácido clorhídrico (HCl) al 10 %, se llevó a calentamiento en baño de María por quince minutos, se dejó enfriar y luego se filtró la muestra. Posteriormente se dividió el filtrado (1,0 mL) en 3 tubos de ensayo identificados para cada reactivo. Seguidamente se adicionaron a el respectivo tubo 2 a 3 gotas de sales de metales pesados como el ioduro de potasio (reactivo de Dragendorff), el ioduro de potasio y mercurio (reactivo de Mayer) y la sal del reactivo de Wagner, formándose precipitados de color naranja, blanco y rojo pardo respectivamente; lo que permitió detectar la presencia de alcaloides básicos.
- **Esteroles y Triterpenos:** Se realizó mediante la prueba de Lieberman Bouchard. Se disolvió una porción del extracto con diclorometano, luego se mezcló con 0,5 mL de anhídrido acético y se adicionó cuidadosamente por la pared del tubo, dos gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se observó los cambios de coloración, la aparición de un color verde, se consideró como prueba positiva para esteroides y un color rojo positivo para triterpenos.
- **Compuestos Fenólicos:** Prueba de cloruro férrico (FeCl_3): se disolvió la muestra (1-2 mg) en 1 mL de etanol añadiendo unas gotas de cloruro férrico al 5 %, la coloración verde azul o negra indicó la positividad de la prueba.
- **Flavonoides:** Prueba de Shinoda: se disolvieron 1-2 mg de la muestra en 1 mL de etanol se disolvió y luego se adicionaron virutas de magnesio y luego unas gotas de HCl concentrado; si se obtiene una coloración roja indica la presencia de auronas o chalconas. En

cambio, sí se forma una coloración naranja a rojo, indica la presencia de flavonas; si es rojo flavonoles y si es magenta flavononas.

- **Taninos:** Ensayo de la gelatina: permitió reconocer la presencia de taninos en el extracto etanólico, se tomó 1-2 mg de la muestra y se disolvió en 2 mL de solución de gelatina. Se observó la presencia del precipitado blanco que indica la positividad de la prueba.
- **Antraquinonas:** Se disolvió la muestra (1-2 mg) en 1 mL de etanol, seguidamente se agregaron gotas de hidróxido de amonio concentrado, la presencia de coloración roja indicó la positividad de la prueba.
- **Quinonas:** Se agregó 1 gota de ácido sulfúrico concentrado a otra porción del extracto que se ha colocado en una capsula de porcelana. La formación de una coloración roja indica la presencia de quinonas.
- **Cumarinas:** Se disolvió la muestra (1-2 mg) en 1 mL de etanol se agregaron unas gotas de hidróxido de amonio concentrado se exponen el tubo a la lámpara de luz ultravioleta (UV) a 365 nm, la presencia de fluorescencia azul indicó la positividad de la misma.
- **Saponinas:** En un tubo de ensayo colocar una porción del extracto y 1-2 mL de agua, agitar vigorosamente durante un minuto y tomar la altura de la espuma, en caso de que se presentara. Si se forma abundante espuma, estable aproximadamente 5 minutos es prueba presuntiva de la presencia de saponinas en la muestra.
- **Glucósidos cardiotónicos:** Ensayo de Kedde: permitió reconocer en el extracto etanólico la presencia de glucósidos cardiotónicos. Una alícuota del extracto en etanol se mezcló con 1 mL de reactivo y se dejó reposar de 5 a 10 minutos. La positividad de la prueba se consideró con la presencia de una coloración violácea.

- **Sesquiterpenlactonas:** Se agregó una porción del extracto a una cápsula de porcelana o en tubo de ensayo disolver una porción del extracto en etanol o diclorometano, luego se le adicionan una gota de hidróxido de potasio 2 N en metanol. Calentar la mezcla a ebullición de 1 a 2 minutos, enfriar y llevar a pH de 1 con ácido clorhídrico 0,5 N. Se adicionó una gota de cloruro férrico 1 %. Las coloraciones roja, violeta o rosa indican que la prueba es positiva para este metabolito.

Esquema 1. Procedimiento empleado para la caracterización cualitativa de los metabolitos secundarios de los extractos y fracciones de *Phyllanthus acidus* L.



Elaborado por Herrera, Contreras y Pérez, 2020.

Determinación de la actividad antibacteriana: la técnica se basó en el método originalmente descrito por Bauer y cols., 1966 (método de Kirby-Bauer). Esta prueba se desarrolló en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA), bajo la asesoría de la Prof. Maria Eugenia Lucena, donde se evaluó la técnica de difusión en disco.

- **Preparación de las muestras:** los extractos metanólicos de las hojas y frutos de *P. acidus* y las tres fracciones obtenidas de cada extracto (hexano, diclorometano y metanol) fueron evaluadas inicialmente en concentraciones de 100 mg/mL.
- **Bacterias utilizadas:** Para este estudio se seleccionaron cinco especies de cepas bacterias: dos especies pertenecen a las bacterias grampositivas y tres pertenecientes a las bacterias gramnegativas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), estas bacterias fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes a cargo de la Licenciada María Eugenia Nieves (Tabla 3).

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

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

Elaborado por Herrera, Contreras y Pérez, 2020.

Método de difusión de discos en agar

- **Preparación de placas:** En las placas de Petri se adicionó aproximadamente 10 mL del medio de cultivo Agar Müeller Hinton (Merck ®) estéril, dejándose solidificar a temperatura ambiente.
- **Preparación de pre-inóculos bacterianos:** Las cepas a ensayar se incuban en agar Müeller Hinton a 37 °C por 16 a 18 horas antes de hacer el ensayo microbiano, ya que es en ese tiempo donde las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano (Anon, 2003).
- **Preparación de los inóculos bacterianos:** Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas, se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa estéril, tomándose de esta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en tubos 13x100 previamente estéril que contenían 5mL de una solución de Cloruro de Sodio (NaCl) al 0,85 % hasta que alcanzó una turbidez equivalente al patrón de Mac Farlán (10^{6-8} UFC/mL).
- **Inoculación de las placas:** Al tener preparada las placas, se inocularon en forma homogénea en la superficie de cada una de ellas con cada uno de los inóculos bacterianos previamente preparados en solución de NaCl al 0,85 % (bacterias en estudio), utilizando para ello un hisopo de algodón estéril.

- **Preparación de los discos:** Se utilizaron discos de papel filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los cuales se esterilizaron bajo luz ultravioleta (LUV), durante toda una noche.
- **Colocación de los discos impregnados:** En las placas de Petri con Agar Müller Hinton previamente inóculados con cada cepa en estudio, se colocaron los discos impregnados con 10 microlitros (μL) de cada una de las diluciones a una concentración de 100 mg/mL de los extractos y fracciones a ensayar, además de los discos de antibióticos comerciales como control positivo con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar (Tabla 4) y como control negativo discos impregnados con 10 μL del solvente dimetil sulfóxido (DMSO); usando una pinza metálica previamente esterilizada.
- **Pre-incubación e incubación de las placas:** Después de haber colocado los discos en las placas con Agar Müller Hinton previamente inóculadas, estas se dejaron en la nevera a temperatura de 4 °C aproximadamente durante 30 min (pre-incubación), con la finalidad de que los discos impregnados con sus diferentes muestras difundieran a través del Agar, para luego llevarlas a la estufa durante 24 h a temperatura de 37 °C en posición invertida en atmósfera aeróbica (incubación).

Tabla 4. Antibióticos empleados como control positivo para el estudio de la actividad antibacteriana.

Bacterias (ATCC)	Antibióticos comerciales					
	E (15 µg)		AMP (10 µg)		PIP (100 µg)	
	CLSI	CE	CLSI	CE	CLSI	CE
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	≥ 23	32	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	≥ 17	32	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	≥ 21	27
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	-	-	-	-	≥ 21	27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	≥ 21	27

Leyenda: E: Eritromicina ®. AMP: Ampicilina ®. PIP: Piperacilina ®. **CLSI:** Lectura de los halos de inhibición recomendados por el Instituto de Estándares de Laboratorio Clínicos. **CE:** Cepas ensayadas (lectura de los halos de la inhibición de los antibióticos realizados en el laboratorio frente a cepas ATCC), mm: milímetros.

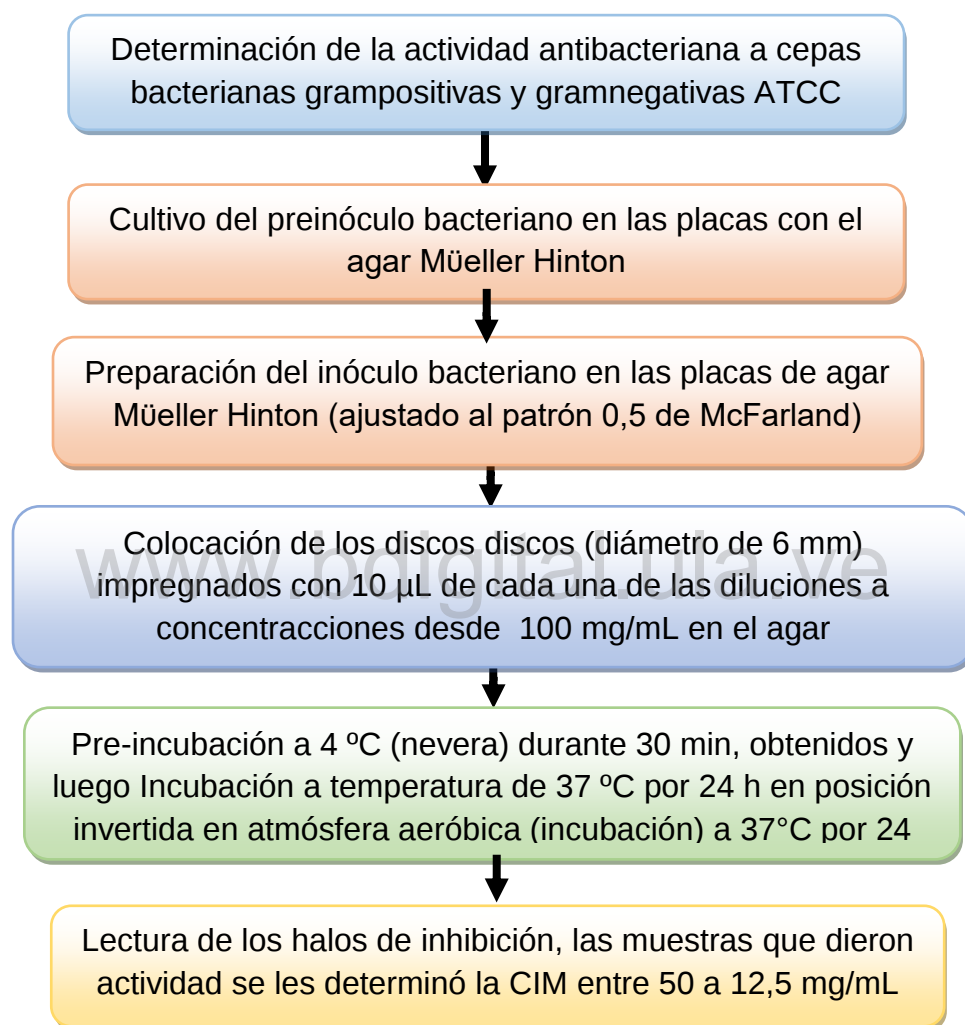
Elaborado por Herrera, Contreras y Pérez, 2020.

- **Lectura de las placas:** Luego de ser incubadas cada una de las placas por un lapso de tiempo de 24 h estas fueron revisadas para realizar la lectura de las mismas con una regla milimétrica. Donde se consideró un resultado positivo o sensible (presencia de actividad antibacteriana) cuando se observó un halo de inhibición alrededor del disco, y se tomó como resultado negativo o resistente (sin actividad antibacteriana) la ausencia de dicho halo. El diámetro de la zona de inhibición producto de la actividad antibacteriana de las muestras en estudio se expresó en milímetros (mm) ver Esquema 2.

- **Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM):** Se determinó la CIM de los extractos y fracciones en estudio, solo para los microorganismos que mostraron actividad antibacteriana a 100 mg/mL, para ello se realizaron diluciones que variaron entre las siguientes concentraciones: 50–12,5 mg/mL.

www.bdigital.ula.ve

Esquema 2. Procedimiento para determinar la actividad antibacteriana de los extractos de *Phyllanthus acidus* por el método de difusión en agar mediante la técnica de disco (Kirby-Bauer).



Elaborado por Herrera, Contreras y Pérez, 2020.

Diseño de Análisis

Existen dos tipos de enfoques de investigación: cualitativo y cuantitativo. En esta investigación el análisis de los datos será realizado a través de un enfoque tanto cuantitativo, como cualitativo. Al respecto, Pallela y Martins (2004) refirieron que el enfoque cuantitativo se basa en la expresión numérica de los datos y el análisis realizado a través de operaciones matemáticas, este enfoque está representado por el diámetro en milímetros (mm) de los halos de inhibición registrados en las pruebas de susceptibilidad. Mientras que el enfoque cualitativo no se basa en mediciones ni expresiones numéricas, sino en características de la unidad de investigación, y estará representado por las características químicas observadas en las pruebas preliminares de identificación, que se llevan a cabo en el tamizaje fitoquímico.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados

Las hojas y frutos de *Phyllanthus acidus* fueron sometidas a un proceso de maceración con metanol obteniéndose así dos extractos metanólicos de 77,70 g de hojas y 62,45 g de los frutos, con un porcentaje de rendimiento de 38,85 % y 31,23 %, respectivamente. Posteriormente cada extracto fue fraccionado mediante columnas de cromatografía al vacío utilizando solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano y metanol) obteniéndose así seis (6) fracciones cuyos pesos y rendimientos se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5. Fracciones obtenidas por la cromatografía de columna al vacío de los extractos metanólicos de hojas y frutos de *Phyllanthus acidus*.

Extractos metanólicos	Fracciones (g) (% de rendimiento)		
	Hexano	Diclorometano	Metanol
Hojas	0,71 g (0,91 %)	5,43 g (6,98 %)	29,25 g (37,64 %)
Frutos	1,17 g (1,87 %)	2,35 g (3,76 %)	21,39 g (34,25 %)

Elaborado por Herrera, Contreras y Pérez, 2020.

Análisis Fitoquímico

Los extractos y fracciones obtenidas de *Phyllanthus acidus* fueron sometidos a las distintas pruebas químicas preestablecidas para conocer los

metabolitos secundarios presentes en estos; y por fenómenos químicos de reacción como cambios de color, formación de precipitados, producción de espuma y fluorescencia por exposición a la luz UV, indicaron la presencia o ausencia de dichos compuestos en la especie en estudio.

Análisis fitoquímico de las de hojas de *Phyllanthus acidus*

Las pruebas cualitativas demostraron que el extracto metanólico de las hojas de *Phyllanthus acidus* posee triterpenos y esteroides, siendo estos últimos los mas abundantes, esto se reflejó debido a la aparición de un anillo de color verde intenso característico. Por otra parte, los compuestos fenólicos y flavonoides fueron reconocidos en este extracto, evidenciándose su presencia por la formación de un color azul intenso que pasa rápidamente a negro y determina la presencia de fenoles, y un color naranja característico que indica que los flavonoides están presentes. De igual modo, los alcaloides también fueron observados debido a la aparición de un precipitado característico, pero solo con el reactivo de Dragendorff fue muy evidente su abundancia; finalmente, se muestra la positividad de los taninos al precipitar las proteínas de la solución de gelatina. Por el contrario, los compuestos como cumarinas, antraquinonas, quinonas y saponinas, se encuentran ausentes en este extracto madre (Tabla 6; Figura 20).

Con respecto a los resultados presentados en las fracciones conseguidas de la separación cromatográfica del extracto metanólico de las hojas; nos indica que los triterpenos y esteroides se mantuvieron presentes en abundancia en las tres fracciones de las hojas (hexano, diclorometano y metanol), dando un anillo de color verde intenso corroborando así la presencia de esteroides en ellas, así mismo se confirmó en la fracción metanólica la presencia de compuestos fenólicos y en la de diclorometano

los flavonoides. También, se reveló que los alcaloides se encontraban solo en las fracciones de hexano y metanol. Finalmente se ratificó la ausencia en las fracciones analizadas de los compuestos tipo cumarinas, antraquinonas, quinonas y saponinas (Tabla 6; Figura 20).

Tabla 6. Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos y fracciones obtenidos de las hojas de *Phyllanthus acidus*.

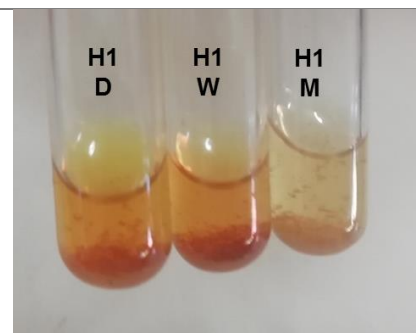
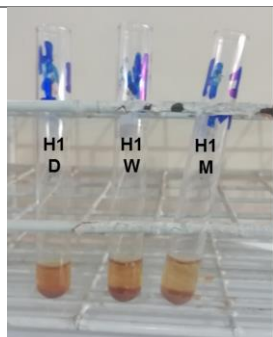
Prueba química	Extracto Metanólico	Fracción Hexano	Fracción Diclorometano	Fracción Metanol
Triterpenos y esteroides	++ (verde)	++ (verde)	++ (verde)	++ (verde)
Compuestos fenólicos	++	ND	ND	++
Flavonoides Shinoda	++	ND		-
NaOH 10 %	++		++	-
Alcaloides Dragendorff	+++	+	-	+
Mayer				
Wagner	+	+	-	+
	+	+	-	+
Taninos	+	ND	ND	-
Cumarinas	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-
Quinonas	-	-	-	-
Saponinas	-	ND	ND	-

Leyenda: Negativo: (-), Positivo: (+), Abundante: (+++), Moderado: (++) , No Determinado: ND.

Elaborado por Herrera, Contreras y Pérez, 2020.

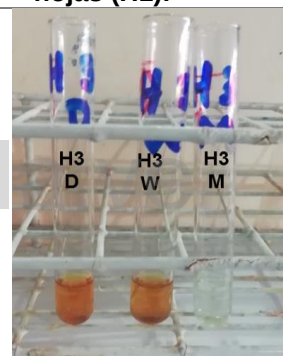
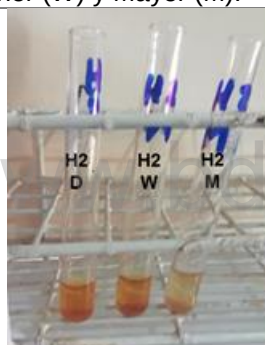
Figura 20. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos y fracciones de las hojas de *Phyllanthus acidus*.

Alcaloides



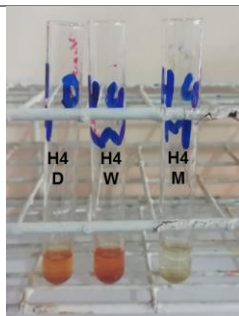
Extracto Metanólico de Hojas (H1)
Prueba: Reactivos de Dragendorff (D), Wagner (W) y Mayer (M).

Ampliación de ilustración de la prueba de alcaloides del Extracto Metanólico de hojas (H1).



Fracción Hexano Hojas (H2)
Prueba: Reactivos de Dragendorff (D), Wagner (W) y Mayer (M).

Fracción Diclorometano Hojas (H3)
Prueba: Reactivos de Dragendorff (D), Wagner (W) y Mayer (M).



Fracción Metanol Hojas (H4)

Prueba: Reactivos de Dragendorff (D), Wagner (W) y Mayer (M).

Reporte: Positivo con la formación de precipitados color naranja para reactivos de Dragendorff (D) y Wagner (W), con Mayer (M) se observa un precipitado blanco.

Figura 20. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos y fracciones de las hojas de *Phyllanthus acidus*. (Continuación)

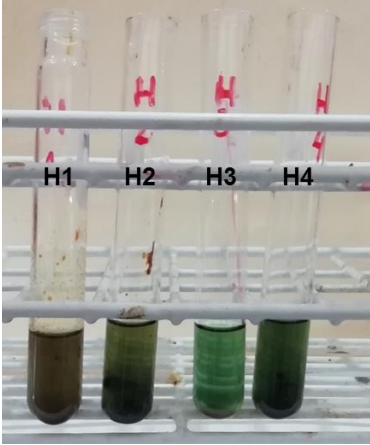
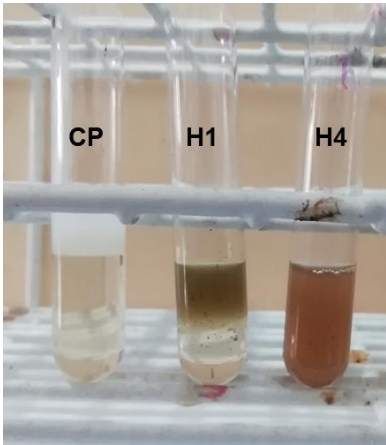
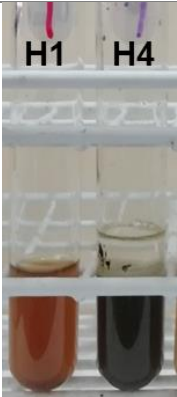
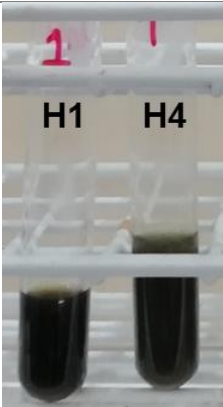
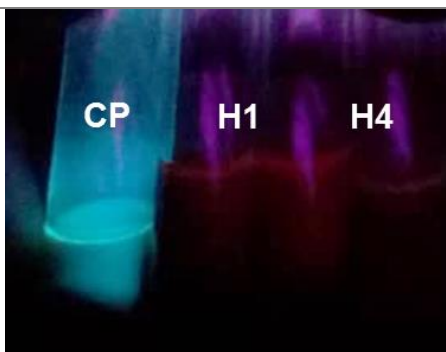
Triterpenos/Esteroles	Taninos
	
Extracto Metanólico de Hojas (H1), Fracción Hexano Hojas (H2), Fracción Diclorometano Hojas (H3) y Fracción Metanol Hojas (H4). Prueba: Liebermann-Burchard. Reporte: positivo para esteroides (anillo verde)	Control Positivo (CP), Extracto Metanólico de Hojas (H1) y Fracción Metanol Hojas (H4) Prueba: Ensayo de gelatina Reporte: precipitado en el extracto metanólico (H1).
Saponinas	Compuestos Fenólicos
	
Extracto Metanólico de Hojas (H1) y Fracción Metanol Hojas (H4) Prueba: prueba de espuma. Reporte: negativo para los extractos ensayados.	Extracto Metanólico de Hojas (H1) y Fracción Metanol Hojas (H4) Prueba: Tricloruro Férrico (FeCl_3). Reporte: positivo formación de coloración verde oscura o negra.

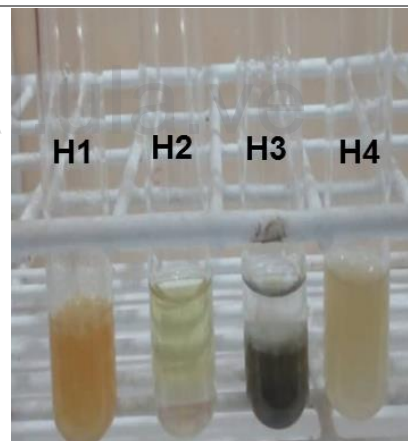
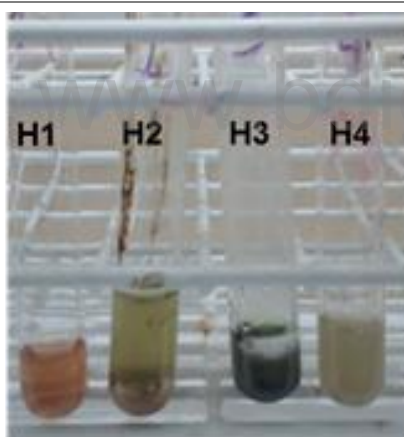
Figura 20. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos y fracciones de las hojas de *Phyllanthus acidus*. (Continuación)

Cumarinas



Control Positivo (CP), Extracto Metanólico de Hojas (H1) y Fracción Metanol Hojas (H4). Prueba: Fluorescencia con NH_4OH . **Reporte:** negativo para los extractos analizados.

Flavonoides



Extracto Metanólico de Hojas (H1), Fracción Hexano Hojas (H2), Fracción Diclorometano Hojas (H3) y Fracción Metanol Hojas (H4).

Prueba: Ensayo de Shinoda.

Reporte: positivo para el extracto metanólico con la presencia de un color rojo/naranja.

Extracto Metanólico de Hojas (H1), Fracción Hexano Hojas (H2), Fracción Diclorometano Hojas (H3) y Fracción Metanol Hojas (H4).

Prueba: Hidroxido de sodio (NaOH) al 10 %.

Reporte: Positivo para el extracto metanólico con la presencia de un color naranja.

Elaborado por Herrera, Contreras y Pérez, 2020.

Análisis fitoquímico de los frutos de *Phyllanthus acidus*

Las pruebas fitoquímicas preliminares se realizaron al extracto metanólico de los frutos donde se pudo observar la presencia de esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides en cantidad moderada, en la misma forma se evidenció que dicho extracto posee alcaloides, pero en menor cantidad en comparación con el extracto de las hojas; adicionalmente, se determinó la ausencia de taninos, cumarinas, antraquinonas, quinonas y saponinas (Tabla 7; Figura 21).

Con respecto a los resultados de las fracciones analizadas de los frutos se confirmó que todas poseen esteroides, en el caso de los flavonoides y alcaloides se encuentran solo en las fracciones de diclorometano y metanol. Al igual que en el extracto metanólico se determinó la ausencia de compuestos fenólicos, taninos, cumarinas, antraquinonas, quinonas y saponinas (Tabla 7; Figura 21).

Tabla 7. Resultados del tamizaje fitoquímico realizado a los extractos y fracciones obtenidos de los frutos de *Phyllanthus acidus*.

Prueba química	Extracto Madre	Hexano	Diclorometano	Metanol
Triterpenos y esteroides	++ (verde)	++ (verde)	++ (verde)	++ (verde)
Compuestos fenólicos	+	ND	ND	-
Flavonoides				
Shinoda	++	ND	+	+
NaOH 10 %	++		+	+
Alcaloides				
Dragendorff	+	-	+	+
Mayer	+	-	+	+
Wagner	+	-	+	+
Taninos	-	ND	ND	-
Cumarinas	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-
Quinonas	-	-	-	-
Saponinas	-	ND	ND	-

Leyenda: Negativo: (-), Positivo: (+), Abundante: (+++), Moderado: (++) , No Determinado: ND.

Elaborado por Herrera, Contreras y Pérez, 2020.

Figura 21. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos y fracciones de los frutos de *Phyllanthus acidus*.

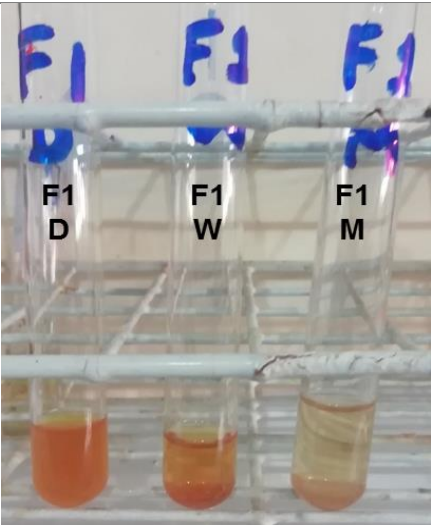
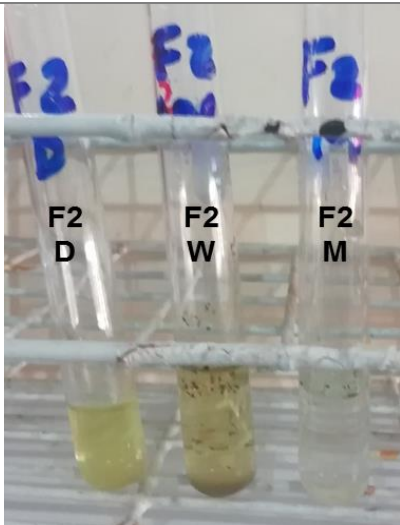
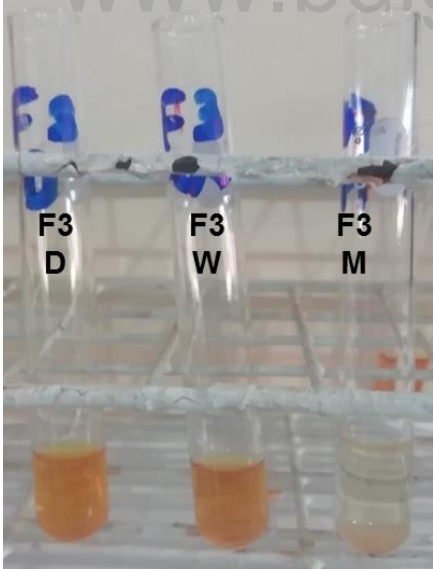
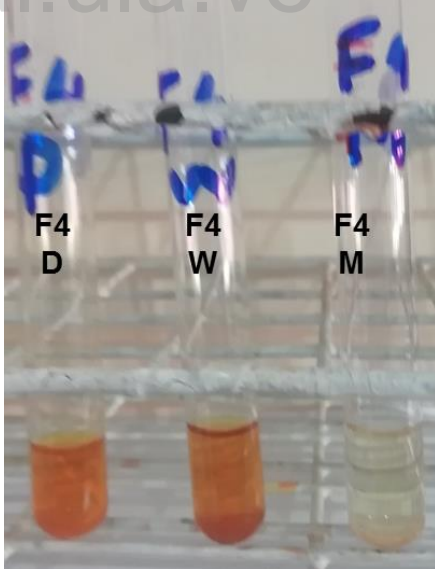
Alcaloides	
	
Extracto Metanólico de Frutos (F1) Prueba: Reactivos de Dragendorff (D), Wagner (W) y Mayer (M).	Fracción Hexano Frutos (F2) Prueba: Reactivos de Dragendorff (D), Wagner (W) y Mayer (M).
	
Fracción Diclorometano Frutos (F3) Prueba: Reactivos de Dragendorff (D), Wagner (W) y Mayer (M).	Fracción Metanol Frutos (F4) Prueba: Reactivos de Dragendorff (D), Wagner (W) y Mayer (M).
Reporte: positivo con la formación de precipitados color naranja para reactivos de Dragendorff (D) y Wagner (W), con Mayer (M) se observa un precipitado blanco.	

Figura 21. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos y fracciones de las hojas de *Phyllanthus acidus*. (Continuación)

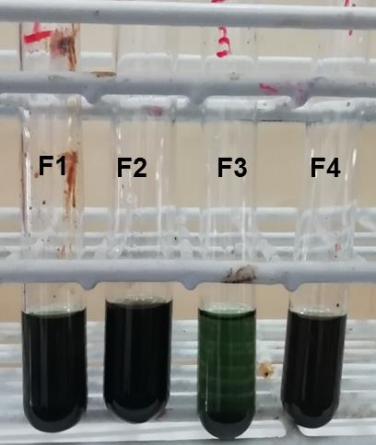
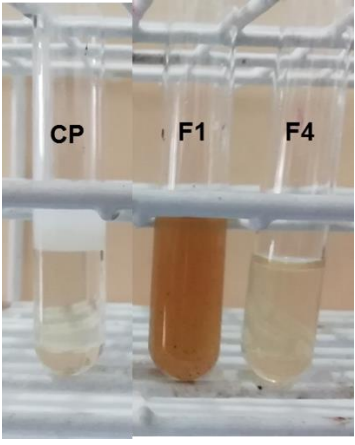
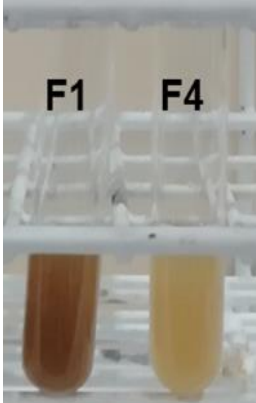
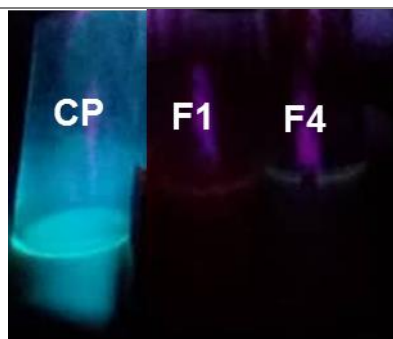
Triterpenos/Esteroles	Taninos
	
Extracto Metanólico de Frutos (F1), Fracción Hexano Frutos (F2), Fracción Diclorometano Frutos (F3) y Fracción Metanol Frutos (F4). Prueba: Liebermann-Burchard. Reporte: positivo para esteroides (anillo verde).	Control Positivo (CP), Extracto Metanólico de Frutos (F1) y Fracción Metanol Frutos (F4) Prueba: Ensayo de gelatina Reporte: negativo la formación del precipitado.
Saponinas	Compuestos Fenólicos
	
Extracto Metanólico de Frutos (F1) y Fracción Metanol Frutos (F4) Prueba: formación de espuma. Reporte: negativo para los ensayados.	Extracto Metanólico de Frutos (F1) y Fracción Metanol Frutos (F4) Prueba: Tricloruro Férrico (FeCl_3). Reporte: positivo por la formación de una coloración verde oscura o negra solo en F1.

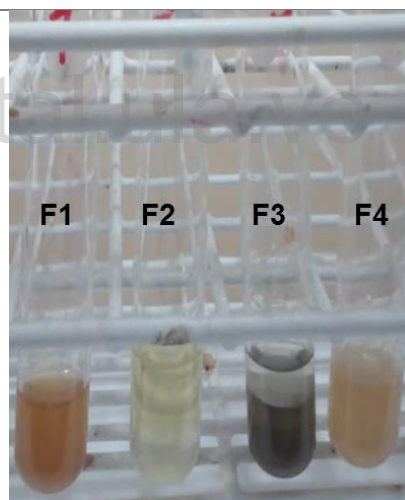
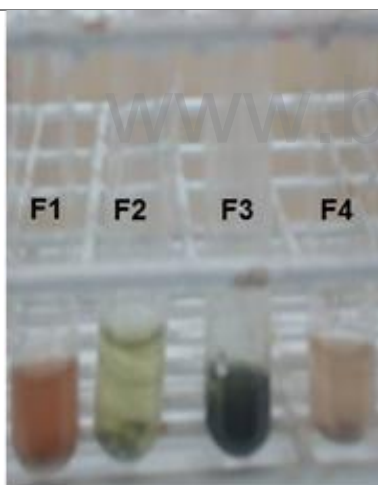
Figura 21. Reporte de resultados ilustrados de la caracterización fitoquímica de los extractos y fracciomes de las hojas de *Phyllanthus acidus*. (Continuación)

Cumarinas



Control Positivo (CP), Extracto Metanólico de Frutos (F1) y Fracción Metanol Frutos (F4). Prueba: Fluorescencia con NH_4OH . **Reporte:** negativo para los extractos analizados.

Flavonoides



Extracto Metanólico de Frutos (F1), Fracción Hexano Frutos (F2), Fracción Diclorometano Frutos (F3) y Fracción Metanol Frutos (F4).

Prueba: Ensayo de Shinoda.

Reporte: positivo para el extracto metanólico, fracciones de diclorometano y metanol presencia de un color rojo/naranja.

Extracto Metanólico de Frutos (F1), Fracción Hexano Frutos (F2), Fracción Diclorometano Frutos (F3) y Fracción Metanol Frutos (F4).

Prueba: Hidroxido de sodio (NaOH) al 10 %.

Reporte: positivo para el extracto metanólico, fracciones de diclorometano y metanol presencia de un color rojo/naranja

Elaborado por Herrera, Contreras y Pérez, 2020.

Actividad antibacteriana

Se determinó a través del método de difusión en disco en agar (Kirby-Bauer), en los dos extractos metanólicos de hojas y frutos, además de las tres fracciones obtenidas de cada extracto (fracciones de hexano, diclorometano y metanol); con concentraciones madres de 100 mg/mL de solución, así mismo, se comprobó la CIM de los extractos y fracciones obtenidos, solo para los microorganismos que mostraron actividad antibacteriana, para ello se realizaron las siguientes diluciones: 50–12,5 mg/mL (Tabla 8 y 9, Figura 22), frentes a las diferentes cepas ATCC: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 8. Resultados obtenidos para la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones de las hojas de *Phyllanthus acidus*.

Muestras ensayadas	[] (mg/mL)	Bacterias ATCC				
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357
H1	100	10 mm	10 mm	-	8 mm	8 mm
	90	9 mm	10 mm	-	7 mm	7 mm
	80	8 mm	9 mm	-	-	-
	70	8 mm	9 mm	-	-	-
	60	7 mm	-	-	-	-
	50	5 mm	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-
H2	100	10 mm	11 mm	10 mm	8 mm	-
	90	10 mm	10 mm	8 mm	-	-
	80	8 mm	10 mm	7 mm	-	-
	70	8 mm	9 mm	7 mm	-	-
	60	7 mm	8 mm	7 mm	-	-
	50	-	8 mm	7 mm	-	-
	40	-	-	6 mm	-	-
H3	100	-	-	-	-	-
	90	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-
	70	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-
H4	100	-	-	10 mm	-	-
	90	-	-	9 mm	-	-
	80	-	-	9 mm	-	-
	70	-	-	8 mm	-	-
	60	-	-	7 mm	-	-
	50	-	-	7 mm	-	-
	50	-	-	7 mm	-	-
	12,5	-	-	6 mm	-	-
DMSO (C-)	α	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

Leyenda: H1: Extracto Metanólico de Hojas, H2: Fracción Hexano Hojas, H3: Fracción Diclorometano Hojas, H4: Fracción Metanol Hojas, mm: Milímetros. DMSO: dimetil sulfóxido, C-: Control negativo. Elaborado por Herrera, Contreras y Pérez, 2020.

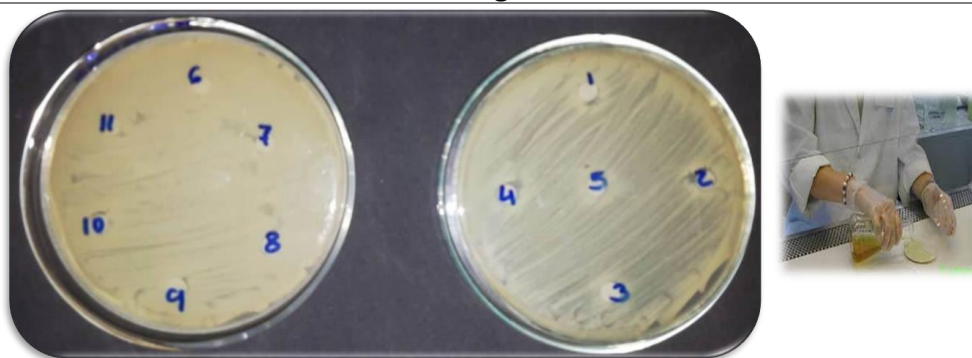
Tabla 9. Resultados obtenidos para la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones de los frutos de *Phyllanthus acidus*.

Muestras ensayadas	[] (mg/mL)	Bacterias ATCC				
		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 23357
F1	100	-	-	10 mm	9 mm	7 mm
	90	-	-	10 mm	9 mm	-
	80	-	-	10 mm	9 mm	-
	70	-	-	10 mm	9 mm	-
	60	-	-	10 mm	9 mm	-
	50	-	-	10 mm	8 mm	-
	40	-	-	-	8 mm	-
	25				7mm	
F2	100	-	-	-	-	-
	90	-	-	-	-	-
	80	-	-	-	-	-
	70	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-
F3	100	11 mm	-	9 mm	8 mm	10 mm
	90	10 mm	-	9 mm	7 mm	7 mm
	80	9 mm	-	8 mm	-	-
	70	9 mm	-	7 mm	-	-
	60	9 mm	-	7 mm	-	-
	50	9 mm	-	7 mm	-	-
	40	8 mm	-	6 mm	-	-
F4	100	9 mm	9 mm	10 mm	-	-
	90	8 mm	-	11 mm	-	-
	80	-	-	-	-	-
	70	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-
	50	-	-	-	-	-
	12,5	-	-	-	-	-
DMSO (C-)	α	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm	0 mm

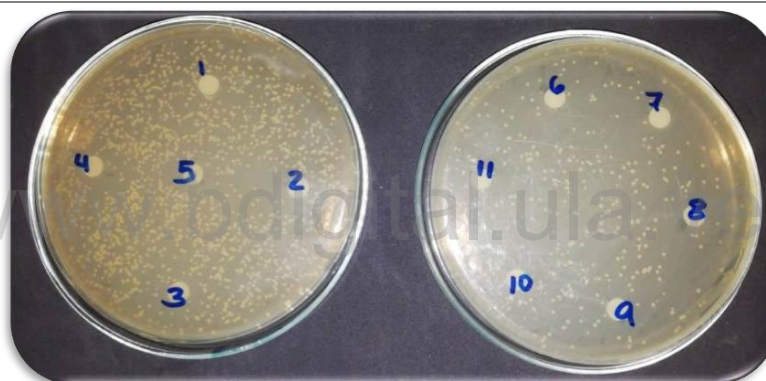
Leyenda: F1: Extracto Metanólico de Frutos, F2: Fracción Hexano Frutos, F3: Fracción Diclorometano Frutos, F4: Fracción Metanol Frutos, mm: Milímetros. DMSO: dimetil sulfóxido, C-: Control negativo. Elaborado por Herrera, Contreras y Pérez, 2020.

Figura 22. Reporte de resultados ilustrados de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones de las hojas y frutos de *Phyllanthus acidus*

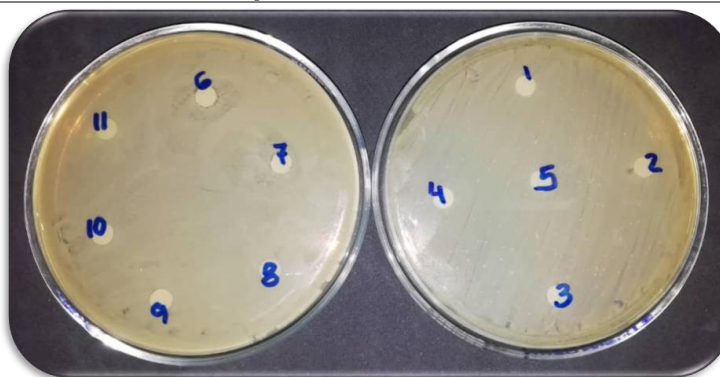
***Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853**



***Escherichia coli* ATCC 25922**



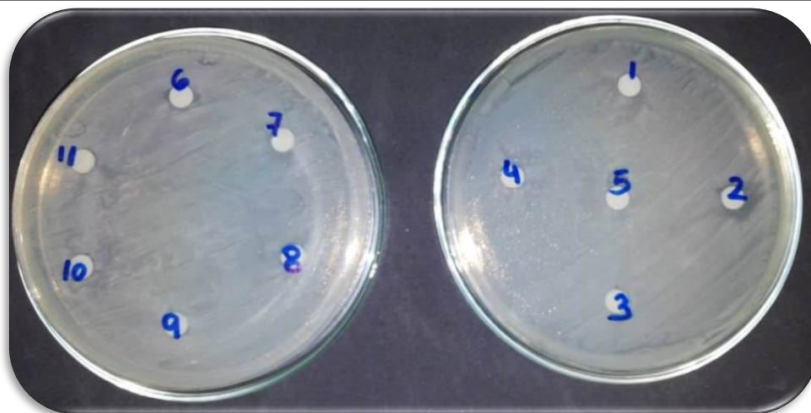
***Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357**



Leyenda: Extracto metanólico de Hojas (1), Fracción Hexano Hojas (2), Fracción Diclorometano Hojas (3), Fracción Metanólica Hojas (4), Extracto metanólico de frutos (5), Fracción Hexano Frutos (6), Fracción Diclorometano Frutos (7) y Fracción Metanólica Frutos (8). Concentración de todas las muestras 100 mg/mL.

Figura 22. Reporte de resultados ilustrados de la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones de las hojas y frutos de *Phyllanthus acidus* (Continuación).

***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**



Leyenda: Extracto metanólico de Hojas (1), Fracción Hexano Hojas (2), Fracción Diclorometano Hojas (3), Fracción Metanólica Hojas (4), Extracto metanólico de Frutos (5), Fracción Hexano Frutos (6), Fracción Diclorometano Frutos (7) y Fracción Metanólica Frutos (8). Concentración de todas las muestras 100 mg/mL.

Elaborado por Herrera, Contreras y Pérez, 2020.

Discusiones

Análisis Fitoquímico

En la presente investigación se obtuvieron los extractos metanólicos de las hojas y frutos de *Phyllanthus acidus*, posteriormente se efectuó un fraccionamiento mediante cromatografía al vacío utilizando solventes en polaridad creciente (hexano, diclorometano y metanol), luego se realizaron las pruebas químicas cualitativas que demostraron la presencia de algunos metabolitos secundarios como esteroides, alcaloides, compuestos fenólicos y flavonoides en los extractos y fracciones de las hojas y frutos analizados, como se menciona a continuación:

- En el extracto metanólico de las hojas *P. acidus* se evidenció la presencia de esteroides, alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides y taninos, mientras que la fracción de hexano presentó alcaloides y esteroides, la de diclorometano esteroides y flavonoides y la de metanol esteroides, compuestos fenólicos y alcaloides. En relación con estos resultados, se corroboró la separación de los compuestos de acuerdo a la polaridad, ya que en la fracción de hexano están los compuestos apolares, en los de diclorometano los de polaridad intermedia y en la de metanol los más polares. Adicionalmente, se observó la ausencia de taninos en las fracciones analizadas, probablemente quedaron retenidos en la silica gel cuando se realizó la separación del extracto metanólico por cromatografía al vacío.

- En el extracto metanólico de los frutos de *P. acidus* se comprobó la presencia de esteroides, alcaloides, compuestos fenólicos, y flavonoides. De igual modo, la fracción de hexano presentó esteroides y las fracciones de diclorometano y metanol esteroides, flavonoides y alcaloides.
- En los extractos y fracciones analizadas de hojas y frutos de *P. acidus* se demostró la ausencia de cumarinas, quinonas, antraquinonas y saponinas, ya que las pruebas realizadas para la determinación de estos metabolitos fueron negativas.

En relación con los resultados obtenidos sobre la composición química de las hojas y frutos de *P. acidus*, investigaciones previas sobre los frutos de esta planta, reportan la presencia de esteroides, carbohidratos y glucósidos en el extracto de éter de petróleo (Habib, Sayeed, Rahman, Mannan, Hasan y Saha, 2011) y de saponinas, alcaloides, taninos y flavonoides en el extracto de cloroformo (Habib y col., 2011). De igual modo, Rahman y cols (2011), confirmaron que el extracto metanólico de los frutos de *P. acidus* contiene glicósidos, taninos, flavonoides y resinas. Asimismo, Kumari, Rao, Chawhan y Rachel (2014), analizaron los extractos de éter de petróleo, acetona, etanol y agua logrando identificar cualitativamente taninos, flavonoides, terpenos, esteroides, saponinas y glicósidos cardíacos en todos los extractos, los alcaloides estuvieron presentes solo en los extractos de acetona y etanol. Dichos estudios coinciden con el análisis fitoquímico realizado en la presente investigación ya que se detectaron esteroides, flavonoides, alcaloides y compuestos fenólicos en el extracto metanólico y en las fracciones de hexano, diclorometano y metanol de los frutos de *P. acidus*, estos resultados difieren de los obtenidos previamente por diversos investigadores en el

sentido que la presencia de taninos y saponinas no fue detectada en ninguna de las muestras analizadas.

En otro orden de ideas, Tram y cols (2017), estudiaron el extracto metanólico de las hojas de *P. acidus*, logrando aislar e identificar varios flavonoides, asimismo, Phatak, Hendre y Durgawale (2016) analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas el extracto metanólico de las hojas reportando esteres, aldehídos, terpenos y fenoles. De acuerdo a lo anteriormente expuesto, los resultados del análisis químico cualitativo realizado en el extracto metanólico y en las fracciones de hexano, diclorometano y metanol de las hojas de *P. acidus* se corresponde con los estudios previos, ya que se detectó la presencia de esteroides, flavonoides, alcaloides, compuestos fenólicos y taninos.

www.bdigital.ula.ve

Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana de los extractos y fracciones de las hojas y frutos de *P. acidus* fue determinada frente a *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli* mediante el método de difusión en agar en disco, utilizando concentraciones que variaron entre 12,5-100 mg/mL, a continuación, se presentan los resultados:

- El extracto metanólico de las hojas fue activo a una concentración de 100 mg/mL frente a todas las bacterias, excepto *E. coli*. Los halos de inhibición variaron entre 6-10 mm. En cuanto a la fracción de hexano presentó actividad contra *E. faecalis*, *S. aureus* y *E. coli* con una CIM de 60 mg/mL, 50 mg/mL y 40 mg/mL, respectivamente. Por otra parte, se observó que la fracción de diclorometano fue inactiva a las

concentraciones evaluadas frente a todas las bacterias y la fracción metanólica solo mostró actividad contra *E. coli* con una CIM de 12,5 mg/mL.

- El extracto metanólico de los frutos presentó actividad contra *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli* con una CIM de 100 mg/mL, 25 mg/mL y 50 mg/mL, respectivamente. Por otro lado, la fracción de hexano no mostró actividad contra ninguna bacteria, sin embargo, la fracción de diclorometano fue activa frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli*, con una CIM de 40 mg/mL, 100 mg/mL, 100 mg/mL y 40 mg/mL, correspondientemente. Asimismo, la fracción metanólica inhibió el crecimiento de *E. coli*, *S. aureus* y *E. faecalis* con una CIM de 100 mg/mL en todos los casos.

En relación a los resultados obtenidos, investigaciones previas reportan sobre la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos de hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol de las hojas de *Phyllanthus acidus* fue determinada contra *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans* utilizando los métodos de difusión de disco, difusión de pozo y dilución. Los investigadores establecieron que *P. acidus* tiene propiedades antimicrobianas, sin embargo, la actividad es selectiva y dependiente del disolvente, siendo el extracto etanólico (E-EtOH), el más potente y el de hexano (E-Hex) el menos activo. La actividad antibacterina determinada por el método de difusión con disco el E-EtOH (200 mg/mL) exhibió halos de inhibición de 4,5 mm para *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans*, mientras que con el extracto de hexano (200 mg/mL) los halos de inhibición fueron menores a 2,2 mm para los tres microorganismos. Por otra parte, la actividad antifúngica se evaluó a través del método de difusión en pozo, el E-EtOH (3,5 mg/mL) presentó halos de inhibición de 9

mm cuando el pozo se llenó con 0,6 mL en comparación con el E-Hex (3,5 mg/mL) para el que la zona de inhibición fue menor a 2,2 mm frente a *C. albicans*. De igual modo, en la actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *E. coli* usando el método de dilución se observó que los extractos de acetato de etilo y etanol (3,5 mg/mL) fueron los que produjeron inhibición con un volumen entre 0,2-0,6 mL. En este sentido, dichos resultados sugieren que los componentes antimicrobianos activos de las hojas de *Phyllanthus acidus* están localizados en el extracto de etanol.

Adicionalmente, otros investigadores señalan que la actividad antibacteriana del extracto clorofórmico de los frutos de *P. acidus* determinada mediante el método de difusión en agar (disco) frente a diversas bacterias patógenas, mostró un espectro de actividad con un halo de inhibición que varió entre 0,5-2,5 mm frente a *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Sarcina lutea* en una concentración de 0,5 mg/disco y fue inactivo contra el resto de bacterias estudiadas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella spp*, *Shigella sonnei*, *Bacillus megaterium*, *Salmonella typhi*) (Habib y col., 2011). El análisis de la composición química indicó la presencia de saponinas, alcaloides, taninos y flavonoides.

Asimismo, el extracto de éter de petróleo de los frutos de *P. acidus* a una concentración de 0,5 mg/disco presentó actividad baja contra *Salmonella typhi* con un halo de inhibición de 2,5 mm y poco efecto frente a una serie de bacterias, incluyendo *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium* con halos de inhibición entre 0,5 a 1,5 mm (Habib y cols., 2011). Los metabolitos detectados en este extracto fueron carbohidratos, glicósidos y esteroides.

Por otra parte, Rahman y cols (2011), evaluaron la actividad antibacteriana del extracto metanólico de los frutos de *P. acidus* utilizando el método de difusión de disco y 13 bacterias patógenas (*Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Sarcina lutea*, *Shigella sonnei*, *Bacillus megaterium*, *Proteus species*). A concentraciones de 0,1 mg/disco y 0,3 mg/disco el extracto fue ineficaz contra todas las bacterias ensayadas, sin embargo, a concentraciones de 0,4 g/disco y 0,8 mg/disco presentó un efecto inhibidor contra *Shigella dysenteriae*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus megaterium* y a 0,8 mg/disco inhibió el crecimiento de *Salmonella typhi* y *Staphylococcus aureus*, con zonas de inhibición promedio de 8 a 12 mm. El análisis fitoquímico permitió detectar la presencia de glicosidos, taninos y resinas y la ausencia de carbohidratos, terpenos, esteroides y alcaloides.

Por otra parte, Padmapriya y Poonguzhali (2015), determinaron la actividad antibacteriana del extracto de acetona de los frutos de *P. acidus* a concentraciones de 25, 50 y 75 µg/mL frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*. Los halos de inhibición variaron entre 13-20 mm, sin embargo, la mayor actividad se observó a la concentración de 75 µg/mL frente a *E. coli* y *P. aeruginosa* con halos de inhibición de 19 y 20 mm respectivamente. El análisis cualitativo de este extracto mostró la presencia de flavonoides, taninos, terpenos, esteroides y saponinas. Adicionalmente, la cuantificación de fenoles reveló una concentración de 22,22 mg/g equivalente a ácido gálico y de 163,15 mg/g equivalente a quercetina.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente, los resultados obtenidos en la presente investigación sobre los extractos de hojas y frutos de *P. acidus* se correlacionan con los estudios anteriores que demuestran que extractos de distintas polaridades presentan una actividad antibacteriana leve debido al tamaño de los halos de inhibición (7 mm), según refiere De Armas, Rodríguez y Salazar (2013) quienes clasificaron la actividad antibacteriana de acuerdo a el diámetro del halo de inhibición a una concentración de 40 mg/mL en leve (7-8 mm), activa (9 mm) o moderado (10 mm).

Adicionalmente, se observó que es necesario la utilización de concentraciones elevadas de los extractos para producir la inhibición del crecimiento de las bacterias ensayadas, lo cual se corresponde con investigaciones previas de otras especies de *Phyllanthus*, como por ejemplo el estudio de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de los frutos de *P. fraternus* la cual fue evaluada mediante el método de difusión en agar en disco a una concentración de 100 mg/mL variando el volumen de impregnación del disco entre 10-50 μ L (Kumar, Kumar, y Janarthanam, 2018). De igual modo, el extracto etanólico de hojas y tallos de *P. virgatus*, fue evaluado en concentraciones entre 10-100 mg/mL, contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* encontrando que los halos de inhibición de mayor tamaño se produjeron a una concentración de 30 mg/mL (Mehta y Jain, 2018).

En relación a los resultados, se visualizó que las bacterias grampositivas fueron más sensibles que las gramnegativas, se presume que esto es debido a que estas últimas poseen una membrana externa que rodean la pared celular que restringe la difusión de compuestos hidrofóbicos a través de los lipopolisacáridos que la cubren, mientras que en las bacterias

grampositivas la pared se encuentra inmediatamente accesible y constituye un blanco ideal para los antibacterianos (Sánchez, 2006), y tanto los extractos como fracciones de hojas y frutos presentarán abundantes compuestos polares por lo cual no atravesaron la membrana de las bacterias gramnegativas.

Por otro lado, diversos autores destacan que los mecanismos por los cuales los principios activos de las plantas pueden causar la destrucción o inhibición de los microorganismos se han atribuido a los metabolitos antimicrobianos que actuarían en los siguientes puntos: degradación de la pared celular, daño a la membrana citoplasmática, daño a las proteínas de membrana, filtración del contenido celular, coagulación del citoplasma y el agotamiento de la fuerza motriz de protones (Ultee, Bennik y Moezelaar, 2002).

En tal sentido, se presume que la actividad antibacteriana de los extractos y fracciones evaluadas de las hojas y frutos de *P. acidus* se debe a la presencia de esteroides y flavonoides, se ha comprobado que los compuestos esteroidales pueden interferir en determinados procesos de síntesis vitales en la célula bacteriana y los triterpenos, por su parte, pueden actuar siguiendo diversos mecanismos, dependiendo de su naturaleza química y naturaleza hidrocarbonada, por ejemplo, tienen generalmente acción depresora sobre la tensión superficial lo cual, cuando tiene lugar en el entorno de la célula bacteriana, altera la selectividad de la membrana citoplasmática para el intercambio de sustancias. Los triterpenos de naturaleza alcohólica alterarían la naturaleza coloidal del protoplasma de la célula provocando su muerte (Abad, 2009). Por otra parte, el mecanismo de acción de los flavonoides, aún no sido completamente dilucidado, pero en la

mayoría de los casos se ha podido demostrar que los flavonoides pueden afectar la actividad de numerosas enzimas, actuando tanto como inhibidores o como inductores (Martino, 2000), sin embargo, se ha podido establecer que algunos de los mecanismos de acción antimicrobiana de los flavonoides están estrechamente relacionados al tipo de compuesto, efecto sinérgico, a su estructura y que cada compuesto posee un punto de acción diferente en las bacterias (Vargas y cols., 2014).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

El extracto metanólico y las fracciones de hexano, diclorometano y metanol obtenidas de las hojas *P. acidus* evidenciaron la presencia de esteroides, alcaloides, compuestos fenólicos, flavonoides y taninos, mientras que el extracto metanólico y las fracciones obtenidas de los frutos de *P. acidus* presentaron esteroides, alcaloides, compuestos fenólicos, y flavonoides. En todos los extractos y fracciones analizadas de hojas y frutos de *P. acidus* se demostró la ausencia de cumarinas, quinonas, antraquinonas y saponinas.

La actividad antibacteriana de los extractos de hojas y frutos de *P. acidus* determinada frente *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *E. coli* indica que las muestras analizadas de distintas polaridades presentan una actividad antibacteriana leve, con halos de inhibición entre 6-7 mm, con unas CIM que variaron entre 12,5-100 mg/mL, siendo las bacterias grampositivas las que presentaron mayor sensibilidad.

Se evidenció que es necesario la utilización de concentraciones elevadas de los extractos y fracciones para producir la inhibición del

crecimiento de las bacterias ensayadas, lo cual se corresponde con investigaciones previas de otras especies de *Phyllanthus*.

Recomendaciones

Determinar la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar en pozo o el método de dilución de los extractos de las hojas y frutos de *P. acidus* frente a las bacterias ensayadas, para verificar que los compuestos polares no están siendo retenidos en el papel de filtro y confirmar la actividad antibacteriana de las muestras analizadas.

Aislar e identificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las hojas y frutos de *P. acidus*.

Cuantificar los componentes fenólicos y flavonoides en las fracciones de metanol de las hojas y en la fracción de diclorometano de los frutos.

Evaluar la actividad antioxidante y antifúngica de las hojas y frutos de *P. acidus*

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Abad, X. (2009). Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos totales de cuatro especies vegetales de las Provincias de Loja y Zamora Chinchipe: *Piper ecuadorence* (matico), *Lepechinia mutica* Benth (Turuyante), *Fuschia ayavacensis* (Pena Pena), *Niphogeton dissecta* (Culantrillodel cerro), empleando los métodos de Difusión en placa, Concentración mínima inhibitoria e Inhibición del Crecimiento Radial. Memoria de título Doctor, Ecuador. Universidad Técnica particular de Loja, Escuela de Bioquímica y Farmacia. 92p.
- Abbott, D. (1973). *Introducción a la cromatografía*, (3ª ed.). Madrid: Alhambra.
- Ajibade, V., Oluwasusi, V., Ibiyemi, M., Ajenifuja, O., y Famurewa, O. (2019). Antibacterial activity of saponin extracted from *Phyllanthus niruri* on Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Journal of Complementary and Alternative Medical*, 7(1), 1-9.
- Albornoz, A. (1998). Medicina Tradicional Herbaria. Guía de Fitoterapia Instituto Farmacoterápico Latino S.A. Venezuela: Caracas.
- Alós, J. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692-699.
- Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(31), 5.
- Angiosperm Phylogeny Group (APG). 2010. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 105–112.
- Arias, F. (2006). *El Proyecto de Investigación. Introducción a la metodología científica*. 5ta Ed, Caracas-Venezuela, Editorial Episteme, C.A.

- Ashna, C., y Suganthi, A. (2019). Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activity of *Phyllanthus emblica* (L.) Fruit pulp. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 8(5), 1381-1391.
- Azuaje, M., Villarreal, S., Rojas, L., Díaz, C., y Rodríguez, M. (2017). Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Hura crepitans* L. (Euphorbiaceae) frente a *Candida albicans*. *Avances en Biomedicina*, 6(3), 197-202. Online: <https://bit.ly/2GUrSCJ>.
- Baris, O., Gulluce, M., Sahin, F., Ozer, H., Kilic, H., y Sokmen, M. (2006). Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Turkish Journal of Biology*, 30, 65.
- Barrios, A. (1988). *Bacteriología y Virología Básica*, Editorial Venezolana C.A. Venezuela.
- Barry, A., Amsterdam, D., Coyle, M., Gerlach, E., y Thornsberry, C. (1979). Simple inoculum standardizing system for antimicrobial disk susceptibility test. *Journal of Clinical Microbiology*, 10, 910.
- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496. doi: 10.1016/S0305-4179(78)80006-0.
- Beutler, J., Ada, A., McCloud, T., y Cragg, G. (1989). Distribution of phorol ester bioactivity in the Euphorbiaceae. *Phytotherapy Research*, 26, 188-192.
- Beyra, Á., León, M., Iglesias, E., Ferrándiz, D., Herrera, R., Volpato, G., Godínez, D., Guimaraes, M., y Álvarez, R. (2004). Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 2, 185-204.

- Biswas, S., Chowdhury, A., Das, J., Karmakar, U., Shill, M., y Raihan, S. (2011). Assessment of cytotoxicity, antibacterial activity and phytochemical screening of ethanol extract of *Phyllanthus acidus* L. (family: Euphorbiaceae) bark. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(6), 112-114.
- Bittner, M., Alarcón, J., Aqueveque, P., Becerra, J., Hernández, V., Hoeneisen, M., y Silva, M. (2001). Estudio Químico de Especies de la Familia Euphorbiaceae en Chile. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 46(4), 419-431.
- Boakye, E., Kasange, E., Biney, R., Boadu, K., Agyare, C., y Woode, E. (2016). Antinociceptive effects of geraniin and an aqueous extract of the aerial parts of *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) Exell. in murine models of chemical nociception. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12, 17–30.
- Borges, L., Negrão, R., Pamplona, S., Fernández, L., Barros, M., Fontes, E., Maia, C., Silva, C., y Silva M. (2018). Anti-Inflammatory and antinociceptive studies of hydroalcoholic extract from the leaves of *Phyllanthus brasiliensis* (Aubl.) Poir. and Isolation of 5-O-D-Glucopyranosyljusticidin B and Six Other Lignans. *Molecules*, 23, 941.
- Bothiraja, C., Shinde, M., Rajalakshmi, S., y Pawar, A. (2011). *In vitro* anti-HIV-type 1 and antioxidant activity of *Emblica officinalis*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 2(3), 556–558.
- Butler, M. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*, 67, 2141-2153. doi: 10.1021/np040106y.
- Bruneton, J. 1999. *Pharmacognosy phytochemistry of medicinal plants*. Paris: Lavoisier.

- Calixto, J. (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 33, 180-187.
- Calixto, J., Adair, R., Valdir, C., y Rosendo, A. (1998). A review of the plants of the genus *Phyllanthus*: Their chemistry, pharmacology and therapeutic potential. John Wiley & Sons, Inc. *Medicinal Research Reviews*, 18(4), 225-258.
- Calixto, J., Adair, R., Niraldo, P., Valdir, C., y Rosendo, A. (1997). The plants of genus *Phyllanthus* as a potential source of new drugs. *Natural Products Research*, 49, 5-6.
- Carvajal, L., Uribe, Y., Sierra, N., y Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos Schultesia* Krukoff). *Revista Colombia Forestal*, 12, 161-170.
- Castro, A. (2014). *Bacteriología médica basada en problemas*, 2a edición. Editorial El Manual Moderno S.A.
- Cervantes, E., García, R., y Paz, S. (2014). Características generales del *Staphylococcus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40.
- Cordiés, J., Machado, A., y Hamilton, L. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Medica*, 8(1):13-27.
- Chakraborty R, Biplabb D, Devannac N, y Sen S. (2012). Antiinflammatory, antinociceptive and antioxidant activities of *Phyllanthus acidus* L. extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), 953-961.
- Choma, I., y Jesionek, W. (2015). TLC-Direct Bioautography as a High Throughput Method for Detection of Antimicrobials in Plants. *Chromatography*, 2(2), 225-238.

- Choma, I., y Grzelak, E. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2684-2691. doi: 10.1016/j.chroma.2010.12.069.
- Chouhan, H., y Singh, S. (2011). Phytochemical analysis, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Phyllanthus simplex*. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(3), 1337-1344.
- Cretu, G., y Morlock, G. (2014). Analysis of anthocyanins in powdered berry extracts by planar chromatography linked with bioassay and mass spectrometry. *Food Chemistry*, 146, 104-112. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.09.038.
- 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 Elementos*, 4, 31-39.
- Dean, J., Merritt, L., Settle, A. y Willard, H. (1990). *Metodos instrumentales de analisis*. (2ª ed.). Mexico DF: Continental.
- De Armas, H., Rodríguez, F. y Salazar, J. (2013). *Estudio fitoquímico preliminar y bioactividad de la planta Melochia villosa proveniente del estado Amazonas, Venezuela*. (Tesis de Pregrado). Universidad de Oriente, Venezuela.
- De la Fuente, C., Dauros, S., Bello, T., Domínguez, Y., Mella, M., Sepúlveda, A. y cols. (2007). Mutations in gyrA and gyrB genes among strains of Gramnegative bacilli isolated from Chilean hospitals and their relation with resistance to fluoroquinolones. *Revista Médica Chilena*; 135(9), 1103-1110.
- Delgado, G., Hernández, Y., y Aguilar M. (1994). Pentacyclic triterpenes from *Cnidoscolus multilobus*. *Planta Médica*, 60, 389-390.

- Dhalwal, K., Biradar, Y., y Rajani, M. (2006). High-performance thin-layer chromatography densitometric method for simultaneous quantitation of phyllanthin, hypophyllanthin, gallic acid, and ellagic acid in *Phyllanthus amarus*. *Journal of AOAC International*, 89(3), 619-23.
- Díaz, M., Rodríguez, C., y Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 147-161.
- Domínguez, X. (1979). *Métodos de Investigación Fitoquímica*, Editorial. Limusa, México.
- Duong, T., Bui, X., Pogam, P., Nguyen, H., Tran, T., Nguyen, T., Chavasiri, W., Boustie, J., y Nguyen, K. (2017). Two novel diterpenes from the roots of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeel. *Tetrahedron*, 73, 5634–5638.
- Evans, F., y Kinghorn, D. (1977). A comparative phytochemical study of the diterpenes of some species of the genera *Euphorbia* and *Elaeophorbia* (Euphorbiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 74(1), 23-35.
- Fan, Y., Gan, L., Liu, H., Li, H., Xu, C., Zuo, J., Ding, J., y Yue, J. (2017). Phainanolide, A. Highly modified and oxygenated triterpenoid from *Phyllanthus hainanensis*. *Organic Letters*, 19, 4580–4583.
- Fernández, F., López, J., Ponce, L., y Machado, C. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 32(1), 44-48.
- Filho, C., Santos, A., De Campos, R., Miguel, O., Yunes, R., Ferrari, F., Messana, G., y Calixto J. (1996). Chemical and pharmacological studies of *Phyllanthus carolinensis* in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 48(12), 1231–1236.

- Flores, M. (2010). *Cromatografías especiales*. Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Facultad de Ciencias Naturales. Cátedra de Farmacognosia. Argentina. 1-5.
- Fuchs, L., Chihu, L., Conde, C., González, V., Noguez, A., Calderon, E., y cols. (1994). Mecanismos moleculares de la resistencia bacteriana. *Salud Publica Mexicana*, 36:428-438.
- García, V. (2005). *Introducción a la Microbiología*. Madrid: Editorial EUNED.
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., y Pavilonis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (kaunas)*, 47(3):137-146.
- Grant-Burgess, J., Jordan, E., Bregu, M., Mearns-Spragg, A., y Boyd, K. (1999). Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research, *Biotechnology*, 70(1-3), 27.
- Gopi, S., y Setty, O. (2010). Protective effect of *Phyllanthus fraternus* against bromobenzene induced mitochondrial dysfunction in rat liver mitochondria. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2170–2175.
- Gutiérrez, A., y Estévez, A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el s. XXI. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 103(2), 409-419.
- Hacek, D., Dressel, D., y Peterson, R. (1999). Highly reproducible bactericidal activity test results by using a modified national committee for clinical laboratory standards broth macrodilution technique, *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1881.
- Habib, R., Rahman, M., Mannan, A., Zulfiker, A., Uddin, M., y Sayeed, M. (2011). Evaluation of antioxidant, cytotoxic, antibacterial potential and phytochemical screening of chloroform extract of *Phyllanthus acidus*.

- International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, 2(1), 410-427.
- Habib, R., Sayeed, M., Rahman, M., Mannan, A., Hasan, R. y Saha, A. (2011). *In vitro* evaluation of cytotoxic, antibacterial, antioxidant and phytochemical screening of petroleum ether extract of *Phyllanthus acidus*. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2(4), 875-881.
- Hans, S. (1992). *Microbiología general*. Madrid: Editorial Panamericana.
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, L. (2010). *Metodología de la investigación*. Quinta edición. Perú: McGrawHill.
- Hecker, E., y Schmidt, R. (1974). Phorbol esters: irritants and carcinogens of *Croton tiglium*. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 31, 377-467.
- Heller, J. (1996). *Phyysiic nutt, Jatropha curcas* L., *Physic nut, Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 1. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Heywood, V. (1985): *Las plantas con flores*. Editorial Reverté. S.A. Barcelona-España. 181 pág.
- Hill, A., Dominicis, M., Mayor, J., Oquendo, M., y Sarduy, R. (2001). Tamizaje fitoquímico preliminar de especies del género *Croton* L. *Revista Cubana de Farmacia*, 35(3), 203-206.
- Hoffmann, P., Kathriarachchi, H., y Wurdack, K. (2006). A phylogenetic classification of Phyllanthaceae (Malpighiales; Euphorbiaceae sensu lato). *Kew Bulletin*, 61, 37-53.

- Hossen, M., Jeon, S., Kim, S., Kim, J., Jeong, D., Sung, N., Yang, S., Baek, K., Kim, J., Yoon, D., Song, W., Yoon, K., y Cho, S. (2015). *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory activity of *Phyllanthus acidus* methanolic extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 168, 217-228.
- Hunziker, A. (1967). Contribución al estudio de las especies argentinas del género *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). *Kurtziana*, 4, 19-27.
- Hurtado, J. (2010). *El proyecto de investigación*. Comprensión holística de la metodología y la investigación. Sexta edición. Caracas: Ediciones Quirón.
- Huy, D., Hung, N., Tuyet, N., y Hao, B. (2018). Triterpenoids from *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels. *Science and Technology Development Journal Natural Sciences*, 2(2), 71-75.
- Isada, C., Bernard, L., Goldman, M., Gray, L., y Aberg, J. (2001). Infectious diseases handbook including antimicrobial therapy and diagnostic test/procedures. 163.
- Islam, S., Arai, H., Ahmad, K., y Uddin, M. (2019). A review on medicinal uses of different plants of Euphorbiaceae family. *Universal Journal of Pharmaceutical Research*, 4(1), 47-51.
- Jagessar, R., Mars, A., y Gomes, G. (2008). Selective antimicrobial properties of *Phyllanthus acidus* leaf extract against *Candida albicans*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* using Stokes Disc diffusion, well diffusion, Streak plate and a dilution method. *Natural Science*, 6(2), 24-38.
- Jain, N., y Singhai, K. (2011). Protective effects of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels leaf extracts on acetaminophen and thioacetamide induced hepatic injuries in Wistar rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(6), 470–474.

- Jasbbi, A. (2006). Chemistry and biological activity of secondary metabolites in Euphorbia. *Iran Phytochemistry*, 67, 1977-1984.
- Jesionek, W., Choma, I., Majer-Dziedzic, B., y Malinowska, I. (2014). Screening bacterial and radical scavening properties of chosen plant extracts using thin-layer chromatography-direct bioautography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37(20), 2882-2891. doi: 10.1080/10826076.2014.907103.
- Kapil, B., Koul, I., Banerjee, S., y Gupta B. (1993). Antihepatotoxic effects of major diterpenoid constituents of *Andrographis paniculata*. *Biochemical Pharmacology*, 46, 182–185.
- Keller, H., Stampella, P., Delucchi, G., y Hurrell, J. (2013). *Vernicia fordii* y *Aleurites moluccanus* (Euphorbiaceae) en la Argentina. Naturalización y etnobotánica. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 48, 3-4.
- Kennedy, K., y Collignon, P. (2010). Colonisation with *Escherichia coli* resistant to critically important antibiotics: A high risk for international travellers. *European Journal of Clinical Microbiology*, 29, 1501-1506.
- Koneman, E. (2008). *Diagnóstico Microbiológico*. México: Editorial Médica Panamericana.
- Kumaran, A., y Karunakaran, R. (2007). *In vitro* antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology*, 40(2), 344–352.
- Kumari, G., Aravind, S., Balachandran, J., Ganesh, M., Devi, S., Rajan, S., Malathib, R., y Ravikumarc, K. (2003). Antifeedant neo-clerodanes from *Teucrium tomentosum* Heyne (Labiatae). *Phytochemistry*, 64(6), 1119–1123.
- Kumari, O., Rao, N., Chawhan, L., y Rachel, B. (2014). Phyto-chemical analysis of *Phyllanthus amarus* (Nela Usiri), *Phyllanthus emblica* and

- Phyllanthus acidus*. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 4(1), 1457-1462.
- Kupchan, S., Nelida, I., Branfman, A., Dailey, R., y Fei, B. (1976). Antileukemic principles isolated from Euphorbiaceae plants. *Science*, 191, 571 –572.
- Kumar, R., Kumar, R. y Janarthnam, B. (2018). Phytochemical composition, tannin content and antibacterial activity of leaf and callus extracts of *Phyllanthus virgatus* G. Forst. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 7(5), 1792-1804.
- Lambert, J., Srivastava, J., y Vietmeyer, N. (1997). *Medicinal Plants: Rescuing a Global Heritage*. World Bank. doi: 10.1596/0-8213-3856-0.
- Langfield, R., Scarano, F., Heitzman, M., Kondo, M., Hammond, G., y Neto, C. (2004). Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galiodes*, *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2-3), 279.
- Leeya, Y., Mulvany, M., Queiroz, E., Marston, A., Hostettmann, K., Jansakul, C. (2010). Hypotensive activity of an *n*-butanol extract and their purified compounds from leaves of *Phyllanthus acidus* (L.) Skeel in rats. *European Journal of Pharmacology*, 649, 301–313.
- León, J., Tomas, G., y Torres, J. (2017). Actividad antibacteriana y antifúngica de extractos de hojas de *Luma chequen* frente a patógenos de origen clínico. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 1(37), 5-7.
- Ly, J., Yu, S., Wang, Y., Wang, D., Zhu, H., Cheng, R., Yang C, Xu, M., y Zhang, Y. (2014). Anti-hepatitis B virus norbisabolane sesquiterpenoids from *Phyllanthus acidus* and the establishment of

- their absolute configurations using theoretical calculations. *Journal of Organic Chemistry*, 79(12), 5432-5447.
- Lim, K., Hanifah, Y., Yusof, M., y Thong, K. (2012). ermA, ermC, tetM and tetK are essential for erythromycin and tetracycline resistance among methicillinresistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from a tertiary hospital in Malaysia. *Indian Journal of Medicine Microbiology*; 30(2):203- 207.
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., y cols. (2012), Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380, 2095-2128.
- Lujan, D. (2014). *Pseudomonas aeruginosa*: Un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamérica*, 48(4), 465-474.
- Mali, S., Sinnathambi, A., Kapase, C., Bodhankar, S., y Mahadik, K. (2011). Anti-arthritic activity of standardised extract of *Phyllanthus amarus* in Freund's complete adjuvant inducedvarthritis. *Biomedicine & Aging Pathology*, 1(3), 185-190.
- Mao, X., Wu, L., Guo, H., Chen, W., Cui, Y., Qi, Q., Li, S., Liang, W., Yang, G., y Shao, Y. (2016). The genus *Phyllanthus*: An ethnopharmacological, phytochemical, and pharmacological review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-36.
- Marcano, D., y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Caracas: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela.
- Markoma, M., Hasan, M., Wan, W., Singh, H., y Jahim, M. (2006). Extraction of hydrolysable tannis from *Phyllanthus niruri* Linn. Effects of solvents

- and extraction methods. *Separation and Purification Technology*, 52, 487-496.
- Márquez, D., Galeano, E., y Martínez, A. (2003). Productos naturales con actividad antimicrobiana. Parte I. *Vitae*, 10(2), 61-71.
- Martin del Campo, R. (1976). Consideraciones acerca de las plantas medicinales mexicanas y su posible proyección mundial en estado actual del conocimiento en Intas medicinales mexicanas. Imeplan. México. 102 pp.
- Martínez, A., Valencia, G., Jiménez, N., Mesa, M., y Galeano, E. (2008). Manual De Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Fitoquímica. Facultad De Química Farmacéutica. Universidad De Antioquia. Colombia. 96 pág
- Mbata, T., Debiao, L., y Saikia, A. (2006). Antibacterial activity of the crude extract of Chinese Green Tea, *African Journal of Biotechnology*, 7(19), 1571.
- Martino, V. (2000). Los Flavonoides como promisorios agentes preventivos y terapéuticos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 19(4), 303-308.
- McDermott, P., Bodeis-Jones, S., Fritsche, T., Jones, R., y Walker, R. (2005). Broth microdilution susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality control ranges for fourteen antimicrobial agents. *Clinical Microbiology and Infection*, 43, 6136.
- Mendoza, N. (2008). *Farmacología Médica*. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. 1008 pág.
- Mehta, K., y Jain, B. (2018). Antibacterial activity of fruit extract of *Phyllanthus fraternus* webster: an ethnomedicinal plant. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 7(5), 795-803.

- Mishra, B., y Tiwari, V. (2011). Natural products: an evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(10), 4769-4807. doi: 10.1016/j.ejmech.2011.07.057.
- Mongalo, N., Opoku, A., y Zobolo, A. (2013). Antibacterial activity of root and leaf extracts of *Jatropha zeyheri* Sond (Euphorbiaceae). *African Journal of Biotechnology*, 12(5), 476-480.
- Morton, J. (1981). Atlas of medicinal plants of middle América. C C Thomas pub spring field III U.S.A. 142. Oliver- Bever B. 1983. Medicinal plants in tropical west África. III. Anti- infection therapy with higher plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 9, 1-83.
- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J., y Ochoa, T. (2011). Mecanismos moleculares de Resistencia antibiotic en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana Medica Experimental de Salud Pública*; 28(4), 648-656.
- Motta, L., Furlan, C., Santos, D., Salatino, M., Duarte, J., Negri, G., Carvalho, J., Ruiz, A., Cordeiro, I., y Salatino, A. (2011). Constituents and antiproliferative activity of extracts from leaves of *Croton macrobothrys*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6, 972-977.
- Murray, P. (2009). *Microbiología Médica*. Barcelona: Editorial Elsevier. Sexta edición. 835 pág.
- Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller. (2009). *Microbiología Médica*. Sexta edición. España-Barcelona. Elsevier.
- Murugaiyah, V., y Chan, K. (2007). Determination of four lignans in *Phyllanthus niruri* L. by a simple high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1154(1-2), 198-204.

- Muthu, C., Ayyanar, M., Raja, N., y Ignacimuthu, S. (2006). Medicinal plants used by traditional healers in Kancheepuram District of Tamil Nadu, India. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2, 43-51.
- Muthusamy, A., Prasad, H., Sanjay, E., Rao, M., y Satyamoorthy, K. (2016). Impact of precursors and plant growth regulators on in vitro growth, bioactive lignans, and antioxidant content of *Phyllanthus* species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52, 598–607.
- Mwine, J., y Van Damme, P. (2011). Why do Euphorbiaceae tick as medicinal plants? A review of Euphorbiaceae family and its medicinal features. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5, 652-662.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997). Methodology for the serum bactericidal test. Approved Guideline. Document M21-A, in press. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997). Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar, *National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova*, 17(1).
- Ncube, N., Afolayan, A., y Okoh, A. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *Journal of Biotechnology*, 7(12), 1797-1806. doi: 10.5897/ajb07.613.
- Neira, L., Stashenko, E., y Escobar, P. (2014). Actividad antiparasitaria de extractos de plantas colombianas de la familia Euphorbiaceae. *Revista de la Universidad Industrial de Santander Salud*, 46(1), 15-22.
- Nisar, M., He, J., Ahmed, A., Yang, Y., Li, M., y Wan C. (2018). Chemical Components and Biological Activities of the Genus *Phyllanthus*: A

- Review of the Recent Literature Molecules*, 23, 2567-2592. doi: 10.3390/molecules23102567.
- Niu, X., Li, S., Zhao, Q., y Lin, Z. (2002). Two novel *ent*-kaurane diterpenoids isolated from *Isodon xerophilus* var. *laxiflora*. *Tetrahedron*, 43, 661-664.
- Novara, L. (2012). Phyllanthaceae Martinov. *Aportes botánicos de salta - ser. Flora*, 10(4), 1-6.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2004). Recomendaciones para gobiernos y consumidores acerca del uso de la medicina tradicional, complementaria y alternativa. *Journal of Public Health*, 16, 218.
- Omulokoli, E., Khan, B., y Chabra, S. (1997). Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 56(2), 133-137.
- Ott, M., Thyagarajan, S., y Gupta, S. (1997). *Phyllanthus amarus* suppresses hepatitis B virus by interrupting interactions between HBV enhancer I and cellular transcription factors. *European Journal of Clinical Investigation*, 27(11), 908-915.
- Padmapriya. N., y Poonguzhali, T. (2015). Antibacterial and antioxidant potential of the acetone extract of the fruit of *Phyllanthus acidus* L. *International Journal of Current Research*, 17- 64-72
- Pan, D., Hu, C., y Chang, J. (1991): Kanmiphorin-C and D Cytotoxic diterpenes from *Euphorbia kansui*. *Phytochemistry*, 30(3), 1018-1020.
- Pascual, M., y Correa, E. (1992). La familia Euphorbiaceae como fuente de aceites vegetales para la industria tecnoquímica, Consejería de Agricultura de la Región de Murcia. C.R.I.A. Departamento Cultivos Zonas Áridas. 30105-La Alberca - MURCIA. 43(1), 39-49.

- Phatak, R., Hendre, A. y Durgawale, P. (2016). Phytochemical composition of methanolic extract of *Phyllanthus acidus* L (Skeels) fresh leaves by GC/MS analysis. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 9(5), 559-561.
- Pereira, R., García, V., Rodríguez, M., y Martínez, J. (2016). Extraction of lignans from *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn using pressurized liquids and low pressure methods. *Separation and Purification Technology*, 158, 204–211.
- Pérez, A., Obregón, Y., Rojas, L., Aparicio, R., Carmona, J., Usubillaga, A. (2018). Chemical composition of the essential oil of *Phyllanthus acidus*. *Natural Product Communications*, 13(1), 97-98.
- Pérez, N. (2013). *Identificación de drogas vegetales*. Laboratorio De Farmacognosia y Medicamentos Herbarios. Facultad de Farmacia. Universidad Central de Venezuela. 26 pp.
- Pino, J., Cuevas, L., Marbot, R., y Fuentes, V. (2008) Volatile compounds of grosella (*Phyllanthus acidus* [L.] Skeels) fruit. *Revista CENIC Ciencias Químicas*, 39, 3-5.
- Poompachee, K., y Chudapongse, N. (2011). Comparison of the antioxidant and cytotoxic activities of *Phyllanthus virgatus* and *Phyllanthus amarus* extracts. *Medical Principles and Practice*, 21(1), 24–29.
- Porter, C. (1967). *Taxonomy of flowering plants*. N. H. Freeman and Company. New York. 73 pp.
- Prats, G. (2007). *Microbiología clínica*. Barcelona: Editorial Médica Panamericana. 366 pág.
- Putakala, M., Gujjala, S., Nukala, S., Bongu, S., Chintakunta, N., Desiredy, S. (2017). Cardioprotective effect of *Phyllanthus amarus* against high

- fructose diet induced myocardial and aortic stress in rat model. *Biomedicine & Pharmacotherapy – Journal*, 95, 1359–1368.
- Rahman, M., Habiba, R., Hasanb, S., Sayeeda, M., y Rana, S. (2011). Antibacterial, cytotoxic and antioxidant potential of methanolic extract of *Phyllanthus acidus* L. *International Journal of Drug Development & Research*, 3(2), 154-161.
- Raj Kapoor, B., Venugopal, Y., Anbu, J., Harikrishnan, N., Gobinath, M., y Ravichandran, V. (2008). Protective effect of *Phyllanthus polyphyllus* on acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(1), 57–62.
- Rakshit, K., Devappa, H., y Klaus, B. (2010). *Jatropha* Toxicity - A Review. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 13, 476-507.
- Ramírez, L., y Marin, D. (2009). Methodologies for evaluating the *in vitro* antibacterial activity of natural compounds of plant origin. *Scientia et Technica*, 42, 263-268.
- Rebouças, S., Da Silva, J., Groff, A., Nunes, E., Lanistcki, M., y Ferraz, A. (2012). The antigenotoxic activity of latex from *Himatanthus articulatus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(2), 389-396.
- Redo, M., Ríos, J., y Villar, A. (1989). A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978- 1988. *Phytotherapy Research*, 3(4), 117-125.
- Ringuelet, J., y Viña, S. (2013). *Productos naturales vegetales*. 1a ed. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata. 261 pp.
- Rivas, C., Oranday, M., y Verde, M. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. Universidad Autónoma de Nuevo León, México. Omnia Science (Omnia Publisher SL). 452 pp.

- Roe, F., y Peirce, W. (1961). Tumor promotion by *Euphorbia latices*. *Cancer Research*, 21, 338-344.
- Roig, J. (1974). *Plantas aromáticas o venenosas de Cuba*. Editorial Ciencia y técnica, La Habana. Cuba. 404-405, 569.
- Rogers, B., Aminzadeh, Z., Hayashi, Y., y Paterson, D. (2011). Country-to-country transfer of patients and the risk of multi-resistant bacterial infection. *Clinical Infectious Diseases*, 53, 49-56.
- Runyoro, D., Matee, M., Ngassapa, O., Joseph, C., y Mbwambo, Z. (2006). Screening of Tanzanian medicinal plants for anti-Candida activity. *BMC complementary and alternative medicine*, 6, 11. doi: 10.1186/14726882-6-11.
- Sabandar, C., Ahmat, N., Jaafar, F., y Sahidin, I. (2013). Medicinal property, phytochemistry and pharmacology of several *Jatropha* species (Euphorbiaceae): a review. *Phytochemistry*, 85, 7-29.
- Salamanca, G. (2002). *La familia Euphorbiaceae como condición promisorio para la obtención de metabolitos secundarios*. Ibagué: Departamento de Química. Universidad de Tolima. Colombia. 10 pág.
- Sánchez, C. (2006). ¿Antibióticos ayer, hoy y mañana...? *Revista Química Viva*, 5(2), 63-77.
- Sánchez-García, E., Castillo-Hernández, S., y García-Palencia, P. (2016). Actividad antimicrobiana. En Rivas-Morales, C., Oranday-Cardenas, M.A., & Verde-Star, M.J. (Eds.). *Investigación en plantas de importancia médica*. Barcelona, España: OmniaScience. 77-100.
- Sarker, S., Latif, Z., y Gray, A. (2005). *Natural Products Isolation*. Humana Press. doi: 10.1385/1592599559.

- Satyanarayana, P., Subrahmanyam, P., y Viswanatham, K. (1988). New second hydroxy lignans from *Phyllanthus niruri*. *Journal of Natural Products*, 51(1), 44-49.
- Schmourlo, G., Mendonça-Filho, R., Alviano, C., y Costa, S. (2005). Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(3), 563-568. doi: 10.1016/j.jep.2004.10.007.
- Schoeder, G., Rohmer, M., Beck, J., y Anton, R. (1980). 7-oxo-7-hydroxy and 7- hydroxysterols from *Euphorbia fischeriana*. *Phytochemistry*, 19, 2213 – 2215.
- Schultes, R. (1981). *El legado de la medicina popular*. Blume. Madrid. 249 pág.
- Skoog, D. (2008). *Principios de Analisis Instrumental*. (6ª ed.). Mexico DF: Reverte.
- Silva, M., Simas, S., Batista, T., Cardarelli, P., y Tomassini, T. (2005). Studies on antimicrobial activity, *in vitro*, of *Physalis angulate* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(7), 779-782. doi: 10.1590/S0074-02762005000700018.
- Silver, L., y Bostian, K. (1993). Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 37(3): 377-383.
- Spicer, J. (2009). *Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas*. Australia: Editorial Elsevier.
- Sirajudeen, J., Muneer, J., Abdul, R., Manivel, V., Pravin, J., Elamparithi, R. (2017). Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of *Phyllanthus niruri*. *Journal of Advanced Applied Scientific Research*.

International Conference on Chemical and Environmental Research, ISSN: 2454-3225.

- Steinmann, V. (2002). Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botánica Mexicana*, 61, 61-93.
- Stevens, P. (2001). Angiosperm Phylogeny Website. Version 14. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>
- 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), 68-74.
- Thakur, H., y Patil, D. (2011). Taxonomic and phylogenetic assessment of the Euphorbiaceae: A Review. *Journal of Experimental Sciences*, 2(3), 37-46.
- Tepe, B., Daferera, D., Sökmen, M., y Polissiou, M. (2004). *In vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of *Thymus eigii* M. Zohary et P.H. Davis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1132.
- Thyagarajan, S., Thirunalasundari, T., Subramanian, S., Venkateswaran, P., y Blumberg, B. (1988). Effect of *Phyllanthus amarus* on chronic carriers of hepatitis B virus. *Lancet*, 2, 764-766.
- Tram, N., Son, N., Nga, N., Phuong, V., Cuc, N., Phuong, D., Truan, G., Cuong, N., y Thao, D. (2017). The hepatoprotective activity of a new derivative kaempferol glycoside from the leaves of Vietnamese *Phyllanthus acidus* (L.) Skeels. *Medicinal Chemistry Research*. doi: 10.1007/s00044-017-1914-x.
- Tram, N., Son, N., Thao, D., y Cuong, N. (2016). Kaempferol and kaempferol glycosides from *Phyllanthus acidus* leaves. *Vietnam Journal of*

Chemistry, International Edition, 54(6), 790-793. DOI: 10.15625/0866-7144.2016-00406.

- Trease, G., y Evans, W. (1986). *Tratado de Farmacognosia Interamericano*. 12a Ed., EMALSA S.A., Madrid. 205 pp.
- Tortora, G. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Bogotá: Editorial Médica Panamericana.
- Tortora, G., Funke, B., y Case, C. (2007). Editorial Médica Panamericana. 9na Ed. Buenos Aires. 988 pág.
- Ultee, A., Bennik, M., y Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 1561–1568.
- Unander, D., Webster, G., y Blumberg, B. (1990). Records of usage or assays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). I. Subgenera *Isocladus*, *Kirganelia*, *Cicca* and *Emblica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 30(3):233-64.
- Unander, D., Webster, G., y Blumberg, B. (1992). Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae): a compilation. III. The subgenera *Ericoccus*, *Conami*, *Gomphidium*, *Botryanthus*, *Xylophylla* and *Phyllanthodendron*, and a complete list of the species cited in the three- part series. *Journal of Ethnopharmacology*, 36(2), 103- 112.
- Unander, D., Webster, G., y Blumberg, B. (1995). Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae). IV. Clustering of antiviral uses and other effects. *Journal of Ethnopharmacology*, 45(1), 1-18.
- Vaisberg, A., Milla, M., Del Carmen Planas, M., Cordova, J., Rosas de Agusti, E., Ferreyra, R., Del Carmen Mestiga, M., Carlin, L., y Hammond, G.

- (1989). Tapsine is the cicatrizant principie in Sangre de Drago extracted from *Croton lechleri*. *Planta Médica*, 55(2), 140-143.
- Valcarcel, M y Gomez A. (1988). *Técnicas analíticas de separación*. Editorial Reverte. España. 800 pág.
- Valgas, C., Souza, S., y Smânia, E. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products, *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 369.
- Valencia C. (1995). *Fundamentos de Fitoquímica*. México DF.: Editorial Trillas. 235 pág.
- Vargas, R., Torrescano, G., Mendoza, A., Vallejo, B., Acedo, E., Sánchez, J., Peñalba, M. y Sánchez, A. (2014). Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleos. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. XVI (1), 32-37.
- Vinayagamoothy, T. (1982). Antibacterial activity of medicinal plants of Sri Lanka, Ceylon. *Journal of Biosocial Science*, 191, 50–59.
- Webster, G. (1986). Irritant plants in the spurge family (Euphorbiaceae). *Clinics in Dermatology*, 4, 36-45.
- Webster, G. (1955). Studies of the Euphorbiaceae, Phyllanthoideae II. The american species of *Phyllanthus* described by Linnaeus. *Journal of the Arnold Arboretum*, 37(1), 1-14.
- Wilkinson, J. (2007). Methods for testing the antimicrobial activity of extracts, *Modern Phytomedicine*, 157-171.
- Williams, J. (2001). Review of antiviral and inmunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on uña de gato and sangre de drago. *Alternative Medicine Review*, 6(6), 567-579.

- Worbs, S., Köhler, K., Pauly, D., Avondet, M., y Schaer, M. (2011). *Ricinus communis*. Intoxications in Human and Veterinary. *Toxins*, 3, 1332-1372.
- Wu, Y., Xie, S., Hu, Z., Wu, Z., Guo, Y., Zhang, J., Wang, J., y Xue, Y. (2017). Triterpenoids from whole Plants of *Phyllanthus urinaria*. *Chinese herbal medicines*, 9, 193-196.
- Wu, Z., Lai, Y., Zhou, L., Wu, Y., Zhu, H., Hu, Z., Yang, J., Zhang, J., Wang, J., Luo, Z., Xue, Y., y Zhang, Y. (2016). Enantiomeric lignans and neolignans from *Phyllanthus glaucus*: Enantioseparation and their absolute configurations. *Scientific Reports*, 6(24), 809. doi: 10.1038/srep24809.
- Yan, H., Han, L., Zhang, X., y Feng, J. (2017). Two new Anti-TMV active chalconoid analogues from the root of *Phyllanthus emblica*. *Natural Product Research*, 31, 2143-2148.
- Zhang, J., Miao, D., Zhu, W., Xu, J., Liu, W., Kitdamrongtham, W., Manosroi J., Abe, M., Akihisa, T., y Feng, F. (2017). Biological activities of phenolics from the fruits of *Phyllanthus emblica* L. (Euphorbiaceae). *Chemistry & Biodiversity*, 14(12). doi:10.1002/cbdv.201700404.
- Zhao, J., Liu, T., y Chen, G. (2016). An effective -cyclodextrin polyurethane spherical adsorbent for the chromatographic enrichment of corilagin from *Phyllanthus niruri* L. extract. *Reactive and Functional Polymers*, 102, 119-129.
- Zheng, X., Yang, J., Lv, J., Zhu, H., Wang, D., Xu, M., Yang, C., y Zhang, Y. (2018). Phyllacidulois A-D: Four new cleistanthane diterpenoids from *Phyllanthus acidus* (L) Skeels. *Fitoterapia*, 125, 89-93.