



**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES**



**“DR. ALFREDO NICOLAS USUBILLAGA DEL HIERRO”**

**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD  
BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS DE LAS PARTES AÉREAS DE  
*Physalis peruviana* L. (SOLANACEAE)**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar  
al título de Licenciado en Bioanálisis**

**Tesista:  
Carlos Contreras  
C.I: V- 19.997.180  
Tutora:  
Dra. Marielba Morillo**

**Mérida, 08 de agosto de 2019**

## DEDICATORIA

A Dios, por ser el inspirador y darme fuerzas para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A mi madre Carmen Rosa, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ti he logrado llegar hasta aquí, por el apoyo ilimitado e incondicional que siempre me has dado, por tener la fortaleza de salir adelante sin importar los obstáculos, por creer y confiar en mí, no hay palabras en este mundo para agradecerte. Ha sido el orgullo y el privilegio de ser tu hijo, eres la mejor madre del mundo.

A mi Padre Carlos Alberto, por ser mi mejor amigo, consejero y ejemplo a seguir. Esta tesis y todo lo que logre hacer será gracias a tus valores inculcados en mí, Con amor, tu hijo.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

A mis hermanos por estar siempre presentes, acompañándonos y por el apoyo moral, que me brindaron a lo largo de esta etapa de nuestras vidas.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios Todo Poderoso por estar siempre a nuestro lado guiándonos en todo momento.

A la Ilustre Universidad de los Andes, por permitirme cumplir esta meta y estar aun en pie formando los profesionales de hoy.

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro” por abrirme las puertas y con la mejor disposición de prestar su colaboración para el desarrollo de esta investigación.

A la profesora Marielba Morillo, quiero agradecer de manera muy especial por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección y que desde el primer momento me brindó su amistad, su bondad, apoyo, paciencia y confianza.

A los profesores Luis Rojas y Alida Pérez por toda su colaboración prestada y buena disposición.

A los profesores: Vanessa Hernández, Tomas Visbal, María Eugenia Rondon y Claudia Plaza por todas sus contribuciones.

Al Laboratorio de Vacunas del Departamento de Microbiología y Parasitología, al Laboratorio de Farmacognosia y al Laboratorio de Ciencia de los Alimentos, por toda su colaboración prestada que fue clave y fundamental para el desarrollo de esta investigación

A mis padres, porque creyeron en mí y porque me sacaron adelante, dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada mi meta.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE ESQUEMA	xiv
ÍNDICE DE GRAFICOS	xv
RESUMEN	xvi
INTRODUCCIÓN	1
<b>CAPITULO I. EL PROBLEMA</b>	<b>3</b>
Planteamiento del problema	3
Justificación e importancia de la investigación	4
Objetivos de la investigación	6
Objetivo general	6
Objetivo específicos	6
Alcances y limitaciones de la investigación	6
<b>CAPITULO II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>8</b>
Trabajos previos	8
Antecedentes históricos o epistemológicos	11
Bases teóricas	13

Generalidades de la familia	13
Propiedades farmacológicas	13
Composición química	15
Generalidades del género <i>Physalis</i>	18
Usos en la medicina tradicional.	18
Composición química	19
Especie <i>Physalis peruviana</i> L.	20
Generalidades de la especie	20
Taxonomía	21
Descripción botánica de la especie.	22
Hábitat.	22
Uso etnobotánico y ancestral.	23
Composición química	24
Producto natural	29
Metabolito secundario presentes en las plantas	30
Extractos Vegetales	36
Consistencia de los extractos.	36
Obtención de los extractos vegetales.	37
Características generales de los extractos	39
Aplicaciones de los extractos vegetales	40
Extractos metanólicos	40
Tamizaje fitoquímico	41
Actividad Antibacteriana	43

Bacterias	44
Estructura bacteriana.	44
Mecanismos de resistencia bacteriana.	46
Resistencia natural	46
Resistencia adquirida	47
Antibióticos	50
Antibióticos según su mecanismo de acción.	50
Antibióticos según su composición química	51
Métodos Para la Determinación de Actividad Antibacteriana	54
Método de difusión en pozos	55
Método de dilución en caldo	55
Bioautografía	55
Actividad Antioxidante	55
Radicales Libres	57
Clasificación de los radicales libres.	57
Método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)	58
Reacción de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)	60
Toxicidad sobre <i>Artemia salina</i> .	60
Taxonomía	61
Definición de operacional términos	63
Operacionalización de la variables	65
Hipótesis	67
<b>CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO</b>	<b>68</b>

Tipo de investigación	68
Diseño de la Investigación	68
Población y muestra	69
Unidad de investigación	69
Selección del tamaño de la muestra	69
Sistema de variables	69
Instrumento de recolección de datos	70
Procedimiento de la investigación	70
Material vegetal	70
Obtención de los Extractos	71
Tamizaje Fitoquímico.	73
Evaluación de la actividad antibacteriana	75
Técnica difusión en pozos (Método Kirby Bauer modificado)	77
Evaluación de la Actividad Antioxidante por el Método DPPH	80
Evaluación de la toxicidad sobre nauplios de <i>Artemia salina</i>	83
Reactivos y Estándares	85
Ensayo de toxicidad general	85
Eclosión de los quistes	86
Realización de la prueba.	86
<b>CAPITULO IV. RESULTADO Y DISCUSION</b>	89
Estudio fitoquímico de los extractos metanólicos de las partes aéreas de <i>P. peruviana</i> L.	89
Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de las partes aéreas de	92

*Physalis peruviana* L.

Actividad antioxidante del extracto metanólico de las hojas de *Physalis peruviana* L. 95

Determinación de toxicidad de los extractos metanólicos de las partes aéreas de 102

*Physalis peruviana* L.

**CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES** 105

Conclusiones 105

Referencia Bibliográficas 106

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1 Nombres comunes de <i>Physalis peruviana</i> L.	21
Tabla 2 Actividad biológica reportadas para cada órgano de <i>Physalis peruviana</i> L.	23
Tabla 3 Compuestos químicos aislados de <i>Physalis peruviana</i> L., entre 1930 y 1990	24
Tabla 4 Compuestos químicos aislados de <i>Physalis peruviana</i> L., entre 1991 y 2010	25
Tabla 5 Esqueletos básicos de witaesteroides	27
Tabla 6 Características generales y enfermedades producidas por las bacterias estudiadas.	46
Tabla 7 Mecanismo de actividad antioxidante	57
Tabla 8 Operacionalización de las variables.	66
Tabla 9 Cepas utilizadas para la realizar las pruebas de sensibilidad y susceptibilidad.	77
Tabla 10 Diluciones para preparar la solución madre de concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$	82
Tabla 11 Diluciones empleadas para realizar la curva patrón de ácido ascórbico	83
Tabla 12 Preparación del agua de mar artificial, usada en el cultivo y eclosión de los quistes del crustáceo <i>Artemia salina</i> .	85
Tabla 13 Clasificación de toxicidad según el CYTED	88
Tabla 14 Estudio fitoquímico de los extractos metanólicos de las partes aéreas de	89

*Physalis peruviana* L.

Tabla 15	Potencial antibacteriano de los extractos metanólicos de las partes aéreas de <i>Physalis peruviana</i> L.	92
Tabla 16	Determinación del potencial antioxidante de los extractos metanólicos de las hojas, tallos y frutos de <i>Physalis peruviana</i> L.	95
Tabla 17	Actividad antioxidante del extracto metanólico de las hojas de <i>Physalis peruviana</i> L.	96
Tabla 18	Datos estadísticos de la actividad antioxidante (% de inhibición) a través del método DPPH, del extracto metanólico de las hojas de <i>P. peruviana</i> L.	101
Tabla 19	Análisis de varianza de la actividad antioxidante (% de inhibición) a través del método DPPH del extracto metanólico de las hojas de <i>P. peruviana</i> L.	101
Tabla 20	Cuantificación de la DL <sub>50</sub> de los extractos metanólicos de las partes aéreas de <i>Physalis peruviana</i> L., y los controles sobre <i>Artemia salina</i> .	102

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1 Estructura química de ixocarpalactona (Ixo A) presente en la familia Solanaceae.	16
Figura 2 Estructura química de algunos compuestos químicos presentes en la familia Solanaceae.	17
Figura 3 Estructura química del Ergostano, presente en el género <i>Physalis</i> .	19
Figura 4 Planta de <i>Physalis peruviana</i> L.	20
Figura 5 Compuestos químicos presentes en <i>P. peruviana</i> L.	25
Figura 6 Estructura química de algunos compuestos presentes en el fruto de <i>Physalis peruviana</i> L.	28
Figura 7 Estructura química de compuestos que poseen actividad antioxidante.	29
Figura 8 Estructura química de los flavonoides.	30
Figura 9 Estructura química de los Triterpenos.	31
Figura 10 Estructura química de las saponinas.	32
Figura 11 Estructura química del Fenol.	32
Figura 12 Estructura química de la cumarinas.	33
Figura 13 Estructura química de los alcaloides.	34
Figura 14 Estructura química de los aldehídos.	34
Figura 15 Estructura química de las quinonas.	35
Figura 16 Estructura química de los taninos.	35
Figura 17 Estructura bacteriana de Gram positivas y Gram negativas.	45
Figura 18 Mecanismo de acción de los antibióticos	49

Figura 19	Mecanismo de resistencia de las bacterias a los antibióticos.	51
Figura 20	Estructura química del radical libre metaestable DPPH	59
Figura 21	Reacción química entre el radical DPPH y la especie antioxidante.	60
Figura 22	Voucher depositado en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes.	70
Figura 23	Balanza	72
Figura 24	Preparación del agar <i>Mueller Hinton</i>	78
Figura 25	Inoculación y preparación de las placas de Petri	79
Figura 26	Incubadora	79
Figura 27	Espectrofotómetro Genesys 10 Bio Thermo Electron Corporation	82
Figura 28	Preparación de las diluciones de la solución madre	82
Figura 29	Placas de microtitulación de 96 pozos y Depósito de larvas	87
Figura 30	Registro del número de nauplios vivos y muertos	88
Figura 31	Resultados obtenidos en el análisis fitoquímico preliminar	90
Figura 32	Pruebas de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de <i>P. peruviana</i> L.	93

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Pág.
Esquema 1 Pasos para la obtención de los extractos.	71
Esquema 2 Pasos para el Método de Difusión en Pozo.	76
Esquema 3 Pasos para el Método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo).	81
Esquema 4 Pasos para determinar la toxicidad sobre nauplios de <i>Artemia salina</i>	84

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfico 1 Porcentaje (%) de inhibición del extracto metanólico de las hojas de <i>P. peruviana</i> L.	102
Gráfico 2 Concentración eficiente 50 (mg/mL) del extracto metanólico de las hojas de <i>P. peruviana</i> L.	103
Gráfico 3 Porcentaje (%) de Letalidad de los extractos metanólicos de las partes aéreas de <i>Physalis peruviana</i> L., sobre <i>Artemia salina</i> a las concentraciones probadas en unidades de ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ).	108

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
“DR. ALFREDO NICOLAS USUBILLAGA DEL HIERRO”



**ESTUDIO FITOQUÍMICO Y DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD  
BIOLOGICA DE LOS EXTRACTOS DE LAS PARTES AÉREAS DE *Physalis  
peruviana* L. (SOLANACEAE)**

**Mérida – Venezuela**

**Trabajo de Grado**

**Realizado por:**

**Br. Carlos A. Contreras O.**

**Tutora: Dra. Marielba Morillo**

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

**RESUMEN**

A partir de *Physalis peruviana* L., perteneciente a la familia Solanaceae, se obtuvieron los extractos metanólicos de las hojas, tallos y frutos; se determinó su composición química a través de tamizaje fitoquímico y la actividad biológica de los mismos. En cuanto a la composición química en los extractos de hojas y tallos, se evidenció la presencia de alcaloides, fenoles y esteroides y en el de los frutos solamente esteroides. No se observó actividad frente a *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Echerichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (método de difusión en pozo). Solo el extracto metanólico de las hojas mostró un porcentaje de inhibición del radical DPPH de 26,9 en comparación de 96,1 del ácido ascórbico, y el IC<sub>50</sub> fue 1,15 mg/mL. La evaluación de la toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*, arrojó que los extractos metanólicos de hojas son relativamente inocuos, de los frutos inocuos, mientras que de tallos son moderadamente tóxico según el CYTED.

Palabras clave: *Physalis peruviana*, actividad antioxidantes, antibacteriana, *Artemia salina*.

## Introducción

Las Solanaceas son una familia de plantas herbáceas o leñosas con hojas alternas, simple y sin estipulas pertenecientes al orden Solanales. Se encuentra distribuida en diferentes hábitats y con morfología muy variada. La familia se distribuye por casi todo el planeta con la excepción de la Antártida. La mayor diversidad de especies se ha registrado en América del Sur y América Central. La importancia de estas plantas tiene lugar en la medicina popular, son frecuentemente utilizadas por personas que tienen problemas de salud y que en algún momento hacen uso de ellas (Magaña y Burelo, 2010)

*Physalis peruviana* L., es conocida como uchuva en Colombia, uvilla en Ecuador, aguaymanto en Perú y topo-topo en Venezuela. Es un cultivo herbáceo originario de la región andina y utilizado fundamentalmente por sus frutos comestibles, los cuales corresponden a una baya jugosa, redondeada, habitualmente de color amarillo y de intenso sabor (aproximadamente entre 1,25 y 2 cm de diámetro), esta fruta crece dentro de un cáliz que lo protege contra insectos, aves, patógenos y condiciones climáticas extremas. La uchuva es considerada una fruta exótica y es ampliamente conocida por sus propiedades fisicoquímicas, nutricionales y medicinales (Franco, Matiaz, Pajaro y Gómez, 2013).

Los extractos de las hojas de *Physalis peruviana* L., han mostrado importantes actividades antibióticas, antioxidantes y antiinflamatorias. Los estudios fitoquímicos de este género han demostrado la presencia de esteroides, alcaloides, glicósidos y flavonoides (Franco y col., 2013).

Los extractos de *Physalis peruviana* L., son de gran importancia para contribuir con el desarrollo de nuevos fármacos, que permitan disminuir los cuadros infecciosos que surgen

día a día por las bacterias, virus, hongos y protozoos, debido a que estos presentan mecanismos defensivos que evaden los efectos de los antibióticos ya existentes, esto ha provocado un problema de consecuencias impredecibles. En tal sentido, se tiene previsto la búsqueda de nuevas estrategias que permitan elaborar fármacos de origen natural (plantas medicinales), para que sea un importante punto de partida en el desarrollo y elaboración de nuevos antibióticos (Franco y col., 2013).

El objetivo de este trabajo es determinar la composición química y actividad biológica de los extractos metanólicos de hojas, tallos y frutos de *Physalis peruviana* L. El mismo estará estructurado por cinco capítulos. El primero titulado el problema de la investigación, esta subtítulo de la siguiente manera: planteamiento del problema, justificación de la investigación, objetivos de la investigación, alcances de la investigación, limitaciones de la investigación. El segundo capítulo titulado marco teórico, esta subtítulo de la siguiente manera: trabajos previos, antecedentes históricos, bases teóricas, sistema de hipótesis, operacionalización de las variables y definición de términos. El tercer capítulo titulado marco metodológico, esta subtítulo de la siguiente manera: tipo de investigación, diseño de la investigación, población y muestra, sistema de variables, instrumento de recolección de datos y diseño de análisis. El cuarto capítulo resultados y discusiones y el quinto capítulo conclusiones y recomendaciones.

## CAPITULO I

### EL PROBLEMA DE LA INVESTIGACION

#### Planteamiento del Problema

Las enfermedades infecciosas son consideradas un problema de salud pública debido a que son causa importante de mortalidad alrededor del mundo por el fenómeno de la resistencia bacteriana, sobre todo en el ambiente hospitalario, donde el uso continuo de fármacos antibacterianos ha favorecido la selección de cepas menos sensibles o de cepas portadoras de resistencia contra uno o más antibióticos (Egwaikhide, Okeniyi y Gimba, 2009).

Se estima que el 80 % de la población mundial usa la medicina tradicional para cubrir sus necesidades primarias de salud, diversas enfermedades infecciosas han sido tratadas con remedios herbolarios. Por este motivo la Organización Mundial de la Salud (OMS) promueve la búsqueda constante de nuevos antibióticos que contrarresten la resistencia de los microorganismos ya existentes y los reemergentes, por lo que se ha incrementado el interés de las plantas medicinales debido a que contienen una gran cantidad de principios activos que pueden ser útiles en el desarrollo de antibióticos (Egwaikhide y col., 2009).

En las últimas décadas se ha incrementado el interés por los productos naturales y sus posibles aplicaciones en la industria farmacéutica en búsqueda de nuevos medicamentos más seguros y eficaces, aproximadamente el 30 % de los fármacos empleados en los países industrializados proceden o se han sintetizado a partir de producto vegetales, por lo que los extractos de plantas son una fuente atractiva de nuevos medicamentos (Egwaikhide y col, 2009).

Las enfermedades infecciosas actualmente son difíciles de tratar ya que muchas bacterias se han vuelto resistentes a una gran variedad de antibióticos debido al uso excesivo de los mismos, así como también la automedicación, el uso de los antibióticos como aditivos en la alimentación del ganado para aumentar el engorde e incluso la incorporación de antibióticos a las soluciones limpiadoras empleadas en el hogar (Cespedes, Avila, Martínez, Calderón y Salgado, 2006).

Debido a esta multiresistencia que han desarrollado muchos de los microorganismos, se ha tratado de crear nuevos antibióticos que puedan destruirlos, es aquí donde se hace importante estudiar la composición química del extracto de *Physalis peruviana* L., ya que puede tener algún efecto antibacteriano. En este caso ya se han realizados estudios que confirman que este tipo de planta presenta dicho efecto contra agentes causantes de infecciones (Cespedes y col., 2006).

Una vez planteada la situación actual del problema de investigación, puede formularse a través de la siguiente pregunta: ¿Cuál es la relación que existe entre los componentes químicos del extracto de *Physalis peruviana* L., y su actividad antioxidante, antibacteriana y toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*?

### **Justificación de la Investigación**

La era de los antibióticos marco un gran paso para la humanidad, la vida de millones fue salvada gracias a este descubrimiento, no obstante, debido al uso excesivo de estos medicamentos puede ser el fin de la medicina moderna tal y como la conocemos. Las bacterias en su lucha por sobrevivir han creado mecanismos de defensa cada vez más difíciles de combatir y las armas contra enfermedades infecciosas se agotan. En vista de

esta problemática en varios países se han tomado medidas de control donde se ha limitado la venta de antibióticos y solo las personas con prescripción médica pueden adquirirlos, así como también la restricción del uso para el alimento de animales (Samiul, Nachiketa, Sayeed,. Masnoon y Mohammad 2016).

Sin embargo, se necesitan otras opciones en cuanto al tratamiento de infecciones bacterianas pero muchos laboratorios farmacéuticos se mantienen al margen ya que en materia económica fabricar medicamentos que se usen de por vida es más rentable que los que proporcionen una cura definitiva (Samiul y col., 2016).

Debido a que cada vez son más las bacterias que desarrollan resistencia a los antibióticos, se hace más difícil tratar y por supuesto curar una enfermedad de origen infeccioso. Es por esto que es importante buscar unas fuentes bactericidas o que controlen a estos microorganismos con el fin de mejorar la calidad de vida de los seres humanos, plantas e incluso animales (Samiul y col., 2016).

Este proyecto de investigación persigue como objetivo principal, confirmar si los componentes químicos de los extractos de *Physalis peruviana* L., son capaces de inhibir el crecimiento de cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas mediante pruebas experimentales. Para así dar a conocer una sustancia que pueda ser usada como terapia contra enfermedades de origen infeccioso. Además de determinar el potencial antioxidante y evaluar la toxicidad sobre *A. salina*, de los metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos de tallos, hojas y frutos.

## Objetivos de la Investigación

### Objetivo General

Determinar la composición química y actividad biológica de los extractos metanólicos de hojas, tallos y frutos de *Physalis peruviana* L.

### Objetivos específicos

- Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios que forman parte de los extractos metanólicos de *Physalis peruviana* L., a través de tamizaje fitoquímico.
- Valorar la actividad antibacteriana que presentan los extractos de *Physalis peruviana* L., frente a las bacterias Gram positivas y Gram negativas de referencia internacional.
- Evaluar la actividad antioxidante de los componentes químicos presentes en los extractos de hojas, tallos y frutos de *Physalis peruviana* L., a través del método DPPH.
- Comprobar la toxicidad frente a nauplios de *Artemia salina*, que presentan los extractos metanólicos de las partes aéreas *Physalis peruviana* L.

### Alcances y Limitaciones de la Investigación

Con relación a los alcances de una investigación, Hernández, Fernández y Baptista (2006), refirieron que están vinculados con la profundidad del estudio, es decir, con lo que realmente se quiere conocer con la investigación. También, hacen mención a que dicho alcance se relaciona con el grado de elaboración del proceso de conocer un fenómeno. En tal sentido, esta investigación tendrá un alcance confirmatorio, pues se verificará la

actividad antioxidante, antibacteriana y toxicidad de los componentes químicos presentes en los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L.

Respecto a las limitaciones, éstas son una serie de factores externos que impiden el eventual y correcto desarrollo de la investigación (Hernández y col., 2006). Por lo tanto, las posibles limitaciones de la investigación podrían ser: las condiciones del laboratorio al trabajar con equipos para toma de datos deben regularse para mantener y garantizar la conservación de patrones y estabilidad en la calibración de los quipos, para que los datos que se tomen expresen de manera fiable y permita conocer mejor las condiciones reales del proceso y así obtener resultados más precisos, también se puede mencionar la falta de reactivos, escasos recursos financieros, fallas en el suministro de electricidad y daño de algún equipo necesario para finalizar la tesis con éxito.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Trabajo Previos

Barrientos y col. (2018), estudiaron el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de *Physalis chenopodifolia* L., silvestre y en cultivo. El objetivo fue determinar la presencia de fenoles y flavonoides tanto en hojas como en frutos y evaluar la actividad antioxidante. El método utilizado fue el DPPH, la actividad antioxidante se incrementó con el aumento de las concentraciones (100, 200 y 500  $\mu\text{L mL}^{-1}$ ), tanto en hojas como en frutos. El valor más alto de porcentaje de inhibición del radical DPPH, correspondió a la concentración de 500  $\mu\text{L mL}^{-1}$  con  $11.5 \pm 0.4$  y de  $8.28 \pm 0.3$ , para plantas cultivadas y silvestres, respectivamente. Los autores concluyeron que *Physalis chenopodifolia* L., efectivamente presenta actividad antioxidante.

Morillo y col. (2017), estudiaron la composición química del aceite esencial de las hojas y tallos de *Physalis peruviana* L. El objetivo fue determinar los componentes volátiles presentes en el aceite esencial de las partes aéreas de la planta. Utilizando la técnica de Cromatografía de gases acoplado a Espectrometría de masas y la medición de los índices de Kovats. Lograron identificar en el aceite proveniente de las hojas 22 componentes, siendo los mayoritarios: el ácido hexadecanoico (42,8 %), el (-)-epóxido de hexano (28,8 %), el fitol (4,7 %) y el éster metílico del ácido hexadecanoico (2,1%); mientras que en el aceite de los tallos se identificaron 21 componentes, siendo los mayoritarios: el ácido hexadecanoico (80,5 %), el ácido pentadecanoico (3,3 %) y el ácido tetradecanoico (2,6 %).

Aparcana y Villarreal (2014), determinaron la capacidad antioxidante de los extractos etanólico de los frutos de *Physalis peruviana* “aguaymanto” de diferentes lugares del Perú. La presente investigación tuvo como objetivo el estudio fitoquímico de los extractos etanólicos, valoración del contenido de polifenoles totales por el reactivo de Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante de los frutos de *Physalis peruviana* L., provenientes de Huánuco, Junín, Ancash y Cajamarca por el método de DPPH. Los autores concluyeron que los fruto procedente de Huánuco, Junín, Ancash y Cajamarca presentaron capacidad antioxidante obteniendo como concentración inhibitoria IC<sub>50</sub> 1,86; 2,04; 2,24 y 2;36 mg/mL respectivamente.

Cortés, Prieto y Rozo (2015), evaluaron la caracterización bromatológica y fisicoquímica de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) y su posible aplicación como alimento nutracéutico. El objetivo fue determinar sus propiedades bromatológicas, fisicoquímicas y actividad antioxidante, para su posible aplicación como alimento nutracéutico. Para este estudio utilizaron el fruto y este fue sometido a deshidratación por calor y liofilización. Luego de este proceso se procedió a la obtención del extracto metanólico de la uchuva, para determinar su actividad antioxidante. Se utilizó el método ácido 2,2-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), el cual registro valores para la uchuva deshidratada por calor de 186,242 mg/100 g de muestra seca, y para la uchuva liofilizada, de 211,64 mg/100 g de muestra seca. En el caso del atrapamiento del radical DPPH<sup>+</sup>, se alcanzaron concentraciones de 393,69 mg/100 g de muestra liofilizada y 391,39 mg/100 g de muestra deshidratada por calor. Los autores concluyeron que la uchuva efectivamente presenta actividad antioxidante.

Huertas (2015), evaluaron *in vitro* el efecto antibacteriano y citotóxico del extracto metanólico de *Physalis peruviana* (capulí) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC25175), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556). El extracto metanólico de la *Physalis peruviana* mostró capacidad inhibitoria frente a las cepas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*. El efecto antibacteriano obtuvo un promedio de 17.25 mm y 16.65 mm respectivamente en la dilución 1 (100 µg/ml), mientras que el menor efecto antibacteriano fue encontrado en la dilución 3 (50 µg/ml) con un promedio de 11.17 mm y 14.37 mm respectivamente. Por otro lado, a partir de la dilución 4 (25 µg/ml) no se encontró efecto antibacteriano de dicha planta. Los autores concluyeron que el extracto metanólico de *Physalis peruviana* tuvo efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis*. Además, no fue citotóxico para la línea celular Jurkat.

Llumiguano (2014), estudió la composición química de los extractos de hojas de Chapuca o uvilla silvestre (*Physalis peruviana*). El objetivo fue determinar la composición química de los extractos etanólico, etéreo y acuoso. Para este estudio utilizaron las hojas para elaborar los extractos. Los resultados que obtuvieron en los extracto etéreo, alcohólico y acuoso, muestra la presencia de metabolitos secundarios entre los que destacan alcaloides, triterpenos y compuestos fenólicos, que podrían estar relacionados con la actividad farmacológica de esta planta.

Franco, Matíaz, Pájaro y Gómez (2012), determinaron la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos y fracciones de *Physalis peruviana* L. y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz. Investigaron la actividad *in vitro* de extractos y fracciones de los cálices de *Physalis peruviana* L. y flores y hojas de *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas*

*aeruginosa*, determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). Los autores concluyeron que ambas especies son promisorias y confirmaron que el extracto de *Physalis peruviana* L., puede inhibir el crecimiento de agentes patógenos.

Sanabria, Lopez y Gualdron (1997), estudiaron los compuestos fitoquímicos y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. El objetivo fue investigar 29 especies de plantas colombianas, entre ellas *Physalis peruviana* L., determinaron que el extracto etanólico de esta especie reveló mediante un análisis fitoquímico preliminar la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, esteroides y/o triterpenos y lactonas terpénicas y a su vez relacionaron la presencia de estos compuestos químicos con la alta letalidad que mostraron estos extractos frente a la *Artemia salina*. La concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) que presentaron las partes aéreas de *P. peruviana* L., fue de 42 µg/mL. Los autores concluyeron que *P. peruviana* L., efectivamente presenta toxicidad.

### **Antecedentes Históricos o Epistemológicos**

La historia del hombre está estrechamente ligada con las plantas medicinales y aromáticas. Antes de conocer el fuego y domesticar los animales su subsistencia dependía en gran parte de las hierbas, los frutos, la miel y los jugos que extraía de las plantas. En el periodo neolítico el hombre se vuelve sedentario y aparece la agricultura, se cultivan granos y plantas como el hinojo y el cilantro que se utiliza como condimento (Méndez, 2008).

El padre de la medicina, Hipócrates recomendaba tratamientos curativos basados en canela, tomillo, hierbabuena y mejorana, sugería tener mucho cuidado en su recolección, secado y preparación. Crateabas, famoso herborista, contemporáneo de Hipócrates, escribió

un manual en el que detallaba cuatrocientas plantas con sus aplicaciones que sirvieron a la humanidad (Méndez, 2008).

Los primeros farmacólogos fueron los árabes, ya en el siglo IX abrieron farmacias en Bagdad y junto con los persas inventaron el alcohol utilizando principalmente en la medicina para destilar esencias de jazmines rosas para aromatizar el ambiente y sus alimentos (Méndez, 2008).

El siglo XVII marcó el apogeo de las plantas aromáticas y medicinales, que hasta entonces se emplearon de manera limitada como medicina, y su propagación y multiplicación había aumentado, pues aparecieron otras como la manigueta de Guinea y anís estrellado de la China. A finales del siglo XVII su utilidad y su valor era el curativo (Méndez, 2008).

No obstante, ha tenido que transcurrir mucho tiempo y algunos acontecimientos para que la medicina tradicional sea valorada. En 1977 la Organización Mundial de la Salud (OMS) hizo conocer su propuesta política “Salud Para Todos en el año 2000”, que fue impulsada en la conferencia de Alma-Ata. La OMS ha sido la principal impulsadora del reconocimiento del potencial de la medicina tradicional y de la utilización de las plantas medicinales en la salud pública a través de decisivas reducciones. En 1976, llamo la atención sobre la importancia de los agentes de salud de la medicina tradicional. La OMS calcula que las hierbas curativas son la medicina principal de dos tercios de la población mundial, es decir, de unos cuatro mil millones de personas (Méndez, 2008).

## **Bases Teóricas**

### **Generalidades de la familia Solanaceae**

La familia Solanaceae cuenta con un total de 90 géneros y 3000 especies con una amplia distribución, principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de Sur América. El género *Solanum* es uno de los géneros más importantes de esta familia con cerca de 1200 especies (Coletto, Kinupp, Absy y Kerr, 2004).

Las Solanaceas, se han empleado en la medicina tradicional mexicana como antifúngicos, gracias a sus propiedades antimicrobianas. Se ha demostrado que las personas utilizan plantas medicinales para el tratamiento de diferentes enfermedades (Lozoya, Navarro, García y Zurita, 1992).

La principal importancia de la familia Solanaceae, radica en su uso como fuente de alimento. Sin embargo, debido a la gran diversidad del género existe una gran oportunidad de uso como fuente de nuevos fármacos, por lo que en la actualidad existe un gran interés científico de investigación de sus propiedades farmacológicas (Boyd, Murray y Tyil, 1984).

### **Propiedades farmacológicas de la familia Solanaceae**

Actualmente se han estudiado diferentes especies de la familia Solanaceae, las cuales tienen importancia farmacológica por sus diferentes propiedades en el beneficio de la salud humana, tales como: analgésica, hipoglucemiante, antimicrobiana y antiparasitarias (Torres, López, Galicia y Silva, 2013)

### **Propiedad analgésica**

Las plantas medicinales son utilizadas comúnmente para el tratamiento de dolores de estómago y cuerpo. Además, a pesar que la comunidad cuenta con analgésicos convencionales proporcionados por clínicas del sector salud, la mayoría de las personas usan plantas medicinales como terapia alternativa para muchos tipos de enfermedades, esto es debido principalmente a la falta de recursos económicos. Los resultados de dicho estudio muestran que las solanáceas tales como *Cestrum dumetorum* (Orcajuda) y *Cestrum nocturnum* (Orcajuda negra) son utilizados para el tratamiento del dolor de cuerpo y bronquitis (Torres y col., 2013).

### **Propiedad antibacteriana**

Dentro de las propiedades antimicrobianas de forma general se destacan la antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria y antiviral. Plantas de esta familia han llamado la atención de científicos para explorar a fondo las mismas y en la actualidad se están realizando investigaciones para analizar su actividad antibacteriana y antifúngica (Torres y col., 2013).

Se ha reportado el empleo de *Datura stramonium* (toloache), para el tratamiento de la gingivitis, la caries y la periodontitis (enfermedades bucales ocasionadas por bacterias, que residen en la cavidad bucal, especialmente el *Streptococcus mutans*), éstas últimas dos han sido las principales enfermedades que afectan a la humanidad (Torres y col., 2013).

## **Propiedad antiparasitaria**

Dentro de la familia Solanaceae, también existen plantas con propiedades antiparasitarias, tal es el caso de *Solanum nudum* conocida también como zapata, la cual ha sido utilizada para el tratamiento de enfermedades febriles por algunas personas (Torres y col., 2013).

López (2008) reportó la presencia de esteroides antiplasmodiales en *Solanum nudum* los cuales muestran efecto antiparasitario contra *Plasmodium falciparum*, agente causal de la malaria. Otro ejemplo es la presencia de alcaloides con actividad en contra de la esquistosomiasis, enfermedad parasitaria causada por helmintos comúnmente conocidos como gusanos.

## **Composición química de la familia Solanaceae**

Existe una relación muy estrecha entre la composición química de los diferentes miembros de la familia Solanaceae y sus efectos. En el chile poblano (*Capsicum spp*) se han encontrado compuestos como la clorofila, beta caroteno y vitaminas los cuales poseen propiedades anticancerígenas (Ramírez, Guzmán, Espinosa y Murillo, 2001).

En el caso del tomatillo (*Physalis philadelphica* L.) que ha demostrado actividad quimiopreventiva del cáncer se ha detectado la presencia de witanólidos, uno de ellos es ixocarpalactona (IxoA) (1, Figura 1) (Choi, Murillo, Su, Pezzuto, Kinghorn, y Mehta, 2006).

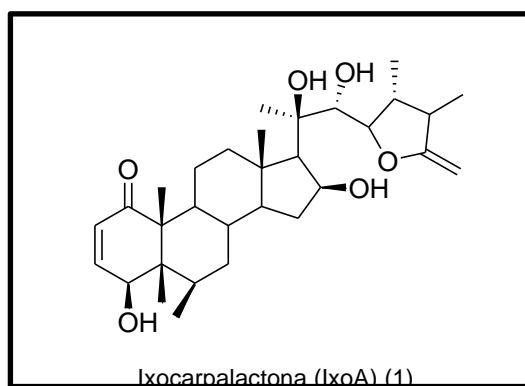


Figura 1. Estructura química de ixocarpalactona (IxoA), presente en la familia Solanaceae

Mediante la purificación de los extractos de *Solanum lanceolatum* obtenidos por métodos convencionales se ha logrado obtener dos nuevos pseudoglicolípidos llamados lanceolitoles (2, Figura 2). (Herrera, Garduño, Vázquez, Ríos y Alvarez, 2005). *Solanum rostratum* es utilizado en México para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, y se ha detectado en sus extractos la presencia de metilprotodioscina (3), a la cual se le determinó su estructura por Resonancia Magnética Nuclear (protónica) a partir de su aglicona (Bah, Gutiérrez, Escobedo, Mendoza y Rojas, 2004).

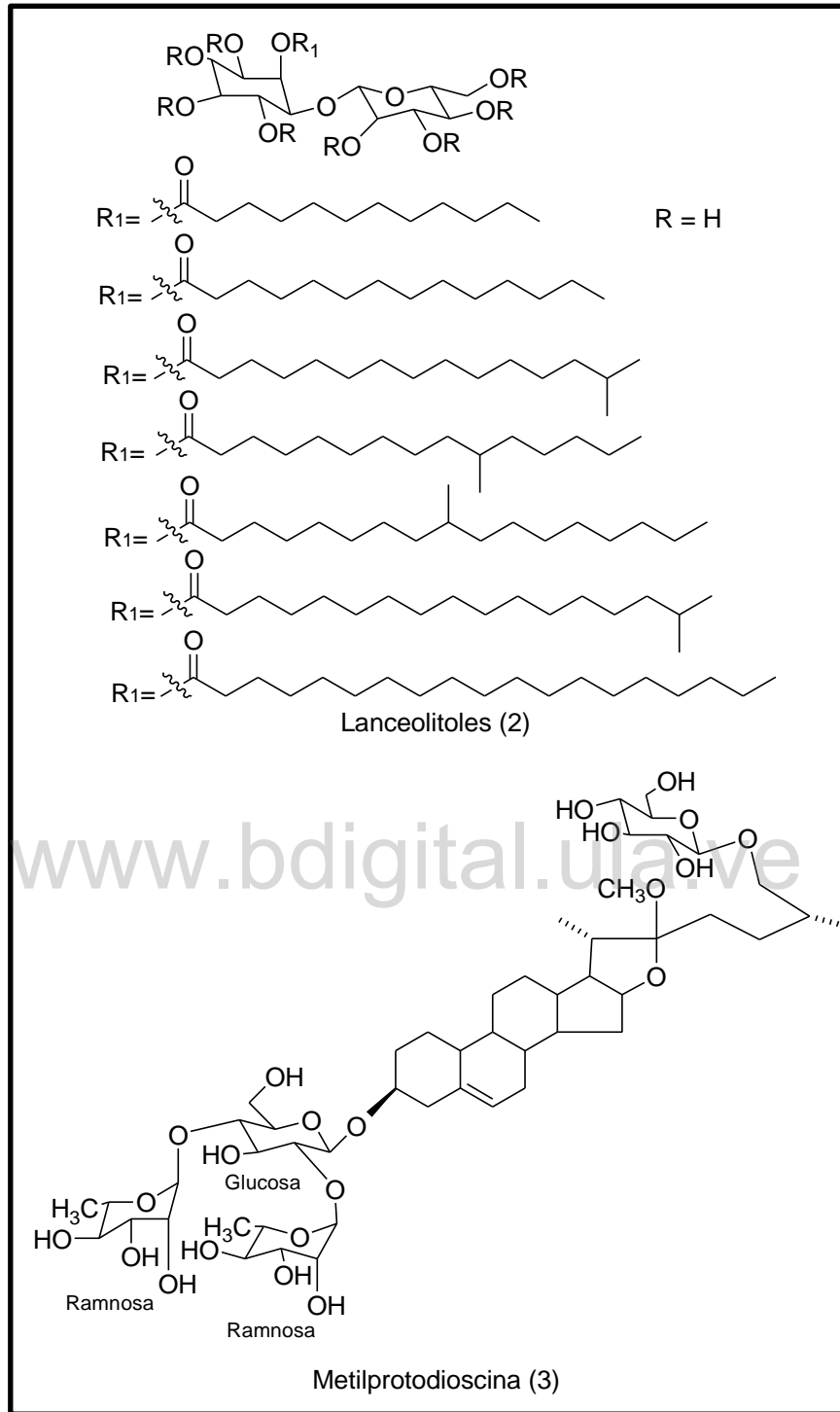


Figura 2. Estructura química de algunos compuestos químicos presente en la familia Solanaceae.

## **Generalidades del género *Physalis***

El género *Physalis* de la familia Solanaceae comprende alrededor de 80 especies cosmopolitas creciendo mayormente en América, con muchas especies localizadas en México, de las 80 especies de *Physalis*, cinco están presentes en Venezuela, encontrándose principalmente en vegetación adventicia producto de intervención entrópica, con amplitud de distribución en cuanto a niveles de temperatura y pisos altitudinales (Benítez y Magallanes, 1998).

Sin embargo, su nombre científico es claramente europeo. Se trata de una palabra derivada del griego que significa “vejiga”, en referencia a la forma que dan las hojas que envuelven al fruto. En la actualidad, se produce principalmente en Sudáfrica, Colombia, Perú y España (Benítez y Magallanes, 1998).

Por su parte Nee (1986) describe el género como plantas perennes, algunas de estas con rizomas, con menos frecuencia arbustos, mide entre 40 y 120 cm, florece en primavera y verano. Las hojas son alternas o por parejas, a menudo ovada, entera o gruesamente dentada. Sus flores son hermafroditas, solitarias y fasciculadas, cuelgan del nacimiento de las hojas y su color es entre rojo y naranja. El fruto es una baya, el pericarpio delgado, jugoso o algunas veces algo seco; semillas numerosas, orbiculares a reniformes.

## **Usos en la medicina tradicional**

En Latinoamérica es común su uso medicinal, mientras que en Europa y Asia se utiliza con fines alimenticios y ornamentales, tanto en jardinería como en decoración de mesas o platos (Santiaguillo y Blas, 2009).

El género *Physalis* es muy rico en vitamina C, también contiene vitamina A y calcio, tiene frutos bajos en calorías y grasas y, además, es apto para diabéticos. También tiene propiedades diuréticas y antioxidantes. Fortalece el sistema inmunológico y el nervio óptico, reduce la temperatura en estados febriles, es relajante, antiinflamatorio y puede llegar a ser una ayuda a la hora de eliminar las piedras en el riñón (Santiaguillo y Blas, 2009).

### Composición química

Estudios fitoquímicos realizados al género *Physalis* reportan la existencia de varios compuestos activos farmacológicamente como lo son los flavonoides, alcaloides, triterpenos, ceramidas, fenilpropanoides, vitaminas, ácidos grasos y diferentes esteroides (Douglas, 2011).

Múltiples investigaciones realizadas identifican a los compuestos citados anteriormente, pero los que despiertan mayor interés son los witaesteroides, un grupo de lactonas esteroidales productoras de ergostano (4, Figura 3) (Menzel, 1951).

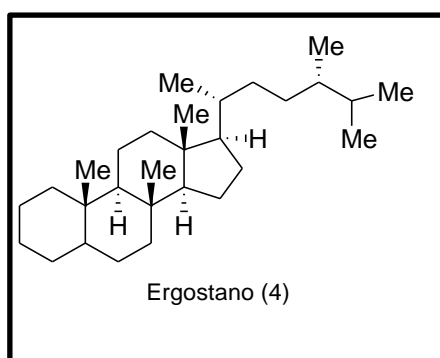


Figura 3. Estructura química del Ergostano (4), presente en el género *Physalis*.

## Especie *Physalis peruviana* L

### Generalidades de la especie

*Physalis peruviana* L. pertenece a la familia de las Solanaceas y es originaria de los andes suramericanos. Su nombre proviene de la palabra indígena uchuva, que significa fruta redonda. Es un fruto autóctono colombiano que se caracteriza por su buen contenido de vitaminas A y C, fósforo, hierro, potasio y zinc (Whitson y Manos 2005).

El fruto es una baya redonda y pequeña (Figura 4) cuyo peso varía entre 4 y 10 g, se encuentra dentro de un capacho que la cubre completamente y la protege del entorno durante la etapa de poscosecha. El cultivo de la uchuva es originario de los andes suramericanos, donde crece silvestre y semi silvestre en las zonas tropicales y subtropicales con altitudes entre los 1500-3000 m.s.n.m. Esta planta perenne crece entre 1,0 y 1,5 metros de altitud (Whitson y Manos 2005).



Figura 4. Planta de *Physalis peruviana* L. (Whitson y Manos 2005).

El nombre de *Physalis peruviana* L., le fue dado por Linneo en 1753. Sin embargo, otros nombres comunes han sido utilizados posteriormente como sinónimos de *Physalis*

*peruviana* L. En la Tabla 1, se indican los diversos nombres con los que es conocida la planta en los diferentes países.

Tabla 1.  
*Nombres comunes de Physalis peruviana L.*

País	Nombres comunes
Bolivia	Awei llamantu, Capuli, Motojobobo embolsado, Ruru chinchí
Chile	Bolsa de amor, Capulí
Colombia	Uchuva, Uchuba, Uchubo, Alquenque, Buchuvba, Capulí,
Perú	Aguaymanto, Capulí, Tomate de bolsa
Venezuela	Cuchuva, Huevo de sapo, Topotopo y Topo-topo
Ecuador	Uvilla
En ingles	Golden berry o Cape gooseberry

(Bernal y Correa, 1998)

La taxonomía de las especies del género es compleja, existiendo un total de cuatro subgéneros y 9 secciones dentro del subgénero *Rydbergis Hendrych*, que es en el que se encuadra la uchuva. Por otra parte, las distinciones entre especies son difusas en muchas ocasiones, lo cual en ocasiones dificulta la identificación de ejemplares incluso para los expertos en el género (Whitson y Manos, 2005).

**Dentro de las angiospermas, la uchuva se encuadra dentro de los siguientes taxones (Whitson y Manos 2005).:**

**Taxonomía:**

Clase: Magnoliopsida  
 Orden Solanales  
 Familia Solanaceae  
 Tribu Physaleae  
 Género *Physalis* L.  
 Especie *Physalis peruviana* L.

## **Descripción botánica de la especie**

Plantas herbáceas con la base a veces lignificada, anual o perenne, de hasta un metro de altura, con pelos simples y tallos angulosos simples o ramificados; hojas membranáceas, geminadas y alternas, ovadas, de 8 cm, con el borde entero o lobulado, el ápice acuminado, la base obtusa, cordada o truncada y vellos-viscoso. Peciolos de 1-4 cm; flores solitarias, axilares y con pedicelos de 3-10 mm. Cáliz campaneado, de 7-15 mm de longitud y con 5 dientes acuminados y de igual longitud que el tubo; corola campanulada o rotada, de 12-15 mm de longitud y 15-20 mm de diámetro, amarilla de puntos purpureo-azulados en la base y a veces lobulada; anteras rojo-purpureas o azuladas; disco amarillo anaranjado; ovario lampiño; estigma capitado; baya globulosa de 1-2,5 cm de longitud y 1,5-3 cm de diámetro, amarillos o amarillo-verdosa, envuelta en una bolsa formada por el cáliz acrescente. Semillas discoideas, de 1,7-2 mm, blanquecinas o parduzcas y con la testa reticulada (Sánchez, 1991).

## **Hábitat**

*Physalis peruviana* L., es originaria de los Andes Sudamericanos, se encuentra en estado silvestre o asilvestrado en los pisos altitudinales intermedios en zonas tropicales y Buscar la referencia primaria quiere decir que Usted debe buscar la tesis que esta referenciando y ver quien fue el autor que escribió verdaderamente eso que Usted esta afirmando, es decir el autor de la tesis lo debe tener en las referencias subtropicales entre los 1500 y 3000 m.s.n.m. En Ecuador prefieren zonas con alturas entre 1800 y 2800 m.s.n.m., en la región interandina, aunque también se desarrolla bien a nivel del mar 72 m.s.n.m. (Trillos, Cotes, Medina, Lobo, y Navas, 2007).

## Uso etnobotánico y ancestral

Popularmente los frutos han sido utilizados en el tratamiento y prevención de pterigios, expectorantes, diuréticos, hipoglucemiante, albuminuria, dolor de amígdalas y para tratar la tosferina. En infusión las flores han sido utilizadas para el tratamiento de la tos rebelde, también se les atribuyen propiedades diuréticas, antiséptico, cicatrizante de heridas, antiespasmódicas y se empleas solas en el tratamiento de la litiasis renal, la gota, la tuberculosis y la depresión (Bernal, 2012).

Las hojas y tallos, frescos o secos, son usados en pomadas o cataplasma para el alivio de contusiones, torceduras y dislocaciones óseas. Además, las hojas y frutos son utilizadas para tratar las infecciones digestivas, inflamación del estómago, diabetes y presión arterial (Bernal, 2012).

En la Tabla 2, se muestran las actividades biológicas reportadas para cada órgano de *Physalis peruviana* L.

Tabla 2.  
*Actividades biológicas reportadas para cada órgano de Physalis peruviana L.*

Parte de la planta	Actividad reportada	Extracción, fracción o metabolito
Planta entera	Actividad antihepatoma, aducción de apoptosis en células humanas y antitumoral.	Extracto etanólico
Hojas	Actividad antiinflamatoria, antioxidante apoptosis en células cancerígenas, actividad antihepatotóxica.	Extractos etanólico y extractos acuosos.
Partes aéreas	Actividad citotóxica contra células cancerígenas (Pulmón, mama e hígado).	Witanólidos
Cálices	Actividad antiinflamatoria	Fracción denominada Pp-D28-LF
Frutos	Actividad antimicrobiana, antioxidante e hipoglucemiante	Fruto entero

(Bernal, 2012).

### Composición química reportada en *Physalis peruviana* L

Bernal y Correa (1998), proporcionan una valiosa información acerca de los constituyentes químicos encontrados en *Physalis peruviana* L., desde 1930 hasta 1990, en donde se destacan principalmente compuesto del tipo witaesteroides (Tabla 3).

Tabla 3.

*Compuestos químicos aislados de Physalis peruviana L., entre 1930 y 1990.*

Parte analizada	Tipo de compuesto	Compuestos aislados
Hoja	Witaesteroides, Terpenos	Fisalina A 2,3-dihidrowitanólido E 4 $\beta$ -hidroxiwitanólido E Witanólido E Fisalolactona Witanólido S Perulactona 3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido de fisalolactona B 24-metilenocolesterol Sitosterol
Fruto	Carotenos	Ácido 16-hidroxiohexadecanoico Carotenoides
Raíz	Alcaloide Witaesteroides	Higrina Witaperuvina F Witaperuvina G Fisalinas Witaperuvina
Cultivo de tejido	Terpenos	Acetato de isofucosterilo Cicloartenol Isofucosterol

(Bernal y Correa 1998).

En la Tabla 4, se exponen los estudios fitoquímicos realizados a *Physalis peruviana* entre 1991 y 2010 para cada órgano. Los compuestos aislados en los últimos años, comprenden principalmente compuesto tipo Peruvianóxido (5, Figura 6), Caempferol (6), Fiperunolido A (7), 4 $\beta$ -hidroxiwitanólido E (8), (1S,2S)-1-fenilpropano-1,2-diol 2-O- $\beta$ -D-glucopiranosido (9) y Calistegina B2 (10). En la Figura 5, se muestran algunos compuestos aislados en *Physalis peruviana* L.

Tabla 4.

*Compuestos químicos aislados de Physalis peruviana L., entre 1991 y 2010.*

Parte analizada	Tipo de compuesto	Compuesto identificado
Parte aérea (hojas)	Alcaloides Witanólidos	3 $\beta$ -acetoxitropano y dos isómeros N-metilpirrolidiniligrina Fiperunolide A Fiperunolide B Fiperunólido C Peruvianoxide
Cálices	Witanólidos	4 $\beta$ -hidroxiwitanólido E 28-hidroxiwitanólido E
Fruto	Glucósidos Vitaminas	(1S,2S)-1-fenilpropano-1,2-diol 2-O- $\beta$ -D-glucopiranosido $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ -tocoferol Vitamina k1 Vitamina C Vitamina A $\beta$ -caroteno Ácidos grasos
Raíz	Alcaloides Witanólidos Witanólidos	Figrina 4 $\beta$ -hidroxiwitanólido E 4 $\beta$ -hidroxiwitanólido E 17 $\beta$ -hidroxi-14,20-epoxi-1-oxo-[22R]-3 $\beta$ -[O- $\beta$ -Dglucopiranosil]- wita-5,24-dienolido
Planta entera	Flavonoides Alcaloides	Quercetina y campferol (+)-Fisoperuvina

(Tomassini, Barbi, Ribero y Xavier, 1999)

www.bdigital.ula.ve

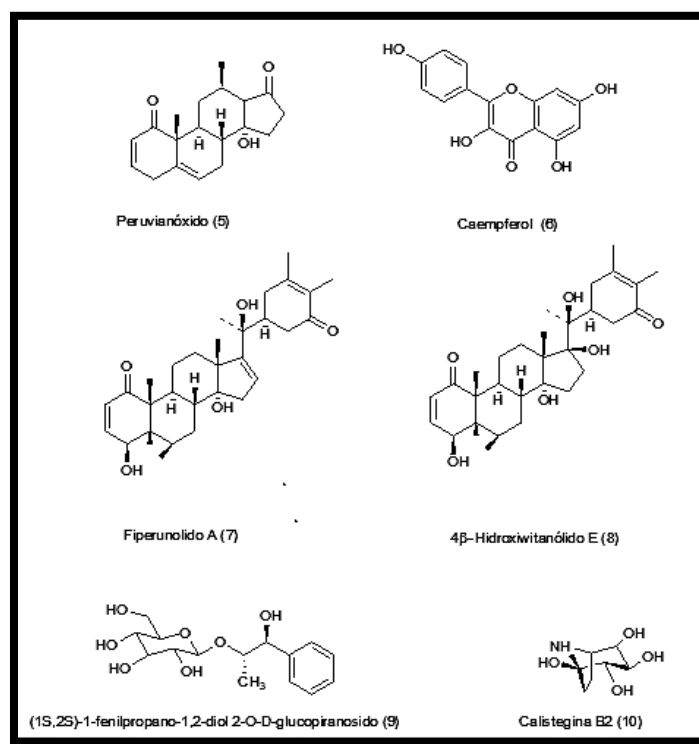


Figura 5. Compuestos químicos presentes en *Physalis peruviana L.*

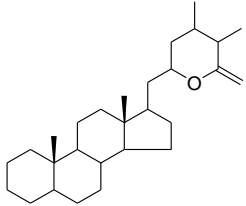
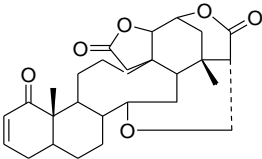
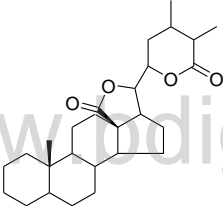
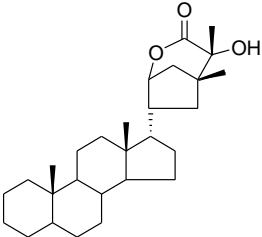
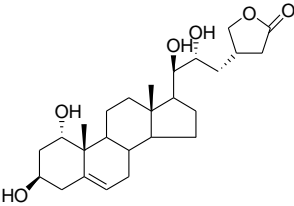
Los compuestos tipo witaesteroides son los más reportados para la especie *Physalis peruviana* L., (Tabla 3). Los witaesteroides junto con capsaicinoides y saponinas esteroidales, representan metabolitos secundarios específicos de algunos taxones de solanáceas. Siendo *Physalis* el género que contiene mayor cantidad de witanólidos, aunque éstos también se presentan con gran frecuencia en el género *Withania* (Tomassini y col., 1999).

Se denominaron originalmente witanólidos a un conjunto de esteroides naturales de veintiocho átomos de carbono, los cuales contienen el esqueleto base del ergostano, y en el cual los carbonos 22 y 26 se encuentran oxidados formando una  $\delta$ -lactona (Tomassini y col., 1999).

Los witanólidos pertenecen al grupo de los witaesteroides, compuestos derivados del ergostano que se encuentran polioxigenados y están presentes principalmente en la familia Solanaceae, no obstante, también se han encontrado en algunas plantas de las familias Leguminosae y Taccaceae. Los witaesteroides se clasifican en 8 grupos de acuerdo a la estructura formada por su función lactónica en C-26 en la Tabla 5 se presentan los esqueletos básicos de cada tipo (Tomassini y col., 1999).

Por sus características estructurales, la mayoría de estos compuestos suelen aislarse de los extractos obtenidos con disolventes de polaridad media, como cloroformo y éter etílico o con disolventes más polares, como metanol y etanol. También se han aislado witanólidos poco polares de extractos realizados con hexano. Por otra parte, ocasionalmente estos compuestos se presentan como glicósidos o como sulfatos (Tomassini y col., 1999). En la Tabla 5, se muestran algunos witaesteroides

Tabla 5.  
*Esqueletos básicos de witaesteroides (Tomassini y col., 1999).*

Tipo de Witaesteroides	Esqueleto básico	Descripción
Witanólido		<p>Son los más abundantes, se conocen como precursores de Witafisalina y Acnistina, se subdividen en dos clases principales de acuerdo con la orientación (<math>\alpha</math> o <math>\beta</math>) de la cadena lateral ubicada sobre el C-17.}</p>
Fisalina		<p>Son moléculas de estructuras bastante complejas, ya que además de presentar la lactona típica de witaesteroides, tienen una <math>\gamma</math>-lactona fusionada al anillo D.</p>
Witafisalina		<p>Tienen el esqueleto ergostano-carboxílico de los witanólidos intacto, pero se aproximan a la fisalinas por presentar la lactona de 5 miembros ligada al anillo D.</p>
Acnistina		<p>Tienen una cadena lateral bicíclica insertada en C-17.</p>
Prolactina		<p>Presentan un anillo <math>\gamma</math>-lactónico saturado con orientación tipo <math>\beta</math>, por alteraciones debido a un grupo hidroxilo en C-22.</p>

Por otra parte, se tiene que los compuestos bioactivos presentes en el fruto, como los fitoesteroles se encuentran en niveles elevados en los aceites fijos extraídos de los frutos de esta planta, que les darían propiedades tales como antioxidantes e hipocolesterolémico. La especie presenta tres fitoesteroles específicos: campesterol (11, Figura 6),  $\beta$ -sitosterol (12) y estigmasterol (13) los cuales serían responsables de los niveles más bajos de colesterol en la sangre. Además, la actividad antioxidante se ha asociado con los altos niveles de polifenoles y elevado contenido de vitaminas E (14, Figura 7), vitaminas C (15) y  $\beta$ -caroteno (16) (Puente, Muñoz, Castro y Cortés, 2011).

Asimismo, el  $\beta$ -sitosterol, posee actividad antiinflamatoria similar a la hidrocortisona y oxifenbutazona, además actividad antipirética parecida al ácido acetilsalicílico, tiene efecto analgésico y antiinflamatorio a través de un mecanismo central relacionado con los receptores opioides (Puente y col., 2011).

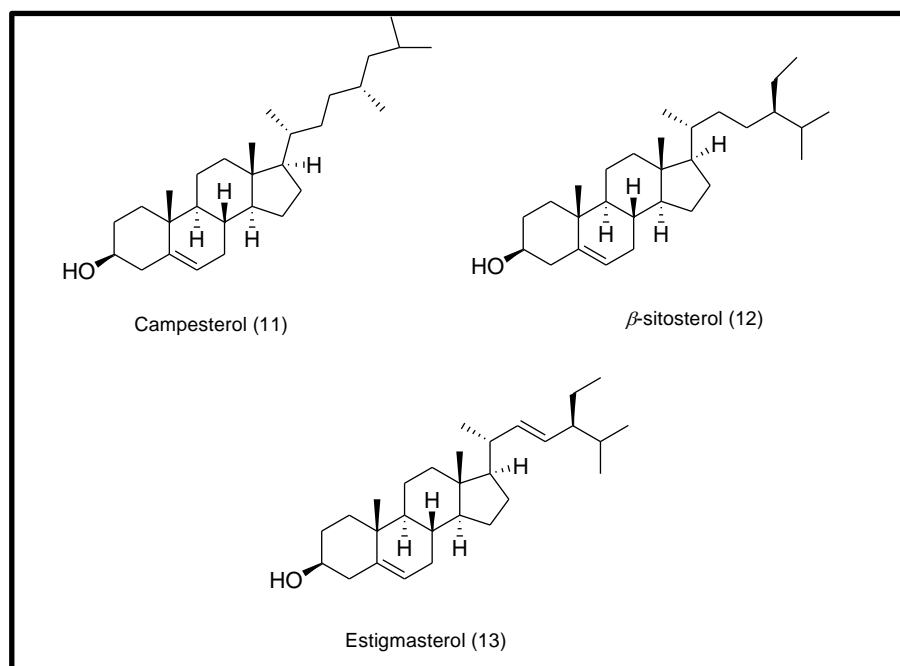


Figura 6. Estructura química de algunos compuestos presentes en el fruto de *Physalis peruviana* L.

En la Figura 7, se muestran estructuras de compuestos que poseen actividad antioxidante

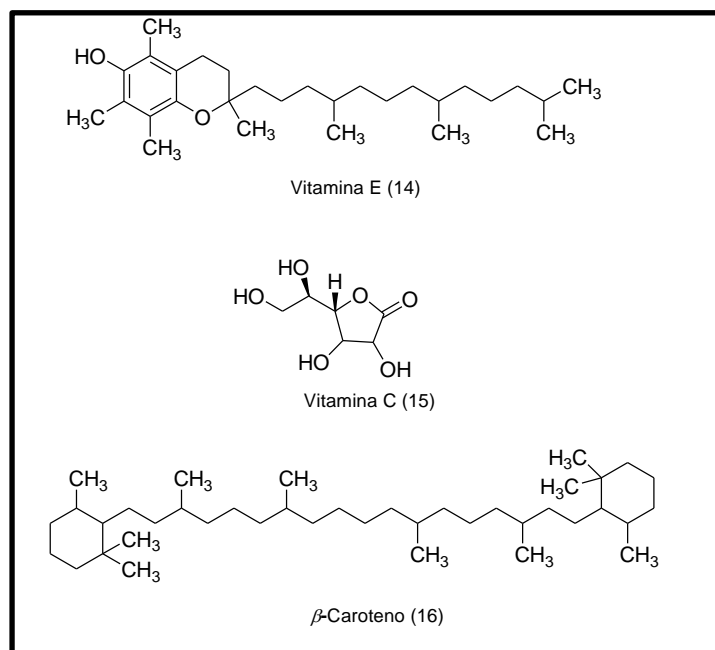


Figura 7. Estructura química de compuestos que poseen actividad antioxidante

www.bdigital.ula.ve

### Producto natural

En sentido amplio un producto natural esta formado por todos los compuestos de la naturaleza. En sentido mas restrictivo un producto natural comprende solo los metabolitos secundarios que son especifico de la especie (Gutierrez y Esteres, 2009). Muchos productos naturales se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamententos, insecticidas, herbicidas, perfumes, colorantes entre otras (Avalos y Perez, 2009).

Estos productos deben diferenciarse de los metabolitos primarios que son producto quimico necesario para la vida, resultantes del metabolismo vital de todo ser vivo; son carbohidratos, lípidos, proteínas y acidos nucleicos. En contraste a los metabolitos primario, los productos naturales o metabolitos secundario son subproductos de rutas

metabólicas normales que ocurren en ciertas especies, siendo particulares dentro de un grupo taxonómico, estado de vida o tejido presentando una distribución restringida dentro del reino vegetal dando origen a la quimiotaxonomía (Torres, 2004).

### **Metabolito secundario**

Son todas aquellas moléculas activas generadas por diversas especies vegetales. Los metabolitos son moléculas que no son necesarias para el crecimiento y la reproducción de las plantas. Pero cumplen con roles muy importantes en el reino vegetal, pueden suponer una ventaja competitiva considerable (Domingo y López, 2003).

**A continuación, se definirán algunos de ellos:**

#### **Flavonoides**

Los flavonoides son sustancias sólidas cristalizadas de color blanco o amarillento. Es el nombre genérico de un grupo de moléculas generadas por el metabolismo secundario de los vegetales, que, como otros principios activos vegetales, se originan mediante una ruta biosintética mixta (en el caso de los flavonoides, a través de la ruta de los policétidos) (Bruneton, 2001). En la Figura 8, se muestra la estructura de la quercetina (**17**), que es un compuesto flavonoide.

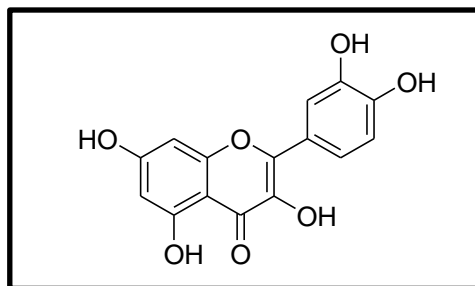


Figura 8. Estructura química de la quercetina (**17**).

## Terpenos

Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isómeros (5 átomos de carbono). De esta forma, los terpenos se clasifican por el número de unidades de isómeros. Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas, la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensa para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en el cloroplasto y genera también IPP. (García y Pérez, 2009). En la Figura 9, se muestran la estructura del escualeno (**18**), que es el compuesto precursor de los triterpeno.

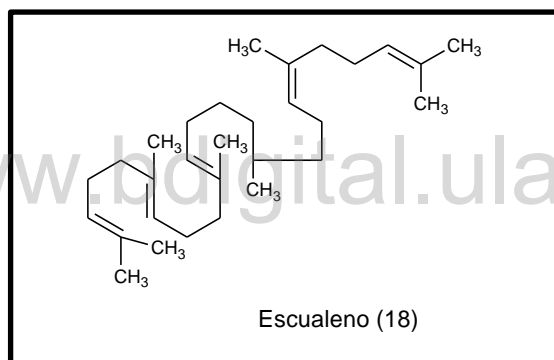


Figura 9. Estructura química del escualeno.

## Saponinas

Son un grupo de sustancias glicosídicas que se disuelven en agua y poseen la propiedad de formar espuma al agitar la solución. Por hidrólisis de una saponina, se obtiene carbohidratos y una aglicona “sapogenica”. La cual estructuralmente puede ser del tipo esteroideal o triterpenoidal. En general, las esteroidales son menos numerosas que las triterpenoidales conocidas. Son más importantes como materia prima para la fabricación de hormonas sintéticas (Marcano y Hasegawa, 2002).

En la Figura 10, se muestra la estructura de la digitonina (**19**), que es un compuesto que pertenece a las saponinas.

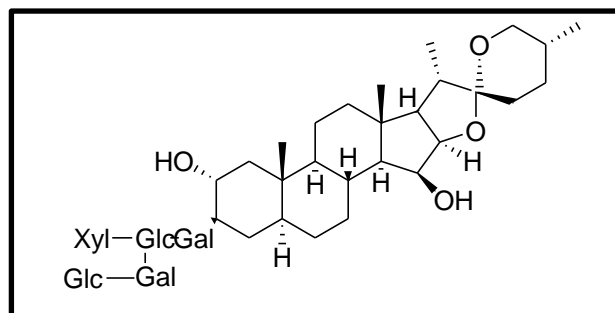


Figura 10. Estructura química de la Digitonina (**19**)

### Compuestos Fenólicos

Entre los fenoles encontrados en estado libre, se encuentran constituyentes importantes de las esencias como el timol (**20**, Figura 11), carvacrol (**21**) (esencia de tomillo), el eugenol (**22**) y el chavicol (**23**). Los fenoles tienen una actividad fisiológica marcada porque poseen propiedades antisépticas. Son los compuestos más simples y consiste en un anillo fenólico sustituido (Domingo y López, 2003).

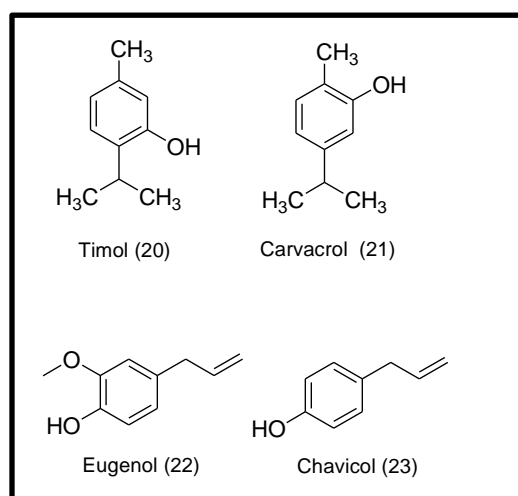


Figura 11. Estructura química de algunos fenoles.

## Cumarinas

Son compuestos derivados de la benzo- $\alpha$ -pirona, como: esculetina (24, Figura 12), umbeliferona (25), warfarina (26) y la escopoletina (27). Tienen propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y vasodilatadoras. Parece que su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante interacción con el ADN eucariota, lo que explica también su actividad antiviral (Domingo y Lopez, 2003).

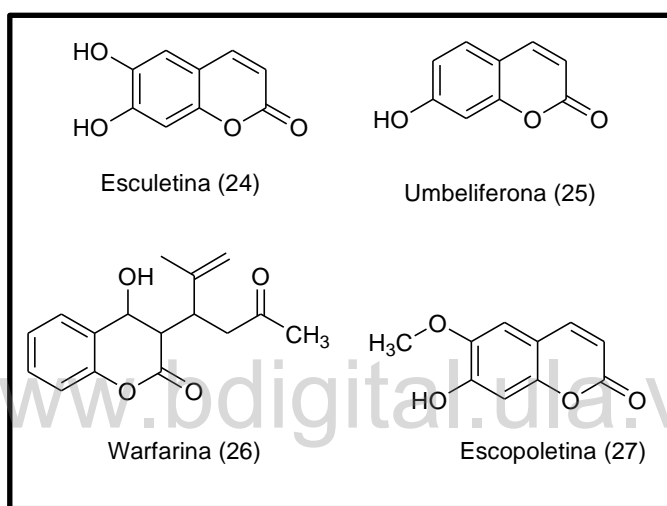


Figura 12. Estructura química de algunas cumarinas

## Alcaloides

Reciben esta denominación los compuestos nitrogenados heterocíclicos. Pertenecen a este grupo, entre otras, sustancias como la morfina, la heroína y la cocaína. El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre pared celular y el ADN del microorganismo (Domingo y López, 2003). En la Figura 13, se muestra la estructura de la cafeína (28), que es un compuesto alcaloide

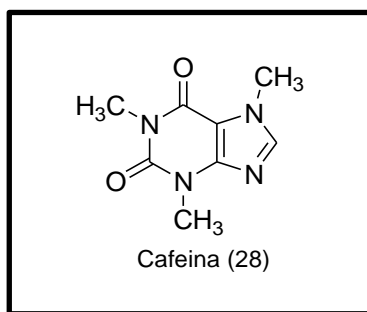


Figura 13. Estructura química de la cafeína.

## Aldehídos

Son derivados de los alcoholes primarios por deshidrogenación. Muchos aldehídos son aromatizantes como la vainilla y el citral. Así mismo este grupo fitoquímico tienen propiedades antisépticas (Domingo y López, 2003). En la Figura 14, se muestra la estructura del cinemaldehído (**29**), que es un compuesto aldehído.

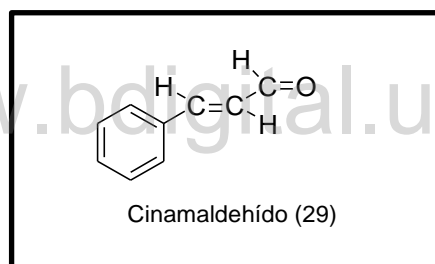


Figura 14. Estructura química del cinemaldehído.

## Quinonas

Son anillos aromáticos con dos funciones ceto. Son ubicuas en la naturaleza y causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando son dañadas. Poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio (Domingo y López, 2003). En la Figura 15, se muestran algunas quinonas como *p*-Benzoquinona (**30**), *o*-Benzoquinona (**31**), 1,4-Naftoquinona (**32**) y 9,10-Antraquinona (**33**).

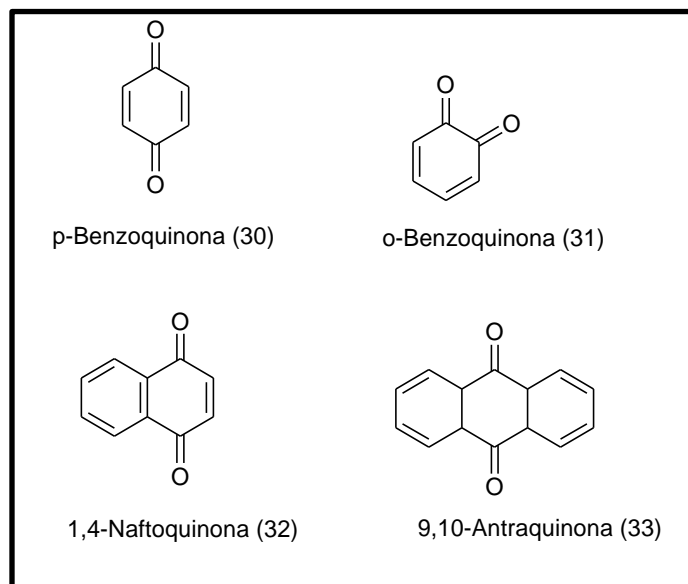


Figura 15. Estructura química de algunas quinonas

## Taninos

Son sustancias de origen vegetal, no nitrogenadas de estructura polifenólica, solubles en agua, alcohol y cetona. Estas sustancias son de sabor astringente y tienen la propiedad común de curtir la piel, haciéndola imputrescible e impermeable al fijarse sobre sus proteínas (Domingo y López 2003). En la Figura 16, se muestra la estructura de la proantocianidinas (34), que es un compuesto tanino.

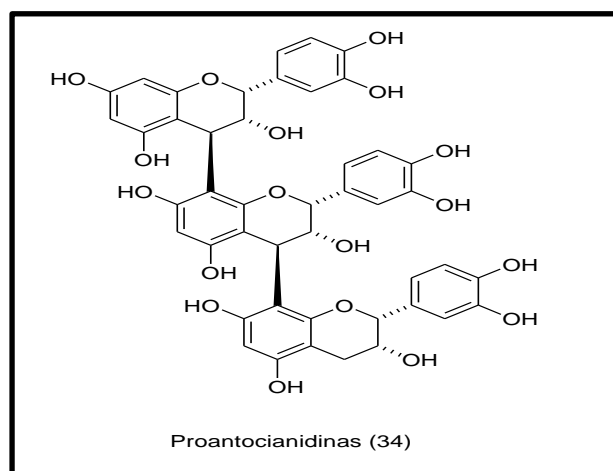


Figura 16. Estructura química de la proantocianidinas (34).

## **Extractos Vegetales**

El extracto vegetal se define como un preparado que permite obtener de las plantas metabolitos secundarios útiles. Los cuales pueden tener diferentes efectos tales como fortificantes, para el control de enfermedades y para el control de plagas. Se extraen de alguna porción de la planta, la raíz, el tallo, las hojas, los frutos y las flores, que, al someterse a procesos químicos, permiten aislar compuestos característicos en forma concentrada y con la característica de conservar sus propiedades químicas (Jiménez, 2001).

### **Consistencia de los extractos**

Los extractos se clasifican en cuatro grupos: blandos, firmes, secos y fluidos (Guerra, 2005).

**Extractos blandos:** estos tienen la consistencia de la miel espesa, algunas veces debidos a la absorción de la humedad atmosférica, presentan una consistencia menos densa.

**Extractos firmes:** como su nombre lo indica deben tener una estrecha semejanza con la masa con la cual se fabrican o manufacturan las píldoras, deben tener la característica especial de no adherirse a los dedos.

**Extractos secos:** son aquellos en los que el disolvente ha sido eliminado casi completamente eliminado. Contiene tan solo el 5 al 8 % de agua. Se reducen fácilmente a polvo y facilitan su manipulación y dosificación.

**Extractos fluidos:** son separados en una forma tal que el peso del extracto corresponde exactamente al peso de la sustancia empleada como medicamento, deseca al aire y pulverizada (Guerra, 2005).

## **Obtención de los extractos vegetales**

Los extractos de plantas completas o partes específicas (hojas, tallos y frutos), son obtenidos a partir de especímenes seleccionados, mediante técnicas especializadas de extracción y concentración química, utilizando diversos solventes y siendo posteriormente analizados por técnicas cromatográficas (Bruneton, 2001).

Los métodos de extracción dependen fundamentalmente de los objetivos del estudio de la planta, es decir, si el trabajo va dirigido al aislamiento de extractos de una muestra sólida el método a utilizar es la extracción sólido-líquido, el cual consiste en pulverizar la muestra sólida y extraer los analitos mediante un disolvente. Ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto puede difundirse desde el sólido a la fase líquida, lo que produce una separación de los componentes originales del sólido (Bruneton, 2001).

### **Algunos de estos métodos son:**

- ***Percolación***

Es un método que consiste en que el solvente (generalmente alcohólico o mezcla hidroalcohólica) atraviesa la masa de material a analizar pulverizado siempre en un solo sentido, alcanzando concentraciones crecientes de tal modo que el equilibrio entre el solvente dentro y fuera del marco nunca se alcanza, por lo que el material vegetal bañado siempre por nuevas proporciones de solvente acabada por ceder todos sus componentes solubles de manera progresiva (Carrión y García, 2010).

- ***Maceración***

El principio consiste en que el material vegetal, con el grado de finura adecuado, se pone en contacto con el solvente, se debe realizar agitaciones frecuentes a lo largo de varios días, tratando de influenciar al gradiente de concentración. Al principio de la extracción este gradiente está en el punto máximo, con el correr de los días, a pesar de la agitación, éste disminuye (Carrión y García, 2010).

- ***Maceración con solventes orgánicos***

Es un proceso de extracción sólido-líquido que se realiza a temperatura ambiente. Consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente (agua, hexano, etanol o metanol), en este caso se prefieren los solventes orgánicos puesto que, a largo tiempo de la extracción, el agua puede provocar la fermentación o la formación de mohos hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no sea atacado con el disolvente; en éste se coloca el material vegetal con el disolvente y tapado se deja en reposo por un periodo de 2 a 14 días con agitación esporádica. Luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto (Gonzales, 2004).

- ***Decocción***

Este procedimiento consiste en llevar a la mezcla de material vegetal más solvente a la temperatura de ebullición del agua, manteniendo esta temperatura durante un periodo variable que suele oscilar de 15 a 30 minutos (Carrión y García, 2010).

- ***Infusión***

Es el proceso en cual se somete el material vegetal previamente humedecida al contacto con el solvente a una temperatura iguala la de ebullición del agua por cinco minutos, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se prepara al 5 % (Carrión y García, 2010).

- ***Digestión***

Es una maceración realizada a una temperatura suave que oscila alrededor de los 50 o 60 °C. Al aumentar mediante la temperatura se consigue un mayor rendimiento de la extracción, puesto que disminuye la viscosidad del solvente lo que hace que éste pueda ingresar más rápidamente al interior de las células y así extraer los principios activos (Carrión y García, 2010).

### **Características generales de los extractos**

Estudios realizados por García, 1992 permitieron fundamentar las siguientes características:

- Los extractos son de color más o menos oscuros, cuando han sido preparados al vacío son ligeramente claros. Algunos son de color café amarillento, otros rojizos, los provenientes de las hojas son verdosos por la clorofila.
- Su aspecto debe ser liso, fino y homogéneo.
- Su olor y sabor son propiedades características de la materia prima que les han dado origen.
- La solubilidad de los extractos es variable y está en relación directa con el tipo de preparación al cual fueron sometidos.

- Los extractos acuosos son solubles en agua y producen una solución transparente, algunas veces ligeramente turbia, debido a que han sido preparados con anterioridad.
- Los extractos alcohólicos son parcialmente solubles en agua y algunas veces son totalmente insolubles, especialmente los extractos que han sido preparados con alcohol fuerte.
- Los extractos alcohólicos preparados con hojas, dan soluciones coloreadas de verde, pues la eliminación de la clorofila no puede ser total.

### **Aplicaciones de los extractos vegetales**

A lo largo de los años se han reportado múltiples usos y aplicaciones de extractos presentes en la gran diversidad de plantas estudiadas entre las que podemos señalar:

- Actividad biológica de extractos y sustancias de origen vegetal con énfasis en la familia Solanáceae que poseen propiedades analgésicas (Alonso y Maldonado, 2012).
- Actividad antioxidante (Olszewska y Michel., 2009).
- Actividad antibacteriana contra cepas gram positivas y gram negativas (Gould, Fielder, Kelly, elsankari y Nauqhton, 2009)

### **Extractos metanólicos**

Son extractos con olor característico, el cual se obtienen a partir de materia desecada de origen vegetal, por maceración o percolación en contacto con metanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. Estos procesos pueden ser

sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado (Gonzales, 2004).

### **Tamizaje fitoquímico**

Es un proceso que comprende el estudio de los metabolitos secundarios de origen vegetal y la metodología que se sigue depende de los objetivos de tales estudios. Sin embargo, existen etapas comunes, que no necesariamente ocurren al mismo tiempo, las cuales se resumen a continuación:

1. Selección del material
2. Prueba de actividad biológica
3. Examen químico de las muestras
  - Pruebas química de campo
  - Pruebas química de laboratorio
  - Que partes del material se analiza
4. Métodos de extracción y fraccionamiento
5. Cromatografía (Marcano y Hasegawa 2002)

### **Fundamento de las Pruebas Químicas:**

- ***Para los alcaloides:*** el crudo se evapora hasta casi sequedad; si durante este proceso se detecta olor de amoníaco o aminas, se evidencia alcaloides que además deben ser inestables. El extracto casi seco se retoma con HCl 10 % y se agita con un solvente inmiscible (diclorometano, cloroformo y acetato de etilo) y éste se separa. La fase acuosa se alcaliniza y se extrae con un solvente inmiscible. Las tres fases se analizan para alcaloides por separado (reactivo de Mayer, Dragendorff y Wagner) lo

que permite detectar alcaloides débilmente básicos, básicos y sales cuaternarias de amonio en los tres extractos, respectivamente (Marcano y Hasegawa 2012).

- **Para las saponinas y esteroides:** estas se manifiestan por la formación de una espuma cuando se agita el material vegetal con agua. Esta espuma dificulta la extracción. Una parte del crudo total se hidroliza (HCl 10 % o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 %, reflujo) y el hidrolizado se concentra y se extrae con acetato de etilo o cloroformo. La fracción orgánica debe contener las saponinas (aglicosas de saponinas) y otros materiales no hidrolizables. Tanto el crudo como el extracto orgánico proveniente de la hidrólisis, se analiza para esteroides y triterpenos (reacción de Lieberman Buchard). Los glicósidos se detectan por reacción con una mezcla 1:1 recién preparada, de ácido 3,5-dinitrobenzoico (2 %) y KOH (0.5 N) lo que produce coloración violeta (Marcano y Hasegawa 2012).
- **Para los flavonoides:** el crudo total se lleva a sequedad y se desgrasa con éter de petróleo. El residuo se trata con HCl concentrado y virutas de magnesio. El test será positivo para flavonoides si se produce una coloración roja al dejar en reposo la reacción por unos 10 a 20 minutos y una gota del extracto total se absorbe sobre papel de filtro y se rocía con una mancha fluorescente amarilla bajo luz UV es indicativa de flavonoides (Marcano y Hasegawa 2012).
- **Para los taninos y polifenoles:** los compuestos fenólicos se detectan por la coloración parda que producen en presencia de una solución de cloruro férrico al 1 %. Para ello el extracto total es evaporado a sequedad y filtrado antes de la reacción con cloruro férrico. Si los fenoles están presentes producen una coloración marrón y

si al tratar el crudo con solución al 1 % de gelatina en NaCl al 1 %, se produce una precipitación, el crudo contiene taninos (Marcano y Hasegawa 2012).

- **Para las antraquinonas:** el crudo total llevado a sequedad, se extrae con KOH (0.5 N), se filtra, se acidifica con ácido acético y se agita con benceno. Si la capa orgánica toma una coloración roja al alcalinizarla con hidróxido de amonio, hay antraquinonas presentes (Marcano y Hasegawa 2012).
- **Para los Glicósidos cianógenos:** al material fresco macerado se añaden gotas de cloroformo y se calienta a 50 – 70 °C en tubo cerrados, los vapores se ponen en contacto con un papel de filtro impregnado en una solución al 1 % de ácido pícrico en carbonato de sodio al 10 %. Los compuestos cianógenos se manifiestan como una mancha roja sobre el papel; el tiempo de reacción varia, puede tomar hasta 2 horas (Marcano y Hasegawa 2012).

### **Actividad Antibacteriana**

La actividad antibacteriana es la capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de una población bacteriana o para eliminarla, y que se puede expresar cuantitativamente con pruebas *in vitro*. Se puede medir en CMI (concentración mínima inhibitoria) o en CMB (concentración mínima bactericida), es decir, concentración a la cual el antibiótico es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias en 1 mL de medio de cultivo, tras 18 a 24 horas de inoculación (Fica, 2005).

El efecto bactericida se define, arbitrariamente, como la capacidad de reducir en 99,9 % una población inicial de bacterias, al cabo de 24 horas; si mata a 90 % de dicha población, se considera bacteriostático; pero la población bacteriana se va eliminando progresivamente, por eso se debe repetir las dosis de antimicrobianos. Por otra parte, el

efecto bactericida se puede ejercer a velocidades distintas, es decir, dos antibióticos bactericidas pueden matar una población bacteriana en distintos tiempos. El más rápido tendrá el mismo efecto en menos tiempo o en la misma unidad de tiempo (24 horas) la reducción será mayor (Fica, 2005).

## **Bacterias**

Las bacterias son estructuras unicelulares que presentan un tamaño de aproximadamente entre 0,5 y 5  $\mu$  de longitud, se reproducen por medio de un proceso asexual denominado fisión binaria, que poseen una pared celular y esta se descompone de peptidoglucano (Lucana y Huanca, 2014)

### **Estructura bacteriana.**

Las bacterias presentan componentes externos que son denominados permanentes o constantes y son la membrana citoplasmática, pared celular y citoplasma con todos sus componentes. de igual manera la clasificación bacteriana puede ser realizada por la aplicación de un procedimiento denominado tinción Gram que utiliza como colorantes principales a la violeta de genciana y la safranina, para dotar de color a las bacterias. Por medio de esta técnica se realiza la división de las bacterias en dos grandes grupos de acuerdo a la capacidad de tinción que presentan y se encuentran: las bacterias Gram positivas y las Gram negativas (Lucana y Huanca, 2014).

Las bacterias Gram positivas tienen una gruesa capa de peptidoglucano y dos tipos de ácidos teicoico: el ácido lipoteicoico (ubicado en la cara interna de la pared celular y unida a la membrana plasmática) y el ácido teicoico (que se halla en la superficie, anclado solamente en el peptidoglucano) (Lucana y Huanca, 2014).

Las bacterias Gram negativas no retienen el colorante de cristal violeta durante el proceso de coloración porque presentan una capa muy fina de peptidoglicano en su pared celular y se capa más externa está cubierta por una membrana de lipoproteínas (Figura 18) (Lucana y Huanca, 2014). En la Figura 18, se muestra la estructura bacteriana de Gram positivas y Gram negativas y en la Tabla 6 se muestran las características generales de algunas bacterias estudiadas.

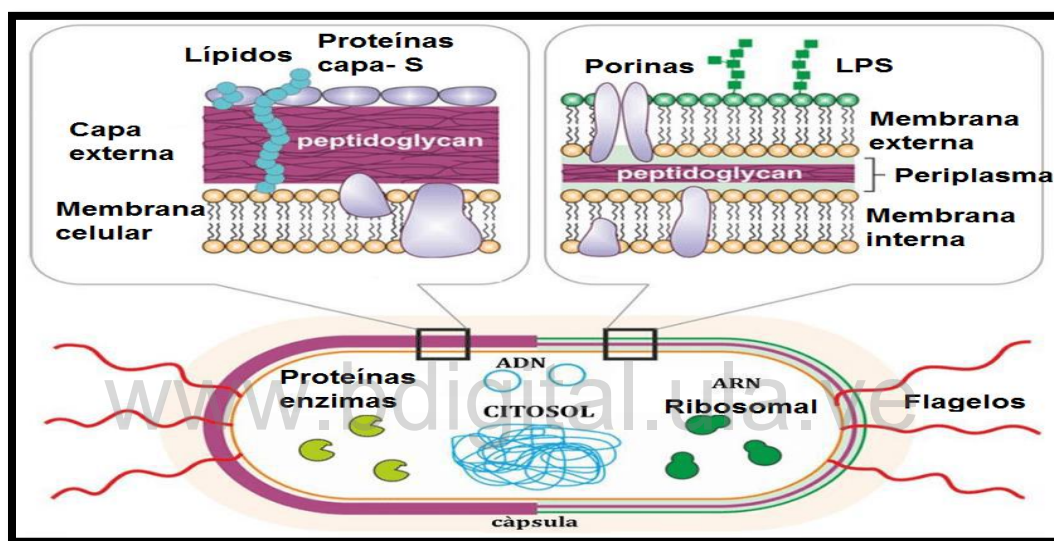


Figura 17. Estructura bacteriana de Gram positivas y Gram negativas.

Tabla 6.

*Características generales y enfermedades producidas por algunas bacterias.*

Bacterias	Nombre	Características Generales	Enfermedad producida
Familia: <i>Micrococcaceae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos Gram positivos. No esporulados Anaerobios facultativos Catalasa positivo	Forúnculos, osteomielitis, meningitis, neumonía, septicemia,
Familia: <i>Enterococcaceae</i>	Nombre: <i>Enterococcus faecalis</i>	Cocos Gram positivos Anaerobios facultativos Catalasa negativo	Infecciones del tracto urinario, bacteriemia, endocarditis

Continuación de la Tabla 6.

Características generales y enfermedades producidas por algunas bacterias

Familia: <i>Pseudomonadaceae</i>	Nombre: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilos rectos Gram negativos No esporulados Aerobios no fermentativos flagelos polares	Patógenos oportunistas asociado a infecciones nosocomiales y usualmente envuelto en infecciones de tejido blando
Familia: <i>Enterobacteriaceae</i>	Nombre: <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacilos Gram negativos No esporulados anaerobios facultativos inmóviles	Patógenos oportunista causante de cuadros neumónicos, también puede causar enteritis y meningitis
Familia: <i>Enterobacteriaceae</i>	Nombre: <i>Escherichia coli</i>	Bacilos rectos Gram negativos No esporulados anaerobios	Infección en vías urinarias

(Martínez, Baquero y Andersson, 2007)

**Mecanismos de resistencia bacteriana.**

Cuando se habla de resistencia bacteriana, se refiere al mecanismo y/o capacidad que tiene un microorganismo para resistir y sobrevivir a los efectos de un antibiótico, o mediante el cual la bacteria puede disminuir o inactivar la acción de los agentes antimicrobianos. Esto es un problema continuo y que va en aumento. Se hace aún mayor cuando un microorganismo presenta más de un mecanismo de resistencia y cuando tiene la facultad de transmitirlo a su descendencia o también a otras bacterias de su misma o diferente especie (Moreno, González y Beltrán, 2009).

**Resistencia natural**

La resistencia natural es un carácter constante de cepas de una misma especie bacteriana y es un mecanismo permanente, su aparición es anterior al uso de los antibióticos, determinado genéticamente y sin correlación con la dosis de antibiótico (Pérez y Robles 2013).

*Se presentan de la siguiente manera:*

- *Transformación:* transferencia o incorporación por una bacteria de ADN libre extracelular procedente de la lisis de otras bacterias.
- *Transducción:* transferencia de ADN cromosómico o plasmídico de una bacteria a otra mediante un bacteriófago (virus que infectan bacterias).
- *Transposición:* movimiento de una sección de ADN (transposon) que puede contener genes para la resistencia a diferentes antibióticos y otros genes cassettes unidos en equipo para expresión de un promotor en particular.
- *Conjugación:* intercambio de material genético entre dos bacterias (donante y receptor), a través de una hebra sexual o contacto físico entre ambas (Serra, 2017).

### **Resistencia adquirida**

La resistencia adquirida, es una característica propia de una especie bacteriana, que por naturaleza es sensible a un antibiótico pero que ha sido modificada genéticamente ya sea por mutación o por adquisición de genes de resistencia. Son evolutivas y su frecuencia depende de la utilización de los antibióticos (Pérez y Robles 2013).

En referencia a la mutación de un gen implicado en el momento de acción de un antibiótico, podemos mencionar el ejemplo de la resistencia a las quinolonas por modificación de la ADN girasa en las enterobacteria o las mutaciones generadas en los genes que codifican a las porinas que trae como consecuencia el bloqueo de ingreso del antibiótico al interior del microorganismo. Por otro lado, la adquisición de genes de resistencia a partir de una cepa perteneciente a una especie idéntica o diferente, esto está dado por plásmidos, transposones e integrones (Pérez y Robles 2013).

### **Mecanismos de acción de los antibióticos.**

Los fenómenos de resistencia antibacteriana son variados, destacando entre ellos cuatro mecanismos principales. En la Figura 19, se muestran los mecanismo de accion de los antibióticos.

#### **Modificación o inactivación del antibiótico mediante enzimas hidrolíticas.**

Las bacterias sintetizan enzimas que hidrolizan al antimicrobiano, destruyendo su acción antibacteriana, sin tener posibilidad de actuar sobre el microorganismo. El ejemplo más representativo son las betalactamasas, enzimas que inactivan el antibiótico al hidrolizar el anillo betalactámico de la molécula. Otra clase importante de antibióticos que son destruidos por enzimas son los aminoglucósidos (Moreno y col., 2009).

#### **Bloqueo de la penetración del antibacteriano mediante modificación del sitio activo.**

La modificación de un aminoácido genera un blanco diferente y así disminuye la afinidad de unión por el antimicrobiano, como se menciona a continuación:

**Modificación de PBP:** el PBP (penicillin-binding-protein) es un complejo enzimático que permite la síntesis del peptidoglucano, un compuesto de la pared celular en bacterias, principalmente en Gram positivas, si se produce mutación del sitio de unión al antimicrobiano como los beta-lactámicos, éstos no pueden actuar y se genera resistencia a ellos.

**Modificación ribosomal:** los genes erm A y erm B producen modificación del sitio activo del ribosoma, mediante metilación. Este mecanismo es importante en la resistencia a macrólidos en *S. pneumoniae* y *S. pyogenes* (Moreno y col., 2009).

### **Disminución de la permeabilidad de la pared celular al ingreso del antimicrobiano.**

Cambios en el diámetro y/o número de porinas puede bloquear el ingreso del antimicrobiano a la bacteria, de esta manera el antibiótico no puede penetrar la superficie bacteriana y alcanzar el núcleo celular, esta es la forma más frecuente de resistencia natural. Es un mecanismo importante en las bacterias Gram negativas, pues poseen canales proteicos denominados porinas que permiten o impiden el paso de moléculas hidrofóbicas (Moreno y col., 2009).

### **Bombas de flujo o expulsión del antibiótico del interior de la célula bacteriana.**

Transporta al antimicrobiano hacia el exterior de la célula sin modificaciones, pero sin acción antimicrobiana. Para ello, la bacteria dispone de bombas de expulsión dependientes de energía, que pueden comportarse como sistemas de eliminación de uno o varios antibióticos (Moreno y col., 2009).

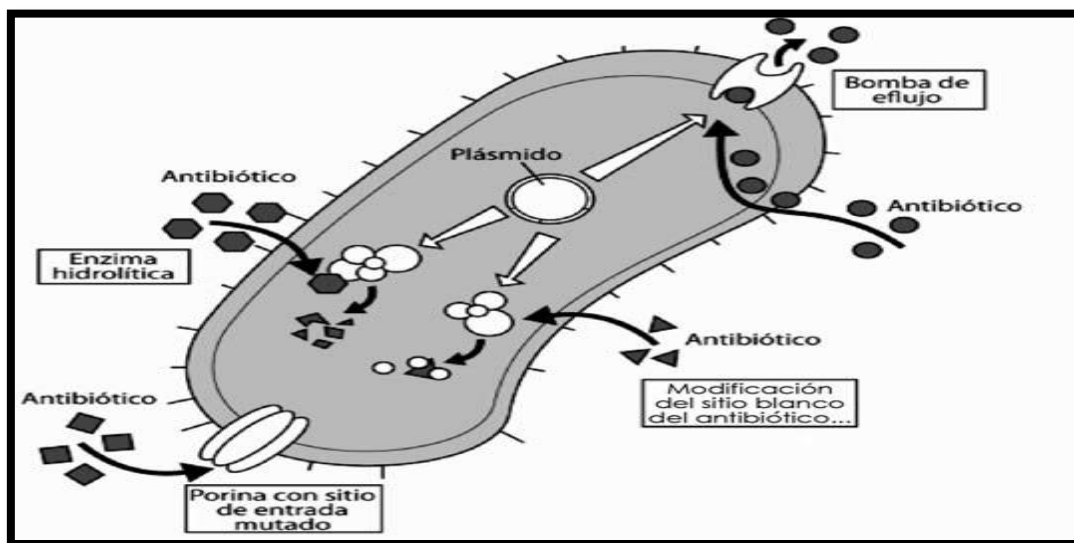


Figura 18. Mecanismo de resistencia de las bacterias a los antibióticos (Moreno y col., 2009).

## **Antibióticos**

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismo (bacterias, hongos, actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros y originan su destrucción, están constituidos por clases muy diversas de compuestos, a menudo se clasifican en diferentes grupos, las más utilizadas son las que se mencionan a continuación (Prats, 2008).

### **Antibióticos según su acción sobre las bacterias**

Estos se clasifican en bacteriostáticos y bactericidas, dependen de si la acción consiste en inhibir el crecimiento o lisar la bacteria, respectivamente (Prats, 2008)

### ***Antibióticos según su mecanismo de acción***

- Elementos que inhiben la síntesis de la pared celular; entre ellas penicilinas y cefalosporina.
- Compuestos que actúan de modo directo en la membrana celular del microorganismo y que afectan su permeabilidad, permitiendo la fuga de compuestos intracelulares; entre ellos están, los detergentes como polimixina y los antimicóticos poliénicos, nistatina y anfotericina B, que se ligan a esteroides de la pared del germen.
- Medicamento que afectan la función de las subunidades ribosómicas 30S o 50S y causan inhibición reversible de la síntesis proteica; estos productos bacteriostáticos incluyen cloranfenicol, tetraciclinas, eritromicina, clindamicina y pristinamicina.
- Compuestos que se unen a la subunidad ribosómica 30S y alteran la síntesis de proteínas, todo lo cual culmina en la muerte del microorganismo; incluye los

aminoglucósidos. Medicamentos que afectan el metabolismo de ácido nucleico como las rifamicinas que bloquea la polimerasa del ARN y las quinolinas, que inhiben a las topoisomerasas.

- Antimetabólicos, como el trimetropin y las sulfonamidas, que bloquean enzimas esenciales del metabolismo del fosfato (Prats, 2008). En la Figuras 20, se muestra el mecanismo de acción de los antibióticos.

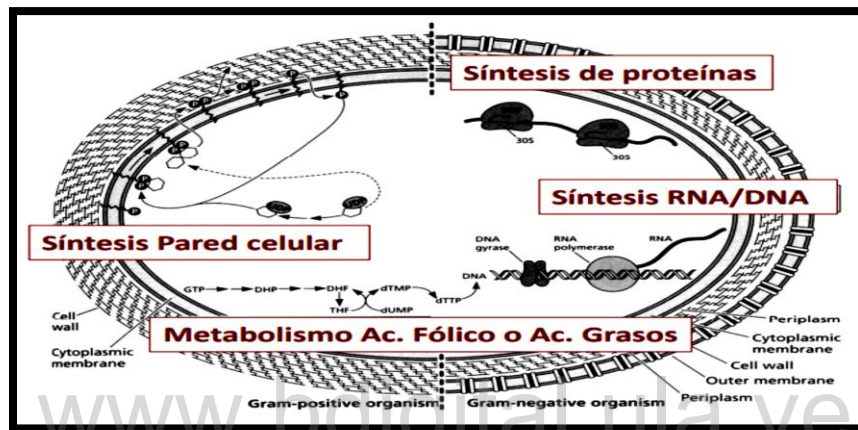


Figura 19. Mecanismo de acción de los antibióticos (Moreno y col., 2009).

## Antibióticos según su acción sobre las bacterias

### *Bactericidas*

- *Betalactámicos.*

Actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular bacteriana, de acción lenta, independiente de la concentración plasmática, presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen de actividad. Sus principales representantes, penicilinas naturales o sintéticas, Cefalosporinas y antibióticos relacionados (I, II, III y IV generación), carbapenémicos, carbacefémicos e inhibidores de  $\beta$ -lactamasa (Marín y Gudiol, 2003).

- *Aminoglucósidos.*

Son un grupo derivados de bacterias del orden de los actinomicetales, del género *Streptomyces*, glucopéptidos y del género *Micronospora*; actúan interfiriendo la síntesis proteica; se inactivan in vitro por la penicilina, antipseudomonas, como la carbenicilina, por ello estos dos agentes no se deben mezclar, son de amplio espectro y presentan alto potencial de toxicidad por lo que deben usarse solo en el tratamiento de infecciones importantes. Sus principales representantes son estreptomicina, gentamicina, tobramicina y aminocaina (Marín y Gudiol, 2003).

- *Glucopéptidos.*

Están representados por la vancomicina, se usa para tratar infecciones por estafilococos resistentes a oxacilina y otras bacterias Gram positivas resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Murray, Rosenthal y Pfauer, 2007).

- *Quinolonas.*

Constituyen una de las clases de antimicrobianos más utilizadas, inhiben la síntesis del ADN bacteriano debido a que provocan el bloqueo de la subunidad A del ADN girasa (topoisomerasas II), diana principal en bacterias Gram negativas. Hoy día presenta resistencia para el tratamiento de infecciones urinarias y ha sufrido por otras quinolonas, como ciprofloxacino, levofloxacino, gatifloxacino y moxifloxacino, conocidos como fluoroquinonas (Murray y col., 2007).

### ***Bacteriostáticos***

- *Lincosamidas*

Son antibióticos naturales y semisintéticos de espectro medio, están formando por dos antibióticos: la lincomicina y la clindamicina, derivado de la lincomicina. Actúan inhibiendo la síntesis de proteínas en el ribosoma bacteriano (Sánchez, Sáenz, Pancorbo, Lanchipa y Zegarra, 2004).

- *Macrólidos*

Son antibióticos con amplio espectro, representados por la eritromicina, producido por *Streptomyces erythreus*. Se han utilizado en el tratamiento de infección del aparato respiratorio debido a los géneros *Mycoplasma*, *Legionella* y *Chlamydia*, así como en el tratamiento de infecciones por especies del género *Campylobacter* y bacterias grampositivas en pacientes alérgicos a penicilina. Casi todas las bacterias grampositivas presentan resistencia a los macrólidos y sus representantes azitromicina y claritromicina (Murray y col., 2007)

- *Tetraciclinas*

Actúan inhibiendo la síntesis de las proteínas bacterianas, representados por dos familias, una de productos naturales (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina y demeclociclina) y otra de productos semisintéticos (metaciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina y tigeciclina) derivados de diferentes especies de *Streptomyces spp.* Presentan actividad frente a una gran variedad de microorganismos, por lo que se han convertido en antibióticos de uso habitual en seres humanos, en animales y en algunas áreas de la agricultura (Pérez e Iglesias, 2003).

- *Cloranfenicol.*

Es un estudio de amplio espectro, aislado inicialmente del *Streptomyces venezuelae*, semejante al de las tetraciclinas, aunque no se emplea de modo frecuente en EE.UU., debido a que no solo interfiere en la síntesis proteica de las bacterias, sino que interrumpe también la síntesis de proteínas en la medula ósea del ser humano, lo que puede producir enfermedades sanguíneas, por ejemplo, anemia aplásica (uno de cada 24.000 pacientes tratados). Este antibiótico ejerce su efecto bacteriostático con la unión reversible al componente peptidil transferasa de la subunidad ribosómica 50S, lo que inhibe la elongación peptídica (Murray y col., 2007).

### **Métodos Para la Determinación de Actividad Antibacteriana**

Las metodologías para la determinación de la actividad antibacteriana de extractos vegetales se pueden clasificar en tres grupos principales:

#### **Métodos de difusión en agar (prueba de Kirby-Bauer).**

El principio en que se basa la técnica del ensayo es bastante simple. Cuando se coloca un disco impregnado de antibiótico en agar en el que previamente se ha inoculado la bacteria objeto de la prueba, el disco capta la humedad y el antibiótico difunde radialmente hacia fuera a través del agar, produciendo un gradiente de concentración del antibiótico. El antibiótico está presente en una concentración alta cerca del disco y afecta incluso gérmenes mínimamente sensibles (los microorganismos resistentes crecen hasta el disco). A medida que aumenta la distancia desde el disco, disminuye la concentración de antibiótico y solo patógenos más sensibles resultan dañados (Prescott, Harley y Klein, 1999).

### ***Método de difusión en pozos (en agar)***

Este método está apoyado por datos clínicos y de laboratorio y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles. La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer (método de Kirby-Bauer). Este método permite determinar en forma cualitativa el efecto antibacteriano de los extractos de plantas sobre los microorganismos de interés, los resultados obtenidos se expresan midiendo el diámetro de los halos de inhibición producidos por los extractos (Sánchez, 2016)

### ***Método de dilución en caldo:***

Se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo caldo o agar (Choma y Giselak, 2011).

### ***Bioautografía:***

Estos pueden ser considerados similares a los métodos de difusión en agar, pero su diferencia radica en que los compuestos de ensayo permanecen adsorbidos en una placa de cromatografía delgada. Esta metodología puede considerarse como un fraccionamiento bio guiado de la matriz, al permitir simultáneamente la identificación de familias fitoquímicas presentes en el extracto a través de cromatografía y así la naturaleza de los compuestos activos (Choma y Giselak, 2011).

## **Actividad Antioxidante**

Los antioxidantes son sustancias que actúan protegiendo al organismo de la acción de los radicales libres, retrasando el proceso de envejecimiento y combatiendo la degeneración

y muerte de las células que provocan los mismos. Existen alimentos que contienen una gran variedad de fitonutrientes, muchos de los cuales tienen estas propiedades, además de la bien conocidas, vitamina C, E y los carotenoides. Existen otros compuestos como los flavonoides (incluyendo flavonas, isoflavonas, flavononas, saponinas y catequinos) que son fuentes antioxidantes (Gutiérrez, Ledesma, Gracia y Grajales, 2007).

Presentan diferentes mecanismos de acción, unos impiden la formación de los radicales libres o especies reactivas (sistema de prevención), otros inhiben la acción de los radicales libres, algunos favorecen la reparación y la reconstrucción de las estructuras biológicas dañadas (sistema de reparación) (Armenteros, Ventanas, Morcuende y Estevés, 2012).

Tradicionalmente se han dividido en dos grupos: antioxidantes primarios o eliminadores de radicales y antioxidantes secundarios o que previenen la oxidación (Permady, 2008).

Los antioxidantes primarios son capaces de inhibir la iniciación y propagación de las reacciones mediante la inactivación de los radicales libres que participan en las reacciones oxidativas, convirtiéndolos en productos estables. Este tipo de antioxidante por lo general son compuestos fenólicos que pueden donar un átomo de hidrogeno o un electrón al radical libre convirtiéndolo en un producto estable (Permady, 2008).

Mientras que los secundarios son compuestos que actúan disminuyendo la formación de radicales libres. Los más utilizados son agentes quelantes de metales como EDTA (ácido etilendiamino tetracético) (Permady, 2008).

Se pueden clasificar como compuestos endógenos producidos por el organismo o compuestos exógenos suministrados con la ingesta de alimentos como es el caso de la vitamina E (Permady, 2008).

En la tabla 7, se muestra el mecanismo de la actividad antioxidante.

Tabla 7.  
*Mecanismo de actividad antioxidante.*

<b>Tipo de antioxidante</b>	<b>Mecanismo de actividad antioxidante</b>	<b>Compuesto químico</b>
Antioxidante	Inactivación lipídica de radicales	Fenólicos
Estabilizadores de hidroperóxido	Prevención de la descomposición de compuestos fenólicos estabilizadores hidroperóxidos en forma gratuita	Fenólicos
Sinergismo	Promover la actividad de propiedades antioxidantes	Ácido cítrico
Quelantes de metales	Unión de metales pesados y compuestos inactivos	Ácido fosfórico
Sustancias que reducen los hidroperóxidos	Reducción de hidroperóxidos de una manera no radical	Proteínas y aminoácidos

(Wu, Huang, Lin, y Wang, 2005)

## **Radicales Libres**

Los radicales libres de oxígeno causan daño oxidativo y este se ha visto implicado en la etiología o patología de más de cien enfermedades diferentes, entre las que se encuentran diferentes tipos de cáncer, enfermedades cardíacas y vasculares, diabetes y desordenes neurovegetativos (Reitter, 1995).

Un radical libre es cualquier molécula que contiene uno o más electrones no apareados. En las células aeróbicas existen diversas vías que conducen a la producción de radicales libres derivados del oxígeno (Reitter, 1995).

### **Clasificación de los radicales libres.**

Los radicales libres del oxígeno se clasifican de la forma siguiente (Brand Cuvelier y Berset, 1995).

1. *Radicales libres inorgánicos o primarios.* Se originan por transferencia de electrones sobre el átomo de oxígeno, representan por tanto distintos estados en la

reducción de este y se caracteriza por tener una vida media muy corta; estos son el anión superóxido, el radical hidroxilo y el óxido nítrico

2. *Radicales libres orgánicos o secundarios.* Se pueden originar por la transferencia de un electrón de un radical primario a un átomo de una molécula orgánica o por la reacción de 2 radicales primarios entre sí, poseen una vida media un tanto más larga que los primarios; los principales átomos de las biomoléculas son: carbono, nitrógeno, oxígeno y azufre.
3. *Intermediarios estables relacionados con los radicales libres del oxígeno.* Es un grupo de especies químicas que, sin ser radicales libres, son generadoras de estas sustancias o resultan de la reducción o metabolismo de ellas, entre las que están el oxígeno, el peróxido de hidrogeno, el ácido hipocloroso y el peroxinitrito.

### **Enfermedades asociadas a las especies reactivas de oxígeno**

A pesar que la célula posee valiosos mecanismo antioxidantes y reparadores que suponen una defensa eficiente frente a la agresión oxidativa, en determinadas ocasiones no son suficientes y el daño oxidativo permanece como un resultado imposible de evitar de la existencia aerobia. El estrés oxidativo se encuentra involucrado en una amplia variedad de procesos degenerativos, enfermedades y síndromes tales como: mutagénesis, transformación celular, cáncer, arterosclerosis, infartos, alteración del sistema nervioso central y estrés foto oxidativo ocular (Boticario y Cascales, 2009).

### **Método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)**

Este método fue propuesto originalmente por Brand Williams. El DPPH es uno de los pocos radicales orgánicos estables, presentan una fuerte coloración violeta, es

comercialmente disponible y no tiene que ser generado *in situ* como el 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) (Reitter, 1995).

El ensayo se fundamenta en la medición de la capacidad de un antioxidante para estabilizar el radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo) (35, Figura 20), esta medición puede hacerse espectrofotométricamente siguiendo el decaimiento de la absorbancia a 517 nm (Reitter, 1995).

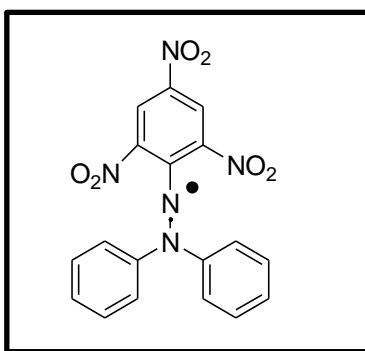


Figura 20. Estructura química del radical libre metaestable DPPH (35)

El resultado se suele expresar como la concentración eficaz a medidas máxima, es decir, la concentración de antioxidante necesaria para estabilizar un 50% del DPPH. Sin embargo, han surgido otros parámetros como la eficiencia anti-radicalaria basada en cinética de la reacción y que involucran, además de la concentración de antioxidante, el tiempo necesario para ejercer su efecto (Reitter, 1995).

Entre las ventajas de este método están su simplicidad y el bajo requerimiento instrumental, sin embargo, entre las desventajas están la dificultad de interpretar los resultados cuando se tienen sustancias cuyo espectro de absorción se solapa con el radical, adicionalmente el DPPH es un radical estable, centrado en nitrógeno, que dista mucho de parecerse a las especies reactivas de importancia biológica (Reitter, 1995).

Muchos antioxidantes que reaccionan rápidamente con radicales peroxilo no lo hacen así con DPPH, debido al impedimento estérico que representan la estructura química que rodea al radical, lo cual hace que sustancias pequeñas generalmente muestren una mayor actividad (Reitter, 1995).

### Reacción de DPPH

Este método permite evaluar la actividad de sustancias frente al radical libre estable DPPH (35), en una solución metanólica que tiene un color violeta intenso que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra que contiene antioxidantes. Así, el grado de decoloración de la solución indica la eficiencia de la capacidad secuestrante de la sustancia agregada. La decoloración del radical se determina a 517 nm y la cuantificación se realiza empleando soluciones patrón de ácido gálico o ácido ascórbico (Reitter, 1995).

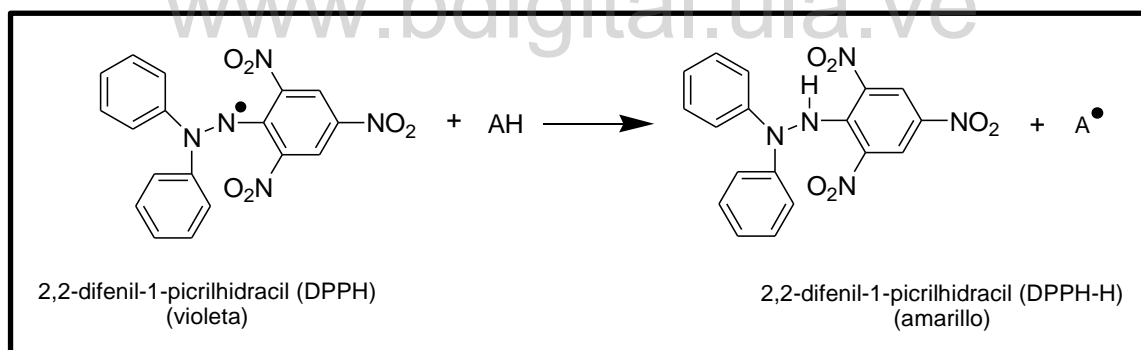


Figura 21. Reacción del radical DPPH con un compuesto antioxidante

### Actividad determinación de toxicidad sobre *Artemia salina*.

*Artemia salina*, también llamado camarón amarillo, son camarones minúsculos de cuerpo blando, de color carmelita y transparente a la luz (Pino y Lazo., 2010).

## **Taxonomía:**

División:	Arthropoda
Clase:	<i>Crustaceae</i>
Subclase:	Branchiopoda
Familia:	Artemiidae
Género:	<i>Artemia</i>
Especie:	<i>Artemia salina</i>

Conocida comúnmente por el nombre de: *Artemia*, “monos de mar” o en inglés “brine shrimo”. El género *Artemia* está compuesto por varias especies, de las cuales se han identificado al menos cuatro especies bisexuales, entre ellas *Artemia salina* Leach, *Artemia persimilis* Piccinello y *Prosdocimi*, *Artemia franciscana* Kellogg (bisexual) y *Artemia partenogénica* Bowen y Sterling (Pino y Lazo., 2010).

El crustáceo de *Artemia salina* vive en aguas hipersalinas, salobres y pueden crecer a temperaturas entre 6 y 35 °C, se alimentan de algas y bacterias además son fuentes de alimento para peces, pájaros y varios invertebrados, Las hembras producen huevos que en condiciones externas favorables, eclosionan produciendo larvas de un tamaño aproximado de 1 mm. Los huevos también pueden formar quistes y permanecer en esta forma por un año o más. La *Artemia* en condiciones favorables, se convierten en adultos transcurridas 6 a 8 semanas, alcanzando un tamaño promedio de 7 mm (Pino y Lazo., 2010).

Los nauplios o larvas de este crustáceo, actúan como un indicador natural en la presencia de toxicidad en las fuentes donde se desarrollan, estos son altamente sensibles a una gran variedad de sustancias químicas y extractos de plantas con actividad biológicas, por lo tanto, son útiles para medir el potencial tóxico de una sustancia. Este organismo también es

empleado como indicador en estudios ambientales, tamizajes de toxinas ambientales y naturales (Pino y Lazo., 2010).

Es así como, el primer reporte de su uso como organismo de prueba aparece en 1956, descrito por Michael, posteriormente en 1982 fue adaptado por Meyer como un bioensayo preliminar útil en la investigación de toxicidad en productos naturales. Un nuevo ensayo, para evaluar toxicidad frente a *Artemia salinas* en microplacas, mostrando resultados comparables al método de tubo de ensayo publicado previamente. Este estudio requiere pequeñas cantidades del extracto y facilita evaluar un gran número de muestras y diluciones (Pino y Lazo., 2010).

*Artemia* es hasta la fecha el único género animal en todo el mundo cuyo estado criptobiótico (quistes) está disponible comercialmente de manera continua, como fuente de alimentos para peces y crustáceos en acuicultura. Esto ha constituido un elemento clave en su utilización en ensayos biológicos. Por razones prácticas, las especies con un estado criptobiótico, durante su ciclo de vida son más adecuadas para el desarrollo de un bioensayo estándar. La disponibilidad permanente de huevos (quistes) a partir de los cuales pueden ser obtenidas las larvas ofrece las siguientes ventajas:

- No hay necesidad de mantener una colonia viva permanentemente.
- Las pruebas pueden realizarse donde y cuando sea necesario
- Se dispone siempre de un número suficiente de individuos de la misma edad y condición fisiológica (Pino y Lazo., 2010).

Este bioensayo de toxicidad *in vivo* es un método rápido, simple y de bajo costo, y ha presentado una buena correlación con la citotoxicidad de algunas líneas celulares

tumorales, sin embargo, no representa en medio eficaz para la predicción de la actividad antitumoral (Pino y Lazo., 2010).

El procedimiento consiste, en exponer los compuestos activos y los extractos naturales, a los nauplios de *A. salina* para determinar valores de dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>), de los cuales se considera como extractos tóxicos, aquellos con una DL<sub>50</sub> ≤ 30 µg/mL. Los valores obtenidos de DL<sub>50</sub> no advierte una actividad fisiológica o biológica en particular, solo son indicadores de toxicidad a nivel celular que pueden orientar investigaciones más específicas (Pino y Lazo., 2010).

### **Definición Operacional de Términos**

#### **Halos de inhibición**

Los halos de inhibición es la zona alrededor de un disco de antibióticos en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen (Bernal y Guzmán, 1984).

#### **Cepa**

Población de células de una sola especie descendientes de una única célula, usualmente propagada clonalmente, debido al interés en la conservación de sus cualidades definitorias (Bernal y Guzmán, 1984).

## **Radical libre**

Son átomos o grupos de átomos que poseen un electrón desapareado, deben su alta reactividad a la tendencia a captar un electrón de moléculas estables en búsqueda de alcanzar su estabilidad electroquímica (Avello y Suwalsky, 2006).

## **Oxidación**

Es la reacción producida por la acción del oxígeno sobre cualquier sustancia a la que altera (Reitter, 1995).

## **Toxicidad**

Es la capacidad de alguna sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él (Moreno, López y Corcho, 2000).

## **Mortalidad**

Expresa la dinámica de las muertes acaecidas en las poblaciones a través del tiempo y el espacio, y sólo permite comparaciones en este nivel de análisis (Moreno, y col., 2000).

## **Letalidad**

Es la proporción de casos de una enfermedad que resultan mortales con respecto al total de casos en un periodo especificado (Moreno y col., 2000).

## **Dosis letal 50**

Es la dosis que causa la muerte al 50 % de los individuos que la reciben (García, Valverde, Agudo, Novales y Luque, 2019).

## **Operacionalización de las Variables**

Las variables se operacionalizan con la finalidad de transformar los conceptos abstractos en empíricos. En consecuencia, se podrán medir a través de los indicadores respectivos. En tal sentido se operacionalizará las variables dependientes actividad antibacteriana, la actividad antioxidante y toxicidad mientras que la variable independiente componentes químicos presentes en el extracto de *Physalis peruviana* L.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)

Tabla 8.

*Operacionalización de las variables.*

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimisión categorías	Indicador
Composición química de los extractos metanólicos de <i>P. peruviana</i> L.	Independiente	Es un proceso que comprende el estudio de los metabolitos secundarios de origen vegetal y la metodología que se sigue depende de los objetivos de tales estudios (Marcano Hasegawa, 2002)	A través de tamizaje fitoquímico.	Presencia de los compuestos fenólicos, Fito esteroides, carotenoides, flavonoides, alcaloides, triterpenos, ceramidas, fenilpropanoides	Cambio de color, formación de precipitado, fluorescencia, turbidez entre otros.
Actividad antibacteriana	Dependiente	Es la capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de una población bacteriana o para eliminarla (Fica, 2005).	Por medio del método Kirby Bauer (difusión en pozos).	Sensible Sensibilidad intermedia Resistencia	Halos de inhibición del crecimiento bacteriano medidos en milímetros
Actividad antioxidante	Dependiente	Se centra principalmente en la búsqueda de compuestos capaces de capturar radicales del medio ambiente que lo rodea (Contreras y col., 2017).	A través del método DPPH.	Compuestos: Fenólicos, Flavonoides, Taninos.	Aparición de color amarillo o decoloración del DPPH. Medición del % de inhibición.
Toxicidad sobre <i>Artemia salina</i>	Dependiente	Son bio ensayos empleados para reconocer y evaluar los efectos de los contaminantes sobre la biota. En los bioensayos se usa un tejido vivo, organismo, o grupo de organismos, como reactivo para evaluar los efectos de cualquier sustancia fisiológicamente activa (Buikema 1982).	A través de un bioensayo de letalidad sobre nauplios de <i>Artemia salina</i> .	Extremadamente tóxico Altamente toxico Moderadamente tóxico Ligeramente tóxico Prácticamente no tóxico Relativamente inocuo	Valores de DL <sub>50</sub>

## Sistema de Hipótesis

### Hipótesis Alternativa (H1)

De acuerdo a la composición química reportada, a *Physalis peruviana* L., se le atribuye una gran variedad de efectos farmacológicos, por lo anteriormente expuesto es posible que los extractos metanólicos de las partes aéreas de esta especie., recolectada en el estado Mérida Venezuela, presenten actividad antibacteriana, actividad antioxidante y poca toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*.

### Hipótesis Nula (H0)

De acuerdo a la composición química reportada, a *Physalis peruviana* L., se le atribuye una gran variedad de efectos farmacológicos, por lo anteriormente expuesto es posible que los extractos metanólicos de las partes aéreas de de esta especie, recolectada en el estado Mérida Venezuela, no presenten actividad antibacteriana, ni antioxidante y presenten toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*.

## CAPITULO III

### MARCO METODOLOGICO

#### Tipo de Investigación

Según Hurtado (2010), los tipos de investigación pueden ser: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. Particularmente, la investigación de tipo confirmatoria se lleva a cabo cuando ya existen investigaciones previas de carácter exploratorio, descriptivo y explicativo, y a la vez, se puede predecir el efecto a partir de la causa o inferir la causa a partir del efecto. . Por lo tanto, la presente investigación es de tipo confirmatorio, ya que se basó en estudiar la composición química de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L., para demostrar la actividad biológica (capacidad antibacteriana, antioxidante y toxicidad sobre *A. salina*).

#### Diseño de la Investigación

Según Hurtado (2010), el diseño de la investigación se refiere a las estrategias que se implementarán para recolectar la información en una fuente determinada, en un tiempo específico y en una cantidad o amplitud asociada a lo que se quiere saber. Por lo tanto, la investigación tendrá un diseño tipo experimental, porque la especie vegetal fue sometida a determinadas condiciones, estímulos o tratamiento, para observar los efectos o reacciones que se producían en la variable dependiente. El diseño de investigación experimental es netamente explicativo, por lo tanto, su propósito es demostrar que los cambios en la variable dependiente fueron causados por la variable independiente. Es decir, se pretende

establecer con precisión una relación causa-efecto. Este estudio se realizó en un lapso de tiempo determinado, por lo tanto, también es un tipo de diseño de investigación transversal.

### **Población y Muestra**

#### **Unidad de Investigación**

Hurtado y Toro (1999), definen como población al conjunto para la cual serán válidas las conclusiones que se obtenga para los elementos y unidades (personas, instituciones o cosas), que se van a estudiar. En el presente estudio, la población está conformada por la especie vegetal *Physalis peruviana* L.

#### **Selección del Tamaño Muestral**

De la población señalada se tomó una muestra no probabilística, la cual, según Hernandez y col. (2006) corresponde al “tipo muestra cuya selección no depende de que todas tengan la misma probabilidad de ser elegidos, sino la decisión de un investigador. Esta muestra estuvo integrada por la recolección de un kilogramo de cada uno de: hojas, tallos y frutos, de la especie vegetal *P. peruviana* L.

#### **Sistema de Variables**

**Variable independiente:** componentes químicos presente en los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L.

**Variabes dependientes:** actividad antibacteriana, actividad antioxidante y toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*.


## Instrumento de Recolección de Datos

Se realizó mediante observación directa de los resultados de la experimentación: Medición de los halos de inhibición en actividad antibacteriana, porcentaje de inhibición en actividad antioxidante, y el porcentaje de letalidad (DL<sub>50</sub>) para determinar la toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina*, los datos arrojados fueron recolectados en tablas para su posterior análisis estadístico e interpretación de los resultados.

### Procedimiento de la Investigación

#### Material vegetal

Las hojas, tallos y frutos de *Physalis peruviana* L., fueron recolectadas en el sector El Arado 2, El Valle, Municipio Libertador Mérida. La identificación botánica la realizó el Ing. Juan Carmona, adscrito al Departamento de Farmacognosia y Medicamentos Orgánicos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. El Vaucher (02) fue depositado en el herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes.

 UNIVERSIDAD DE LOS ANDES FACULTAD DE FARMACIA MÉRIDA - VENEZUELA HERBARIO	<i>Fecha:</i> 12/01/16	<i>Colectores:</i> Marielba Morillo & Virginia Marquina	<i>Número:</i> 02
	DET.: Juan Carmona		

SOLANACEAE

Physalis peruviana L.

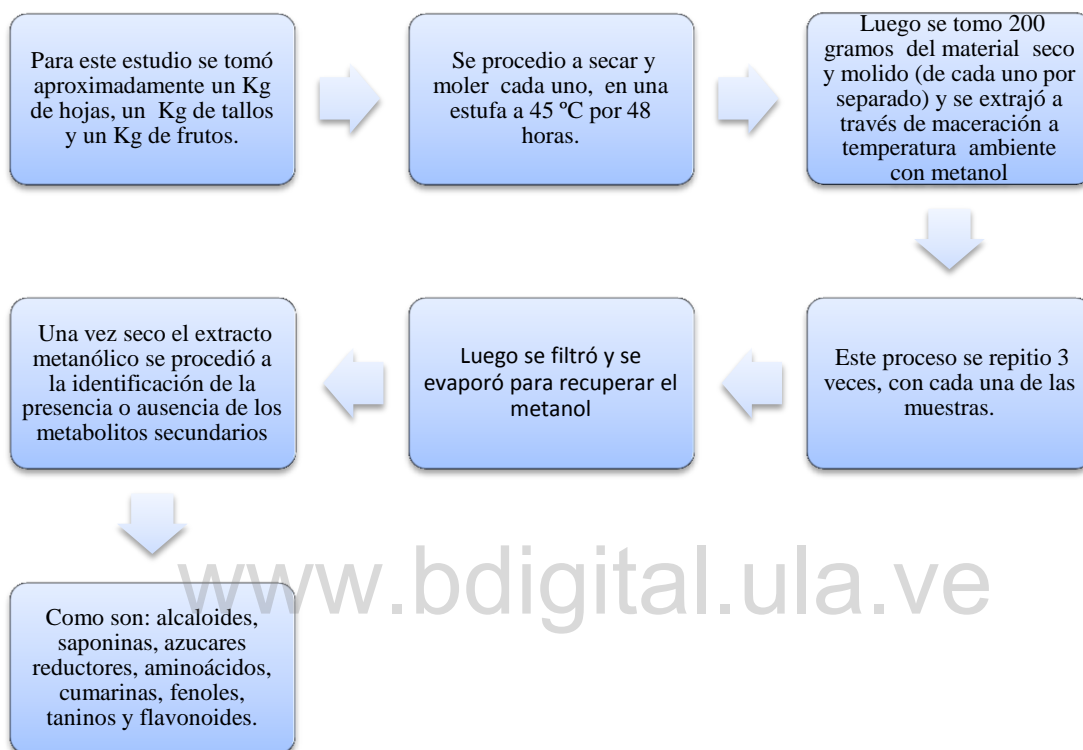
Hierba, pubescente de aproximadamente 50cm de alto. Hojas alternas, dentadas, cordiformes. Flores amarillas con manchas purpúreas en el interior de la garganta. Fruto una baya envuelta por el cáliz

LOCALIDAD: Venezuela. Edo. Mérida. Municipio Libertador. El Valle Arado A

Figura 22. Información del voucher de la planta

## Obtención de los Extractos

En el Esquema 1, se muestra el procedimiento para la obtención de los extractos y determinación cualitativa de la composición química de los mismos.



Esquema 1. Procedimiento para la obtención de los extractos y determinación cualitativa de la composición química de los mismos.

Para este estudio se tomó aproximadamente un Kg de hojas, un Kg de tallos y un Kg de frutos, se procedió a secar y moler en una estufa a 45 °C por 48 horas. Luego se tomó 200 g de cada uno de los materiales vegetales (secos y molidos) y se colocaron en un erlenmeyer con aproximadamente 200 mL de metanol (para extraer los componentes del material vegetal a través de maceración a temperatura ambiente. Este proceso se repitió 3 veces, para cada uno, se filtró y se evaporó para recuperar el metanol, cada uno de los extractos se almacenaron en frascos herméticamente tapados, previamente rotulados y tarados.

Los extractos fueron pesados y de cada uno de ellos se obtuvo la siguiente cantidad en gramos:

- Extracto de las hojas: 4,68
- Extracto de los tallos: 2,44 g
- Extracto de los frutos: 9,33 g

En la Figura 24, se muestra la balanza marca Denver Instrument XL 3100 donde se pesaron los extractos metanólicos.



Figura 23. Balanza analítica Denver Instrument XL 3100

#### **Rendimiento de los extractos metanólicos:**

##### **Extracto metanólico de las hojas:**

200 g ----- 100 %
4,68 g ----- X
X= 2,34 %

##### **Extracto metanólico de los tallos:**

200 g ----- 100 %
2,44 g ----- X
X= 1,22 %

### Extracto metanólico de los frutos:

200 g ----- 100 %
9,33 g ----- X
X= 4,67 %

### Tamizaje Fitoquímico

Para determinar la presencia de los grupos de metabolitos secundarios presentes en cada extracto, se efectuaron una serie de pruebas, entre estas se encuentran: ensayo de Liberman-Burchard (terpenos y/o esteroides), ensayo de Shinoda (flavonoides), prueba de Dragendorf, Wagner y Meyer (alcaloides), ensayo de cloruro férrico (fenoles), prueba de la gelatina (taninos) y prueba de la espuma (saponinas).

#### Terpenos y/o esteroides

##### *Ensayo de Liberman-Burchard*

*Técnica:* se disolvieron los tres extractos en 0,5 mL de diclorometano anhidro. Se añadió 0,5 mL de anhídrido acético a cada uno. Luego se le adicionó cuidadosamente por las paredes del tubo una gota de ácido sulfúrico concentrado. Se considera positiva la prueba cuando aparece un color rojo, verde o azul.

#### Alcaloides

##### *Ensayo de Dragendorf, Wagner y Meyer*

*Técnica:* se pesaron 100 mg del extracto metanólico y se le adicionó 10 mL de HCl y se colocaron en baño de maría hasta ebullición por 30 minutos. Se filtró y el filtrado se

distribuyó en 3 tubos de ensayo. Se adicionó a cada tubo gotas del reactivo correspondiente (Dragendorff, Wagner y Meyer). La aparición de turbidez o precipitado indica la positividad de la prueba.

## **Fenoles**

### ***Prueba con FeCl<sub>3</sub>***

*Técnica:* se añadió 1 mL de solución alcohólica de cada una de los extractos, se agregó una gota de solución acuosa de cloruro férrico al 10 %. La formación de color azul o verde indicó la presencia de fenoles.

## **Flavonoides**

### ***Ensayo de Shinoda***

*Técnica:* se tomó 1 mL de solución de cada extracto. Se añadieron algunas virutas de Mg, se sujetó el tubo con una pinza, se añadió cuidadosamente por la pared del tubo unas gotas de HCl concentrado. La aparición de una coloración naranja o violeta, se considera una prueba positiva.

## **Saponinas**

### ***Ensayo de la espuma***

*Técnica:* se colocó en un tubo una pequeña cantidad de cada uno de los extractos y se le adicionó 1 mL de agua. Se agito vigorosamente durante un minuto. La prevalencia de la espuma durante más de 5 minutos indico la positividad de la prueba.

## **Taninos**

### ***Prueba de la gelatina***

*Técnica:* la fracción metanólica seca se disolvió en agua, aparte se preparó una solución al 10 % de gelatina y se puso en contacto con el extracto acuoso. La desnaturalización de la proteína que se evidencia con la presencia de un precipitado o la ruptura de la gelatina, se considera positiva la prueba.

## **Cumarinas**

### ***Prueba luz UV***

*Técnica:* disolver el extracto en su propio solvente (0,5 mL). Adicionar 2 gotas de hidróxido de amonio concentrado. Se considera positiva la prueba si se presenta una fluorescencia azul-violeta bajo luz UV.

## **Quinonas**

*Técnica:* se adicionan gotas de hidróxido de amonio concentrado al extracto disuelto en etanol y se considera positiva la prueba para antraquinonas al tener la presencia de una coloración roja que aparece en los 2 primeros minutos

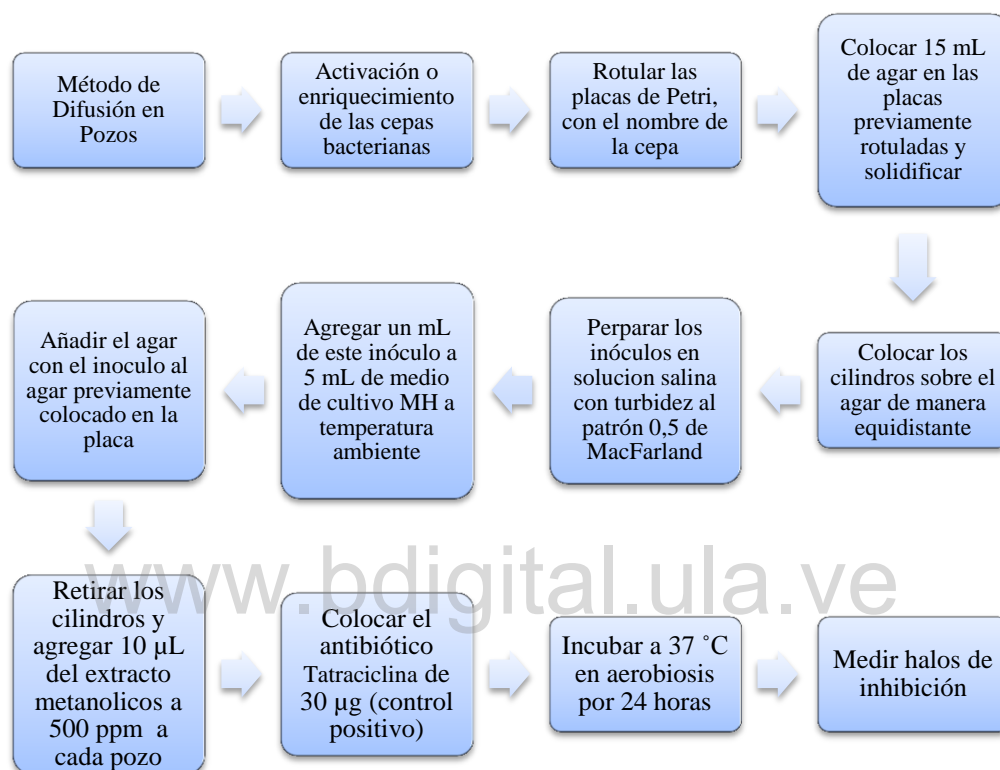
## **Evaluación de la actividad biológica**

### **Evaluación de la actividad antibacteriana**

La determinación de la actividad antibacteriana se llevó a cabo en el Laboratorio de Vacunas, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, ULA bajo la supervisión de la Dra. Vanessa Hernández.

## Técnica difusión en pozos (Método Kirby Bauer modificado)

En el Esquema 2. Se muestra el procedimiento para la realización del método de difusión en pozos.



Esquema 2. Procedimiento para la realización del método de difusión en pozos.

Se depositó el inóculo y se sembró sobre las superficies del agar selectivo estipulado para este método, seguido de ello se hicieron los pozos sobre la superficie del agar con apoyo de un sacabocado estéril de 6 mm de diámetro y en cada uno de ellos se depositó de 10 a 25  $\mu$ L de los extractos a evaluar, estándares (control positivo y negativo) y blanco por triplicado, se dejó reposar por espacio de 30 minutos (para evaporar el líquido), finalmente se inoculó con la caja invertida a 37 °C por 24 horas, posteriormente se midieron los halos de inhibición.

### **Técnica empleada.**

Para evaluar el potencial antibacteriano de los extractos metanólicos, se prepararon diluciones a una concentración de 500 ppm. Se seleccionaron las cepas bacterianas a estudiar: cepas ATCC Gram positivas y Gram negativas. En la tabla 12 se muestran las cepas ATCC utilizadas.

Tabla 9.  
*Cepas utilizadas para realizar las pruebas de sensibilidad y susceptibilidad.*

<b>MICROORGANISMO</b>	<b>ATCC</b>	<b>TINCIÓN DE GRAM</b>
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	POSITIVA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 23357	NEGATIVA
<i>Echerichia coli</i>	ATCC 25922	NEGATIVA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	NEGATIVA

*Se preparó el agar semilla.* Para la preparación del agar Mueller-Hinton (MH), se tomaron 13,3 g del polvo de agar y se disolvieron en 350 mL agua caliente purificada y se mezcló. La solución se llevó al microondas hasta que se formó una espuma de más de un 1 cm de grosor, verificando que el agar estuviera transparente lo que indica que el agar se fundió completamente. Se llenaron 15 tubos con 5 mL de agar MH y 15 tubos con 15 mL del mismo, se llevaron a autoclave por 15 minutos a 121 °C a 15 libras de presión para esterilizarlos. En la Figura 25, se muestra el procedimiento de preparación del agar Mueller Hinton.



Figura 24. Preparación del agar *Mueller Hinton*.

**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 en medio agar Nutriente o agar Infusión Cerebro Corazón (BHI), hasta que se logró una turbidez óptica correspondiente al patrón MacFarland N° 05 (D.O. 0,08 – 0,10 a 625 nm), con la ayuda de un espectrofotómetro, que equivale a  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL

**Inoculación y preparación de las placas de Petri:** una vez preparado el inóculo de cada bacteria, un mL de este inóculo fue añadido a 15 mL de medio de cultivo *Mueller-Hinton* a temperatura ambiente. Este inóculo fue añadido a los 15 mL del agar en las placas de Petri y se dejaron a temperatura ambiente hasta que el medio solidificó.

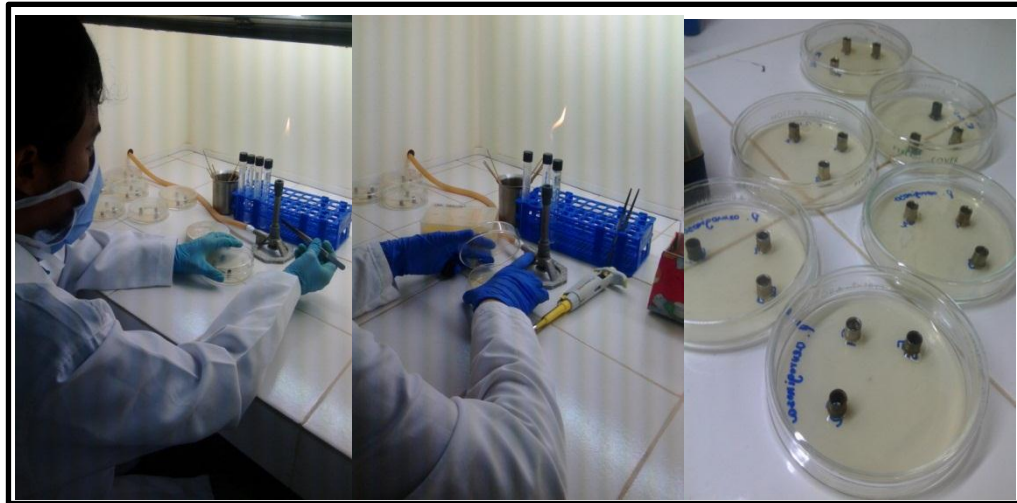


Figura 25. Preparación e inoculación de las placas de Petri

**Controles.** El ensayo se realizó por triplicado utilizando como control negativo el solvente DMSO (Dimetil sulfoxido) y como control positivo se agregó un disco de antibiótico de Tetraciclina (esta indicó si efectivamente había crecimiento correcto de las cepas en estudio y si son sensibles a los antibióticos comerciales).

**Incubación.** Las placas se incubaron a una temperatura de 36 °C durante 24 horas. En la Figura 26, se muestra la incubadora donde se colocaron las placas.



Figura 26. Incubadora que se encuentra en el Laboratorio de Vacunas, del Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

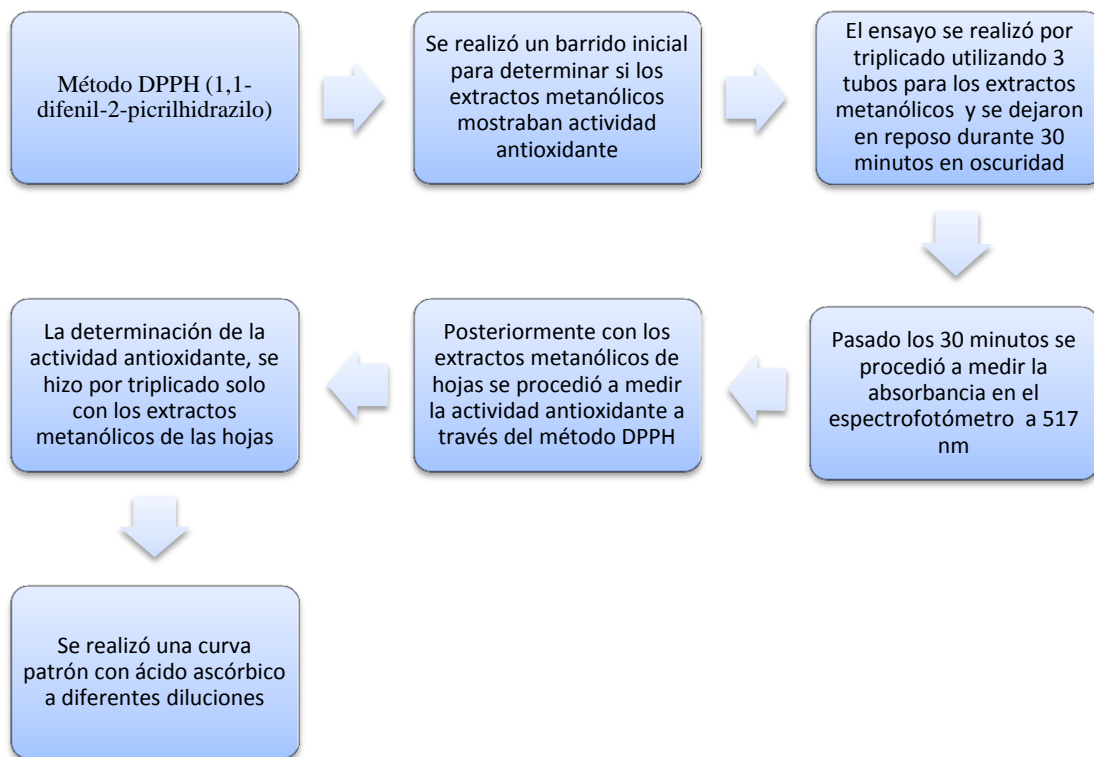
***Determinación de la sensibilidad.*** La sensibilidad se determinó por la medida del diámetro del halo de inhibición de crecimiento, donde los halos mayores o iguales a 14 mm se consideraron halos de inhibición significativos, de acuerdo con el protocolo establecido por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2011).

#### **Actividad antioxidante por el método DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)**

La determinación de la actividad antioxidante se llevó a cabo en el Departamento de Plantas Medicinales y Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y en el Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

En el Esquema 3, se muestra el procedimiento para la determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH, de los extractos metanólicos de *P. peruviana* L.

[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)



Esquema 3. Pasos de la determinación de la actividad antioxidante por el método de DPPH.

Se realizó un barrido inicial para determinar si los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L., mostraban actividad antioxidante. Para ello se tomaron 4 mg de los extractos y se colocaron en un tubo eppendorf y se diluyó con 1 mL de metanol.

El ensayo se realizó por triplicado utilizando 3 tubos para los extractos metanólicos los cuales contenían 700  $\mu$ L de DPPH y 300  $\mu$ L de la dilución anterior, estos se dejaron en reposo durante 30 minutos en oscuridad. Pasado los 30 minutos se procedió a medir la absorbancia en el espectrofotómetro Genesys 10 Bio Thermo Electron Corporation a una longitud de onda de 517 nm. En la Figura 27, se muestra el espectrofotómetro Genesys 10 Bio Thermo Electron Corporation



Figura 27. Espectrofotómetro Genesys 10 Bio Thermo Electron Corporation

En la Tabla 10, se muestran las diluciones para preparar una solución madre de concentración 1 mg/mL y se especificó las cantidades exactas en  $\mu\text{L}$ , que se tomaron de la solución madre y del solvente metanol.

Tabla 10.

*Diluciones empleadas para preparar la solución madre a una concentración 1 mg/mL.*

	500 $\mu\text{g/mL}$	250 $\mu\text{g/mL}$	150 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$
Madre (1mg/mL)	500 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	25 $\mu\text{L}$
Metanol	500 $\mu\text{L}$	750 $\mu\text{L}$	850 $\mu\text{L}$	900 $\mu\text{L}$	950 $\mu\text{L}$	975 $\mu\text{L}$

En la Figura 28, se muestra la preparación de las diluciones del extracto metanólico de las hojas de *Physalis peruviana* L.



Figura 28. Preparación de las diluciones del extracto metanólico de las hojas de *Physalis peruviana* L.

Se realizó una curva patrón con ácido ascórbico a diferentes concentraciones, partiendo de una solución madre con una concentración de 1 mM (17,6 mg en 100 mL de metanol).

En la Tabla 11 se muestra Las concentraciones de las diluciones para realizar la curva del ácido ascórbico y se especificó las cantidades exactas en  $\mu\text{L}$ , que se tomaron de la solución madre y del solvente metanol.

Tabla 11.

*Diluciones empleadas para realizar la curva patrón de ácido ascórbico.*

	0,088 mg/mL	0,044 mg/mL	0,022 mg/mL	0,011 mg/mL
Madre (0,176 mg/mL)	500 $\mu\text{L}$	250 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$
Metanol	500 $\mu\text{L}$	750 $\mu\text{L}$	900 $\mu\text{L}$	950 $\mu\text{L}$

La determinación de la actividad antioxidante, se hizo por triplicado solo con los extractos metanólicos de las hojas de *Physalis peruviana* L, que fue el extracto que mostró % de inhibición por encima del 50%.

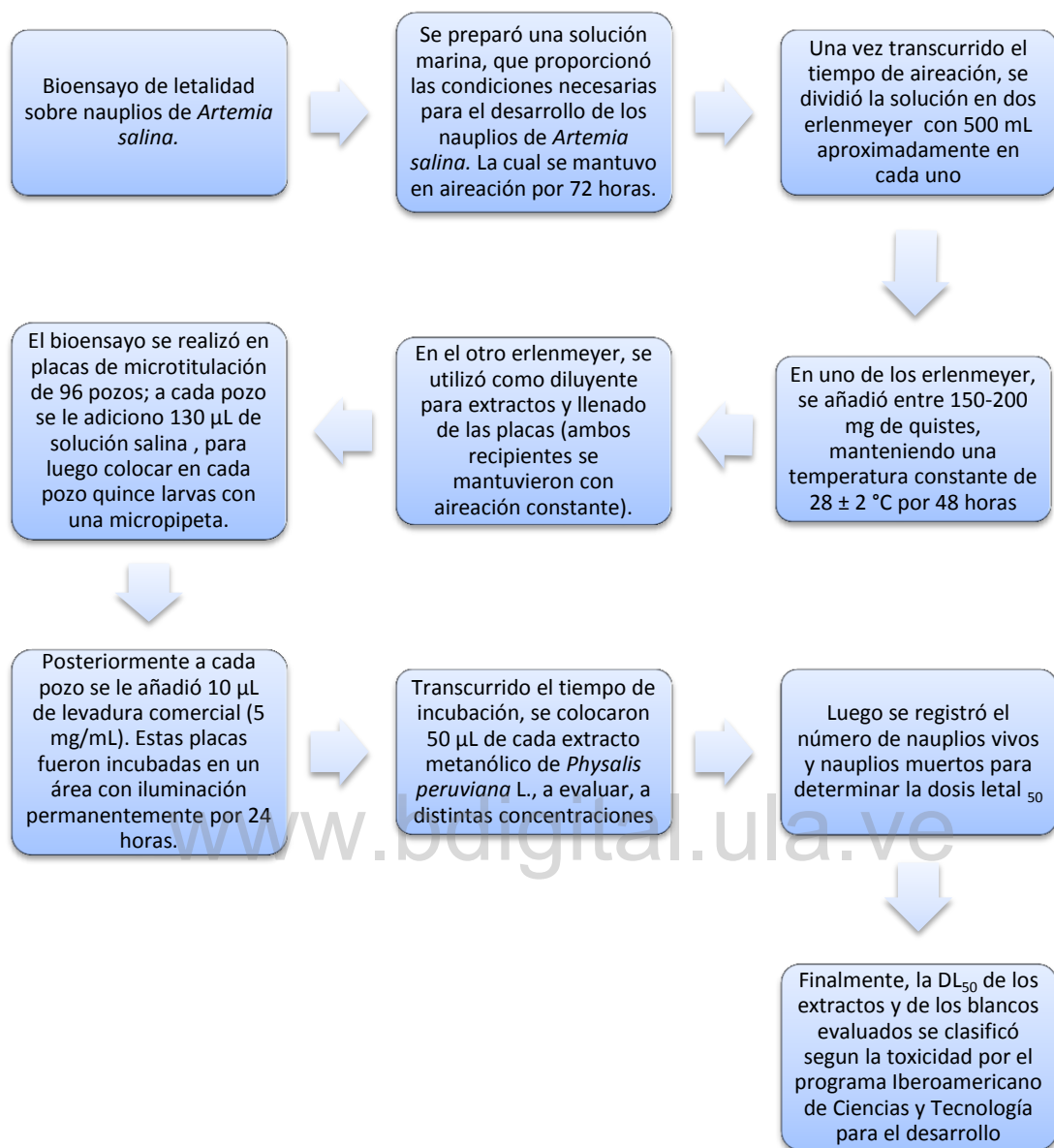
#### **Análisis estadístico:**

El estudio estadístico se realizó con el programa IBM SPSS versión 21 año 2012, Statistict editor de datos (Tabla 18), y se completó con un análisis ANOVA de una sola vía (Tabla 19).

#### **Evaluación de la toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina***

La determinación de la toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina* se realizó en el Departamento de Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

En el Esquema 4, se muestra el Procedimiento para la determinación de la toxicidad de los extractos metanólicos de *P. peruviana* L., sobre nauplios de *Artemia salina*.



Esquema 4. Procedimiento para la determinación de la toxicidad de los extractos metanólicos de *P. peruviana* sobre nauplios de *Artemia salina*

Este método estándar se basó en la determinación de la concentración o dosis de los extractos metanólicos de *Physalis peruviana* L., que causa la muerte al 50 % de una población de larvas de *Artemia salina* en 24 horas, esta dosis es conocida como dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>).

## Reactivos y Estándares

Los reactivos utilizados para evaluar la toxicidad de los extractos frente a *Artemia*, fueron: Cloruro de sodio (NaCl), Sulfato de magnesio hexahidratado ( $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ ), Cloruro de magnesio hexahidratado ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ), Cloruro de potasio (KCl), Bicarbonato de sodio ( $NaHCO_3$ ), Cloruro de calcio ( $CaCl_2$ ) y Dodecilsulfato de sodio [ $CH_3(CH_2)_{10}CH_2OSO_3Na$ ] conocido también como Lauril sulfato sódico, Levadura comercial, quistes del crustáceo *Artemia salina* (Youfishtuff y fs-USA). Todos los químicos usados incluyendo los solventes, fueron de grado analítico.

## Ensayo de toxicidad general

En el desarrollo del bioensayo, primero se preparó una solución marina (agua de mar artificial), que proporcionó las condiciones necesarias para el desarrollo de los nauplios de *Artemia*. Esta solución se mantuvo en aireación (burbujeo) 72 horas previas al bioensayo, con la finalidad de oxigenar la misma. En la Tabla 12, se muestra la composición de la solución marina, necesaria para ambientar la *A. salina*.

Tabla 12.  
*Preparación del agua de mar artificial, usada en el cultivo y eclosión de los quistes del crustáceo Artemia salinas (Kinee, 1971).*

Sales	g/L
Cloruro de sodio (NaCl)	27,65
Sulfato de magnesio hexahidratado ( $MgSO_4 \cdot 6H_2O$ )	14,29
Cloruro de magnesio hexahidratado ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )	5,18
Cloruro de potasio (KCl)	0,697
Bicarbonato de sodio ( $NaHCO_3$ )	0,143
Carbonado de sodio ( $Na_2CO_3$ )	0,035
Cloruro de calcio $CaCl_2$	1,54
Agua destilada estéril	1000 mL

### **Eclosión de los quistes**

Una vez transcurrido el tiempo de aireación de la solución marina, se dividió la solución en dos recipientes (erlenmeyer) con 500 mL aproximadamente en cada uno; en uno de los erlenmeyer, se añadió entre 150-200 mg de quistes, manteniendo una temperatura constante de  $28 \pm 2$  °C por 48 horas (tiempo necesario para su eclosión). La solución marina contenida en el otro erlenmeyer, se utilizó como diluyente para extractos y llenado de las placas (ambos recipientes se mantuvieron con aireación constante).

### **Realización de la prueba.**

El bioensayo se realizó en placas de microtitulación de 96 pozos; a cada pozo se le adiciono 130  $\mu$ L de solución salina (aireada), para luego colocar en cada pozo quince (15) larvas con ayuda de una micropipeta. Para facilitar la atrapada de los nauplios, para tal fin, se ilumino un sector del envase que contenían las mismas, hasta concentrar las larvas en esa zona y facilitar su recolección (aprovechando su fototropismo). El volumen agregado de solución marina con larvas, fue de 10  $\mu$ L. Posteriormente a cada pozo se le añadió 10  $\mu$ L de levadura comercial (5 mg/mL). Estas placas fueron incubadas en un área con iluminación permanentemente por 24 horas, para excitar su actividad metabólica. En la Figura 29, se muestran las placas de microtitulación de 96 pozos que fueron utilizadas para realizar el ensayo de toxicidad en nauplios de *Artemia salina*.

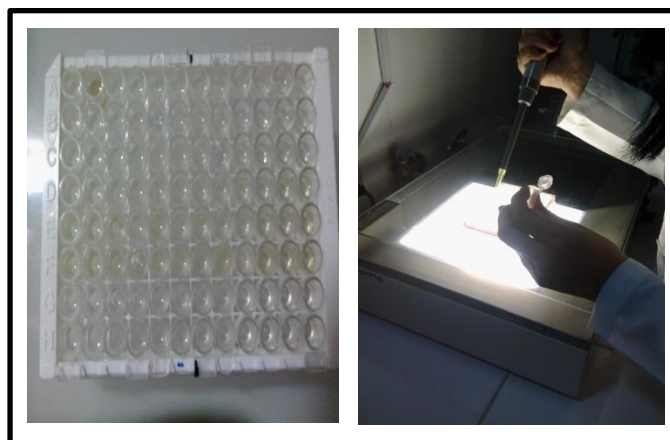


Figura 29. Placas de microtitulación de 96 pozos donde se colocaron los nauplios de *A. salina*.

Transcurrido el tiempo de incubación, se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de cada extracto metanólico de *Physalis peruviana* L., a evaluar, a distintas concentraciones (5; 25; 250; 750; 1250; 2500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Los extractos se diluyeron en DMSO y solución marina (1:9). Se incluyó, además, un grupo control negativo (con todos los elementos del ensayo, excepto la muestra a ensayar) y un grupo control positivo Dodecil sulfato de sodio [ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{OSO}_3\text{Na}$ ] (DSS), con seis replicas para cada grupo.

Durante el bioensayo se registraron el número de nauplios puestos inicialmente en cada pozo (NV), y al cabo de 24 horas de contacto con los extractos ensayados se realizó el conteo del número de nauplios muertos (NM) para determinar el porcentaje (%) de letalidad y la dosis letal 50 ( $\text{DL}_{50}$ ) con un intervalo de confianza del 95 %, utilizando para este fin el método de análisis Probit. Además, se calculó el porcentaje de letalidad mediante la ecuación (Apu, Khatun, Bhuyan y Liza, 2013). En la Figura 30, se muestra el procedimiento para realizar el registro del número nauplios vivos y muertos.

$$\% \text{ de Letalidad} = \frac{NM}{NV} * 100$$

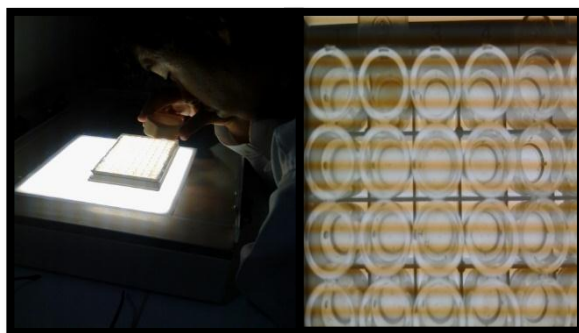


Figura 30. Registro del número de nauplios vivos y muertos

Finalmente, la  $DL_{50}$  de los extractos y de los blancos evaluados se clasificó según la toxicidad, tomando como referencia las recomendaciones del programa Iberoamericano de Ciencias y Tecnología para el desarrollo (CYTED) (Tabla 13).

Tabla 13.  
*Clasificación de toxicidad según CYTED.*

Concentración $DL_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Categoría
1-10	Extremadamente toxico
10-100	Altamente toxico
100-500	Moderadamente toxico
500-1000	Ligeramente toxico
1000-1500	Prácticamente no toxico
>1500	Relativamente inocuo

(Sánchez y Neira, 2005).

#### **Análisis estadístico:**

En el presente estudio los datos obtenidos en las mediciones permitieron elaborar tablas para el análisis correspondiente para este fin. Esta información se trasladó a un archivo de Microsoft excel versión 2016. Y se determinó el % de letalidad, para el cálculo de  $DL_{50}$ , se realizó un análisis de regresión PROBIT, para tal fin, se utilizó un programa estadístico IBM SPSS versión 21, año 2012.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### Estudio fitoquímico de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L.

Se llevó a cabo una serie de pruebas para conocer cualitativamente los compuestos químicos presentes en los diferentes extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L. (Tabla 14).

El análisis fitoquímico preliminar reveló la presencia de varios metabolitos secundarios de interés biológico y a su vez se evidenció la alta variabilidad de compuestos presentes tanto en hojas, tallos y frutos de *Physalis peruviana* L., donde se observó una importante presencia de metabolitos secundarios entre los que destacan alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos en los extractos metanólicos de hojas y tallos, mientras que los extractos metanólicos de los frutos solo se encontró esteroides (Figura 32).

Tabla 14.  
*Estudio fitoquímico de los extractos metanólicos de las partes aéreas de Physalis peruviana* L.

Metabolitos Secundarios	Reacción	Extractos Metanólicos		
		Hoja	Tallo	Frutos
Alcaloides	Dragendorf	+	+	-
	Wagner	+	+	-
	Mayer	+	+	-
Esteroides	Lieberman-Buchner	+++	+	++
Compuestos fenólicos	Fe Cl <sub>3</sub>	+++	+++	-
Flavonoides	Shinoda	-	-	-
Saponinas	Prueba de La espuma	-	-	-
Taninos	Prueba de Gelatina	-	-	-
Cumarinas Y quinonas	Luz UV	-	-	-

+++ Muy abundante, ++ abundante, + presentes en pocas concentraciones



Figura 31. Resultados obtenidos en el análisis fitoquímico preliminar.

Esta investigación se correlaciona con la realizada por Llumiguano (2014), quien reportó la presencia de alcaloides, triterpenos, catequinas, azúcares reductores, fenoles y flavonoides en el extracto etanólico de las hojas; alcaloides y triterpenos en el extracto etéreo; alcaloides, azúcares reductores y fenoles en el extracto acuoso.

Esta diferencia en cuanto a los componentes químicos encontrados quizás pueda deberse a las condiciones climáticas y ubicación geográfica del sitio de recolección de la planta,

para entender esta afirmación nos basamos en lo enunciado por Waterman y Mole (1994), quienes afirmaron que el contenido de varios tipos de metabolitos secundarios está influenciado por el genotipo de la planta (la especie y la variedad), las características ambientales (la radiación solar y la disponibilidad de agua), madurez, la velocidad de crecimiento, la condición nutricional del suelo, la depredación y las enfermedades. Así mismo, la aparición de los compuestos secundarios está relacionada con los mecanismos de defensa de la planta.

Por otra parte tenemos lo referido por Valares (2011), quien afirmó que la dependencia de los factores climáticos en la síntesis de metabolitos secundarios como flavonoides, terpenos y fenoles, se debe ya que la mayoría de los ecosistemas existen grandes diferencias en las variables meteorológicas a lo largo del año e interanualmente. Esto es muy importante al afectar a la variabilidad temporal en la producción de metabolitos secundarios.

De igual forma Hernández (2015), realizó un estudio fitoquímico de las hojas de *Physalis peruviana* L., e indicó la presencia de esteroides, flavonoides, taninos y alcaloides en los extractos etanólico y a su vez relacionaron la presencia de estos compuestos con la actividad biológica, por el contrario al análisis fitoquímico realizado a *Physalis peruviana* L., recolectada en Mérida – Venezuela donde el extracto metanólico, mostró positividad en las pruebas para alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos (Figura 31).

Otro factor importante a tener en cuenta para la determinación de metabolitos secundarios en una especie es la edad de la planta, para comprender esta afirmación nos basamos en lo expuesto por Cabrera y col. (2017), quienes encontraron que los metabolitos

secundarios varían de acuerdo a la edad de la planta, demostrando que el estado de desarrollo de éstas afecta la biosíntesis y acumulación de estos compuestos químicos, siendo las hojas jóvenes maduras las que secretan mayor cantidad de ellos.

Por otro lado tenemos lo expresado por Valares (2011), quien afirmó que durante el crecimiento de la planta y la ontogenia, los metabolitos secundarios pueden cambiar considerablemente, tanto cualitativa como cuantitativamente. En general, estados más juveniles expresan más defensas que edades más maduras, lo cual les puede permitir soportar mejor diferentes tipos de estrés.

Esto podría explicar el hecho de que en nuestro estudio el extracto metanólico de los frutos de *P. peruviana*, solo dio positivo para la presencia de esteroides, es posible que la madurez del fruto haya influido sobre el contenido de algunos metabolitos secundarios (Olivares y col., 2016).

**Actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L.**

En la Tabla 15, se presentan los resultados de la actividad antibacteriana realizada a los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L., a una concentración de 500 ppm, frente a las especies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Echerichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se usó como control positivo el antibiótico Tetraciclina.

Tabla 15.  
Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L.

Extracto	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
			Halo de inhibición	
<b>Metanólico</b>	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Los resultados obtenidos en la prueba pueden ser observados en la Figura 30, donde se muestran resultados negativos frente a las bacterias ATCC ya que no se produjo halo de inhibición alguno.

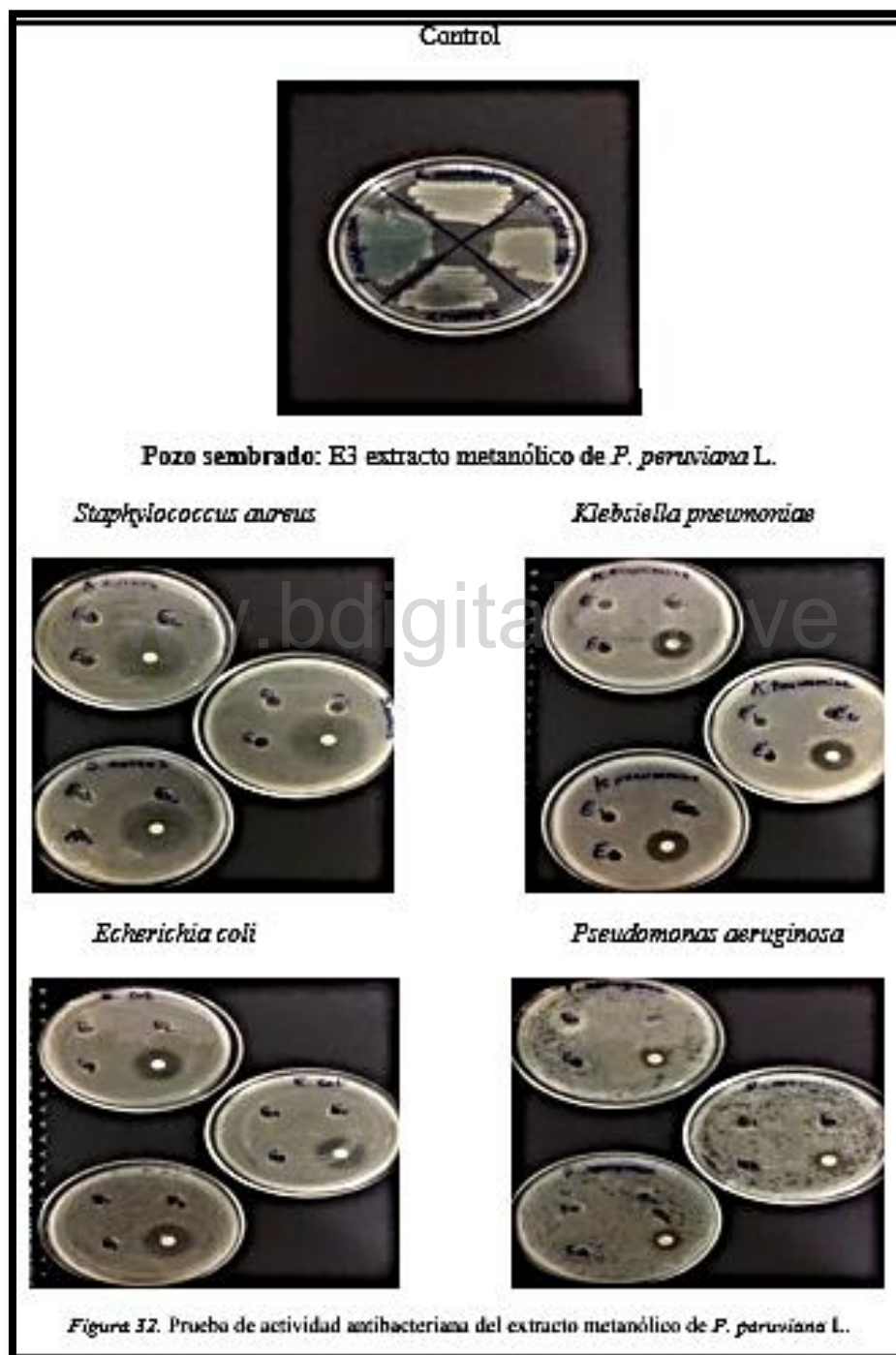


Figura 32. Prueba de actividad antibacteriana del extracto metanólico de *P. peruviana* L.

Esta investigación difiere de los resultados de Huertas (2015), quien evaluó la acción antibacteriana del extracto metanólico de *Physalis peruviana* L., por el método de difusión en pozos y demostró que el mismo posee un buen espectro de inhibición contra *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguinis* obteniendo un promedio de 17.25 mm y 16.65 mm respectivamente en la dilución 1 (100 µg/ml), mientras que el menor efecto antibacteriano fue encontrado en la dilución 3 (50 µg/ml) con un promedio de 11.17 mm y 14.37 mm respectivamente. Así mismo, a pesar que las cepas bacterianas utilizadas en estas investigaciones son distintas, pertenecen al mismo grupo de las Gram positivas al igual que la del presente estudio.

Es importante destacar que esta diferencia en los resultados quizás se deba a la composición química, teniendo en cuenta que la actividad antibacteriana de estos extractos ha dependido de las características específicas de los principios activos y de su solubilidad en los solventes empleados para su extracción, en este caso metanólico de naturaleza polar. Esto indicaría que los metabolitos presentes, que generarían el efecto antibiótico, también son de la misma naturaleza química (Azmir y col., 2013)

También cabe mencionar que el presente estudio no se reportaron metabolitos secundarios como flavonoides, taninos y saponinas que están relacionados con la actividad antibacteriana, para comprender esta afirmación nos basamos en lo expuesto por Ragendra (2014), quien afirmó que los flavonoides, presentan grupos hidroxilo fenólicos que penetran fácilmente a través de la membrana celular bacteriana, se combinan y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas y actuando como venenos protoplasmáticos, los taninos por su parte tienen la capacidad de privar a los microorganismos del medio apropiado para su desarrollo, debido especialmente a que

provocan desnaturalización de las proteínas, mientras las saponinas poseen importante actividad antibacteriana debido a que reduce la tensión superficial y actúa sobre los lípidos de la membrana bacteriana causando la muerte.

Del mismo modo Franco y col., (2012), evaluaron la actividad antibacteriana de cuatro extractos (etéreo, éter, cloroformo y etanol) de *Physalis peruviana* L., contra *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados revelaron que dichos extractos presentan una CMI de 250 µg/mL.

#### **Actividad antioxidante del extracto metanólico de las hojas de *Physalis peruviana* L.**

La actividad antioxidante fue determinada por el método DPPH, previamente se realizó un barrido inicial con los extractos metanólicos de hojas, tallos y frutos de *Physalis peruviana* L., con el fin de conocer si estas poseían potencial antioxidante.

En la Tabla 16, se muestran los resultados de la determinación de porcentaje (%) de inhibición (% I), de los extractos metanólicos de las hojas, tallos y frutos de *Physalis peruviana* L., (barrido inicial).

Tabla 16.

*Determinación del potencial antioxidante de los extractos metanólicos de las hojas, tallos y frutos de *Physalis peruviana* L. a una concentración de 4 mg/mL.*

	<b>Absorbancia 517 nm</b>				
Extractos metanólicos	1	2	3	Media	% Inhibición
Hojas <i>P. peruviana</i> L.	0.173	0.173	0.163	0.1697	72,6
Tallo <i>P. peruviana</i> L.	0.322	0.352	0.35	0.3413	47,7
Fruto <i>P. peruviana</i> L.	0.453	0.442	0.472	0.4557	26,5
DPPH	0.627	0.632	0.600	0.6197	

*El potencial antioxidante fue calculado utilizando la siguiente ecuación*

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Absorbancia DPPH} - \text{Absorbancia Muestra})}{(\text{Absorbancia DPPH})} \times 100$$

$$\% \text{ Inhibicion Hojas} = \frac{(0,6197 - 0,1697)}{(0,6197)} \times 100 = 72,6$$

$$\% \text{ Inhibicion Tallos} = \frac{(0,6197 - 0,3413)}{(0,6197)} \times 100 = 47,8$$

$$\% \text{ Inhibicion Frutos} = \frac{(0,6197 - 0,4557)}{(0,6197)} \times 100 = 26,5$$

Con este primer barrido se pudo determinar que el extracto metanólico de las hojas de *Physalis peruviana* L., dio un % de inhibición de 72,6 %, siendo mayor de 50 %, lo cual indicó que tenía actividad antioxidante, mientras que los extractos metanólicos de tallos y frutos mostraron un % I menor al 50 % lo que permitió descartarlo, por no poseer actividad antioxidante evidente. Posteriormente la determinación de la actividad antioxidante, se realizó al extracto metanólico de las hojas, en la Tabla 17 se puede observar los resultados obtenidos

Tabla 17.  
Actividad antioxidante del extracto metanólico de las  
hojas de *Physalis peruviana* L.

	Concentración (mg/mL)	% I	DE
Extracto metanólico de las hojas de <i>P. peruviana</i>	0,05	6,2	0,0
	0,1	12,2	0,1
	0,15	14,9	0,4
	0,2	19,5	0,6
	0,25	20,6	0,2
	0,5	26,9	0,2
Patrón Ác. ascórbico	0,176	96,1	0,2

Existen diferencias estadísticamente significativas entre datos  
( $p < 0,05$ ) con un nivel de confianza de 95,0 %

Al utilizar el método DPPH se pudo observar y comprobar que la capacidad antioxidante del extracto metanólico de las hojas a su máxima concentración de dilución e fue de 26,9 %, en comparación de 96,1 % del ácido ascórbico utilizado como control positivo (Grafico 1).

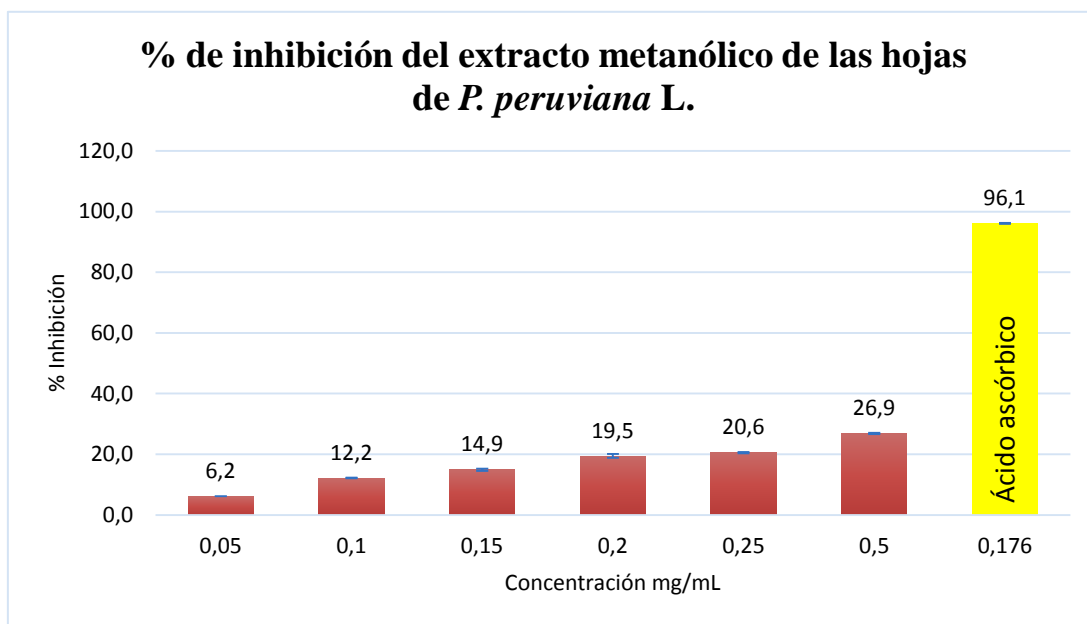
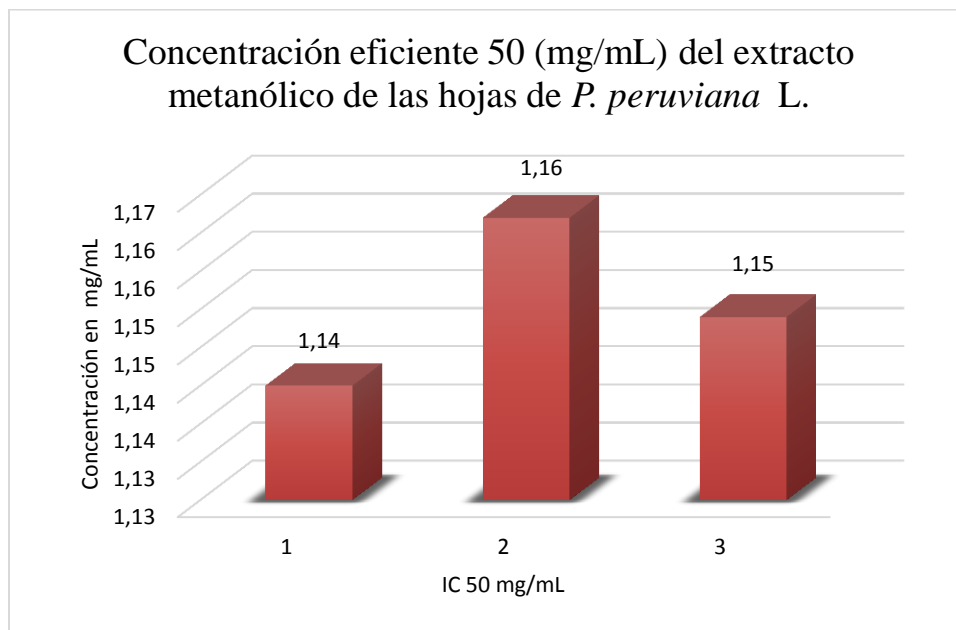


Gráfico 1: Porcentaje (%) de inhibición del extracto metanólico de las hojas de *P. peruviana* L.

### Concentración eficiente 50 (mg/mL) del extracto metanólico de las hojas de *Physalis peruviana* L.

Castañeda, Ramos e Ibañez (2008), indicó que el fundamento del método DPPH, consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; la diferencia de absorbancias, permite obtener el porcentaje de captación de radicales libres. A partir del ensayo con DPPH, se obtiene la concentración eficiente (EC), con la cual se disminuye en un 50 % la concentración inicial de DPPH. En el Gráfico 2, se muestra la concentración eficiente 50 en mg/mL del extracto metanólico de las hojas de *Physalis peruviana* L., para captar radicales libres es de 1,15 mg/mL. Este cálculo se determinó por triplicado, como se muestra en el gráfico.



*Gráfico 2: Concentración eficiente 50 (mg/mL) del extracto metanólico de las hojas de *P. peruviana* L.*

Este estudio difiere al reportado por Aparcana y Villarreal (2014), quienes evaluaron el potencial antioxidante de los frutos de *Physalis peruviana* L., recolectados en diferentes lugares del Perú como fueron Huánuco, Junín, Ancash y Cajamarca. Encontrando que el extracto etanólico presentaba una concentración inhibitoria IC<sub>50</sub> de 1,86; 2,04; 2,24 y 2,36 mg/mL respectivamente y los compuestos químicos predominantes en su estudio fitoquímico fueron la presencia elevada de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides, triterpenos y una leve presencia de saponinas.

La concentración eficiente 50 en mg/mL del extracto metanólico de las hojas de *Physalis peruviana* L., para captar radicales libres, en nuestro estudio fue de 1,15 mg/mL, que es considerado un mejor resultado a pesar de la ausencia de compuestos químicos como son taninos, flavonoides y la baja concentración de alcaloides, reportados. Para explicar esta afirmación nos basamos en lo expuesto por Arranz (2010), quien afirmó que la acción

biológica de los compuestos fitoquímicos está relacionada con la estructura y concentración de estas sustancias, porque influyen en su biodisponibilidad y bioaccesibilidad. También debemos tener en cuenta que la producción de estos metabolitos secundarios en las hojas de *Physalis peruviana* L., pudo estar afectada por diversos factores, para comprender esta afirmación nos fundamentamos en lo expuesto por Sharapin (2000), quien explica que la producción de compuestos fitoquímicos en las plantas están sujetos a factores extrínsecos como la temperatura, humedad, calidad del suelo, el clima; y por factores intrínsecos a nivel genético, que inciden directamente en la producción de metabolitos secundarios.

Debido a esto podemos encontrar una explicación y es que la presencia de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides y triterpenos presentes en el fruto, juegan un papel muy importante en la actividad antioxidante, si lo comparamos con los compuestos encontrados en las hojas como fueron alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos, pero no fue evidente la presencia de flavonoides y taninos, lo que explica la reservada actividad antioxidante que presentó.

De igual manera Cortés y col. (2015), determinaron la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de los frutos de *Physalis peruviana* L., por el método DPPH, donde alcanzaron concentraciones ( $CI_{50}$ ) de 393,69 mg/100 g de muestra liofilizada y 391,39 mg/100 g de muestra deshidratada por calor.

Es importante destacar en el presente estudio, los frutos de *Physalis peruviana* L., no mostraron actividad antioxidante ya que no poseen compuestos donadores de H y solo se reportó la presencia de esteroides. Sin embargo Williamson (1998), afirmó que el ciclostadienol ( $\alpha$ -sitosterol), que es un 4-metil-esterol, es un eficaz antioxidante. Por lo

cual, no podemos afirmar que la presencia de esteroides está relacionado con la falta de actividad antioxidante, pero sí que en esta situación, pudo influir la variedad del fruto, el lugar de cosecha, la altura, las condiciones del suelo, el clima, los nutrientes y el estado de madurez, entre otros factores que influyen al momento de realizar un análisis. Para comprender esta afirmación nos basamos en lo expuesto por Olivares y col. (2016), quienes afirmaron que el grado de madurez de los frutos influye en el contenido de compuestos bioactivos tales como ácido ascórbico, fenólicos totales, carotenoides totales; así como en la capacidad antioxidante.

Por otra parte se tienen estudios realizados a otras especies del género *Physalis* quienes reportaron actividad antioxidante como es el estudio de Barrientos y col. (2018), quienes estudiaron el contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de *Physalis chenopodifolia* L., silvestre y cultivo. Determinaron la presencia de fenoles y flavonoides tanto en hojas como en frutos y evaluaron la actividad antioxidante por el método DPPH. La concentración de 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  se obtuvo  $11,5 \pm 0,4$  y de  $8,28 \pm 0,3$  %, para plantas cultivadas y silvestres, respectivamente. Las demás concentraciones (200 y 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) fueron de  $6,45 \pm 0,3$  y de  $4,19 \pm 0,2$  para plantas cultivadas y de  $3,91 \pm 0,1$  y  $2,14 \pm 0,1$  en plantas silvestres.

Para comprender estas diferencias entre especies, en cuanto a la producción de metabolitos secundarios nos basamos en lo expuesto por Leinmuller, Steingas y Menke (1995), quien explica que la distribución de metabolitos secundarios al interior de las plantas varía entre especies y dentro de la célula vegetal se localizan en las vacuolas citoplasmáticas o en la pared celular.

## Estudio estadístico

En la Tabla 18, se muestran los datos estadísticos de la actividad antioxidante a través del método DPPH, del extracto metanólico de las hojas de *P. peruviana* L

Tabla 18.  
*Datos estadísticos de la actividad antioxidante (% de inhibición) a través del método DPPH, del extracto metanólico de las hojas de P. peruviana L.*

		Concentración mg/mL	% I
	Validos	5	5
N	Perdidos	0	0
Media		0,2083	16,7167
Error típ. de la media		0,06509	2,94861
Mediana		0,1750	17,2000
Moda		0,05 <sup>a</sup>	6,20 <sup>a</sup>
Desv. típ.		0,15943	7,22258
Varianza		0,025	52,166
Rango		0,45	20,70
Mínimo		0,05	6,20
Máximo		0,50	26,90
Suma		1,25	100,30

En la Tabla 19, se muestran los análisis de varianza de la actividad antioxidante (% de inhibición) a través del método DPPH del extracto metanólico de las hojas de *P. peruviana* L.

Tabla 19.  
*Análisis de varianza de la actividad antioxidante (% de inhibición) a través del método DPPH del extracto metanólico de las hojas de P. peruviana L.*

ANOVA <sup>a</sup> DE UN FACTOR						
			Suma de cuadros	Gl	Media cuadrática	F Sig.
Inter-grupos	(Combinados)		260,828	5	52,166	. ,000 <sup>b</sup>
	Término lineal	Contraste	226,843	1	226,843	.
		Desviación	33,985	4	8,496	.
Intra-grupos			,000	0		
Total			260,828	5		

a. Variable dependiente: % I

b. variables predictoras: (Contante), 0,1

**Determinación de toxicidad de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L.**

En la Tabla 20, se muestran los resultados promisorios del bioensayo de letalidad en *Artemia salina*, aplicado a los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L., y los controles sobre *Artemia salina*.

Tabla 20.

*Cuantificación de la DL<sub>50</sub> de los extractos metanólicos de las partes aéreas de P. peruviana L., y los controles sobre Artemia salina.*

Extracto	DL <sub>50</sub> (ppm)	Límite de confianza (95 %) ppm		Categoría según el CYTED
		Límite inferior	Límite superior	
Tallos	438,984	145,187	1183,823	Moderadamente tóxico
Hojas	2551,959	-	-	Relativamente inocuo
Frutos	-	-	-	Inocuo
DMSO	-	-	-	Inocuo
DDSS	23,372	13,507	28,026	Altamente tóxico

DL<sub>50</sub>: Dosis letal<sub>50</sub>; signo (-): valores muy altos; DMSO: Dimetilsulfoxido; DDSS: Dodecil sulfato de sodio.

De acuerdo a lo observado en la Tabla 20, los extractos metanólicos de las hojas resultaron ser relativamente inocuos, el extracto metanólico de los frutos resultó ser inocuo y el extracto metanólico de los tallos resultaron ser moderadamente tóxico según el CYTED, encontrándose en los límites inferiores (dentro de los intervalos de confianza) por encima de 1000 ppm.

En relación al % de letalidad a la concertación más alta evaluada (2500 ppm), para los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L. (Gráfico 3), mostraron los siguientes resultados, para el extracto metanólico de las hojas el % de letalidad fue de 6,66, para los frutos 0 y para los tallos 13,3.

En el Gráfico 3, se muestran los Porcentajes (%) de Letalidad de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L., sobre *Artemia salina* a las concentraciones probadas en unidades de ppm ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

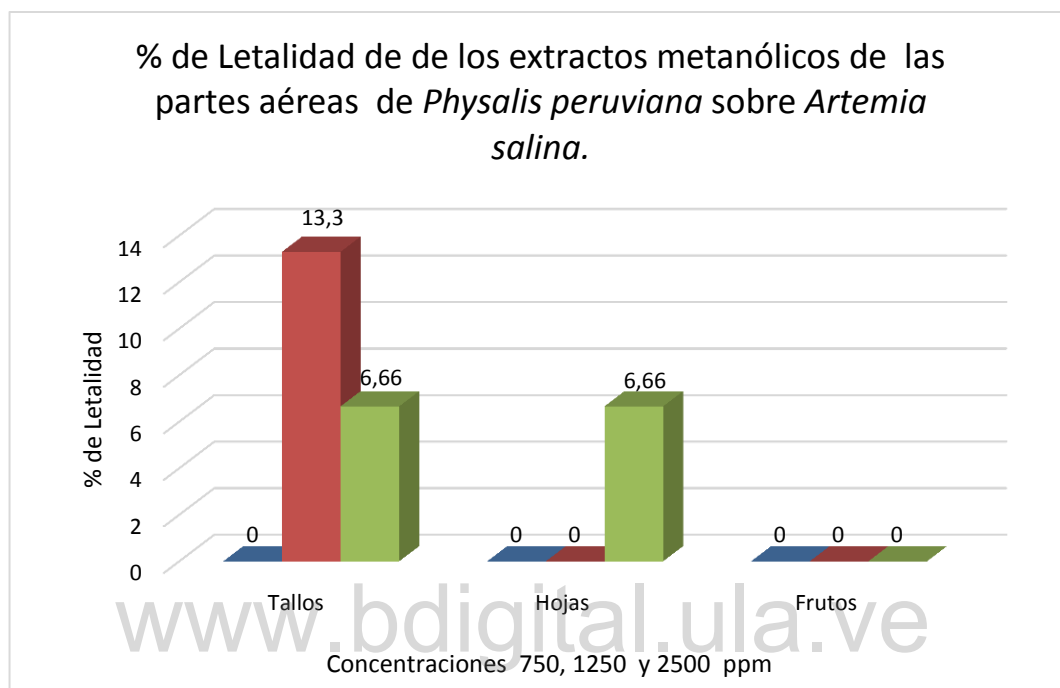


Gráfico 3. Porcentaje (%) de Letalidad de los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L., sobre *Artemia salina* a las concentraciones probadas en unidades de ppm ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Este estudio difiere a lo reportado por Sanabria y col (1997), quienes investigaron 29 especies de plantas colombianas, entre ellas *Physalis peruviana* L., se encontró que el extracto etanólico de esta especie reveló mediante un análisis fitoquímico preliminar la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, esteroides y/o triterpenos y lactonas terpénicas y a su vez relacionaron la presencia de estos compuestos químicos con la alta letalidad que mostraron estos extractos frente a la *Artemia salina*. La concentración letal 50 ( $\text{CL}_{50}$ ) que presentaron las partes aéreas de *P. peruviana* L., fue de  $42 \mu\text{g}/\text{mL}$  lo que indica que es altamente tóxico.

Esta diferencia quizás se debe a que en el presente estudio, se reportó bajas concentraciones de alcaloides y ausencia de metabolitos secundarios como taninos y saponinas. Para comprender esta afirmación nos basamos en lo expuesto por Bun y col. (2009), quienes afirman que altas concentraciones de alcaloides aumenta la toxicidad de la planta sobre nauplios de *Artemia salina*, lo cual puede servir para determinar la toxicidad intrínseca de la planta y así poder controlar tratamientos seguros y evitar efectos por sobredosis aguda hacia células normales.

Por otra parte tenemos lo expuesto por Zhao y col. (1999), quienes evaluaron la toxicidad de varios tipos de saponinas contra *A. salina*, y como resultado encontraron que los compuestos ensayados disminuyeron su toxicidad a medida que las concentraciones de las saponinas analizadas aumentaron. Estos resultados demuestran que las saponinas pueden ser letales a bajas concentraciones, por lo que se recomendaría el uso de *A. salina*, como un valioso bioensayo de toxicidad para evaluar extractos vegetales que contengan bajas concentraciones de compuestos químicos con altas polaridades. En nuestro estudio se observó ausencia de saponina que podría incidir directamente en la baja toxicidad mostrada por los extractos metanólicos de las partes aéreas de *P. peruviana* L.

Con base en lo expuesto anteriormente, se puede afirmar que se aprecia una relación entre la presencia de algunos metabolitos secundarios y la letalidad sobre *A. salina*, especialmente de los alcaloides y saponinas. Sin embargo, es claro que la letalidad sobre *A. salina* depende de la concentración de las sustancias, de la presencia de otros metabolitos secundarios no analizados en este trabajo y la interacción entre los mismos

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES

- El análisis fitoquímico preliminar reveló la presencia de metabolitos secundarios entre los que destacan alcaloides, esteroides y compuestos fenólicos en los extractos metanólicos de las hojas y tallos, en cuanto al extracto metanólico de los frutos solo se determinó la presencia de esteroides.
- Los extractos metanólicos de las hojas de *Physalis peruviana* L., no mostraron actividad frente a las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, a través del método de difusión en pozos (Kirby Bauer) ya que no se produjo halo de inhibición alguno a las concentraciones de 500 ppm.
- La actividad antioxidante de los extractos metanólicos de las hojas de *Physalis peruviana* L., mostró la máxima concentración de dilución el porcentaje de inhibición fue de 26,9, en comparación de 96,1 del ácido ascórbico y la concentración eficiente 50 (mg/mL) de los extractos metanólicos de las hojas de *Physalis peruviana* L., para captar radicales libres es 1,15 mg/mL.
- La evaluación de la toxicidad sobre nauplios de *Artemia salina* arrojó que el extracto metanólico de hojas es relativamente inocuo, el extracto metanólico de los frutos resultaron ser inocuos, mientras que el extracto metanólico de tallos resultó ser moderadamente tóxico según el CYTED. En relación al % de letalidad a la concentración más alta evaluada (2500 ppm), para los extractos metanólicos de las partes aéreas de *Physalis peruviana* L., resultó que para las hojas es de 6,66 % de letalidad, los frutos fue del 0 % y los tallos es de 13,3 % de letalidad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, A., y Maldonado, J. (2012). Medical Plants Used in the Huasteca Potosi, Mexico. *Journal of Ethnopharmacology*, 143 (1) 292-298.
- Armenteros, M., Ventanas, D., Morcuende, M., y Estevés, J. (2012). Empleo de antioxidantes Naturales en Productos Cárnicos. *Eurocarne*, (207), 63-73.
- Arranz, S. (2010). *Compuestos fenólicos (extraíbles y no extraíbles) en alimentos de la dieta española: Metodología para su determinación e identificación*. (Tesis de Doctorados). Universidad Complutense de Madrid, España.
- Aparcana, I., y Villarreal L. (2014). *Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos del fruto de Physalis peruviana "aguaymanto" de diferentes lugares geográficos del Perú*. (Tesis de Grado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.
- Apu, S., Khatun, F., Buyhan, S., y Liza, M. (2013). Assessment of cytotoxic activity of two medicinal plants using brine shrimp (*Artemia salina*) as an experimental tool. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4 (21), 1125-1130.
- Avalos, A., y Perez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). *Serie Biologia Vegetal*, 2 (3), 119-145
- Avello, M., y Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atanea*, (494), 161-172.

- Azmir, J., Zaidul, I., Rahman, M., Sharif, K., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M., Ghafoor, K., Norulaini N., y Omar, N. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds From plant materials. *Journal of Food Engineering*, 117 (4), 426-436.
- Barrientos, L., Lourdes, M., Salcedo, E., Villanueva, S., Vargas, J., Barradas, B., y Ruiz, M. (2018). Contenido de polifenoles y capacidad antioxidante de *Physalis chenopodifolia* Lam. silvestre y cultivo. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 10 (51), 183-200
- Bah, M., Gutiérrez, M., Escobedo, C., Mendoza, S., Rojas, I., y Rojas, A. (2004). Methylprotodioscin from the Mexican Medical Plant *Solanum rostratum* (Solanaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32 (2), 197-202.
- Benítez, C., y Magallanes, A. (1998). El Genero *Physalis* (Solanaceae) de Venezuela. *Journal Article*, 11-42.
- Bernal, C. (2012). *Contribución al Estudio Farmacotécnico del Extracto Estandarizado de Frutos de Physalis peruviana L. con Miras a la Obtención de un Producto Fitoterapéutico* (Tesis Magister en Ciencias Farmacéuticas). Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Bernal, M., y Guzmán, M. (1984). El antibiograma de disco. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. *Biomedica*, 4 (3), 112-115.
- Bernal, H., y Correa, J. (1998). *Especies vegetales promisorias de los países del convenio*. Andrés Bello. Bogotá, Colombia: Guadalupe Ltda.

- Boticario, C., y Cascales, M. (2009). *Innovaciones en Cáncer*. Madrid, España.
- Boyd, J., Murray, D., y Tyil, R. (1984). Silver Leaf Nightshade, *Solanum elaeagnifolium*, Origin, Distribution and Relation to Man Economic Botany. *Weed science*, 38 (2), 210-217.
- Brand. W., Cuvelier, M., y Berset, C. (1995). Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28 (4), 25-30.
- Bruneton, J. (2001). *Flavonoides en farmacognosia: Fitoquímica plantas medicinales*. Zaragoza, España: Acribia.
- Buikema, A., Niederleher, B., y Cairns, J. (1982). Biological monitoring. Part IV - Toxicity Testing. *Water Researchs*, 16 (83), 239-262.
- Bun, S., Laget, M., Chae, A., Bun, H., Oliver, E., y Elias, R. (2009). Cytotoxic Activity of alkaloids isolated From *Stephania rotunda*, *in vitro* citotoxic activity of cepharanthine. *Phytotherapy Research*, 587-590
- Cabrera, J., Jaramillo, C., Dután, F., Cun, J., García, P., y Rojas, L. (2017). Variacion del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleífera* Lam., en función de la edad y altura. *Bioagro*, 29 (1), 53-60.
- Carrión, J., y García, C. (2010). *Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica* (Tesis de pregrado). Universidad de Cuenca, Ecuador.
- Castañeda, C., Ramos, Ll., y Ibañez, V. (2008). Evaluacion de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Horizonte Médico*, 56-72

- Céspedes, G., Avila, A., Martínez, B., Calderón, J. y Salgado, R. (2006). Antifungal and Antibacterial Activities of Mexican Tarragon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (10), 3521-3527.
- Contreras, M., Diaz, L., Celis, M., Rojas, J., Mendez, L., Rosenzweig, P., y Ontiveros, J. (2017). Actividad antioxidante del aceite esencial de las hojas de *Pimenta racemosa* var., *racemosa* (Mill.) J.W. Moore (Myrtaceae) de Táchira – Venezuela. *Revista Ciencia e Ingeniería*, 38 (3), 223-230.
- Coletto, S., Kinupp, V., Absy, M., y Kerr, W. (2004). Pollen morphology and study of the visitors (Hymenoptera, Apidae) of *Solanum stramonifolium* Jacq. (Solanaceae) in Central Amazon. *Acta botanica brasiliensis*, 18 (3), 653-657.
- Choi, JK., Murillo, G., Su, BN., Pezzuto, JM., Kinghorn, AD., y Mehta, RG. (2006). Ixocarpalactone A isolated from the Mexican tomatillo shows potent antiproliferative and apoptotic activity in colon cancer cells. *FEBS Journal*, 273 (24), 5714- 23.
- Choma, I., y Gizelak, E. (2011). Bioautography Detection in thin-layer Chromatography. *Journal of Chromatography*, 1218 (19), 2684-2691.
- Cortés, G., Prieto, G., y Rozo, W. (2015). Caracterización Bromatológica y fisicoquímica de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) y su posible aplicación como alimento natracéutico. *Revista Ciencia en Desarrollo*, 87-97

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2011). Performance Standards for Antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. M100-S21, 31 (1).
- Domingo, D., y López, B. (2003). Plantas con actividad antimicrobiana. *Rev. Esp Qimioterap*, 16 (4), 385-390.
- Egwaikhide, P., Okeniyi, S., y Gimba, C. (2009). Screening For Anti-microbial Activity and Phytochemical Constituents Of some Nigerian Medicinal Plants. *Journal of Medicinal Plants*, 3 (12), 1088-1091.
- Fica, A. (2005). Aspectos Básicos Sobre Antimicrobianos I. *Revista Biomédica*, 5 (2), 123-125.
- Franco, L., Matiaz, G., Pajaro, I., y Gomez, H. (2013). Actividad Antibacteriana *in vitro* de Extractos y Fracciones de *Physalis peruviana* y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz. *Artículos Originales*, 12 (3), 230-237.
- García, A., y Pérez, E. (2009). Metabolitos Secundario de Plantas. *Reduca*, 2 (3), 119-145.
- García, M., y Lozano, A. (2002). *Contribución al estudio fitoquímico y farmacológico de los cálices de Physalis peruviana L.* (Tesis de grado). Universidad de Colombia, Colombia.
- García, E., Valverde, E., Agudo, M., Novales, J., y Luque, M. (2019). Toxicología clínica. *Farmacia Hospitalaria*, 43 (2), 667-668.

- Gould, S., Fielder, M., Kelly, A., Elsankari, W., y Naughton, D. (2009). Antimicrobial porne granate rind extract enhancement by Cu (II) and vitamin C combination against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Bristish Journal of Biomedical Science*, 66 (3), 129-132.
- Gonzales, A. (2004). *Obtención de Aceites Esenciales y Extractos Etanolicos de Plantas del Amazonas*. (Tesis de Grado). Universidad de Bogotá, Bogotá, Colombia.
- Guerra, A. (2005). Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físico-químicas de los extractos fluidos, blandos y secos asi como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*) a nivel de laboratorio. (Tesis de Grado). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Gutierrez, A., y Esteves, A. (2009). Relevancia de los productos naturales en el descubrimientos de nuevas fármacos en el S. XXXI. *Revista Real Academica de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Esp)*, 100 (2), 409-419.
- Gutiérrez, A., Ledesma, L., Gracia, I., Grajales, O. (2007). Capacidad Antioxidante Total en Alimentos Convencionales y Regionales de Chiapas, México. *Revista Cubana de Salud Pública*, 1-8.
- Hernández, R., Fernández, C., y Baptista, P. (2006). Metodología de la investigación. México D.F. McGraw Hill.

Hernández, M. (2015). Actividad antioxidante y citotóxica de las fisalinas y de los flavonoides presentes en las hojas de *Physalis peruviana* L. (Tesis de Grado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Huertas, C. (2015). *Evaluación In Vitro del Efecto Antibacteriano y Citotóxico del Extracto Metanólico de Physalis peruviana (capulí) Sobre Cepas de Streptococcus mutans (ATCC 25175), Streptococcus sanguinis (ATCC 10556)* (Tesis de Maestría). Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas. Perú.

Herrera, Y., Garduño, M., Vázquez, L., Ríos, M., y Alvarez, L. (2005). Myo-inositol-derived glycolipids with anti-inflammatory activity from *Solanum lanceolatum*. *Journal of Natural Products* 68 (7), 1031- 10366.

Hurtado, I., y Toro, J. (1999). Paradigmas y métodos de investigación en tiempos de cambio. Venezuela: Episteme consultores Asociados C.A.

Hurtado J., 2010. *El proyecto de investigación. Comprensión holística de la metodología y la investigación*. Bogotá, Colombia.

Jiménez, G. (2001). Biological Screening of Plants of the Venezuelan Amazons. *Journal of Ethnopharmacology*, 77 (1), 77-83.

Leinmuller, E., Steingass, H., y Menke, K. (1995). Tannins in ruminant feedstuffs. *Animal and Research and Development*, 33, 9-15.

Lozaya, X., Navarro, V., Garcia, M., y Zurita, M. (1992). *Solanum chrysotrichum* (SCHL DL) a Plant Used in Mexico for the Treatment os skin mycosis. *Journal of Ethnopharmacology*, 36 (2), 127-132.

- Lucana, M., y Huanca, R. (2014). Estructura bacteriana. *Revista de actualización clínica*, 49, 2589-2592.
- Llumiguano, F. (2014). *Evaluación del efecto hipoglucemiante del extracto de hojas de chapuca o uvilla silvestre (Physalis peruviana). En ratas (Rattus norvegicus) con hiperglicemia inducida*. (Tesis de Grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba Ecuador.
- Magaña, M.A., y Burelo, C.M. (2010). Uso Medicinal de la Familia Solanaceae en Tabasco. *Kuxulkab*, 16 (30), 33-34.
- Marcano, D., y Hasegawa, H. (2002). *Fitoquímica Orgánica. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico*. Caracas, Venezuela.
- Marín, M., y Gudiol, F. (2003). Antibióticos Betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 21 (1), 42-45.
- Martínez, L., Baquero, F., y Andersson, D. (2007). Predicting antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, 5 (12), 958-965
- Méndez, R. (2008). *Cultivos Orgánicos (Su control biológico en plantas medicinales y aromáticas)*. Ediciones ECOE. Segunda edición.
- Menzel, Y. (1951). The cytology and genetics of *Physalis*. Proceedings of the American Philosophical Society 95, 132-183.
- Moreno, M., González, E., y Beltrán, C. (2009). Mecanismo de resistencia antimicrobiana en patógenos respiratorios. *Artículo de revisión*, 69, 186-187.

- Moreno, A., López, S., y Corcho, A. (2000). Principales medidas epidemiológicas. *Salud Pública de México*, 42 (4), 337-341.
- Morillo, M., Marquina, V., Rojas, L., Aparicio, R., Carmona, J., y Usubillaga A. (2017). Estudio de la Composición Química del Aceite Esencial de Hojas y Tallos de *Physalis peruviana* L. *Revista Académica*, 16 (85), 86-90.
- Murray, P., Rosenthal, K., y Pfauer, M. (2007). Microbiología Médica, Madrid: Medica Panamericana.
- Nee, M. (1986). Instituto Nacional de Investigación Sobre Recursos Bióticos. Solanaceae I. *Fascículo Flora de Veracruz*, 49 (4), 68-72.
- Olszewska, M., y Michel, P. (2009). Antioxidant Activity of Inflorescences, Leaves and Fruits of three Sorbus Species in Relation to their Polyphenolic Composition. *Products naturals of investigation*, 23 (16), 1507-1521.
- Olivares, T., Dekker, M., Verkerk, R., y Boekel, M. (2016). Health-promoting compounds in cape goosberry (*Physalis peruviana*). *Trends in Food Science and Technology*, 83-92.
- Pérez, E., y Iglesias, L. (2003). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Efermedades Infecciosas y Micobiología Clínica*, 57, 520-529.
- Pérez, C., y Robles, C. (2013). Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*, 4 (3), 186-191 .

- Pino, O., y Lazo, F. (2010). Ensayo de *Artemia*: Útil Herramienta de Trabajo Para Ecotoxicológicos y Químicos de Producto Naturales. *Revista de Protección Vegetal*, 22 (1), 35-41.
- Prats, G. (2008). Microbiología Clínica. Madrid, España: Medica Panamericana.
- Prescott, L., Harley, JP., y Klein, D. (1999). “Microbiología”. España: Mc GrawHill Interamericana.
- Puente, L., Muñoz, C., Castro, E., y Cortés, M. (2011). *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit. *Food Research International*. 44 (7), 1733– 1740.
- Rajendra, S. (2014). Antibacterial Activity of the ethanolic leaves extract of *Bixa orellana*. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3 (9), 389-394.
- Ramirez, P., Guzman, J., Espinosa, J., Murillo, S. (2001). Antimutagenic Effect of One Variety of Green Papper (*Capsicum* spp) and its Possible Interference whit the Nitrosation Process. *Mutation Research*, 496 (2), 39-45.
- Reitter, R. (1995). Oxidative Processes and Antioxidative Mechanisms. *The FASEB Journal*, 9 (6), 526-533.
- Samiul, A., Nachiketa B., Sayeed S., Masnoon K., y Mohammad, H. (2016). In vitro antibacterial potential of *Bixa orellana* L., against some pathogenic bacteria and comparative investigation on some standard antibiotics. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5 (2), 178-181

- Sanabria, A., Lopez, S., y Gualdron, R. (1997). Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artémia salina* de plantas colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, (26), 15-19.
- Sanchez, L., y Neira, A. (2005). Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava* L y *Psidium guineense* Sw. *Cultura Científica*, 40-45.
- Sánchez, E. (1991). Flora Agrícola Tomo I. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid España.
- Sánchez, S., Sáenz, E., Pancorbo, J., Lanchipa, P., y Zegarra, R. (2004). Antibiótico sistémico en dermatología. *Dermatolog Peruana*, 14 (3), 161-179.
- Santiaguillo, J., Blas, S. (2009). Aprovechamiento Tradicional de las Especies de *Physalis* en México. *Revista de Geografía Agrícola*, (43), 81-86.
- Serra, V. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16 (3), 402-419.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos* Vol. I. Colombia: CYTED.
- Torres, M., López, L., Galicia, G., y Silva, S. (2013). Solanaceas Mexicanas: Una Fuente de Nuevos Agentes Farmacológicos. *Acta Química Mexicana*, 5 (10), 27-32.

- Torres, C. (2004). Investigaciones en la transformación secundaria de frutos, tuberculos, flores, hojas o tallos de especies pertenecientes a ecosistemas andinos. Informe técnico. Bogota, Colombia: Jardin Botanico Jose Celestino Mutis, Subdireccion científica.
- Tomassini, T., Barbi, N., Ribero, I., y Xavier, D. (1999). Genero *Physalis*-una revisao sobre vitaesteróides. *Revisao*, 23 (1), 47-50.
- Trillos O., Cotes J., Medina I., Lobo, M., y Navas A. (2007). Caracterización morfológica de cuarenta y seis accesiones de uchuva *Physalis peruviana* L. en Antioquia (Colombia). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 30 (3), 708-715.
- Valares, C. (2011). *Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente*. (Tesis de doctorado). Universidad de Extremadura, Badajoz, España.
- Waterman, P., y Mole, S. (1994). *Method in ecology. Analysis of phenolic plant metabolites*. Boston, United State: Blackwell Sci.
- Williamson, E. (1998). The antioxidant activity of  $\Delta^5$ -avenasterol. PhD Thesis, University of Reading, Reading, UK.
- Whitson, M., y Manos, P. (2005). Untagling *Physalis* (Solanaceae) From the Physaloids: a Two-Gene Phylogeny of the Physalinae. *Sistematic Botany*, 30 (1), 216-230.
- Wu, S., Huang, Y., Lin, D., y Wang, S. (2005) Antioxidant activities of *Physalis peruvian* L. *Biol Pharm Bull*, 28 (6), 963- 966.
- Zhao, W. Qin, G., y Lou, G. (1999). Evaluacion of toxicity of some saponins on brine shrimp. *Journal of Asian Natural Product Research*, 307-311.