



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS CLÍNICO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
DR. ALFREDO NICOLÁS USUBILLAGA DEL HIERRO**



**ESTUDIO FITOQUIMICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS
EXTRACTOS DE *Gmelina arborea* (Verbenaceae) CONTRA CEPAS
GRAM POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS.**

Trabajo de Grado para Optar al Título de Licenciados en Bioanálisis

Autores:

Barrios Zambrano Daniel Alejandro

Bastidas Arias Simón Andrés

Tutor:

Prof. Johanna Hernández

Mérida, marzo 2020

DEDICATORIA

Primeramente, a Dios que me brindó la oportunidad de llegar hasta acá e iluminarme en todo momento y guiarme en el camino para siempre y darme la fuerza necesaria para superar cada obstáculo darme salud y vida y ser mi guía día a día.

A mis Padres que siempre fueron mi pilar fundamental en cada momento y apoyarme siempre de mi vida y mi carrera, ser mi fuente de inspiración y motivación para seguir siempre adelante haciendo un esfuerzo inalcanzable para ver cumplir todas mis metas. Los amo.

A mi hermana que a pesar de la distancia me ha acompañado en cada momento bueno y amargo en mi vida, gracias a ella pude ver culminada mi carrera y siempre confiar en mí y ayudarme en mantenerme enfocado en mi meta.

A mis amigos por brindarme esa amistad incondicional apoyo y cariño, por ser nobles de corazón y ser siempre esa grata compañía a largo de la vida.

A mi compañero de tesis Daniel Alejandro por siempre y ayudarme a superar cada obstáculo y percance ser también un gran apoyo para mí.

A mis hermanos de toda la vida Jean Alejandro y Jonathan Prieto por jamás dejarme solo y ser grandes personas en mi vida y un punto de apoyo cuando más los necesitabas gracias hermanos.

A mi novia Marycarmen Mora por ser una persona humilde y sincera que me apoya en todo lo que hago, por jamás abandonarme aun en mis peores momentos, por hacerme alguien mejor y más fuerte, infinitas gracias por la espera, ayudarme, apoyarme por ser mi compañía en este camino, por creer siempre en mí y en mis capacidades, por seguir siempre junto a mí en las buenas y en las malas. Te amo

Simón Bastidas

DEDICATORIA

Primero que nada, a Dios por guiarme, acompañarme y permitirme siempre gozar de buena salud para poder lograr todas las metas propuestas, siempre a mi lado en cada momento de mi vida colocándome en el momento y lugar exactos. Gracias Dios.

A la memoria de mi padre Luis Gerardo Barrios, quien en vida me brindó su apoyo incondicional y con su ejemplo de constancia y perseverancia hoy he aprendido a luchar por todas las cosas que me proponga gracias mi viejo.

A mi mamá María Zulay Zambrano que más que madre a sido mi amiga y compañera incondicional y hoy le agradezco enormemente haber dedicado su vida a nuestra crianza impartiendo buenos valores y educación desde pequeño y siempre velando por nuestro bienestar gracias a ti hoy he logrado muchas cosas importantes. Te amo.

A mi hermana María Alejandra por acompañarme en este camino y no dejarme nunca sólo, brindarme su apoyo para enfocarme en lo que quiero y nunca desfallecer.

A mi familia Barrios ya que desde un principio me abrieron las puertas y siempre me han apoyado durante este momento de mi vida.

A mi familia Zambrano que nunca me ha abandonado y siempre he contado con tu apoyo incondicional.

A mis hermanos de carrera Simón, Luis David, Luis Emiro y José Luis porque desde un comienzo han estado a mi lado brindándome su amistad y su apoyo

Daniel Barrios

AGRADECIMIENTOS

A la Ilustre Universidad de Los Andes y a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por acogernos en su espacio e impartir en nosotros valores humanos, académicos y profesionales de sus excelentes profesores para nuestra formación durante este largo y provechoso camino. Orgullosos de pertenecer a tan prestigiosa casa de estudios.

Al Instituto de Investigaciones “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” por su valioso servicio y compromiso promovido en pro del desarrollo de la Facultad y profesionalización de profesores y estudiantes, acompañado de excelentes investigadores.

A la Prof. Yndra Cordero por su gran apoyo y ayuda a lo largo de la carrera y en nuestro trabajo de grado. A la Prof. Alida Pérez por su paciencia y determinación y compartir su conocimiento en pro de ayudarnos para la presentación de nuestra tesis. A Nuestra tutora Johanna Hernandez por darnos la confianza y acompañamiento para lograr la presentación de nuestro trabajo de grado, gracias por sus conocimientos, consejos, dedicación y orientación.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I. EL PROBLEMA	3
Planteamiento del Problema	3
Justificación de la Investigación	7
Objetivos de la Investigación	9
Objetivo General	9
Objetivos Específicos	9
Alcances y Limitaciones de la Investigación	10
Alcances de la Investigación	10
Limitaciones de la Investigación	10
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	11
Trabajos Previos	11
Antecedentes Históricos	15
Bases Teóricas	18
Familia Verbenaceae	18
Características botánicas	18
Usos medicinales de la Familia Verbenaceae	20
Propiedades de los extractos de la familia Verbenaceae	21
<i>Gmelina arbórea</i>	23
Características macroscópicas de <i>Gmelina arbórea</i>	24
Usos de <i>Gmelina arbórea</i>	25
Uso medicinal de <i>Gmelina arbórea</i>	25

Actividad antibacteriana de <i>Gmelina arbórea</i>	26
Compuestos químicos de <i>Gmelina arbórea</i>	28
Screening fitoquímico de las hojas de <i>Gmelina arbórea</i>	30
Farmacología y fitoterapia	30
Extractos vegetales	32
Consistencia de los extractos	34
Características de los extractos	34
Conservación de los extractos	36
Componentes de los extractos vegetales	37
Propiedades antibacterianas de los extractos vegetales	43
Identificación de los componentes químicos de los extractos vegetales mediante el método de screening fitoquímico o tamizaje fitoquímico	44
Bacterias	46
Bacterias Gram positivas	46
Bacterias Gram negativas	48
Resistencia bacteriana	50
Tipos de mecanismos contra los antibacterianos	52
Mecanismos de acción de los antibacterianos	53
Mecanismo de resistencia a los antibacterianos	55
Antibióticos	60
Actividad antibacteriana	60
Técnicas utilizadas para la determinación de la actividad antibacteriana	61
Prueba de sensibilidad por difusión en agar (Kirby-Bauer)	63
Definición de términos	64
Operacionalización de las variables	65
Hipótesis	67
CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO	68

Tipo de Investigación	68
Diseño de Investigación	68
Población y Muestra	69
Instrumento de Recolección de Datos	69
Procedimiento o Metodología	69
Recolección de la muestra	69
Preparación de los extractos vegetales	69
Remoción o evaporación del solvente	70
Screening fitoquímico	73
Determinación de la actividad antibacteriana del extracto de la especie <i>Gmelina arborea</i>	75
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
Resultados	79
Discusión	88
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	92
Conclusiones	92
Recomendaciones	93
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS	94

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura química de la retronecina	37
Figura 2. Estructura química del ácido oleoico	38
Figura 3. Estructura química del ácido galico	39
Figura 4. Estructura química de un flavonoide	40
Figura 5. Estructura química del hallocromo	40
Estructura química de una cumarina (1-benzopiran-2-	
Figura 6. ona)	41
Figura 7. Estructura química de una saponina esteroideal	42
Figura 8. Estructura química del ácido elárgico	43
Figura 9. Estructura química del ácido hexahidroxiferico	43
Figura 10. Imagen de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Figura 11. Imagen de la bacteria <i>Escherichia coli</i>	50
Figura 12. Preparación de los extractos vegetales	70
Figura 13. Proceso de maceración en frio	70
Figura 14. Remoción o evaporación del solvente	71
Figura 15 Lectura de halos de inhibición con una regla milimetrada	77
Figura 16 Halos de inhibición producidos por extractos de la planta mediante el método de difusión en agar (Kirby Bauer) en pozo modificado	87

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Operacionalización de la variable dependiente	65
Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente	66
Tabla 3. Bacterias empleadas para el estudio de la actividad antibacteriana de la especie <i>Gmelina arborea</i>	76
Tabla 4. Resultados de caracterización fotoquímica de los extractos de etanol y hexano de la especie <i>Gmelina arborea</i>	84
(Continuación) Resultados de caracterización fotoquímica de los extractos de etanol y hexano de la especie <i>Gmelina arborea</i>	85
Tabla 4. Antibiótico empleado como control positivo para el estudio de la actividad antibacteriana (Oxitetraciclina)	86

ÍNDICE DE ESQUEMAS

		Pág.
Esquema 1	Diseño experimental para la obtención de los extractos (hexano y etanol) de la especie <i>Gmelina arbórea</i>	72
Esquema 2	Procedimiento empleado para la evaluación de la actividad antibacteriana por el método modificado en pozo en agar	78
Esquema 3	Resultado de la caracterización fitoquímica de los extractos de <i>Gmelina arbórea</i> para alcaloides	80
Esquema 4	Resultado de la caracterización fitoquímica de los extractos de <i>Gmelina arbórea</i> para triterpenos/esteroles	80
Esquema 5	Resultado de la caracterización fitoquímica de los extractos de <i>Gmelina arbórea</i> para compuestos fenólicos	81
Esquema 6	Resultado de la caracterización fitoquímica de los extractos de <i>Gmelina arbórea</i> para flavonoides	81
Esquema 7	Resultado de la caracterización fitoquímica de los extractos de <i>Gmelina arbórea</i> para quinonas	82
Esquema 8	Resultado de la caracterización fitoquímica de los extractos de <i>Gmelina arbórea</i> para cumarinas	82
Esquema 9	Resultado de la caracterización fitoquímica de los extractos de <i>Gmelina arbórea</i> para saponinas	83
Esquema 10	Resultado de la caracterización fitoquímica de los extractos de <i>Gmelina arbórea</i> para taninos	83



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



**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS
EXTRACTOS DE *Gmelina arbórea* (Verbenaceae) CONTRA CEPAS GRAM
POSITIVAS Y GRAM NEGATIVAS**

Autores:

Barrios Zambrano Daniel Alejandro
Bastidas Arias Simón Andrés

Tutor:

Prof. Johanna Hernández

RESUMEN

En este estudio se determinó la composición química y la actividad antibacteriana de los extractos de hexano y metanol de las hojas de la especie *Gmelina arbórea*. Los extractos fueron obtenidos mediante el método de maceración en frío con disolventes orgánicos (etanol y hexano). La determinación parcial de metabolitos secundarios se realizó mediante screening fitoquímico, identificando la presencia de fenoles y triterpenos. La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de Kirby-Bauer (en pozo modificado) frente a cepas Gram positivas y Gram negativas, la misma permitió conocer que ambos extractos no presentaron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Debido a la baja concentración de metabolitos secundarios presentes en la planta.

Palabras clave: *Gmelina arbórea*, screening fitoquímico, actividad antibacteriana.

INTRODUCCIÓN

En el siglo XX el descubrimiento de los antibióticos se convirtió en la solución a las múltiples enfermedades producidas por agentes infecciosos. El incremento en el uso indiscriminado de antibióticos y la respectiva presión selectiva que ejercen, es el factor más importante que contribuye a la aparición de diversas clases de resistencia bacteriana (Ang, Ezike, y Asmar 2004). De acuerdo con los últimos cálculos del Centro para la Prevención y Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), los organismos resistentes a los antibióticos causan 2 millones de infecciones y 23 000 muertes solo en los Estados Unidos cada año, pudiendo ser igual o mayor en otras regiones del mundo, en particular en países de continuo crecimiento tales como los de América Latina (Thompson, Cabezudo y Wenzel 1982).

La emergencia de la resistencia bacteriana ha generado nuevos intereses en la búsqueda de medicamentos con poder antibacteriano, prueba de ello es el aumento en los últimos años del número de publicaciones, relacionando productos naturales y actividad antimicrobiana, centrándose las investigaciones en los productos naturales como fuentes de moléculas bioactivas (Redo, Rios, y Villar, 1989; Silver, y Bostian 1993).

En el transcurso de los años se ha despertado un gran interés en la medicina “naturista”, en búsqueda de una alternativa a través de las plantas para el tratamiento de diversas afecciones. Paralelamente, el interés ha evolucionado hacia el estudio científico de los componentes y los efectos de las plantas que tradicionalmente, muestran actividades biológicas interesantes, donde destacan los aceites esenciales y extractos que han demostrado en su mayoría actividad antibacteriana gracias a la presencia de diversos compuestos, dicha diversidad brinda la oportunidad de encontrar

nuevos agentes activos desde el punto de vista farmacológico (Marcano y Hasegawa, 2002).

Gmelina arborea (Verbenaceae) es un árbol de hoja caducifolia, que crece a una altura de 12 a 30 metros, crece preferiblemente en zonas húmedas y fértiles. En la medicina popular india, la decocción de la raíz se usa para tratar tumores abdominales, Además, también es un remedio popular para el ántrax, picaduras, trastornos sanguíneos, cólera, cólico, convulsiones, diarrea, dispepsia, fiebre, gota, viruela, mordedura de serpiente, hinchazón y urticaria (Duke y Wain 1981). La forma de extracto de diferentes partes de *Gmelina arborea* ha sido probado científicamente por ser analgésico (Nayak, Dinda y Ellaiah 2013), antidiabético (Nayak, Ellaiah y Dinda 2012), Antimicrobiano (El-Mahmood, Doughari y Kiman 2010), Antioxidante (Patil, Kadam y Ghosh 2009) y posee actividades de curación de heridas (Shirwaikar, Ghosh, y Rao 2003).

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

La utilización de agentes antimicrobianos data de 2.500 años de antigüedad, cuando la civilización china utilizó la planta de soja en el tratamiento del carbunco (López-Brea, 1998); en la era preantibiótica, el control de las enfermedades infecciosas se realizaba mediante medidas de asepsia, uso de desinfectantes, antisépticos y vacunas (Muñoz, Rubio y López, 1998). El descubrimiento de los antibióticos ha sido uno de los logros más importante de este siglo (Pérez, 1998). En 1929, A. Fleming descubre el primer antibiótico: la penicilina. Este tremendo éxito y la esperanza de hacer desaparecer las enfermedades producidas por microbios se ven oscurecidos diez años después por la aparición de las primeras resistencias a sulfamidas y penicilina (Muñoz, y cols.,1998).

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, entre otros.) o sintetizados por métodos de laboratorio que suprimen el crecimiento de bacterias y pueden eventualmente destruirlas. Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano (Martínez, Coque, y

Baquero, 2015). En la actualidad la definición de un antibiótico está siendo usada para incluir a los antimicrobianos sintéticos o quimioterapéuticos,

como las quinolonas, sulfamidas y otros agentes antimicrobianos derivados de productos naturales y aquellos con propiedades antibióticas descubiertas empíricamente (Strohl, 1997).

En la actualidad, las enfermedades infecciosas muestran una tendencia emergente, por lo que el conocimiento de los antibióticos a quienes se les prefiere denominar drogas antibacterianas resulta de suma importancia. Su utilización creció rápidamente y en la actualidad la proporción de pacientes que reciben antibióticos en hospitales de especialidad es cercana al 50%, lo que significa que uno de cada dos pacientes internos, recibe uno o más antibióticos (Watanabe y Contardo, 1998).

El descubrimiento de la penicilina en 1927 por Alexander Fleming marcó el principio de la era antibiótica, considerado el logro más importante de la medicina en el siglo XX, permitiendo disminuir la mortalidad y la morbilidad causadas por infecciones bacterianas (Quizhpe, Encalada, Sacoto, Andrade y Muñoz, 2014). Simultáneamente a este desarrollo ha surgido la resistencia a los antibióticos, llegando a aparecer microorganismos multiresistentes (Carlet, Jarlier, Harbarth, Voss, Goossens, y Pittet, 2012). La multiresistencia bacteriana es uno de los problemas de salud pública más preocupantes del mundo, pues el aumento de las enfermedades infecciosas, el acrecentamiento de la pobreza, el alto costo de los medicamentos y su venta libre, son factores que han incrementado la resistencia a los antibióticos (Quizhpe, y cols., 2014).

Desde la década de los ochenta, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha promovido el uso racional de medicamentos y ha recomendado

que este aspecto sea integrado en las políticas nacionales de medicamentos. La Asamblea Mundial de la Salud (AMS) de 1998 instó a los países miembros a desarrollar acciones dirigidas a mejorar el uso de los antibióticos. En 1998, la Conferencia Panamericana de Resistencia Antimicrobiana en las Américas hizo recomendaciones clave para los países de la región sobre mejoramiento del uso de antibióticos. En el año 2001, la OMS dio a conocer la Estrategia Global para Contener la Resistencia Antimicrobiana. En su 60a reunión de 2006, la OMS reconoció que no es posible aplicar resoluciones sobre resistencia antimicrobiana sin abordar el problema más amplio del uso irracional de medicamentos en los sectores público y privado, y para ello instó a los países miembros a invertir lo necesario en recursos humanos y financiamiento (Dresler, Wirtz, Corbett y Echániz 2008).

En Venezuela se está vigilando la resistencia bacteriana a los antibióticos desde el año 1987. Los primeros reportes de resistencia bacteriana a nivel mundial comienzan hace aproximadamente 40 años. En el año 1987 se creó el Programa Venezolano de Vigilancia de la Resistencia Bacteriana a los Antimicrobianos (Carmona, Guzmán, Silva y Pulido 1989); actualmente participan 23 laboratorios de Microbiología de diferentes hospitales del país. Esta red forma parte de un Sistema Internacional de Vigilancia de la Resistencia, que depende de la Organización Mundial de la Salud, en el que participan 53 países del mundo.

Los productos naturales han sido utilizados durante siglos en cada cultura del ámbito mundial. Los científicos y profesionales de la medicina han mostrado creciente interés en el campo de la medicina natural, a medida que reconocen los verdaderos beneficios que para la salud tributan estos productos (Wang, West, Jensen, Nowicki, Palu y Anderson 2002). Las plantas tienen una habilidad casi sin límites de sintetizar compuestos químicos, que en muchos casos le sirven como mecanismos de defensa contra microorganismos, insectos y herbívoros. Atendiendo a ello el hombre,

ha dirigido sus investigaciones a la identificación y aislamiento de estas sustancias que tienen actividad antimicrobiana y ha logrado probar que un gran número de especies vegetales inhiben el crecimiento de bacterias resistentes a numerosos antibióticos y hongos patógenos para el hombre (Wallace, 2004; Stermitz, Lorenz, Tawara, Zenewicz y Lewis 2000).

La familia Verbenaceae incluye 2600 especies agrupadas en 100 géneros con distribución tropical. El número más significativo de especies se encuentra en América Latina, donde se encuentran en una amplia gama de ecosistemas. Esta familia incluye hierbas, arbustos y algunos árboles y son un importante elemento en la flora de Sudamérica (O'Leary, Calviño, Martínez. Lu-Irving, Olmstead y Múlgura 2012).

La familia Verbenaceae presente en Venezuela, está formada por 51 géneros, entre los que se encuentra el género *Lantana* con 160 especies. Destaca *Lantana cámara* L., conocida como cariaquito morado en Venezuela, cuyos estudios han reportado actividad antimalárica (Carrillo-Rosario y Díaz, 2006). De las hojas de esta especie se han aislado diferentes triterpenos, flavonoides, alcaloides y glucósidos, que poseen diversas actividades biológicas, incluyendo efectos antibacterianos, antitumorales y antihipertensivos (Chhabra, Mahunnah y Mshiu 1993); la raíz se ha utilizado para el tratamiento de malaria, reumatismo y lesiones en piel (Ali-Emmanuel, Moudachiori, Akakpo y Quetin-Leclercq 2002; Ghisalberti, 2000). La lantamina, alcaloide obtenido de la corteza de las ramas y de las raíces de *L. cámara* L., ha mostrado actividad antipirética y antiespasmódica, comparable con la quinina (Carrillo-Rosario y Díaz, 2006).

Gmelina arborea es una de las plantas mencionadas en todas las escrituras antiguas de Ayurveda, que tienen valor medicinal ilimitado. Tradicionalmente se usa externamente en numerosas dolencias relacionadas

con el sistema nervioso central, también en sistemas circulatorios, respiratorios, urinarios y reproductivos. La determinación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar, demostró que los extractos crudos acuoso, etanólico, de hexano y cloroformo de las hojas y corteza del tallo de *Gmelina arbórea*, inhiben el crecimiento de bacterias patógenas tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella typhi*. La extensión de la inhibición dependía del disolvente y del organismo. La efectividad de los extractos fue más evidente en condiciones ácidas que en alcalinas y aumentaron con la subida de la temperatura. Esta planta puede ser utilizada como fuente de nuevos antibióticos para el posible control de la disentería, diarrea, fiebre tifoidea e Infecciones de heridas asociadas con estas bacterias (El-Mahmood y cols., 2010).

Una vez descrita la situación del problema de estudio, los autores elaboraron el siguiente enunciado holopráxico: ¿Qué relación existe entre la composición de los extractos obtenidos de *Gmelina arbórea* y la actividad antibacteriana frente a diversas cepas Gram positivas y Gram negativas?

Justificación de la investigación.

La resistencia antimicrobiana constituye un problema de gran impacto en la salud pública, alcanzando elevadas proporciones en los últimos años. Numerosas publicaciones han destacado la posible relación entre el uso imprudente o la sobreutilización de antimicrobianos en humanos y animales y el incremento de resistencias a dichos compuestos en bacterias de importancia en patología humana y animal (Mellon, Benbrook, Beenbrook, 2001; Neu, 1992; Piddock, 1996; Witte, 1998), originando el incremento

continuo de fracasos terapéuticos debido al aumento en número y diversidad de microorganismos resistentes (Livermore, 2003).

Las compañías farmacéuticas están buscando drogas alternativas de otras fuentes incluyendo las plantas y los animales. Las plantas medicinales son consideradas como una fuente potencial de nuevas drogas quimioterapéuticas debido a su contenido de fitoquímicos y a su poco o nulo efecto toxico (Beg y Ahmad, 2000). En las últimas décadas, ha habido un crecimiento exponencial en la práctica y uso de la medicina herbaria. Debido a su origen natural y seguridad relativa, se ha popularizado en países en vías de desarrollo e incluso en países desarrollados. Las partes de las plantas tales como las hojas, raíces, corteza o frutos se sabe que contienen sustancias químicas que pueden inhibir o prevenir el crecimiento de microorganismos (Munira, Gururaja, Deepak, Roopashree, y Shashidhara 2013).

www.bdigital.ula.ve

Se ha demostrado la actividad antibacteriana de *Gmelina asiática* contra *Bacillus cereus* y *Klebsiella pneumoniae*. (Rohit, Patel, Chakraborty, y Kamath, 2012). Las hojas crudas y los extractos de la corteza y del tallo de *Gmelina arborea* reportaron actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, incluyendo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, y *Shigella dysenteriea*. El extracto de etanol de *G. arborea* mostró significativa actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, tales como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis* (Bhabani, Nunhu, Reevidya, 2012). La Actividad antibacteriana mostrada por el extracto de etanol es algo comparable con la estreptomycin, una marca estándar de antibióticos (Bhabani y cols., 2012).

Este proyecto de investigación se basó en analizar el estudio de la actividad antibacteriana de los extractos de *Gmelina arborea* (Verbenaceae),

para demostrar la capacidad inhibitoria que ejerce esta sustancia contra microorganismos patógenos (cepas Gram positivas y Gram negativas) y de esta forma contribuir en parte al desarrollo científico de la sociedad.

Objetivos de la investigación

Objetivo General

Determinar la composición química y actividad antibacteriana de los extractos crudos de la especie *Gmelina arbórea*, contra cepas Gram positivas y Gram negativas.

Objetivos Específicos

www.bdigital.ula.ve

1. Obtener los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Gmelina arbórea* por maceración en frío.
2. Determinar cualitativamente, mediante el tamizaje fitoquímico la presencia de metabolitos secundarios en los diferentes extractos de *Gmelina arbórea*.
3. Determinar la actividad antibacteriana contra cepas Gram positivas y Gram negativas.

Alcances y Limitaciones de la investigación.

Alcances de la investigación

El producto de esta investigación está orientado en proporcionar nuevos datos de posibles fuentes de principios activos para la industria farmacéutica que podrían ser utilizados para la elaboración de nuevos antibióticos y erradicación de enfermedades causadas por estos microorganismos, junto a motivar el control del uso selectivo de los antibióticos en la sociedad.

Limitaciones de la investigación

Para esta investigación las limitaciones estuvieron determinadas por la poca disponibilidad de insumos de laboratorio debido a su carencia en el mercado nacional y sus altos costos, incluyendo también equipos de laboratorio que debido mal estado en que se encontraban, fue imposible su utilización. Las limitaciones en cuanto al tiempo se enfocan en el lento crecimiento de las cepas, además por inconvenientes en el suministro eléctrico lo que conllevaba a la muerte de las mismas por no tener las óptimas condiciones para su desarrollo.

Por otro lado, se debe acotar que existen ciertos parámetros o condiciones que pueden influir en la determinación de los analitos secundarios de la planta y por ende su actividad antibacteriana, como lo son las condiciones climáticas (altitud, temperatura y humedad) donde se recolectó la planta, y ubicación geográfica. Sin embargo, durante el proceso de investigación esto no fue impedimento para mantener la vialidad del estudio.

CAPÍTULO II.

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Navreet y Sarabjit (2018). Publicaron un trabajo denominado: Evaluación farmacológica y fitoquímica de *Gmelina arborea*. El presente estudio se realizó para establecer la farmacogenia y los estándares fisicoquímicos para *Gmelina arborea*. La evaluación microscópica mostró la presencia de phellogen, corcho, corteza y phelloderm. Estudios fisicoquímicos en *Gmelina arborea* mostraron que la ceniza fue insoluble cinco veces en ácido y la ceniza soluble en agua fue aproximadamente tres veces menor que la ceniza total. El análisis fitoquímico mostró la presencia de alcaloides, carbohidratos, antocianinas, taninos y flavonoides. Estos hallazgos serán útiles para establecer estándares farmacognosticos. Este trabajo guarda relación con la investigación ya que los autores hacen estudios con la especie *Gmelina arborea* e investigan sus componentes químicos.

Chothani y Patel, (2018). Publicaron un estudio titulado: Detección fitoquímica y cuantificación de fitoconstituyentes en extractos de frutas de *Gmelina arborea* Los objetivos de la presente investigación son llevar a cabo

un examen fitoquímico y cuantificar los fitoconstituyentes de los extractos de frutas de *Gmelina arborea* (Verbenaceae). El análisis fitoquímico del extracto de etilo, y extracto metanólico mostró la presencia de carbohidratos, saponina, alcaloide, flavonoides, compuestos fenólicos, esteroides y triterpenos. La cuantificación del total de compuestos fenólicos y flavonoides se realizó mediante el método Folin-Ciocalteu y el método de cloruro de aluminio, respectivamente, mientras que el contenido de saponina se determina usando ácido sulfúrico de vainillina. El contenido de alcaloide crudo se determinó en (Cromatografía en capa fina) también se realiza en extracto de metanol de frutas de *G. arborea*. Los resultados revelaron que el extracto de acetato de etilo mostró la mayor cantidad de contenido fenólico y flavonoide mientras que el mayor contenido de saponina se encontró en el extracto metanólico de frutas. Este trabajo guarda relación con la investigación en que los autores trabajaron determinando los fitoconstituyentes de la especie *Gmelina arborea*.

Rosewin, (2016). publicó un estudio llamado: Actividad antibacteriana de los extractos acuosos de las hojas, Frutas y corteza de *Gmelina arborea*. En este estudio se investigó la actividad antibacteriana de los extractos acuosos de las hojas, los frutos y la corteza de *Gmelina arborea* contra *Escherichia coli*. Se realizó extracción acuosa y se prepararon tres concentraciones: extracto de 2,5 ml: 5 ml de H₂O destilada, extracto de 5,0 ml: 5 ml de H₂O destilada y 7,5 ml de extracto: 5 ml de H₂O destilada. El método de difusión en disco se utilizó en el bioensayo utilizando *E. coli*, después de lo cual, los discos de papel de filtro se remojaron por separado en tres concentraciones de extractos de *Gmelina arborea* (corteza, frutos y hojas). La actividad antibacteriana se determinó en base a las zonas de inhibición formadas que se midieron después de 12, 24, 36 y 48 horas. Los resultados mostraron que la zona de inhibición promedio más alta (9.86 mm) se formó usando los extractos acuosos de las frutas seguido de la zona de

inhibición promedio (8.45 mm) formado utilizando los extractos acuosos de la corteza y luego el de los extractos acuosos de las hojas (7,44 mm). Por lo tanto, los extractos acuosos de las hojas, frutos y corteza de *Gmelina arborea* tienen actividad antibacteriana contra *E. coli*. Este trabajo tiene relación con la investigación ya que los autores hacen estudios con la especie *Gmelina arborea*.

Powar, Rathod, Ambikar y Sharma. (2015). Publicaron un artículo titulado: Formulación y evaluación de un gel antibacterial herbario que contiene extracto de hoja de *Gmelina arborea*. La presente investigación se ha emprendido con el objetivo de formular y evaluar el gel que contiene extracto de hoja etanólica de *Gmelina arborea* y evaluar la propiedad antibacteriana. El examen fitoquímico de *Gmelina arborea* revela la presencia de carbohidratos, alcaloides, saponinas, taninos, antraquinonas y glucósidos cardíacos. El gel se preparó usando extracto de hojas etanólico, Carbapol 934, metil parabeno, propil parabeno, propilenglicol, EDTA disódico, etanol, trietanolamina y agua destilada. Se determinaron los parámetros fisicoquímicos de formulaciones tales como pH, viscosidad, capacidad de extensión y capacidad de extrusión. Los resultados mostraron que el gel GF1 tiene mejores propiedades de gel que otras formulaciones. La determinación de la actividad antimicrobiana utilizando el método de difusión en agar mostró que los extractos crudos de la hoja y el gel a base de hierbas de la planta inhibieron el crecimiento de (*Staphylococcus aureus* 25 mm), patógeno recalcitrante que con frecuencia aparece en infecciones comunes de la piel. Los extractos de etanol puro tenían la concentración inhibitoria mínima (CIM) más baja de 0,01 µg, lo que implicaba una mayor actividad contra *Staphylococcus aureus*. La actividad de los extractos fue consistentemente menor que la del antibiótico convencional, la tetraciclina. Este trabajo tiene relación con la investigación ya que hacen un estudio con

la especie *Gmelina arborea* y se estudia la propiedad antibacteriana de la planta.

Mosad, Laila, Amal, Osman, Mohamed, Maha y Asmaa (2015). Publicaron un trabajo llamado Actividad antimicrobiana *in vitro* de cinco especies de plantas egipcias. En este estudio, cinco especies egipcias fueron evaluadas por sus actividades antimicrobianas *in vitro*. El cribado se llevó a cabo mediante el método de difusión en disco hacia cuatro cepas del antibiótico clínico resistente, entre los patógenos se incluyen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. Los extractos metanólicos seleccionados, (*Azadirachta indica*, *Tectona grandis* y *Ficus sycomorus*) mostraron un amplio espectro antimicrobiano contra tres cepas con zonas de inhibición entre 13-27 mm, seguido de (*Gmelina arborea* y *Ficus microcarpa*) con zonas de inhibición entre 11-17 mm, las plantas no mostraron actividad contra *Aspergillus niger* excepto *Gmelina arborea* con zonas de inhibición de 12 mm. La penicilina G se usó como control positivo a una concentración de 100 µg/mL, disco con zonas de inhibición, (*Staphylococcus aureus* 28 mm, *Escherichia coli* 22 mm, *Candida albicans* 25 mm y *Aspergillus niger* 0 mm). Debido a la alta actividad de los extractos metanólicos, los extractos se desgrasan a través de éter de petróleo y luego se fraccionan a través de; cloroformo, acetato de etilo y n-butanol. El n-butanol de *Azadirachta indica* fue el más activo contra *Candida albicans* (25 mm), acetato de etilo de *Ficus sycomorus* contra *Staphylococcus aureus* (18 mm), n-butanol de *Gmelina arborea* contra *Staphylococcus aureus* (17 mm) y n-butanol de *Ficus microcarpa* contra *Staphylococcus aureus* (15 mm). Estos resultados sugieren que las plantas probadas pueden ser fuentes potenciales efectivas de antimicrobianos naturales, y son potentes inhibidores de patógenos resistentes a antibióticos. Este trabajo guarda relación con la investigación en que una de las especies con las que trabajan los autores se trata de *Gmelina arborea*

Antecedentes Históricos

El género *Gmelina* fue descrito por Linneo en 1742 y la especie *Gmelina arbórea*, fue descrita por William Roxburgh en 1810 pertenece a la familia Verbenaceae y es originaria Asia. Ha sido introducida a través de plantaciones en diferentes países particularmente en el oeste de África, America del Sur, en costa de Marfil y Nigeria. Se caracteriza por ser una especie de rápido crecimiento, con una amplia gama de campos de utilización y facilidad en cuanto a trabajabilidad. (Chudnoff, 1984).

La idea de que seres vivos fueran capaces de producir sustancias que inactivaran o directamente mataran a otros seres con los cuales convivían era un pensamiento absolutamente contraintuitivo. Paul Vuillemin, de la Universidad de Nancy, presentó en 1889 su descripción de este fenómeno al que denominó “influencias antibióticas”, y fue Selman Waksman, el microbiólogo estadounidense descubridor de la estreptomicina, quien propuso en 1941 la utilización del término “antibiótico” para referirse al grupo creciente de sustancias con propiedades antibacterianas (Waksman, 1956).

Muy probablemente los antibióticos fueron utilizados inadvertidamente mucho antes de su descubrimiento oficial. Existen evidencias de la presencia de tetraciclinas en materiales provenientes de la civilización egipcia, y, probablemente, la costumbre de utilizar tierra en la curación de enfermedades por parte de muchas tribus y civilizaciones antiguas guarda relación con el hecho de que el suelo es una de las principales fuentes de microorganismos productores de antibióticos (Stuart, 1992).

Aproximadamente hasta el año 1800, apenas se había progresado en el campo de la fitoquímica. Sólo se conocían unas cuantas sustancias como el azúcar de caña, almidón, alcanfor y ácido benzoico, debido a que su preparación era sumamente sencilla. Los primeros investigadores en el campo de la Fitoquímica no llegaron a apreciar la extrema complejidad de las

materias con que realizaban sus investigaciones y carecieron casi por completo de las técnicas necesarias para conseguir un proceso autentico. El Farmacéutico francés Nicolás Lémery (1645-1715) extendió el empleo de los procesos de extracción y utilizó el alcohol como disolvente (Torres, 2004).

Robert Boyle (1627-1691) abandonó la antigua teoría de Aristóteles de que la materia está compuesta de cuatro elementos y aunque jamás llevo a aislar ningún alcaloide es evidente que iba bien encaminado cuando trato el opio con carbonato potásico y alcohol (Torres, 2004). En la edad media los árabes impulsaron la innovación de métodos utilizados para extracción de las sustancias vegetales, seguido de ello con herramientas más avanzadas, Arnau de Vilanova en el siglo XIII descubre el sistema de destilación de las esencias de las plantas (Suarez, 2007). Hoy en día existen diversos medios y formas de extraer una amplia gama de productos y extractos con una alta efectividad en el tratamiento de enfermedades (Rangel, García, Buitrago y Velazco, 2001).

La palabra bacteria proviene de un término griego que significa “bastón”. Se trata de un microorganismo unicelular procarionta que puede provocar enfermedades, fermentaciones o putrefacción en los seres vivos o materias orgánicas (Curtis, Barnes, Schenk y Massarini, 2008). En 1840, el anatomopatólogo alemán Friedrich Henle propuso unos criterios para demostrar que los microorganismos eran responsables de la aparición de enfermedades en el ser humano. En los años setenta y ochenta del mismo siglo, Robert Koch y Louis Pasteur confirmaron esta teoría mediante una serie de elegantes experimentos en los que demostraron que los microorganismos eran responsables de distintas enfermedades (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009).

Desde el siglo XVIII se han empleado sustancias químicas para el tratamiento de enfermedades infecciosas. Paul Ehrlich, quien formuló los principios de toxicidad selectiva, reconoció las reacciones químicas

específicas entre microorganismos y medicamentos, la aparición de la resistencia a estos y el papel de la terapéutica combinada para combatirlos. Posteriormente se descubrieron las sulfonamidas y se acrecentó el interés en sustancias antibacterianas de origen microbiano, llamadas antibióticos, de ahí surgió la penicilina, estreptomina, tetraciclina, cloranfenicol. Las cuales también han sido obtenidas sintéticamente, a través de modificación química, total o parcial, de las moléculas por biosíntesis (Manrique y Mosquera, 1997).

Por otra parte, la historia del uso de las plantas en la medicina data aproximadamente en el año 5.000 a.C cuya cultura oriental se basaba en la herbolaria y se describen cerca de 300 plantas en el libro chino Pen Tsao. Descubierta en el siglo XVI (Wheeler, 2000), más adelante en un pergamino egipcio llamado el Papiro Ebers se descubrió el uso medicinal que utilizaban los egipcios en el año 1500 a.C, donde explicaban varias plantas y su toxicología de cerca de 700 sustancias vegetales (López, 1997).

Las especies cultivadas del género *Gmelina* tienen un amplio rango de usos medicinales reportados en sus países de origen (Kok, 2012), además de hacer parte de la medicina tradicional en la India (Punitha, Thandavamoortly, Arumugasamy, Suresh, Danya y Udhayasankar 2012). Se puede decir que todas las partes de la planta tienen un uso medicinal diferente. Los frutos, flores, hojas, raíces y corteza se usan para tratar la tos, dolores de cabeza, problemas de estómago y enfermedades de la sangre, también se puede usar como laxativo y tónico para los nervios, como diurético, actividad antihelmíntica, cardioprotectora, antidiabética, antipirética analgésica (Kaswala, Patel, Chakraborty, y Kamath 2012).

BASES TEORICAS

Familia Verbenaceae

La familia Verbenaceae posee aproximadamente 99 géneros y 3151 especies distribuidas principalmente en zonas tropicales y subtropicales. Desde la India han sido reportados unos 22 géneros y más de 30 especies (Sharma, 2004). *Tectona grandis* es la planta más importante de esta familia y suministra madera de teca. La madera es muy dura de color amarillento y requiere un buen pulido para que sea ampliamente utilizada en la fabricación de muebles (Sambamurty, 2005). La familia es prácticamente cosmopolita y solo falta en las partes más calientes del Sahara y en las regiones árticas y antárticas.

En Venezuela está representada en todo el territorio nacional desde el nivel del mar hasta los 3.000 metros y más de altura con unos pocos géneros nativos (*Verbena*) o en cultivo (*Aloysia*). Hay algunos géneros que solamente han sido registrados para uno o dos estados: *Callicarpa*, para Trujillo, *Ghinia*, para Bolívar y Monagas; pero quizás ello se deba a la falta de un inventario florístico completo. Esta familia comprende diversos usos entre los que se destaca como planta ornamental, en la carpintería, y se han descrito usos medicinales (López-Palacios, 1977).

Características botánicas

- Familia en Venezuela predominante herbácea o subarborescente, pero con representantes arbóreos en cerca de la mitad de sus géneros

(*Aegiphila*, *Callicarpa*, *Citharexylum*, *Cornutia*, *Duranta*, *Petrea*, *Tectona*, *Vitex*, etc). (López-Palacios, 1977).

- Tallos y ramitas de cuadrangulares a cilíndricos, inermes o armados (*Citharexylum*, *Clerodendrum*, *Duranta*, *Lantana*), en su mayoría erectos, pero también procumbentes (*Phila*), escandentes (*Aegiphila*, *Lantana*), y aun volubles (*Clerodendrum*, *Petrea*) (López-Palacios, 1977).
- Hojas en su mayoría opuestas, pero en algunos géneros se encuentran verticiladas y aun alternas (*Amasonia*), pero estas últimas son escasas, simples, por excepción digitadas (*Vitex*); sin estípulas, aunque algún autor considera la base espinescente de los pecíolos de algunos *Clerodendrum* de origen estipular; algunas especies llevan usualmente un par de glándulas en la base del limbo; de borde entero hasta inciso; con limbos y pecíolos inermes, a excepción de alguna *Lantana*; unas veces glabras, otras, de indumento vario (López-Palacios, 1977).
- Inflorescencias unas veces espiciformes o racemosa, otras veces cimosas, axilares o terminales, la mayoría de las veces alargadas y multifloras (López-Palacios, 1977).
- Flores hermafroditas, aunque a veces funcionalmente diclinas por aborto (*Aegiphila*), cada una en la axila de una bráctea, que a veces es acrescente después de la antesis (López-Palacios, 1977).
- Cáliz truncado o ciatiforme, delgado, en muchas especies acrescente y cubre el fruto, de borde vario, generalmente 4-5-fido, y aun bilabiado o sin división alguna, como en *Holmskioldia*, en donde aparece de una sola pieza y sirve al fruto como medio de dispersión; el de algunas *Stachytarpheta* tiene la particularidad de estar inserto dentro del raquis de la espiga (López-Palacios, 1977).
- Estilo terminal, casi siempre incluso y frecuentemente engrosado hacia el apise.

- Estigma generalmente bífido, pero capitado en algunos géneros.
- Ovario súpero, 2-8-celdado, bicarpelar, aunque a veces, por aborto se presenta como monocarpelar, cada celda con un ovulo sub-basal o lateral, anátropo, péndulo en la tribu *Viticeae*.
- Fruto unas veces drupa, otras veces esquizocarpo seco y aun abayado, compuesto de 2-4 pírenos de envoltura leñosa, coriácea u ósea. Embrión recto. Radícula corta e ínfera (López-Palacios, 1977).

Usos medicinales de la familia Verbenaceae

Las plantas de la familia Verbenaceae son bien conocidas por sus usos en los sistemas medicinales tradicionales de varios países. Se ha informado que muchas de las plantas contienen fitoquímicos bioactivos con importantes efectos farmacológicos. A citar solo algunas publicaciones recientes, los diterpenoides abietanos que tienen propiedades antibacterianas y antiparasitarias (anti-leishmania, anti-malaria) aisladas de las raíces de *Clerodendrum eriophyllum* Gürke (Machumi, Samoylenko Yenesew, Derese, Midiwo, Wiggers, Jacob, Tekwani, Khan, Walker y Muhammad., 2010).

El aceite esencial obtenido de las hojas de *Lippia gracilis* Schauer presuntamente poseía actividades anticonceptivas y antiinflamatorias. En particular la planta es utilizada por practicantes de medicina popular de la región de Caatinga en el noreste de Brasil para estas propiedades (Mendes, Bomfim, Alves, Blank, Estevam; Antonioli y Tomazzi. 2010). El aceite esencial obtenido de *Lippia graveolens* inhibió el crecimiento de *Giardia lamblia*, el agente causante de la enfermedad diarreica, giardiasis (Machado, Dinis, Salgueiro, Cavaleiro, Custódio y Sousa 2010).

Se ha demostrado que los aceites esenciales obtenidos de *Lippia turbinata* Griseb y *Lippia polystachya* Griseb, redujeron significativamente los efectos letales contra larvas del mosquito de *Culex quinquefasciatus*, (Kembro, Marin, Zygadlo y Gleiser, 2009). El aceite esencial de *Lippia sidoides* Cham ha demostrado tener actividad antihelmíntica contra nematodos gastrointestinales de ovejas (Camurca-Vasconcelos, Bevilaqua, Morais, Maciel, Costa; Macedo, Oliveira; Braga, Silva y Vieira 2007; Camurca- Vasconcelos, Bevilaqua, Morais, Maciel, Costa; Macedo, Oliveira; Braga, Silva, Vieira y Navarro 2008). Se ha reportado actividad antiespasmódica para el aceite esencial de *Lippia dulcis* Trev., Una planta utilizada en la medicina tradicional de América Central para la tos, resfriados, bronquitis, asma y cólicos (Görnemann, Nayal, Pertz y Melzig, 2008).

Propiedades de los extractos de la familia Verbenaceae

www.bdigital.ula.ve

Se ha mostrado propiedades de varios extractos proveniente de hojas de *V. officinalis* (Casanova, Garcia-Mina y Calvo, 2008), el extracto etanólico de *Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl, demostró tener propiedades antiinflamatorias en animales (Sulaiman, Zakaria, Chiong, Lai, Israf y Azam-Shah 2009). Los glucósidos fenilpropanoides antiinflamatorios han sido informados de hojas de *Clerodendron trichotomum* Thunberg (Kim, Kim, Jung, Ham y Whang. 2009). La planta *Clerodendrum umbellatum* Poir es utilizada en el sistema tradicional de Camerún para el tratamiento de la helmintiasis intestinal, se ha demostrado que los extractos acuosos de las hojas tienen propiedades esquistosomicidas en el modelo de ratones con *Schistosoma mansoni* (Jatsa, Ngo, Tchuem y Kamtchouing. 2009).

Compuestos químicos de la familia Verbenaceae

En el trabajo realizado por (Stashenko, Jaramillo y Martínez, 2003). Se estudiaron metabolitos secundarios volátiles, obtenidos por diferentes técnicas de extracción, de tres plantas de la familia Verbenaceae, cultivadas en la región Nororiental de Colombia. *Lippia alba* fue un quimio tipo nuevo, no descrito previamente en la literatura; contiene la carvona (40- 57%) como el componente mayoritario en los aceites Esenciales y en los extractos, aislados por destilación, seguido del limoneno (24-37%), el biciclosesquifelandreno (2-22%), la piperitenona (1-2%), la piperitona (0,8-1,2%) y el β -burboneno (0,6-1.5%). El compuesto principal en las fracciones volátiles fue el limoneno (27-77%), seguido de la carvona (14-30%), el biciclosesquifelandreno (1-33%) y el β -burboneno (0,5-6,5%).

Los componentes mayoritarios en los aceites esenciales y en los extractos de *Aloysia triphylla*, fueron el neral (19-22%) y el geranial (33-38%), seguidos del nerol (2-5%) y el geraniol (2-6%), los sesquiterpenoides ar-curcumeno (3-4%), biciclosesquifelandreno (2-3%), espatulenol (2-4%), nerolidol (ca. 2%), β burboneno (1-2%), β -cariofileno (3-5%) y su óxido (1-1.5%). El aceite esencial de *Lantana camara* fue de tipo sesquiterpenoide; más del 60% de la mezcla lo representan hidrocarburos sesquiterpénicos, C₁₅H₂₄, y ca. 30% sus análogos oxigenados. El trans- β -cariofileno (14-15%) y su óxido (4-9%), el biciclosesquifelandreno (16-18%), el α -zingibereno (5-6%), el E, E- α -farneseno (3-4%) y el γ bisaboleno (3-4%) fueron los sesquiterpenos mayoritarios aislados de *L. camara*. La fracción de monoterpenos, C₁₀H₁₆, en *L. camara* no alcanzó un 10%; entre éstos, el β -pineno (0.2-3%) y el β mirceno (2-4%) fueron hidrocarburos mayoritarios. En la *L. alba* predominaron monoterpenos (>30%), y monoterpenos oxigenados (ca. 55%); para la *A. triphylla*, la familia de compuestos mayoritarios fue la de monoterpenos oxigenados (>70%), de los cuales, ca. 60% correspondieron al

citral; mientras que la *L. camara* fue pobre en monoterpenos y sus análogos oxigenados (Stashenko, y cols., 2003).

Gmelina arbórea

Gmelina arbórea habita naturalmente en 11 países, en regiones tropicales y subtropicales de Asia. Aproximadamente 700,000 hectáreas (ha) de *Gmelina* se han establecido en plantaciones, pequeños lotes en entornos agroforestales en el centro-oeste y este de África, el sudeste de Asia, el Pacífico Sur y el norte de América Latina. Se espera que las áreas de plantación se expandan a 800,000 ha para 2020. La especie ha generado interés debido a su rápido crecimiento y rápido retorno de la inversión. Su madera se puede utilizar para una multitud de productos que van desde pulpa para hojas, hasta muebles. *G. arbórea* también tiene una gran utilidad en sistemas agroforestales. La reproducción intensiva y la mejora de los clones traerán una madera más uniforme, una mejor resistencia a las enfermedades y productos de mayor calidad para los mercados locales e internacionales (Akachuku, 1984).

SEFORVEN (1992) indica que, en Venezuela, hasta principios de la década de los noventa, se tenían aproximadamente 5.000 hectáreas plantadas con *Gmelina arbórea*, en los llanos occidentales del país, principalmente en las reservas forestales de Caparo y Ticoporo. Esta especie ha sido plantada en países de clima tropical debido a su alta tasa de crecimiento, resistencia al ataque de plagas, enfermedades y los cortos ciclos de rotación (Moya y Tomazello, 2007).

Características macroscópicas de *Gmelina arborea*

Gmelina arborea es hermosa de rápido crecimiento, moderada a árbol caduco, grande y sin armas, de hasta 30 metros de altura, con una circunferencia de 1,2 a 4,5 metros y un claro de 9-15 metros. Árbol de pie, recto, con ramas en la parte superior y follaje grueso. Formando una corona cónica en la parte superior del tallo alto (Tiwari, 1995). Las ramas y las partes jóvenes están vestidas de blanco fino. Pubescente.

- **Hojas:** Las hojas son pecioladas, los pecíolos son de 5-15 cm de largo, ampliamente ovado, 10-25 × 7,5-18 cm. Opuesto, cordado, glandular, glabro arriba y fulvado. Tomentosa debajo.
- **Flores:** Flores abundantes, de tallo corto, peludas, en forma de trompeta y 4-5 cm de largo de color amarillo pardusco en la panícula terminal. Inflorescencias fulvous-tomentosas a lo largo, las brácteas. lineal a lineal-lanceolato; cáliz ampliamente campanulado, 5-dentado Corola vistosa, que tiene 4 estambres, exerta. Las flores de Gambhari son en forma de embudo, tubular abajo. Los labio superior a menudo naranja-rosado, profundamente dividido en 2 oblongos, Lóbulos rizados hacia atrás y el labio inferior a menudo limón. Amarillo, hasta dos veces más largo que el superior y 3 lobulados.
- **Frutas:** las frutas son drupas ovoides carnosas, de 2-2,5 cm de largo, aromáticas, amarillo anaranjado cuando está maduro; 1-2 sembrados (Joy., Thomas, Mathew y Baby, 1998; Smith, 1991).
- **Corteza:** madura es de color amarillento cuando está fresco. Las piezas son curvas y canalizadas. La superficie externa es Robusta debido a la presencia de grietas verticales, crestas, fisuras y lentillas. La corteza del tallo maduro se presenta plana y con piezas ligeramente curvas. La superficie externa es ligeramente rugosa

debido a la presencia de algunas grietas, crestas, etc. La fractura es corta y granular (Kapoor, 2005).

Usos de *Gmelina arbórea*

Sus usos más comunes son: la elaboración de chapas decorativas, tableros contrachapados, por su capacidad y resistencia al fuego se emplea para decorar interiores de casas y edificios y en estructuras internas de edificaciones (Obregón, 2006). Para construcción es utilizada como columnas sólidas, pisos, molduras, puertas, vigas sólidas, tablillas, vigas laminadas, columnas laminadas, tableros laminados, tarimas, mesas, sillas, sillones y marco de puertas y ventanas (Moya, 2004; Rojas, Arias, Moya, Meza, Morillo y Arguedas 2004).

En carpintería se usa para elaborar muebles rústicos y finos, armarios, bancas, camas, mesas, sillas, sillones, archivadores y molduras, pisos livianos, tarimas, instrumentos musicales de resonancia, artesanías, moldes, juguetes, embalajes, mango para herramientas, canoas y guacales (Moya, 2004; Obregón, 2006). En Costa Rica las astillas de *Gmelina arbórea* se han utilizado para la producción de papel (González y Serrano, 2004).

Uso medicinal de *Gmelina arbórea*

Gmelina arbórea es una planta medicinal muy valiosa es conocida localmente como “Gambhari”. En inglés se conoce como “árbol de candahar” o “teca blanca”. Las raíces, los frutos y las hojas de Gambhari tienen gran valor medicinal. En la medicina popular se utilizan casi todas las partes de este árbol, para el tratamiento de diversos trastornos estomacales, fiebre y problemas de piel (Sharma, Yelne y Dennis, 2001). Se utiliza principalmente

en el tratamiento de la diarrea, inflamación, debilidad sexual en varones, lepra, ulcera, disuria, anemia, secreciones vaginales, sensación de ardor y dolor de cabeza (Agharkar, 1991). Así *Gmelina arbórea* tiene el potencial para el desarrollo de la vida moderna y para el tratamiento de diversas enfermedades.

Actividad antibacteriana de *Gmelina arbórea*

(El-Mahmood, Doughari y Kiman, 2010). Demostraron la actividad antibacteriana de las hojas y corteza del tallo de *G. arbórea*, la cual se llevó a cabo utilizando el método de difusión en agar. Este ensayo mostró, que el crudo acuoso, etanólico, hexano y extractos de cloroformo de las hojas y cortezas inhiben el crecimiento de bacterias patógenas tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Shigella dysenteriae* y *Salmonella tiphy*, que frecuentemente muestran resistencia por encima del promedio. La extensión de la inhibición dependía del disolvente y del organismo.

Encontraron que la actividad fue consistentemente menos que la del antibiótico tetraciclina convencional, la efectividad de los extractos fue más en condiciones ácidas que en alcalinas y aumentadas con el ascenso de la temperatura. La planta se puede utilizar como fuente de nuevos antibióticos para el posible control de la disentería, diarrea, fiebre tifoidea e infecciones de heridas asociadas con estas bacterias (El-Mahmood, y cols., 2010).

Gmelina arbórea es utilizada tradicionalmente por curanderos tribales de Distrito de Wayanad, Kerala, India. En tal sentido (Bhagyalakshmi, Deepthi, Saju, Sameer, Suresh, Ajithkumar y Sanis y Reghu 2017). Determinaron La cicatrización de heridas y la actividad antiinflamatoria de *Gmelina arbórea* en ratas albinas wistar adultas. La actividad de curación se

evaluó utilizando el método de cicatrización de heridas por escisión y la actividad antiinflamatoria se evaluó utilizando el modelo de edema de pata inducido por carragenano. La toxicidad oral del extracto se determinó dando el extracto a una velocidad de 2000 mg / kg. Por dosis oral única. Para probar la actividad de curación de heridas de los extractos metanólicos Se utilizaron plantas al 5% y 10% en vehículo de parafina y el efecto se comparó con el fármaco estándar ácido bórico. La actividad antiinflamatoria se evaluó mediante una dosis oral única a la tasa de 250 mg / kg y 500 mg / kg de los extractos posteriores a la carragenina, manteniendo diclofenaco como control positivo. Se descubrió que el extracto no poseía toxicidad significativa después de la dosificación oral. *G. arbórea* mostró actividad moderada. Con respecto a la actividad antiinflamatoria y una mejor actividad en la curación de heridas.

(Vijay, Rajan, Sarumathy, Palani y Sakthivel 2011). Investigaron el posible efecto protector de *Gmelina arbórea* contra la cardiotoxicidad inducida por la dexorrubicina (agente quimioterapéutico contra el cáncer) en ratas. Para ello se administró *Gmelina arbórea* (250 y 500 mg/kg), y se aplicó dexorrubicina (20 mg/kg) en el séptimo día. *G. arbórea* protegida contra dexorrubicina inducida aumentó los niveles de enzimas marcadoras. Eso inhibió significativamente el agotamiento del glutatión (GSH) provocado por dexorrubicina en los tejidos cardíacos. Las reducciones de las actividades cardíacas de catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GSH-Px) y glutatión reductasa (GR) se mitigaron significativamente. Pretratamiento de *Gmelina arbórea* significativamente *Gmelina arbórea* alivió los cambios histopatológicos en los corazones de las ratas tratadas con dexorrubicina. En conclusión, *G. arbórea* protege contra la cardiotoxicidad inducida por dexorrubicina en ratas.

Compuestos químicos de *Gmelina arborea*

Una gran cantidad de metabolitos secundarios se han aislado de *Gmelina arborea*, que incluyen lignanos, flavonoides, cumarinas, saponinas, esteroides, terpenos, ácidos grasos y glucósidos (Tiwari, 2008).

- **Hojas:** se han aislado Glucósidos como iridoides, luteolina, apigenina, quercetina, glucósidos de kaempferol, quercetina, hentriacontanol y β -sitosterol (Hosny y Rosaazza, 1998; Nair y Subramanian, 1975; Rao, Rao, y Viswanathan, 1967). En las partes aéreas de *G. arborea* tres glucósidos iridoides: 6-O-(3''-O-benzoil)- α -1-ramnopiranosilcatapol, 6-O-(3''-O-trans-cinamoil)- α -1-ramnopiranosilcatapol y el 6-O-(3''-O-cis-cinamoil)- α -1-ramnopiranosilcatapol (Tiwari, 2008).
- **Frutas:** contiene ácido butírico en trazas y sustancias resinosas y sacarinas (Joshi, 2004). El aceite de la fruta es rico en alcoholes alifáticos tales como el (Z)-3-hexenol (17,9%), 1-octen-3-ol (8,4%) y hexanol (6,1%). El aceite también muestra presencia de heptacosano (5,6%), pentacosano (3,8%) y 1-pentacosano (3,2%) como hidrocarburos; y nonanal (8,7%) y (E)-2-decenal (3,0%) como constituyentes aldehídos (Moronkola, 2009).
- **Semillas:** contienen proteínas, grasas, fibra y carbohidratos. Minerales como el calcio, el magnesio y el fitato también son abundantes. Se espera que, si estas semillas son adecuadamente procesadas, serían buenas para fines nutricionales, especialmente para alimento del ganado (Akinjagunla, 2007).
- **Raíces:** contienen aceite viscoso, resina, alcaloides, ácido benzoico, gmelinol, hentriacontanol, alcohol cerílico, octacosanol, β -sitosterol y

cadinano tipo furanosesquiterpeno-gmelofurano (Daniel, 2008). Otros fitoquímicos aislados son la apigenina, apiosylskimmino, gmelinol y arboreol (Adhyapak, 2011); y derivados de la cumarina como el umbeliferona-7-apiosilglucósido (Satyanarayana, 1985).

- **Duramen:** La extracción de duramen ha producido n-hexacosanol, n-octacosanol, alcohol cerílico, cluitilferulato, β -sitosterol y un número de lignanos, incluyendo gmelinol, oxodihidrogelmelinol, arboreol, isoarboreol, metil arboreal, (Daniel, 2008), gummadiol (Anjaneyulu, 1975), gmelanona (Row, 1974). Algunos de los nuevos hidroxilignanos identificados de duramen son 4-hidroxisamina; 4,8-dihidroxisamina; 1,4-dihidroxisamina; 4-derivado de hidroxitetrahidrofurano, 2-piperonil-3-hidroximetil-4-(α -hidroxi-3,4-metilendioxibencil)-4-hidroxitetrahidrofurano y 4-O-glucósido de 4-epigummodiol (Anjaneyulu, Madhusudhana, Kameswara, Ramachandra, Andrew y Robert 1977). Además 2, 3, 4-trisustituido tetrahidrofuranilignano; arborona y 7-oxo-dihidrogelelinol y dos furofuranlignano; paulowin acetato y epiudesmina fueron aislados junto con metil trans-p-metoxicinamato y ácido trans-p-hidroxicinámico (Satyanarayana, 1986).
- **Corteza:** contiene lignanos, a saber, tirosol, balanofonina y gmelinol. Otros compuestos aislados de él incluyen 2,6-dimetoxi-p-benzoquinona, 3, 4,5-trimetoxifenolano un nuevo glucósido feniletanoido que fue identificado como p-hidroxifeniletilo-[5''-O-(3,4-dimetoxicinamoilo) β -d-apiofuranosil-(1'' 6'')]- β -d-glucopiranosida (Falah, Katayana y Suzuki. 2008).

Screening Fitoquímico de las hojas de *Gmelina arborea*

El screening fitoquímico realizado a las hojas de la planta revelo concentraciones elevadas de glucósidos y en bajas concentraciones la presencia de alcaloides, taninos, fenoles, flavonoides y esteroides. (Daya y Patel. 2012).

Farmacología y Fitoterapia

La farmacología moderna tiene sus raíces en la medicina “natural” tradicional, muchas de las drogas convencionales fueron originadas en el reino vegetal. En muchas partes del mundo, la medicina herbolaria estuvo en declive cuando las potentes drogas estuvieron disponibles, pero en una tercera parte de los países del mundo, esta práctica aún permanece en uso hasta nuestros días. En otros países, la medicina a través de las plantas continua en una coexistencia con la farmacología moderna (Ernst, 2001).

Mientras que las medicinas derivadas de fuentes vegetales han sido usadas desde tiempos remotos como una forma primitiva de terapéutica, la investigación moderna de la acción de las drogas es una actividad relativamente reciente que tiene sus orígenes en Alemania (Cuthbert, 2006, Vallance y Smart. 2006).

Claudius Galeno debe ser considerado como uno de los primeros practicantes de la farmacología, en los años 150 a.C., cuando reconoció la importancia de la experimentación y la teoría en el uso racional de los medicamentos (farmacología galénica). El médico suizo Paracelso, propuso el momento inicial de la farmacología con la investigación de los principios o ingredientes activos de muchas preparaciones medievales. Fue él quien reconoció que todas las drogas pueden ser venenos y el

conocimiento de la dosis permite determinar si un compuesto es útil o tóxico, posiblemente el más temprano reconocimiento hacia el aspecto terapéutico, un tema que debe ser familiar para los practicantes del cuidado de la salud de hoy. En esencia se piensa que la ciencia de la farmacología que es ampliamente reconocida surge a mediados del siglo XIX con Oswald Schiedeberg quien también fundó la primera revista de farmacología (Vallance y Smart 2006).

El uso de productos naturales con propiedades terapéuticas es tan antiguo como la civilización y por un largo tiempo los minerales, las plantas y los animales fueron las principales fuentes de drogas. La revolución industrial y el desarrollo de la química orgánica tuvieron como resultado la preferencia por los productos sintéticos para el tratamiento farmacológico. Sin embargo, si consideramos el impacto del descubrimiento de la penicilina obtenida de los microorganismos para el desarrollo de la terapia anti-infecciosa, la importancia de los productos naturales es enorme, cerca del 25% de las drogas prescritas alrededor del mundo vienen de las plantas: 121 compuestos bioactivos se convierten en drogas de uso común. De las 252 drogas consideradas como básicas y esenciales para la Organización Mundial de la Salud (OMS), el 11% son exclusivamente de origen vegetal y un número significativo son drogas sintéticas obtenidas de precursores naturales (Rates, 2001).

En la búsqueda de nuevos agentes antibacterianos, la implementación de modelos farmacodinámicos es una herramienta útil para el análisis de los compuestos naturales potencialmente activos, estos se deben construir cuidadosamente para poder generar datos en estudios *in vivo* e *in vitro* y así generar ideas en la dinámica de las poblaciones bacterianas que son la base del surgimiento de la resistencia bacteriana (Campion, 2005). Algunos estudios hechos con modelos farmacodinámicos muestran la importancia de que existen variantes de bacterias que

poseen resistencia a dosis bajas de antibióticos, estas son determinantes en la evolución de la resistencia bacteriana (Campion, 2005).

La evaluación de la sensibilidad que tienen las bacterias a los diferentes agentes antibacterianos está basada en el enfrentamiento *in vitro* de la bacteria con diferentes concentraciones del agente. La sensibilidad de una bacteria a un antibiótico determinado está dada por la concentración mínima inhibitoria (CMI), que se define como la menor concentración del antimicrobiano capaz de inhibir el desarrollo de una cepa bacteriana (Koneman, 1999; Prescott, 2000). Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) son consideradas como el “estándar de oro” para la determinación de la susceptibilidad de los organismos a los antimicrobianos y es por lo tanto usado para juzgar la interpretación de todos los otros métodos para probar la susceptibilidad (Andrews, 2001; Lambert y Pearson, 2000; Lambert, 2001).

www.bdigital.ula.ve

Extractos vegetales

La búsqueda de poderes curativos en las plantas es una idea ancestral. La gente de todos los continentes aplica cataplasmas y utiliza infusiones de cientos o miles de plantas autóctonas que datan desde la prehistoria. Existen evidencias de que los neandertales que vivieron hace 60.000 años en el hoy conocido Irak usaban plantas que son aun utilizadas ampliamente en la etnomedicina en todo el mundo (Winslow y Kroll. 1998; Cowan, 1999).

El uso de hierbas para el tratamiento de padecimientos tiene su raíz en una tradición de salud holística ancestral que se originó en Asia hace más de 3.000 años. Fue discontinuada por los practicantes de la medicina norteamericana en los siglos XIX y XX, sin embargo, los practicantes de la

salud a principios del siglo XXI, incorporaron remedios herbolarios, tales como la medicina tradicional china (MTC), japonesa, y la medicina Ayurveda de la india que están ganando gran aceptación. La medicina herbolaria consiste en el uso de mezclas complejas de plantas mínimamente procesadas (Kong, 2003; Plaeger, 2003).

Desde la perspectiva de la fisiología vegetal, existen grandes oportunidades para la investigación básica de las plantas medicinales y para el estudio de su producción química fitomedicinal (Briskin, 2000). Se estima que existen 420.000 especies de plantas en la naturaleza y que al menos el 5% de las plantas conocidas han sido analizadas para una o más actividades biológicas (Vuorelaa, 2004).

Los productos de las plantas, poseen numerosas propiedades farmacológicas, incluyendo las propiedades antiinflamatorias y antitumorales y la habilidad de promover la cicatrización de heridas (Chen, 2003; Dunsmore, 2001). Una de las principales fuentes de agentes antimicrobianos son los metabolitos secundarios de las plantas. La biosíntesis de estas moléculas es llevada ya sea de manera constitutiva, patógeno-independiente (fitoanticipinas) o si es inducida como una parte de la respuesta defensiva de las plantas en contra de una infección por bacterias, hongos o nematodos (fitoalexinas) en este grupo se encuentran las flavanonas, las isoflavonas, las auronas y los fenalenones (Luque-Ortega, 2004; Tanaka, 2002).

Los extractos de plantas son muy populares en algunos países, las drogas son usadas para el tratamiento de diversos padecimientos como la hiperplasia prostática benigna sintomática (HPBS) y las infecciones en vías urinarias (Dreikorn 2002)

Consistencia de los extractos

Alzate en 1990, descubrió la consistencia ideal que deberían tener los extractos. De acuerdo con este aspecto comúnmente los extractos se clasifican en cuatro grupos: blandos, firmes, secos y fluidos (Barreto, 1997).

Extractos Blandos Tienen la consistencia de la miel espesa; algunas veces, debido a la absorción de la humedad atmosférica, presentan una consistencia menos densa (Barreto, 1997).

Extractos firmes o de consistencia pilular Como su nombre lo indica deben tener una estrecha semejanza con la masa con la cual se fabrican o manufacturan las píldoras; deben tener la característica especial de no adherirse a los dedos (Barreto, 1997).

Extractos secos Anteriormente se le conocía con la denominación de “sales esenciales”. Son los extractos en los cuales el disolvente ha sido completamente eliminado. Contiene tan solo del 5 al 8% de agua. Se reducen fácilmente a polvo y facilitan su manipulación y dosificación. La forma farmacéutica de extractos secos aparece en varias farmacopeas (Belga, Norteamericana, noruega y mexicana), pero no indican un método exacto para la preparación de este tipo de extractos. (Barreto, 1997).

Extractos fluidos Son preparados en una forma tal que el peso del extracto corresponde exactamente al peso de la sustancia empleada como medicamento, desecada al aire y pulverizada (Barreto, 1997).

Características de los extractos

Estudios realizados por Corpas y Barreto entre 1988 y 1991, permitieron fundamentar las siguientes características específicas de los extractos:

- a.** Los extractos bien preparados son de color más o menos oscuro; cuando han sido preparados al vacío, son ligeramente más claros.
- b.** Algunos son de color café amarillento, otros rojizos: los extractos provenientes de hojas son verdosos debido a la clorofila.
- c.** Su aspecto debe ser liso, fino y homogéneo.
- d.** Su olor y sabor son propiedades características de la materia prima que les ha dado su origen. Cuando son mal preparados, adquieren olor a caramelo o confitura poco conocida.
- e.** La solubilidad de los extractos es variable y está en relación directa con el tipo de preparación al cual fueron sometidos.
- f.** Los extractos acuosos son completamente solubles en agua y producen una solución transparente, algunas veces ligeramente turbia, debido a que han sido preparados con mucha anterioridad.
- g.** Los extractos alcohólicos son parcialmente solubles en agua y algunas veces son totalmente insolubles, especialmente los extractos que han sido preparados con alcohol fuerte tienen un excelente índice de disolución, en el mismo título alcoholimétrico de alcohol con el cual han sido preparados.
- h.** Los extractos alcohólicos preparados con hojas, dan soluciones coloreadas de verde, pues la eliminación de la clorofila no puede ser total. Cordel en 1995 propuso ensayos generales para someter a los extractos a pruebas específicas para observar su calidad y composición final. Estos trabajos fueron remontados por Corpas, quien propuso realizar ensayos de identidad a los extractos obtenidos (Barreto, 1997).

Conservación de los extractos

Los extractos son medicamentos en donde la alteración modifica y varía notoriamente la naturaleza del producto. En principio, un extracto seco o de tipo pilular se conserva mejor que un extracto acuoso. Esto no es totalmente exacto, pues la naturaleza del producto interviene igualmente. Algunos extractos se descomponen al aire, otros absorben humedad atmosférica. Algunos se recubren de hongos y permiten el desarrollo de gérmenes bacterianos. Por otra parte, las alteraciones más frecuentes consisten en modificaciones químicas no aparentes como sucede con los extractos de flores verdes que por la oxidación de la clorofila pierden su color. Los extractos a base de alcaloides, bajan de título, según lo demuestran las investigaciones de Fricotel y Métin (1970). Esta disminución del título alcalóidico, es especialmente sensible a los extractos blandos y de aspecto pilular y bastante menos notorio en los extractos secos (Barreto, 1997).

La conservación de los extractos es indispensable y deben cumplir las siguientes condiciones:

- a. Se deben conservar protegiéndolos de la luz.
- b. Los envases deben estar bien tapados.
- c. Se deben conservar en un medio ambiente seco (Barreto, 1997).

Desde luego, son numerosos los métodos que se han indicado para la conservación de los extractos. Para mayor comodidad ellos se pueden clasificar, en dos categorías (Barreto, 1997).

En el primer grupo tenemos aquellos a los cuales no se les ha adicionado ninguna materia extraña. Al segundo grupo, por el contrario, pertenecen aquellos extractos que han sido objeto de la adición de productos extraños, de naturaleza físico-química definida (Barreto, 1997).

Componentes de los extractos vegetales

Alcaloides: Son sustancias nitrogenadas, básicas, de origen natural y de distribución restringida, los alcaloides poseen una estructura compleja. Su átomo de nitrógeno forma parte de un sistema heterocíclico y posee una actividad farmacológica significativa; según algunos autores, provienen únicamente del reino vegetal. Pueden encontrarse en estado de sales y se pueden añadir que biosintéticamente se forman a partir de un aminoácido (Bruneton, 2001). La variedad estructural es muy grande, tanto en su esqueleto carbonado como en el tipo y número de sustituyentes. El nitrógeno, que debe estar presente para que una molécula sea catalogada como alcaloide, puede estar como una amina primaria, secundaria, terciaria, o sal cuaternaria de amonio, amida y N-óxidos, o puede haber más de un nitrógeno con diferente funcionalidad en la misma molécula. Los aminoácidos no son alcaloides, pero son sus precursores (Marcano, y Hasegawa 2002).

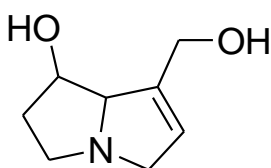


Figura 1. Retronecina

Triterpenos: Compuestos basados en más de 40 esqueletos diferentes son compuestos de C_{30} , procedentes de la ciclación del 3S-2,3-epóxido-2,3-dihidroescualeno o, más raramente, del mismo escualeno. Casi siempre hidroxilados en C_3 (debido a la apertura del epóxido), los triterpenos presentan una gran unidad estructural: las principales diferencias se deben a su configuración y van unidas a la conformación adoptada por el

epoxiesqualeno (o el escualeno) antes de la ciclación; el catión que se produce en esta ciclación, puede sufrir a continuación una serie de desplazamientos 1,2 de protones y de metilos que justifican la existencia de los diferentes esqueletos tetra- y pentacíclicos que caracterizan este grupo (Bruneton, 2001). Los triterpenos se encuentran en la naturaleza tanto en forma libre como asociados con azúcares o aminoácidos (Marcano, y Hasegawa 2002).

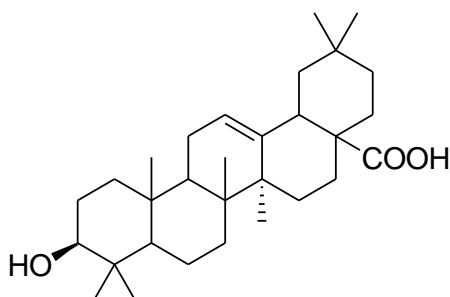


Figura 2. Ácido oleanoico

www.bdigital.ula.ve

Compuestos Fenólicos: Entre los compuestos fenólicos sencillos pueden contarse derivados de fenoles simples: C₆, Del ácido benzoico: C₆-C₁, de la acetofenona: C₆-C₂, y del ácido cinámico (fenilpropano): C₆-C₃. Hay relativamente pocos fenoles sencillos en la naturaleza y se forman por reacciones de degradación de los fenilpropanoides; algunos se derivan del ácido acético. La hidroquinona es probablemente la más frecuente, le sigue el floroglucinol que se encuentra libre (en té, cebollas) y combinado con glucosa (en varios cítricos). Los ácidos fenólicos son comunes en las plantas superiores. Para su formación se propone la conversión de los precursores directos: ácido shikímico ácido quínico además de la degradación del fenilpropano correspondiente: ácido cinámico y sus derivados. (Marcano, y Hasegawa 2002).

El elemento estructural fundamental que los caracteriza es la presencia de al menos un núcleo bencénico que contiene como mínimo un

grupo hidroxílico, libre o formando parte de otra función: éter, éster, heterósido. Una definición exclusivamente química de los fenoles es insuficiente para la caracterización de los compuestos fenólicos vegetales, ya que incluiría metabolitos secundarios que contienen estos elementos estructurales, pero que de manera manifiesta pertenecen a grupos fitoquímicos perfectamente diferenciados. Esto ocurre con numerosos alcaloides (boldina, morfina) y bastantes terpenos (timol, gosispol, carnosol) que poseen en su estructura, núcleos bencénicos e hidroxilos fenólicos (Bruneton, 2001)

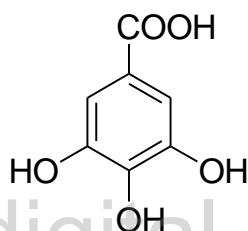


Figura 3. Ácido gálico

Flavonoides: La función de los flavonoides en las plantas son varias. Así, se consideran como antioxidantes y secuestradores de radicales libres, agentes antimicrobianos y antinutricionales, fotoreceptores y protectores contra la luz UV, agentes quelantes de metales, entre otros. La estructura general de los flavonoides comprende un anillo **A** derivado de la cadena del policétido (sigue el patrón de oxigenación del floriglucinol o del resorcinol: patrón *meta*), un anillo **B**, derivado del ácido shikímico, con sustitución en *orto*, como en los ácidos cumárico, cafeico y gálico, y tres átomos de carbono que unen los anillos **A** y **B**, correspondientes a la parte alquílica del fenilpropano. Es por ello que se les conoce como unidades C₁₅: C₆-C₃-C₆ y el esqueleto recibe el nombre de núcleo de flavano. Estos pueden contener un anillo central heterociclo (gamma-pironas) que son los más abundantes, o una

cadena abierta: chalconas, como precursores de los anteriores (Marcano, y Hasegawa 2002).

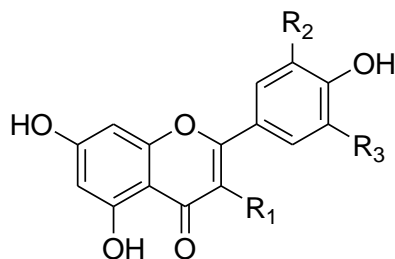


Figura 4. Flavonoides

Quinonas: Son compuestos oxigenados que corresponden a la oxidación de derivados aromáticos y que se caracterizan por un agrupamiento 1,4-dicetociclohex-2,5-diénico (*p*-quinonas) u, ocasionalmente, por agrupamiento 1,2-dicetociclohexa-3,5-diénico (*o*-quinonas). Las quinonas naturales tienen su diona conjugada con los dobles enlaces de un núcleo bencénico (benzoquinonas) o con los de un sistema aromático policíclico condensado: naftaleno (naftoquinonas), antraceno (atraquinonas), 1,2-benzantraceno (antraciclinoquinas), naftodiantreno (naftodiantronas), perileno, fenantreno. Al ser las quinonas un producto de oxidación de fenoles, también pueden encontrarse en agrupamiento quinónico en diferentes tipos de metabolitos secundarios. De este modo, se conocen algunos flavonoides-quinonas (oxidación del ciclo **B**) y numerosas quinonas con esqueleto terpénico (Bruneton, 2001).

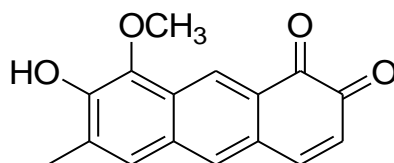


Figura 5. Hallocromo

Las α -pironas que se generan por lactonización del ácido *o*-cumárico se conocen como cumarinas y están ampliamente distribuidas en el reino vegetal. La estructura más sencilla, la cumarina misma, es utilizada como aromatizante en confitería (Marcano y Hasegawa 2002).

Las cumarinas se encuentran en su mayoría oxigenadas en C-7 (por ejemplo, umbelliferona, muy frecuente en las plantas de la familia Umbellifera), presentan a menudo, una o varias unidades de isopreno en posiciones *orto* al oxígeno fenólico. Ello puede a su vez formar, por degradación de la cadena furocumarinas lineales o angulares, como por ejemplo psoralen (un potente antiasmático, que se encuentra en las plantas de ruda, *Ruta graveolens*) y angelicina, respectivamente. Algunas furanocumarinas preniladas en C-5 y en C-8 se han aislado como metabolito minoritario de las semillas de *Murraya koenigii*, usadas en la medicina tradicional de Nigeria entre otras cosas, como tónicos estomacales y para curar la mordedura de animales venenosos (probablemente debido a su contenido de alcaloides) (Marcano y Hasegawa 2002).

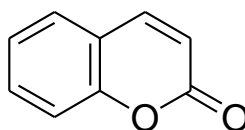


Figura 6. Estructura de una cumarina (1-benzopiran-2-ona)

Saponinas: Se llaman saponinas a un grupo de sustancias glicosídicas que se disuelven en agua y poseen la propiedad de formar espuma al agitar la solución. Por hidrólisis (ácida, microbiológica o enzimática) de una saponina se obtienen carbohidratos y una aglicona: “sapogenina”, la cual estructuralmente puede ser del tipo esteroidal (C₂₇) o triterpenoidal (C₃₀). Estos compuestos se aíslan de diferentes fuentes vegetales; en Liliáceas,

Dioscoreáceas y Solanáceas son comunes las saponinas esteroidales, mientras que, en las Umbelíferas, Leguminosas, Caryofiláceas, Araliáceas, Rhamnáceas, lo son las triterpenoidales. En general las esteroidales, menos numerosas que las triterpenoidales conocidas, son más importantes como materia prima para la fabricación de hormonas sintéticas, mientras que las triterpenoidales son potencialmente más aplicables en forma directa (Marcano y Hasegawa 2002).

Las saponinas clásicas están conformadas por azúcares y una aglicona. Sin embargo, recientemente se han aislado compuestos tensoactivos, que además de azúcares, poseen un glicérido que contiene dos unidades de ácido linoleico y una unidad de galactosa con la cual se conecta el resto glicérido a la posición C₂₃ del esqueleto del ácido oleanólico (Marcano y Hasegawa 2002).

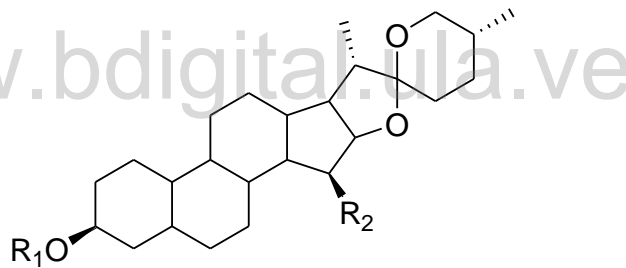


Figura 7. Saponina esteroidal

Taninos: Son sustancias que producen el endurecimiento del cuero, están ampliamente distribuidos en dicotiledóneas leñosas; su función en las plantas no está clara, pero debido a su abundancia en tejidos jóvenes y en las heridas causadas en el tallo, particularmente aquellas cerca del suelo, se cree que son utilizados por el vegetal como protección contra infecciones de hongos y parásitos (los arboles pobres en taninos se pudren rápidamente) se extraen con agua ya que a pesar de su complejidad estructural son

altamente oxigenados y/o presentan azúcares en su composición que le dan carácter hidrofílico (Marcano y Hasegawa 2002). Los taninos se clasifican en:

- Hidrolizables: (galotaninos y elagitaninos) aquellos que por tratamiento con ácido o por enzimas, se separan en la aglicona (ácidos gálico y elágico, o sus derivados) y los azucars (Marcano y Hasegawa 2002).
- Condensados: aquellos que por tratamiento con ácido no se degradan, polimerizan aún más, convirtiéndose en masas amorfas insolubles conocidas como *flobafenos*; estos son polímeros derivados de 3-hidroxi- y 3,4-dihidroxi-flvanos (Marcano y Hasegawa 2002).

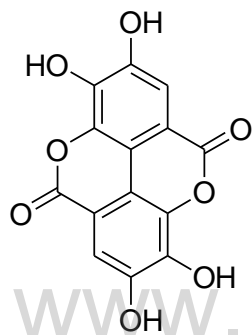


Figura 8. Ácido elárgico

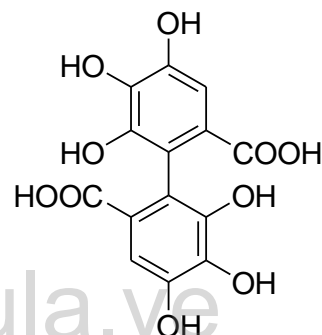


Figura 9. Ácido hexahidroxifénico

Propiedades antibacterianas de los extractos vegetales

Últimamente, el surgimiento de nuevos padecimientos incluyendo el síndrome de inmunodeficiencia adquirida humana ha incentivado la investigación intensiva dentro de los derivados vegetales. Los cuales pueden ser efectivos, especialmente para su uso en las naciones subdesarrolladas con poco acceso a las medicinas caras (Cowan, 1999; Navarro. 2006).

La resistencia a los antibióticos en uso se ha convertido en un gran problema de salud pública, ante lo cual, los extractos vegetales con acción antibacteriana capaces de burlar los mecanismos de resistencia actuales representan una importante alternativa para su uso clínico en el tratamiento

de enfermedades infecciosas (Critchley y Blosser-Middleton. 2003; Dartois, 2005; Dryla, 2005).

Uno de los mecanismos para la inducción de la resistencia es la presión selectiva a la que se someten las bacterias, pero como el uso de extractos vegetales a nivel hospitalario es limitado, las bacterias no han desarrollado mecanismos de resistencia en su contra (Begun, 2005; Haddadin, 2002; Lowy, 2003.). Entonces es posible que los extractos vegetales y aceites esenciales puedan inhibir el crecimiento de cepas resistentes, y multirresistentes.

Identificación de los componentes químicos de los extractos vegetales mediante el método de Screening Fitoquímico o tamizaje fitoquímico.

El screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en someter a los extractos a ciertos ensayos de reacción de color y/o precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo.

Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación de los metabolitos secundarios presentes en la especie vegetal (Lock, 1994). Entre los ensayos más importantes se encuentran:

- **Ensayo de Lieberman-Bourchard (triterpenos y/o esteroides):** se basa en la formación de un compuesto coloreado por la acción del ácido sulfúrico concentrado sobre los esteroides y triterpenos en medio anhidro. El medio anhidro se consigue con ácido acético y el producto

final obtenido es un compuesto de color verdoso en el caso de los esteroides, y color rojo o violeta para los triterpenos (Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011).

- **Ensayo de espuma (saponinas):** Debido a que las soluciones de saponinas presentan actividad óptica, es común medir el contenido de sólidos solubles en solución utilizando un refractómetro (Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011).
- **Ensayo de Dragendorff, Wagner y Mayer (alcaloides):** se basan generalmente en la combinación de los alcaloides con metales pesados. Se llevan a cabo en solución acuosa ácida. Los reactivos más utilizados para la precipitación de los alcaloides son ácidos de elevado peso molecular. Como el reactivo yodado de Dragendorff (yodo bismutato potásico, precipitado rojo- naranja); el reactivo de Mayer (mercurio tetrayoduro potásico, precipitado blanco- amarillento) y el reactivo Wagner (yoduro de potasio, precipitado marrón) (Domínguez, 1973).
- **Ensayo de Hidróxido de amonio (cumarinas):** se basa en la apertura y solubilización en medio básico. Las cumarinas se caracterizan por su intensa absorción de la región UV del espectro, las cuales al ser examinadas a la luz ultravioleta presenta coloración exaltada en presencia de amoniaco (Tamayo Verdecia y Mojera, 2011).
- **Ensayo de Borntrager (quinonas):** la naftoquinonas y antraquinonas libres al ser tratadas con la solución de hidróxido amónico forman complejos de color rojo cereza. Esta reacción es utilizada para la detección directa de quinonas en los extractos vegetales (Tamayo, Verdecia y Mojera, 2011).
- **Ensayo de Shinoda (flavonoides):** el zinc en polvo reacciona con ácido clorhídrico concentrado. El hidrogeno generado produce por reducción el ion flavilio de color rojo escarlata (varía desde el rosa muy

débil hasta el rojo escarlata). Todos los flavonoides, excepto chalconas, auronas e isoflavonas dan positiva esta reacción (Dominguez, 1973).

Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares que están constituidos por una sola célula, sin núcleo. Su ADN se localiza libre en el citoplasma y no presenta organelos. Además, está provista de una pared celular que rodea la célula otorgándole solidez y protección. Las células son diminutas que no se pueden observar, sin embargo, cuando se unen entre sí creando colonias es más fácil observarlas. Cuando los factores ambientales se tornan desfavorables, la gran mayoría de bacterias crean de manera interna endosporas, quienes son las encargadas de comprender la sustancia genética y los elementos fundamentales para subsistir. Algunas de ellas se caracterizan por ser sólidas, facilitándoles la subsistencia a elevadas temperaturas. Su reproducción es de tipo asexual a través de la fisión binaria, el cual va a generar duplicados idénticos a la célula inicial. En algunos casos las bacterias realizan su réplica de forma tan rápida dando así a una población de millones de bacterias en un tiempo muy reducido. (Sacsquispe y Lucho 2009.).

Bacterias Gram positivas

Posee una pared celular gruesa formada principalmente por una capa de peptidoglicano (mureina) y dos clases de ácidos: teicoicos y lipoteicoico, están en la superficie empotrado en la capa y unido a la membrana citoplasmática; y el ácido teicoico de la pared que está en la superficie, y se une solo a la capa externa (Murray, Rosenthal, y Pfaller. 2009).

La pared de las bacterias Gram positivas es mucho más gruesa en comparación a la de las Gram negativas. El polímero principal en la pared de la Gram positiva se denomina mucopéptido. Este polímero está formado por una cadena de moléculas alternas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico en unión a al cual está unido un tetrapéptido de aminoácidos alternantes. Los aminoácidos son D-glutámico, y D y L alanina, L-lisina, glicina y un diaminoácido único, el ácido diaminopilémico. (Quentin y Russell 2002).

El ácido teicoico es otro polímero de las paredes de las bacterias Gram positivas; está compuesto de fosfato de glicerol o fosfato de ribitol y puede estar unido al ácido murámico. (Quentin y Russell 2002). Existen gran variedad de bacterias Gram positivas, pero se describirán a continuación las empleadas para este estudio:

El género *Enterococcus* comprende microorganismos Gram positivos, de los cuales existen al menos 12 especies. El *Enterococcus faecalis* es el más común, siendo una bacteria inmóvil, anaerobia facultativa, fermenta la glucosa sin producir gas y habita el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos, son capaces de crecer en condiciones extremas y causan del 85 al 90% de las infecciones comprometidas en humanos. Se considera una de las causas más comunes de infecciones nosocomiales, sobre todo en unidades de cuidados intensivos, se transmite de paciente a paciente por dispositivos médicos. Son resistentes a aminoglucósidos y producen betalactamasas. (Brookc, Butel y Morse, 2005; Koneman, Allen, Janda, Shreckenberger, y Win 2001).

Staphylococcus aureus se destaca como un importante patógeno humano (ver figura), produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. En la comunidad, las infecciones por *S. aureus* son a menudo agudas, piogénicas y superficiales, aunque también puede producir, con menor frecuencia, infecciones profundas como osteomielitis, neumonía y

endocarditis aguda. A nivel nosocomial *S. aureus* es un importante agente de infecciones de herida quirúrgica, de prótesis y otras. También es causa de una serie de infecciones producidas por toxinas como el síndrome del shock tóxico, la intoxicación alimentaria y el síndrome de piel escaldada (Seija, 2006).



Figura 10. *Staphylococcus aureus*

Bacterias Gram negativas

Las bacterias Gram negativas tienen una capa delgada de péptidoglucano (mureína) unida a una membrana exterior por lipoproteínas. La membrana exterior está hecha de proteínas, fosfolípidos y lipopolisacáridos. La pared de la célula tiene poros llamados porines para el transporte de sustancias de bajo peso molecular. Entre la membrana citoplásmica y la pared celular hay un espacio periplásmico con enzimas hidrolíticas, enzimas inactivadoras de antibiótico y proteínas de transporte (Murray, Rosenthal, Pfaller 2009).

La pared de las bacterias Gram negativas es más compleja. Hay un péptidoglucano mucho más delgado y con menos enlaces cruzados en la superficie interna junto a la membrana citoplasmática. En las paredes de las Gram negativas las cadenas vecinas se enlazan directamente por medio de péptidos de ácido murámico (Quentin y Russell 2002).

En la superficie externa de la capa de péptidoglicano esta una capa denominada membrana externa; esta es una capa doble de fosfolípidos que comprende al lipopolisacarido de la superficie externa, con lipoproteína y proteína incluidas. La lipoproteína puede constituir el 40% del peso seco de la pared celular. El lipopolisacarido está constituido por lípido A y un núcleo polisacárido que es común a todas las bacterias Gram negativas (Quentin y Russell 2002). Existe gran variedad de bacterias Gram negativas, pero se describirán a continuación las empleadas para este estudio.

La especie *Escherichia coli* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo corto anaerobio facultativo que mide entre 0,5 µm de ancho por 3 µm de largo, no forma esporas, son móviles por la presencia de flagelos periféricos (ver figura), estas bacterias se caracterizan por ser catalasa positivo, oxidasa negativo y por reducir nitratos a nitritos y fermentar la glucosa con producción de ácido o ácido y gas. Así mismo, se encuentra normalmente como flora habitual del tracto gastrointestinal y posee estructuras antigénicas complejas que producen diferentes toxinas y factores de virulencia, provocando infecciones intestinales y extra intestinales como: infecciones en el aparato excretor, vías urinarias, meningitis, septicemia entre otros. (Brookc, Butel y Morse, 2005; Koneman, Allen, Janda, Shreckenberger, y Win 2001).

Pseudomonas aeruginosa pertenece a la familia Pseudomonadaceae, son bacilos o diplococos Gram negativos, aerobios no esporulados y no utiliza los hidratos de carbono, puede tolerar condiciones de alcalinidad y al igual que *Escherichia coli* puede reducir los nitratos a nitritos. En los medios de cultivo se observan colonias lisas, grandes y brillantes, producen pigmentos y tiene olor característico a fruta. Es un patógeno oportunista en inmunocomprometidos produciendo graves infecciones en vías respiratorias, vías urinarias, tejidos y septicemia. (Brookc, Butel y Morse, 2005; Koneman, Allen, Janda, Shreckenberger, y Win 2001).

Klebsiella pneumoniae es una bacteria de forma bacilar, Gram negativa, anaerobia facultativa, inmóvil y usualmente encapsulada. (Leal, Schmalbach, Álvarez, Buitrago, Méndez y Grebo 2006). Ampliamente esparcida en el ambiente, y presente de manera especial en las superficies mucosas de mamíferos; en los seres humanos coloniza la nasofaringe y el tracto gastrointestinal (Orjala, Wright, Rali y Sticher. 1993; Standley, y Steyermark. 1952).

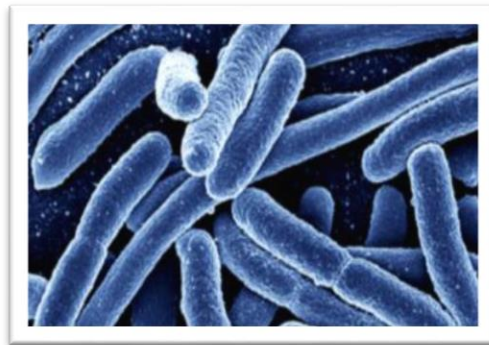


Figura 11. Escherichia coli.

www.bdigital.ula.ve

Resistencia Bacteriana

La resistencia que presentan las bacterias contra los antibióticos se ha convertido en un problema de salud a nivel mundial. El desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos, su uso indiscriminado e irracional y la presión evolutiva ejercida por el uso terapéutico ha favorecido el incremento de cepas resistentes (Tello, Austin y Telfer. 2012; Wilke, 2010). Entendiéndose por resistencia, el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antibacterianos (Cordiés, Machado, y Hamilton, 1998). Desde el principio de la era antibiótica se han descrito los fenómenos de resistencia y actualmente se han identificado las cepas resistentes, tal es el caso de la aparición de *Staphylococcus aureus* resistente a la penicilina por su capacidad de degradar a este antibiótico, posteriormente resurge esta misma cepa presentando resistencia a otro antibiótico conocido como

meticilina (Rodríguez-Noriega, Seas, Guzmán-Blanco, Mejía, Álvarez, Bavestrello, Zurita, Labarca, Luna, Salles, y Gotuzzo , 2010).

Desde el punto de vista clínico se considera que una bacteria es sensible a un antibacteriano cuando la concentración de este en el lugar de la infección es al menos 4 veces superior a la concentración mínima inhibitoria (CMI). Una concentración por debajo de la CMI califica a la bacteria de resistente y los valores intermedios como de moderadamente sensibles. Los conceptos de sensibilidad y resistencia son absolutamente relativos y dependen tanto del valor de la localización de la infección como de la dosis y vías de administración del antibiótico (Cordiés, Machado y Hamilton 1998)

Se pensaba que el descubrimiento o el diseño de nuevos antibióticos podría resolver el problema, es entonces cuando aparecen medicamentos tales como los macrólidos, glicopéptidos, aminoglucósidos entre otros, con los cuáles se observa una respuesta favorable contra las enfermedades infecciosas. Sin embargo, también aparecen nuevos mecanismos de resistencia difíciles de controlar y entonces surgen las bacterias que sobreviven a la presencia de más de un antibiótico, conocidas como multirresistentes (Amábile-Cuevas, 2010).

Entre los diversos factores que han contribuido al incremento significativo de la aparición de resistencia bacteriana podemos mencionar la presión selectiva ejercida al prescribir formal o libremente medicamentos para uso terapéutico, la utilización generalizada de antibacterianos en pacientes inmunocomprometidos y en la unidad de cuidados intensivos, el uso de dosis o duración inadecuada y el desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los microorganismos aislados (Wilke, 2010). La resistencia bacteriana tiene una base genética intrínseca y una adquirida (Tello, Austin y Telfer. 2012). A continuación, se describirá de manera breve los tipos de resistencia bacteriana que se presentan.

Tipos de mecanismos contra los antibacterianos:

Se entiende por resistencia, el mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir la acción de los agentes antimicrobianos principalmente por el uso indiscriminado mismos en humanos y producciones animales (Cordiés, Machado y Hamilton, 1998; Curtis, Barnes, Shcnek y Flores, 2006; Watson 2011). La implementación de dosis o duración inadecuada de la terapia antimicrobiana y el desconocimiento de los perfiles de sensibilidad de los antibióticos a la bacteria teniendo en cuenta las referencias de institutos de salud también pueden generar el fenómeno de resistencia. Cada antibiótico se caracteriza por un espectro natural de actividad antibacteriana, y las cepas bacterianas que no se encuentra incluidas dentro de dicho espectro se denominan naturalmente resistentes (resistencia intrínseca o natural), (Cabrera, Gómez y Zúñiga, 2007; Sumano y Ocampo, 2006).

Se conoce como resistencia natural a los mecanismos permanentes determinados genéticamente, no correlacionables con el incremento de dosis del antibiótico. Un ejemplo de esto es la resistencia de la *Pseudomonas aeruginosa* a las bencilpenicilinas y al trimetoprin sulfametoxazol; bacilos Gram negativos aeróbicos a clindamicina. Los microorganismos que producen antibióticos son por definición resistentes. En el caso de la resistencia natural todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico (Couvalin, 1988).

La resistencia adquirida aparece por cambios puntuales en el ADN (mutación) o por la adquisición de éste (plásmidos, trasposones, integrones). Se dan casos tales como la transformación de una Betalactamasa en una Betalactamasa de espectro extendido o como en el caso de mutaciones de los genes que codifican las porinas con el consecuente bloqueo del ingreso

del antibiótico al interior del microorganismo. Constituye un problema en la clínica, se detectan pruebas de sensibilidad y se pone de manifiesto en los fracasos terapéuticos en un paciente infectado con cepas de un microorganismo en otros tiempos sensibles (Couvalin, 1988)

La aparición de la resistencia en una bacteria se produce a través de mutaciones (cambios en la secuencia de bases de cromosoma) y por la transmisión de material genético extracromosómico procedente de otras bacterias. En el primer caso, la resistencia se transmite de forma vertical de generación en generación. En el segundo, la transferencia de genes se realiza horizontalmente a través de plásmidos u otro material genético movable como integrones y transposones; esto último no sólo permite la transmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas. De esta forma una bacteria puede adquirir la resistencia a uno o varios antibióticos sin necesidad de haber estado en contacto con estos (Guerra, 2000; Hart, 1998).

www.bdigital.ula.ve

Mecanismos de acción de los antibacterianos

- Inhibición de la síntesis de la pared celular
- Inhibición de la síntesis proteica
- Alteración de la permeabilidad célula
- Inhibición de la síntesis de ADN y ARN

Inhibición de la síntesis de la pared celular: La inhibición de la síntesis del péptidoglicano es letal para la bacteria, ya que normalmente, durante la síntesis de la pared celular, el proceso de adición de componentes se acompaña de digestión autolítica de la materia ya existente, por lo que, en

presencia de un inhibidor de la síntesis, la digestión enzimática continúa, debilitándose la pared, con lo que se permite que en presencia de un medio hipotónico (con respecto al interior celular), los líquidos ingresen, hinchando la bacteria y produciendo la "lisis osmótica" de la misma. De esta forma podemos entender el efecto casi nulo de los antibacterianos ante un absceso, el cual representa un medio hipertónico (pus con respecto al citoplasma bacteriano) que no se presta para la lisis osmótica mencionada. De aquí la necesidad de drenar abscesos, simultáneamente al uso de un antibiótico. La síntesis de pared celular, puede ser inhibida en diferentes niveles (Frohlich, 1985).

Inhibición de la síntesis proteica: La síntesis proteica requiere de mecanismos intactos de interacción entre ribosoma, ácido ribonucleico mensajero (ARNm), de transferencia (ARNt), y aminoácidos. Los aminoglucósidos, la espectinomicina y la tetraciclina impiden la unión de la porción 30S ribosomal con el ARNm. El cloranfenicol, la eritromicina, la lincomicina y la clindamicina impiden la formación subsecuente de péptidos, al unirse a la región 50S ribosomal (Frohlich, 1985).

Alteración de la permeabilidad celular: la organización química de la membrana celular de bacterias y humanos es muy parecida, por esta razón, los antibacterianos que ejercen sus efectos deletéreos sobre las bacterias a este nivel, producen también efectos tóxicos importantes e los tejidos del hombre, limitando su uso terapéutico (Frohlich, 1985).

Ejemplo de este grupo es la nistatina (usada sólo en forma tópica por lo ya mencionado), la anfotericina y las polimixinas. Estas últimas producen "aperturas" en la membrana mediante las cuales se produce un intercambio anormal de iones, con trastorno de la homeostasis celular y muerte (Frohlich, 1985).

Inhibición de la síntesis de ADN y ARN: entre estos tenemos al ácido nalidíxico, la rifampicina, la griseofulvina, la sulfas y el trimethopim. El ácido nalidíxico produce bloqueo enzimático a nivel de la “gyrasa” (necesaria para la síntesis de ácido desoxirribonucleico ADN). La rifampicina lo hace a nivel de la “ARN polimerasa” (enzima que normalmente inicia la síntesis de ácido ribonucleico mensajera) (ARMm) (Frohlich, 1985).

En la síntesis de bases que forman parte de los ácidos nucleicos, el ácido fólico representa la vitamina fundamental. A partir de este, y a través de una serie de pasos enzimáticos, se producen los ácidos desoxirribonucleico y ácido nucleico (ADN, ARN). Las bacterias poseen las enzimas necesarias para producir ácido fólico a partir de ácido paminobenzóico (Paba); el hombre no. Las sulfas ejercen su acción inhibiendo este paso metabólico bacteriano. Los pasos enzimáticos que siguen, para la transformación del ácido fólico a metabolitos básicos para la síntesis de los ácidos nucleicos, son similares en bacterias y hombre. El trimethoprím actúa inhibiendo la acción de una enzima: la "dihidrofolato reductasa". Por ser este uno de los pasos comunes en ambos, representaría una acción tremendamente tóxica para el hombre, de no ser por la afinidad "diez mil veces mayor" del trimethoprím, hacia la enzima bacteriana, lo que da el margen de toxicidad selectiva que permite su uso terapéutico. La griseofulvina (análogo de la base púrica guanosina), compite con esta durante la síntesis del ADN (Harper, 1978).

Mecanismos de resistencia a los antibacterianos.

El uso de los antibacterianos para el tratamiento de las infecciones ha sido relacionado, prácticamente siempre, a la aparición de cepas resistentes a ellos. Los conocimientos disponibles sobre los diferentes mecanismos de resistencia, tanto fenotípicos (resistencias cruzadas y resistencias asociadas)

como bioquímicos y genéticos, han permitido establecer unas buenas bases para la terapéutica, así como para la búsqueda de nuevos antibacterianos (Ruiz y Guillén, 2005).

La importancia de estos conocimientos en el ámbito terapéutico se hace evidente cuando en los estudios sistemáticos de sensibilidad *in vitro* que se utilizan habitualmente en los laboratorios de microbiología no se detecta la resistencia a un antibacteriano a pesar de que el microorganismo objeto de estudio posee la dotación genética necesaria para expresar dicha resistencia. En estas situaciones el conocimiento de los mecanismos de resistencia y la elección de los antibacterianos más idóneos para detectar dicha resistencia resulta vital para evitar fracasos terapéuticos (Ruiz y Guillén, 2005).

La interpretación conjunta de la resistencia a varios antibacterianos de la misma o diferentes familias, la deducción del posible mecanismo de resistencia y la posterior generación del informe con el antibiograma (patrón de sensibilidad a los antibacterianos) es lo que se ha denominado antibiograma interpretativo (Ruiz y Guillén, 2005).

Las bacterias presentan dos tipos de resistencia que pueden ser naturales, adquiridas o terapéuticas. La resistencia natural está asociada a una vía de biosíntesis natural presente en la bacteria, no todos estos son inicialmente sensibles a todos los antibacterianos, sino que una determinada bacteria puede ser resistente a un antibacteriano sin necesidad de que medie ninguna adquisición (Ruiz y Guillén, 2005).

La resistencia adquirida se refiere, cuando en una especie que es naturalmente sensible a un antibacteriano aparecen cepas de la misma especie con resistencia a dicho antibacteriano. La resistencia terapéutica está influida por muchos factores, como los dependientes del hospedador, los relacionados con el antibacteriano, los relacionados con el paciente y los

relacionados con los microorganismos por tal motivo, el fracaso terapéutico de un tratamiento puede deberse a la resistencia bacteriana ya sea natural o adquirida (Ruiz y Guillén, 2005).

Puede existir el origen no genético del fármaco resistencia ya que en la mayor parte de las acciones antibacterianas es necesaria la replicación de las bacterias. Por lo tanto, los microorganismos que carecen de actividad metabólica (no se multiplican) son fenotípicamente resistentes a los fármacos. Sin embargo, su progenie es sensible. Por otra parte, la mayor parte de los microorganismos resistentes a fármacos emerge como resultado de algún cambio genético y una serie de procesos de selección por los antibacterianos (Brookc, Butel, y Morse. 2005). A continuación se define los mecanismos de resistencia genéticas:

- **Resistencia cromosómica:** surge como resultado de una mutación espontánea en un locus que regula la sensibilidad a determinado antibacteriano. La presencia del antibacteriano sirve como mecanismo de selección para suprimir a los microorganismos sensibles y fomentar la proliferación de los mutantes resistentes. Constituyen una causa rara de resistencia clínica a los fármacos. Los mutantes cromosómicos por lo general son resistentes gracias a un cambio en un receptor estructural para un fármaco. Por lo tanto, la proteína P 12 en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano sirve como receptor para el enlace de la estreptomicina. La mutación en el gen que regula a esa proteína estructural provoca resistencia a la estreptomicina. La mutación también puede provocar la pérdida de PBP, lo que hace que estos mutantes sean resistentes a los β -láctamicos (Brookc, Butel, y Morse. 2005).
- **Resistencia extracromosómica:** con frecuencia las bacterias contienen elementos genéticos extracromosómicos llamados

plásmidos. Algunos plásmidos transportan genes de resistencia a uno, y con frecuencia a varios, antibacterianos. Los genes de los plásmidos para resistencia antibacteriana suelen regular la formación de enzimas que pueden destruir a los antibacterianos. Así, los plásmidos establecen la resistencia a las penicilinas y cefalosporinas al transportar genes para la formación de β -lactamasas. Los plásmidos codifican las enzimas que acetilan, adenilan o fosforilan diversos aminoglucósidos, para enzimas que determinan el transporte activo de las tetraciclinas a través de la membrana celular, y para otras. El material genético y los plásmidos se pueden transferir a través de transducción, transformación y conjugación (Brookc, Butel, y Morse. 2005).

- **Transducción:** es una recombinación genética en las bacterias mediada por bacteriófagos. En términos simples, una partícula de transducción puede considerarse como el ácido nucleico bacteriano en un fago cubierto. Incluso una población de fagos líticos puede contener algunas partículas en las cuales la cubierta del fago está rodeada por ADN derivado de la bacteria más que del propio fago. Tal población se ha utilizado para transferir genes de una bacteria a otra. Los fagos atemperados son los vehículos preferidos para la transferencia genética porque la infección de las bacterias receptoras bajo condiciones que favorecen la lisogenia reduce la lisis celular y por tanto favorece la supervivencia de las cepas recombinantes (Brookc, Butel, y Morse. 2005).
- **Transformación:** la captación directa de ADN donador por bacterias receptoras depende de su competencia para la transformación. La competencia natural es poco común entre bacterias y algunas de estas cepas son transformables sólo en presencia de factores de competencia, que se producen en un punto específico en el ciclo de crecimiento. Otras cepas sufren

transformación natural con rapidez y esos organismos ofrecen una promesa para la ingeniería genética por la facilidad con la cual incorporan ADN modificado a sus cromosomas. Se encuentran bacterias transformables competentes naturalmente en varios géneros, lo que incluye *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae* (Brookc, Butel, y Morse. 2005).

- **Conjugación:** los plásmidos son los elementos genéticos que más a menudo se transfieren por conjugación. Las funciones genéticas necesarias para la transferencia están codificadas por los genes t.r.a, que son transportados por plásmidos autotransmisibles. Estos últimos pueden movilizar otros plásmidos o porciones del cromosoma para su transferencia. En algunos casos se logra la movilización porque los genes t.r.a proporcionan las funciones necesarias para la transferencia de un plásmido por lo demás no susceptible de transmisión. En otros casos, los plásmidos autotransmisibles se integran con el ADN de otro replicón y, como una extensión de sí mismo, aportan cadenas de ADN a la célula receptora (Brookc, Butel, y Morse. 2005).
- **Resistencia cruzada:** algunos microorganismos que son resistentes a cierto fármaco también son resistentes a otros fármacos que comparten un mecanismo de acción. Este tipo de relación existe principalmente entre fármacos con similitud química o que tienen un modo similar de enlace o acción. En determinadas clases de fármacos, el núcleo activo de la sustancia química es tan similar entre distintos congéneres que la resistencia cruzada es extensa (Brookc, Butel, y Morse. 2005).

Antibióticos

A partir de 1928, cuando Fleming descubrió la penicilina, comenzó la llamada época de los antibióticos y, desde esa fecha, en las décadas siguientes, se produjo un incremento de forma exponencial en la creación de nuevas clases de estos agentes, especialmente en países desarrollados (Hart, 1998).

Los antibióticos, suelen definirse como: la sustancia química producida por un ser vivo o fabricada por síntesis, capaz de paralizar el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos, por su acción bacteriostática, o de causar la muerte de ellos por su acción bactericida. Se han identificado cientos de antibióticos y muchos han sido llevados a la etapa en que tienen utilidad en la terapéutica de enfermedades infecciosas. Los antibióticos muestran diferencias notables en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en sus espectros antibacterianos y en sus mecanismos de acción (Flores, Leal y Escamilla 2014).

Actividad antibacteriana

El crecimiento acelerado de la población trae con ella enfermedades como por ejemplo las infecciosas, producidas por bacterias, virus, hongos entre muchos otros microorganismos. A pesar de que existen muchos antibacterianos para su control o tratamiento, el uso irracional de estos viene generando resistencia bacteriana y otros efectos, llamados secundarios que no son beneficiosos para la salud. La biodiversidad vegetal ofrece alternativas antibacterianas; algunas especies con excelentes resultados, debido a sus constituyentes químicos, los cuales pueden tener más de 150 componentes. En tal sentido, la actividad antibacteriana es la capacidad de destruir, inactivar microorganismos, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena (Urbina y Villamizar, 2012).

Esta diversidad de componentes brinda la oportunidad de encontrar nuevos agentes activos desde el punto de vista farmacológico, a partir de una materia prima más económica y natural: las plantas medicinales. La actividad biológica puede variar desde la inhibición completa o parcial del crecimiento microbiano hasta la acción bactericida (Urbina y Villamizar, 2012).

Varios métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacteriana frente a agentes antibacterianos. En muchos laboratorios de microbiología clínica el test de difusión en agar es usado en forma rutinaria para microorganismos de rápido crecimiento y algunas bacterias patógenas. Los ensayos de susceptibilidad basados solamente en la presencia o ausencia de una zona de inhibición sin importar su tamaño, no son aceptables. Resultados confiables solo se pueden obtener con disco de ensayo de difusión que use el principio de metodología estandarizada y con medidas de diámetro de zonas correlacionadas con la determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) con cepas conocidas susceptibles y resistentes a varios antibióticos (Urbina y Villamizar, 2012).

Técnicas utilizadas para la determinación de la actividad antibacteriana

Los métodos antibacterianos, están clasificados en tres grupos principales: difusión, dilución y métodos bioautograficos (Rivas, Morales, Cárdenas, 2016). Dentro de los principales métodos de evaluación preliminar de la actividad antibacteriana se encuentran los métodos de difusión en disco y difusión del pozo en agar, mediante los cuales se determina en forma cualitativa el efecto antibacteriano de los extractos de plantas sobre los microorganismos de interés, los resultados obtenidos se expresan midiendo

el diámetro de los halos de inhibición producido por los extractos (Rivas, Morales, Cárdenas, 2016).

Por otro lado, los métodos de dilución son apropiados para la determinación cuantitativa de la actividad antibacteriana, la técnica más utilizada es la denominada concentración mínima inhibitoria (CMI), con la cual se define la concentración mínima capaz de inhibir el crecimiento visible del microorganismo. Esta técnica puede ser mejorada con la ayuda de indicadores REDOX, que son utilizados generalmente para la determinación del crecimiento/viabilidad bacteriana. Una vez que se ha establecido de forma cualitativa y cuantitativa el efecto antibacteriano de los extractos es conveniente determinar el compuesto responsable de dicha actividad (Rivas, Morales, Cárdenas, 2016).

Las pruebas de susceptibilidad bacteriana son técnicas esenciales en la investigación y los resultados pueden variar dependiendo de una gran cantidad de factores involucrados en el desarrollo de las mismas. Desde la selección de las plantas, el tipo de extracción, la elección de bioensayos apropiados hasta detalles como la cantidad de inóculo y la técnica utilizada para la determinación de actividad antibacteriana, pueden influir en los resultados de una manera contundente (Rivas, Morales, Cárdenas, 2016).

Los ensayos de sensibilidad deben estar estandarizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad. Y aunque no existe una reglamentación y/o estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria de los extractos de plantas, como está establecido para los antibióticos, la mayoría de los métodos están basados en los utilizados para evaluar la resistencia y/o susceptibilidad a antibióticos. Los métodos para evaluar la actividad de extractos sobre bacterias y hongos suelen ser similares, variando la preparación del inóculo, medio de cultivo, temperatura y el tiempo de incubación (Rivas, Morales, Cárdenas, 2016).

El método de difusión es un método cualitativo, que se caracteriza por ser de fácil estandarización y está indicado para microorganismos no exigentes y crecimiento rápido. Este método está apoyado por datos clínicos y el laboratorio y además presenta la ventaja de ser reproducible; esta técnica se puede realizar ya sea en pozo o disco ya que actualmente ambos se encuentran estandarizados y son recomendados por el Subcomité de ensayos de susceptibilidad del NCCLS, de los Estados Unidos (Rivas, Morales, Cárdenas, 2016).

Prueba de sensibilidad por Difusión en Agar (Kirby- Bauer)

Este método incorpora el antibacteriano a discos de papel de filtro. Su introducción permitió agilizar la determinación de la sensibilidad de las cepas bacterianas frente a un número importante de antibacterianos de forma simultánea. El empleo de los discos de papel de filtro para las pruebas de sensibilidad está estandarizado y se correlaciona con la CMI. Durante muchos años, y a pesar de ser una técnica puramente cualitativa, el método de difusión por disco (o método Kirby-Bauer), en función sobre todo de su comodidad, economía y fiabilidad, ha sido uno de los más utilizados en los laboratorios (Malbrán, 2012).

Se coloca un disco de papel filtro que contiene determinada cantidad de un fármaco, en la superficie de un medio sólido en el que se ha sembrado la bacteria a investigar, ésta se inocula en una o varias placas de agar y sobre su superficie se disponen los discos correspondientes a varios antibióticos. Se incuban las placas durante 16-24 horas y se estudia el crecimiento en ellas. Se valora el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco como poder de inhibición que tiene el fármaco contra dicha bacteria y se compara con las referencias oportunas publicadas por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI). De esta

manera se sabe si la bacteria es Sensible, Intermedio o Resistente a cada uno de los antibióticos (Malbrán, 2012).

Definición de Términos

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en $\mu\text{g}/\text{mL}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C . (Horna, Silva, Vicente y Tamaris (2005).

Metabolitos Secundarios: Son una gran cantidad y diversidad de compuestos orgánicos que produce una planta y no parecen tener función directa con su crecimiento y desarrollo (Torres, 2004).

Extracto: Sustancia muy concentrada que se obtiene de las diferentes partes de las plantas, empleando diversos procedimientos. (Albornoz, 1980)

Fitoquímica: por definición, la fitoquímica es el estudio de los componentes químicos de las plantas. La técnica más común para obtener los Principios Activos (PA) a partir de plantas es conocida como extracción y su finalidad es la separación de la materia soluble (componentes fitoquímicos) de los tejidos vegetales (materia insoluble) por acción de un disolvente. (Flores, Castañeda, Montiel y Hernández, 2014),

Infección: Es un término clínico que indica la contaminación, con respuesta inmunológica y daño estructural de un hospedero, causada por un microorganismo patógeno, es decir, que existe invasión con lesión tisular por

esos mismos gérmenes (hongos, bacterias, protozoos, virus, priones), sus productos (toxinas) o ambos a la vez (Tortora, Funke y Case 2007).

Operacionalización de las Variables

La variable es una característica o cualidad; magnitud o cantidad; que puede sufrir cambios, y que es objeto de análisis, medición, manipulación o control en una investigación. En el presente trabajo se operacionalizan las variables con el fin de convertir los conceptos abstractos en términos concretos, observables y medibles.

Tabla 1. Operacionalización de la variable dependiente.

1. Variable	2. Tipo de Variable	3. Definición conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana de los extractos de <i>Gmelina arborea</i>	Dependiente Cuantitativa	Actividad antibacteriana, es la propiedad de ciertas sustancias que forman un compuesto, o que se hallan en una muestra capaces de eliminar agentes bacterianos o la inhibición de su crecimiento sin incurrir en el daño del objeto, ambiente u organismo que las porta. Son en esencia fármacos como es el caso de los antibióticos u otros agentes químicos capaces de combatir estos cuerpos (Venemedia, 2015)
4. Definición Operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
La actividad antibacteriana se puede medir por: -Método de difusión en pozos modificado (Kirby-Bauer).	Cepas Grampositivas: - <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 - <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212 Cepas Gramnegativas: - <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 - <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	Sensible -Sensibilidad intermedia -Resistente -Presencia o ausencia del halo de inhibición frente a cepas Grampositivas y Gramnegativas.

Fuente: Obregón, Pérez y Cordero de Rojas (2019)

Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente

1. Variable	2. Tipo de Variable	3. Definición Conceptual ¿Qué es?
Composición química de los extractos de la especie <i>Gmelina. arbórea</i>	Independiente Cualitativa Discreta	Metabolito secundario o Producto natural que se usa como sinónimo, aquel que es propio de una especie, se le conoce también como producto químico y en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza (Marcano y Hasegawa, 2002).
4. Definición Operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicador
- Pruebas químicas cualitativas también conocidas como Tamizaje fitoquímico.	Para las pruebas químicas cualitativas puede haber presencia y ausencia de: - Alcaloides. - Esteroles y/o triterpenos. - Saponinas. - Compuestos fenólicos simples. - Taninos. - Flavonoides. - Quinonas y Antraquinonas. - Glicosidos cardiotónicos. - Cumarinas. - Sesquiterpenlactonas.	- Alcaloides: la aparición de turbidez o precipitados. - Esteroles y/o triterpenos: coloración azul o verde para esteroides; coloración es rosa, rojo, magenta o violeta para triterpenos. - Formación de abundante espuma, para saponinas. - Compuestos fenólicos: coloración de azul a negro. - Un precipitado blanco indica presencia de taninos. Flavonoides: coloración naranja a rojo, para flavonas; si es rojo flavonoles y magenta flavononas. -Para antraquinonas y quinonas una coloración roja. -Glicosidos cardiotónicos: coloración púrpura o violácea. -Cumarinas: La presencia de fluorescencia azul-violeta. - Las coloraciones roja, violeta o rosa para sesquiterpenlactonas

Fuente: Obregón, Pérez y Cordero de Rojas (2019)

Hipótesis

En vista, que estudios anteriores han demostrado que diferentes especies del género *Gmelina*, han presentado actividad antibacteriana, es de esperar que los extractos obtenidos de la especie *Gmelina arborea* posean actividad antibacteriana contra diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación.

Es una investigación basada en un estudio de tipo confirmatorio ya que se estableció la relación causa-efecto entre la composición de los extractos de hexano y etanol obtenidos de las hojas de *Gmelina arborea* frente a bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*) Gram negativas. (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*).

Diseño de la Investigación.

Es una investigación que presenta un diseño de campo y experimental: ya que el material vegetal (hojas) para la obtención del extracto de la especie *Gmelina arborea*, fue recolectado en el Jardín de Plantas Medicinales “Doctor Luis Ruiz Terán”, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Se le realizaron una serie de pruebas y de tal manera se observó los efectos que producen frente a cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas.

Población y Muestra.

Población

La población de esta investigación estuvo representada por la planta *Gmelina arbórea*, ubicada en el Jardín de Plantas Medicinales “Doctor Luis Ruiz Terán”, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Muestra

La muestra estuvo representada por 1345 g de hojas de la especie *Gmelina arbórea*, perteneciente a la familia (Verbenaceae).

Instrumento de Recolección de Datos

Procedimientos o Metodologías.

Recolección de la Muestra: Las hojas de la planta *Gmelina arbórea*, fueron recolectadas en el Jardín de Plantas Medicinales “Doctor Luis Ruiz Terán”, de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, tomándose aproximadamente 1345 g de la misma, seguidamente, se procedió a almacenar a temperatura ambiente para su posterior tratamiento y obtención de los extractos vegetales (Esquema 1).

Preparación de los extractos vegetales: Se separaron las hojas de los tallos, luego se llevó a estufa durante 5 días a una temperatura no superior a 40°C. Donde se obtuvo un peso (hojas secas) de 383 g. (Figura 13). Transcurrido este tiempo, se verificó que la muestra se encontrara libre de humedad, para luego realizar el proceso de molienda, hasta obtener un polvo fino mediante un mortero La muestra seca y molida de las hojas de *Gmelina arbórea*, luego de pesar una cantidad representativa, fue sometida a

extracción sólido-líquido por maceración en frío, utilizando como solventes hexano y etanol durante un periodo de 7 días cada uno. Donde inicialmente se utilizó todo el material en una sola columna, se agregó primero el hexano, se filtró por gravedad y posteriormente se repitió el procedimiento con el etanol, (Figura 14) para así obtener ambos extractos.



Figura 12. Preparación de los extractos vegetales

www.bdigital.ula.ve



Figura 13. Maceración en frío.

Remoción o evaporación del solvente: se concentraron los destilados de hexano y etanol a presión reducida, utilizando un rotavapor a una temperatura de 45°C. El producto seco se pesó, 1,17 g para el extracto hexánico y 8,13 g para el extracto etanólico, se colocaron en envases de

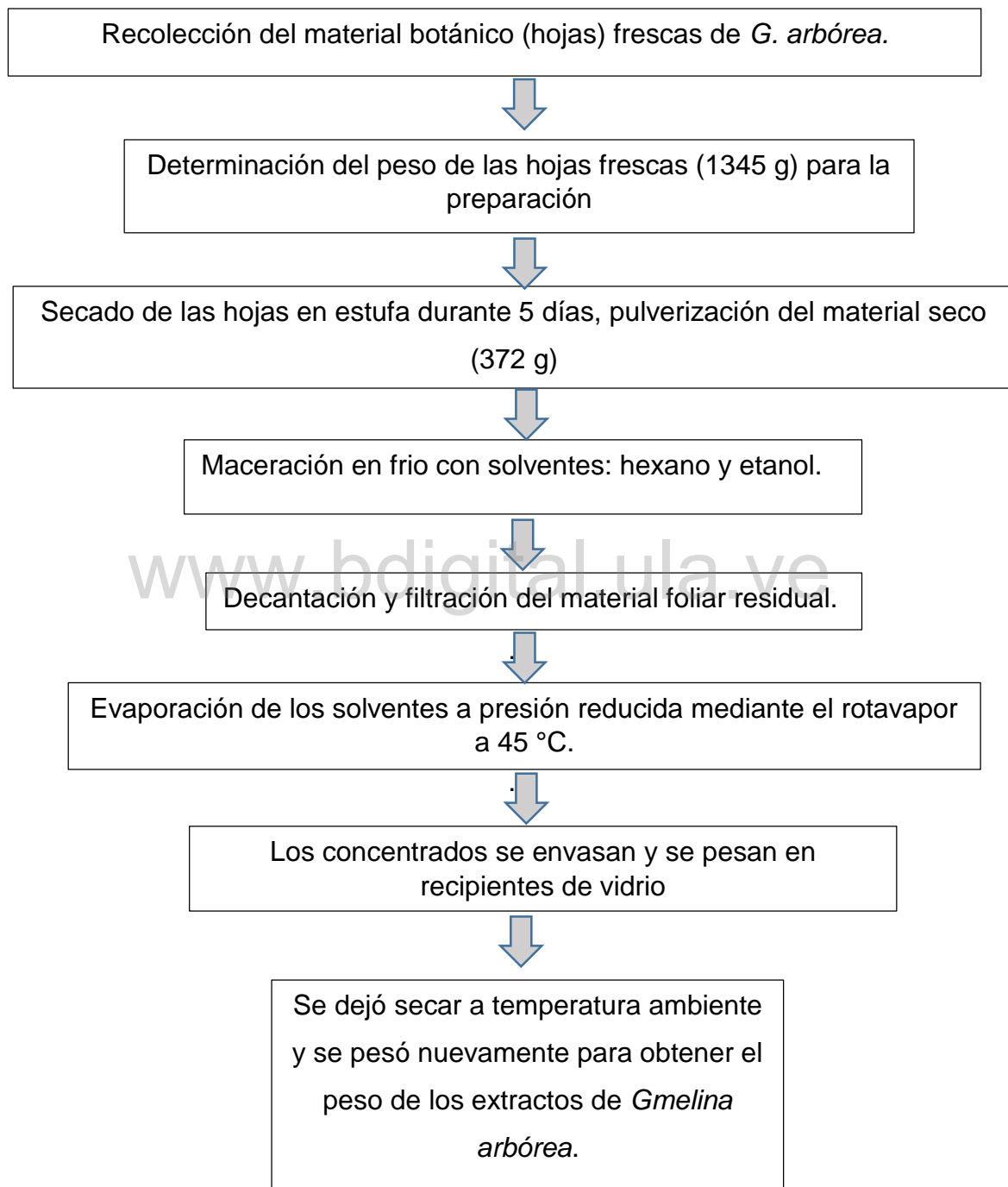
vidrio transparentes, respectivamente rotulados y sellados conservándose en un lugar seco y fresco (Figura 15 y Esquema 1).



Figura 14. Remoción o evaporación del solvente

www.bdigital.ula.ve

Esquema 1. Diseño experimental para la obtención de los extractos (hexano y etanol) de la especie *Gmelina arbórea*.



Screening Fitoquímico: El screening fitoquímico para los extractos etanólico y hexanólico se realizaron en el Instituto de Investigaciones “Dr Alfredo Nicolas Usubillaga del Hierro” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de la Dra. Alida Pérez. Los diferentes ensayos colorimétricos utilizados y reportados permitieron identificar de forma cualitativa la presencia de ciertos metabolitos secundarios, tales como: alcaloides, (Esquema 3) quinonas, (Esquema 7) compuestos fenólicos, (Esquema 5) cumarinas, (Esquema 8) flavonoides, (Esquema 6) saponinas, (Esquema 9) taninos (Esquema 10) y triterpenos y esteroides (Esquema 4). (Marcano y Hasegawa, 2002)

- **Identificación de esteroides y triterpenos: Reacción Lieberman Bourchard:** en dos tubos de ensayos limpios, secos y debidamente identificados, se tomaron pequeñas cantidades de los extractos previamente llevados a sequedad y se les añadió 0,5 mL de anhídrido acético, y luego se adicionó cuidadosamente por las paredes del tubo 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La reacción se interpreta positiva cuando aparecen coloraciones violeta, verde o azul hay presencia de esteroides; si la coloración es rosa, rojo, magenta o violeta habrá presencia de triterpenos. (Marcano y Hasegawa, 2002)
- **Identificación de taninos:** Para la identificación fue necesario realizar el siguiente ensayo: Reacción con gelatina al 10%: se toma 1-2 mg del extracto y se disuelve en 2 mL de solución de gelatina. Si se observa la presencia del precipitado blanco indica positivo para la prueba, habrá presencia de taninos. (Marcano y Hasegawa, 2002)
- **Identificación de cumarinas:** Reacción con hidróxido de amonio: a una parte del extracto en un tubo de ensayo se les adicionaron 0,5 mL de etanol y dos gotas de hidróxido de amonio concentrado. Se

considera positiva la prueba si se presenta una fluorescencia azul-violeta bajo la luz ultravioleta. (Marcano y Hasegawa, 2002)

- **identificación de flavonoides** Para realizar la determinación de flavonoides fue necesario realizar el siguiente ensayo. Se disolvió una porción del extracto en 3 mL de etanol y se dividió en 2 tubos. El primer tubo se usó para la reacción de Shinoda y el segundo se utilizó como blanco.

Reacción de Shinoda: se adicionaron 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, si se forma una coloración naranja indica la presencia de flavonas, si es rojo flavonoides y si es magenta flavononas. (Marcano y Hasegawa 2002)

- **Identificación de quinonas:** Reacción de hidróxido de amonio: se adicionó una gota de hidróxido de amonio concentrado a cada extracto. Se considera positiva la prueba para antraquinonas al tener la presencia de una coloración roja que aparece en los primeros minutos. (Marcano y Hasegawa, 2002)
- **Identificación de alcaloides:** En este ensayo se utilizaron los reactivos de Mayer, Wagner y Dragendorff tomando una porción del extracto de etanol en 3 tubos de ensayo y se le adicionaron 2 mL de ácido clorhídrico HCl al 5% y posteriormente se situó en el ultrasonico durante 2 minutos, para finalmente añadir 3 gotas del reactivo de Mayer, Wagner y Dragendorff respectivamente. Se considera positiva la prueba cuando aparece una turbidez o precipitado en los tubos. (Marcano y Hasegawa, 2002)
- **Identificación de Saponinas:** En un tubo de ensayo se colocó la muestra (1-2 mg) del extracto etanólico disuelta en 1 mL de agua y se agitó fuertemente. La ausencia de formación de espuma que debió permanecer por más de 15 minutos se consideró como negativa. (Rivas, Oranday y Verde, 2016)

- **Identificación de Compuestos fenólicos:** Prueba del FeCl₃: se disolvió la muestra 1-2 mg del extracto, en 1 mL de etanol añadiendo unas gotas de cloruro férrico al 5%, la coloración verde oscura o negra indicó la positividad de la prueba. (Rivas, Oranday y Verde, 2016)

Determinación de la actividad antibacteriana del extracto de la especie *Gmelina arborea*.

Para determinar la actividad antibacteriana por el método de Kirby-Bauer en pozo modificado, el cual consiste en sembrar el inóculo sobre la superficie del agar selectivo estipulado para este método y seguido se hacen los pozos sobre la superficie del agar con el inverso de una pipeta estéril y en cada uno de ellos se deposita de 1000ppm de los extractos a evaluar se deja reposar por 30 min y finalmente se incuba a 37 °C por 24 horas, posteriormente se miden los halos de inhibición. Técnica descrita por (Ríos, Recio y Villar, 1988).

Bacterias de ensayo: Para el estudio se seleccionaron cinco especies de bacterias de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), (Tabla 3) de las cuales: dos corresponden al grupo de bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*), y tres especies bacterianas pertenecientes al conjunto de las Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*).

Tabla 3. Bacterias empleadas para el estudio de la actividad antibacteriana de la especie *Gmelina arborea*.

Cepas Gram-positivas	Cepas Gram-negativas
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853

Preparación de los pre-inóculos bacterianos: Las cepas a ensayar se incuban en medio BHI a 37 °C por 16 a 18 horas antes de hacer el ensayo bacteriano, ya que es en ese tiempo donde las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento.

Preparación de los inóculos bacterianos: Una vez que se obtienen las cepas bacterianas frescas y purificadas se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa en aro estéril, tomándose de ésta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en una solución de NaCl al 0,85% previamente estéril, hasta alcanzar la turbidez del patrón de MacFarland N-0,5 equivalentes a 10^{6-8} UFC/mL.

Preparación de las placas: A cada placa se le colocan 20mL del agar Mueller-Hinton previamente preparado y esterilizado a una temperatura que no supere los 40°C para poder mezclar con el inóculo bacteriano en la relación del 2% con respecto a los 20 mL agar Mueller-Hinton y posteriormente se deja solidificar a temperatura ambiente.

Preparación de los pozos: Cada placa solidificada se les procede a realizar los pozos con la inversa de una pipeta estéril, a cada pozo se le adicionan 50µL de la muestra (extracto); el control positivo representado por el

antibiótico en polvo comercial diluido (Oxitetraciclina 5 mg/mL) (Tabla 5) con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a evaluar y el control negativo representado por el Dimetil sulfoxido (DMSO) el cual utilizamos para disolver la muestra.

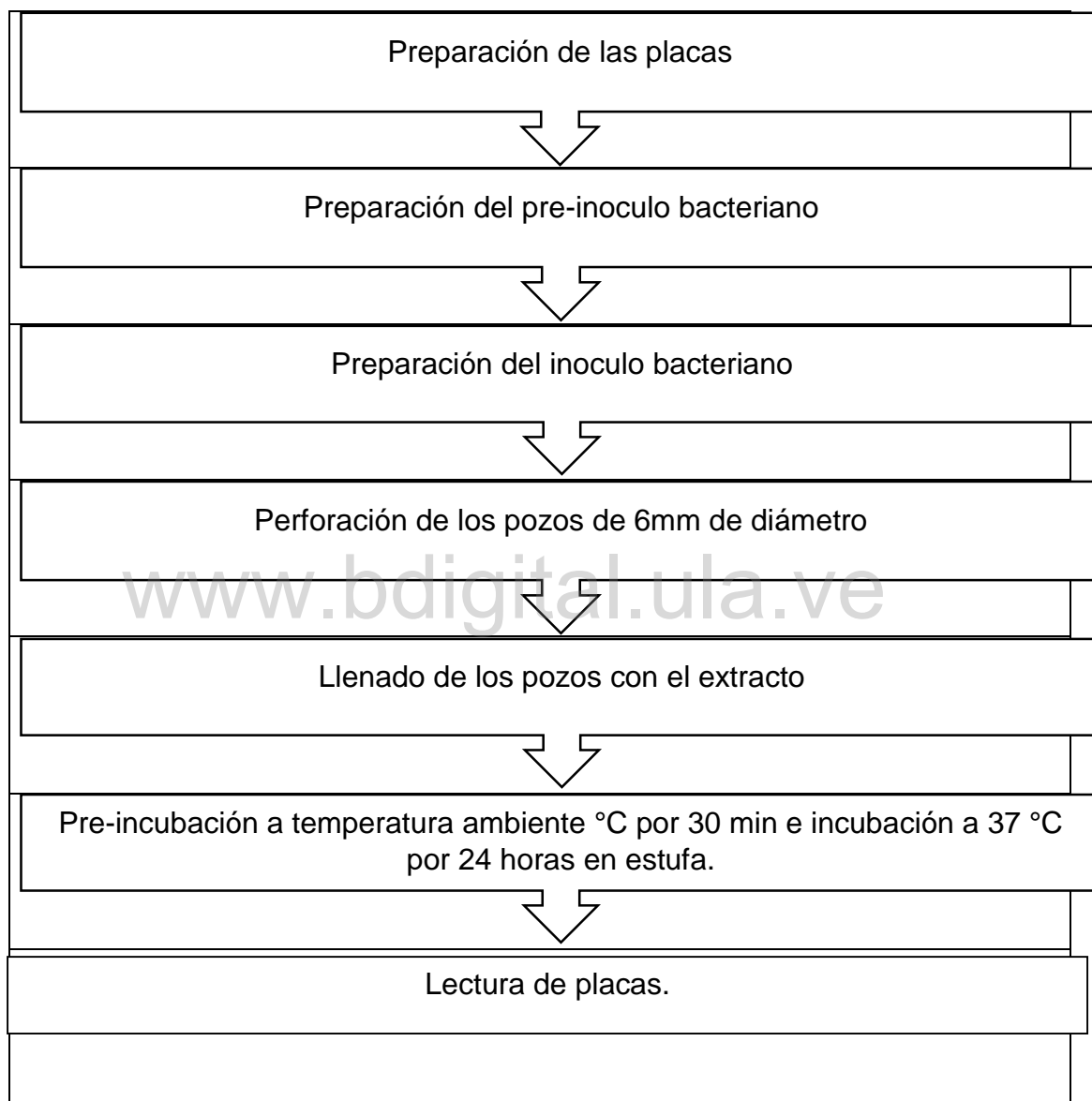
Pre-incubación e incubación: Después de preparadas las placas con la muestra a estudiar, éstas se dejan a temperatura ambiente por 30 minutos para que las muestras difundan (preincubación); y finalmente se incuban en la estufa a 37°C durante 24 horas en atmósfera aeróbica.

Lectura de los halos de inhibición: Finalizado el tiempo de incubación se procede a medir con una regla milimetrada la zona clara alrededor del pozo (Figura 16) de cada una de las placas que contienen las cepas bacterianas a estudiar, el control positivo y el control negativo.



Figura 15. Lectura de halos de inhibición con una regla milimetrada.

Esquema 2. Procedimiento empleado para la evaluación de la actividad antibacteriana por el método modificado de pozos de agar.



CAPITULO IV

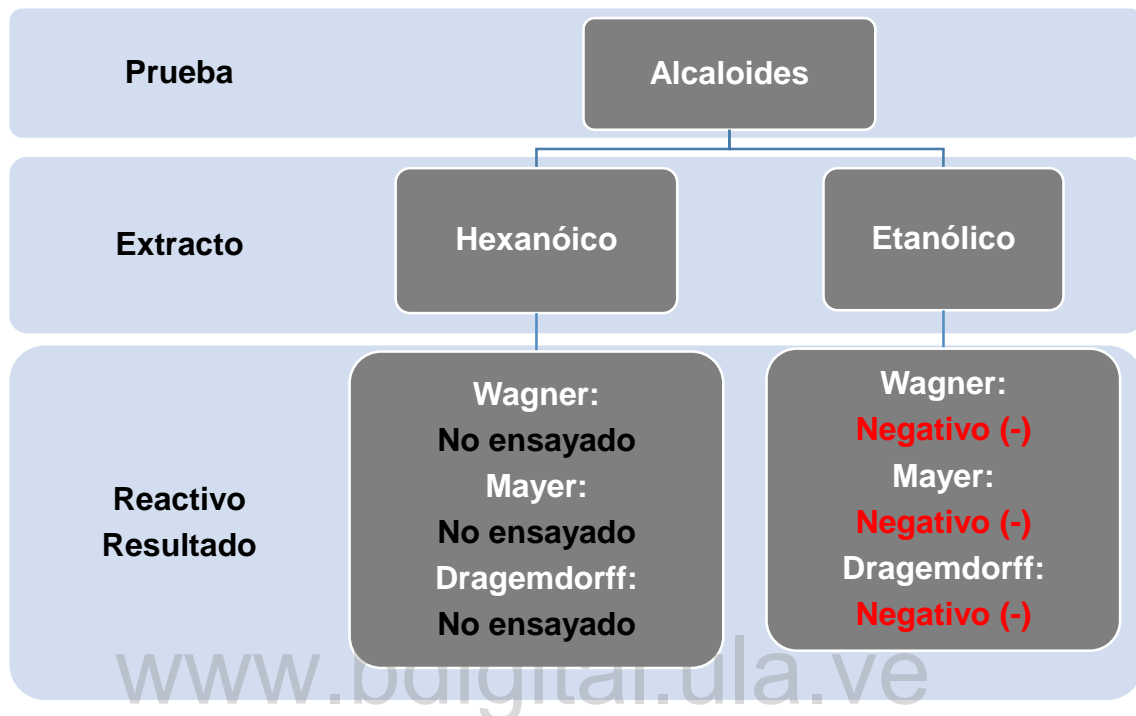
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

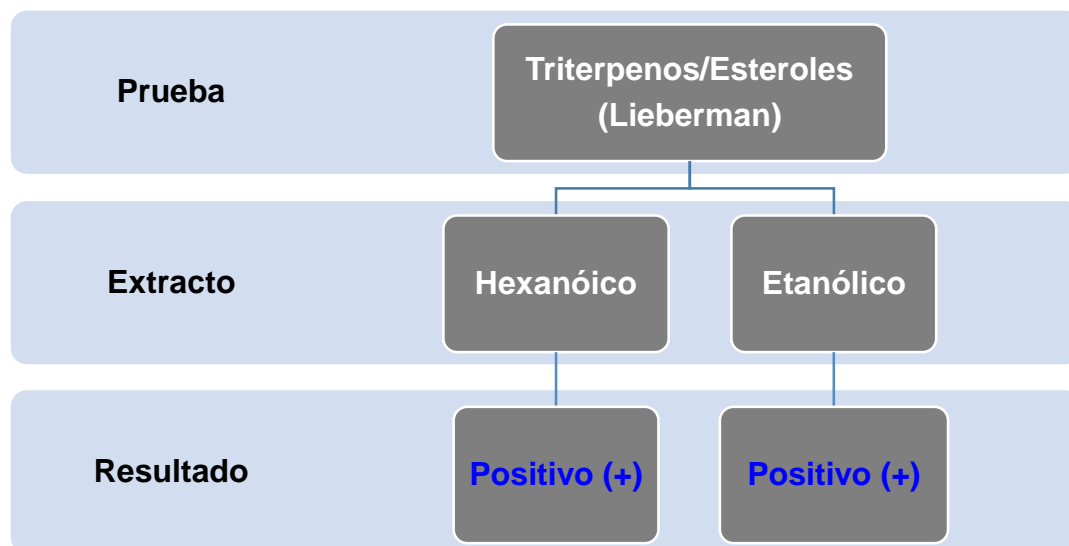
Las hojas de la especie *Gmelina arbórea* fueron expuestas a un proceso de maceración con solventes orgánicos (hexano y etanol) los cuales se llevaron al rotavapor para evaporar los solventes y obtener los extractos concentrados (separando el solvente de la solución). De este proceso se obtuvieron 8,13 g y 1,17 g de los extractos etanólico y hexanólico respectivamente, los mismos presentaron un olor característico, un color verde oscuro y consistencia espesa.

Se le realizó un estudio fitoquímico a los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Gmelina arbórea*, que se basó en el estudio de los metabolitos secundarios contenidos en las muestras. Habiendo la presencia o ausencia de cada uno de estos compuestos de forma específica: dando como resultado, viraje de color principalmente, aparición de precipitados, turbidez del medio, producción de espuma por agitación, ruptura de proteínas y fluorescencia por exposición a la luz ultravioleta (UV). Los resultados arrojados (Tabla 4, Esquemas 3-10) por las pruebas que se realizaron aportaron información muy relevante para la caracterización fitoquímica de la especie *Gmelina arbórea*.

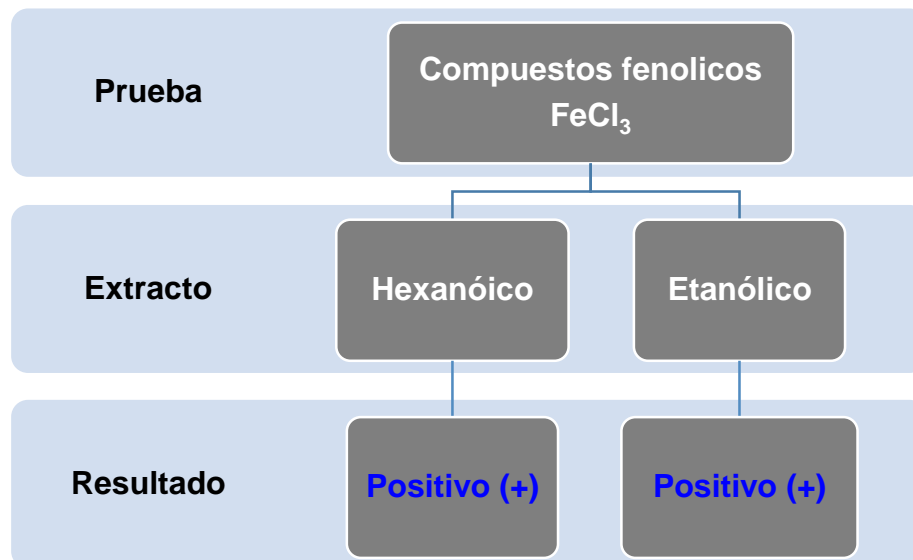
Esquema 3. Resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Gmelina arbórea*, para Alcaloides.



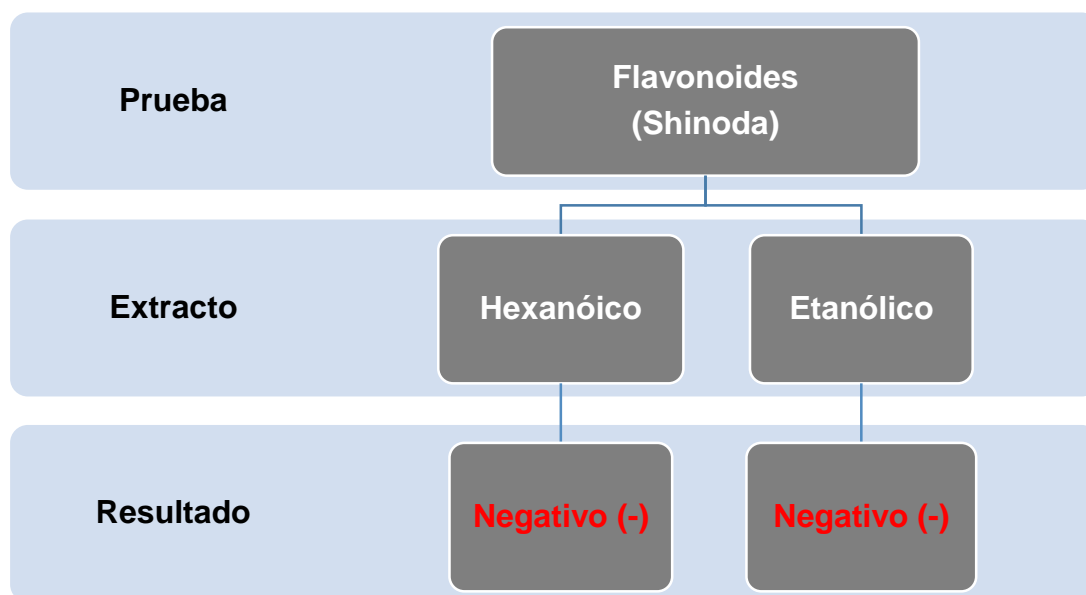
Esquema 4. Resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Gmelina arbórea*, para Triterpenos/Esteroles.



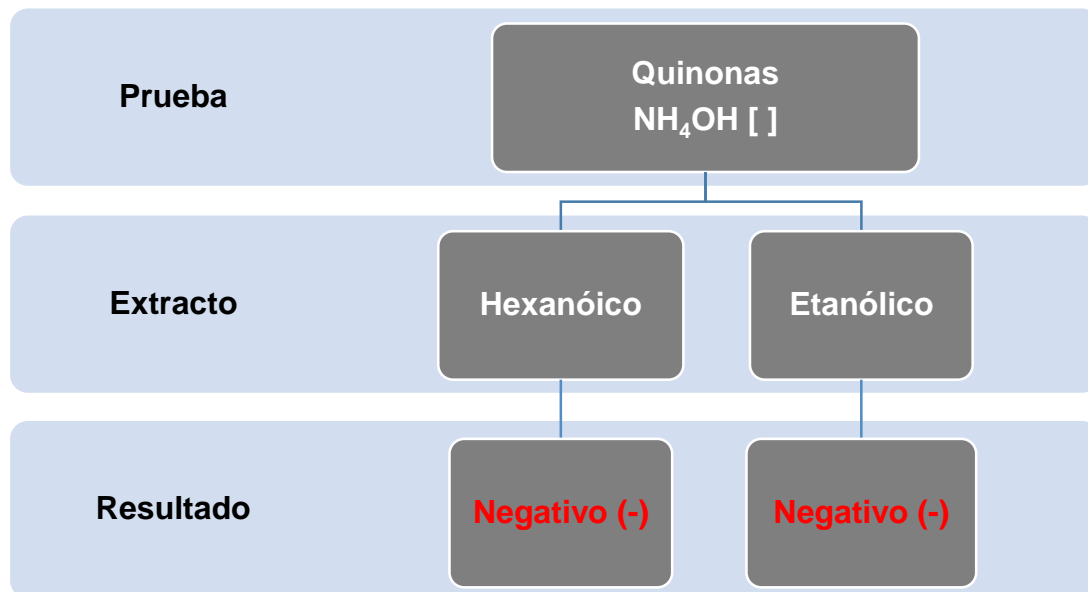
Esquema 5. Resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Gmelina arbórea*, para Compuestos Fenólicos.



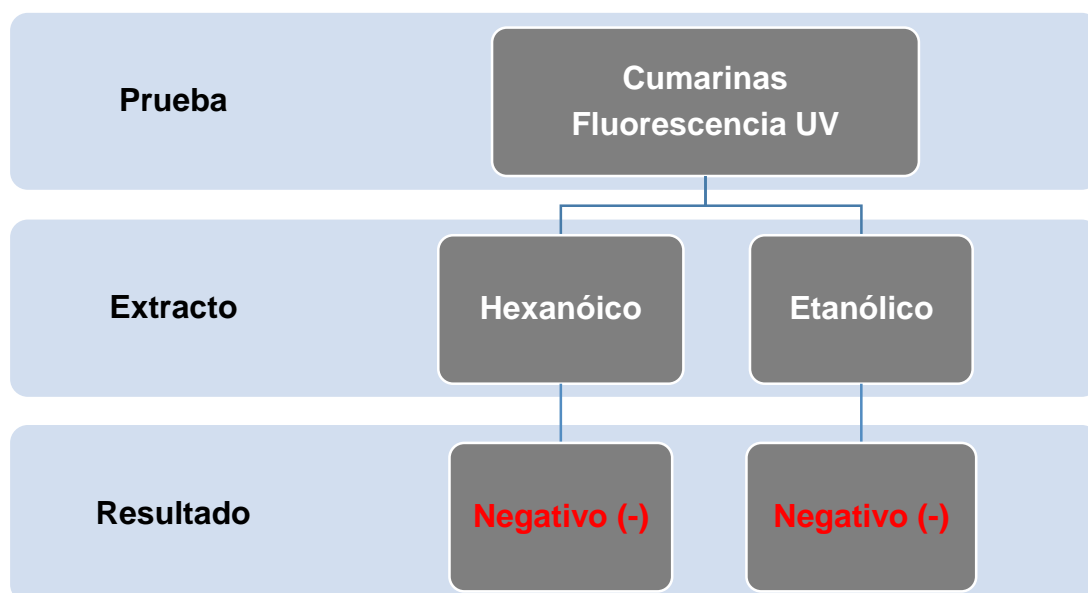
Esquema 6. Resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Gmelina arbórea*, para Flavonoides.



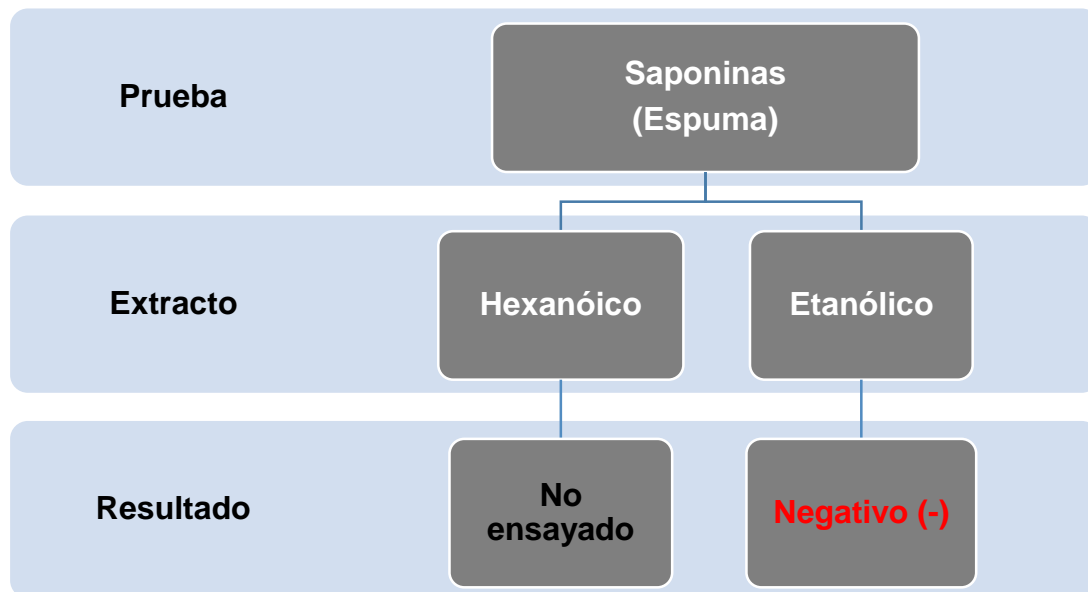
Esquema 7. Resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Gmelina arbórea*, para Quinonas.



Esquema 8. Resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Gmelina arbórea*, para Cumarinas.



Esquema 9. Resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Gmelina arbórea*, para Saponinas.



Esquema 10. Resultados de la caracterización fitoquímica de los extractos de *Gmelina arbórea*, para Taninos.

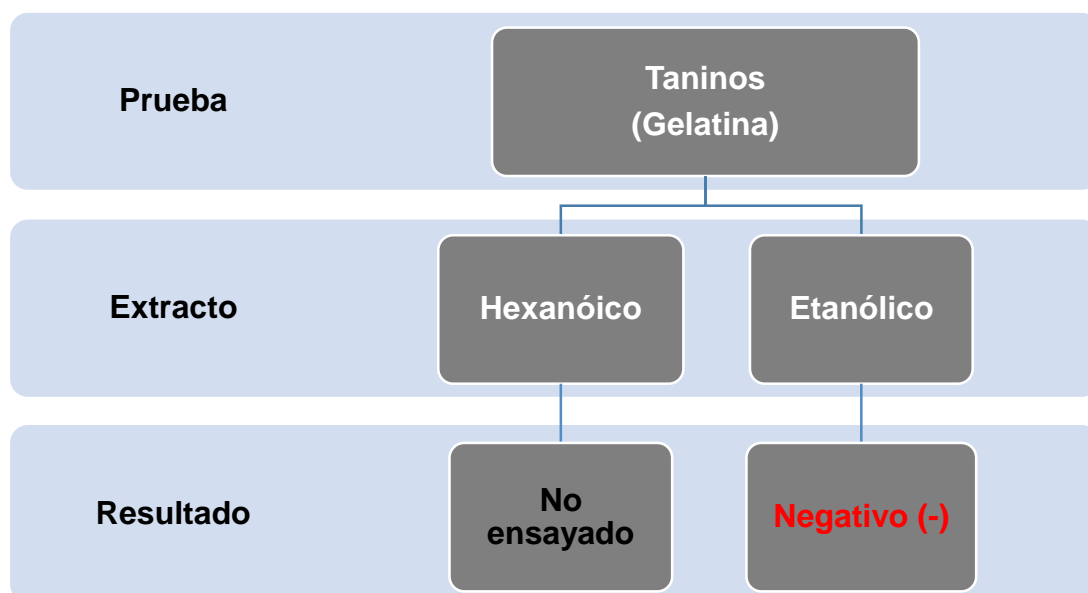

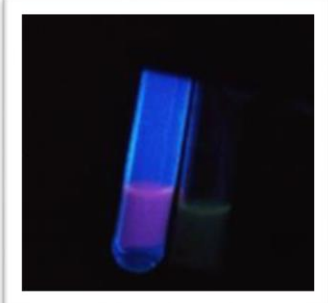




Tabla 4. Resultados de caracterización fotoquímica de los extractos de etanol y hexano de la especie *Gmelina arborea*.

	<p>Identificación de alcaloides: Reacción de Mayer, Wagner, y Dragendorff. Resultado: negativo. Extracto etanólico.</p>
	<p>Identificación de esteroides y triterpenos: Prueba de Lieberman. Resultado: positivo. Extractos etanólico y hexanólico.</p>
	<p>Identificación de compuestos fenólicos: Reacción de tricloruro férrico. Resultado: Positivo. Extractos hexanólico y etanólico.</p>
	<p>Identificación de flavonoides: Prueba de Shinoda. Resultado: Negativo. Extractos hexanólico y etanólico.</p>

Tabla 4. (Continuación) Resultados de caracterización fotoquímica de los extractos de etanol y hexano de la especie *Gmelina arborea*.

	<p>Identificación de taninos: Prueba de la gelatina. Resultado: Negativo. Extracto etanólico.</p>
	<p>I Identificación de cumarinas: Fluorescencia bajo luz UV. Resultado: Negativo Extractos hexanólico y etanólico.</p>
	<p>Identificación de quinonas NH₄OH: Resultado: Negativo Extractos hexanólico y etanólico.</p>
	<p>Identificación de saponinas: Prueba de la espuma. Resultado: Negativo. Extracto etanólico</p>

Evaluación de la actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana contra las cepas ATCC de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, se comprobó a través del método de difusión en agar (Kirby-Bauer) en pozo modificado, solo con el extracto etanólico (Tabla 6) ya que el extracto hexanólico no es soluble en dimetil sulfóxido (DMSO) que fue el solvente utilizado como control negativo, se determinó con una concentración madre de 1000 ppm de solución. Sin embargo, luego de realizadas las pruebas pertinentes se determinó que a esta concentración no se obtuvo acción antibacteriana contra las cepas ya antes mencionadas.

Tabla 5. Antibiótico empleado como control positivo para el estudio de la actividad antibacteriana. (Oxitetraciclina).

Bacterias	Antibiotico comercial
<i>Staphylococcus aereus</i> ATCC 25923	11mm
<i>Enterococcus fecalis</i> ATCC 29212	12mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	11mm
<i>Escherechia coli</i> ATCC 25922	11mm
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	11mm

Tabla 6. Evaluación de la actividad antibacteriana.

Bacterias	Halos de inhibición (mm)		
	Control positivo	Control negativo	Extracto Etanólico
	Oxitetraciclina 5mg/mL	DMSO	1000 ppm
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	11	0	0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	12	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	11	0	0

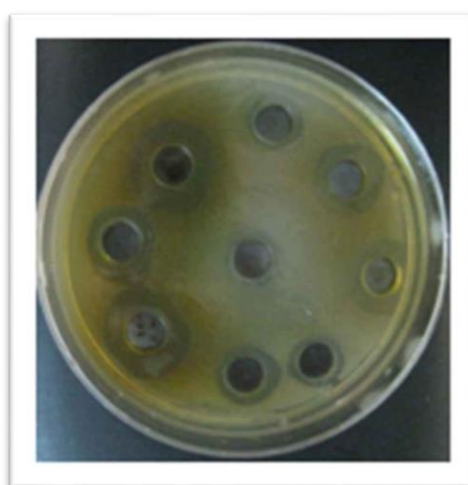


Figura 16. Halos de inhibición producidos por extractos de plantas mediante el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) en pozo modificado.

Discusión

Al realizar el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico y hexanólico de las hojas de la especie *Gmelina arbórea*, que se obtuvo por maceración frío se observaron en los resultados positivos solo la presencia de esteroides y compuestos fenólicos. Al confrontar los resultados del screening fitoquímico del presente estudio con investigaciones anteriores de la especie recolectada y estudiada en diferentes países, se vio reflejada la similitud solo en estos dos compuestos ya antes mencionados. Sin embargo no se descarta la presencia de otros metabolitos tales como: quinonas, alcaloides, saponinas, cumarinas, flavonoides y taninos.

La presencia de compuestos fenólicos se comprobó con tricloruro férrico (FeCl_3) por la formación de un anillo verde y para los esteroides el viraje de color a verde oscuro por acción del reactivo de Lieberman. Si los comparamos con la quimiotaxonomía de la familia Verbenaceae si existe relación, pero solo estos compuestos fueron los determinados en la presente investigación.

En tal caso un estudio realizado por, El-Mahmood, Doughari y Kiman (2010) en Yola, estado de Adamawa, Nigeria, reveló que en las pruebas fitoquímicas de los extractos de las hojas y corteza de *Gmelina arbórea*, existe la presencia de carbohidratos, alcaloides, fenoles, taninos, saponinas, antracenos y glucósidos cardíacos, difiriendo en estos últimos dos con respecto al screening realizado en esta investigación. Los resultados mostraron que los extractos de la hoja demostraron actividad antimicrobiana contra los organismos de prueba; *Eschechia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Shigella dysenteriae*. y *Salmonella typhi*. Siendo esta última la más susceptible de todas las bacterias de prueba (12 mm de diámetro de zona de inhibición), mientras que *K. pneumoneae* fue la menos susceptible (7 mm de diámetro de zona de inhibición).

Así mismo un estudio realizado por Offor (2014) en el departamento de Bioquímica, Ebonyi Universidad Estatal de Abakaliki, Nigeria, reportaron en el examen fitoquímico de las hojas de la planta diferentes concentraciones de alcaloides, taninos, fenoles, flavonoides, saponinas y glucósidos. Se encontraron saponinas y glucósidos en concentraciones más altas, pero se registraron bajas concentraciones de fenoles, flavonoides, alcaloides, esteroides y taninos.

En otro sentido Mosad, Laila., Amal., Osman., Mohamed., Maha. y Asmaa, (2015), en un estudio a cinco diferentes plantas de Egipto, entre las cuales se encontraba la especie *Gmelina arbórea* revelo que posee tanto actividad antibacteriana como antifúngica ya que las zonas de inhibición contra tres cepas de diferentes fracciones probadas de *G. arborea* osciló entre 5-17 mm contra, *E. coli*, *S. aureus* y *C. albicans*, así como un efecto característico contra *A. niger* con zona de inhibición (12 mm) Además, Amrutha y Bhaskar., (2009) informaron sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de metanol y cloroformo de *G. arbórea*. A la luz de tales resultados, *G. arborea* proporcionó las bases científicas para la aplicación folclórica como planta medicinal. Y puede usarse como fuente de nuevas sustancias antibióticas para posible control de infecciones asociadas con bacterias y hongos.

Con respecto a que en el actual trabajo hablamos estrictamente de los extractos de la hoja de *Gmelina arbórea* vale la pena mencionar que Bhabani, Ellaiah, y Subas (2012) estudiaron extractos de las frutas de *Gmelina arbórea* los cuales demostraron tener actividad antibacteriana, antioxidante y antidiabética. Se descubrió que la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de etanol era de 300 µg/mL contra *S. aureus* y *P. aeruginosa*, mientras que contra *B. subtilis* era de 200 µg/mL. Los extractos de acetato de etilo y éter de petróleo exhibieron un CMI de 400

$\mu\text{g/mL}$ contra *P. aeruginosa*. El extracto de etanol exhibió una actividad antibacteriana significativa (diámetros de zona de inhibición de crecimiento que varían de 13 a 17,75 mm) tanto contra bacterias Gram positivas como Gram negativas. Entre los diferentes organismos, se encuentra que el *S. aureus* demostró ser más sensible al extracto etanólico ya que presenta una actividad antibacteriana comparable con el fármaco estreptomicina. Por otra parte el de n-butanol no mostró ninguna actividad contra organismos de prueba, donde el acetato de etilo y los de éter de petróleo mostraron acción inhibitoria contra *P. aeruginosa*.

En efecto, confrontando esta investigación con los estudios anteriores los extractos de las hojas de *Gmelina arborea*, contra las cepas de *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. aureus* debieron haber tenido actividad antibacteriana. En este sentido se debe mencionar que diversos factores tales como el clima, posición geográfica donde fue recolectada la planta, y la época del año, intervienen químicamente en su composición química y en consecuencia los resultados obtenidos al momento de realizar la actividad antibacteriana se vieron afectados.

Por otra parte, existen ciertos parámetros en cuanto a temperatura y localización geográfica que son necesarios señalar. La planta (*Gmelina arborea*) recolectada en el Jardín de Plantas Medicinales “Doctor Luis Ruiz Terán” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes Estado Mérida se encuentra a una altitud de 1600 m.s.n.m., a una temperatura que oscila entre los 14 a 25 °C aproximadamente, y precipitaciones con una acumulación total promedio de 182 mm. La mayoría de la lluvia cae durante los 31 días centrados alrededor del 11 de mayo. La fecha aproximada con la menor cantidad de lluvia es de 19 de enero, con una acumulación total promedio de 17 mm. Mientras que la planta recolectada por (El-Mahmood, Doughari y Kiman 2010) en Yola, estado de Adamawa, Nigeria, se encuentra a una temperatura entre los 17 a 39°C y una altitud

media de 1.000 m.s.n.m. y precipitaciones con una acumulación total promedio de 169 mm. La temporada de lluvia dura 7,3 meses, del 27 de marzo al 7 de noviembre, con un intervalo móvil de 31 días de lluvia de por lo menos 13 mm. La mayoría de la lluvia cae durante los 31 días centrados alrededor del 25 de agosto. La fecha aproximada con la menor cantidad de lluvia es el 5 de enero, con una acumulación total promedio de 0 mm. Estas diferencias son clave a la hora de comparar una planta con la otra a pesar de ser exactamente la misma. También es importante resaltar la concentración del extracto utilizado en este estudio (1000 ppm) esto también pudo ser un factor que afectara la actividad antibacteriana contra las cepas ATCC y la utilización de solo un solo solvente (etanol) para la obtención del extracto, ya que en investigaciones anteriores ya antes mencionadas se utilizaron otros tipos de solventes como lo son el metanol, n-butanol, éter de petróleo entre otros.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. En los extractos etanólico y hexanólico obtenidos de las hojas de *Gmelina arbórea* se determinaron de forma cualitativa la presencia de esteroides y compuestos fenólicos, y la ausencia de alcaloides, flavonoides, quinonas, camarinas, saponinas y taninos.

2. Los resultados arrojados indican que los extractos obtenidos de las hojas de *Gmelina arbórea* no fueron activos frente a las cepas bacterianas ATCC de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Pseudomonas aeruginosa*, reportando que las 5 cepas son resistentes al extracto etanólico estudiado, por el método de Kirby-Bauer en pozo modificado.

Recomendaciones

1. Recolectar la especie *Gmelina arbórea* en condiciones geográficas similares a las descritas en estudios en los que esta planta arroja actividad antibacteriana u en una época de año donde se observe a la planta en óptimas condiciones.

2. Purificar los extractos de las hojas de *Gmelina arbórea* para trabajar con los metabolitos secundarios más puros y con probabilidad de obtener algún resultado en el ensayo de actividad antibacteriana.

3. Realizar estudios fitoquímico de otras partes de la planta como lo son la raíz, corteza, tallo, frutos y flores de la especie *Gmelina arbórea*. Para observar si poseen actividad antibacteriana, antifúngica y antioxidante.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Adhyapak S. (2011). High Performance Liquid Chromatographic method for quantization of apigenin from dried root powder of *Gmelina arborea* Linn. *International of Pharma and Bio Sciences*, 2(1); 742-749.
- Agharkar, S. (1991). Medicinal plants of Bombay presidency. *Scientific Publishers, Jodhpur*, 1 230.
- Akachuku, A. (1984). The possibility of tree selection and breeding for genetic improvement of wood properties of *Gmelina arborea*. *Forest Science*. 30(2): 275–283.
- Akinjagunla Y. (2007). Chemical composition and phytate content of *Gmelina arborea* seeds. *Continental of Agricultural Science*, (1); 8-13.
- Ali-Emmanuel, I., Moudachiori, M., Akakpo, J. y Quetin-Leclercq, J. (2002). Activités antibactériennes *in vitro* de *Cassia alata*, *Lantana camara* et *Mitracarpus scaber* sur *Dermatophilus congolensis* isolé au Bénin. *Revue d'Elevage et de Medecine Veterinaire des Pays Tropicaux*, 55(3) 183-187.
- Albornoz, A., (1980). *Productos Naturales, sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Universidad Central de Venezuela, Caracas: Editorial Impresos Urbina, C.A. 22-26
- Amábile-Cuevas, C. (2010). Antibiotic resistance in Mexico: a brief overview of the current status and its causes. *Journal of Infection in Developing Countries*, 4(3); 126-131.
- Amrutha A. y Bhaskar C. (2009). Antioxidative and Antimicrobial Activity of Methanol and Chloroform Extracts of *Gmelina Arborea* Roxb. *Revista Internacional de Biotecnología y Bioquímica* 6; 139-144.

- Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Antimicrob Chemother*, 48(1): 5-16.
- Ang, J., Ezike, E. y Asmar, B. (2004). Antibacterial resistance. *The Indian Journal of Pediatrics*, 71, 229–239.
- Anjaneyulu, A. (1975). The structure of gummadiol-a lignin hemi-acetal. *Tetrahedron Letter*, 16(22); 1803-1806.
- Anjaneyulu, A., Madhusudhana, R., Kameswara, R., Ramachandra, R., Andrew, P. y Robert S. (1977). Novel hydroxyl lignans from the heartwood of *Gmelina arborea*. *Tetrahedron*, 33(1): 133-143.
- Barreto J (1997). Efectos Antimicrobianos del diente de león (*Taxaxacum officinale*) y el gualanday (*Jacaranda obtusifolia*) sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* causante de enfermedades de la piel. Carrera Bacteriología. Facultad Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de Pregrado. Bogotá D.C. 9.-.29.
- Beg A. & Ahmad I. (2000) Effect of Plumbago zeylanica extract and certain curing agents on multidrug resistant bacteria of clinical drugs. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16; 841–844
- Begun J. (2005). *Staphylococcus aureus* virulence factors identified by using a high-throughput *Caenorhabditis elegans*-Killing model. *Infectology Immunology*, 73(2): 872-7.
- Bhabani, S., Ellaiah, P. y Subas, C. (2012) Actividades antibacterianas, antioxidantes y antidiabéticas de los extractos de fruta de *Gmelina arborea* roxb. *International Journal of Green Pharmacy*, 6 (3): 224.
- Bhabani, U., Nunhu, A., y Reevitya, S. (2012). Evaluation of antidiabetic potency of *Gmelina arborea* L. leaves. *International Journal of Green Pharmacy*, 4; 75-8.

- Bhagyalaskshmi, C., Deepthi, V., Saju, G., Sameer, K., Suresh, N., Ajithkumar, K., Sanis J. Reghu R. (2017). Wound Healing and anti-inflammatory activity of Methanolic Extract of *Gmelina arborea* and *Hemigraphis colorata* in rats. *Internaciona Journal of Curent Microbiology and Applied Sciences*, 6(8); 311-3122.
- Briskin D. (2000). Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology*, 124(2); 507-14.
- Brookc GF, Butel JS, Morse SA. (2005). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. México, DF: Editorial Médica.
- Bruneton, J (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica Plantas Medicinales*. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A. 776.
- Cabrera, C., Gómez, R Zúñiga, A. (2007) La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colombia Médica*. Corporación Editora Médica del Valle; 38(2): 149-158.
- Carlet J, Jarlier V, Harbarth S, Voss A, Goossens H, y Pittet D (2012). Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action. *Antimicrobial Resistance Infection*, 1(1); 11
- Carmona O., Guzmán M., Silva H. Pulido, S. y Grupo Colaborativo del Programa Venezolano de Resistencia Bacteriana (G.C.P.V.R.B) (1989). Vigilancia de la Resistencia Bacteriana a los Antimicrobianos en 10 Hospitales de Venezuela. *Sociedad. Venezolana de. Microbiología*. 9; 19-23.
- Campion J. (2005). Pharmacodynamic modeling of the evolution of levofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*.. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49(6): 2189-99.

- Camurca-Vasconcelos A., Bevilaqua C., Morais S., Maciel M., Costa C., Macedo I., Oliveira L., Braga R., Silva R. y Vieira L. (2007). Anthelmintic activity of *Croton zehntneri* and *Lippia sidoides* essential oils. *Veterinary Parasitology*, 148; 288-294.
- Camurca-Vasconcelos A., Bevilaqua C., Morais S., Maciel M., Costa C., Macedo I., Oliveira L., Braga R., Silva R., Vieira L., y Navarro A. (2008). Anthelmintic activity of *Lippia sidoides* essential oil on sheep gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 154; 167-170.
- Casanova, E., García-Mina, J. y Calvo, M. (2008). Antioxidant and antifungal activity of *Verbena officinalis* L. leaves. *Plant Foods for Human Nutrition*, 63; 93-97.
- Carrillo-Rosario, T y Díaz A. (2006). Actividad antimalarica de extractos acuosos de la *Lantana cámara* L., *Verbena litoralis* y *Heliotropium indicum* L. en ratones infectados con *Plasmodium berghei*. *Revista de facultad de Farmacia ULA*. 48; 252-256.
- Chen X. (2003). Shikonin, a component of Chinese herbal medicine, inhibits chemokine receptor function and suppresses human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(9); 2810-2816.
- Chhabra, S., Mahunnah, R. y Mshiu, E. (1993). Plants used in traditional medicine in Eastern Tanzania. VI. Angiosperms (Sapotaceae to Zingiberaceae). *Journal Ethnopharmacol*, 39; 83-103.
- Chothani, D. y Patel, N. (2018). Phytochemical screening and quantification of phytoconstituents in *Gmelina arborea* fruits extracts. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 6(4), 31-35.
- Chudnoff, M. (1984). Tropical timbers of the world. United States Department of Agriculture. *Forest Service Handbook Madison*, 607; 464.

- Critchley. y Blosser-Middleton. (2003). Baseline study to determine in vitro activities of daptomycin against-positive pathogens isolated in the United States in 2000-2001. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 47(5); 1689-93.
- Cordiés, J., Machado, L., y Hamilton, M. (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica*; 8(1); 13-27.
- Couvalin, A. (1988). El final de la edad de oro de los antibióticos *Therapeutic National*; 314(3); 50-2.
- Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. Journal. *Clinical Microbiology*, 12(4): 564-82.
- Curtis H, Barnes S, Schenk A y Massarini A. (2008). *Curtis Biología*. (7a ed). Editorial Médica Panamericana. 455-477.
- Curtis H, Barnes S, Schenk A y Flores G. (2006). *Invitación a la Biología*. (6a ed). Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 177-188
- Cuthbert, A. (2006). A brief history of the British Pharmacological Society. *Pharmacol*, 147(1); 2-8.
- Daniel M. (2008). Medicinal plants-chemistry and properties. *Science publishers*, (1); 152.
- Dartois V. (2005). Systemic antibacterial activity of novel synthetic cyclic peptides. Journal. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 49(8); 3302-10.
- Daya C., y Patel M. (2012). Preliminary phytochemical screening, pharmacognostic and physicochemical Evaluation of leaves of *Gmelina arborea*. *Asian Pacific Tropical Biomedicine*, 2(3); 1333-1337.

- Dreikorn K. (2002). The role of phytotherapy in treating lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia. *World Journal of Urology Periódico*, 19(6), 426-35.
- Dreikorn K. (2002). Phytotherapy of benign prostatic hyperplasia. Current evidence-based evaluation. *Urologe* 41(5); 447-51.
- Dreser, A., Wirtz, V., Corbett, K. y Echániz G. (2008). Uso de antibióticos en México: revisión de problemas y políticas. *Salud pública de México*, 50(4); 480-487. DOI: 10.1590/S0036-36342008001000009.
- Dryla A. (2005). Comparison of antibody repertoires against *Staphylococcus aureus* in healthy individuals and in acutely infected patients. *Clinical and Vaccine Immunology* 12(3); 397-98.
- Domínguez Z. (1973). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Distrito Federal, Mexico: Editorial Limusa. 69–76.
- Duke, J. y Wain, K. (1981). Medicinal plants of the world. *Agriculture Research Service*, 3.
- Dunsmore K E. (2001). Curcumin, a medicinal herbal compound capable of inducing the heat shock response. *Critical Care Medicine*, 29(11); 2199-2204
- El-Mahmood A., Doughari J., y Kiman H. (2010). In vitro antimicrobial activity of crude leaf and stem bark extracts of *Gmelina arborea* (Roxb) against some pathogenic species of Enterobacteriaceae. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 4(6); 355-361.
- Ernst E. (2001). Herbal medicine products: an overview of systematic reviews and meta-analyses. *Perfusion*, 14; 398-404.

- Falah S., Katayana T., y Suzuki T., (2008). Chemical constituents from *Gmelina arborea* bark and their antioxidant activity. *Wood Science*, 54; 483-489.
- Flores B., Leal C. y Escamilla S. (2014) *Uso de antibióticos en adultos hospitalizados en el hgz24*. Unidad de Medicina Familiar no 73 (Tesis de Postgrado). Instituto Mexicano del Seguro Social. Veracruz-Norte, Mexico.
- Flores, V., Castañeda, O., Montiel, T., y Hernández, G. (2014). Análisis fitoquímico preliminar del extracto hexánico de hojas de *Hemiphylacus novogalicianus*, una especie endémica de México. *Revista Investigación y Ciencia*, 22(63).
- Frohlich, E. (1985). *Rypins Medical Licensure Examination*. U.S.A: Lippincott Williams & Wilkins, 592-600.
- Ghisalberti E. (2000). *Lantana camara* L. (Verbenaceae) *Fitoterapia.*; 71(5); 467-86.
- Guerra B. (2000). Antimicrobial resistance and spread of class 1-Integrans among *Salmonella* Serotipes. *Antimicrobial Agent of Chemotherapy*; 44(8); 2166-9.
- González, T., y Serrano, M. (2004). Propiedades y utilizaciones de la madera de *Gmelina arborea* (Roxb). Procedente de árboles plantados en Costa Rica. *Revista Forestal* 1(1): 1-9.
- Görnemann, T., Nayal, R., Pertz, H., y Melzig, M. (2008). Antispasmodic activity of essential oil from *Lippia dulcis* Trev. *Ethnopharmacology*, 117; 166-169.
- Harper, H. (1978). *Manual de Química Fisiológica*. México, D.F: Editorial El Manual Moderno, pp. 72,188.

- Hart, C. (1998). La resistencia a los antibióticos. ¿Un problema creciente?. *British Medical Journal*, 6; 147-8.
- Haddadin A S. (2002). Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the intensive care unit. *Postgraduate Medical Journal*, 78(921); 385-392.
- Horna, G., Silva, M., Vicente, W. y Tamaris, J. (2005). Concentracion Minima Ihibitoria y Concentracion Minima Bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatogenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplasicas. *Revista Médica Hereditaria*. 16(1); 4
- Hosny, M. y Rosaazza J. (1998). Twelve acylatediridoid glycosides from *Gmelina arborea*. *Natural Product*, 61 734-742.
- Jatsa, H., Ngo, S., Tchuem, T. y Kamtchouing, P. (2009). Evaluation of the *in vivo* activity of different concentrations of *Clerodendrum umbellatum* Poir against *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Traditional Complementary and Alternative Medicines of Africa*, 6; 216-221.
- Joshi, S. (2004). *Medicinal plants*. New Delhi, India: Oxford & IBH publications.
- Joy, P., Thomas, J., Mathew, S. y Baby, S. (1998). Medicinal plants. *Aromatic and Medicinal Plants Research Station*, (1); 72.
- Kapoor, L. (2005). Handbook of Ayurvedic medicinal plants: Herbal reference library. *Boca Raton*, 1; 197.
- Kembro, J., Marin, R., Zygadlo, J., y Gleiser R. (2009). Effects of the essential oils of *Lippia turbinata* and *Lippia polystachya* (Verbenaceae) on the temporal pattern of locomotion of the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) larvae. *Parasitology Research*, 104(5); 1119-1127.

- Kaswala R., Patel V., Chakraborty M. Y Kamath V. (2012). Phytochemical and pharmacological profile of *Gmelina arborea*. *Department of Pharmacology; Shree Devi College of Pharmacy*, 3(2), 61-64.
- Kim, K., Kim S., Jung, M., Ham, I. y Whang, W. (2009). Anti-inflammatory phenylpropanoid glycosides from *Clerodendron trichotomum* leaves. *Journal Archives of Pharmacal Research*, 32; 7-13.
- Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Shreckenberger, P. y Win, W. (2001). *Diagnostico Microbiológico*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Koneman E. (1999). *Diagnóstico Microbiológico*. D.F, México: Ed. Médica Panamericana.
- Kok R. (2012). A revision of the genus *Gmelina* (*Lamiaceae*). *Rev. KewBulletin*, 67; 293–329.
- Kong J. (2003). Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacologica Sinica*, 24(1); 7-21.
- Lambert R. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Appl Microbiol*, 91(3): 453-62.
- Lambert R. y Pearson J. (2000). Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Appl Microbiology*, 88(5): 784-90.
- Leal A., Schmalbach J., Álvarez C., Buitrago G., Méndez M y Grebo. B. (2006). Canales endémicos y marcadores de resistencia bacteriana, en instituciones de tercer nivel de Bogotá, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 8; 59-70.

- Livermore, D. (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clinical Infectious Diseases: an publication of the Infectious Diseases Society of America*, 36(1); 11-23.
- López-Brea, D (1998). Ventajas e inconvenientes de una política de antibióticos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 16; 353-355.
- López, F. (1997). Papiro Ebers. Recuperado el 16 de marzo de 2015, de la Tierra de los Faraones: <http://www.egiptologia.org/fuentes/papiros/ebers>
- López-Palacios, S. (1977). Flora de Venezuela: Verbenaceae. Merida, Venezuela: Consejo de Publicaciones ULA.
- Lowy F. (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation* 111(9); 1265-73.
- Lock U. (1994). Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de los Productos Naturales. *Revista. Universidad Católica del Perú. Lima*, 1; 24-38.
- Luque-Ortega J R. (2004). Fungus-elicited metabolites from plants as an enriched source for new leishmanicidal agents: antifungal phenylphenalenone phytoalexins from the banana plant (*Musa acuminata*) target mitochondria of *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(5); 1534-1540
- Machado M., Dinis A., Salgueiro L., Cavaleiro C., Custódio J. y Sousa C. (2010). Anti-Giardia activity of phenolic-rich essential oils: effects of *Thymbra capitata*, *Origanum virens*, *Thymus zygis subsp. sylvestris*, and *Lippia graveolens* on trophozoites growth, viability, adherence, and ultrastructure. *Parasitology Research*, 106(5); 1205-1215.

- Machumi, F., Samoylenko, V., Yenesew, A., Derese, S., Midiwo, J., Wiggers, F., Jacob, M., Tekwani, B., Khan, S., Walker, L. y Muhammad I. (2010). Antimicrobial and antiparasitic abietane diterpenoids from the roots of *Clerodendrum eriophyllum*. *Journal. Natural Product Communications*, 5(6); 853-858.
- Malbrán C. (2012). Métodos de Determinación de Sensibilidad Antimicrobiana por Dilución. Revista. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 4(44) 2-14.
- Manrique, E. y Mosquera, O. (1997). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones obtenidas a partir de *Espeletia murilloi* cuatr. y *Espeletopsis guacharaca*. *Carrera Bacteriología. Facultad de Ciencias Básicas*. (Trabajo de Pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá. 15-16.
- Marcano, D. y Hasegawa M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Caracas, Venezuela: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela Segunda Edición, 379-380.
- Martínez, J., Coque, T. y Baquero, F. (2015). What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nature reviews, Microbiology*. 13(2);116-123.
- Mellon, M., Benbrook C. y Beenbrook K. (2001). Hogging it: *Estimates of Antimicrobial Abuse in Livestock*. *Union of Concerned Scientist*, Cambridge, M.A.
- Moronkola D. (2009). Essential oil composition of *Gmelina arborea* Roxb. Verbenaceae, from Nigeria. *Essential Oil Research*, 21(3); 264-266.
- Mosad G., Laila R., Amal S., Osman N., Mohamed S., Maha A. y Asmaa S. (2015). *In Vitro* Antimicrobial Activity of Five Egyptian Plant Species.

Journal of Applied Pharmaceutical Science, 5(2); 45-49. DOI: 10.7324/JAPS.2015.58.S7.

Moya R. (2004). *Gmelina arborea* en Costa Rica. *Journal Bois et Forets des tropiques* 279(1): 47-57.

Moya, R. y Tomazello, M. (2007). Wood density and fiber dimensions of *Gmelina arborea* in fast growth trees in Costa Rica: relation to the growth rate. *Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*. 16; 267-276.

Munira, B., Gururaja, G., Deepak, M., Roopashree T., y Shashidhara, S. (2013). An overview on phytochemistry and pharmacological properties of *Gmelina arborea*. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 3(4), 62-71.

Muñoz, M., Rubio, J. y López, M. (1998). Resistencia bacteriana en la infección pediátrica. V jornadas de Actualización e infecciones pediátricas, Sevilla, España.

Murray P., Rosenthal K., Pfaller M. (2009). *Microbiología Médica*. Barcelona, España: Editorial Elsevier. 3-251.

Nair, A., y Subramanian, S. (1975). Quercetagenin and other flavones from *Gmelina arborea* and *Gmelina asiatica*. *Phytochemistry*, 61; 734-742.

Nayak, B, Dinda, S. y Ellaiah, P. (2013), Opioid and non-opioid analgesic activity of *Gmelina arborea* Roxb. Fruit extracts. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5: 263-266.

Nayak, B, Ellaiah, P. y Dinda S. (2012) Antibacterial, antioxidant and anti-diabetic activities of *Gmelina arborea* Roxb fruit extracts. *International Journal of Green Pharmacy*, 6(3):224.

- Navarro G. (2006). Antifungal and Antibacterial Activity of Four Selected Mexican Medicinal Plants. *Pharmaceutical Biology*, 44; 297.
- Navreet K. y Sarabjit K. (2018). Pharmacognostic and phytochemical evaluation of *Gmelina arborea* Roxb. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(2).401-403
- Neu H. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science New Series*, 257; 1064-1073.
- Obregón C. (2006). *Gmelina arborea*: Versatilidad, renovación y productividad sostenible para el futuro. *Revista El Mueble y la Madera*, 50; 14-20.
- Offor C.E, (2014). Phytochemical and proximate analyse of dry *Gmelina arborea* leaves. *International Journal of Current Research and Academy Review*, 2(12); 101-105.
- O'Leary, N., Calviño, C.; Martínez, S.; Lu-Irving P.; Olmstead R. y Múlgura, M. (2012). Evolution of morphological traits in Verbenaceae. *American Journal of Botany*, 99 (11):1778-1792. DOI: 10.3732/ajb.1200123.
- Orjala J., Wright A., Rali T. y Sticher O. (1993) Aduncamide, a Cytotoxy and antibacterial beta-Phenylethylamine derive da mide from *Piper aduncum*. *Natural Product Letters*; 2(3); 231-236.
- Patil S., Kadam, V., y Ghosh, R. (2009). In vitro antioxidant activity of methanolic extract of stem bark of *Gmelina arborea* Roxb. (Verbenaceae). *International Journal of PharmTech Research*, 1(4):1480-1484.

- Pérez, R. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información terapéutica del sistema nacional de salud*, 22; 57-67.
- Piddock, L. (1996). Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 38(1); 1-3.
- Plaeger S. (2003). Clinical immunology and traditional herbal medicines. *Clinical and Vaccine Immunology*, 10(3); 337-8.
- Powar V., Rathod S., Ambikar B. y Sharma H. (2015). Formulation and evaluation of an herbal anti-bacterial gel containing *Gmelina arborea* leaf extract. *Indian Drugs*, 52(3); 10-14.
- Prescott (2000). *Microbiología*. Madrid, España: McGraw-Hill-interamericana.
- Punitha, D., Thandavamoortly, A., Arumugasamy, K., Suresh, N, Danya, U., Udhayasankar, R. (2012). Anti-hyperlipidemic effect of ethanolic leaf extract of *Gmelina arborea* in streptozotocin induced male wistar albino rats. *International Journal. Life science of Pharma Research*, 2; 250-480.
- Quentin N, y Russell S (2002). *Bacteriología y micología médica*. México, D.F: Editorial interamericana Mc Graw-Hill 32.
- Quizhpe, A., Encalada, L., Sacoto, A., Andrade, E. y Muñoz G. (2014) Uso apropiados de antibióticos y resistencia bacteriana. *Accion frente a la resistencia bacteriana*, 1.
- Rangel, D., García, I., Buitrago, D. y Velazco, E. (2001). Actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos, acetónicos y acuosos de *Baccharis nítida*. *Departamento de Microbiología y Parasitología. Escuela de Bioanálisis. Instituto de Investigaciones. Facultad de*

Farmacia. Universidad de Los Andes. Recuperado el 12 del 03 de 2015.

Rao, D., Rao E., y Viswanathan, N. (1967). Occurrence of luteolin in the leaves of *Gmelina arborea* Linn. *Current Science*, 36; 71-72.

Rates S. (2001). Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39(5): 603-13.

Redo M., Ríos J. y Villar A. (1989). A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978- 1988. *Phytotherapy Research*, 3(4); 117.

Ríos J. L., Recio M. C. & Villar A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Ethnopharmacology*, 23(2-3); 127-149.

Rivas C., Morales M., y Cárdenas M. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. Revista. *Omnia science*, 6(3); 78.

Rivas, M., Oranday, C. y Verde, S. (2016). Investigación en Plantas de importancia Clínica. Nuevo León, México. Omnia Science.

Rodríguez-Noriega, E., Seas, C., Guzmán-Blanco, M., Mejía, C., Álvarez, C., Bvestrello, L., Zurita, J., Labarca, J., Luna, C., Salles, M., y Gotuzzo E. (2010). Evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(7); 560-6.

Rohit, K.; Patel, V.; Chakraborty, M.; Kamath, J. (2012). Phytochemical and pharmacological profile of *Gmelina arborea* an overview. *Journal. International research. Pharmacy*, 230-407.

- Rojas, R., Arias, A., Moya, R., Meza, M., Morillo, G., y Arguedas, M. (2004). Manual para productores de melina *Gmelina arborea* en Costa Rica. *Revista Cartago*. 1; 314.
- Rosewin, P. (2016). Antibacterial Activity of the Aqueous Extracts of the Leaves, Fruits and Bark of *Gmelina arborea*. *College of Arts and Sciences*, 21(2); 1-13.
- Row, L. (1974). Structure of gmelanone-a novel lignan with the 3, 6-dioxabicyclo [3, 2, 1] octane skeleton. *The Chemical Society, Chemical Communications*, 12; 476-477.
- Ruiz, A. y Guillén, S. (2005). *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana, pp. 98-247.
- Sacsaquispe R, y Lucho J. (2009). Seis años de vigilancia de la resistencia antimicrobiana a bacterias de origen hospitalario. *Revista Semanal del Instituto Nacional de Salud*, 6(32); 5.
- Sambamurty, A. (2005). *Taxonomy of Angiosperms*. New Delhi, India. Editorial I.K. International.
- Satyanarayana P. (1985). An apiose-containing coumarin glycoside from *Gmelina arborea* root. *Journal. Phytochemistry*, 24(8); 1862-1863.
- Satyanarayana, P. (1986). Arborone and 7-oxo-dihydrogmelinol: two new keto-lignans from *Gmelina arborea* *Natural Products*, 49(6); 1061-1064.
- Seija, V. (2006). Etiopatogenia Microbiológica. *Revista de Bacteriología y Virología Médica*. 2; 17-18.
- SEFORVEN. (1992). *Melina, Servicio Autónomo Forestal Venezolano. Ministerio del Ambiente y Recursos Naturales Renovables. Serie*

Autoecología de especies. (Publicación N° 4). Recuperado de <http://www.saber.ula.ve/bitstream/handle/123456789/35574/articulo8.pdf?sequence=1&isAllowed=>.

Sharma, O. (2004). *Plant Taxonomy*. New Delhi, India. Editorial McGraw-Hill Publishing Company Limited.

Sharma, P., Yelne, M. y Dennis, T. (2001). Database on Medicinal Plants used in Ayurveda. *Journal Central Council for Research in Ayurveda and Siddha* (3); 217–228.

Shirwaikar, A., Ghosh, S. y Rao P. (2003) Effect of *Gmelina arborea* Roxb. Leaves on wound healing in rats, *Journal of Natural Remedies*. 3: 45-48.

Silver, L. y Bostian K. (1993) Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 37(3):377-83.

Smith, A. (1991). Flora Vitiensis nova: a new flora of Fiji. *National Tropical Botanical Garden*, 5; 203.

Standley, P., y Steyermark, J. (1952). Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany*, 24(3), 275-337.

Stashenko, E., Jaramillo, B. y Martínez J. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Revista Academica Colombiana Cientifica* 27(105): 579-597.

Stermitz, F., Lorenz P., Tawara J., Zenewicz L. y Lewis K. (2000). Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences of the United States of America 97(4)
1433-1437.

Strohl W., (1997). *Biotechnology of antibiotics*. Estados Unidos. New York. M. Dekker.

Stuart, L. (1992). *The antibiotic paradox*. New York, EEUU: Springer US.

Suarez, J. (2007). Más de 100 plantas medicinales. Historia general de las plantas medicinales. La obra social de la caja de canarias. Recuperado de https://issuu.com/medicinaveterinariajdc/docs/evaluaci_n_de_la_actividad_antibac/83.com.

Sulaiman, M., Zakaria, Z., Chiong, H., Lai, S., Israfi, D., y Azam-Shah, T. (2009). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Stachytarpheta jamaicensis* (L.) Vahl (Verbenaceae) in experimental animal models. *Journal Medical Principles and Practice*, 18; 272-279.

Sumano HS, Ocampo I. 2006. Antimicrobianos. *Farmacología Veterinaria*. 3a Ed. México D. F: McGraw-Hill Interamericana; p. 127-146.

Tamayo R; Verdecia A. y Mojera I. (2011). Tamizaje Fitoquímico de los extractos alcohólicos, etéreo y acuoso de las hojas y tallo de la *Isocarpha cubana* B. *Revista médica multimedia*, 15(3).

Tanaka H. (2002). Antibacterial activity of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiology*, 35(6); 494-498.

Tello, A., Austin, B., y Telfer, T. (2012). Selective Pressure of Antibiotic Pollution on Bacteria of Importance to Public Health. *Environ Health Perspect*, 120(8); 1100-6.

- Thomson, R, Cabezudo, I. y Wenzel R. (1982). Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Annals of internal medicine. 97(3), 309-317. DOI: 107326/0003-4819-97-3-309.
- Tiwari N. (2008). Iridoid glycosides from *Gmelina arborea*. *Phytochemistry*, (69); 2387-2390.
- Tiwari, V. (1995). Ethnobotanical survey of Halbi tribe of Chandrapur and Gadchiroli districts of Maharashtra state, India. *Fitoterapia*, 66; 346–350.
- Torres, C. (2004). Investigación en la transformación secundaria de fruto, tubérculos, flores y hoja o tallo de especies pertenecientes al ecosistema andino. Informe técnico Jardín botánico. Subdirección de ciencias botánicas. Bogotá Colombia. 2-14.
- Tortora G., Funke B., Case C. (2007). Introducción a la Microbiología. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. 98,153-155,247.
- Urbina F. y Villamizar D. (2012). *Análisis del Aceite Esencial de la Especie Pipereriopodon y Determinación de su Actividad Antimicrobiana*. (Trabajo de grado). Universidad de los Andes. Mérida (Venezuela): Facultad de Farmacia y Bioanálisis.1-53
- Vallance P. y Smart T. (2006). The future of pharmacology. *Pharmacol*, 147(1): 304-307.
- Venemedia Ciencia E. (2015). *Definición de energía química*. Recuperado el 27 de octubre de 2015, de <http://conceptodefinicion.de/energia-quimica/>
- Vijay, T., Rajan, M., Sarumathy, K., Palani, S. y Sakthivel K (2011). Cardioprotective, antioxidant activities and Phytochemical analysis by

- GC-MS of *Gmelina arborea* (GA) in Doxorubicin-induced myocardial necrosis in Albino rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01(05), 198-204.
- Vuorelaa, P. (2004). Natural products in the process of finding new drug candidates. *Current Medicinal Chemistry*, 11(11): 1375-89.
- Waksman, S. (1956). Definition of antibiotics. *Antibiotic Medicine & Clinical Therapy*, 2(2) 82-6.
- Wallace, R (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 63(4); 621-629.
- Wang, M., West, B., Jensen C., Nowicki, D., Su, C., Palu, A. y Anderson G. (2002). *Morinda citrifolia* (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacol Sinica*, 12 1127-1141.
- Watanabe, N. y Contardo, M. (1998). *Estudio de la flora microbiológica en la UCI, Edgardo Rebagliati Martins*. Ciencia y Tecnología 7, (2/3). Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/5465/Tesis%20Doctoral%20%20Maria%20Elena%20Mendoza%20Chayguaque.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Watson G. 2011. Día mundial de la salud 2011: Resistencia a los antimicrobianos: si no actuamos hoy, no habrá cura para mañana. *Revista Médica Hondureña*. 79(3): 115-116.
- Wheeler, V. (2000). History & Findings of Chinese Herbal Medicine. Recuperado el 16 de Marzo de 2015, de <http://www.mcpt.com.au/history.php>
- Wilke, M. (2010). Multiresistant bacteria and current therapy- the economical side of the story. *European Journal of Medical Research*, 15; 571-576.

Winslow, L, y Kroll, D. (1998). Herbs as medicines. *Arch Intern Med*, 158(20): 2192-9.

Witte W., (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science (New York, N. Y.)*, 279(5353), 996-997.

www.bdigital.ula.ve