



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE PRODUCTOS NATURALES
"Dr. ANTONIO MORALES MÉNDEZ"



**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE
Croton leptostachyus EN CEPAS ATCC**

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al grado de Licenciada en Bioanálisis.

www.bdigital.ula.ve

Autora:

Yessika Chacón
C.I: V-21.441.063

Tutora:

Prof. Janne Rojas, *PhD*

Cotutor:

Prof. Alexis Buitrago, *Dr*

Mérida, marzo de 2020

DEDICATORIA

A Dios por todas sus bendiciones e iluminar siempre mi camino.

A mi madre, que es mi ejemplo a seguir, por estar en todo momento conmigo, apoyarme, brindarme su cariño y confiar en mí.

A mi compañero de vida Amador, por darme la oportunidad de tener una carrera académica, por su apoyo incondicional, amor, paciencia, confianza e impulsarme cada día para lograr esta meta.

A mi sobrina Camila Chacón, por su amor y compañía en momentos de tristeza y alegría haciendo este camino más fácil y llevadero.

A mis hermanos, que a pesar de la distancia siempre están presentes con una palabra de aliento.

Yessika Chacón

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

A nuestra Alma Mater, la Universidad de Los Andes.

A mi tutora *PhD.* Janne Rojas, por su total entrega, paciencia y brindarme su conocimiento científico en la realización de mi tesis.

A mi cotutor *Dr.* Alexis Buitrago, por compartirme su experiencia y conocimientos.

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y al Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (S.G.U), “Lic. Luisa Vizcaya”, Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes; por brindarme todos los medios para la ejecución de este proyecto.

A mis compañeros María Virginia Morales, Ania Hernández, Estefania La Cruz y José Paredes por brindarme su apoyo desde el inicio de la carrera.

A mi amiga Sharait Rujano por motivarme día a día en la culminación de esta meta.

A mi madrina Coromoto Rujano por su apoyo emocional y espiritual durante el transcurso de mi carrera.

A mi compañera Teresa Arellano por ser una guía fundamental en la realización de mi tesis.

Y a todos aquellos que de una u otra forma contribuyeron para concretar esta meta.

Mil gracias.

TABLA DE CONTENIDO

| | Pág. |
|--|------|
| RESUMEN | vi |
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| LISTA DE TABLAS | viii |
| LISTA DE ESQUEMAS | ix |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Antecedentes del Problema | 1 |
| El problema | 4 |
| Antecedentes Teóricos | 4 |
| Trabajos Previos | 4 |
| Antecedentes Históricos | 8 |
| Familia Euphorbiaceae | 8 |
| Género <i>Croton</i> | 8 |
| Especie <i>Croton leptostachyus</i> | 9 |
| Distribución geográfica del género <i>Croton</i> a nivel mundial | 10 |
| Distribución geográfica del género <i>Croton</i> en Venezuela | 10 |
| Composición química del género <i>Croton</i> | 11 |
| Usos etnobotánicos que se le atribuyen al género <i>Croton</i> | 13 |
| Bases Teóricas | 14 |
| Metabolitos secundarios de las plantas | 14 |
| Mecanismos de resistencia de los antibacterianos | 15 |
| Extractos | 15 |
| Métodos de obtención | 15 |
| Bacterias | 16 |
| Tinción de Gram | 21 |
| Mecanismos de resistencia | 21 |
| Antibióticos | 23 |

| | |
|---|----|
| Mecanismo de acción de los antibióticos | 24 |
| Métodos para determinar la actividad antibacteriana | 25 |
| Definición de términos | 26 |
| Operacionalización de las variables | 27 |
| Hipótesis | 29 |
| Objetivos de la investigación | 30 |
| Objetivo general | 30 |
| Objetivos específicos | 30 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| Tipo de Investigación | 30 |
| Diseño de la Investigación | 31 |
| Población y Muestra | 31 |
| Unidad de la Investigación | 31 |
| Selección del Tamaño de la Muestra | 31 |
| Sistema de Variables | 32 |
| Instrumento de Recolección de Datos | 32 |
| Procedimiento de la Investigación | 32 |
| Diseño de Análisis | 38 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 39 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 42 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 44 |



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LICENCIATURA EN BIOANÁLISIS

LINEA DE INVESTIGACIÓN: actividad antibacteriana



ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DE
Croton leptostachyus EN CEPAS ATCC
Proyecto de Investigación

Autor:

Yessika Chacón
C.I: V-21.441.063

Tutor:

Prof. Janne Rojas, *PhD*

Cotutor:

Prof. Alexis Buitrago, *Dr*

RESUMEN

La especie *Croton leptostachyus* se caracteriza por contener en su mayoría metabolitos secundarios como triterpenos, flavonoides y alcaloides. Esta especie, es ampliamente utilizada por agricultores en el tratamiento de enfermedades asociadas con bacterias y hongos. El objetivo de este trabajo fue evaluar la relación que existe entre el extracto metanólico de *Croton leptostachyus* y la actividad antibacteriana en cepas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC). El diseño de esta investigación fue de campo, laboratorio, contemporáneo, transeccional, multivariable y de tipo experimental. La muestra seca y molida (1690 g) de la especie *Croton leptostachyus* fue sometida a extracción sólido-líquido por maceración en frío, utilizando como solvente metanol. La actividad antibacteriana se determinó mediante el método de difusión en disco o Kirby Bauer, se usaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro; los cuales fueron impregnados con 10 μ L del extracto de concentración conocida (489 mg/mL) y cepas ATCC. El diseño de análisis se realizó mediante un enfoque cuantitativo. Para el extracto en metanol (Met) de la especie *C. leptostachyus*, los resultados mostraron actividad solo contra la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, con un diámetro de inhibición de 26 mm y una CIM de 100 mg/mL, por lo que se concluyó que dicho extracto, contiene metabolitos con potencial actividad antibacteriana; abriendo así la posibilidad de ser utilizado como un fitofármaco capaz de actuar frente a bacterias de importancia sanitaria.

Palabras Clave: extracto metanólico, actividad antibacteriana, *Croton leptostachyus*, *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE FIGURAS

| N° | | Pág. |
|----|---|------|
| 1 | Estructuras químicas de algunos terpenos aislados del género <i>Croton</i> | 12 |
| 2 | Estructuras químicas de algunos flavonoides aislados del género <i>Croton</i> | 13 |
| 3 | Estructuras químicas de algunos alcaloides aislados del género <i>Croton</i> | 13 |
| 4 | Pared celular de las bacterias Gram positivas | 18 |
| 5 | Pared celular de las bacterias Gram negativas | 19 |
| 6 | Preparación de los discos | 36 |
| 7 | Inoculación en el agar Müller-Hinton | 37 |
| 8 | Actividad antibacteriana del extracto en metanol (Met) de <i>C. leptostachyus</i> contra la cepa de control <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) | 38 |
| 9 | Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto en metanol (Met) de <i>C. leptostachyus</i> contra la cepa de control <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) | 40 |

LISTA DE TABLAS

| N° | | Pág. |
|----|--|------|
| 1 | Taxonomía de la especie <i>Croton leptostachyus</i> | 9 |
| 2 | Características Botánicas de la Especie <i>Croton leptostachyus</i> | 10 |
| 3 | Distribución Geográfica del Género <i>Croton</i> en Venezuela | 11 |
| 4 | Operacionalización de la Variable Dependiente Actividad Antibacteriana | 28 |
| 5 | Operacionalización de la Variable Independiente Extracto Metanólico de <i>Croton leptostachyus</i> | 29 |
| 6 | Microorganismos y Controles Positivos | 35 |
| 7 | Actividad Antibacteriana del Extracto Metanólico de <i>Croton leptostachyus</i> | 39 |

www.bdigital.ula.ve

LISTA DE ESQUEMAS

| N° | | Pág. |
|----|---|------|
| 1 | Procedimiento general de la investigación | 33 |

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

Antecedentes del Problema

Un agente con actividad antibacteriana es cualquier compuesto químico, natural o sintético que inhibe el crecimiento de las bacterias. La capacidad antibacteriana que poseen los extractos de las hojas de algunas plantas, muy probablemente se deba a la acción combinada de varios compuestos, más que atribuirse a uno solo de ellos¹.

A partir de 1928, cuando Alexander 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. Sin embargo, en los años recientes la producción de nuevos antibióticos ha disminuido de forma considerable y ha surgido como un problema de consecuencias impredecibles la resistencia a estos, por la aparición en las bacterias de mecanismos defensivos con el fin de evadir la acción destructiva de estas sustancias².

En los últimos años el hombre ha encontrado en los recursos naturales la solución a diferentes problemáticas, empleando las plantas a nivel alimenticio, industrial y medicinal, convirtiéndose de esta manera, en materias primas de vital importancia para el avance de la humanidad, es así como los productos naturales han desempeñado un papel importante y se ha demostrado en diversas investigaciones el poder antibacteriano de los extractos derivados de las plantas¹.

Existen reportes en la literatura que evidencian la gran variedad de géneros de plantas con propiedades antibacterianas, entre las cuales está la especie *Croton leptostachyus* Linneo 1753, planta comúnmente llamada “mosquero”, utilizada ampliamente por los agricultores, para el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias y hongos. Este género se caracteriza por contener en su mayoría sustancias del tipo triterpenos, flavonoides y alcaloides. También se ha registrado la presencia en menores proporciones de otros metabolitos, tales como: cumarinas, glicósidos cianogénicos y taninos, entre otros^{3,4}.

Esta investigación estuvo respaldada por las siguientes aproximaciones teóricas: sobre los metabolitos secundarios de las plantas y los mecanismos de resistencia de

los antibacterianos; la primera, denota que los productos naturales tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. En la actualidad un gran número de plantas se siguen utilizando en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades⁵.

La segunda, define a los mecanismos de resistencia como estrategias que generan las bacterias para disminuir o inactivar la acción de los antibióticos. Por lo que, pueden producir enzimas hidrolíticas o modificadoras de antibiótico, permitiendo así disminuirlo radicalmente².

Los usos relevantes de las plantas, específicamente del género *Croton* ha sido motivo de estudio en diferentes países en los últimos cinco años, en Kenia (2016)⁶, se estudió la actividad antimicrobiana de extractos de corteza de tallo de *Croton macrostachyus* contra varias bacterias patógenas humanas. Asimismo, en Perú (2018)⁷, se evaluó el efecto antibacteriano *In Vitro* del látex de *Croton lechleri* “Sangre de Grado” frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); por otro lado en Paraguay (2019)⁸, se evaluó la actividad sinérgica de los alcaloides crotosparina y esparsiflorina, aislados de *Croton bomplandianum* Baill, con los antibacterianos Gentamicina® y Ciprofloxacina® frente a *Pseudomonas aeruginosa*, microorganismo frecuentemente responsable de infecciones intrahospitalarias. Y en Guayaquil-Ecuador (2019)⁹, Valdez y Morales; evaluaron la actividad antibacteriana y antioxidante de los extractos de *Hibiscus escobariae* Fryxell, *Loxopterygium huasango* y *Croton ferrugineus* Kunth.

En cuanto a la justificación de la investigación, debe responder a los por qué o razones de la misma. Específicamente, estas razones pueden ser categorizadas como necesidades, curiosidades y preocupaciones, motivaciones, intereses, valores, potencialidades, oportunidades, tendencias y contradicciones¹⁰. En esta investigación se identificaron las siguientes razones:

La resistencia bacteriana a ciertos antibióticos, debido a que las bacterias expresan mecanismos tales como, modificar o cambiar sus puntos de unión para los antibióticos, evitando que el mismo pueda ejercer su acción, esta información genética puede ser transmitida mediante plásmidos o bacteriófagos a su misma

especie u otras especies¹¹. Dentro de las bacterias que muestran resistencia, están el género *Staphylococcus* especie *aureus*, que en 1946 presentaba la mayoría de sus cepas sensibles a la Penicilina®; en la actualidad casi todas las cepas nosocomiales, son resistentes a Bencilpenicilina® y algunas lo son a la Meticilina® y Gentamicina®, y el género *Pseudomonas aeruginosa*, que actualmente presenta resistencia a la mayoría de los antibióticos¹².

Los metabolitos secundarios presentes en esta planta, por ejemplo, los terpenos, los compuestos fenólicos y por último los alcaloides, han demostrado poseer actividad biológica en el tratamiento de enfermedades. Los extractos son usados popularmente por la medicina tradicional, como método curativo o preventivo¹³.

Se han hallado evidencias de una gran variedad de especies de plantas con propiedades antibacterianas y antifúngicas, entre las cuales está el *Croton leptostachyus*, utilizada ampliamente por los agricultores, para el tratamiento de enfermedades producidas por bacterias y hongos. También se encontraron razones con categoría de potencialidad, en lo que a antibióticos se refiere, debido a que los mismos, que se usan para el tratamiento de pacientes que poseen infecciones, usualmente son versiones sintéticas de sustancias elaboradas por microorganismos, los cuales para sobrevivir por millones de años tuvieron que desarrollar simultáneamente mecanismos de protección contra otras especies (antibióticos)¹¹.

Por tal motivo, se considera que la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Croton leptostachyus* en cepas ATCC, proporcionará evidencia de su factibilidad como sustituto de los antibióticos, siendo este un tema de gran interés para la industria farmacéutica y para las ciencias de la salud.

Hurtado (2010)¹⁰ se refiere al alcance de una investigación como la amplitud y la profundidad del conocimiento que se quiere aprender. El verbo del objetivo general es la cúspide del conocimiento adquirido durante la realización de un trabajo científico, él mismo se refiere a la profundidad del estudio a desarrollar. Dicha investigación tuvo como alcance evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Croton leptostachyus* en cepas ATCC.

En cuanto a las limitaciones de la investigación Hernández, Fernández y Batista¹⁴, hacen referencia a aspectos importantes tales como: la disponibilidad de

recursos financieros, humanos y materiales, sin los cuales se presentarían grandes dificultades en la elaboración del trabajo, es por ello que se identificó como posible factor limitante el alto costo de los materiales y reactivos para la realización de las distintas técnicas en la caracterización de los microorganismos, los cortes de electricidad, transporte público e internet.

El Problema

Después de describir la situación actual del problema, en la presente investigación se formuló el siguiente enunciado holopráxico: ¿El extracto metanólico de las hojas de *Croton leptostachyus* presenta actividad antibacteriana frente a las cepas ATTC, actividad que se realizará en el Laboratorio de Productos Naturales "Dr. Antonio Morales Méndez" de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde septiembre de 2018 hasta febrero de 2020?

Antecedentes Teóricos

Trabajos Previos

Obey *et al.* (2016)⁶, realizaron un trabajo de investigación en la Universidad de África Oriental (África-Kenia), que llevó por nombre actividad antimicrobiana de extractos de corteza de tallo de *Croton macrostachyus* contra varias bacterias patógenas humanas. Sumergieron (500 g) de corteza de tallo de *Croton macrostachyus* en acetato de etilo y butanol, obtuvieron una concentración final de 500 mg/mL en ambos, esta solución se diluyó en serie para dar las concentraciones de 250 mg/mL a 1,95 mg/mL. La actividad antibacteriana la evaluaron por el método en agar con discos, inocularon los microorganismos en la superficie del agar; luego colocaron los discos de papel de filtro (6 mm de diámetro), previamente impregnados (75 µL de extracto) y con el control negativo (DMSO). Usaron los antibiótico de referencia como control positivo (Amoxicilina[®] 20 µg, Ciprofloxacina[®] 5 µg para *E. coli*, *S. Typhi*, *K. pneumoniae* y *E. aerogenes*; Ampicilina[®] 10 µg para *L. monocytogenes*, Clotrimazol[®] y cefotaxima[®] 30 µg para *C. albicans*); las cepas bacterianas se cultivaron a 37° C y *C. albicans* a 30° C. Los resultados de las pruebas antimicrobianas las expresaron como medias ± desviación estándar (DE),

en el caso del extracto de acetato de etilo (EtOAc) mostró actividad antimicrobiana contra todos los patógenos estudiados *S. Typhi* ($16,0 \pm 1,2$ mm), *E. coli* ($12,2 \pm 1,6$ mm), *K. pneumoniae* ($10,7 \pm 1,0$ mm), *E. aerogenes* ($10,1 \pm 0,6$ mm) y *L. monocytogenes* ($11,7 \pm 1,3$ mm) con actividad más débil contra *C. albicans* ($5,6 \pm 1,0$ mm). En el mismo extracto, obtuvieron una CIM en el rango de 250 mg/mL a 125 mg/mL contra todas las bacterias estudiadas y contra *C. albicans* (CIM de 500 mg/mL). En el extracto de butanol, encontraron una CIM de 250 mg/mL contra *E. coli* y *S. Typhi*, 500 mg/mL contra *K. pneumoniae* y *E. aerogenes*.

Chininin J, Cisneros C. (2018)⁷, desarrollaron una investigación en la Universidad San Pedro (Chimbote-Perú), en la que evaluaron el efecto antibacteriano *In Vitro* del látex de *Croton lechleri* "Sangre de Grado" frente a *Staphylococcus aureus*. Prepararon 6 placas del cultivo bacteriano, los discos que utilizaron, previamente fueron embebidos con los 15 μ L de los siguientes tratamientos: etanol 96°, Eritromicina® 15 μ g, *Crotón lechleri* al 50%, 70% y 100% de concentración, utilizándolo como disolvente etanol. En tres placas de Petri sembraron discos impregnados con etanol y Eritromicina® y, en otras tres placas los discos conteniendo sangre de grado en concentraciones de 50%, 70% y 100%. Ubicaron los discos con un diámetro de 6 mm a una distancia mínima de 25 mm uno del otro; incubaron a 37,2°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos por 48 horas, finalmente midieron los diámetros de las zonas de inhibición utilizando un vernier.

Los resultados mostraron un promedio para los diámetros de los halos de inhibición bacteriana de 13 mm; 14,83 mm y de 15,33 mm para sangre de grado a 50%, 70% y 100% de concentración, con un porcentaje de inhibición de 46,43%; 52,96%; y 54,75%; lo que les permitió concluir que el tratamiento con el látex de *Croton lechleri* al 100% es el que reporta el mayor promedio de inhibición con un efecto antibacteriano *In Vitro* del 54,75 % frente a *Staphylococcus aureus*.

García J, Alvarenga N. (2019)⁸, llevaron a cabo un trabajo científico en la Universidad Nacional de Asunción (Paraguay), titulado Actividad sinérgica *In Vitro* de los alcaloides crotosparina y esparsiflorina aislados de *Croton bomplandianum* frente a *Pseudomonas aeruginosa*. En cuanto a las pruebas de sinergia, los resultados

obtenidos entre la combinación de Gentamicina[®] con esparsiflorina mostraron un marcado efecto sinérgico, con un valor del índice fraccional de la concentración inhibitoria (FICI) de 0,25 mg/mL. La combinación consigue una reducción de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antibiótico (1 µg sin combinar) y del alcaloide (2000 µg/mL sin combinar) de 0,125 µg y 250 µg/mL. Esto es particularmente relevante en el caso de Gentamicina[®], puesto que es conocido que los antibióticos aminoglucósidos presentan importantes efectos adversos, siendo los más importantes la nefrotoxicidad y la ototoxicidad que muchas veces limitan su empleo. Respecto a la combinación de Ciprofloxacina[®] con esparsiflorina observaron efecto aditivo, no sinérgico; en esta misma combinación, observaron un valor de FICI de 0,375 µg/mL lo que evidencia un claro efecto sinérgico entre ambas sustancias. Para el antibacteriano Gentamicina[®] y la crotsparina, mostró efecto sinérgico; el valor del índice fraccional de la concentración inhibitoria (FICI) obtenido fue de 0,25 µg/mL y observaron una reducción en el valor de las CMI del antibiótico (1 µg sin combinar) y el alcaloide (2000 µg/mL sin conbinar) de 0,125 µg y 250 µg/mL combinados. El resultado es similar al obtenido para la esparsiflorina, indicando que en el caso de la Gentamicina[®] la magnitud del efecto no es dependiente de las diferencias en la estructura del alcaloide.

Aunado a ello, en el valor de la CIM para la Ciprofloxacina[®] (0,5 µg sin combinar) con esparsiflorina (2000 µg/mL sin combinar), consiguieron una reducción de 0,0625 µg y 1000 µg/mL, la misma es relevante; porque este antibiótico también presenta efectos adversos, si bien moderados en comparación con la Gentamicina[®]. La reducción en el valor de la CIM implicaría eventualmente una disminución en las dosis empleadas del fármaco, aumentando su margen de seguridad. A diferencia de lo que sucede con la Gentamicina[®], en el caso de la Ciprofloxacina[®] la acción si depende de la estructura de los alcaloides, ya que en un caso se observa efecto aditivo y en el otro sinérgico. Otro aspecto importante en la interacción de la Ciprofloxacina[®] con los alcaloides, donde la disminución de sus valores de concentración inhibitoria mínima (CIM) hacen que se alejen del valor límite de 0,5 µg/mL (por encima del cuál la cepa podría presentar resistencia), lo cual indica que los alcaloides aumentan la susceptibilidad del microorganismo al fármaco

antibacteriano. Estos resultados, permitieron a los autores concluir que los alcaloides crotosparina y esparsiflorina producen una importante disminución de los valores de CIM de los fármacos antibacterianos Gentamicina® y Ciprofloxacina® frente a *P. aeruginosa*. El efecto es sinérgico para la crotosparina con ambos fármacos y es sinérgico para la esparsiflorina con Gentamicina® y Ciprofloxacina®.

Valdez y Morales. (2019)⁹, en la Universidad de Guayaquil, evaluaron la actividad antibacteriana y antioxidante de los extractos de *Hibiscus escobariae* Fryxell, *Loxopterygium huasango* y *Croton ferrugineus* Kunth. Para el análisis de las muestras realizaron tamizaje fitoquímico, cuantificación de flavonoides por el método colorimétrico cloruro de aluminio, fenoles totales por la técnica de Folin-Ciocalteu, la actividad antioxidante mediante la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH), de igual manera la actividad antibacteriana por el ensayo de difusión por disco. *Hibiscus escobariae* (Malvaceae), presentó poco contenido de alcaloides, esteroides y triterpenos; pero elevados contenidos de los flavonoides con un total de 100,95 mg CE/g de extracto (quercetina por gramos de extracto) y fenoles con un total de 12,24 mg GAE/g de extracto (ácido gálico por gramos de extracto) y las quinonas, antraquinonas y saponinas estuvieron ausentes, a pesar de tener elevados contenidos de flavonoides y fenoles, no exhibió actividad antioxidante; en tanto que mostró actividad antibacteriana frente a las siguientes bacterias Gram positivas: *Bacillus subtilis* con un halo de inhibición de 13,5 mm, (CMI: 100 mg /mL) y *Listeria monocytogenes* un halo de inhibición de 7,4 mm (CMI de 50 mg/mL) pero, para las bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Vibrio parahaemolyticus*) no presentó ninguna actividad antibacteriana.

Loxopterygium huasango (Anacardiaceae), presentó alcaloides, flavonoides (995,42 ± 3,16 mg CE/g extracto), fenoles (314,72 ± 1,91 mg GAE/ g extracto), taninos, quinonas y antraquinonas en proporciones abundantes y poco contenido de esteroides, triterpenos y saponinas. El porcentaje de inhibición del radical DPPH en *L. huasango* fue de 92,97%, cercano al del ácido ascórbico (Vitamina C) que obtuvo un porcentaje del 95,48%; lo cual indica una gran capacidad antioxidante. Además, una gran actividad antibacteriana frente a todas las bacterias Gram positivas (*S. aureus* con un halo de inhibición de 9 mm, *B. subtilis* 10,5 mm; ambas con una CMI de 5

mg/mL y *L. monocytogenes* un halo de inhibición de 8 mm con una CMI de 2,5 mg/mL) y Gram negativas (*E. coli* con un halo de inhibición de 7,75 mm, *P. aeruginosa* 10,25 mm y 9,5 mm para *V. parahaemolyticus*, todas presentaron una CMI de 2,5 mg/mL).

Croton ferrugineus (Euphorbeaceae), en el tamizaje fitoquímico presentó elevadas cantidades de flavonoides (190,50 ± 0,83 mg CE / g extracto), fenoles (10,17 ± 0,22 mg GAE/ g extracto) y taninos, en bajas concentraciones los alcaloides, esteroides, triterpenos, quinonas, antraquinonas y saponinas. La actividad antioxidante fue alta, con un porcentaje de inhibición del radical DPPH del 82,95%, estando cerca al porcentaje de inhibición de 95,32% del ácido ascórbico y no presentó inhibición antibacteriana frente a las bacterias Gram positivas (*S. aureus*, *B. subtilis* y *L. monocytogenes*), pero; si para una de las bacterias Gram negativas (*E. coli* con un halo de inhibición de 8 mm con un CMI de 200 mg/mL).

Antecedentes históricos

Familia Euphorbiaceae

Entre las Angiospermas es la sexta familia más diversa; presenta cinco subfamilias, 317 géneros y cerca de 8100 especies, con distribución tropical y subtropical, la mayoría de taxones crece en zonas bajas, aunque unas pocas especies pueden alcanzar los 4000 m de altitud¹⁵. Esta familia se caracteriza por presentar látex o exudado coloreado y estípulas de diversas formas; las hojas son simples, espiraladamente dispuestas y sólo en algunas especies son opuestas; generalmente presentan glándulas de diversas formas en la lámina y a veces sobre el pecíolo. Las flores generalmente están dispuestas en inflorescencias muy variadas. El fruto es una cápsula esquizocárpica con dehiscencia explosiva. La semilla tiene un rafe muy notorio y generalmente presenta carúncula o arilo¹⁶.

Género *Croton*

Comprende aproximadamente unas 1300 especies difundidas en las regiones cálidas del planeta, sobre todo en América del Sur y en África; es el género más grande de la subfamilia Crotonoideae¹⁷. El género *Croton* comprende desde hierbas

a árboles, con muy variadas formas de hojas, exudado coloreado, generalmente con glándulas en la base de la lámina y/o sobre el pecíolo, flores femeninas generalmente con pétalos reducidos o ausentes. Una de las principales características del grupo es la curvatura apical de los filamentos estaminales en el botón floral, lo cual hace que las anteras estén invertidas de manera introrsa^{18,19}.

Otra característica diagnóstica del género es la presencia de tricomas estrellados y lepidotos, los cuales parecen variar en densidad y persistencia dependiendo de la edad y las condiciones ambientales. Se ha reconocido que el tipo y posición de los tricomas son caracteres útiles para diferenciar especies^{20,21,22}. Además, la mayoría de las especies de *Croton* poseen estructuras secretoras de diversa índole, tales como nectarios florales y extraflorales^{23,24}.

Especie *Croton leptostachyus*

Planta conocida comúnmente como mosquero, la cual es ampliamente utilizada por agricultores en el tratamiento de enfermedades asociadas a bacterias y hongos. Forma parte de arbustales abiertos y ralos (Ver Tabla 1-2)¹⁸.

Tabla 1. Taxonomía de la especie *Croton leptostachyus* Linneo 1753¹⁸.

| | |
|-----------------|----------------------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Subclase | Rosidae |
| Orden | Euphorbiales |
| Familia | Euphorbiaceae |
| Género | <i>Croton</i> |
| Especie | <i>Croton Leptostachyus</i> (L.) |

Tabla 2. Características Botánicas de la Especie *Croton leptostachyus*¹⁸.

| Parte de la planta | Descripción |
|--------------------|--|
| Hojas | Generalmente simples, compuestas, palmeadas; alternas u opuestas, con estípulas que pueden estar transformadas en espinas o glándulas. |
| Flores | Imperfectas monoicas o dioicas, dispuestas en espigas o racimos, la inflorescencia característica es el ciatio. |
| Estambres | Filamentos libres o soldados, a veces ramificados, insertos sobre un disco nectarífero; con anteras bitecas y dehiscencia longitudinal. |
| Gineceo | Ovario súpero, con tres carpelos soldados, con tres lóculos y uno o dos óvulos cada uno, placentación axilar, estilos libres o unidos en forma variable. |
| Semillas | Con embrión recto o curvo, a menudo con ornamentación muy variada y de alto interés taxonómico, en ocasiones con abundante endosperma oleaginoso. |

Distribución Geográfica del Género *Croton* a Nivel Mundial

Croton es uno de los géneros más grandes de angiospermas con más de 1200 especies y es el segundo género más diverso de la familia Euphorbiaceae^{19,20}. Se encuentra distribuido en los trópicos y subtrópicos de todo el mundo, principalmente en zonas áridas y semiáridas, con mayor diversidad en Brasil, Madagascar y el Caribe²¹.

Distribución Geográfica del Género *Croton* en Venezuela

En Venezuela, *Croton* es el género mejor representado de la familia Euphorbiaceae con 79 especies²⁴. Para la región Andina las especies más conocidas son *Croton leptostachyus*, *Croton fragilis*, *Croton chamanus* y *Croton conduplicatus* (Ver Tabla 3)²⁰.

Tabla 3. Distribución geográfica del género *Croton* en Venezuela²⁰.

| Género y especie | Ubicación geográfica |
|-----------------------------|--|
| <i>Croton leptostachyus</i> | Laderas con vegetación secundaria entre 800 y 2400 m.s.n.m en los estados Mérida, Táchira y Trujillo. Además en Zulia entre 100 y 2400 m.s.n.m. |
| <i>Croton fragilis</i> | Regiones semiáridas del valle del río Chama en Mérida, donde forma parte de la vegetación xerofítica en laderas, y bordes de camino entre 450 y 1200 m.s.n.m y en la zona costera del país. |
| <i>Croton chamanus</i> | Regiones semiáridas de Lara y del valle del río Chama en Mérida. Forma parte de la vegetación xerofítica sobre laderas de suelos arenosos entre 300 y 2000 m.s.n.m. En Venezuela tiene amplia distribución, encontrándose en casi todos los estados del país entre 0 y 1200 m.s.n.m. |
| <i>Croton conduplicatus</i> | |

Composición Química del Género *Croton*

La química del género *Croton* ha sido bien explorada; aislándose sustancias tipo triterpenos, flavonoides y alcaloides. También se ha registrado la presencia de otros metabolitos como las cumarinas, glicósidos cianogénicos y taninos²⁵.

Triterpenos

Los terpenos son hidrocarburos que pertenecen a las familias de los alquenos, alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y cetonas. Cuando las moléculas contienen átomos de oxígeno se da preferencia al término terpenoide, aunque ambas denominaciones suelen utilizarse. La unión sucesiva de seis unidades de isopreno da origen al triterpeno. Se localizan en las plantas, sobre todo en las hojas, en las flores y en los frutos y, en menor cantidad en los tallos, el tronco y las raíces. Entre los terpenos aislados en el género *Croton* se encuentran el β -cariofileno y α -amirina (Ver Figura 1)²⁵.

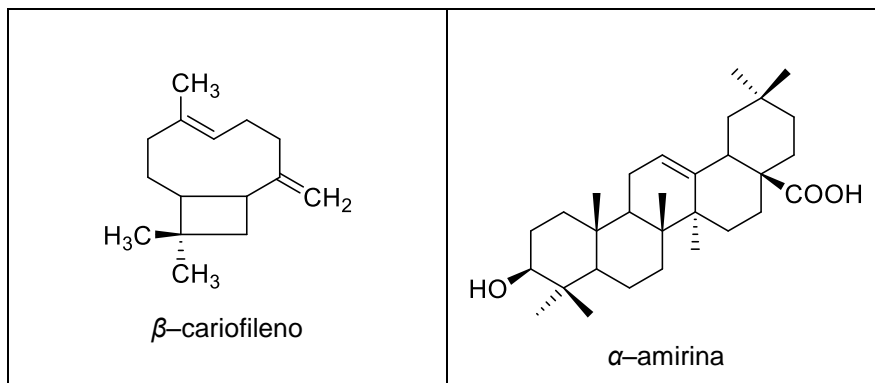


Figura 1. Estructuras químicas de algunos terpenos aislados del género *Croton*²⁵.

Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, el polvo del ambiente y sustancias químicas presentes en los alimentos. Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C₆-C₃-C₆), compuesto por dos anillos aromáticos ligados a través de otro anillo de núcleo pirano heterocíclico. Entre los flavonoides aislados del género *Croton* están la quercetina y el canferol (Ver Figura 2)²⁶.

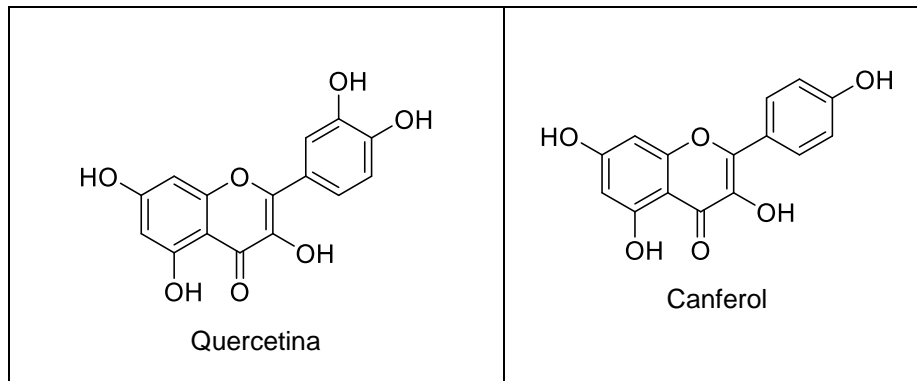


Figura 2. Estructuras químicas de algunos flavonoides aislados del género *Croton*²⁶.

Alcaloides

Son compuestos orgánicos de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado (el nitrógeno se encuentra intracíclico), derivados de aminoácidos, de carácter más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas. Los alcaloides son esencialmente sustancias presentes en todos los órganos de la planta del género *Croton* entre estos están la glaucina y la tapsina (Ver Figura 3)²⁷.

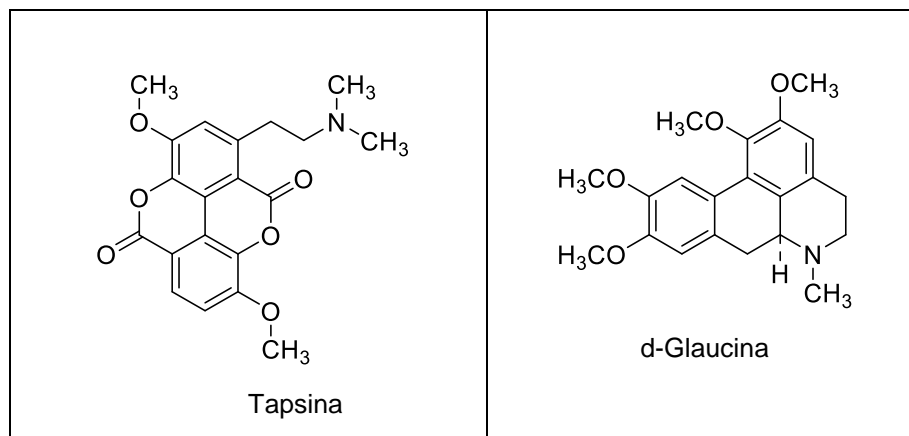


Figura 3. Estructuras químicas de algunos alcaloides aislados del género *Croton*²⁷.

Usos Etnobotánicos que se le Atribuyen al Género *Croton*

Las especies que pertenecen al género *Croton*, se caracterizan porque poseen un amplio rango de usos etnobotánicos. A nivel popular sus hojas se usan como agente cicatrizante, además posee propiedades antiinflamatorias, antisépticas y

hemostáticas, así como antidiarreico. También se ha utilizado en el tratamiento de úlceras gastrointestinales, cólicos uterinos, retención urinaria y como anticancerígeno. Algunas poblaciones indígenas lo han usado en el tratamiento de fiebres atribuidas a infecciones de origen digestivo, para baños vaginales antes del parto, para el caso de hemorragias postparto y para tratar diferentes afecciones de la piel. En la medicina popular se utilizan dosis de decocciones obtenidas de especies del género *Croton*, a partir de ocho gotas (aunque se alcanzan incluso dosis de 20 a 30 gotas), que son aplicadas sobre la piel o administradas vía oral. En los diferentes países donde se encuentra distribuida, resulta habitual encontrar un látex de color rojo característico en diferentes presentaciones, tanto en forma líquida, e incorporado a diversos preparados²⁷.

Bases Teóricas

Metabolitos Secundarios de las Plantas

A diferencia de otros organismos, las plantas destinan una cantidad significativa del carbono asimilado y de la energía a la síntesis de una amplia variedad de moléculas orgánicas que no parecen tener una función directa en procesos fotosintéticos, respiratorios, asimilación de nutrientes o síntesis de proteínas, carbohidratos o lípidos, y que se denominan metabolitos secundarios. Estos además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies⁵.

También reciben la denominación de productos naturales y tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado éste último de su uso en la industria cosmética, alimentaria, farmacéutica. Un gran número de estos, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas, colorantes, entre otros⁵.

Mecanismos de Resistencia de los Antibacterianos

Son estrategias que generan las bacterias para disminuir o inactivar la acción de los antibióticos. Por lo que, pueden producir enzimas hidrolíticas o modificadoras de antibiótico, permite así disminuirlo radicalmente. Pueden presentar bombas de eflujo, expulsando el antibiótico hacia el exterior de la bacteria. A su vez, cambian la permeabilidad de la membrana imposibilitando la entrada del antibiótico a la bacteria. Por último, pueden alterar el sitio de acción del antibiótico²⁹. Por ello, la resistencia bacteriana continúa en aumento y representa serios retos para el tratamiento de infecciones. Asimismo, en los últimos años se han realizado muchas investigaciones, que han demostrado el poder antibacteriano de los extractos².

Extractos

Los extractos son una mezcla compleja de compuestos químicos, obtenibles por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología³⁰.

Métodos de Obtención

Maceración

Es una extracción que se realiza a temperatura ambiente. Consiste en remojar el material vegetal, bien fragmentado en un solvente (agua o etanol, se prefiere el etanol puesto que a largos tiempos de extracción el agua puede propiciar la fermentación o la formación de mohos) hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que resista al disolvente; en éste se colocan el material vegetal con el disolvente, una vez tapado se deja en reposo por un período de 2 a 14 días, durante los cuales se debe agitar ocasionalmente. Pasados estos días, se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y finalmente se obtiene el extracto³¹.

Percolación

También conocido como lixiviación, es uno de los procesos más divulgados, se puede realizar con disolventes orgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener el material. Consiste en colocar el material fragmentado en un embudo o recipiente cónico y hacer pasar un disolvente adecuado a través del mismo. En este proceso se requiere agregar solvente constantemente³¹.

Decocción

En este procedimiento se hierve la materia vegetal en agua por un tiempo variable (según sea la planta o el principio activo a extraer). Una vez hecha la decocción se enfría, se filtra y se añade suficiente agua fría a través de la materia vegetal hasta obtener el volumen deseado³¹.

Infusión

Es el proceso en cual se somete las partes de la planta a utilizar previamente humedecida al contacto con el solvente a una temperatura igual a la de ebullición del agua, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se filtra mediante un tamiz o papel de filtro³¹.

Digestión

Es una forma de maceración, con ligero calentamiento durante el proceso de extracción, siempre que esta temperatura no altere los principios activos del material vegetal. Se utiliza este proceso con aquellas partes vegetales más duras, o que contienen sustancias poco solubles³¹.

Bacterias

Son microorganismos que poseen una estructura relativamente simple, son procariotas, es decir, unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, ni retículo endoplásmico que se reproducen por división asexual. Además, tienen una

capacidad extraordinaria de adaptación a diferentes condiciones ambientales. Afortunadamente, solo algunas especies se asocian con enfermedades humanas, sin embargo, algunos de ellos son agentes etiológicos de enfermedades infecciosas fatales^{32,33}.

Clasificación de las Bacterias

Las bacterias se clasifican en dos grupos diferentes en función de la estructura de su pared celular^{33,34}.

Gram positivas

Son aquellas que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de Gram. Esta característica química está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Son grupos principales de bacterias y, cuando se tratan como taxón, se utiliza también el nombre de Posibacteria y las que restan son las bacterias Gram negativas³⁵.

Composición de su Pared Celular

La pared celular de las bacterias Gram positivas está formada en un 90% por peptidoglicano, siendo éste el principal componente que permite diferenciarlas con la pared de las Gram negativas, pues al teñirlas, es gracias al grosor que éste le proporciona, que se logra mantener la coloración del cristal violeta en el interior de la célula al Gram. Además del peptidoglicano, ésta se encuentra compuesta de ácidos teicoicos, los cuales están presentes en pequeñas cantidades (Ver Figura 4)³⁵.

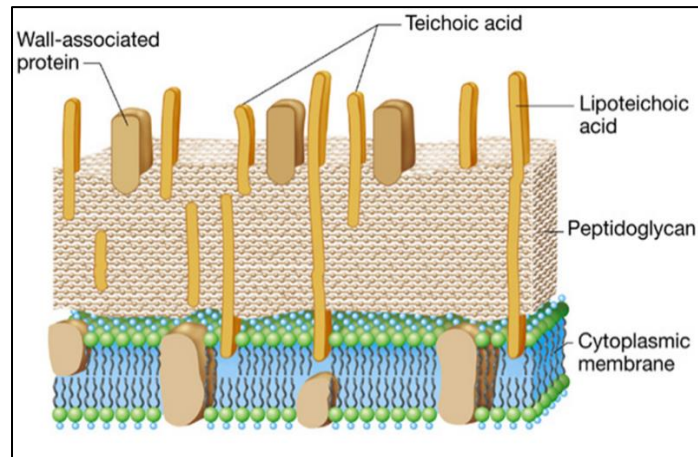


Figura 4. Pared celular de las bacterias Gram positivas³⁶.

Entre las bacterias Gram positivas se encuentran:

Staphylococcus aureus

Son cocos Gram positivos en racimos irregulares, inmóviles no formadores de esporas, sin cápsula, catalasa y coagulasa positiva y aerobios facultativos, poseen alta tolerancia a la sal, fermentan el manitol, las colonias son redondas, lisas, elevadas y resplandecientes de color amarillo dorado intenso. Además, causan infecciones piógenas en lactantes y niños, en la piel, celulitis, furúnculos e infecciones post-operatorios. Si la lesión es severa las bacterias pasan las barreras locales de la lesión llegando a los ganglios linfáticos y al torrente sanguíneo en donde se multiplica causando necrosis³⁷.

Enterococcus faecalis

Son cocos Gram positivos que se encuentran formando parte de la microbiota de la cavidad oral y del tracto gastrointestinal, anaerobio facultativo, catalasa negativo, inmóvil y no esporulado que se dispone en pares o cadenas. Tienen un rango óptimo de crecimiento de 30 a 35 °C, crecen en caldos con 6,5% de NaCl e hidrolizan la esculina. Se atribuye ser el agente causal de entre un 5 a 20% de endocarditis bacteriana³⁸.

Gram negativas

Las bacterias gramnegativas poseen una pared celular compuesta por pocas capas de peptidoglucano y una membrana externa, compuesta por lipopolisacáridos, lipoproteínas y fosfolípidos. El peptidoglucano está unido a lipoproteínas de la membrana externa y se encuentra en el periplasma, una sustancia gelatinosa localizada entre la membrana externa y la membrana plasmática, que contiene una concentración elevada de enzimas degradantes y proteínas de transporte³⁶.

Composición de su Pared Celular

La pared de las bacterias Gram negativas no posee ácido teicoico. La membrana externa contiene diversas proteínas; entre ellas, las porinas o canales proteicos que permiten el paso de ciertas sustancias. También presenta unas estructuras llamadas lipopolisacáridos (LPS), que están formados por tres regiones: el polisacárido O (antígeno), una estructura polisacárida central (KDO) y el lípido A (endotoxina) (Ver Figura 5). El lipopolisacárido contiene una toxina termoestable que se libera al romperse la bacteria, pudiendo resistir a la esterilización en autoclave³⁹.

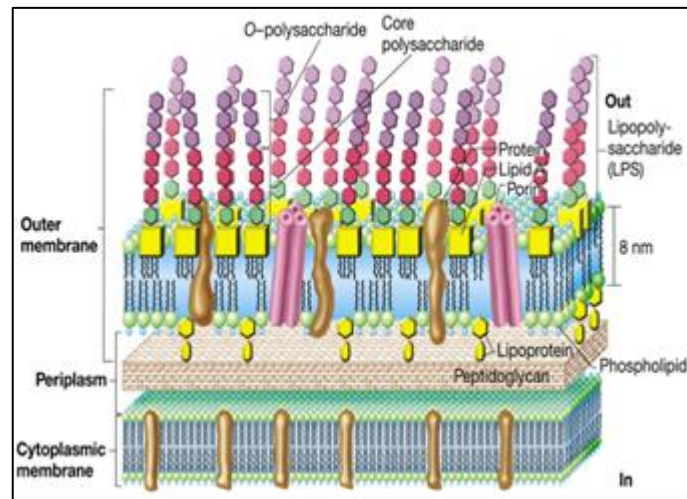


Figura 5. Pared celular de las bacterias Gram negativas³⁶.

Entre las bacterias Gram negativas están:

Escherichia coli

Es un bacilo Gram negativo, aerobio o anaerobio, fermenta la lactosa y la glucosa, sin cápsula y móviles. Las cepas lisas forman colonias incoloras, convexas y brillantes, pero al ser sub-cultivadas se convierten en cepas rugosas que forman colonias granuladas y opacas. Se encuentra en el intestino grueso, causan enfermedad intestinal primaria e infección extra-intestinal, puede desplazarse del conducto intestinal al tracto urinario y a los riñones por vía hematogena o linfática presentando con mayor frecuencia procesos patológicos en el tracto urinario³⁷.

Pseudomonas aeruginosa

Es un bacilo Gram negativo, móvil, aerobio, no forma esporas, fermenta la glucosa, es negativo al indol y generalmente no tiene cápsula. En un medio de agar sangre, las colonias son grandes, irregulares con pigmento verde. Tienen proteasas que pueden ser responsables de las lesiones cutáneas hemorrágicas observadas en algunas infecciones. Además produce una enterotoxina responsable de la diarrea asociada con infecciones intestinales, también da lugar a infecciones del tracto urinario, infecciones de quemaduras y heridas, meningitis, bronconeumonía y endocarditis bacteriana³⁷.

Diferencias entre bacterias Gram positivas y Gram Negativas

- ✓ Las bacterias Gram positivas tiene una gruesa capa de peptidoglicano, dos tipos de ácidos teicoicos: el ácido lipoteicoico (ubicado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática) y el ácido teicoico (que se halla en la superficie, anclado solamente en el peptidoglicano).
- ✓ En las bacterias Gram negativas, la pared celular es delgada, y está unida, mediante lipoproteínas, a otra membrana plasmática externa, dicha membrana es soluble en solventes orgánicos, la capa de peptidoglucano es

muy delgada y no retiene el complejo de cristal violeta, y por lo tanto no es posible su tinción azul violácea³⁶.

Tinción de Gram

Es una técnica de coloración bacteriana que debe su nombre al científico Christian Gram; mediante su uso se pueden diferenciar estos microorganismos en dos grupos Gram positivos y Gram negativos, basándose en la composición molecular de la pared celular, es así como los Gram positivos por su gran cantidad de peptidoglicano retienen el colorante primario (cristal violeta) y se tiñen de color púrpura, por el contrario los Gram negativos al poseer una membrana externa con un alto contenido de lípidos, son decoloradas por la mezcla de alcohol-acetona, tomando como tinción el colorante secundario (safranina) observándose de color rojo².

Mecanismos de resistencia

La resistencia de las bacterias a los antibióticos es una consecuencia previsible de la variación genética, al administrar un antibiótico se ejerce una presión selectiva sobre las bacterias de tal manera que se ven forzadas a defenderse. Se define como las estrategias que utilizan las bacterias para disminuir o inactivar la acción de los agentes antimicrobianos, atacándolos y así persistiendo en el hospedero⁴⁰.

Tipos de mecanismo de resistencia

Las modificaciones genéticas que se presentan en las bacterias son capaces de impedir que los antibióticos las destruyan al generar por lo menos ocho sistemas de defensa⁴⁰.

Destrucción o inactivación enzimática

La forma más común de este tipo de resistencia es la perduración de β -lactamasas, estas enzimas están presentes tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas. Inicialmente la bacteria se ve expuesta al antibiótico y esto la induce a producir la β -lactamasa. La resistencia de las bacterias por el mecanismo

de inhibición enzimática no está limitada al medio hospitalario, sino que también toca a las bacterias adquiridas en las comunidades^{40,41}.

Alteración de la membrana bacteriana

La resistencia a las penicilinas se debe a la existencia de una membrana externa que impide que el antibiótico atraviese a dicha membrana en los Gram negativos específicamente por los orificios llamados porinas, los cuales están constituidos por proteínas que forman un canal de paso restringido hacia el interior de la bacteria, esta membrana externa está ausente en los Gram positivos. La resistencia a algunos antibióticos se debe a las mutaciones que permiten que las bacterias pierdan porinas específicas y se vuelvan resistentes a los antibióticos β -lactámicos⁴⁰.

Cambios en la permeabilidad de la membrana interna

Otra forma de resistencia de la bacteria es la alteración de la producción energética que no permite el paso del antibiótico de la capa externa a la interna de la membrana: este tránsito consume energía y se efectúa mediante un transportador aniónico; al alterar la bacteria este mecanismo se defiende del ataque del antibiótico⁴¹.

Alteración del blanco ribosomal

Por medio de este mecanismo la bacteria adquiere habilidad para inhibir la síntesis proteínica y el crecimiento celular. También se puede modificar el ribosoma mediante la mutación de algunas de sus proteínas como la 12S de la subunidad 30S. La resistencia a Rifampicina®, por modificación de la ARN-polimerasa, y la mutación de las subunidades de la ADN-girasa (que otorga resistencia a las quinolonas) son ejemplo de ellos. La alteración del blanco ribosomal lo realiza la bacteria a través de genes mediados por plásmidos⁴¹.

Modificación enzimática

Es debida al cambio enzimático codificado por el gen del plásmido o el cromosoma. La alteración de la molécula por acetilación, fosforilación y adenilación,

puede inactivar los antibióticos durante su paso por el citoplasma bacteriano. Las enzimas responsables son altamente heterogéneas y su síntesis esta codificada por varios genes, por lo cual la mutación no es frecuente⁴⁰.

Extracción activa del antibiótico

Por medio de este mecanismo, se altera la producción de energía, se disminuye la entrada y concentración del antibiótico, se promueve la extracción activa del mismo por lo tanto su efecto se reduce. Para garantizar que el antibiótico sea expulsado hasta el ambiente externo las bombas de energía altamente eficientes se acoplan con algunas porinas. Una de las características más interesante de este tipo de resistencia es que suele conferir protección contra diferentes antimicrobianos a la vez⁴⁰.

Alteración de los precursores de la pared

Por medio de este mecanismo de resistencia mediado por un gen cromosomal, el peptidoglicano precursor es cambiado al modificar la terminación D-alamina por D-alanina-D-lactato y de esta manera se logra que el antibiótico no se pueda unir al precursor de membrana. Este mecanismo se ha estudiado con Vancomicina® y antibióticos glicopeptídicos⁴⁰.

Modificación de las enzimas blanco

Este mecanismo de resistencia a la penicilina y otros antibióticos β -lactámicos comprende las alteraciones en una o más de las proteínas fijadoras de penicilina (PBP) que son fundamentales en la síntesis de peptidoglicano que forman la membrana bacteriana y al alterarlos, hace que la bacteria se torne resistente al antibiótico⁴⁰.

Antibióticos

Son agentes terapéuticos de acción bactericida o bacteriostática sobre un espectro más o menos amplio de gérmenes patógenos. El 80% de las

prescripciones de antibióticos son penicilinas por su bajo costo y eficacia frente a un amplio espectro de bacterias Gram positivas y Gram negativas⁴¹.

Mecanismo de acción de los antibióticos

Hay varios sitios de acción posibles para los antimicrobianos, dentro de la célula bacteriana pero las vías o las estructuras atacadas con mayor frecuencia son las síntesis de la pared celular, la membrana celular, la síntesis de proteínas y de ADN y ARN⁴².

Inhibidores de la síntesis de la pared celular

La pared de la célula bacteriana, conocida como peptidoglicano cumple una función esencial en la vida de esa célula. El anillo β -lactámico es la clave del mecanismo de acción de estos fármacos, que están dirigidos contra la síntesis de la pared celular y la inhiben por unión a las enzimas que participan en ella. Las enzimas esenciales para esta función, se encuentran fijadas en la membrana celular y como grupo se denominan proteínas de unión a la penicilina (PBP), con frecuencia son las más importantes para la supervivencia⁴².

Inhibidores de la función de la membrana celular

Las polimixinas son los agentes que alteran la membrana de la célula bacteriana más antiguos. Esta alteración produce pérdida de macromoléculas y de iones esenciales para la supervivencia celular, son más activas contra las bacterias Gram negativas. Además, las células huésped humanas también tienen membranas, de modo que hay riesgos de toxicidad por polimixinas, por ello, suelen utilizarse como último recurso cuando se aíslan bacilos Gram negativos multirresistentes⁴³.

Inhibidores de la síntesis de ADN y ARN

Los agentes antimicrobianos primarios dirigidos contra el metabolismo del ADN son las fluoroquinolonas y el Metronidazol[®]. Las fluoroquinolonas como la Ciprofloxacina[®] y la Ofloxacina[®] se unen con las ADN girasas involucradas en la regulación del superenrollamiento del ADN bacteriano, un proceso esencial para la

replicación y la transcripción del ADN. Del Metronidazol[®] se desconoce el mecanismo exacto, pero se cree que provocan rupturas de las cadenas de ADN. La Rifampicina[®] se une a la enzima ARN polimerasa dependiente del ADN e inhibe la síntesis del ARN^{41,42}.

Inhibidores de procesos metabólicos

Las bacterias usan la vía del ácido fólico para producir precursores importantes para la síntesis de ADN. La diana de las sulfonamidas es una de esta enzima, la dihidropteroatosintetasa, a la que se unen para destruir la vía del ácido fólico. El Trimetoprim[®] también actúa en la vía del ácido fólico, sin embargo, inhiben otra enzima la dihidropteroato reductasa. El mecanismo de acción de la Nitrofurantoína[®] no se conoce por completo, puede tener varias dianas entre las proteínas bacterianas y en la síntesis de enzimas, también puede dañar el ADN⁴².

Inhibidores de la síntesis de proteínas

Varias clases de antibióticos inhiben la síntesis de proteínas bacterianas y provocan alteraciones graves del metabolismo celular. En el caso de los aminoglucósidos, tetraciclinas y glicilciclinas inhiben la síntesis de proteínas bacterianas y se unen a los receptores de proteína presentes en la subunidad ribosómica 30S del microorganismo. Mientras que, los fenicoles, macrólidos, lincosaminas, estreptograminas y oxazolidonas inhiben la síntesis de proteínas al unirse a los receptores presentes en la subunidad 50S del ribosoma⁴¹.

Métodos para determinar la actividad antibacteriana

Método de Kirby Bauer

Es una prueba de difusión referida como cualitativa, en este, se emplean discos de papel absorbente, impregnados con una concentración conocida del antibacteriano. Estos discos se colocan en la superficie del agar de Müller-Hinton, en la que previamente se inocula una suspensión de la cepa a probar, con una turbidez igual al patrón 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Cuando el disco se

humedece, el antibacteriano difunde radialmente. Si se presentan zonas de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de los discos, la medición de los halos de inhibición y su comparación con los valores de referencia, permite establecer si la cepa es resistente, intermedia o susceptible⁴³.

Método de dilución

El método de dilución en agar o en caldo, es utilizado para determinar la concentración bactericida mínima y la concentración inhibitoria mínima (CIM). En esta técnica son utilizados tubos o microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. La cepa es inoculada en los diferentes tubos o pozos de las microplacas y la CIM es determinada después de la incubación. En la técnica de dilución en agar, las placas se siembran por profundidad con una determinada concentración de extracto vegetal, luego se inoculan con la cepa de estudio y se incuban por 24 horas⁴⁴.

Definición operacional de términos

Bactericidas

Son sustancias que provocan la destrucción y muerte del germen por lo que su acción sobre el mismo es irreversible⁴⁵.

Bacteriostáticos

Son antisépticos que consiguen frenar el crecimiento de los microorganismos. Este procedimiento es reversible por lo que cuando deja de estar presente la sustancia bacteriostática, los gérmenes pueden volver a reproducirse⁴⁵.

Medios de cultivo

Es un conjunto de nutrientes, factores de crecimiento y otros componentes, que proveen condiciones bioquímicas y biofísicas apropiadas para el aislamiento, desarrollo y mantenimiento de los microorganismos⁴⁶.

Antibiograma

Es el procedimiento que se utiliza en el laboratorio para la determinación de la sensibilidad de un microorganismo ante diferentes antibióticos. Es la principal ayuda que ofrece el laboratorio clínico para la elección de un tratamiento apropiado⁴⁷.

Concentración inhibitoria mínima

Es definida como la concentración más baja de sustancias que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas⁴⁶.

Operacionalización de las variables

La operacionalización de las variables se emplea en la investigación científica para designar al proceso mediante el cual se transforma la variable de conceptos abstractos a términos concretos, observables y medibles (Ver Tabla 4-5), es decir, dimensiones e indicadores; por lo general se representa en un cuadro¹⁰.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 4. Operacionalización de la Variable Dependiente Actividad Antibacteriana

| 1.Variable | 2.Tipo de variable | 3.Definición conceptual ¿Qué es? |
|---|---|---|
| Actividad antibacteriana | Dependiente Cuantitativa Continua | La actividad antibacteriana que poseen los extractos de las plantas se debe a la gran variedad de componentes químicos presentes en estos, que tienen capacidad inhibitoria frente al crecimiento o destrucción del microorganismo patógeno ⁴⁸ . |
| 4.Definición operacional ¿Cómo se mide? | 5.Dimensiones | 6.Indicador |
| Se encuentran los métodos de difusión en disco y difusión del pozo en agar. | Sensibilidad | Se observa un halo de inhibición |
| | Sensibilidad intermedia | Se observa un halo de inhibición más reducido |
| | Resistencia | Se observa muy poco o ningún halo de inhibición. |

Fuente: Chacón y Hernández, 2018.

Tabla 5. Operacionalización de la Variable Independiente Extracto Metanólico de *Croton leptostachyus*

| 1.Variable | 2.Tipo de variable | 3. Definición conceptual ¿Qué es? |
|---|-------------------------------|---|
| Extracto metanólico de <i>Croton leptostachyus</i> | Independiente Cualitativa | Los extractos son una mezcla compleja de compuestos químicos, obtenibles por procesos físicos, químicos y/o microbiológicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología ³⁰ . |
| 4. Definición operacional ¿Cómo se mide? | 5.Dimensiones | 6.Indicador |
| La obtención de los extractos se puede hacer por maceración y/o percolación | Compuestos químicos presentes | Como referencia se realiza en plantas |
| | Compuestos químicos ausentes | |

Fuente: Chacón y Hernández, 2018.

www.bdigital.ula.ve Hipótesis

Son las explicaciones tentativas del fenómeno estudiado o también, son respuestas tentativas a las preguntas del problema. Son proposiciones tentativas acerca de las relaciones entre dos o más variables y se apoyan en conocimientos organizados y sistemáticos⁴⁹.

Hipótesis Alternativa (H(A))

Es posible que el extracto metanólico de *Croton leptostachyus* presente actividad antibacteriana frente a las cepas ATCC, cuyo ensayo se realizará en el laboratorio de Productos Naturales "Dr. Antonio Morales Méndez" de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde septiembre de 2018 hasta febrero de 2020.

Hipótesis Nula (H (0))

No es posible que el extracto metanólico de *Croton leptostachyus* presente actividad antibacteriana frente a las cepas ATCC, cuyo ensayo se realizará en el Laboratorio de Productos Naturales "Dr. Antonio Morales Méndez" de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde septiembre de 2018 hasta febrero de 2020.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Croton leptostachyus* en cepas ATCC.

Objetivos Específicos

- Extraer los metabolitos secundarios presentes en la especie *Croton leptostachyus*, por el método de maceración a temperatura ambiente usando metanol como solvente.
- Evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Croton leptostachyus*, por el método de difusión en disco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de Investigación

El tipo de investigación tiene relación con la interrogante de estudio en la cual se resalta lo que se quiere saber, esto marca el logro general que se desea alcanzar durante el proceso e identificar el tipo de investigación. Los tipos de investigación pueden ser: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa⁴⁹. En consecuencia, la presente investigación fue de tipo evaluativa, ya que se ensayó la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Croton leptostachyus* en cepas ATCC.

Diseño de Investigación

Los datos serán recolectados considerando dónde, cuándo y la amplitud de la información⁴⁹. Con respecto al dónde, el diseño de esta investigación fue de tipo mixta al incluir un diseño de campo, ya que se recolectó la planta y de laboratorio, debido a que se obtuvieron los extractos de la misma. Para el cuándo, fue una investigación mixta la cual, reunió un diseño contemporáneo, porque se recolectó la información durante el desarrollo de la investigación y a su vez fue transeccional, en el caso de tomar los datos una vez. Asimismo, según la amplitud de la información fue multivariable, debido a que hubo una variable dependiente y otra independiente (actividad antibacteriana y extracto metanólico de *Croton leptostachyus*, respectivamente). Según, la intervención del investigador, fue de tipo experimental.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

Hernández, Fernández y Batista¹⁴, señalaron que una población es el conjunto de todos los casos que concuerdan con una serie de especificaciones. La población conduce hacia el conjunto finito o infinito de elementos que presentan características comunes con el fenómeno que se investiga. Con base en esto, al principio la población a estudiar fue finita, integrada por la especie *Croton leptostachyus*, la extracción de la planta fue realizada en el Laboratorio de Productos Naturales “Dr. Antonio Morales Méndez”, Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes y la actividad antibacteriana fue analizada en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (S.G.U), “Profesora Luisa Vizcaya”, Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Selección del Tamaño de la Muestra

La “n” muestral estuvo representada por 1690 g de la planta (seca y molida) perteneciente a la especie *Croton leptostachyus*.

Sistema de Variables

Las variables relacionadas con el propósito de esta investigación son las siguientes: Variable dependiente (VD): actividad antibacteriana, variable independiente (VI): extracto metanólico de *Croton leptostachyus*. Estas variables permitieron la verificación del fenómeno de estudio en la unidad de investigación.

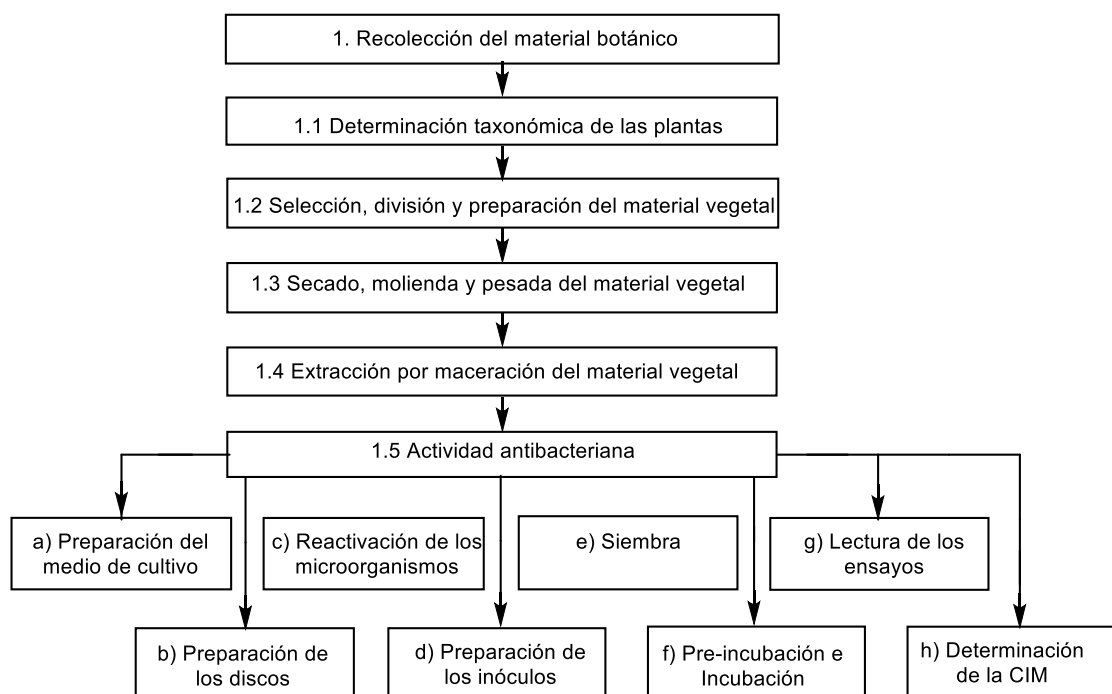
Instrumento de Recolección de Datos

Según Palella y Martins⁴⁹ un instrumento permite recolectar los datos para medirlos, posteriormente, a través de modelos matemáticos. Por lo cual, los insumos utilizados para la realización del sistema de recolección de datos serán: el sistema de variables, los objetivos, las bases teóricas y la operacionalización de las variables.

Procedimientos de la Investigación

Es importante que el investigador describa con detalle, el procedimiento que llevará a cabo durante el estudio, esta descripción permite, verificar que el procedimiento utilizado cumplió con los requerimientos metodológicos del proceso de investigación (Ver Esquema 1)¹⁰.

Esquema 1. Procedimiento general de la investigación^{50,51,52,53,54,55,56}



Recolección de la especie botánica

La especie *Croton leptostachyus* se recolectó en el sector Capilla Virgen de La Carbonera en Michelena, estado Táchira a 1200 m.s.n.m.

Determinación taxonómica de la planta

El material vegetal fue identificado por el ingeniero Juan Carmona adscrito al Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos. Una muestra testigo fue depositada en el Herbario “Dr. Luis Ruíz Terán” (**MERF**), Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. La muestra testigo reposa en el inventario con el código: **VM** (JR 40).

Selección, división y preparación del material vegetal

El material vegetal, fue sometido por separado, a un proceso de selección para eliminar las impurezas y partes en descomposición de las hojas. Luego se seleccionó una muestra representativa destinada a la preparación del extracto.

Secado, molienda y pesada del material vegetal

El material vegetal seleccionado de las partes aéreas de la planta (hojas), se secó en un horno eléctrico ubicado en el Herbario **MERF**, a la temperatura no superior a 40 °C, durante al menos 72 horas. Pasado este tiempo, se verificó que la muestra se encontrara libre de humedad y quebradiza al tacto, para seguidamente realizar el proceso de molienda, hasta obtener un polvo fino capaz de traspasar un tamiz de malla número 20. La muestra obtenida con un peso de 1690 g, se colocó en un envase rotulado, para luego colocarse en un lugar seco y fresco, hasta la realización de las diferentes pruebas.

Extracción por maceración del material vegetal

Luego de pesar una cantidad representativa de la muestra seca y molida de la especie *Croton leptostachyus*, fue sometida a extracción sólido-líquido por maceración en frío, utilizando como solvente metanol, durante un periodo de 10 días divididos en dos ciclos de cinco días. El extracto metanólico obtenido se filtró por gravedad y concentró destilando el metanol a presión reducida, utilizando un rotavapor a la temperatura de 40°C. El producto seco se pesó (114,4 g) y colocó en un envase de color ámbar rotulado y sellado, conservándose en un lugar seco y fresco.

Actividad antibacteriana

La evaluación de la actividad antibacteriana, se realizó en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) "Profesora Luisa Vizcaya", del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de la Dra. Judith Velasco Carrillo; empleando el método de difusión en agar con discos de papel. Para el ensayo se utilizaron las bacterias de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC) (Ver Tabla 6).

Tabla 6. Microorganismos y controles positivos

| | ANTIBACTERIANO | |
|----------------|---|-----------------------|
| | MICROORGANISMOS | (CONTROLES POSITIVOS) |
| GRAM POSITIVOS | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | Oxacilina® (1µg) |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29912 | Vancomicina® (30 µg) |
| | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | Tobramicina® (10µg) |
| GRAM NEGATIVOS | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357 | Aztreonam® (30µg) |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | Cefepime® (75µg) |

El método permitió medir la susceptibilidad *In Vitro* de las bacterias frente a una sustancia o mezcla de sustancias de origen vegetal^{50,51,52,53,54,55,56}. El protocolo experimental que se utilizó se presenta a continuación:

- a) Preparación del medio de cultivo: para las bacterias se colocaron aproximadamente 20 mL de agar Müller-Hinton (HIMEDIA®) en placas de Petri. Una vez solidificada la placa, se realizó el control de esterilidad y se conservaron a 4°C hasta el día del ensayo.
- b) Preparación de los discos: los discos de papel de filtro con un diámetro de 6 mm, se impregnaron con 10 µL del extracto (Ver Figura 6), los cuales fueron preparados con el solvente de extracción a la concentración de 489 mg/mL. Luego se colocaron en placas de Petri y esterilizaron bajo luz UV, durante 90 minutos previo al ensayo.

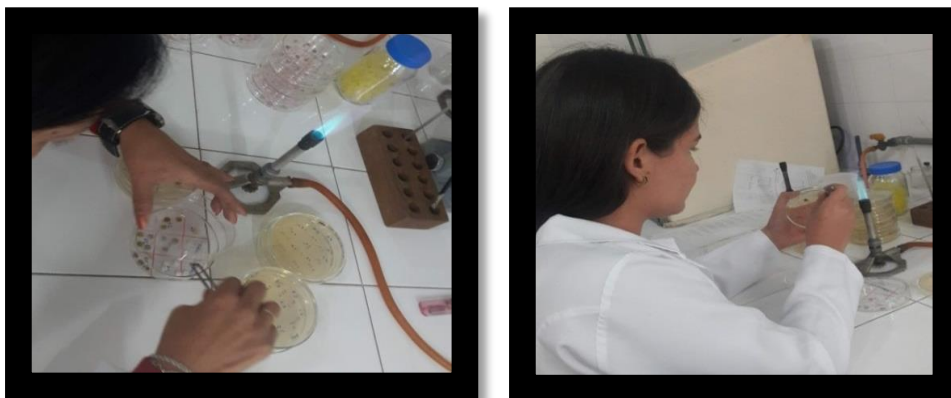


Figura 6. Preparación de los discos

Foto tomada por Chacón, Yessika. Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) "Profesora Luisa Vizcaya", del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA

- c) Reactivación de los microorganismos:** las bacterias se mantuvieron en medio de conservación a temperatura ambiente, a partir de este medio, se reactivaron las cepas y se verificó su pureza.
- d) Preparación de los inóculos:** los inóculos se prepararon en solución salina estéril (0,85 % p/v NaCl), a partir de un cultivo fresco de cada cepa bacteriana repicada en caldo Müeller-Hinton, hasta lograr una turbidez correspondiente al patrón de McFarland N° 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).
- e) Siembra:** los inóculos de cada microorganismo, se sembraron en la superficie del agar con un hisopo estéril (Ver Figura 7). Seguidamente, se colocaron en la superficie del agar inoculado, los discos de papel de filtro impregnados con el extracto, solvente (control negativo) y fármacos de referencia para cada microorganismo (controles positivos).



Figura 7. Inoculación en el agar Müeller-Hinton

Foto tomada por Chacón, Yessika. Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) "Profesora Luisa Vizcaya", del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA

- f) Pre-incubación e Incubación: con el propósito de permitir que los componentes presentes en el extracto y compuestos puros difundan sobre el agar inoculado, se realizó una pre-incubación durante 18 h a la temperatura de 4°C. Por otra parte, el crecimiento bacteriano se llevó a cabo incubando las placas en una estufa a la temperatura de 37°C, durante 48h.
- g) Lectura de los ensayos: se realizaron las lecturas de los halos de inhibición a las 24h y 48h, expresando el diámetro de la zona de inhibición en milímetros (mm). La prueba se consideró negativa cuando se observó crecimiento bacteriano alrededor de los discos.
- h) Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM): se determinó en aquellos microorganismos que mostraron susceptibilidad al extracto ensayado. Para determinar la **CIM** se prepararon diluciones a diferentes rangos de concentración entre 500 mg/mL a 20 mg/mL y se impregnaron los discos con 10 µL de cada dilución, lo cual; permitió determinar la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.

Diseño de Análisis

Los datos recolectados serán analizados a través de un enfoque cuantitativo. Asimismo, estos serán expresados por medio de tablas, en la que se registrará la

actividad antibacteriana mediante la medición de halos de inhibición obtenido del extracto en metanol de la especie *Croton leptostachyus*⁴⁹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS

Actividad Antibacteriana del Extracto Metanólico Obtenido de la Especie *Croton leptostachyus*

Los resultados en la evaluación de la sensibilidad *In Vitro* del extracto en metanol de la especie *Croton leptostachyus*, a una concentración de 489 mg/mL, frente a las cepas Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29912) y Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), expresados en la Tabla 7, solo mostraron actividad antibacteriana contra *S. aureus* con un halo de inhibición de 26 mm de diámetro (Ver Figura 8), un valor significativo si se compara con el control positivo, el antibiótico de referencia (Oxacilina® 1µg), para el cual la bacteria es susceptible o presenta un halo de inhibición ≥ 22 mm. El valor de **CIM** obtenido luego de sucesivas diluciones con el solvente **DMSO** fue 100 mg/mL (Ver Figura 9).

Tabla 7. Actividad Antibacteriana del Extracto Metanólico de *Croton leptostachyus*

| Microorganismos | Zona de inhibición (mm) | | | | | | CMI (mg/mL) |
|-----------------------------------|-------------------------|----------------------------|-----|-----|-----|-----|-------------|
| | Extracto | Disco (6 mm) | | | | | |
| | | Antibióticos de referencia | | | | | |
| | Met | OX | VAN | TOB | ATM | FEP | DMSO |
| <i>S. aureus</i> (ATCC 25923) | 26 mm | ≥22 | - | - | - | - | 100 |
| <i>E. faecalis</i> (ATCC 29912) | NA | - | ≥17 | - | - | - | NE |
| <i>E. coli</i> (ATCC 25922) | NA | - | - | ≥15 | - | - | NE |
| <i>K. pneumoniae</i> (ATCC 23357) | NA | - | - | - | ≥21 | - | NE |
| <i>P.aeruginosa</i> (ATCC 27853) | NA | - | - | - | - | ≥18 | NE |

mm: milímetros; **Met:** metanol; **NA:** no activo; **OX:** Oxacilina[®] 1 µg; **VAN:** Vancomicina[®] 30 µg; **TOB:** Tobramicina[®] 10 µg; **ATM:** Aztreonam[®] 30 µg; **FEP:** Cefepime[®] 75 µg; **CMI:** concentración inhibitoria mínima; **DMSO:** Dimetilsulfóxido, **NE:** no ensayado.

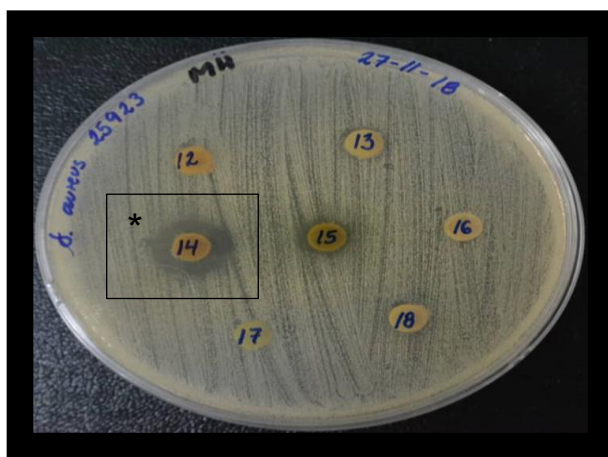


Figura 8. Actividad antibacteriana del extracto en metanol (Met) de *C. leptostachyus* contra la cepa de control *S. aureus* (ATCC 25923) (*14)

Foto tomada por PhD Rojas, Janne. Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) "Profesora Luisa Vizcaya", del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA

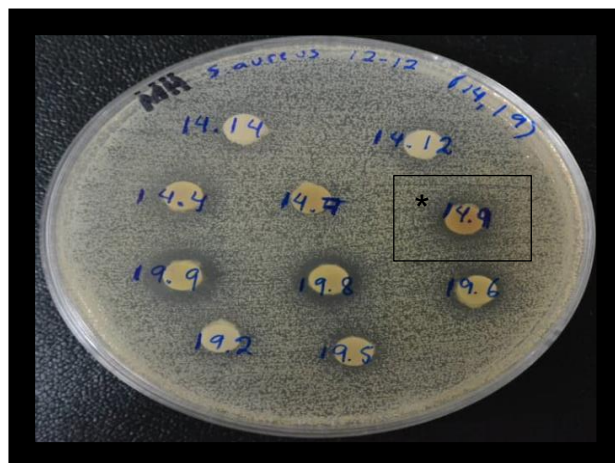


Figura 9. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) del extracto en metanol (Met) de *C. leptostachyus* contra la cepa de control *S. aureus* (ATCC 25923) (*14,9)

Foto tomada por PhD Rojas, Janne. Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios (SGU) "Profesora Luisa Vizcaya", del Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. ULA

DISCUSIÓN

Actualmente, la aparición de bacterias resistentes o multiresistentes a fármacos antibacterianos, representa un grave problema de salud pública a nivel mundial; esta problemática requiere una vigilancia constante, situación que desafía a la comunidad científica para la búsqueda de alternativas. La disminución de la eficacia y el aumento de la toxicidad de los antimicrobianos sintéticos agravan el problema; por lo que los científicos están buscando compuestos naturales para obtener soluciones. Al respecto, la medicina tradicional basada en el uso de plantas medicinales representa una alternativa para el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias resistentes o multiresistentes, tanto en humanos como animales⁵⁷.

Es así, que en el presente estudio, el extracto en metanol de la especie *Croton leptostachyus* mostró una notable actividad antibacteriana frente a la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*, con un halo de inhibición de 26 mm y un valor de CIM de 100 mg/mL. Tal inhibición, guarda relación con el estudio llevado a cabo por Chininin J, Cisneros C. (2018)⁷, quienes evaluaron el efecto antibacteriano *In Vitro* del látex de *Croton lechleri* "Sangre de Grado" frente a *Staphylococcus aureus*. Obtuvieron que el tratamiento con látex de *Croton lechleri* al 100% es el que reporta

el mayor promedio de inhibición frente a *Staphylococcus aureus*, con un halo de 15,33 mm; lo que representa un efecto antibacteriano *In Vitro* del 54,75 %.

Además, los resultados del mencionado estudio, guardan relación con el trabajo titulado actividad antibacteriana de *Croton roxburghii* Balak., contra patógenos entéricos, en el cual, Panda *et al.* (2010)⁵⁸, observaron que el extracto etanólico de *Croton roxburghii* (corteza y hoja) exhibió actividad antibacteriana contra todas las cepas de referencia *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* y *Vibrio cholerae*. El extracto acuoso (corteza y hoja) no mostró actividad contra *Salmonella* Typhimurium. La mayor actividad antibacteriana se observó contra *S. aureus* (corteza 18 mm y hoja 16 mm) a partir del extracto etanólico, el extracto acuoso (corteza 10 mm y hoja 11 mm), seguido de *E. coli* enteropatógena (corteza 16 mm y hoja 14 mm) del extracto etanólico, el extracto acuoso (corteza 13 mm y hoja 14 mm) y *E. coli* enterotoxigénica (corteza 18 mm y hoja 15 mm) del extracto etanólico, el extracto acuoso (corteza 12 mm y hoja 14 mm). La inhibición del crecimiento de las bacterias de prueba varió de 625 µg/mL a 156 µg/mL. El valor de CIM, registrado más bajo fue contra *S. aureus* a 156 µg/mL (extracto etanólico de la corteza). El extracto disolvente (etanol) tiene una actividad antibacteriana muy pronunciada en comparación con el extracto acuoso, esto podría justificar el uso tradicional de esta planta en la disentería y otras infecciones.

No obstante, las investigaciones realizadas tanto por García J, Alvarenga N. (2019)⁸ como por Valdez V, Morales E. (2019)⁹; muestran diferencias en la inhibición de las cepas con respecto al presente estudio con el extracto en metanol de *C. leptostachyus*, que reveló alta susceptibilidad bacteriana contra *S. aureus*, entre las cepas están *P. aeruginosa* para el primero, en el que los alcaloides crotosparina y esparsiflorina producen una importante disminución de los valores de CIM de los fármacos antibacterianos, Gentamicina[®] (0,125 µg) con crotosparina (250 µg/mL) con un efecto sinérgico y Ciprofloxacina[®] (0,0625 µg) con esparsiflorina (1000 µg/mL) con un efecto aditivo frente a dicha bacteria, indicando que los alcaloides aumentan

la susceptibilidad del microorganismo a los fármacos antibacterianos y *E. coli* para el segundo, con un halo de inhibición de 8 mm y una CMI de 200 mg/mL.

Así también, el trabajo llevado a cabo por Obey *et al.* (2016)⁶, difiere en la actividad antibacteriana manifestada en la presente investigación. Estos autores, determinaron la actividad antimicrobiana de extractos de corteza de tallo de *Croton macrostachyus* contra bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter aerogenes*), Gram positivas (*Listeria monocytogenes*) y un hongo (*Candida albicans*). El extracto de acetato de etilo (EtOAc) mostró actividad antimicrobiana contra todos los patógenos estudiados *Salmonella Typhi* (16,0 ± 1,2 mm), *E. coli* (12,2 ± 1,6 mm), *K. pneumoniae* (10,7 ± 1,0 mm), *E. aerogenes* (10,1 ± 0,6 mm) y *L. monocytogenes* (11,7 ± 1,3 mm) con actividad más débil contra *C. albicans* (5,6 ± 1,0 mm). En este mismo extracto, obtuvieron una CIM en el rango de 250 mg/mL a 125 mg/mL contra todas las bacterias estudiadas y contra *C. albicans* (CIM de 500 mg/mL). En el extracto de butanol, encontraron una CIM de 250 mg/mL contra *E. coli* y *Salmonella Typhi*, 500 mg/mL contra *K. pneumoniae* y *E. aerogenes*.

Tales diferencias, pueden deberse a que los compuestos y las concentraciones de los mismos cambian dependiendo del género, especie, estado fenológico, situaciones de estrés y localización geográfica de la planta; además de la técnica utilizada para la extracción y concentración de metabolitos secundarios.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- En el estudio de sensibilidad *In Vitro*, el extracto metanólico de *Croton leptostachyus*, mostró efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la bacteria Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) una CIM de 100 mg/mL. Ya que, esta bacteria es una de la principal responsable en las infecciones a nivel intrahospitalario, lugar en el que se han encontrado cepas de tipo SARM (*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina), se podría considerar el mencionado extracto como una alternativa terapéutica en el tratamiento de dichas infecciones.

- En contraparte, el extracto no presentó actividad antibacteriana contra la bacteria Gram positiva (*Enterococcus faecalis*) y las bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*).
- Es importante resaltar, que el trabajo en estudio reveló susceptibilidad bacteriana contra *Staphylococcus aureus*, con un halo de inhibición de 26 mm (CIM: 100 mg/mL), mientras que la investigación realizada por Chininin y Cisneros, mostró un halo de inhibición menor de 15,33 mm (concentración del látex de *Crotón lechleri* al 100%).
- Así como, el trabajo de Panda *et al*, presentó actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (16 mm) con una CIM más baja (156 µg/mL) y también frente a *Escherichia coli* enteropatógena (14 mm), *Escherichia coli* enterotoxigénica (15 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (13 mm), *Shigella flexneri* (13 mm), *Shigella sonnei* (15 mm) y *Vibrio cholerae* (14 mm); entretanto que el trabajo desarrollado solo presentó inhibición contra *S. aureus*, pero con un halo de inhibición más marcado (26 mm de diámetro y CIM 100 mg/mL).
- Por otro lado, los trabajos elaborados por, García J, Alvarenga N y Obey *et al*, no mostraron actividad contra *Staphylococcus aureus* sin embargo, presentaron actividad frente a *P. aeruginosa* en el primero y en bacterias Gram positivas (*Listeria monocytogenes*), Gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella Typhi*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter aerogenes*) y un hongo (*Candida albicans*), para el segundo con una CIM en el rango de 250 mg/mL a 125 mg/mL.
- Los resultados indican que el extracto metanólico de *Crotón leptostachyus*, contiene metabolitos con potencial actividad antibacteriana; abriendo así la posibilidad de ser utilizado como un fitofármaco capaz de actuar frente a bacterias de importancia sanitaria.

RECOMENDACIONES

- Basados en los resultados positivos de esta investigación, evaluar la actividad antibacteriana *In Vivo*, para obtener un amplio espectro a cerca su potencial, a fin que este extracto pueda ser desarrollado como un fitofármaco comercial.
- Realizar tamizaje fitoquímico de *Croton leptostachyus* para corroborar la presencia de metabolitos secundarios.
- Realizar el aislamiento de metabolitos secundarios de *Croton leptostachyus* mediante técnicas cromatográficas como cromatografía en columna (CC), cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS) e identificar los metabolitos aislados haciendo uso de métodos espectroscópicos de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas (E.M), infrarrojo (I.R) y ultravioleta (U.V.), para descubrir cuál o cuáles son los responsables de la actividad antibacteriana.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Monroy M, Prieto F. Determinación de la composición química y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial obtenido de *Allium savillum*. [Tesis de pregrado]. Mérida; Venezuela: Universidad de Los Andes; 2015.
2. Koneman E, Allen S, Yanda W, Scherchenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. 5a ed. Buenos Aires-Argentina: Panamericana; 2001.
3. Pardo D, Ortíz L, Tacha A, Murillo E, Méndez J, Murillo W. Estudio químico y etnobotánico de *Croton leptostachyus*. Revista de la Academia Colombiana de la Ciencia 2014; 38 (149), 356-363.
4. García G, Pérez E. Metabolismo secundario de plantas. REDUCA 2009; 2 (3): 119-145.
5. Chaquisbol N, Lengua L, Dolores I, Bazán R, Bravo M. Alimentos funcionales fitoquímicos, clasificación e importancia. Rev.Per,Quim. Ing.Quim 2003; 5(2). 9-20.
6. Obey J, Wright A, Orjala J, Kauhanen J, Tikkanen-Kaukanen C. Antimicrobial Activity of *Croton macrostachyus* Stem Bark Extracts against Several Human Pathogenic Bacteria. Journal of Pathogens. 2016. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4879225/>
7. Chinin J, Cisneros C. Evaluación del efecto antibacteriano *In Vitro* del látex de *Croton lechleri* "sangre de grado" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. 2018; 9(1): 129-136. Disponible en: <http://revista.usanpedro.edu.pe/index.php/CPD/article/view/302/290>
8. García J, Alvarenga N. Actividad sinérgica in vitro de los alcaloides crotosparina y esparsiflorina aislados de *Croton bomplandianum* frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Mem. Inst Investig Cienc Salud. 2019; 17(1): 47-53. Disponible en: <http://scielo.iics.una.py/pdf/iics/v17n1/1812-9528-iics-17-01-47.pdf>
9. Valdez V, Morales A. Actividad antibacteriana y antioxidante de los extractos de *Hibiscus escobariae* fryxell, *Loxopterygium huasango* R. Spruce y *Croton ferrugineus* Kunth. [Tesis de pregrado]. Universidad de Guayaquil; 2019.
10. Hurtado J. El proyecto de la investigación. 7ª ed. Caracas: FEDUPEL; 2010.
11. Echeverría, J. Resistencia bacteriana. Revista Médica Herediana. 1998; 9(2), 53.
12. Carrera C, Gómez R, Zúñiga A. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. Colombia Médica 2007; 38 (2), 149-158.

13. Pérez Y. Aislamiento, caracterización y actividad biológica de metabolitos secundarios de *Croton elegans* Kunth. [Trabajo de Investigación]. Ecuador: Universidad Técnica Particular de Loja; 2014.
14. Hernández R, Fernández C, Batista L. Metodología de la Investigación. 5a ed. México: Mc Graw Hill; 2010.
15. Webster G, Del Arco-Aguilar M, Smith B. Systematic distribution of foliar trichome types in *Croton* (Euphorbiaceae). Botanical Journal of the Linnean Society 1996; 121: 41-57.
16. Murillo J. Las Euphorbiaceae de Colombia. Biota Colombiana 2004; 5 (2), 183-200.
17. Queiroz M, Queiroz F, Zeraik M, Marti G, Favre-Godal Q, Simões-Pires C. Antifungals and 88 acetyl cholinesterase inhibitors from the stem bark of *Croton heliotropiifolius*. Phytochemistry Letters 2014; 10, 38-43.
18. Gordillo M, Matías S. Tricómas foliares de *Croton* sección Barhamia (Euphorbiaceae). Acta Botánica Mexicana 2005; (72), 39-51.
19. Berry P, Hipp A, Wurdack K, B.W. Van E, Riina, R. Molecular phylogenetics of the giant genus *Croton* and tribe Crotonese (Euphorbiaceae sensu stricto) using ITS and trnL-trnF DNA sequence data. American Journal of Botany 2005; 92: 1520-1534.
20. Lujan M, León Y, Riina R. Sinopsis de *Croton* (EUPHORBIACEAE) en Los andes de Mérida, Venezuela. Revistas.unal.edu.co 2015; 37 (1): 1. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/cal/article/view/50815/53325>
21. Riina R, D. Carneiro-Torres J, Peirson P, Berry I, Cordeiro I. Further support for the Crotonese phylogeny: A new species of *Brasilia croton* (Euphorbiaceae) based on morphological, geographical, and molecular evidence. Systematic Botany 2014; 39: 227-234.
22. Martínez M, Espinoza I. Tricomas foliares de *Croton* Sección Barhamia. Acta Botanica Mexicana 2005; 72: 39-51.
23. Govaerts R, Frodin A, Radcliffe-Smith. World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae. Royal Botanic Gardens, Kew 2000; 4: 189.
24. Berry P, Riina R. *Croton* - Euphorbiaceae. En: Hokche O, Berry P, Huber, O (eds). Nuevo Catálogo de la Flora Vasculare de Venezuela. Fundación Instituto Botánico de Venezuela, Caracas. 2008; 366-379.
25. Ormeño E, Fernández C. Los terpenos de las plantas. 2012. Disponible en: <http://www.thcterapeutico.com/wp-content/uploads/2013/05/terpenos.pdf>

26. Martínez S, González J, Culebras J, Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Departamento de Fisiología. España: Universidad de León y Hospital de León; 2002.
27. Arango G. Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. [Trabajo en línea]. Facultad de Química Farmacéutica. Colombia: Universidad de Antioquia; 2008. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/alcaloides.pdf>
28. Pieters I, De Bruyne, Claeys M, Vlietinck J. Isolation of the dihydrobenzofuran lignan from the South American dragon's blood (*Croton* sp.) as an inhibitor of cell proliferation. *J nat prod* 1993; 56(6): 899-906.
29. Medina J. Guía de antimicrobianos y tratamiento de las infecciones. Madrid: Ediciones Días de Dos Santos; 2000.
30. Pardo J. Patentabilidad de los extractos vegetales. 2002.
31. González A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. [Trabajo de Investigación]. Universidad Nacional de Colombia; 2004. Disponible: <http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreaonzalezvilla.2004.pdf>
32. Murray P.R, Rosenthal K.S, Pfaller M.A. Microbiología médica. Madrid: Editorial Elsevier Mosby; 2009.
33. Serrano C, Gutiérrez R. Manual de microbiología. Chile: Ediciones Universidad Católica de Chile; 2018.
34. Gama M. Biología un enfoque constructivista. México: Editorial Pearson Educación; 2017.
35. Montoya H. Microbiología Básica para áreas de la salud y afines. Universidad de Antioquia, Medellín: Colombia; 2008.
36. Tortora G.J, Funke B.R, Case C.L. Introducción a la Microbiología. 9° edición. Buenos Aires-Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2007.
37. Canelo L.Y. Actividad antimicrobiana y antimicótica de los extractos de cinco especies de plantas del género *Vernonia*. [Trabajo de investigación]. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala; 2012.
38. Armijo J, Silva N. Presencia de *Enterococcus faecalis* en dientes con diagnóstico de periodontitis apical asintomática. [Trabajo de investigación]. Universidad de Chile, Chile; 2011.
39. Romero R. Microbiología y parasitología humana. (1ra. Ed.). España: Médica Panamericana 2007; 18-21.

40. Quintero A, Nieto J, Lerma C. Infección en cirugía. Bogotá: Editorial Médica Panamericana; 2001.
41. Plasencia M. Manual de prácticas tuteladas en oficina farmacia. España: Editorial Complutense; 2003.
42. Forbes B.A, Sahm D.F, Weissfeld A.S. Diagnóstico Microbiológico. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2009.
43. Rodríguez E, Gamboa M, Hernández F, García J. Bacteriología General: principios y prácticas de laboratorio. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica; 2005.
44. Ramírez L.S, Castaño D.M. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. [Trabajo de investigación]. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia; 2009.
45. Domínguez M, Galiana J, Pérez F. Manual de cirugía menor. Madrid: Editorial Arán Ediciones; 2002.
46. Ramírez A, García E, Longa A, Sánchez K, Nieves M, Velasco J, Araque M, Mosqueda N. Manual práctico de bacteriología general. Mérida: Publicaciones Vicerrectorado; 2010.
47. Porres O, Ruiz E. Microbiología clínica. España; Ediciones Paraninfo; 2018.
48. Negroni M. Microbiología estomatológica. Buenos aires: Ediciones Médica Panamericana; 2009.
49. Palella S, Martins F. Metodología de la Investigación Cuantitativa. 2ª ed. Caracas: FEDUPEL; 2010.
50. Adams, R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry 6^{ta} ed. Carol Stream^[UdW1] IL, USA: Allured Publishing Corporation. 2007.
51. Buitrago^[UdW2] A, Rojas J, Rojas L, Peñaloza Y. *In Vitro* antioxidant activity and qualitative phytochemical analysis of two *Vismia* (Hypericaceae) species collected in Los Andes, Venezuela. Revista de Biología Tropical. 2016; 6(4): 1431-1439.
52. CLSI^[UdW3]. (Estados Unidos). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 28th Edition. [Wayne, PA]: Clinical and Laboratory Standards Institute. Disponible en: https://www.clsi.org/media/1930/m100ed28_sample
53. ^aSalas F, Velasco J, Rojas J, Morales A. Antibacterial activity of the crude extract and constituents of *Vismia baccifera* var. *dealbata* (Guttiferae) collected in Venezuela. Natural Product Communications. 2007; 2(2): 185-188.

54. ^bSalas F, Ciangherotti C, Salazar-Bookaman M, Rojas J, Morales A. Toxicidad aguda y actividad analgésica del extracto acuoso de hojas de *Vismia baccifera* L., var. *dealbata* (Guttiferae) en animales de experimentación. Revista de la Facultad de Farmacia. 2007; 49(1): 5-9^[UdW4].
55. Wink^[UdW5] M. Bioprospecting: The search for bioactive lead structures from nature. En K. Kayser & Q. Quax Eds. Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application. Weinheim, Alemania: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. K. 2007. 97-116
56. Velasco^[UdW6] J, Contretas E, Buitriago D, Velazco E. Efecto antibacteriano de *Viola sebifera* sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Ciencia. 2005; 13: 411- 415.
57. Valle D, Andrade J, Puzon J, Cabrera E, Rivera W. Antibacterial activities of ethanol extracts of Philippine medicinal plants against multidrug-resistant bacteria. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2015; 5(7): 532-540.
58. Panda SK, Dutta SK, Bastia AK. Antibacterial activity of *Croton roxburghii* Balak., against the enteric pathogens. Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research. 2010; 1(4): 419-422

www.bdigital.ula.ve