



Universidad de Los Andes
Facultad de Farmacia y Bioanálisis
Escuela de Bioanálisis
Cátedra: Componente de Investigación
Asignatura: Trabajo de Grado II
Mérida Edo Mérida



**“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA
PRODUCIDA POR EXTRACTOS DE PLANTAS
OBTENIDAS EN LA REGIÓN ANDINA”**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de
Licenciado en Bioanálisis**

TUTOR:
Dr. Bernardo Chataing
C.I.: 19.486.947

INTEGRANTE:
Vivas Guerrero, Karla Andreina

MERIDA-VENEZUELA
2013

Resumen del trabajo de grado presentado como requisito parcial para obtener el título de Licenciado (a) en Bioanálisis.

Autor:

Vivas Guerrero, Karla Andreina

Tutor Académico:

Dr. Bernardo Chataing

La utilización de las plantas con fines medicinales por poblaciones humanas, data de milenios; aun en nuestros días han ocupado un papel primordial en la salud humana. Actualmente, conociendo la clasificación de las mismas y logrando el hombre identificarlas por sus características externas, recurre a ellas para mejorar su salud, además de ser económicas, efectivas, fácilmente manejables, y existen fuentes históricas de principios activos con actividad biológica. El aislamiento de metabolitos de las mismas representa la mayor estrategia para descubrir y desarrollar nuevas drogas. En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona auriginosa*, de extractos vegetales obtenidos de plantas de la región andina; las cuales fueron: *Vitacea*, *Albahaca (amarilla, morada, blanca, de monte)*, *Lepechinia (bullata, conferta)*, *Solanum (bicolor, hypomalacophyllum, torvum)*, *Petrea aspera*, *Hypericum laricifolium*, *Stachitarpheta mutabilis*, *Carramboa (badilloi, tachirensis)*, *Ocotea Macropoda*, y *Munnozia*; además de compuestos purificados: *Acnistina (L, A, E)*, *Tomatina*, *Solanocapsina*, *Horminona*, *Solamargina*, y *Cacique*. La evaluación antibacteriana se realizó mediante la difusión en agar con discos, utilizando como controles discos de antibióticos; Eritromicina y Ácido nalidíxico, y Dimetil sulfóxido, medio de dilución de los extractos. La determinación de la inhibición celular se obtuvo mediante la concentración inhibitoria mínima cualitativamente, a través del método de microdilución y detección de actividad con Resazurina, en aquellos extractos que tuvieron actividad en el método de difusión en

agar con discos. Los extractos obtenidos de *Vitacea* y *Albahaca amarilla* demostraron ser los más efectivos, porque a concentraciones de 20 µg/mL, inhibieron el crecimiento bacteriano de todas las cepas, al igual que *Albahaca morada*, aun cuando para *S. aureus* y *E. coli*, obtuvo actividad a mayor concentración; 50 µg/mL. Los extractos de *Munnozia* (medio acuoso, hexanólico, metanólico) probados en *B. subtilis*, mostraron que el extracto acuoso fue el activo. Los compuestos puros ensayados sobre *S. aureus*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa*, mostraron actividad sobre la primera bacteria, *Solanocapsina* inhibió el desarrollo de las otras dos y tanto *Solamargina* como *Acnistina A*, inhibieron *E. faecalis*.

Palabras claves: Aislamiento de metabolitos, actividad antimicrobiana, extractos vegetales, inhibición celular.

www.bdigital.ula.ve

DEDICATORIA

Le doy Gracias primeramente a Dios Todopoderoso y a la Virgen, sin sus bendiciones jamás fuese posible alcanzar cada una de mis metas propuestas.

A mi abuelita querida, se que estarías muy orgullosa de mi. Te amaré por siempre.

A mi madre amada y colega favorita por su apoyo continuo, cada consejo tuyo hacen de mi lo que soy ahora. Te amo.

A mi padre, Gracias siempre. Espero te sientas orgulloso. Te amo.

A mi hermano, espero te sirva de motivación. Eres un pilar fundamental en mi vida. Te adoro.

A mi tía Luz, Guille, Abuelo y a toda mi familia por su gran ayuda y buenos consejos. Los quiero.

A mi novio, por estar ahí en cada momento. Te amo.

Karla Vivas

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por cada consejo dado, son lo mejor en mi vida. Gracias.

A mi profesor Bernardo Chataing por su paciencia, ayuda, y dedicación constante, fueron varios años de trabajo y amistad, siempre lo voy a recordar por lo especial que fue. Un Dios le pague.

A la Lcda. Alida Pérez, Lcda. Darly Villalobos, Lcdo. Joel Lara, Profesor Luis Rojas y al Profesor Bernardo Chataing por los extractos vegetales y compuestos puros gentilmente cedidos para esta investigación.

A la Lcda. María Nieves por el aporte de las bacterias utilizadas en el proyecto.

A la profesora Sarelle Carrero por su gran colaboración.

Al profesor Luis Rojas por la ayuda prestada.

A la Prestigiosa Universidad de Los Andes por ser la casa de estudio, donde fui formada académica, moral y éticamente.

A la Sra. Mercedes, Marisa, Ramón, Yelitza y demás amigos. Los quiero.

A todos quienes fueron parte de este triunfo, gracias por sus palabras de motivación. ¡Un Dios les pague!

INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE CONTENIDO	I
INDICE DE FIGURAS	II
INDICE DE TABLAS	II
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Historia de plantas con fines medicinales	6
2.1.1. Estudios de plantas venezolanas	6
2.1.2. Otros usos populares de plantas en Venezuela y las Antillas ..	8
2.2. Aislamiento de fracciones de plantas utilizando solventes como medio de extracción	9
2.3. Susceptibilidad de microorganismos a agentes químicos y términos biológicos para la determinación de su efectividad	10
2.4. Técnicas para determinar la actividad antibacteriana	11
2.4.1. Método de difusión con pozos	11
2.4.2. Método de difusión en agar con disco	12
2.4.3. Determinación del porcentaje de inhibición celular detectada con Resazurina	14
2.5. Ficha Bibliográfica de las bacterias en estudio	18
2.6. Ficha Bibliográfica de algunas plantas en estudio	20
3. HIPÓTESIS	26

4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo general	27
4.2. Objetivos específicos	27
5. SISTEMA DE VARIABLES	28
5.1. Variables a controlar	28
6. MATERIALES Y METODOS	29
6.1. Diseño experimental	29
6.2. Materiales	30
6.2.1. Material Vegetal	30
6.2.2. Cepas bacterianas	32
6.2.3. Reactivos	32
6.2.4. Equipos e Instrumentación	33
7. METODOLOGIA	34
7.1. Extracción y preparación de extractos vegetales	34
7.2. Preparación de las concentraciones de los extractos	38
7.3. Preparación de los compuestos puros	39
7.4. Evaluación de actividad antibacteriana	40
7.4.1. Preparación de cultivos bacterianos	40
7.5. Técnicas para determinar la actividad antibacteriana	41
7.5.1. Método de difusión en Agar con disco	41
7.5.2. Determinación cualitativa de la actividad antibacteriana y determinación de la MIC por medio del uso de Resazurina	42

8. RESULTADOS Y DISCUSION	44
9. CONCLUSION	58
10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	60
11. ANEXOS	71

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Método de difusión con pozos.....	12
Figura 2. Medida de la densidad óptica de los estándares de McFarland.....	13
Figura 3. Método de difusión en agar con disco.....	13
Figura 4. Aplicación de un método para evaluar la proliferación celular en líneas celulares.....	14
Figura 5. Absorbancia de la Resazurina a diferentes longitudes de onda.....	16
Figura 6. Fluorescencia. Espectro de emisión de Alamar Blue.....	16
Figura 7. Absorbancia de Alamar Blue.....	17
Figura 8. Identificación bacteriana.....	18
Figura 9. <i>Petrea aspera</i> Turcz.....	20
Figura 10. <i>Vitacea cissus sicyoides</i>	21
Figura 11. <i>Ocimum basilicum</i>	22
Figura 12. <i>Lepechinia bullata</i>	23
Figura 13. <i>Solanum torvum</i>	24
Figura 14. <i>Munnozia senecionidis Benth</i>	25
Figura 15. Cálculo de las Concentraciones del Compuesto a Utilizar.....	38
Figura 16. Organización de la placa de 96 huecos.....	43
Figura 17. Método Resazurina en placa de 96 huecos.....	43

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad antimicrobiana de los extractos vegetales frente a las cepas bacterianas por el método de difusión en agar con discos.....	49
Tabla 2. Halos de Inhibición de los estándares de antibióticos sobre las cepas bacterianas.....	53
Tabla 3. Actividad antimicrobiana de los extractos vegetales frente a las cepas bacterianas por el método de difusión en agar con discos.....	54
Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los compuestos puros frente a las cepas bacterianas por el método de difusión en agar en discos.....	56
Tabla 5. Concentración inhibitoria mínima (MIC) de los extractos frente a las bacterias.....	57

ANEXOS

a. Densidad óptica de la actividad de los extractos sobre <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 19433 a 570 y 595 nm.....	71
b. Densidad óptica de la actividad de los extractos sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 a 570 y 595 nm.....	72
c. Densidad óptica de la actividad de los extractos sobre <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 a 570 y 595 nm.....	74
d. Densidad óptica de la actividad de los extractos sobre <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 a 570 y 595 nm.....	75
e. Densidad óptica de la actividad de los extractos sobre <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357 a 570 y 595 nm.....	76
f. Densidad óptica de la actividad de los extractos sobre <i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853 a 570 y 595 nm.....	77
g. Densidad óptica de los Blancos de tratamiento: Compuestos sin bacteria a 570 y 595 nm.....	78

1. INTRODUCCIÓN

Los seres vivos se relacionan con su ambiente y entre ellos mismos, por lo cual han desarrollado algunos sistemas de protección para su supervivencia, generando moléculas específicas para ello, y en otros casos, generando una serie de enfermedades, entre las cuales las más comunes son las producidas por los parásitos, las bacterias, los hongos y los virus. En el primer caso es conocida la generación de venenos animales en serpientes, alacranes, arañas, avispas e insectos, y en una diversidad de organismos como los peces y organismos marinos. Algunos ejemplos lo constituyen la utilización de tetrodoxina y saxitoxina, dos potentes neurotoxinas del *Takifugu*, pez globo a menudo conocido con el nombre japonés *Fugu*, que bloquea los canales de sodio y potasio; el veneno que poseen las medusas “aguamalas” que produce ardor y escozor de la piel; el veneno que contiene la cola de los rajiformes “pez raya”. En el caso de la flora, se han obtenido una serie de compuestos que presentan propiedades venenosas o curativas, como es el caso del curare (D-tubocarina) presente en la yuca amarga; neurotóxicos como es el caso de la cocaína, la marihuana y otros compuestos que afectan el sistema nervioso. Entre otros compuestos comunes se encuentran la cafeína y la nicotina (1,2).

Muchas medicinas utilizadas actualmente se derivan de la utilización de plantas como en el caso de la aspirina o ácido acetilsalicílico, que inhibe la síntesis de prostaglandinas; la artemisina para el tratamiento de la malaria; la digital, una mezcla de esteroides cardiotónicos derivados de *Digitalis purpurea* que mejora la contractibilidad del músculo cardíaco (1,2).

Aparte de ello, se presentan una serie de enfermedades degenerativas, que particularmente se desarrollan con el envejecimiento, tales como la aterosclerosis, *diabetes mellitus* y el cáncer en sus diversas manifestaciones. Esto ha conllevado a la producción de diversas drogas, la mayoría de ellas sintéticas, para coadyuvar al

tratamiento de tales enfermedades. Algunas de ellas han resultado exitosas pero otras han producido resultados poco alentadores. La estrategia actual es sintetizar drogas que actúen sobre un blanco específico de acción y/o en el análisis de productos naturales. Esta última opción representa una de las mayores estrategias para descubrir y desarrollar nuevas drogas. Una vez conocidos los compuestos naturales activos se trata de determinar cuál es su mecanismo de acción. En el primer caso, esta estrategia ha llevado a la síntesis de muchos nuevos compuestos, especialmente antibióticos, que han invadido la estantería moderna, pero que lamentablemente en muchas cepas bacterianas genera resistencia que las hacen de poca utilidad. En el caso de las plantas, su utilización con fines medicinales por poblaciones humanas data de milenios. La interdependencia hombre-planta ha ocupado un papel primordial en la salud humana, aún en nuestros días. El aislamiento de metabolitos de las mismas representa una de las mayores estrategias para descubrir y desarrollar nuevas drogas (1,2).

www.bdigital.ula.ve

Desde el siglo XVI, la descripción de la flora americana con fines medicinales fue objeto de interés. Uno de los reportes más antiguos para nuestro país es el de Fray Antonio Caulin en su “Historia de la Nueva Andalucía”, en donde reseña las plantas medicinales que utilizaban los indígenas de las Provincias de Venezuela y de Nueva Andalucía (3). En el siglo XIX, A. Ernst hace una reseña de algunas plantas medicinales venezolanas (4) y Pompa recopila los usos tradicionales de medicamentos indígenas a partir de 1820, que aparecen en un manual que todavía se sigue publicando y utilizando (5).

Durante el siglo XIX aparecieron otras obras importantes que describen las especies medicinales utilizadas en Venezuela, entre ellas el “Manual de Plantas Usuales de Venezuela” de H. Pittier (6); “Plantas Comunes de Venezuela” de L. Schnee (7); “Algunas Plantas Usadas en la Medicina Empírica Venezolana” de Delascio (8), “Medicina Tradicional Herbaria” de Albornoz (9) y “El Médico Botánico Criollo” de Grosourdy (10) que representa un compendio de los usos medicinales de las plantas

de la región del Caribe, desde Haití y las Antillas hasta Venezuela. Otros libros y publicaciones son más específicos y recogen el conocimiento popular de determinadas áreas o regiones del país, entre ellos están: Cumaná (11), que reporta unas 230 especies utilizadas como curativas en el Estado Sucre. en tanto que para el Estado Cojedes, los trabajos de Delascio (12) y Méndez (13), reportan el uso de unas 90 especies. Francisco Guánchez (14) ha publicado, una recopilación de plantas amazónicas de uso medicinal y mágico, que amplía aún más el horizonte de plantas investigadas en Venezuela por su actividad medicinal. Se postula que en el país viven unas 17.000 especies de plantas superiores, aunque cálculos más amplios estiman un máximo de 35.000 especies (14). Heywood y Davis (15), puntualizan 21.070 plantas diferentes, siendo este el valor de diversidad vegetal más reciente para nuestro país y que nos ubica entre los siete más diversos del mundo.

Con el transcurso de los años y en vista del incremento del número de casos de enfermedades conocidas, de la aparición de nuevas enfermedades y de la resistencia de organismos patógenos a las drogas comerciales existentes, se ha incrementado la investigación en compuestos naturales con la finalidad de buscar principios activos de origen natural en la lucha contra las mismas (16-18).

Actualmente, conociendo la clasificación de las plantas y su identificación por sus características externas, el hombre recurre a ellas para mejorar su salud, debido, entre otras cosas, a que son económicas, efectivas, de fácil manejo, de uso popular y existen fuentes históricas de principios activos con actividad biológica (19).

Según Poole (20), las plantas, tienen un metabolismo secundario muy diverso, por lo que pueden ser una fuente importante de sustancias para el descubrimiento de compuestos (aceites esenciales y extractos acuosos) con actividad antimicrobiana, antifúngica y sobre otros organismos de interés clínico. La razón de ello estriba en el

hecho de que las plantas han desarrollado evolutivamente muchos metabolitos secundarios con la finalidad de protegerse de agentes patógenos (21,22) y ambientales que puedan poner en riesgo su sobrevivencia.

Los registros de etnobotánica venezolana indican que muchas de las plantas autóctonas poseen alguna actividad biológica, y en ciertos casos, como hemos investigado en el laboratorio durante los últimos años, algunas plantas de la región (y del país) presentan actividad citotóxica, antibacteriana, antifungal y antiparasitaria. Nos planteamos las siguientes dudas: ¿Se podrá determinar este tipo de actividad en otras plantas recolectadas del estado Mérida?; ¿Qué bases podemos tener para escoger las plantas de interés?, Este segundo problema es complejo por el hecho de que no tenemos *a priori* evidencias firmes de la actividad biológica de las plantas, por lo cual la mejor metodología a utilizar es indagar en las referencias etnobotánicas y el uso que le dan las personas. Con estas evidencias, el paso posterior sería el de obtener información acerca de los principales metabolitos que posee la planta de acuerdo a la especie a la cual pertenece, ya que en cada especie existen metabolitos secundarios similares o con ligeros cambios en su estructura, que una vez extraídos por métodos químicos convencionales, pueden ser ensayados sobre diversos sistemas biológicos, tales como bacterias, hongos, virus, parásitos, células cancerosas, etc., para detectar alguna actividad biológica de interés medicinal.

El siguiente trabajo se hizo con la finalidad de detectar la actividad antimicrobiana de diferentes extractos vegetales y compuestos puros aislados de plantas, sobre seis cepas bacterianas, tanto Gram positivas como Gram negativas, aplicando los siguientes métodos: el primero, convencional, correspondiente a la difusión en agar con disco, con la finalidad de determinar el tamaño del halo de inhibición y consecuentemente el efecto inhibitorio de los extractos ensayados, y el segundo, la inhibición celular detectada con resazurina, para obtener la concentración inhibitoria mínima de forma cualitativa de los extractos y compuestos puros ensayados en el presente trabajo.

2. MARCO TEÓRICO

La medicina utilizada desde la antigüedad ha estado acumulando conocimientos prácticos, los cuales han sido transmitidos de generación en generación, por medios orales y escritos, por lo que hoy en día el uso de plantas medicinales constituyen una alternativa para preservar la salud (medicina homeopática), sobre todo en comunidades que están geográfica o culturalmente aisladas. Este tipo de medicina es aplicada en todos los países del mundo, por todas las clases sociales, en base a la credibilidad obtenida y transmitida de generación en generación, sobre sus capacidades curativas (23).

Al considerar a las plantas como fuente valiosa de drogas, es importante apreciar que la naturaleza es un campo de batalla donde las plantas han evolucionado durante millones de años logrando su sobrevivencia a través de la producción de compuestos bioactivos para su defensa. A pesar de que existen unas 1500 especies de plantas de uso medicinal reportadas en la literatura etnobotánica venezolana (24), muy pocas se han estudiado desde el punto de vista químico o de la actividad biológica de fracciones aisladas de sus extractos (25).

Muchas de las drogas medicinales utilizadas hoy en día son derivadas de especies vegetales provenientes de la selva tropical. Hasta el momento, poco más de un 1% de las especies tropicales han sido evaluadas para su uso medicinal; sin embargo, el 25% de las prescripciones comercializadas en los países occidentales, posee compuestos derivados de especies vegetales autóctonas de estas áreas (25). Por otra parte, los productos naturales han servido de plantilla para la síntesis de un gran número de nuevas drogas, desde la aspirina hasta la procaína (26).

La actividad de la plantas como coadyuvante en la salud humana, radica en la elaboración y almacenamiento de productos durante su crecimiento, debido al metabolismo secundario característico de las mismas. Dichos productos presentan al mismo tiempo principios activos y sustancias indiferentes o de lastre, que determinan

la facilidad de la adsorción de los primeros en el organismo (26). Casi siempre en la planta se encuentran varios principios activos, de los cuales uno de ellos determinaría la importancia de la especie para alguna aplicación (27).

En las últimas cuatro décadas, el hombre ha realizado innumerables estudios sobre sustancias provenientes de plantas superiores con actividad antimicrobiana, con la única finalidad de encontrar la cura de las enfermedades producidas por microorganismos resistentes a los antimicrobianos (28). De las sustancias presentes en las plantas pueden obtenerse extractos, ya sea en medio acuoso, metanólico y/o hexanólico, siendo efectivos contra un amplio espectro de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como levaduras y hongos (29).

Es importante resaltar que algunos compuestos naturales derivados de las plantas, pueden actuar como agente en la quimioterapia del cáncer. Algunos ejemplos son: el taxol, la vincristina, la vinorelbina, el tenipósito y varios análogos solubles en agua de la camptotecina (30). En el período comprendido entre 1981-2002, de las 877 pequeñas moléculas introducidas como nuevas drogas, 61% fueron modelados en base a productos naturales. Estos incluyen productos naturales directos tal y como son extraídos de la planta (6%), derivados de productos naturales (27%) y compuestos sintéticos diseñados en base a la estructura conocida de un producto natural (23%). En el caso de las drogas utilizadas para combatir el cáncer, 74% de compuestos antitumorales son de origen natural (31).

2.1. Historia de algunas plantas con fines medicinales

2.1.1. Estudios de plantas venezolanas

-*Croton cajucara*: Contiene dehidrocrotonina y tiene actividad anti-ulcerogénica (32), mientras que *Croton cuneatus* muestra actividad citotóxica (33).

-*Protium heptaphyllum*: En la resina se encontraron monoterpenos y fenilpropanoides: alfa-terpinolene, *p*-cimene, *p*-cimen-8-ol, limoneno y dillapiol. Su aceite esencial produce halos de inhibición de aproximadamente 1,5 cm de diámetro en las placas con agar donde crece *Nocardia* GAM-5 (34).

-*Solanum americanum* Miller es una planta herbácea que crece espontáneamente en los alrededores de la ciudad de Mérida y que está ampliamente distribuida sobre todo el territorio nacional; sus frutos contienen glicoalcaloides esteroidales de tipo espirosolano y/o solanidano con una elevada actividad biológica sobre diversos sistemas biológicos (35). Esta planta conocida ordinariamente como yerbamora, es utilizada especialmente por la población rural en forma de cataplasmas o zumos de las hojas, para curar la culebrilla, el impétigo y eczemas, tal como lo menciona Pompa en la página 254 de su libro (5), Pittier en la página 426 (6) y Roig (36). Las mezclas alcaloideas extraídas de esta planta han mostrado ser efectivas en el tratamiento de las diferentes manifestaciones de herpes, sin efectos tóxicos o colaterales visibles, al menos en el control rápido de los signos y síntomas clínicos de las lesiones herpéticas, y además parece tener un efecto inhibitorio sobre el virus (37,38).

La familia de las solanáceas, como la Solasonina y la Solamargina presentan actividad antifúngica (39), antiparasitaria contra *Trypanosoma cruzi* (40) y antitumoral (35, 41, 41), acciones que son potenciadas por combinaciones sinérgicas entre algunos de estos compuestos (35) y que incluso inhiben el melanoma B16/F1 en ratones con una baja toxicidad (43,44); la Solamarina inhibe el sarcoma 180 en ratones (45), y la Solamargina anteriormente expuesta, al combinarse de forma sinérgica con otros compuestos de la misma familia, posee propiedades antivirales contra el Herpes simple, zoster y genital sin efectos adversos sobre la piel (37,38).

-Las *acnistinas*, un tipo particular de lactonas esteroidales, de la familia de los whitanólidos presenta actividad antitumoral (46-49), antiparasitaria (50),

antiinflamatoria (51), citotóxica (52), inmunosupresora (53), antihiperlicemiantes (54) y antifúngica (55).

2.1.2. Otros usos populares de plantas en Venezuela y las Antillas

-Euforbio de hojas lineales (*Euphorbia linearis*): La leche abundante que sale por las cortaduras hechas en la corteza de esta mata, se aplica con mucha ventaja a las úlceras sifilíticas llamadas llaguitas para cauterizarlas (10).

-Brunsfelsia de América (*Brunsfelsia americana*): Sus frutos antes de la madurez son útiles contra las diarreas apiréticas o sin “calentura” (10).

-Llanten común o de Europa (*Plantago major*): Es usado para curar las contusiones o golpes y en caso de presentar hemorragias leves, las detiene (10).

-Crescencia cujete o totumo (*Crescentia cujete*): El cocimiento de la corteza interior inmediata a la madera se emplea en Venezuela, para combatir las diarreas mucosas vulgarmente llamadas “pujos” (10).

Un compendio del uso de plantas con propiedades medicinales utilizadas en el área del Caribe y Venezuela pueden obtenerse del libro el Médico Botánico Criollo de Grosurdy (10) y de plantas venezolanas en los textos anteriormente citados como los de Henri Pittier en su “Manual de Plantas Usuales de Venezuela” (6), “Plantas Comunes de Venezuela” de Schnee Ludwig (7), “Algunas Plantas Usadas en la Medicina Empírica Venezolana” de Francisco Delascio (8), y “Medicina Tradicional Herbaria” Américo Albornoz (9).

Vale destacar que los principios activos de las plantas no se distribuyen en forma homogénea por toda su anatomía, además que éstos oscilan según el hábitat de la misma, su recolección y preparación; por lo tanto los extractos se obtienen de alguna porción de la planta, ya sea la raíz, el tallo, las hojas, los frutos y/o las flores, que al

someterse a procesos químicos, permiten aislar compuestos característicos en forma concentrada, conservando sus propiedades químicas (27).

2.2. Aislamiento de fracciones de plantas utilizando solventes como medio de extracción.

Para separar y examinar el o los componentes de un extracto con una determinada actividad biológica, se procede inicialmente a realizar una extracción con diferentes solventes o combinaciones de solventes. En general se intentan separar los componentes polares del extracto con un solvente polar como el agua, luego se procede a tratar el remanente del extracto que no fue solubilizado en el sistema acuoso con un solvente o mezcla de solventes metanólicos y/o al final se procede a aislar del extracto aquellos componentes no polares utilizando solventes como el hexano, benceno u otro. Posteriormente, cada fracción del extracto es evaporada y liofilizada para eliminar el solvente y el sólido residual resultante se disuelve en un solvente o medio de cultivo adecuado. Las recomendaciones son las de utilizar dimetilsulfóxido (DMSO) que tiene una polaridad que permite la disolución de los mismos y a concentraciones menores de 5 % prácticamente no afecta las células, tanto bacterianas como animales o vegetales. En este punto debe tomarse en consideración la evaluación del sistema biológico en la presencia de este solvente para evitar que el mismo interfiera con el análisis. Se recomienda no exceder en un 10 % la presencia de este reactivo para las pruebas biológicas (56).

Una vez que el extracto sólido ha sido disuelto en DMSO, se procede a preparar diluciones del extracto en el medio biológico más adecuado. Si se pretenden utilizar células de mamíferos u otras, se utiliza medio RPMI y en el caso de las bacterias medio de dilución BHI (Infusión cerebro corazón) o Mueller-Hinton u otro medio adecuado y específico para su crecimiento. En algunos casos puede también ser

utilizado un medio salino fisiológico o una solución de Dulbecco fosfato a pH 7.0 (56).

2.3. Susceptibilidad de microorganismos a agentes químicos y términos biológicos para la determinación de su efectividad.

Debido a que no se puede predecir la susceptibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos, es necesario estudiar la sensibilidad de cada cepa a estas drogas, pudiéndose elegir entonces el agente apropiado (el más activo contra patógenos, el menos tóxico para el huésped, con las características farmacológicas apropiadas y el más económico), que proporcione mayores posibilidades de una evolución favorable en el paciente (57).

Los compuestos pueden proceder como agentes bactericidas o bacteriostáticos, lo cual se define de la manera siguiente:

Bactericidas: Son aquellas sustancias capaces de provocar la muerte bacteriana, y por consiguiente el proceso es irreversible. Algunos agentes antimicrobianos pueden ser bacteriostáticos y bactericidas, según la existencia de algunos factores, como lo es el tipo de bacteria, crecimiento celular, concentración del antibiótico (58).

Bacteriostáticos: Son aquellas sustancias que bloquean el desarrollo y la multiplicación de las bacterias pero no las lisan, por lo que al retirar el antimicrobiano su efecto es reversible (58).

Resistencia Bacteriana

La resistencia bacteriana a los antibióticos es una respuesta predecible y quizás inevitable del uso de antimicrobianos. La velocidad con la que surge y se extiende en poblaciones bacterianas está con frecuencia determinada por la cantidad de

antibióticos usados en un momento dado. Los tipos de resistencia son: resistencia natural, secundaria, mutacional y transferible (58).

2.4 Técnicas para determinar la actividad antibacteriana

Para la evaluación y valoración de actividad antimicrobiana de una sustancia de origen vegetal se utilizan diversos métodos, los cuales comprenden, entre otros, las técnicas de ensayo en placas de agar y diluciones en medios de cultivo (59).

2.4.1 Método de difusión con pozos

Es un método que emplea placas de petri estériles con agar Müeller – Hinton, sin solidificar. A cada placa se le coloca una plantilla perforada que produzca cinco pozos de 4mm de diámetro cada uno. Para la inoculación de las placas se preparan inóculos bacterianos o fungales aislando una pequeña cantidad de colonias, que luego son resuspendidas en solución salina fisiológica estéril al 0,85% de Cloruro de sodio hasta alcanzar la turbidez equivalente al patrón 0,5 McFarland. Posteriormente, las placas de petri previamente perforada son inoculadas en forma de césped por medio de hisopos estériles. Luego con una pipeta automática se procede a colocar el aceite esencial o extracto en los pozos, siguiendo un orden correlativo ascendente, en el sentido de las agujas del reloj. Una vez depositados los aceites o extractos se procede a sellar cada pozo con agar Müeller – Hinton para facilitar la difusión del aceite o extracto en las placas. Luego se dejan 5 minutos a temperatura ambiente para finalmente ser colocada en incubación aerobia a 37 °C durante 24 horas (Fig. 1). La efectividad del extracto se compara con la de discos de antibióticos o antifungales puros de concentración conocida (60).

El resultado positivo esta dado por la inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del pozo; en caso contrario se considera negativo o resistente (60).



Fig. 1.- Método de difusión con pozos. Tomado de Técnicas Inmunológicas.

<http://clasedeinmunologia2.blogspot.com/> (61).

www.digital.ula.ve

2.4.2 Método de difusión en agar con disco

Es el método de uso más frecuente en la valoración de actividad antimicrobiana de un aceite esencial o extracto acuoso por su comodidad, rápida lectura y economía (62).

Esta técnica basada en el método Kirby – Bauer modificado, consiste en la utilización de discos impregnados con la muestra a ensayar. En ella, se coloca una placa de petri con agar Müeller – Hinton en el caso de bacterias o agar Saboraud Dextrosa en el caso de levaduras. En la preparación de los inóculos de cada microorganismo, estos deben ajustarse al patrón de turbidez 0,5 McFarland (63).

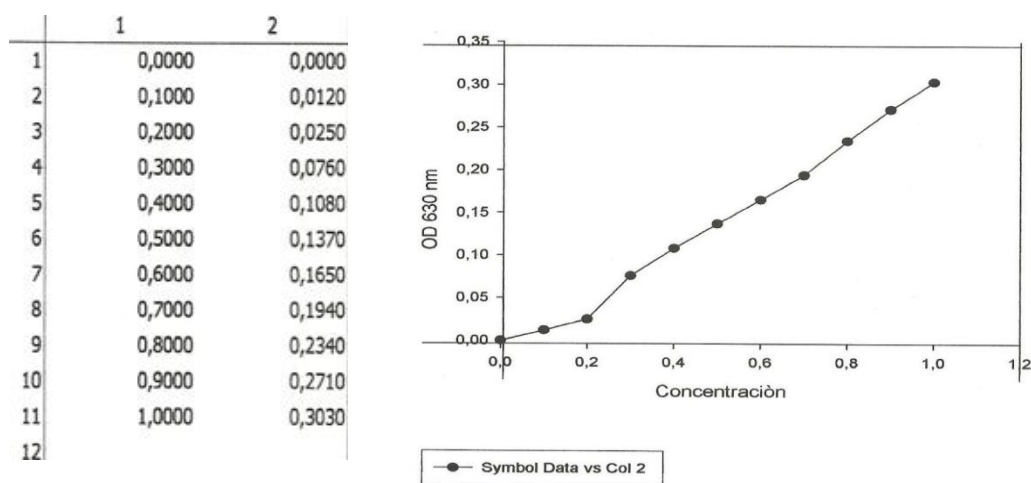


Fig. 2.- Medida de la densidad óptica de los estándares de McFarland. Tomada en el Laboratorio de Análisis de Compuestos naturales. ULA

La placa se siembra por estrías, con un hisopo estéril. A continuación sobre estas placas se coloca los discos de papel filtro (6 mm de diámetro), previamente impregnado con la concentración adecuada de los aceites esenciales o extractos acuosos, dejando al menos 2 cm de espacio entre cada uno de ellos (Fig. 3). Luego de una incubación a 37 °C durante 24 horas, se leen los halos de inhibición (64).



Fig. 3.- Método de difusión en agar con disco. Tomado en el Laboratorio de Análisis de Compuestos Naturales de la ULA.

2.4.3. Determinación del porcentaje de inhibición celular detectada con Resazurina

La Resazurina es un polvo blanco relacionado con compuestos heterocíclicos que contienen cromóforosoxazonas. Tiene aplicación práctica como colorante por su sensibilidad a la oxido-reducción. En forma de sal sódica es soluble en agua e insoluble en éter, su fórmula química es la sal de sodio de $C_{12}H_6NO_4^-$ y su peso molecular es de **251,18 g/mol**.

La Resazurina, al igual que otros métodos como el tratamiento con Alamar Blue y MTT/PMS (sal de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio / metasulfato de fenazina), permite cuantificar la proliferación de diferentes células animales, bacterias, micobacterias y hongos, ya que actúa como indicador de viabilidad celular no tóxica. En particular, este colorante (azul no fluorescente) se reduce en dos pasos, irreversiblemente a resorufina (rosado altamente fluorescente), y en una segunda etapa reversible, a dihidroresorufina, compuesto incoloro y no fluorescente, procesos que se asocian principalmente con la mitocondria de células viables (Fig. 4).

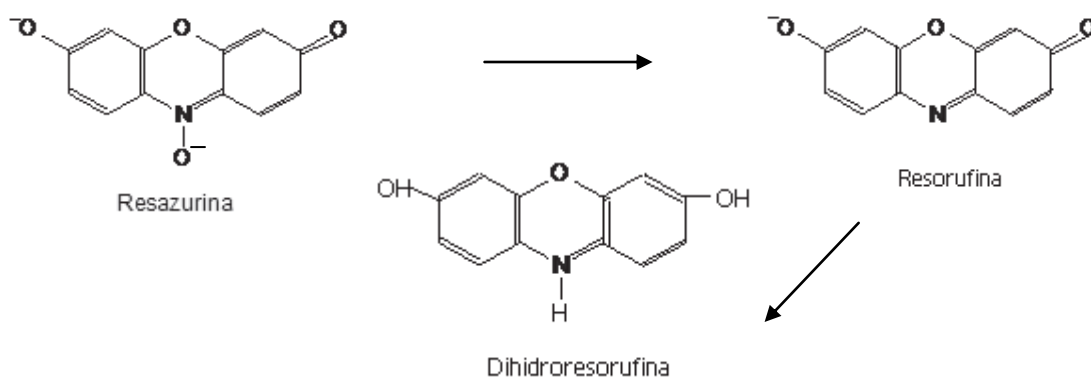


Fig. 4.- Aplicación de un método para evaluar la proliferación celular en líneas celulares. Tomado de Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica (65).

Sin embargo la transformación de color no siempre procede del azul al rojo o rosado fluorescente, ya que como lo expresan Atherton y Newlander en sus estudios de la calidad de la leche, las tonalidades pueden variar del azul, violeta acentuada, rosa oscuro, rosa blanquecino a Blanco (66).

La resorufina es difundida al medio permitiendo el continuo monitoreo de la proliferación y/o muerte celular (citotoxicidad) asociada al tratamiento con xenobióticos sobre células humanas, animales, bacterias, parásitos e incluso hongos; igualmente se emplea en la degradación de contaminantes como indicador redox, que combinada con otras técnicas sirve para obtener conocimientos fundamentales en los procesos biogeoquímicos.

Así, su empleo permite la continuidad de estudios en la misma población celular, economizando tiempo y dinero, especialmente en cultivos primarios donde las células son muy escasas y preciadas. Además, la determinación de la cantidad de células viables con este sistema de tinción es muy sensible y altamente reproducible (65).

Los datos pueden ser obtenidos a través de la instrumentación ya sea basado en la fluorescencia o absorbancia. La fluorescencia oscila entre 530 y 560 nm en estado excitado, y 590 nm durante la emisión (Fig. 5); mientras que la absorbancia se controla a 570 nm y 600 nm (Fig. 6 y 7) El mejor valor determinado en el laboratorio para medir la absorbancia parece ser 600 nm. Nuestros datos indican que la absorbancia medida a 570 nm no es una buena región para obtener resultados satisfactorios, lo cual difiere con los reportes de Alamar Blue (67).

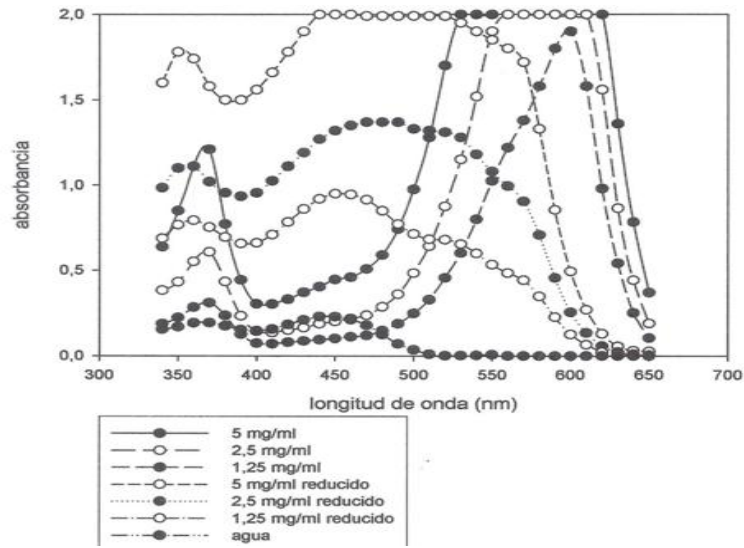


Fig. 5.- Absorbancia de la resazurina a diferentes longitudes de onda.

www.bdigital.ula.ve

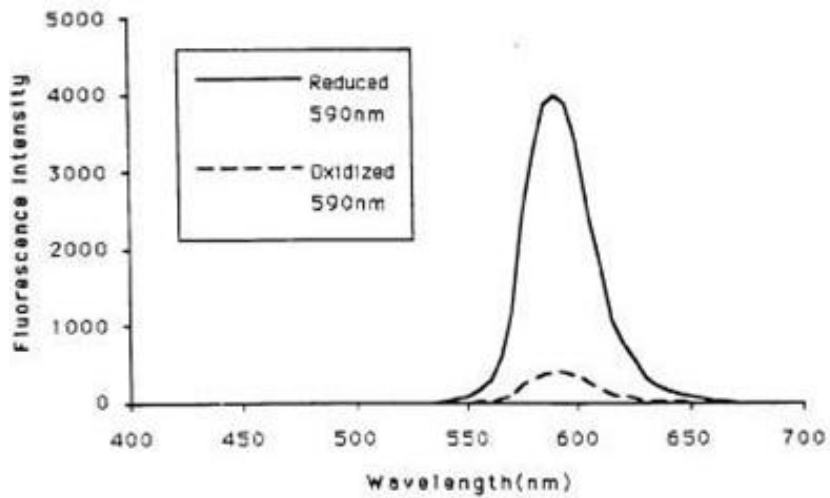


Fig. 6.- Fluorescencia. Espectro de emisión de Alamar Blue.

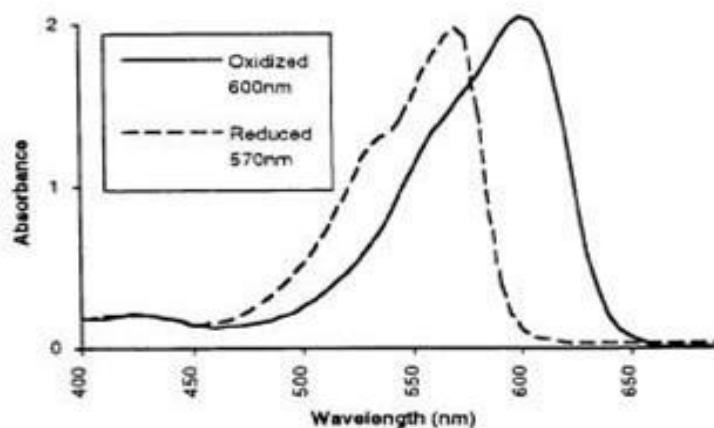


Fig. 7.- Absorbancia de Alamar Blue.

Esta prueba de sensibilidad se realiza en una placa de poli-estireno que contiene 96 celdillas. Una placa puede contener de 7 a 8 diluciones de 12 diferentes agentes antimicrobianos. Una celdilla sirve como control positivo (caldo más inóculo), y otro sirve como control negativo (sólo caldo). El volumen total en cada pozo es de 200 μL (68).

La determinación de la dosis inhibitoria mínima puede realizarse mediante tres métodos: El método visual que permite ver el cambio de coloración de azul a rojo o rosado (aún cuando se presentan variaciones, como en el caso de la leche); el método espectrofotométrico midiendo la absorbancia a 590-600 nm con 20 μL de una solución de 0,1 mg/ml de resazurina en agua, y el método fluorométrico midiendo la absorbancia a 550 y 590 nm con Alamar Blue (68).

El porcentaje de inhibición puede determinarse por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = (\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{muestra}} / \text{OD}_{\text{control}}) \times 100 \%$$

OD: Densidad óptica

2.5. Ficha Bibliográfica de las bacterias en estudio

Bacteria	Morfología	Coloración de Gram	Requerimientos de O ₂	Reacciones químicas
<i>Bacillus subtilis</i>	Bacilos	Gram positivos	Aerobio	Catalasa positiva
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos dispuestos en grupo	Gram positivos	Anaerobios facultativos	Catalasa positiva Coagulasa positiva
<i>Enterococcus faecalis</i>	Cocos dispuestos en cadenas o pares	Gram positivos	Anaerobio facultativo	Catalasa negativa
<i>Escherichia coli</i>	Bacilos	Gram negativos	Anaerobio facultativo	Oxidasa negativa Catalasa positiva Fermentan la glucosa y lactosa
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacilos	Gram negativos	Aerobios	Oxidasa negativa Fermentan la lactosa
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Bacilos	Gram negativos	Aerobios	Oxidasa positiva Catalasa positivo

Fig. 8.- Identificación bacteriana. Tomado del Manual de bacteriología general. ULA (69).

Algunos términos:

- **Tinción de Gram:** Revela la forma de la bacteria, agrupación y grupo taxonómico al que pertenece: Gram positivo o Gram negativo (70).
- **Prueba de catalasa:** El peróxido de hidrógeno constituye uno de los productos finales del metabolismo oxidativo de los carbohidratos, su acumulación en las células bacterianas puede ser letal para las mismas por lo que su descomposición y eliminación es vital para muchos microorganismos, los cuales producen la enzima catalasa (hemoproteína) que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Esta prueba se utiliza para diferenciar cocos Gram positivos de importancia médica y ayuda al estudio de algunas especies de microorganismos Gram positivos y Gram negativos (70).
- **Prueba de oxidasa:** Se basa en la producción bacteriana de una enzima citocromo oxidasa intracelular, la cual transfiere electrones al oxígeno, aceptor final en la cadena transportadora de electrones de ciertos microorganismos. Esta prueba es de gran utilidad para diferenciar las enterobacterias, la mayoría, negativas, de otras bacterias de importancia clínica como las pertenecientes al género *Pseudomonas* (70).
- **Prueba de coagulasa:** Se utiliza para diferenciar especies del género *Staphylococcus*, específicamente *Staphylococcus aureus*. La coagulasa es una enzima que posee actividad similar a la de la protrombina y es capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina lo cual resulta en la formación de un coágulo visible a simple vista (70).

2.6. Ficha Bibliográfica de algunas plantas en estudio

Nombre común: TOPOSTILLO

Nombre científico: *Petrea aspera* Turcz

Familia: Verbenaceae

Características anatómicas: Trepadoras o arbustivas de hasta 13 metros de alto, aromáticas. Tallos obtusamente cuadrangulares. Hojas decusado-opuestas de textura rugosa. Flores pediceladas.

Propiedades: Usadas en heridas infectadas, sangrado uterino (raíz), asma (hojas), tos (corteza), sarampión.

Partes usadas: Raíz, Hojas, Corteza (71).



Fig. 9.- *Petrea aspera* Turcz. Tomado de Manuplants: Taxa Matching your Search.

http://manuplants.org/species_search.php?Genus=Petrea (72).

Nombre común: TRIPAS DE VACA

Nombre científico: *Vitacea cissus sicyoides*

Familia: Vitacea

Características anatómicas: Arbusto de hasta 3 metros de largo. Hojas simples, de forma variable, a veces lobadas o profundamente partidas, de hasta 15 cm de largo y hasta 12,5 cm de ancho, puntiagudas de base variable. Flores pequeñas, blanco-verdosas, blancas, amarillas, o raramente rojas; pétalos triangulares a ovoides, 2 mm de largo.

Propiedades: Los tallos y especialmente la corteza se maceran con alcohol y se usan contra el reumatismo, las contusiones y úlceras.

Partes usadas: Corteza del tallo y hojas (73).



Fig. 10.- *Vitacea cissus sicyoides*. Tomado de Algunas malezas de Costa Rica y Mesoamérica. http://international_extension.ifas.ufl.edu/LaFlor/weeds-of-costa-rica/MALEZAS/Vitaceas/cissus-sicyoides.shtml (74).

Nombre común: ALBAHACA.

Nombre científico: *Ocimum basilicum*

Familia: Lamiaceae (Labiatae)

Características anatómicas: Hierba muy aromática que puede alcanzar hasta 50 cm de altura. Hojas pecioladas, opuestas ovaladas de borde finamente dentado y de color verde oscuro. Las flores están dispuestas en racimos y son de color blanco. Los frutos son cápsulas con dehiscencia espontánea.

Propiedades: Anti-diarreico, antiespasmódico gástrico, carminativo, digestivo, diurético, galactagogo, pectoral, sedante, antidiabético, antiasmático, antipirético, adelgazante.

Partes usadas: Hojas, flores, cogollos tiernos, ramas y semillas (75).



Fig. 11.- *Ocimum basilicum*. Tomado de Plantas aromáticas, cultivos en Huerto Orgánico. <http://www.plantasaromaticas.com.uy/albahaca.html> (76).

Nombre común: MATICO, SALVIA REAL.

Nombre científico: *Lepechinia sp.*

Familia: Labiatae

Características anatómicas: Planta herbácea de tallo decumbente, menores de 0,5 metros de altura. Flores de corola azul. Hoja astada-cordiforme en la base, cáliz no inflado globoso.

Propiedades: Digestiva, es buena para el mal aliento, inflamaciones gingivitis, contra las náuseas, espasmos intestinales.

Partes usadas: Hojas, Flores (77).



Fig. 12.- *Lepechinia bullata*. Tomado de flickr.

<http://www.flickr.com/photos/stationalpinejosephfourier/2083936102> (78).

Nombre común: HIERBA SOSA, PENDEJERA, BERENJENA CIMARRONA.

Nombre científico: *Solanum torvum*

Familia: Solanaceae

Características anatómicas: El arbusto tiene una altura de 2-3 metros y generalmente un solo tallo a nivel del suelo. Las ramas son gris-verde con pelusas. Las hojas están enfrentadas y son lobuladas. Las flores son blancas agrupadas en corimbos. Los frutos son bayas de color amarillo cuando maduran y contienen numerosas semillas.

Propiedades: En algunos lugares lo utilizan para envenenar a los ratones. Los extractos de la planta se utilizan para el tratamiento de la hiperactividad, los resfriados, la tos, las espinillas y la lepra.

Partes usadas: Hojas, flores (79).

www.bdigital.ula.ve



Fig. 13.- *Solanum torvum*. Tomado de Invasive.org, center for invasive species and ecosystems health. <http://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5159075>

(80).

Nombre común: COMPUESTAS

Nombre científico: *Munnozia senecionidis* Benth.

Familia: Asteraceae

Características anatómicas: Arbustos o hierbas con exudado lechoso. Las hojas pueden tener el envés con o sin pelos y las inflorescencias son solitarias o ampliamente ramificadas. Las flores exteriores de la inflorescencia tienen pétalos muy delgados y son generalmente de color amarillo o blanco.

Partes usadas: Hojas, Flores (81).



Fig. 14.- *Munnozia senecionidis* Benth. Tomado de Plantillustrations.org
[http://plantillustrations.org/species.php?id_species=683237
&language=English](http://plantillustrations.org/species.php?id_species=683237&language=English) (82).

3. HIPÓTESIS

Existen diversas plantas conocidas, como se ha indicado anteriormente, de las cuales una gran variedad de éstas pudieran presentar compuestos potencialmente citotóxicos hacia cepas bacterianas. El propósito es determinar cuáles de ellas presentan este tipo de actividad, para posteriormente aislar e identificar cada uno de los componentes puros y cuál es el responsable de la actividad biológica. El hecho de que un compuesto sea citotóxico hacia las bacterias, no indica ciertamente el que sea de utilidad para su uso como una droga medicinal. Para ello hay que realizar posteriores estudios toxicológicos, inicialmente en mamíferos roedores hasta en humanos.

www.bdigital.ula.ve

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la posible actividad citotóxica de extractos crudos y/o compuestos puros de plantas autóctonas de la región sobre determinadas cepas bacterianas.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Recolectar plantas autóctonas de la región andina.
- Preparar los extractos vegetales de las plantas en estudio, en medio acuoso, metanólico y hexanólico o en otro solvente conveniente, la mayoría de los cuales han sido procesados por investigadores del Instituto de Investigación o en nuestro laboratorio.
- Obtención de compuestos puros o parcialmente purificados, en el laboratorio, por investigadores del Instituto de Investigaciones, o de diferentes casas comerciales para determinar la posible actividad antibacteriana
- Preparar cultivos de diferentes cepas bacterianas.
- Determinar la actividad de los extractos, compuestos parcialmente purificados y puros, frente a las diversas cepas bacterianas, midiendo los halos de inhibición en placas de Petri preparadas con medio Mueller-Hinton y las cepas bacterianas en estudio.
- Establecer las condiciones óptimas (temperatura, tiempo de incubación y concentración de colorantes a utilizar) para el cálculo de la inhibición del crecimiento celular producido por los extractos y/o compuestos a experimentar en el presente proyecto.
- Determinar cualitativamente el valor de la MIC de los extractos, mediante el uso de la Resazurina.
-

5. SISTEMA DE VARIABLES

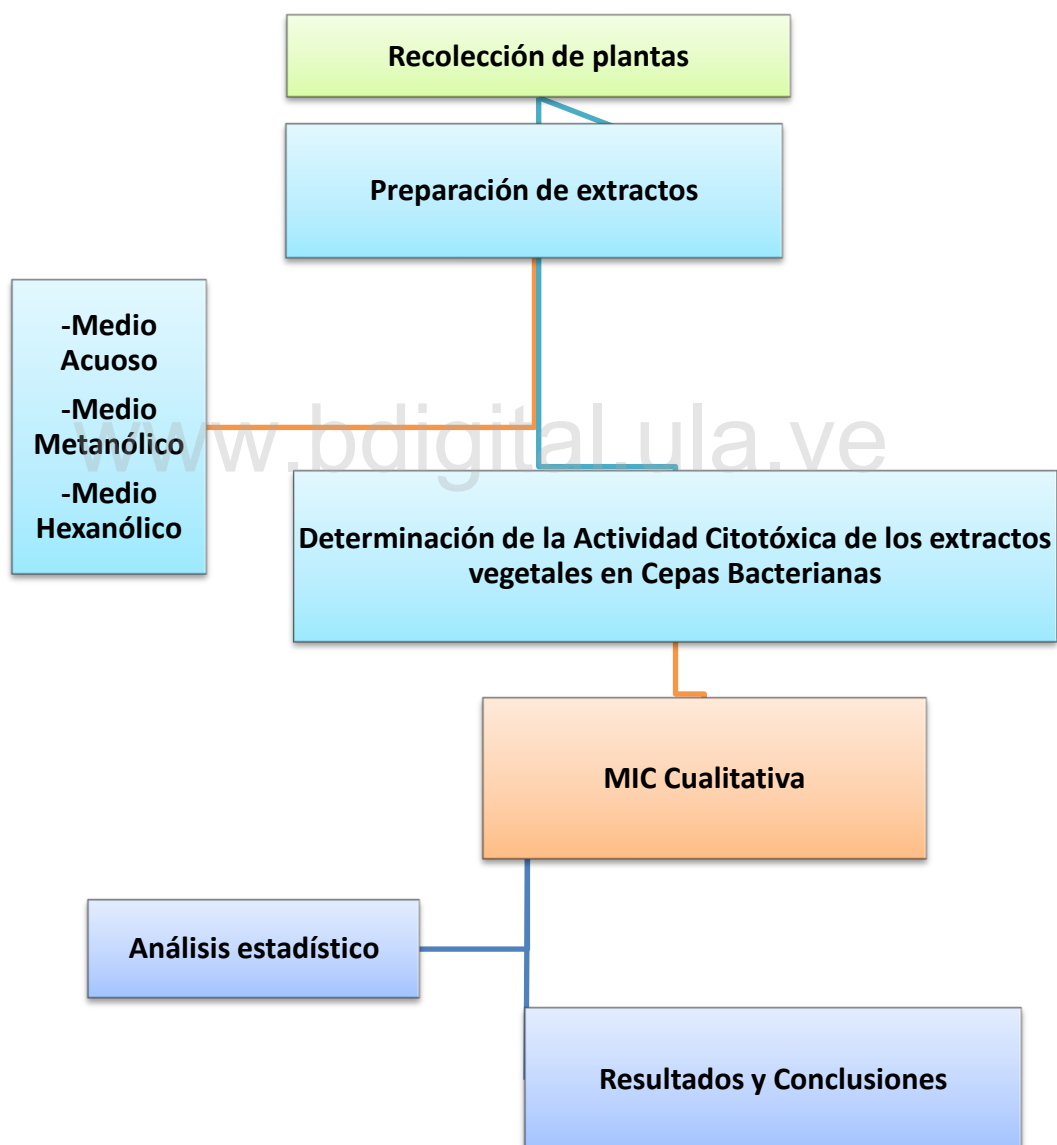
5.1. Variables a controlar

- Procesamiento de los extractos y compuestos.
- Cantidad y concentración de los extractos en los discos.
- Pureza de las bacterias.
- Crecimiento bacteriano.
- Técnicas para el tratamiento de las bacterias.
- Actividad citotóxica de los extractos sobre las bacterias.
- Sistema estadístico.

www.bdigital.ula.ve

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Diseño experimental



6.2. Materiales

6.2.1. Material Vegetal

Las plantas recolectadas en la localidad del estado Mérida fueron clasificadas y archivadas en el Jardín Botánico de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Las plantas, las fracciones de compuestos puros, y los compuestos puros a estudiar fueron los siguientes:

Plantas:

- *Vitacea cissus sicyoides*
- *Albahaca amarilla*
- *Albahaca morada*
- *Albahaca blanca*
- *Albahaca de monte*
- *Petrea aspera* Turcz
- *Stachitarpheta mutabilis*
- *Hypericum laricifolium*

Aportadas por la Lcda. Darly Villalobos, de la Escuela de Farmacia, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA.

- *Lepechinia bullata* (Fracciones de compuestos puros)
- *Lepechinia conferta*
- *Solanum bicolor*
- *Solanum hypomalacophyllum*

- *Solanum torvum*

Gracias al aporte hecho por la Lcda. Alida Pérez, del Instituto de Investigaciones de la Escuela de Farmacia, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA.

- *Carramboa badilloi*
- *Carramboa tachirensis*
- *Ocotea Macropoda*

Aportadas por el Profesor Luis Rojas, de la Escuela de Farmacia, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA.

- *Munnozia senecionidis Benth*

Cedidas por el Lcdo. Joel Lara, del Instituto de Investigaciones de la Escuela de Farmacia, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA.

Compuestos puros:

- *Acnistina L*
- *Acnistina A*
- *Acnistina E*
- *Tomatina*
- *Solanocapsina*
- *Horminona*
- *Solamargina*
- *Cacique*

Aportadas por el Dr. Bernardo Chataing, del Laboratorio de Análisis de Compuestos Naturales de la Escuela de Bioanálisis, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA.

6.2.2. Cepas Bacterianas

Las bacterias ATTC utilizadas fueron aportadas por la Lcda. María Nieves del Área de Preparación de medios de cultivos de la Escuela de Bioanálisis, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA, y estas fueron:

- *Bacillus subtilis*
- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Enterococcus faecalis*
- *Pseudomona aeruginosa*

6.2.3. Reactivos

- Resazurina, obtenida de Sigma Chemical Co.
- Eritromicina y Acido nalidíxico, obtenidos de Calbiochem
- Medio BHI (Infusión cerebro corazón)
- Medio Mueller-Hinton
- Estándar de McFarland
- Agua destilada estéril
- Alcohol
- Solución salina fisiológica estéril pH 7.0
- Medio RPMI 1640
- Solución fisiológica de Dulbecco

- Solventes orgánicos tales como hexano, etanol, dimetilsulfóxido.

6.2.4. Equipos e Instrumentación

- Campana de Flujo Laminar
- Espectrofotómetro
- Lector de Placas (ELISA) Biorad modelo 550
- Estufa
- Esterilizador
- Refrigerador
- Material de Vidrio estéril (Beakers, Tubos de ensayo, Placas de cultivo, Rastrillo, Pipetas volumétricas, Pipetas Pasteur, canoas de vidrio diseñadas en el laboratorio para toma de muestras)
- Pipetas automáticas
- Placas de 96 huecos
- Tips o puntas de pipetas

7. METODOLOGIA

7.1. Extracción y preparación de extractos vegetales

Se tomaron aproximadamente unos 250 g de la parte de la planta en estudio (raíz, tallo, hoja, flores, semilla), la cual fue secada en la estufa durante 48 horas. Una vez seca, se procedió a molerla en un mortero y posteriormente se le realizó el tratamiento de extracción con diferentes solventes, comenzando con hexano, seguido de metanol y luego con una solución de metanol-agua en proporción 7:3 v/v y finalmente se extrajeron en agua. Este procedimiento fue hecho a todas las plantas por separado. Una parte de la muestra vegetal pesada fue procesada con diferentes solventes comenzando con hexano y finalizando con la extracción en agua, mientras que la otra parte de la muestra vegetal se trató solamente con etanol.

- **Extracto hexanólico**

Una cantidad de la muestra vegetal seca y pesada se dejó en hexano durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se filtró para extraer la fracción líquida. Al precipitado se le agregó nuevamente el mismo solvente por 24 horas adicionales para obtener el segundo filtrado. Estos filtrados se mezclaron y se procedió a colocarlos en el rotavapor, donde se concentraron por presión reducida a una temperatura no mayor a 50 °C, hasta secar completamente.

- **Extracto metanólico**

Para obtener este extracto, el precipitado sólido remanente de la filtración obtenido de la extracción hexanólica, se colocó en metanol, siguiendo el mismo protocolo anteriormente señalado.

- **Extracto Metanol-Agua**

El sólido remanente de la filtración con metanol, se colocó en una solución de metanol-agua en la proporción 7:3 v/v, siguiendo el protocolo descrito anteriormente para su extracción.

- **Extracto Acuoso**

Utilizando el material remanente de la filtración en metanol-agua, se procedió a extraer con agua destilada, siguiendo el mismo protocolo anterior.

- **Extracto etanólico**

La otra fracción pesada del material vegetal fresco y seco, fue sometido a extracción en frío con etanol por 24 horas y luego, la solución obtenida fue concentrada en un rotavapor hasta eliminar el solvente y recuperar el sólido remanente.

Los concentrados de todos los extractos obtenidos, fueron colocados en frascos estériles y se llevaron a la estufa hasta su completo secado. Estos extractos concentrados fueron diluidos en dimetil sulfóxido (DMSO) para cada una de las pruebas. La concentración inicial de los extractos fue de 2 mg/ml en DMSO (56).

Los extractos usados fueron:

- *Vitacea cissus sicyoides*:
 - ✓ Extracto metanólico
- *Albahaca amarilla*:
 - ✓ Extracto metabólico

- *Albahaca morada:*
 - ✓ Extracto metanólico

- *Albahaca blanca:*
 - ✓ Extracto metanólico

- *Albahaca de monte:*
 - ✓ Extracto metanólico

- *Petrea aspera Turcz:*
 - ✓ Extracción con diclorometano

- *Stachitarpheta mutabilis:*
 - ✓ Extracto metanólico
 - ✓ Extracto con diclorometano

- *Hypericum laricifolium:*
 - ✓ Extracto con diclorometano

- *Carramboa badilloi:*
 - ✓ Extracto vegetal

- *Carramboa tachirensis:*
 - ✓ Extracto vegetal

- *Ocotea Macropoda:*
 - ✓ Extracto etanólico
 - ✓ Extracto metanólico
 - ✓ Extracto acuoso

- *Munnozia senecionidis Benth.*:
 - ✓ Extracto etanólico
 - ✓ Extracto metanólico
 - ✓ Extracto Acuoso

- *Solanum bicolor.*:
 - ✓ SBF: Extracto MeOH:H₂O (7:3 v) de frutos
 - ✓ SBFB: Fracción butanólica de los frutos
 - ✓ SBFC: Fracción clorofórmica de los frutos
 - ✓ SBH: Extracto MeOH:H₂O (7:3 v) de las hojas
 - ✓ SBH2: Fracción MeOH:H₂O (75:25 v) de las hojas
 - ✓ SBH3: Fracción MeOH:H₂O (50:50 v) de las hojas
 - ✓ SBH4: Fracción MeOH:H₂O (25:75 v) de las hojas
 - ✓ SBH5: Fracción MeOH:H₂O (100% MeOH) de las hojas

- *Solanum torvum.*:
 - ✓ ST: Extracto MeOH:H₂O (7:3v)
 - ✓ SAFB: Fracción MeOH:H₂O (50:50 v)
 - ✓ SAFC: MeOH:H₂O (100% MeOH)

- *Solanum hypomalacophyllum.*:
 - ✓ SHB: Extracto butanólico de las hojas
 - ✓ SHC : Extracto clorofórmico de las hojas

- *Lepechinia conferta.*:
 - ✓ LCH: Extracto metanol:agua
 - ✓ LCHB: Extracto butanólico
 - ✓ LCHA: Extracto de acetona

7.2. Preparación de las concentraciones de los extractos

Los extractos de las plantas fueron preparados a una concentración inicial de 2 mg/ml en DMSO. Para ello se tomaron 10 gr del extracto y se disolvieron en 5 ml de DMSO (dimetil sulfóxido) para obtener dicha concentración; a partir de ésta se realizaron diluciones seriadas con el medio RPMI 1640 en concentraciones desde 10 hasta 1000 µg/ml, las cuales fueron ensayadas en las bacterias como se indica en la siguiente figura.

Solución	Concentración (µg/ml)	Volumen de solución (µl)	Volumen de RPMI (µl)
A	2 mg/ml	4 ml DMSO	
B	150 µg/ml	750 µL sol A	4250
C	100 µg/ml	500 µL sol A	4500
D	75 µg/ml	375 µL sol A	4625
E	50 µg/ml	500 µL sol A	9500
F	25 µg/ml	125 µL sol A	4875
G	20 µg/ml	2000 µL sol E	3000
H	10 µg/ml	1000 µL sol E	4000
I	5 µg/ml	500 µL sol E	4500

Fig. 15.- Cálculo de las concentraciones del compuesto a utilizar.

7.3. Preparación de los compuestos puros

Se pesaron aproximadamente unos 3.000 g de cada una de las plantas a estudiar, los cuales fueron secados en la estufa a 40 °C durante una semana y luego molidos, obteniéndose el material listo para ser extraído en columna abierta con diferentes solventes, comenzando con hexano, seguido de acetona, butanol, metanol y luego con una solución de metanol-agua en proporción 7:3 v/v y finalmente se extrajeron en agua. Este proceso fue realizado a cada una de las plantas de las que se pretendía aislar componentes puros particulares de las mismas.

El material vegetal seco y molido, fue extraído hasta agotamiento durante varios días en una columna abierta con los solventes. Las soluciones provenientes de las extracciones se filtraron y luego se concentraron en un rotoevaporador a presión reducida a una temperatura no mayor a 45 °C.

Las fracciones de compuestos puros y modificados usados fueron:

- *Lepechinia bullata*:
 - ✓ APLH 135 AM: 3-acetil-ursolato de metilo. Extracto de acetona
 - ✓ APLH 135 M: Ursolato de metilo. Extracto de acetona. Hidrólisis en medio básico del compuesto APLH 135AM
 - ✓ APLH 24: Carnosol. Extracto de hexano
 - ✓ APLH 24A: 11,12-diacetil-carnosol. Extracto de hexano. Se tomó 50 mg del compuesto APLH 24 para realizar una reacción de acetilación obteniendo un rendimiento de 39 % (19,5 mg)
 - ✓ LBHH: Extracto de hexano de las hojas
 - ✓ LBHA: Extracto de acetona de las hojas

Los compuestos puros usados fueron:

- *Acnistina L*
- *Acnistina A*
- *Acnistina E*
- *Tomatina*
- *Solanocapsina*
- *Horminona*
- *Solamargina*
- *Cacique** (nombre de la persona que lo suministró. El nombre de la planta es mantenida en reserva)

7.4. Evaluación de actividad antibacteriana**7.4.1. Preparación de los cultivos bacterianos**

Las cepas bacterianas puras: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, y *Pseudomona aeruginosa*, fueron activadas agregándole medio BHI en forma líquida a los tubos con las bacteria. Luego de una hora, se tomó un inóculo de cada una de las bacterias y se sembró en medio de cultivo agar BHI en tubo, y se incubó a 36 °C por 24 horas, luego de lo cual se transfirió un pequeño inóculo a un tubo conteniendo solución salina fisiológica estéril (0,9%), ajustando a la turbidez del patrón 0,5 del estándar McFarland, el cual se midió a una longitud de onda de 630 nm en un espectrofotómetro Bausch-Lomb.

7.5. Técnicas para determinar la actividad antibacteriana

7.5.1. Método de difusión en Agar con disco

- a. Una vez ajustada la concentración bacteriana al patrón 0,5 de McFarland (aprox. 10^7 cfu/ml), se agregó un volumen de aproximadamente 500 μ L del mismo, en una placa de Petri con 20 ml de agar Mueller - Hinton solidificado, girando dicha placa sucesivamente en ángulos de 90° y utilizando un rastrillo estéril para la mejor dispersión. Luego se extrajo el líquido restante con una pipeta automática y se dejó secar el inóculo a temperatura ambiente durante algunos minutos (no más de 20 minutos).
- b. Se colocaron con una pinza estéril hasta 8 discos de papel de filtro en forma equidistante, presionándolos suavemente contra la superficie del agar, para seguidamente agregarle 6 μ L ya sea del extracto, compuesto parcialmente purificado o puro, a concentraciones diferentes por placa. Se utilizaron como controles el antibiótico correspondiente (Eritromicina para bacterias Gram positivas y Acido nalidíxico para Gram negativas) y DMSO.
- c. Se incubaron las placas a 36°C en una atmósfera aeróbica humidificada durante 24 horas, y posteriormente se realizó la lectura, utilizando una regla milimetrada para medir la zona clara (halo de inhibición) alrededor del disco, el cual corresponde con la inhibición del crecimiento bacteriano. La lectura se realizó con la placa invertida e iluminación directa evitando el reflejo de la luz.
- d. Se interpretaron los halos de inhibición, estableciendo la sensibilidad cuando se mostro ausencia de crecimiento bacteriano en un halo superior a los 8 mm y resistencia cuando no se produjo ninguna inhibición por el extracto para cada cepa estudiada (83).

7.5.2. Determinación cualitativa de la actividad antibacteriana y determinación de la MIC por medio del uso de Resazurina

- a. La concentración inhibitoria mínima (MIC) de los extractos vegetales en estudio, se determinó en: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, y *Pseudomona aeruginosa*.
- b. Estas cepas bacterianas se mantuvieron en medio BHI líquido, fueron incubadas a 36 °C en una atmósfera aeróbica humidificada durante 24 horas, y a partir de allí se tomó un inóculo para transferirlo a un tubo con solución salina fisiológica estéril ajustando a la turbidez del patrón 0,5 del estándar McFarland.
- c. Se eligieron los extractos a ensayar según los halos de inhibición obtenidos en la prueba de difusión en Agar con disco, hecha con anterioridad. En este caso, no se evaluó la MIC de los compuestos puros.
- d. Se organizó la placa de 96 huecos, y en los pozos correspondientes se agregaron 100 µL de las bacterias ajustadas, junto a 100 µL de los compuestos a concentraciones seriadas, según los requerimientos del estudio. Además se preparó el blanco y los controles, para finalmente incubar por 24 horas como lo indica la figura 16.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLANCO	200		µL		de		agua				200

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los extractos y compuestos puros obtenidos de las plantas recolectadas: *Vitacea*, *Albahaca amarilla*, *Albahaca morada*, *Lepechinia bullata*, *Solanum bicolor*, *Solanum hypomalacophyllum*, *Solanum torvum*, fueron probados en todas las cepas en estudio, obteniendo que las mismas mostraron diferente actividad antibacteriana (Tabla 1):

- Para *Bacillus subtilis* ATCC 19433, mostraron actividad inhibitoria los extractos de *Vitacea*, *Albahaca amarilla*, *Albahaca morada*, *Lepechinia bullata* APLH 135 M y LBHH, *Solanum bicolor* SBH2 y SBH5.
- Para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, presentaron actividad antimicrobiana los extractos de: *Vitacea*, *Albahaca amarilla*, *Albahaca morada* (excepto a concentraciones bajas; 50 µg/mL y 20 µg/mL), *Lepechinia bullata* APLH 135 AM, APLH 135M y APLH 24, *Solanum hypomalacophyllum* SHC y *Solanum torvum* ST, SAFB, SAFC.
- Para *Escherichia coli* ATCC 25922, los extractos *Vitacea*, *Albahaca amarilla*, *Albahaca morada* (excepto en concentraciones bajas, 50µg/mL y 20 µg/mL), *Lepechinia bullata* APLH 135M 100 µg/mL, *Lepechinia bullata* LBHH, *Solanum bicolor* SBH5, *Solanum hypomalacophyllum* SHC, *Solanum torvum* ST y SAFB, también presentaron actividad.
- Para *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, presentaron actividad antimicrobiana los extractos: *Vitacea*, *Albahaca amarilla*, *Albahaca morada*, las fracciones de *Lepechinia bullata* LBHH y LBHA, además de *Solanum torvum* SAFC.
- Para *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, mostraron actividad inhibitoria los extractos *Vitacea*, *Albahaca amarilla*, *Albahaca morada*, *Lepechinia bullata*

LBHA, las fracciones de *Solanum bicolor* SBFC y SBH5, y *Solanum torvum* SAFC.

- Para *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, los extractos *Vitacea*, *Albahaca amarilla*, *Albahaca morada*, *Lepechinia bullata* LBHH, *Solanum torvum* SAFC, de igual manera mostraron actividad.

Los antibióticos controles usados; eritromicina y ácido nalidíxico mostraron contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas, respectivamente, un halo de inhibición correspondiente al reportado en la literatura, que asegura la viabilidad de las mismas (84) (Tabla 2).

Asimismo se ensayaron otros extractos en *Bacillus subtilis* ATCC 19433, siendo éstos: *Petrea aspera*, *Hypericum laricifolium*, *Stachitarpheta mutabilis*, *Albahaca de monte*, *Albahaca blanca*, *Lepechinia conferta*, *Carramboa badilloi*, *Carramboa tachirensis*, *Ocotea Macropoda*, *Munnozia* (en medio acuoso, hexanólico, metanólico), demostrando que solo *Hypericum laricifolium*, las fracciones de *Lepechinia conferta* LCH y LCHA, y *Munnozia* en medio acuoso, presentan actividad inhibitoria (Tabla 3).

En este estudio se analizó la actividad de compuestos puros tales como *Acnistina* L, *Acnistina* A, *Acnistina* E, *Tomatina*, *Solanocapsina*, *Horminona*, *Solamargina*, y *Cacique* en las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, obteniendo como resultado que:

- Para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, todos los compuestos muestran inhibición.

- Para *Enteroccus faecalis* ATCC 19433, solo *Acnistina A*, *Solanocapsina* y *Solamargina*, presentan actividad antimicrobiana.
- *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853, en cambio fue resistente contra los compuestos, excepto para *Solanocapsina* que presenta una débil inhibición (Tabla 4).

Además para la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), mediante el método de microdilución y detección de actividad con Resazurina, se midió la densidad óptica a 570 y 595 nm utilizando un lector de placas (ELISA). Los extractos evaluados, fueron los que tuvieron actividad en el método de difusión en agar con discos (Ver anexos), y por consiguiente se determinó la MIC cualitativamente (Tabla 5).

El valor de la MIC realizada utilizando Resazurina como colorante de visualización, en observaciones de cambio de color, muestra que este valor es diferente para cada cepa bacteriana analizada. El valor de la MIC obtenido para *Vitacea* varía en un rango entre 75 a 1000 µg/ml dependiendo de la cepa bacteriana, con valores elevados para *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, intermedios para *P. aeruginosa* y *B. subtilis* y menores para *E. faecalis* (75 µg/ml); mientras que la *Albahaca amarilla* muestra valores muy elevados para la mayoría de las cepas bacterianas analizadas con un valor aproximadamente de 1000 µg/ml para *E. coli*, 500 µg/ml tanto para *K. pneumoniae* como para *P. aeruginosa* e intermedios para *B. subtilis* y *E. faecalis*.

Examen de los resultados obtenidos con las fracciones de *Lepechinia bullata* APLH 135 AM, APLH 135 M y APLH 24 indican valores de MIC de aproximadamente 500 µg/ml para *S. aureus*. El análisis de la MIC de *Albahaca morada* muestra valores

bajos, alrededor de 250 µg/ml para las anteriores cepas mencionadas (*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *Enterococcus faecalis*.), mientras que *Munnozia* (fracción acuosa) muestra un valor de MIC de 20 µg/ml para *B. subtilis*, lo cual es indicativo de que una purificación de esta fracción pudiera ser de gran utilidad para determinar cual componente en esta fracción es activo como antibiótico (Tabla 5).

En estudios realizados por otros investigadores (85,86) se ha determinado que los miembros de la familia Lamiaceae (Labiatae), tienen diversas propiedades médicas, entre ellas antifúngicas y antibacterianas, y según un estudio hecho por Acosta M. y colaboradores (60), cepas bacterianas (*K. pneumoniae* y *S. aureus*) fueron sometidas a la actividad inhibitoria de los aceites esenciales de especies vegetales del género *Ocimum* (perteneciente a la familia anteriormente mencionada), específicamente la especie *Ocimum basilicum* conocida como *Albahaca*, pudiéndose observar que el efecto inhibitorio contra las cepas probadas fue dependiente de la especie vegetal; resultado que pudimos confirmar en la presente investigación, en la que se observó la inhibición del crecimiento de las bacterias mencionadas.

Debemos resaltar que en los trabajos realizados por Amaro P. y Costa (87) en sus estudios de la actividad antiparasitaria de los extractos de las hojas de *Carramboa badilloi* y *Carramboa tachirensis*, y de los estudios de Arboleda y Suárez (88) de la actividad antiparasitaria contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana* de los extractos de dos especies de la familia Lamiaceae, así como los estudios de la actividad antiparasitaria de la especie *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Cham ex A.DC. (*Boraginaceae*) realizados por Betancourt (89) y otras pruebas realizadas en el laboratorio, utilizando los extractos de las plantas estudiadas en el presente trabajo, sobre *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana* para observar el efecto de los mismos como inhibidores del crecimiento, se encontró que tales extractos son activos

contra dichos parásitos, a excepción de la fracción acuosa de *Munnozia*, aún cuando, y a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, las fracciones metanólica y hexanólica de tal planta fueron activas contra los parásitos analizados.

Por otra parte, datos generados de la actividad de los compuestos puros como las *Acnistinas*, revelan que estas presenta actividad antiparasitaria contra *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania mexicana* y *Plasmodium falciparum* (50) y actividad antitumoral (49); mientras que los glicoalcaloides de *Solanaceas* como *Solamargina*, *Tomatina*, *Solanocapsina* presentan actividad antiparasitaria contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana* (40).

Debemos resaltar que *Solamargina* y otros glicoalcaloides aislados de *Solanum nigrum*, *Chaconina* de papa (45) y otros como *Tomatina* aislada de tomate y *Solanocapsina* muestran antitumoral (35), y *Solamargina* aislada de *Solanum nigrum* muestra actividad contra el Herpes simple, zoster y genital (37, 38).

Tabla 1. Halos de inhibición (mm) de los extractos vegetales frente a las cepas bacterianas utilizando el método de difusión en agar con discos.

Planta en estudio	BS +	SA +	EC -	EF +	KP -	PA -
Volumen (5 µL)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
<i>Vitacea</i>						
2 mg/mL	18	15	20	19	14	18
100 µg/mL	16	12	18	15	12	15
50 µg/mL	16	13	17	14	11	14
20 µg/mL	15	12	17	13	11	13
<i>Albahaca amarilla</i>						
2mg/MI	19	17	22	19	18	20
100 µg/mL	16	14	19	15	15	16
50 µg/mL	16	12	16	9	13	14
20 µg/mL	15	12	14	9	11	11
<i>Albahaca morada</i>						
2mg/mL	18	17	19	19	17	17
100 µg/mL	15	12	17	15	15	14
50µg/mL	14	-	-	14	11	14
20µg/mL	11	-	-	11	9	13

Planta en estudio	BS +	SA +	EC -	EF +	KP -	PA -
Volumen (5 μ L)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
<i>Lepechinia bullata</i>						
APLH 135 AM						
100 μ g/mL	-	13	-	-	-	-
50 μ g/mL	-	12	-	-	-	-
10 μ g/mL	-	9	-	-	-	-
<i>Lepechinia bullata</i>						
APLH 135 M						
100 μ g/mL	10	10	13	-	-	-
50 μ g/mL	9	10	-	-	-	-
10 μ g/mL	9	9	-	-	-	-
<i>Lepechinia bullata</i>						
APLH 24						
100 μ g/mL	-	10	-	-	-	-
50 μ g/mL	-	9	-	-	-	-
10 μ g/mL	-	8	-	-	-	-

Planta en estudio	BS +	SA +	EC -	EF +	KP -	PA-
Volumen (5 µL)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
<i>Lepechinia bullata</i>						
APLH 24 A						
100 µg/mL	-	-	-	-	-	-
50 µg/mL	-	-	-	-	-	-
10 µg/MI	-	-	-	-	-	-
<i>Lepechinia bullata</i>						
LBHH	11	13	9	10	-	9
LBHA	-	10	-	8	8	-
<i>Solanum bicolor</i>						
SBF	-	-	-	-	-	-
SBFC	-	-	-	-	8	-
SBH	-	-	-	-	-	-
SBH2	8	-	-	-	-	-
SBH3	-	-	-	-	-	-
SBH4	-	-	-	-	-	-
SBH5	9	-	9	-	10	-

Planta en estudio	BS +	SA +	EC -	EF +	KP -	PA -
Volumen (5 µL)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
<i>Solanum hypomalacophyllum</i>						
SHB	-	-	-	-	-	-
SHC	-	8	10	-	-	-
<i>Solanum torvum</i>						
ST	-	11	9	-	-	-
SAFB	-	9	17	-	-	-
SAFC	-	10	-	9	9	8

BS: *Bacillus subtilis* ATCC 19433.

SA: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

EC: *Escherichia coli* ATCC 25922.

EF: *Enterococcus faecalis* ATCC 19433.

KP: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357.

PA: *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853.

mm: halos de inhibición en milímetros.

El símbolo + o – en cada una de las abreviaturas de las bacterias, significa si la misma es Gram positivo o Gram negativo.

Tabla 2. Halos de Inhibición de los estándares de antibióticos sobre las cepas bacterianas.

Eritromicina					
BS+ (mm)		SA+ (mm)		EF+ (mm)	
32		33		33	
Ácido Nalidíxico					
EC- (mm)		KP- (mm)		PA- (mm)	
23		23		25	
Dimetil Sulfóxido					
BS	SA	EF	EC	KP	PA
-	-	-	-	-	-

www.bdigital.ula.ve

Tabla 3. Actividad antimicrobiana de los extractos vegetales frente a las cepas bacterianas por el método de difusión en agar en discos.

Planta en estudio	BS + (mm)	SA + (mm)	EC - (mm)	EF + (mm)	KP - (mm)	PA - (mm)
<i>Petrea aspera</i>	-					
<i>Hypericum laricifolium</i>	7					
<i>Stachitarpheta mutabilis</i>	-					
<i>Albahaca de monte</i>	-					
<i>Albahaca blanca</i>	-					
<i>Lepechinia conferta</i>						
LCH	10					
LCTB	-					
LCHA	6					
<i>Carramboa badilloi</i>						
CBHH	-					
<i>Carramboa tachirensis</i>						
CTEH	-					
<i>Ocotea Macropoda</i>						
OMM 2mg/mL	-					
OMH 2mg/mL	-					
OMA 2mg/mL	-					

Planta en estudio	BS +	SA +	EC -	EF +	KP -	PA -
Volumen (5 µL)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
Munnozia Acuoso						
2 mg/mL	19					
100 µg/mL	15					
75 µg/mL	14					
50 µg/mL	12					
25 µg/mL	10					
20 µg/mL	10					
10 µg/mL	9					
Munnozia Metanol						
2 mg/mL	-					
100 µg/mL	-					
75 µg/mL	-					
50 µg/mL	-					
25 µg/mL	-					
20 µg/mL	-					
10 µg/mL	-					
Munnozia Hexano						
2 mg/mL	-					
100 µg/mL	-					
75 µg/mL	-					
50 µg/mL	-					
25 µg/mL	-					
20 µg/mL	-					
10 µg/mL	-					

NOTA: Los espacios en blanco significan que la planta no fue probada sobre esa bacteria.

Tabla 4. Actividad antimicrobiana de los compuestos puros frente a las cepas bacterianas por el método de difusión en agar en discos.

Planta en estudio Volumen (5 µL)	BS + (mm)	SA + (mm)	EC – (mm)	EF + (mm)	KP – (mm)	PA – (mm)
<i>Acnistina L</i> 2 mg/mL		11		-		-
<i>Acnistina A</i> 2 mg/mL		10		8		-
<i>Acnistina E</i> 1 mg/mL		8		-		-
<i>Tomatina</i> 2 mg/mL		8		-		-
<i>Solanocapsina</i> 1 mg/mL		8		10		7
<i>Horminona</i> 1 mg/mL		9		-		-
<i>Solamargina</i> 3 mg/mL		10		11		-
<i>Cacique</i> 2 mg/mL		9		-		-

NOTA: Los espacios en blanco significan que la planta no fue probada sobre esa bacteria.

Tabla 5. Concentración inhibitoria mínima (MIC) de los extractos frente a las bacterias.

PLANTA	BACTERIA	MIC (mg/dL)
<i>Vitacea</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	250
	<i>Staphylococcus aureus</i>	1000
	<i>Escherichia coli</i>	1000
	<i>Enteroccus faecalis</i>	75
	<i>Klepsiella pneumoniae</i>	1000
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	500
<i>Albahaca amarilla</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	500
	<i>Staphylococcus aureus</i>	500
	<i>Escherichia coli</i>	1000
	<i>Enteroccus faecalis</i>	250
	<i>Klepsiella pneumoniae</i>	250
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	500
<i>Albahaca morada</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	250
	<i>Enteroccus faecalis</i>	250
	<i>Klepsiella pneumoniae</i>	250
	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	250
<i>Munnozia H₂O</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	20
<i>Lepechinia bullata</i> APLH 135 M	<i>Staphylococcus aureus</i>	500
<i>Lepechinia bullata</i> APLH 135 AM	<i>Staphylococcus aureus</i>	500
<i>Lepechinia bullata</i> APLH 24	<i>Staphylococcus aureus</i>	500

NOTA: En los anexos se muestran los valores de la determinación del MIC individual de cada uno de los extractos sobre las bacterias en estudio, y las de los compuestos solos.

9. CONCLUSION

- Los extractos obtenidos a partir de las plantas *Vitacea* y *Albahaca amarilla* demostraron ser los más efectivos, ya que a concentraciones de 20 µg/mL, inhibieron el crecimiento bacteriano de todas las cepas en estudio. Por esta razón sería conveniente seguir estudiando sus comportamientos, para lograr que sean utilizadas como nuevos agentes antimicrobianos, teniendo en cuenta de que deben ser más activos contra los patógenos y menos tóxicos para el huésped.
- Otra de las plantas que demostró ser eficaz para la inhibición de todas las bacterias fue *Albahaca morada*, aun cuando para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, se logró obtener actividad a concentraciones mayores de 50 µg/mL.
- Para los otros extractos obtenidos de las demás plantas, se observó que algunas de las fracciones obtenidas de los mismos, lograron tener actividad contra varias de las bacterias estudiadas, pero no en todas, lo que pudiera indicar alguna selectividad en el tipo de inhibición.
- Los extractos vegetales de *Munnozia* en medio acuoso, hexanólico y metanólico probados en *Bacillus subtilis*, mostraron que el extracto acuoso fue el activo. En contraste, las fracciones metanólica y hexanólica revelan una carencia de actividad; lo cual pudiera ser indicativo de que la fracción acuosa presenta uno (s) compuesto (s) con actividad antibacterial.

- Se demostró, que de los compuestos puros ensayados en *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomona aeruginosa*, todos mostraron inhibición sobre la primera bacteria mencionada, mientras que *Solanocapsina* inhibió el desarrollo de las otras dos y que tanto *Solamargina* como *Acnistina A*, actuaron sobre *Enterococcus faecalis*.
- También se logró utilizar la Resazurina como colorante en cultivos bacterianos, en un método de fácil manipulación y bajo costo para permitir el monitoreo de la proliferación y/o muerte celular (citotoxicidad) observado por el cambio de color, producido por los extractos y compuestos puros en las cepas bacterianas en este estudio. Es importante resaltar que se necesitan estudios posteriores, para conseguir las condiciones más adecuadas en el uso de dicho colorante, y así poder obtener la concentración inhibitoria mínima de forma cuantitativa.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Castillo A. 1995. El uso medicinal de los árboles del bosque húmedo del Río Cataniapo, estado Amazonas, Venezuela. *Acta Botánica Venezolana*. 15: 41-54.
2. Fernández A, Milano B, Gonto R, Williams B. 2000. Ponencia presentada en el III Congreso Ecuatoriano de Botánica, Quito.
3. Caulín F. 1777. Historia de la Nueva Andalucía. Estudio preliminar por Pablo Ojer, s.j. Ediciones de la Biblioteca Nacional de las Historias. Fuentes para la Historia Colonial de Venezuela, Caracas. 81: 82.
4. Ernst A. 1883. Obras Completas. Volumen I, Botánica (Compilación de B. Bruni-Celli, 1976). Fundación Venezolana para la Salud y la Educación, Caracas.
5. Pompa G. 1974. Medicamentos Indígenas. Editorial América, Miami. 14-311.
6. Pittier H. 1978. Manual de las plantas usuales de Venezuela y su suplemento. Fundación Eugenio Mendoza, Caracas. 7-620.
7. Schnee L. 1984. Plantas comunes de Venezuela. Ediciones de la Biblioteca de la UCV, Caracas. 5-806.
8. Delascio F. 1985. Algunas plantas usadas en la medicina empírica venezolana. Dirección de Investigaciones Biológicas. División de Vegetación. Jardín Botánico. Inparques, Caracas.

9. Albornoz A. 1992. Medicina tradicional herbaria. Guía de fitoterapia. Instituto Farmacoterápico Latino S.A. División de Fitoterapia y Productos Naturales, Caracas. 5-573.
10. Grosurdy R. 1864. El Médico Botánico Criollo. Paris: Libreria de Francisco Brachet, Vol. 1: Tomo I: 43-77.
11. Cumana J, Cabeza P. 1997. Etnobotánica de angiospermas medicinales en el estado Sucre, Venezuela., Caracas.
12. Delascio-Chitty, F. 1994. Nuevas adiciones para la flora del estado Cojedes, Venezuela, coleccionadas en el Hato Piñero. Acta Terramaris. 7: 8-18.
13. Méndez G, Stergios B, González A. 1997. Etnobotánica en la región del macizo rocoso de El Baúl, estado Cojedes, Venezuela. BioLlania. Cap. 13: 6796.
14. Guánchez F. 1999. Plantas amazónicas de uso medicinal y mágico. Fundación Polar, Caracas. 13-233.
15. Heywood V, Davis S. 1997. Introduction. En: Centers of Plant Diversity. A Guide and Strategy for their Conservation. WWF, IUCN y The World Conservation Union.
16. Yang S, Cragg M, Newman J, Bader P. 2001. Natural Product-Based Anti-HIV Drug Discovery and Development Facilitated by the NCI Developmental Therapeutics Program. Journal Naturals Products. 64: 265-277.
17. Huber O, Duno R, Riina Stauffer F, Pappaterra L, Jiménez A, Llamozas S, Orsini G. 1998. Documentos técnicos de la estrategia nacional de diversidad biológica. MARNR, Caracas.

18. Chang C, Doongs S, Tsai I, Chen I. 1997. Coumarins and anti- HBV constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. *Phytochemistry*. 45: 1419-1422.
19. Garrot L. 1985. Antibiótico. Salvat editores, España. 1: 97.
20. Poole K. 2001. Overcoming antimicrobial resistance by targeting resistance mechanisms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 53: 283–295.
21. Toledo M. 1993. La diversidad Biológica de México. Nuevos retos para la investigación en los noventas. *Ciencias UNAM*. 34: 43–59.
22. Zabaras D, Wyllie S. 2001. The Effect of Mechanical Wounding on the Composition of Essential Oil from *Ocimum minimum* L. Leaves. *Molecules*. 6: 79-86.
23. Rosil C, Arias G, Lozano N. 2002. Evaluación antimicrobiana y fotoquímica de *Lepechinia mellen walp* 'salvia'. *Ciencia e investigación*. 1:5.
24. MARN. 2000. Primer informe de Venezuela sobre diversidad biológica. Caracas: Oficina Nacional de Diversidad Biológica.
25. Farnsworth N. 1988. Screening plants for new medicines. In: Peter EOWaFM, ed. *Biodiversity*. Washington: National Academy Press. 1: 83-97.
26. Trace E. 1989. *Farmacognosia*. México.
27. San Martín R. 1968. *Farmacognosia con Farmacodinamia*. Editorial Científica Médica, España. 141-225.

28. Mantilla J, Sanabria A. 1985. Actividad antibacteriana de plantas superiores colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*. 4: 25-33.
29. Cattaneo A. (s.f). Rincón del vago. Recuperado el 27 de enero de 2012, de <http://html.rincondelvago.com/aceitesesenciales.html>.
30. Cragg G, Newman D. 1999. Discovery and development of anti-neoplastic agents from natural sources. *Cancer investigation*. 17: 153-63.
31. Newman D, Cragg G, Snader K. 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*. 66: 1022-37.
32. Hiruma C, Spadari R, Grassi D. 1999. Antiulcerogenic mechanisms of dehydrocrotonin, a diterpene lactone obtained from *Croton cajucara*. *Planta Médica*. 65: 325-30.
33. Suarez A, Blanco Z, Delle F. 2004. Three new glutarimide alkaloids from *Croton cuneatus*. *Natural product research*. 18: 421-6.
34. Mendez R, Serrano J, Chataing B, Jiménez D, Mora D, Rojas L. 2007. Estudio Comparativo de la Actividad Biológica del aceite esencial *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March y el Aceite esencial *Lippia organoides* Hbk Sobre tres especies de *Nocardia sp.* *Salud & Desarrollo Social*. 2: 57-60.
35. Chataing B. 2004. *Activities Biologiques de Composés Naturels Purifiés de Plantes Vénézuéliennes*. Tesis Doctoral en Biología. Université de Montpellier, Francia.

36. Roig J. 1974. Plantas Medicinales, Aromáticas y Venenosas de Cuba. Ciencia y Técnica. Instituto de Libro. La Habana. 722-723.
37. Chataing B, Buitrago N, Concepción J, Usubillaga A. 1996. Estudio Clínico de la Efectividad de Extractos Alcaloideos obtenidos de los Frutos de *Solanum americanum* Miller sobre el Herpes simplex, Herpes zoster y Herpes genitalis. Revista de la Facultad de Farmacia. ULA. 32: 18-21.
38. Chataing B, Buitrago de Cristancho N, Usubillaga A. 2001. Tratamiento tópico del Herpes simple, Herpes zoster y Herpes genital con una mezcla de alcaloides de Solanáceas. MedULA. 7: 30-35.
39. Fewell A, Roddick J, Weissenberg M. 1994. Interactions between the glycoalkaloids solanine and solamargine in relation to inhibition of fungal growth. Phytochemistry. 37: 1007-1011.
40. Chataing B, Concepción J, Lobaton L, Usubillaga A. 1998. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth by *Solanum* alkaloids. A comparison with ketoconazole. Planta Médica. 64: 31-36
41. Cham B, Meares H. 1987. Glycoalkaloids from *Solanum sodomaeum* are effective en the treatment of skin cancer in man. Cancer Letters. 36: 111-118.
42. Cham B, Gilliver M, Wilson L. 1987. Antitumor effects of glycoalkaloids isolated from *Solanum sodomaeum*. Planta Médica. 1: 34-36.
43. Al Chami L. 1996. Efecto Farmacológico de la acción de *Solamargina* sobre ratas "wistar" sanas y su efecto sobre el melanoma B16/F1 inoculado en ratones C57BL/6. Tesis de licenciatura en Bioanálisis. ULA.

44. Al Chami L, Méndez R, Chataing B, O'Callaghan J, Usubillaga A, LaCruz L. 2003. Toxicological Effects of α -solamargine in Experimental animals. *Phytotherapy Research*. 17(3): 254-258.
45. Kupchan S, Barboutis S, Knox C. 1965. β -Solamargine: tumor inhibitor isolated from *Solanum dulcamara*. *Science*. 150: 1827-1828.
46. Bargagn P, Hamza A, Kim Y. 2007. The Tumor Inhibitor and Antiangiogenic Agent Withaferin A Targets the Intermediate Filament Protein Vimentin. *Chemistry & biology*. 14(6): 623-34.
47. Mulabagal V, Subbaraju G, Rao C. 2009. Withanolide sulfoxide from Aswagandha roots inhibits nuclear transcription factor-kappa-B, cyclooxygenase and tumor cell proliferation. *Phytotherapy Research*. 23(7): 987-992.
48. Budhiraja R, Sudhir G, Gard K. 1984. Antiinflammatory activity of 3- β -hydroxy-2,3-dihydro-withanolide F. *Planta Médica*. 50(2): 134-136.
49. Chataing B, Usubillaga A, Pérez M, Méndez C. 2009. La actividad citotóxica de acnistinas sobre células cancerosas humanas. *Ciencia*. 17(2): 113-123.
50. Chataing B, Hocquette A, Diaz S, Valentin A, Usubillaga A. 2009. Activity of acnistins against *Leishmania mexicana*, *Trypanosoma cruzi* and *Plasmodium falciparum*. *Ciencia*. 17(1): 25-32.
51. Hsieh P, Huang Z, Chen J, Chang F, Wu C, et al. 2007. Cytotoxic withanolides from *Tubocapsicum anomalum*. *Journal Natural Products*. 70(5): 747-753.

52. Luis J, Echeverri F, García F, Rojas M. 1994. The structure of acnistin B and the immunosuppressive effects of acnistin A, B and E. *Planta Médica*. 60(4): 348-350.
53. Maurya R. 2008. Synthesis, Characterization and Antiamoebic Activity of Benzimidazole Derivatives and Their Vanadium and Molybdenum Complexes. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 18(24): 6534-6537.
54. Choudary M, Parveen Z, Jabbar A, Ali I, et al. 1995. Antifungal steroidal lactones from *Whitania coagulance*. *Phytochemistry Research*. 40(4): 1243-1246.
55. Malik F, Singh J, Khajuria A, Suri K, et al. 2007. A standardized root extract of *Withania somnifera* and its major constituent withanolide-A elicit humoral and cell-mediated immune responses by up regulation of Th1-dominant polarization in BALB/c mice. *Life Science*. 80(16): 1525-1538.
56. Jiménez G, Hasegawa M, Rodríguez M, Estrada O, Méndez J, Castillo A, González F, Motta N, Vásquez, J, Romero E. 2001. Biological screening of plants of the Venezuelan Amazons. *Journal of Ethnopharmacology*. 77: 77-83.
57. Aurore S, Abaul J, Bourgeois P, Luc J. 1998. Antibacterial and antifungal activities of the essential oils *Pimenta racemosa* P. Miller (J. W. Moore) (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*. 10: 161-164.
58. Fernández P. 2008. Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica*. Editorial Médica Panamericana. 46: 793-797.
59. Janssen A, Scheffer J, Baerheim A. 1987. Antibacterial activity of essential oils. *Planta Médica*. 53: 395-398.

60. Acosta M, González M, Araque M, Velazco E, Khouri N, Rojas L, Usubillaga A. 2003. Composición química de los aceites esenciales de *Ocimum basilicum L. var basilicum*, *O. basilicum L. var purpurens*, *O. gratissimum L.*, y *O. enuiflorum l.* y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multiresistentes de origen nosocomial. *Revista de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis*. 45: 19-24.
61. Blogger. 2007. Técnicas Inmunológicas. Recuperado el 5 de febrero de 2012, de <http://clasedeinmunologia2.blogspot.com/>
62. Vilariño R. 1988. *Prontuario microbiológico*. Caracas, Venezuela. Disinlimed, C.A. 1: 231-261.
63. Gracia C, Correa E, Rojas N. 1991. Estudio fitoquímico preliminar y evaluación antimicrobiana de algunas plantas superiores colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*. 23: 42-48.
64. Lynch M, Raphael S, Mellor L, Spare L, Inwood M. 1988. *Métodos de laboratorio*. Editorial México Interamericana. 2: 1001-1013.
65. Escobar L, Aristizábal F. 2010. Aplicación de un método fluorométrico para evaluar la proliferación celular en líneas celulares tumorales. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 17: 2173-180.
66. Atherton H, Newlander J. 1977. *Dye Reduction Tests: Methylene Blue and Resazurin*. Chemistry and Testing of Dairy Products. 4th Edición. AVI, Westport, CT.
67. Uptima. UptiBlue Viable Cell Counting Kit. *Patente n° FT-669412*.

68. Baker C, Stocker S, Culver D, Thornsberry C. 1991. Comparison of the E test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *Journal Clinical Microbiology*. 29: 533-538.
69. Ramírez A, García E, Longa A, Sánchez K, Nieves M, Velasco J, Araque M, Mosqueda N. 2006. Identificación de los microorganismos. *Manual práctico de bacteriología general*. 12: 149-152.
70. Ramírez A, García E, Longa A, Sánchez K, Nieves M, Velasco J, Araque M, Mosqueda N. 2006. Otras reacciones metabólicas útiles para la identificación bacteriana. *Manual práctico de bacteriología general*. 11: 131-138.
71. Willmann D, Heinrich M. 2000. Flora del Valle de Tuacacán-Cuicatlán. *Verbenaceae J. St.-Hil.* 27: 44-45.
72. Manuplants: Plants of Manu National Park. 2012. *Verbenaceae Petrea aspera* Turcz. Recuperado el 7 de febrero de 2012, de http://manuplants.org/species_search.php?Genus=Petrea
73. Lombardi J. 2000. *Vitaceae-Generos Ampelocissus e Cissus*. *Flora Neotropica*. Monograph 80. The New York Botanical Garden.
74. Institute of food and agricultural sciences, university of Florida. 2011. *Vitáceas: Cissus sicyoides*. Recuperado el 7 de febrero de 2012, de http://international_extension.ifas.ufl.edu/LaFlor/weeds-of-costa-rica/MALEZAS/Vitaceas/cissus-sicyoides.shtml

75. Gil R, Carmona J. 2003. Herbolario Tradicional Venezolano. 1era edición. Editorial Consejo de Publicaciones ULA. Mérida Venezuela. 11-218.
76. Plantas aromáticas, Cultivos en Huerto Orgánico. 2011. *Albahaca*. Recuperado el 7 de febrero de 2012, de <http://www.plantasaromaticas.com.uy/albahaca.html>
77. Cegarra J, Soriano P, Costa M, Lluch A, Martinez I. 2006. Especies medicinales y tóxicas del género *Lepechinia willd* (Labiatae) en Venezuela. Revista de Fitoterapia. 6(2): 155-159.
78. Flickr. 2007. *Lepechinia bullata*. Recuperado el 7 de febrero de 2012, de <http://www.flickr.com/photos/stationalpinejosephfourier/2083936102>
79. Wikipedia La enciclopedia libre. 2011. *Solanum torvum*. Recuperado el 24 de Abril de 2012, de http://es.wikipedia.org/wiki/Solanum_torvum
80. Invasive.org. 2007. *Solanum torvum*. Recuperado el 7 de febrero de 2012, de <http://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=5159075>
81. La Greca M. Asteraceae (*Compositae Tubuliflorae*). Dipartimento di Biologia. Università di Catania. Recuperado el 24 de Abril de 2012, de http://www.dipbot.unict.it/sistematica_es/Aste_fam.html
82. Plantillustrations.org. 2012. *Munnozia senecionidis Benth*. Recuperado el 24 de Abril de 2012, de http://plantillustrations.org/species.php?id_species=683237&language=English

83. Velasco J, Araque M, Araujo E, Longa A, Nieves B, Ramírez A, Sánchez K, Velasco E. 2008. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Manual práctico de bacteriología clínica. 2: 27-29.

84. Ramírez A, García E, Longa A, Sánchez K, Nieves M, Velasco J, Araque M, Mosqueda N. 2006. Prueba de difusión del disco y control de calidad. Manual práctico de bacteriología general. 14: 172-173.

85. Vega Montalvo, R. y Carrillo Domínguez, C. 1997. Efectos sobre la motilidad intestinal y toxicidad aguda oral del extracto fluido de *Ocimum gratissimum* L. (Orégano Cimarrón). Rev. Cubana Planta Médica. 2:14-18.

86. García, D., Pupo, S., Crespo, M. y Fuentes, L. 1998. Estudio farmacognóstico de *Ocimum gratissimum* L. (orégano cimarrón). Rev. Cubana Planta Médica. 3:31-36.

87. Amaro Y, Costa M. 2011. Determinación de la actividad antiparasitaria de los extractos obtenidos de las hojas de *Carramboa badilloi* y *Carramboa tachirensis*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

88. Arboleda L, Suárez L. 2011. Determinación de la actividad antiparasitaria contra *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania mexicana* de los extractos obtenidos de dos especies de la familia *Lamiaceae*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

89. Betancourt J. 2011. Determinación de la actividad antiparasitaria de la especie *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Cham. Ex A.DC. (*Boraginaceae*) de los Andes Venezolanos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes.

11. ANEXOS

- a. Densidad óptica de la actividad de los extractos sobre *Bacillus subtilis* ATCC 19433 a 570 y 595 nm.

<i>Bacillus subtilis</i> Vitacea			<i>Bacillus subtilis</i> Albahaca amarilla		
µg/mL	570nm	595nm	µg/mL	570nm	595nm
20	0,547	0,589	20	0,655	0,608
25	0,648	0,626	25	0,670	0,624
50	0,707	0,661	50	0,676	0,681
75	0,662	0,633	75	0,661	0,689
100	0,647	0,630	100	0,662	0,723
250	0,523 *	0,573 *	250	0,631	0,688
500	0,480	0,661	500	0,871 *	0,984 *
1000	0,483	0,642	1000	1,122	1,244

<i>Bacillus subtilis</i> Albahaca morada			<i>Bacillus subtilis</i> Munnozia H ₂ O		
µg/mL	570nm	595nm	µg/mL	570nm	595nm
20	0,853	0,540	20	0,986 *	0,345 *
25	0,613	0,531	25	1,014	0,350
50	0,669	0,653	50	1,072	0,412
75	0,636	0,609	75	0,989	0,546
100	0,670	0,660	100	0,764	0,739
250	0,672 *	0,531 *	250	0,971	0,394
500	0,643	0,700	500	0,607	0,596
1000	0,619	0,748	1000	0,592	0,625

* = Cambio aparente del color

b. Densidad óptica de la actividad de los extractos sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a 570 y 595 nm.

<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Vitacea</i>			<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Lepechiniabullata</i> APLH 135AM		
µg/mL	570nm	595nm	µg/mL	570nm	595nm
20	0,585	0,669	20	1,192	0,521
25	0,565	0,622	25	1,118	0,526
50	0,578	0,627	50	0,963	0,509
75	0,559	0,622	75	0,938	0,466
100	0,568	0,692	100	0,887	0,494
250	0,521	0,680	250	0,776	0,575
500	0,521	0,669	500	1,195 *	0,553 *
1000	0,509 *	0,629 *	1000	0,507	0,594

<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Albahaca amarilla</i>			<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Lepechiniabullata</i> APLH 135M		
µg/mL	570nm	595nm	µg/mL	570nm	595nm
20	0,659	0,743	20	1,053	0,380
25	0,630	0,730	25	1,066	0,586
50	0,615	0,716	50	0,927	0,571
75	0,598	0,674	75	0,867	0,668
100	0,619	0,744	100	0,864	0,730
250	0,867	0,999	250	0,886	0,755
500	1,117*	1,275	500	1,032 *	0,444
1000	1,531	1,677	1000	0,546	0,623

<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Lepechiniabullata</i> APLH 24		
µg/MI	570nm	595nm
20	1,096	0,543
25	0,942	0,573
50	0,904	0,528
75	0,934	0,454
100	0,827	0,841
250	0,719	0,766
500	1,155 *	0,423 *
1000	0,505	0,616

* = Cambio aparente de color

www.bdigital.ula.ve

- c. Densidad óptica de la actividad de los extractos sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 a 570 y 595 nm.

<i>Escherichia coli</i> Vitacea			<i>Escherichia coli</i> Albahaca amarilla		
µg/mL	570nm	595nm	µg/mL	570nm	595nm
50	0,648	0,540	50	0,620	0,530
75	0,646	0,554	75	0,640	0,517
100	0,641	0,538	100	0,648	0,543
250	0,819	0,383	250	0,818	0,505
500	0,741	0,361	500	0,825	0,544
1000	0,583 *	0,541 *	1000	0,642 *	0,624 *
2000	0,505	0,536	2000	0,666	0,684
4000	0,653	0,631	4000	0,924	0,843

En concentraciones menores no hubo cambio de color, por lo tanto se probó a mayor concentración.

* = Cambio aparente del color

- d. Densidad óptica de la actividad de los extractos sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 a 570 y 595 nm.

<i>Enterococcus faecalis</i> Vitacea			<i>Enterococcus faecalis</i> Albahaca amarilla		
µg/mL	570nm	595nm	µg/mL	570nm	595nm
20	0,876	0,453	20	0,845	0,378
25	0,892	0,408	25	0,861	0,379
50	0,857	0,429	50	0,886	0,389
75	0,834 *	0,363 *	75	0,918	0,399
100	0,846	0,385	100	0,929	0,399
250	0,887	0,315	250	1,172*	0,399
500	0,967	0,291	500	1,178	0,405
1000	0,723	0,600	1000	0,849	0,894

<i>Enterococcus faecalis</i> Albahaca morada		
µg/mL	570nm	595nm
20	1,264	0,671
25	1,275	0,563
50	1,184	0,679
75	1,001	0,367
100	0,970	0,371
250	1,137 *	0,368
500	1,032	0,300
1000	0,806	0,679

* = Cambio aparente del color

- e. Densidad óptica de la actividad de los extractos sobre *Klepsiella pneumoniae* ATCC 23357 a 570 y 595 nm.

<i>Klepsiella pneumoniae</i> Vitacea			<i>Klepsiella pneumoniae</i> Albahaca amarilla		
µg/mL	570nm	595nm	µg/mL	570nm	595nm
20	0,942	0,462	20	0,855	0,538
25	0,972	0,383	25	0,979	0,416
50	0,960	0,468	50	0,922	0,515
75	0,725	0,548	75	0,776	0,574
100	0,754	0,596	100	0,885	0,657
250	0,960	0,225	250	1,137 *	0,444
500	1,012	0,319	500	1,118	0,760
1000	0,637*	0,666*	1000	0,820	0,869

<i>Klepsiella pneumoniae</i> Albahaca morada		
µg/mL	570nm	595nm
20	1,274	0,755
25	1,295	0,582
50	0,568	0,357
75	0,891	0,461
100	0,801	0,593
250	0,974 *	0,403*
500	1,079	0,295
1000	0,740	0,745

* = Cambio aparente del color

f. Densidad óptica de la actividad de los extractos sobre *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 a 570 y 595 nm.

<i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>Vitacea</i>			<i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>Albahaca morada</i>		
µg/mL	570nm	595nm	µg/mL	570nm	595nm
20	0,951	0,437	20	1,367	0,726
25	0,948	0,453	25	1,351	0,644
50	0,782	0,631	50	0,935	0,568
75	0,724	0,648	75	0,732	0,672
100	0,711	0,656	100	0,718	0,675
250	0,528	0,358	250	0,983 *	0,303 *
500	0,712 *	0,623 *	500	0,832	0,599
1000	0,651	0,698	1000	0,703	0,781

<i>Pseudomona aeruginosa</i> <i>Albahaca amarilla</i>		
µg/mL	570nm	595nm
20	0,931	0,548
25	0,921	0,508
50	0,932	0,551
75	0,763	0,666
100	0,856	0,774

* = Cambio aparente del color

- g. Densidad óptica de los Blancos de tratamiento: **Compuestos sin bacteria** a 570 y 595 nm.

Blancos de tratamiento		
<i>Vitacea</i>		
$\mu\text{g/mL}$	570nm	595nm
100	0,658	0,760
500	0,567	0,676
2000	0,453	0,636

Blancos de tratamiento		
<i>Albahaca amarilla</i>		
$\mu\text{g/mL}$	570nm	595nm
100	0,623	0,719
500	0,694	0,793
2000	0,597	0,760

Blancos de tratamiento		
<i>Albahaca morada</i>		
$\mu\text{g/mL}$	570nm	595nm
100	0,613	0,703
500	0,585	0,688
2000	0,574	0,748

Blancos de tratamiento		
<i>Lepechinia bullata: APLA 135 AM</i>		
$\mu\text{g/mL}$	570nm	595nm
100	0,647	0,720
500	0,658	0,754
2000	0,863	0,978

Blancos de tratamiento		
<i>Lepechinia bullata</i> : APLA 135 AM		
µg/mL	570nm	595nm
100	0,620	0,692
500	0,603	0,637
2000	0,478	0,665

Blancos de tratamiento		
<i>Lepechinia bullata</i> : APLA 24		
µg/mL	570nm	595nm
100	0,649	0,732
500	0,586	0,655
2000	1,134	1,306

Blancos de tratamiento		
<i>Munnozia</i> H₂O		
µg/mL	570nm	595nm
100	0,624	0,702
500	0,529	0,628
2000	0,542	0,698