



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



**Caracterización Fitoquímica y Actividad Antibacteriana de los  
Extractos de *Tabernaemontana coronaria* (Jacq.) Willd.**

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

**Autor:** Luis Emiro Portillo Blanco

**Tutor:** Prof. Alida Pérez.

Mérida, Julio 2019.

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo principalmente a la vida, por haberme puesto en el camino de mis padres y permitirme llegar a este punto tan importante de mi vida. A mis padres, Liliana del Carmen Blanco Puerto y Luis Segundo Portillo León, quien, gracias a su amor, confianza, enseñanzas y apoyo incondicional, me dieron la fuerza para alcanzar esta meta. A mi hermana Luisana del Carmen Portillo Blanco, a mis abuelos, a mi tía Adriana Mercedes Blanco Puerto, demás tíos, primos y familiares que me han acompañado a alcanzar esta meta. Al Ing. Miguel Sacramento Cianci Perrino quien ha sido mi mentor a lo largo de este camino, gracias.

A mis amigos, en especial Daniel Barrios, Luis Rodríguez, Simón Bastidas, José Navas, Lizber Márquez, Laurent Contreras y Jeniffer Gutiérrez por su apoyo, cariño y amistad, espero que perdure toda la vida.

## AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento a quienes me acompañaron y motivaron efectivamente y académicamente para alcanzar esta meta:

A Dios padre por haberme regalado la vida y perseverancia para llegar hasta acá.

A mis padres, quienes, con su afecto, sus consejos y su comprensión me formaron como un hombre de bien.

A la Universidad de los Andes por ser mi alma mater, y centro de formación de miles de estudiantes.

Al Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis “Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro”

Al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de La Universidad de Los Andes.

A los profesores que dignamente aportaron su conocimiento para que pudiéramos conceptualizar toda la carrera.

A mi tutora, la Prof. Alida Pérez, quien me brindo su tiempo, conocimiento, amistad y sobre todo el estímulo constante para que hiciéramos realidad el requisito y la experiencia exigida para optar al título de Licenciado en Bioanálisis.

Al jurado evaluador, profesoras Yndra Cordero e Ysbelia Obregón, por sus contribuciones académicas y gran interés durante el desarrollo de la investigación.

A mis compañeros de clases por siempre haberme apoyado durante toda la carrera.

## INDICE DE CONTENIDO

	Pág.
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	<b>vii</b>
<b>INDICE DE TABLAS</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>ix</b>
<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO I. EL PROBLEMA</b>	<b>3</b>
Planteamiento del Problema	3
Justificación de la Investigación	4
Objetivos de la Investigación	7
<i>Objetivo General</i>	7
<i>Objetivos Específicos</i>	7
Alcances de la Investigación	8
Limitaciones de la Investigación	8
<b>CAPITULO II. MARCO TEORICO</b>	<b>9</b>
Trabajos Previos	9
Antecedentes Históricos	12
Bases Teóricas	13
Familia Apocynaceae	13
Género <i>Tabernaemontana</i>	16
<i>Tabernaemontana coronaria</i>	17
Ensayos Fitoquímicos	19
Extractos	22
Microbiología	23
Bacterias	24
Antibióticos	25

Mecanismos de acción de los antibióticos	28
Mecanismos de resistencia bacteriana	31
Actividad antibacteriana	32
Métodos utilizados para la determinación de la actividad antimicrobiana	32
Operacionalización de las Variables	34
Hipótesis	36
<b>CAPITULO III. MARCO METODOLOGICO</b>	<b>37</b>
Tipo de Investigación	37
Diseño de Investigación	37
Población y muestra	38
Unidad de Investigación	38
Selección del Tamaño de la Muestra	38
Instrumento de Recolección de Datos	39
Procedimiento de la Investigación	39
<b>CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION.</b>	<b>44</b>
Resultados	44
Discusión	50
<b>CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMEDACIONES</b>	<b>52</b>
Conclusiones	52
Recomendaciones	53
<b>REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRAFICAS</b>	<b>54</b>

## INDICE DE FIGURAS

N°	Pág.
<b>Figura 1.</b> Algunos flavonoides aislados en la familia Apocynaceae.	15
<b>Figura 2.</b> <i>Tabernaemontana coronaria</i>	17
<b>Figura 3.</b> Algunos alcaloides de <i>T. coronaria</i>	19
<b>Figura 4.</b> Resultados del análisis fitoquímico de los extractos de las hojas de <i>T. coronaria</i> .	47
<b>Figura 5.</b> Halos de inhibición de los extractos de hexano de la hoja de <i>Tabernaemontana coronaria</i>	50

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

## INDICE DE TABLAS

N°	Pág.
1. Taxonomía de la especie	17
2. Operacionalización de variable dependiente.	35
3. Operacionalización de variable independiente.	35
4. Bacterias de referencia internacional (ATCC)	42
5. Resultados del análisis fitoquímico de las hojas de <i>Tabernaemontana coronaria</i> .	45
6. Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de la hoja de la especie <i>Tabernaemontana coronaria</i>	48

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



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



**Caracterización Fitoquímica y Actividad Antibacteriana de los Extractos de  
*Tabernaemontana coronaria* (Jacq.) Willd.**

**Autor:** Luis E. Portillo B.

**Tutor:** Prof. Alida A. Pérez C.

**RESUMEN**

Las plantas proveen gran variedad de sustancias químicas bioactivas, las condiciones del trópico hacen que Venezuela presente una elevada diversidad de flora que conforma un material potencial poco explorado científicamente, práctico y eficiente en el manejo de problemas epidemiológicos de diferentes orígenes, además de contribuir al conocimiento fitofarmacológico a través del uso de los recursos naturales y de brindar un respaldo científico del uso tradicional de las plantas por las comunidades humanas. Durante los últimos años las plantas han sido utilizadas con fines curativos, pues muchos tratamientos fundamentados en la medicina tradicional fueron y son extraordinariamente eficaces, debido a su contenido de metabolitos secundarios biológicamente activos. En tal sentido se obtuvieron los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Tabernaemontana coronaria* mediante la técnica de extracción bajo un sistema de reflujo, luego se procedió a identificar mediante pruebas químicas cualitativas los metabolitos secundarios presentes en los extractos previamente obtenidos de *T. coronaria* para así determinar la actividad antibacteriana de los extractos de *T. coronaria* contra cepas Grampositivas y Gramnegativas de referencia internacional. La actividad antibacteriana frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Klebsiella pneumoniae* de los extractos de hexano y etanol de las hojas de *T. coronaria* se presentó a concentraciones entre 500 y 7,8 ppm, sin embargo la cepa de *E. fecalis* fue resistente en todo el intervalo de concentraciones evaluado. La CIM del extracto de hexano fue de 15,62 ppm para *Klebsiella pneumoniae*.

**Palabras clave:** Fitofarmacológico. extractos, metabolitos secundarios, antibacteriano, cepas.

## INTRODUCCIÓN

Las plantas proveen gran variedad de sustancias químicas bioactivas, las condiciones del trópico hacen que Venezuela presente una elevada diversidad de flora que conforma un material potencial poco explorado científicamente, práctico y eficiente en el manejo de problemas epidemiológicos de diferentes orígenes, además de contribuir al conocimiento fitofarmacológico a través del uso de los recursos naturales y de brindar un respaldo científico del uso tradicional de las plantas por las comunidades humanas.

En tal sentido, la familia Apocynaceae reporta aproximadamente 180 géneros y más de 1600 especies, las cuales en su mayoría han sido usadas contra el reumatismo, resfriados y enfermedades de la piel (Agra y cols, 2007), químicamente presenta compuestos tipo terpenoides, lignanos, glicósidos y alcaloides, más específicamente alcaloides tipo indólico y bisindólicos (Márquez 1999; Rocha y cols, 2005). Estos compuestos han sido aislados de varias especies de la familia Apocynaceae, de diferentes partes de la planta: semillas, corteza, hojas y tallos, principalmente (Quintans-Júnior y cols, 2007; Souza y cols, 2007) y han despertado interés como anticancerígenos (vinblastina), hipertensivos (yohimbina) y antiparasitarios (alcaloides indólicos) (Soares y cols, 2003).

En relación a lo anteriormente expuesto, *Tabernaemontana coronaria*, también conocida como *Tabernaemontana divaricata*, o *Ervatamia coronaria* (Gentry, 2001) es usada en la medicina tradicional como purgante, analgésico, antipirético, en el tratamiento de cáncer, heridas e inflamaciones (Kirtikar y cols, 1975), contiene una serie de metabolitos secundarios tales como alcaloides (Henríques y cols, 1996), triterpenos, esteroides (Sharma y cols, 1988), flavonoides y compuestos fenólicos en hojas, raíces y tallos (Daniel y cols, 1978).

En la presente investigación se realizó la caracterización fitoquímica y se determinó la actividad antibacteriana de los extractos de la especie *Tabernaemontana coronaria*, ya que estudios previos reportan la presencia de diversos metabolitos que pueden tener aplicaciones importantes en la medicina moderna. En tal sentido, se aplicaron pruebas químicas con el objeto de determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en los extractos y para establecer la actividad antibacteriana se implementó la técnica de difusión en agar con disco (Kirby- Bauer).

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

## CAPITULO I

### EL PROBLEMA

#### Planteamiento del Problema

En los últimos años, ha aumentado el uso de plantas medicinales para tratar diversas patologías, sobre todo en países en vía de desarrollo debido a su bajo costo y alta efectividad. Diversos estudios sugieren que varios extractos de plantas pueden mejorar síntomas de enfermedades e inhibir el crecimiento de patógenos y se pueden utilizar como un tratamiento alternativo. Estas plantas, como la *Tabernaemontana coronaria*, presentan efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antimicrobianos, por lo que su uso es cada vez más conocido (Senez, 1976).

Por otra parte, la resistencia bacteriana es un fenómeno creciente caracterizado por una refractariedad parcial o total de los microorganismos al efecto del antibiótico generado principalmente por el uso indiscriminado e irracional de éstos y no sólo por la presión evolutiva que se ejerce en el uso terapéutico (Collard,1976). Se ha encontrado que la prevalencia de organismos patógenos humanos resistentes a los antibióticos es cada vez mayor, pero el descubrimiento y desarrollo de nuevos antibióticos que controlen éstos es mucho más lento (Iladiba, 1998).

Desde el principio de la era antibiótica los fenómenos de resistencia a estas sustancias han sido descritos. Cabe destacar la importancia inicial de cepas de *Staphylococcus aureus* capaces de degradar la penicilina y la posterior aparición de esta misma bacteria con resistencia a la meticilina. Inicialmente el problema fue resuelto con el descubrimiento o síntesis de nuevas sustancias que eran capaces de controlar las bacterias con este fenómeno, y aparecen medicamentos como los aminoglucósidos, macrólidos, glicopéptidos, entre otros (Iladiba, 1998).

Durante los últimos años las plantas han sido utilizadas con fines curativos, pues muchos tratamientos fundamentados en la medicina tradicional fueron y son extraordinariamente eficaces, debido a su contenido de metabolitos secundarios biológicamente activos. Es por ello, que existe la necesidad de estudiar la composición química de los extractos de *Tabernaemontana coronaria* y su posible actividad antibacteriana. Una vez descrita la situación del problema de estudio, se elaboró el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál es la relación entre la composición química y la actividad antibacteriana de los extractos de *Tabernaemontana coronaria*?

### **Justificación de la Investigación**

Según la OMS (2007), los medicamentos herbarios contienen como principios activos partes de plantas u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos elementos, y su uso está bien establecido y ampliamente reconocido como inocuo y eficaz. La medicina herbolaria se utiliza desde tiempos remotos para curar o aliviar las enfermedades, dando

lugar a los fitofármacos, y es apreciada por su costo bajo y por los reducidos índices de toxicidad, en comparación con los productos de síntesis (Gallegos-Zurita, 2016).

Si bien es cierto las hierbas y los fármacos son considerados dos mundos opuestos, de acuerdo a un estudio realizado por el Instituto Nacional de Cáncer en Estados Unidos, el 67 % tiene su origen, en mayor o menor medida, en la naturaleza; y alrededor de 25 % de estos se derivan de las plantas. En la actualidad existe gran interés por la medicina tradicional y, dentro de esta, la medicina herbaria, que ha generado numerosos estudios, divulgados en prestigiosas publicaciones. Pero, hay poco uso de medicamentos de origen vegetal por parte de los profesionales de la salud; sus tratamientos están basados únicamente en fármacos sintéticos, incluso, en el tratamiento de problemas de salud diagnosticados como enfermedad leve (Gallegos-Zurita, 2016).

Para el caso de las poblaciones rurales, el acceso a los medicamentos farmacológicos se torna restringido por múltiples razones, como el traslado a una farmacia, los costos altos, los aspectos culturales, el difícil acceso a centros de salud, entre otros, optando siempre por la medicina natural que está a su alcance. Además, las experiencias ancestrales acumuladas en el tiempo, su accesibilidad, sus costos bajos, convierten a la medicina herbaria en la alternativa principal para la atención primaria de su salud, hechos que han permitido que estas prácticas se mantengan hasta la actualidad (Gallegos-Zurita, 2016).

La medicina a través de la historia y sin tener en cuenta escuelas, tendencias y doctrinas, ha tenido y tiene un denominador común que es la búsqueda incesante de la salud, o lo que es igual, el estado de completo bienestar biológico, psíquico y social. Sin embargo, hoy día muchos países del mundo asisten al deterioro de los sistemas médicos y de la Salud Pública

en general, por intereses mercantilistas que imponen desde los múltiples medicamentos hasta los métodos diagnósticos altamente sofisticados con un alto costo para el enfermo y mayores beneficios económicos para sus productores (Vander, 2008).

La medicina forma parte del contexto natural de los pueblos lo que explica que el uso de los recursos naturales, especialmente el de las plantas y entre ellas las medicinales, alcanzan niveles diferenciados de adecuación en directa relación con el desarrollo de la sociedad, así mientras en los pueblos primitivos o subdesarrollados mantienen su carácter estrictamente empírico en los altamente desarrollados es simplemente la materia prima del que gracias al avance extraordinario de la tecnología y la ciencia se ha logrado tener una visión más aproximada de su composición química, lo que junto al mejor conocimiento de la biología sobre todo a nivel celular, permite lograr cada vez sea más precisa en su acción (Vander, 2008). El análisis de la medicina alternativa basada en principios remarca la importancia de ayudar a los pacientes a lograr sus propios objetivos de salud de una manera culturalmente sensitiva pero consistente con el conocimiento (Seeff, 2008).

Las medicinas tradicionales derivadas de varias especies de plantas han sido frecuentemente utilizadas en el sistema de atención médica diaria en los países en desarrollo desde hace mucho tiempo (Breitbach y cols, 2013; Ferreira y cols, 2014; Veiga, 2005). Los productos naturales, principalmente de origen vegetal, representan una alternativa potencial para tratar diversas enfermedades causadas por microorganismos. El uso de plantas con fines terapéuticos se basa en el conocimiento popular y científico, estos son también actos de proveedores de sustancias activas aisladas, como extractos totales o purificados (Atanasov y cols, 2015; Carmona y Pereira, 2013). Los remedios fitoterapéuticos son rentables con una toxicidad mínima y reducción de riesgos para la salud. Estos también

están disponibles en el mercado en comparación con drogas sintéticas (Khandaker y cols, 2016).

En tal sentido, esta investigación se fundamentó en determinar la actividad de los extractos de *Tabernaemontana coronaria* sobre microorganismos patógenos utilizando el método de difusión en agar (Prueba de Kirby-Bauer) y establecer la composición química mediante pruebas químicas cualitativas para comprobar si los metabolitos que produce la planta pueden tener aplicaciones importantes en la medicina moderna.

## **Objetivos de la investigación**

### ***Objetivo General***

Confirmar la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos de *Tabernaemontana coronaria* (Jacq.) Willd.

### ***Objetivos Específicos***

Obtener los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Tabernaemontana coronaria* mediante la técnica de extracción bajo un sistema de reflujo.

Identificar mediante pruebas químicas cualitativas los metabolitos secundarios presentes en los extractos previamente obtenidos de *T. coronaria*.

Determinar la actividad antibacteriana de los extractos de *T. coronaria* contra cepas Grampositivas y Gramnegativas de referencia internacional.

Establecer la concentración mínima inhibitoria de los extractos que resulten activos.

## **Alcances de la Investigación**

El alcance de una investigación se relaciona con la profundidad del conocimiento sobre el fenómeno de estudio. Establece la visión que posee el investigador para lograr los objetivos (Hernández, Fernández y Baptista, 2010).

En relación a lo anteriormente expuesto, en la presente investigación se planteó verificar la capacidad antibacteriana de los extractos de *Tabernaemontana coronaria* y se establecieron cualitativamente su composición química.

## **Limitaciones de la Investigación**

Para el desarrollo de esta investigación se presentaron algunas limitaciones tales como la falta de internet para realizar la búsqueda de los trabajos previos relacionados con el tema de investigación, adicionalmente, se encontraron pocos artículos que ofrecían información de primera mano sobre el evento y unidad de estudio.

También la situación país limitó económicamente algunos aspectos de dicha investigación por el elevado costo de los medios de cultivo y reactivos, así como, las fallas constantes de los servicios básicos (electricidad, agua, gas) que interfirieron en el desarrollo de la parte experimental.

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Trabajos Previos

Menecucci, Mucellini, Machado, Higashi, Ribeiro, Porto, Pilau, Goncalves, y Braz (2019), publicaron un estudio titulado: Látex de *Tabernaemontana catharinensis* (A. DC) —Apocynaceae: una alternativa para la producción de compuestos biológicamente activos. La investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad proteolítica del látex de *T. catharinensis* utilizando azocaseína como sustrato. El análisis colorimétrico y espectrofotométrico de la fracción soluble en agua del látex permitió establecer que contenía carbohidratos, proteínas y aminoácidos. Por otra parte, el látex se sometió a extracción con hexano para obtener una fracción rica en *n*-alcanos que se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM), seguidamente se realizó una extracción de alcaloides. Los resultados sugieren que el látex de *T. catharinensis* es una fuente rica de azúcares, aminoácidos, *n*-alcanos, alcaloides y proteínas.

Muniyandi, Joen-Rong y Pitchairaj (2017), publicaron un trabajo titulado: Potencial antioxidante y anticataractogénico *in vitro* de nanopartículas de plata biosintetizadas utilizando un extracto etanólico de hojas de *Tabernaemontana divaricata*. En el presente estudio, se determinó

la actividad antioxidante mediante el método del 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) y Peróxido de Hidrogeno ( $H_2O_2$ ) de nanopartículas de plata (AgNP) biosintetizadas usando un extracto etanólico de hojas de *Tabernaemontana divaricata*, asimismo se estableció la actividad anticataractogenica *in vitro* inducida por selenito. Los resultados sugieren que las AgNP del extracto de *T. divaricata* previenen la cataractogenesis por su poder antioxidante. Este trabajo guarda relación con la investigación en que los autores trabajaron con la misma especie.

Sumanthi y Devipriya (2016), publicaron un trabajo titulado: Antibiograma de *Candida albicans*, utilizando extractos de hojas de *Tabernaemontana divaricata*. Los extractos de las hojas fueron preparados con diferentes solventes tales como acetona, butanol, cloroformo y etanol. Posteriormente, se determinó la actividad contra las betalactamasas de espectro extenso producidas por *Escherichia coli* mediante el ensayo de difusión en disco, los halos de inhibición fueron de 10, 12, 13 y 16 mm para el extracto de acetona, butanol, cloroformo y etanol, respectivamente. Adicionalmente, se evaluó la actividad antibacteriana en diferentes concentraciones (25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g, 75  $\mu$ g) y se utilizó estreptomicina (75  $\mu$ g) como control positivo. La concentración de 75  $\mu$ g fue la más efectiva para todos los extractos.

Bing-Jie Z, Xi-Feng T y cols. (2015), publicaron un estudio titulado: Alcaloides citotóxicos de *Tabernaemontana officinalis*. El estudio fitoquímico de las partes aéreas de *T. officinalis* permitió el aislamiento de 37 alcaloides, de los cuales 28 son conocidos y 9 son nuevos y fueron llamados taberdivarinas A–F y taberdivarinas G–I. Algunos compuestos mostraron citotoxicidad contra tres líneas celulares de cáncer humano HeLa , MCF- 7 , y SW480 con valores que van desde 1,42 a 11,35 moles. Este trabajo guarda relación, ya que en el mismo la investigación se basó en el mismo género.

Boligon, Piana, Felli, Nunes, Vendruscolo, Cordenonsi, Weiblen, Lovato, Hartz, Campos y Linde (2015), publicaron un estudio titulado: Análisis de cromatografía líquida de alta resolución y actividad antimicrobiana y antiviral de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. Es en este trabajo se evaluó la actividad biológica de extractos crudos, fracciones y subfracciones de *T. catharinensis*. Los mejores resultados antimicrobianos ocurrieron con las fracciones de diclorometano (DCM) y butanólica (NB) contra *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus sp.*, *Enterococcus faecalis* y *Bacillus subtilis* (concentración inhibitoria mínima, CIM = 31,25-1000 µg/mL). Teniendo en cuenta las bacterias gramnegativas, solo la fracción NB fue eficaz contra *Proteus mirabilis* y *Aeromonas sp.* (CIM = 62,5 µg/mL y 250 µg/mL, respectivamente). Además, los hongos *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus* fueron particularmente vulnerables a la fracción DCM (CIM = 31,25–1000 µg/mL). Las fracciones y subfracciones fueron efectivas contra *Mycobacterium smegmatis* (CIM = 19,53–156,25 µg/mL). Las fracciones de DCM (índice de selectividad - SI = 77,92), acetato de etilo (EA) (SI = 40,27) y NB (SI = 28,97) de las hojas mostraron una actividad antiviral potencial hacia el *Herpes simplex Virus* tipo 1, mientras que la subfracción DCM2 de las hojas (SI = 12,28) y la fracción alcaloidal (AF) (SI = 10,71) mantuvo buena actividad. Los compuestos de esteroides, terpenoides y compuestos fenólicos se identificaron por cromatografía líquida de alto rendimiento con arreglo de diodos (CLAR/DAD) y pueden ser parcialmente responsables de las actividades antimicrobianas y antivirales observadas. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que *T. catharinensis* tiene actividades antimicrobianas y anti-herpéticas.

Poornima y Gopalakrishnan (2014), publicaron un estudio titulado: Actividad anticancerígena de *Tabernaemontana coronaria*, contra carcinoma células renales inducido por carcinógenos. Se evaluó la propiedad

anticancerígena del extracto etanólico de *T. coronaria* contra el carcinoma de células renales inducido por DEN (dietilnitrosamina) y Fe-NTA (Nitrilotriacetato férrico). Un grupo de ratas macho fueron tratadas con la inyección intraperitoneal única de DEN (200 mg/kg de peso corporal) y seguido de Fe-NTA (9 mg Fe/kg de peso corporal) dos veces a la semana durante 24 semanas. De igual modo, otro conjunto de dos grupos fueron tratados con carcinógenos y con extractos de plantas (200 y 400 mg/kg de peso corporal), respectivamente y un último grupo de ratas fueron inyectadas sólo con los extractos de plantas. La eficacia terapéutica del extracto etanólico de *T. coronaria* se observó en términos de normalización de las alteraciones renales y parámetros de estrés oxidativo y antioxidantes enzimáticos en los riñones de las ratas. Estos resultados sugieren que el extracto de la planta podría actuar contra el DEN y Fe-NTA por un mecanismo relacionado con sus propiedades antioxidantes que fue confirmado por estudios histopatológicos. Este trabajo guarda relación con la investigación en que los autores trabajaron con la misma especie.

### **Antecedentes Históricos**

*Tabernaemontana divaricata* pertenece a la familia Apocynaceae, a la subfamilia Plumeroida, a la tribu Tabermontanae. El género fue nombrado por el lugar de nacimiento de su descubridor, J. Th. Mueller, Bergzabern y Bergzabern y luego fueron latinizados en *Tabernaemontana*. El basiónimo de *T. divaricata* es *T. siamensis*. Su sinónimo homotípico es *Ervatamia siamensis* (Pratchayasakul y cols, 2008).

Los holotipos de *T. divaricata* son L, M y W7, el sinónimo genérico, *Ervatamia*, se distribuye ampliamente en los países tropicales como una planta de jardín, que usualmente tiene flores dobles con aroma dulce. Aproximadamente 100 especies de este género están ampliamente

distribuidas en partes tropicales del mundo, incluyendo Brasil, Egipto, India, Sri Lanka, Vietnam, Malasia y Tailandia. Linnaeus describió por primera vez a *T. divaricata* (Pratchayasakul y cols, 2008).

La especie *T. coronaria* se ha utilizado en medicina tradicional y para otros fines. Los constituyentes reportados para esta especie incluyen alcaloides y constituyentes no alcaloidales tales como terpenoides, esteroides, flavonoides, fenilpropanoides, ácidos fenólicos y enzimas. Desde 1974, se han identificado aproximadamente 66 alcaloides diferentes de *T. divaricata*. Dicha información puede ayudar en la búsqueda de nuevos compuestos médicamente interesantes que puedan ser útiles contra las enfermedades (Pratchayasakul y cols, 2008).

### **Bases Teóricas**

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

### **Familia Apocynaceae**

Las Apocynaceae son una familia de las dicotiledóneas que incluye árboles, arbustos, hierbas, o lianas, muchas especies son grandes árboles que se encuentran en la selva tropical, y la mayoría son de procedencia de los trópicos y los subtrópicos. Estas plantas tienen savia lechosa y muchas de ellas son venenosas si se ingieren, se reconocen aproximadamente 5031 especies dentro de esta familia, divididas en 402 géneros. La familia Asclepiadaceae está ahora incluida en la de Apocynaceae (Endress y Bruyn, 2000).

La familia Apocynaceae consta de cinco subfamilias: Rauvolfioideae (980 especies en 42 géneros), Apocynoideae (860 especies en 77 géneros), Periplocoideae (180 especies en 31 géneros), Secamonoideae (170 especies

en 9 géneros) y Asclepiadoideae (2365 especies en 214 géneros). Las últimas tres subfamilias integraban la antigua familia de las Asclepiadaceae (Endress y Bruyn, 2000).

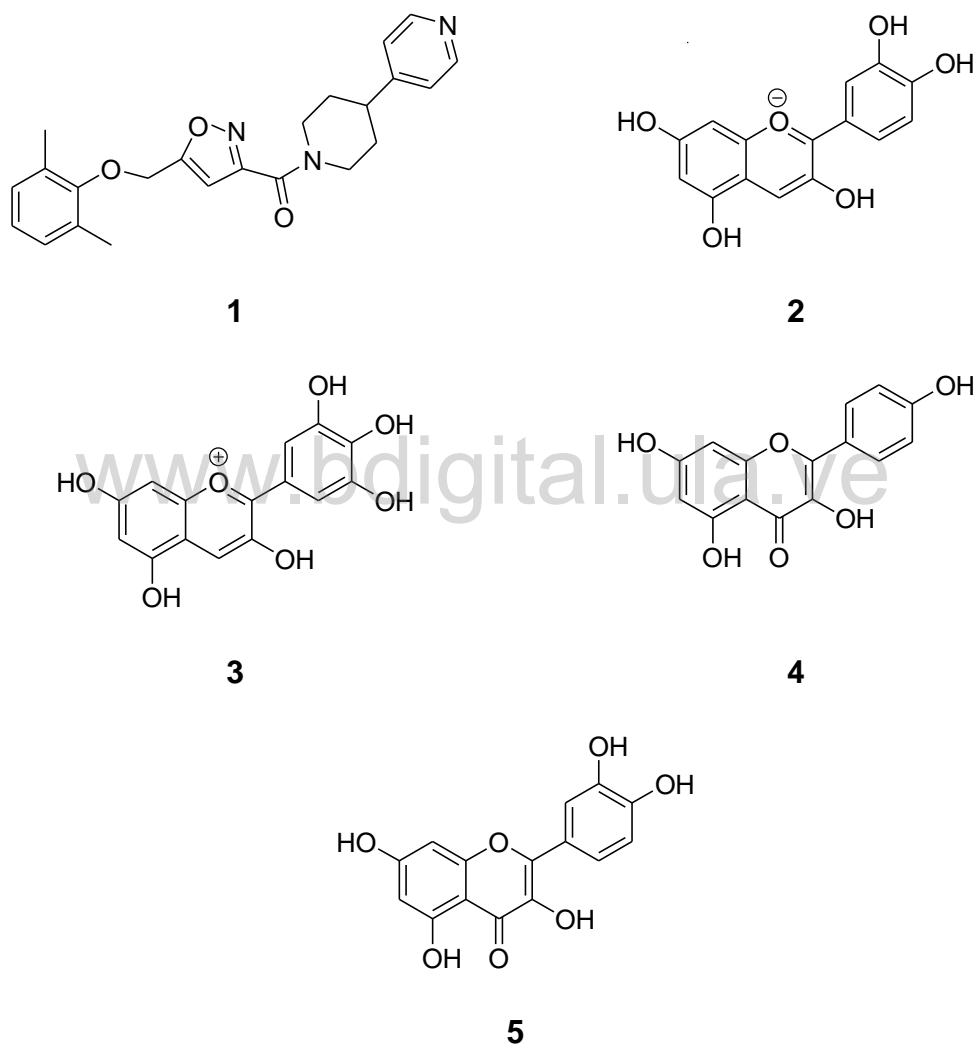
Geográficamente, las Apocinaceas son una familia pantropical con algún representante en las regiones templadas. Los bosques tropicales pluviales y pantanosos de la India y de la península Malaya, contienen árboles perennifolios desde muy pequeños hasta de gran talla. Las especies de *Plumeria* muy cultivadas, son originarias de América central. Los bosques de América del Sur, África y Madagascar son ricos en lianas. Las adelfas (*Nerium*) son nativas de los biotopos húmedos de la región mediterránea templada (Heywood, 1985).

Algunos de sus usos, como por ejemplo el de *Aspidosperma* quebracho-blanco (quebracho blanco) en la Argentina, cuyo árbol es nativo perennifolio del centro y norte del país, de corteza y raíces medicinales, usado para leña, proporciona madera de excelente calidad, dura y pesada. Presenta numerosas utilidades en carpintería, mueblería, tornería, tirantería, piezas de ajedrez. Con creosota puede sustituir la madera de quebracho colorado en la fabricación de postes y durmientes de ferrocarril. Excelente para lograr buenas esculturas, también es empleada para la elaboración de carbón y leña de gran poder calórico que no chispea y produce poca ceniza. Los frutos proporcionan un jugo que se utiliza en algunas regiones del país para cuajar la leche en la elaboración de quesos. Entre las sustancias presentes en la corteza se mencionan seis alcaloides: aspidospermina, quebrachamina, hipoquebrachina, aspidosamina, quebrachina y yohimbina, las cuatro primeras actúan sobre los centros motores y los restantes son venenosos como el curare. La aspidospermina tiene aplicación médica como febrífugo (Marzocca, 1952; Escurra, 1981).

Las Apocinaceas, en general, contienen alcaloides e iridoides en algunos géneros como *Plumeria*, *Rauwolfia* y *Allamandra*, estudios previos

reportan el aislamiento de proantocianidina (1), cianidina (2), delphinidina (3), kaempferol (4) y quercetina (5) (Figura 1) (Watson, L. 1992).

**Figura 1.** Algunos flavonoides aislados en la familia Apocynaceae.



## Género *Tabernaemontana*

*Tabernaemontana* es un género con 100-110 especies de plantas de flores pertenecientes a la familia Apocynaceae, con una distribución tropical. Son arbustos y pequeños árboles que alcanzan entre 1-15 metros de altura. Las hojas son perennes opuestas de 3-25 cm de longitud. Las flores son olorosas, blancas de 1-5 cm de diámetro (Raven y Hong, 1995). Son arbustos o árboles con látex blanco y ramas bifurcadas. Hojas opuestas, eglandulares. Inflorescencia cimoso-paniculada, con flores blancas; sépalos pequeños más o menos iguales; corola hipocrateriforme; anteras no aglutinadas a la cabeza del estilo; ovario apocárpico (Gentry, 2001).

Las especies de *Tabernaemontana* son conocidas por la producción de alcaloides de indol y varios triterpenos pentacíclicos, estos tipos de compuestos son responsables de diversas actividades farmacológicas (antileishmanicida, tripanocida, antioxidante, antibacteriana; antitumoral hipoglicemiante, analgésica y cardiotónica) (Van Beek y cols, 1984; Pereira y cols, 2004; Lim y cols, 2009).

Los alcaloides presentes en el género, constituyen la mayoría de los metabolitos secundarios encontrados. Se han aislado más de 250 estructuras de bases diferentes. En trabajos realizados anteriormente, se ha encontrado que extractos crudos metanólicos y etanólicos de corteza de tronco de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. recolectada en la Provincia de Misiones Argentina, tenían actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Guida y cols, 2017).

## ***Tabernaemontana coronaria***

En esta investigación se utilizó específicamente la especie *Tabernaemontana coronaria*, también llamada *Tabernaemontana divaricata* y *Ervatamia coronaria* (Tabla 1, Figura 2), su nombre común es Jazmín crapé ó corona de neón, en América se le da un uso ornamental, también se utiliza en la medicina ayurvédica y en la medicina tradicional del sudeste asiático , la Península Malaya , Indonesia y la Isla de Ambon (Perry, 1980).

**Tabla 1.** Taxonomía de la especie *Tabernaemontana coronaria*

<b>Reino:</b> Plantae
<b>Familia:</b> Apocynaceae
<b>Orden:</b> Gentianales
<b>Género:</b> <i>Tabernaemontana</i>
<b>Especie:</b> <i>coronaria</i> <i>Tabernaemontana divaricata</i> y <i>Ervatamia coronaria</i> .
<b>Nombre científico:</b> <i>Tabernaemontana coronaria</i>
<b>Sinónimos:</b> <i>Tabernaemontana divaricata</i> y <i>Ervatamia coronaria</i>

Portillo y Pérez, 2019.



**Figura 2.** *Tabernaemontana coronaria*

*Fuente:* Monaco Nature Enciclopedia.

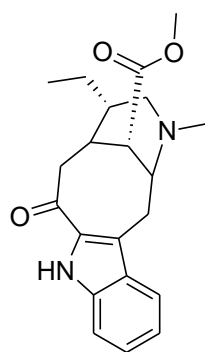
*T. coronaria* pertenece a la familia Apocynaceae, a la subfamilia Plumeroidae, a la tribu Tabermontanae y al género *Tabernaemontana*, se

distribuye ampliamente en los países tropicales como una planta de jardín, que generalmente tiene flores dobles con aroma dulce (Pratchayasakul y cols, 2008).

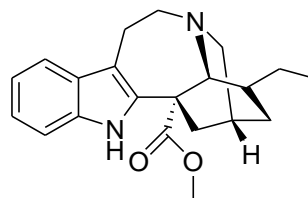
Investigaciones previas reportan que los extractos de *T. coronaria* poseen actividad antioxidante (Mandal y Mukherji, 2001; Nicola y cols, 2013), antiinflamatoria (Jain y cols, 2013), antimicrobiana, antiparasitaria, antitumorogénica, antiartrítico, antiasmática (Van Beek y cols, 1984), analgésica, antinociceptiva (Henriques y cols, 1996) y anticancerígena (Poornima y Gopalakrishnan, 2014).

Se ha reportado que la planta contiene una variedad de compuestos nitrogenados (Figura 3), alrededor de 66 alcaloides han sido aislados, algunos de ellos son tabernaemontanina (6), coronaridina (7), coronarina (8) y dregamina (9), se reporta la presencia de estos compuestos alcaloidales en todas las partes vegetativas de este arbusto (Perry, 1980).

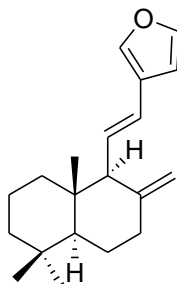
La mayor parte del trabajo fitoquímico sobre *T. coronaria* se ha relacionado con los constituyentes alcaloidales, la mayoría de los usos etnomédicos están probablemente relacionados con la actividad farmacológica de estas sustancias, algunos constituyentes no alcaloidales, como los terpenoides, esteroides, enzimas e hidrocarburos también se han aislado de esta planta (Pratchayasakul y cols, 2008).



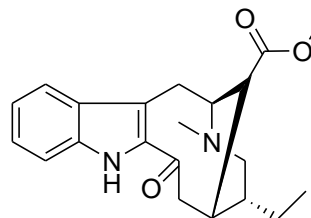
6



7



8



9

www.bdigital.ula.ve  
**Figura 3.** Algunos alcaloides de *T. coronaria*

### Ensayos Fitoquímicos

La fitoquímica tiene como objeto el aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias producidas por los vegetales. Los ensayos fitoquímicos pueden ser tanto cualitativos y cuantitativos, los de tipo cualitativo permiten la identificación de drogas y el reconocimiento de falsificaciones, se caracterizan principalmente metabolitos secundarios. Los metabolitos primarios son importantes para la vida del vegetal como proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, hormonas, mientras que los metabolitos secundarios no cumplen ningún rol fisiológico en los vegetales tales como los alcaloides, glicósidos, resina, entre otros (Bruneton, 2001).

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo (Bruneton, 2001).

Los resultados del tamizaje ofrecen una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico. Así cuando una planta revela acción sobre el sistema nervioso central durante el tamizaje farmacológico y presencia de alcaloides en el tamizaje fitoquímico, es bastante probable que la acción farmacológica se deba a la fracción alcaloidal. De la misma manera, el hecho de evidenciarse acción anti-inflamatoria en el tamizaje farmacológico y la presencia de flavonoides en el tamizaje fitoquímico, puede dar lugar a procesos de aislamiento y sometimiento a pruebas más específicas de estos compuestos (Bruneton, 2001).

Para determinar la presencia de ciertos grupos químicos en una planta se efectúan una serie de pruebas, que dependiendo de las características estructurales y solubilidad puede realizarse la identificación de los mismos (Bruneton, 2001), entre estas pruebas se encuentran las siguientes:

- **Ensayo de Lieberman-Burchard:** Permite reconocer en un extracto la presencia de terpenos y/o esteroides, por poseer ambos un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo  $\beta$  y en la posición 5-6 (Martínez y cols, 2013).

- **Ensayo de Shinoda:** Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal y/o tintura ya que el núcleo benzopirona (p. ej. flavonas, flavonoles, flavanonas, etc.) produce coloraciones rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado (Martínez y cols, 2013; Martínez, 2005).
- **Ensayo de Dragendorff:** Permite reconocer en un extracto y/o tintura la presencia de alcaloides en una solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3 gotas del Reactivo de Dragendorff, el resultado es positivo si hay precipitado (Martínez y cols, 2013).
- **Ensayo de Mayer, Wagner:** Se procede de la misma forma descrita anteriormente para identificar sustancias alcaloidales, al obtener la solución acuosa ácida se adiciona el reactivo de Mayer y Wagner, si se observa precipitado la prueba es positiva (Martínez y cols, 2013).
- **Prueba de la espuma:** El extracto acuoso se agita. La aparición de espuma es indicio de estos compuestos (Marcano y Hasegawa, 2002).
- **Prueba de gelatina:** El extracto se trata con unas gotas de solución de gelatina al 1%. La presencia de taninos se manifiesta con la precipitación del complejo proteína-tanino (Marcano y Hasegawa, 2002).
- **Reacción de cloruro férrico ( $FeCl_3$ ):** Es utilizada para determinar la presencia o ausencia de fenoles en una muestra dada. La formación de una coloración intensa roja, azul, verde, o púrpura indica la presencia de fenoles (Marcano y Hasegawa, 2002).

## Extractos

Los extractos son el resultado obtenido a partir de una materia prima desecada de origen vegetal, por maceración en contacto con un solvente, 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 (González, 2004).

Existen diferentes métodos para la obtención de extractos, la selección de uno de ellos dependerá de las necesidades y facilidades tanto técnicas como económicas con que se cuenten, entre estos métodos están la extracción con Soxhlet, digestión, infusión, decocción, maceración, percolación y destilación (González, 2004).

En esta investigación, el método utilizado fue la maceración, la cual es una extracción que se realiza a temperatura ambiente y consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente (agua o metanol, se prefiere el metanol puesto que a largos tiempos de extracción el agua puede propiciar la fermentación o la formación de mohos) hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa que no sea atacado con el disolvente; en éste se colocan el material vegetal con el disolvente y tapado se deja en reposo por un período de 15 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 (González, 2004).

## Microbiología

Es el estudio de los microorganismos y sus actividades. Esto concierne a su forma, estructura, fisiología, reproducción, metabolismo e identificación. El objetivo de la microbiología es comprender las actividades perjudiciales y beneficiosas de los microorganismos y mediante esta comprensión, diseñar la manera de aumentar los beneficios y reducir o eliminar los daños. La microbiología abarca diversas áreas, entre las cuales se pueden mencionar las siguientes (Senez. 1976):

- *Bacteriología*: Estudia las bacterias, microorganismos procariontes unicelulares de estructura relativamente simple. Ejemplos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, etc.
- *Micología*: Estudia los hongos, microorganismos eucariotes quimioheterótrofos, pueden ser unicelulares o multicelulares. Ejemplos: *Aspergillus fumigatus*, *Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, etc.
- *Virología*: Estudia los virus, agentes submicroscópicos filtrables, parásitos unicelulares obligados, que poseen un sólo tipo de ácido nucleico rodeado de una cubierta proteica. Ejemplos: Virus de la rabia, virus de la poliomielitis, virus del sarampión.
- *Protozoología*: Estudia los protozoarios, microorganismos unicelulares eucariotes. Ejemplos: *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi*, etc.
- *Inmunología*: Estudia los mecanismos de defensa del huésped contra las enfermedades.

## Bacterias

Son microorganismos unicelulares muy pequeños y relativamente sencillos, cuyo material genético no está rodeado por una membrana nuclear especial, son seres unicelulares procariotas, estructuralmente están constituidos por una pared celular, membrana plasmática, citoplasma, ribosomas y una región nuclear, en algunos casos capsula, flagelos, pelos, endosporas e inclusiones citoplasmáticas (Granados y cols, 2002).

Desde que se empezaron a descubrir las primeras formas de las bacterias, comenzó su agrupamiento. Por su similitud morfológica se formaron cuatro grupos; Cocos, que son de forma esférica; Bacilos, con una figura de pequeños bastones; Espirilos, con forma de tirabuzón y los Vibrios, ligeramente curvados y generalmente de gran movilidad (Romero, 2000).

Una vez conocida la forma de las bacterias, se empezó a observar que se agrupan en forma muy particular, y así se formaron otros grupos, como son los estreptococos en forma de cadenas, diplococos en pares, las tétradas en grupos de cuatro, las sarcinas en forma de cubo y los estafilococos en forma de racimos (Romero, 2000).

Luego se descubrió que las bacterias se teñían con colorantes y surgió otro criterio de agrupación, su afinidad tintorial. Así la tinción de Gram formo dos grandes grupos bacterianos: los grampositivos, que se tiñen de color violeta y los gramnegativos, que se tiñen de color rojo. También Ziehl-Neelsen formo dos grandes grupos. Las bacterias ácido-alcohol resistentes que se tiñen de color rojo, y las no ácido-alcohol resistentes que se tiñen de color azul (Romero, 2000).

## Antibióticos

Los agentes antimicrobianos son sustancias químicas sintetizadas parcial o totalmente en el laboratorio y son capaces de inhibir el crecimiento y/o destruir a los microorganismos (Bado y cols, 2010). Pueden clasificarse de la siguiente manera:

- *Betalactámicos*: Son un grupo de antibióticos de origen natural o semisintético, que se caracterizan por poseer en su estructura un anillo betalactámico, actúan inhibiendo la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana. Constituyen la familia más numerosa de antimicrobianos y la más utilizada en la práctica clínica (Bado y cols, 2010).

Se trata de compuestos de acción bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática, que presentan escasa toxicidad y poseen un amplio margen terapéutico. Su espectro se ha ido ampliando a lo largo de los años por la incorporación de nuevas moléculas con mayor actividad frente a los bacilos Gramnegativos; pero la progresiva aparición de resistencias adquiridas ha limitado su uso empírico y su eficacia en determinadas situaciones (Bado y cols, 2010). Se clasifican en:

- Penicilinas
- Cefalosporinas
- Monobactámicos
- Carbapenemos
- Betalactámicos asociados a inhibidores de betalactamasas

- *Glicopéptidos*: Se trata de antibióticos que actúan sobre la pared bacteriana, actualmente hay dos drogas en uso clínico: vancomicina y teicoplanina. La vancomicina es un antibiótico bactericida de espectro reducido (solo actúa sobre bacterias grampositivas), que se obtiene de *Streptomyces orientalis*. Fue introducida en 1956 pero debido a su toxicidad fue relegada (Bado y cols, 2010).
- *Aminoglucósidos*: Se caracterizan por la presencia de dos o más aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un anillo aminociclitol. Según los aminoazúcares se clasifican en familias. En nuestro país los aminoglucósidos disponibles son: gentamicina, amikacina y estreptomina para uso parenteral. La tobramicina se encuentra disponible en presentación tópica para uso oftalmológico. La espectinomicina no tiene aminoazúcares, y a pesar de ser considerada muchas veces en el grupo, no es un verdadero aminoglucósido. Son altamente polares, polímeros solubles en agua y generalmente estables al calor y cambios de pH entre 5 y 8 (Bado y cols, 2010).
- *Macrólidos*: Los macrólidos (eritromicina, claritromicina, azitromicina), las lincosaminas (lincomicina y clindamicina), los cetólidos y las estreptograminas, son antibióticos que comparten un mecanismo de acción similar pero tienen estructura diferente. Son antibióticos semisintéticos, derivados de la eritromicina producida por *Streptomyces erythraeus*. Éstos se clasifican de acuerdo al número de carbonos: 14 carbonos (eritromicina y claritromicina), 15 carbonos (azitromicina) y 16 carbonos (espiramicina) (Bado y cols, 2010).
- *Oxazolidinonas*: Es una clase de antibióticos enteramente sintéticos, en la cual el linezolid es el único disponible para uso clínico en humanos (Bado y cols, 2010).

- *Quinolonas*: Se trata de un grupo de antimicrobianos que derivan de una molécula básica formada por una doble estructura de anillo que contiene un residuo N en la posición 1. Diferentes sustituciones incluyendo la adición de residuos de flúor, han derivado desde el ácido nalidíxico hasta las quinolonas fluoradas. Las quinolonas son antibióticos bactericidas y actúan inhibiendo las topoisomerasas, enzimas que catalizan el superenrollamiento del ADN cromosómico y que aseguran una adecuada división celular (Bado y cols, 2010).
- *Sulfonamidas*: Fueron las primeras drogas eficaces empleadas para el tratamiento sistémico de infecciones bacterianas. Debido a la aparición de resistencia bacteriana y al descubrimiento de fármacos más activos y menos tóxicos, su uso se limitó durante un tiempo. Sin embargo actualmente, con la recuperación de la sensibilidad de algunas bacterias y la aparición de la combinación de trimetoprim y sulfonamidas que actúan de manera sinérgica, estos antibióticos han vuelto a ser usados (Bado y cols, 2010).
- *Trimetoprim-sulfametoxazol*: Trimetoprim es una 2,4-diamino-5-(3',4',5'-trimetoxibenzil) pirimidina. A pesar de tener actividad antimicrobiana propia, esta droga fue sintetizada como un inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) con la finalidad de potenciar la actividad de las sulfonamidas (Bado y cols, 2010).
- *Rifampicina*: Es un agente bactericida, y su alta liposolubilidad favorece la penetración en el fagosoma. La resistencia antimicrobiana emerge rápidamente si se realizan tratamientos con este antibiótico como tratamiento de la tuberculosis asociada a otros antibióticos, y como profilaxis en la meningitis producida por *N. meningitidis* (Bado y cols, 2010).

- *Nitrofurantoína*: Pertenece al grupo sintético de nitrofuranos, junto a furazolidona y nitrofurazona. Su acción bactericida se debe a la capacidad de unión a proteínas ribosomales, daño cromosómico e inhibición de la respiración y metabolismo del piruvato. Su actividad en muchos casos parece necesitar la reducción enzimática dentro de la célula bacteriana. Es una buena opción para el tratamiento de las infecciones urinarias bajas no complicadas (Bado y cols, 2010).
- *Cloranfenicol*: Es un agente de actividad bactericida, sobre microorganismos agentes de meningitis, tales como *N. meningitidis*, *H. influenzae* y *S. pneumoniae*, y bacteriostática frente a otros gérmenes. Su penetración en la célula requiere un proceso energía-dependiente, y una vez dentro inhibe la síntesis proteica por unión a la subunidad ribosomal 50S (Bado y cols, 2010).
- *Tetraciclinas*: son un grupo de agentes bactericidas activos sobre microorganismos grampositivos y gramnegativos, patógenos intracelulares como clamidias, micoplasmas y rickettsias. Su mecanismo de acción se debe a la inhibición de la síntesis proteica por unión a la subunidad ribosomal 30S (Bado y cols, 2010).

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

En general, los antibióticos deben su toxicidad selectiva a las diferencias entre las células eucariotas y procariontas. Su eficacia tóxica es la consecuencia de su capacidad de inhibir una reacción bioquímica específica y esencial, bien sea para la célula eucariota o para la célula procarionta. Para que el antibiótico ejerza su acción es necesario que llegue al foco infeccioso, penetre en las bacterias (por difusión o transporte activo) y alcance intracelularmente la concentración necesaria. Una vez dentro de la célula el

antibiótico puede ser bacteriostático si inhibe la multiplicación de forma reversible, o bactericida si tiene un efecto letal (Mateos, 2010). En general, cada grupo de antibióticos actúa preferentemente de una forma u otra, así tenemos:

- *Antibióticos bacteriostáticos*: macrólidos, tetraciclinas, cloranfenicol.
- *Antibióticos bactericidas*: betalactámicos, aminoglicósidos, polipeptídicos, polienos.

Los antibióticos de pueden ejercer su acción siguiendo algunos de estos mecanismos:

- *Inhibición de la síntesis de la pared celular*: La pared celular de las bacterias está compuesta por peptidoglicano, esta estructura, que es más gruesa en las grampositivas, entre otras funciones protege a la célula de su destrucción por estallido en un medio normal, no hiperosmótico puesto que las bacterias tienen una gran presión osmótica interna (grampositivas: 20 atmósferas; gramnegativas: 5 atmósferas). Las células, debido a su crecimiento, están continuamente sintetizando nuevo peptidoglicano y transportándolo a su sitio adecuado en la pared celular. Los antibióticos reaccionan con una o varias enzimas que se requieren para completar este proceso originando que la célula desarrolle puntos frágiles en su pared celular debido a la síntesis de peptidoglicano deficiente, lo que origina que sea osmóticamente frágil. Las sustancias que producen este efecto se consideran bactericidas ya que la célula debilitada está sujeta a lisis. La mayor parte de estos antibióticos son activos frente a células en crecimiento ya que las células viejas no sintetizan peptidoglicano (Mateos, 2010).

- *Alteración sobre la membrana citoplásmica:* Una célula con la membrana dañada muere invariablemente por insuficiencia metabólica o lisis incluso cuando no está en crecimiento debido a que esta estructura es vital para todas las células ya que entre sus propiedades incluye el actuar como barrera de permeabilidad selectiva. Las sustancias que alteran esta estructura modifican la permeabilidad, permiten la salida de iones  $K^+$  y macromoléculas como los ácidos nucleicos y causan un efecto lítico. Desgraciadamente, debido a la presencia universal de membranas tanto en células microbianas como animales, la mayor parte de estos antibióticos son tóxicos para los humanos (Mateos, 2010).
- *Inhibición de la síntesis proteica:* La mayor parte de los inhibidores de la síntesis proteica reaccionan con el complejo ribosoma-mARN. Aunque las células humanas también tienen ribosomas, los ribosomas de los eucariotas son diferentes en tamaño y estructura de los ribosomas de los procariotas (80S y 70S) por lo que estos antimicrobianos tienen una acción selectiva frente a bacterias (Mateos, 2010).
- *Bloqueo de la síntesis de los ácidos nucleicos:* La biosíntesis de moléculas de ARN y ADN consiste en una larga serie de reacciones catalizadas por enzimas que al igual que cualquier otro proceso complejo es susceptible de romperse en diferentes puntos. Una inhibición en un punto de la secuencia puede bloquear las reacciones posteriores. Los antibióticos que interfieren en la síntesis de ácidos nucleicos esencialmente actúan bloqueando la síntesis de sus componentes, inhibiendo la replicación o parando la transcripción (Mateos, 2010).

## Mecanismos de resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana a los antibióticos es una respuesta predecible y quizás inevitable del uso de antimicrobianos. La velocidad con la que surge y se extiende en poblaciones microbianas esta con frecuencia determinada por la cantidad de antibióticos concretos usados en un ambiente dado. Existe por ello la posibilidad de retrasar su aparición y limitar su extensión con un juicioso uso de los antibióticos, tanto en humanos como en animales. La resistencia tiene varias consecuencias, las infecciones por patógenos resistentes tienen más altas tasas de morbilidad y mortalidad, y suponen un mayor coste que las causadas por patógenos sensibles. (Medina, 2000).

Dentro de una misma especie, la prevalencia de resistencia a los antibióticos varía de forma importante según el año de estudio, el lugar geográfico, el tipo de hospital y el tipo de antibiótico examinado. Los genes de resistencia no están confinados a especies bacterianas en particular sino que tienen el potencial para una amplia distribución entre especies. Los mecanismos de resistencia bacteriana a antibióticos son fundamentalmente de tres tipos (Medina, 2000):

- Inactivación por destrucción o modificación, como beta-lactamasas, enzimas inactivantes de aminoglucósidos.
- Inaccesibilidad al lugar de acción, bien por disminución de la permeabilidad o por expulsión activa, como la resistencia a tetraciclinas por expulsión del antibiótico de la bacteria, o resistencia a betalactámicos por disminución de la permeabilidad.
- Alteración en el lugar de acción, como modificación del ribosoma por metilación (responsable de las resistencias a macrólidos), como la producción de nuevas enzimas con poca afinidad por el antibiótico.

## **Actividad antibacteriana**

La actividad antibacteriana se refiere a la capacidad de impedir la proliferación de bacterias que pueden provocar infecciones graves o incluso la muerte de los seres humanos. A su vez, se puede definir como la acción química que ejerce una sustancia en bajas concentraciones, contra los microorganismos, destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento (García, 2015).

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

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

### **Métodos utilizados para la determinación de la actividad antibacteriana**

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antibacterianos es de gran importancia para el correcto manejo de las infecciones clínicas. Las pruebas de sensibilidad o antibiograma, tienen como principal objetivo evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos y su resultado se utiliza como

factor predictivo de la eficacia clínica de un tratamiento. Las pruebas de sensibilidad definen la actividad *in vitro* de un antibacteriano frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. Los ensayos de sensibilidad han de estar estandarizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad (Herrera, 1999).

La determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) es la medida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico. Es la mínima capacidad de un antimicrobiano que es capaz de impedir el crecimiento de un microorganismo en unas condiciones normalizadas. Para llevarlo a cabo es necesario utilizar cepas control (de referencia) con el fin de que los resultados sean reproducibles y comparables. Este método nos ofrece información sobre la sensibilidad de las bacterias S (sensible) y R (resistente) (Wayne, 1997):

- *Sensible*: si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en el caso de un tratamiento a la dosis habitual.
- *Resistente*: si la probabilidad de éxito es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuera el tipo de tratamiento.

En la actualidad se cuenta con diversos métodos para evaluar la actividad antibacteriana, entre estos están:

- *Dilución en caldo*: En el método de dilución en tubo se utilizan una serie de tubos que contienen un medio de cultivo estéril y varias concentraciones de cada uno de los antibióticos que se van a ensayar. Todos los tubos se inoculan con el microorganismo que va a ser ensayado y se incuban a la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo. Posteriormente se examinan los tubos para determinar en cuáles de ellos se ha inhibido el crecimiento del

microorganismo. También se calcula la concentración inhibitoria mínima (CIM) que es la concentración más baja que es capaz de prevenir el crecimiento del microorganismo. Aquellos antibióticos que tengan la CIM más baja deberán ser los que tengan la mayor actividad antimicrobiana frente al patógeno (Mateos, 2010).

- *Difusión en agar (Kirby Bauer)*: En este método se incuba el microorganismo en una placa Petri con medio de cultivo solidificado sobre la que se añaden discos de papel impregnados con una cantidad conocida de antibiótico. Después de la incubación se observan en la placa la presencia de zonas claras alrededor de los discos llamadas halos de inhibición. La ausencia de un halo significa que el microorganismo es resistente al antibiótico. Por el contrario y por regla general, cuanto mayor es el halo más efectivo es el antibiótico. Este método se puede utilizar también para determinar la CIM al utilizar discos con distintas concentraciones de un mismo antibiótico (Mateos, 2010).

### **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 operacionalizó la variable dependiente (Tabla 1) como la actividad antibacteriana y la variable independiente (Tabla 2) la composición química de los extractos de *Tabernaemontana coronaria*.

**Tabla 1.** Operacionalización de la variable dependiente

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual
Actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de <i>T. coronaria</i> .	Dependiente	La actividad antibacteriana es la capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de una población bacteriana o para eliminarla.
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Método de Kirby-Bauer modificado  Técnica de difusión en disco	Cepas ATTC de: <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E coli</i> , <i>E. fecalis</i> , <i>S. aureus</i> .	Sensible  Resistente  Halos de inhibición del crecimiento bacteriano (mm)

**Portillo y Pérez, 2019.**

**Tabla 2.** Operacionalización de la variable independiente

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual
Componentes químicos presentes en los extractos de <i>T. coronaria</i> .	Independiente	La composición de los extractos comprende una mezcla compleja de metabolitos secundarios obtenidos por diferentes procesos de extracción a partir de una planta.
Definición operacional	Dimensiones	Indicador
Pruebas químicas cualitativas	Alcaloides Flavonoides Quinonas Esteroles Fenoles Triterpenos Saponinas	Reacciones colorimétricas o precipitación. Reacciones por revelación UV.

**Portillo y Pérez, 2019.**

## Hipótesis

Estudios previos sugieren que el género *Tabernaemontana* contiene metabolitos secundarios biológicamente activos, por lo cual, es de esperar que los extractos de *Tabernaemontana coronaria* posean sustancias estructuralmente relacionadas y con actividad antibacteriana.

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

## **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 el proyecto de investigación es de tipo confirmatorio, ya que se estableció la relación de causa-efecto entre los componentes químicos de los extractos de *Tabernaemontana coronaria* y su actividad antibacteriana sobre cepas Grampositivas y Gramnegativas.

#### **Diseño de 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 el proyecto de investigación

tuvo un diseño experimental ya que se sometió al objeto o grupo de investigación a estímulos bajo condiciones controladas en el laboratorio con el fin de observar los efectos producidos.

## **Población y Muestra**

### **Unidad de Investigación**

Hernández, Fernández y Baptista (2004), refirieron que una población es el conjunto de todos los casos que concuerdan con una serie de especificaciones. La población conduce hacia el conjunto finito o infinito de elementos finitos o infinitos de elementos que presentan características comunes con el fenómeno que se investiga. Una vez conociendo lo citado al principio la población a estudiar es finita, integrada por la especie *Tabernaemontana coronaria*, que se recolectó en el estado Mérida, Municipio Libertador, en la ciudad de Mérida, específicamente en el Jardín de Plantas medicinales de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (FFB-ULA).

### **Selección del Tamaño de la Muestra**

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

## Instrumento de Recolección de Datos

Los instrumentos que se utilizarán para la obtención de la información deberán ser validados por expertos, con el objetivo de determinar la validez del contenido. De hecho, se estima que la validez constituye el procedimiento que permite determinar la consistencia interna de los instrumentos, en cuanto a que midan lo que se propone medir, de ahí se dice que la validez, se refiere al grado en que un instrumento realmente mida la variable, según (Hernández y cols 2004).

La técnica que se utilizó para esta investigación fue la observación no estructurada, los instrumentos fueron fotografías y tablas donde se registraron los resultados de la actividad antibacteriana y la composición química de los extractos estudiados.

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

### Procedimiento de la Investigación

**Recolección de la planta:** La recolección de la especie *Tabernaemontana coronaria* se realizó en el Jardín de plantas medicinales de la FFB-ULA, en el estado Mérida, la planta fue identificada en el Herbario MERF “Dr. Luis Ruiz Terán” de la misma institución. Se recolectó cerca de 700 gramos de las hojas de la planta.

**Preparación de los extractos:** La planta previamente recolectada, específicamente sus hojas, se sometieron a un proceso de secado y molienda (79,57 g), posteriormente se inició el proceso de extracción utilizando la técnica de maceración y solventes en polaridad creciente (hexano y etanol) hasta agotamiento del material vegetal, las soluciones producto de la maceración, fueron concentradas en un sistema de destilación

continua hasta sequedad, obteniendo 3,36 g del extracto de hexano y 15,45 g del extracto etanólico.

**Tamizaje Fitoquímico:** Se aplicaron una serie de reactivos a los extractos obtenidos para identificar mediante reacciones de color y/o precipitación los metabolitos secundarios presentes. A continuación se describen las pruebas realizadas:

- *Ensayo de Dragendorff, Mayer y Wagner* (alcaloides): una porción del extracto fue diluida en una solución acuosa ácida, se sometió a calentamiento por 5 min y se filtró. El filtrado fue dividido en 3 partes y posteriormente se adicionó 3 gotas del Reactivo de Dragendorff, Mayer y Wagner, la prueba se considera positiva si se observa la aparición de un precipitado.
- *Prueba de la espuma:* la aparición de espuma cuando se agita el extracto diluido en agua, indica la presencia de saponinas.
- *Prueba de Shinoda* (flavonoides): el extracto seco se trató con HCl concentrado y virutas de magnesio, la aparición de coloraciones rojizas indican un resultado positivo.
- *Reacción de Cloruro férrico* (compuestos fenólicos): la muestra se disolvió en agua y se agregó unas gotas de solución de cloruro de hierro (III) diluido. La formación de una coloración roja, azul, verde, o púrpura indica la presencia de fenoles.
- *Ensayo de Lieberman-Burchard* (triterpenos y esteroides): el extracto se disolvió en diclorometano, posteriormente se colocó anhídrido acético y unas gotas de ácido sulfúrico concentrado. Una coloración verde azulada indica la presencia de grupo esterooidal y rojiza la presencia de triterpenos.
- *Prueba con hidróxido de amonio* (quinonas y cumarinas): el extracto se llevó a sequedad y se adicionaron gotas de  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado, la aparición de una coloración rojiza indica la presencia de quinonas y al

visualizar la muestra bajo la luz U.V la observación de una fluorescencia azul indica la presencia de cumarinas.

**Evaluación de la actividad antibacteriana:** La técnica se basó en el método originalmente descrito por Bauer y cols., (método de Kirby-Bauer). Esta prueba se desarrolló en el Laboratorio de Actinomicetos del Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes (ULA), bajo la asesoría de las profesoras Yndra Cordero e Ysbelia Obregón.

**Preparación de las muestras:** Se trabajó con los extractos de hexano y etanol, realizando las siguientes diluciones: 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,2 ppm, 15,8 ppm y 7,8 ppm. El solvente usado fue dimetil sulfóxido (DMSO).

**Microorganismos a evaluar:** Para la evaluación de la actividad antibacteriana mediante el método de difusión en agar, se estudiaron 5 bacterias (Tabla 3), 2 especies de bacterias Grampositivas y 3 de ellas Gramnegativas de referencia internacional pertenecientes a la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), provenientes del Cepario del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de La Universidad de Los Andes.

**Tabla 3.** Bacterias de referencia internacional (ATCC)

BACTERIAS	ATCC	TINCION DE GRAM
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Positiva
<i>Enterococcus faecalis</i>	29219	Positiva
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	23357	Negativa
<i>Escherichia coli</i>	25922	Negativa
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	Negativa

**Preparación de las placas:** A cada placa se le colocó aproximadamente 15 mL del agar Mueller-Hinton previamente esterilizado, la preparación se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial, posteriormente se dejó solidificando a temperatura ambiente.

**Preparación de los discos:** Los discos de papel filtro de 6 mm de diámetro se organizaron en placas de Petri de vidrio y se esterilizaron bajo luz ultravioleta por 24 horas.

**Preparación de los inóculos bacterianos:** Las cepas frescas purificadas se mantuvieron en un medio de cultivo de Agar Mueller Hinton, con un tiempo de incubación no mayor a 24 horas, de estas se tomó una pequeña cantidad de colonias con un asa en aro para luego ser suspendidas en una solución de cloruro de sodio al 0,85 % estéril, ajustando el inóculo hasta una concentración de bacterias equivalente a 0,5 en la escala de Mac Farland ( $10^{6-8}$  UFC/mL).

**Colocación de los discos impregnados:** En las placas de Petri con Agar Müller Hinton previamente inóculados con cada cepa estudio, se colocaron los discos impregnados con 10  $\mu$ L de cada una de la dilución de 1000 ppm de la muestra a ensayar y se colocaron los discos de antibióticos comerciales como control positivo (Tabla 2) correspondiente a cada de las

cepas en estudio, además del control negativo; usando una pinza metálica previamente esterilizada.

***Pre-incubación e incubación de las placas:*** Después de haber colocado los discos en las placas con Agar Müller Hinton previamente inóculados, estas se dejaron en la nevera a temperatura de 4 °C aproximadamente durante 30 min (pre-incubación), con la finalidad de que los discos impregnados con sus diferentes muestras difundieran a través del Agar, para luego llevarlas a la estufa durante 24 h a temperatura de 37 °C en posición invertida en atmósfera aeróbica (incubación).

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

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Resultados

Los datos recolectados sobre la caracterización fitoquímica y actividad antibacteriana de los extractos de *Tabernaemontana coronaria* fueron sistematizados en tablas y gráficos. Posteriormente, se interpretaron utilizando criterios de análisis relacionados con pruebas cualitativas de análisis fitoquímico, también con la técnica de difusión en disco a través del método de Kirby- Bauer.

#### **Determinación de metabolitos secundarios de los extractos de *Tabernaemontana coronaria*.**

En el análisis preliminar de las hojas de la especie *T. coronaria* se utilizaron los extractos de hexano y etanol, sin embargo, el rendimiento del extracto de hexano fue muy bajo. A continuación en la tabla 4 se presentan los resultados de las pruebas químicas realizadas para detectar la presencia de metabolitos secundarios en los extractos anteriormente mencionados.

**Tabla 4.** Resultados del análisis fitoquímico de las hojas de *Tabernaemontana coronaria*.

PRUEBAS	Metabolitos	EHTC	EETC
Reacción de Cloruro Férrico	Compuestos fenólicos	ND	+
Reacción de Shinoda	Flavonoides	-	+
Reacción de Dragendorff, Mayer y Wagner	Alcaloides	ND	++
Prueba de Hidróxido de Amonio	Quinonas	-	-
Reacción de Lieberman-Burchard	Esteroles y Triterpenos	Esteroles +	Esteroles +
Prueba de la Espuma	Saponinas	ND	-
Prueba de fluorescencia	Cumarinas	-	-

**EHTC:** Extracto de Hexano de las hojas de *T. coronaria*. **EETC:** Extracto de etanol de las hojas de *T. coronaria*. **ND:** no determinado. **(-):** Ausente. **(+):** Presente. **(++):** Abundante.

El tamizaje fitoquímico realizado a los extractos de hexano y etanol de las hojas de *T. coronaria* reveló la existencia de una amplia diversidad de metabolitos secundarios de interés farmacológico (Figura 4). El extracto de etanol resalta por su abundancia en alcaloides, y se identificaron además, compuestos fenólicos, flavonoides y esteroides. Por otra parte, el extracto de hexano se destaca por su mayor concentración de esteroides.

En la reacción de  $\text{FeCl}_3$  realizada para la detección de compuestos fenólicos se observó en el extracto de etanol un cambio de color a azul-negro, lo cual indicó la presencia de dichos compuestos. En cuanto a la detección flavonoides a través de la reacción de Shinoda se obtuvo un cambio de coloración a rojo leve para la muestra de etanol, lo cual indica resultados positivos para esta prueba. Respecto al análisis correspondiente a la determinación de alcaloides, utilizando los reactivos de Dragendorf, Mayer

y Wagner, solo los extractos de etanol de la especie evaluada produjeron precipitado, por otra parte, el análisis correspondiente a la determinación de esteroides y triterpenos, tanto los extractos de hexano como los de etanol de las hojas de la especie evaluada produjeron un cambio de color, observándose una coloración verde en la reacción de Liebermann- Bouchard, indicando la presencia de esteroides.

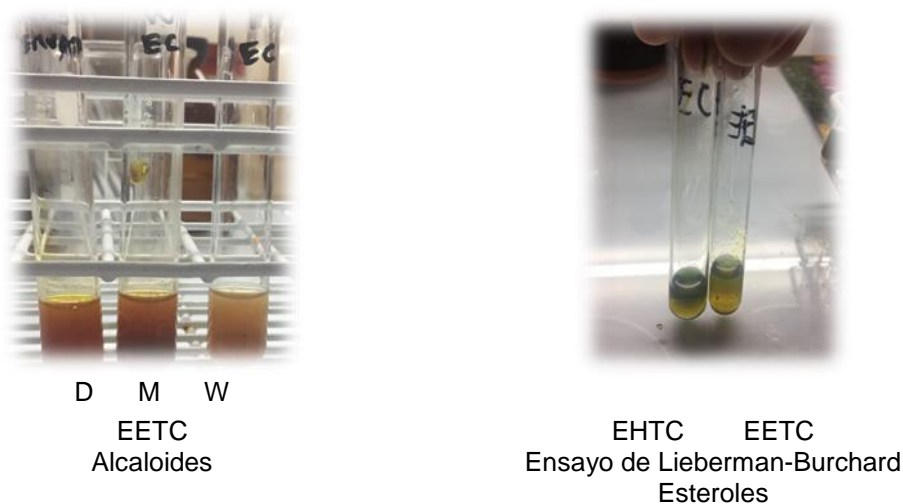
Asimismo, el análisis cualitativo de las hojas de *T. coronaria* permitió determinar la ausencia de quinonas (no formó anillo rojo), cumarinas (no produjo fluorescencia azul) y saponinas (no produjo espuma) en ambos extractos.



EETC  
Reacción de  $\text{FeCl}_3$   
Compuestos Fenólicos



EHTC    EETC  
Reacción de Shinoda  
Flavonoides



**EHTC:** Extracto de Hexano de la hoja de *T. coronaria*. **EETC:** Extracto de etanol de la hoja de *T. coronaria*. **D:** Dragendorff. **M:** Mayer. **W:** Wagner

**Figura 4.** Resultados del análisis fitoquímico de los extractos de las hojas de *T. coronaria*.

Los resultados obtenidos en esta investigación, son congruentes con los análisis realizados previamente en varias especies del género en estudio, ya que se determinó la presencia de alcaloides, esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides, en tal sentido, estos datos constituyen un aporte sobre la información fitoquímica de *Tabernaemontana coronaria* de la cual existen pocos análisis químicos.

#### **Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de *T. coronaria*.**

Los extractos obtenidos de las hojas de la especie *T. coronaria* fueron sometidos a las pruebas de susceptibilidad bacteriana, leyendo el halo de inhibición y calculando la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante la técnica de difusión en agar, para lo cual se prepararon diluciones con unas concentraciones de 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62, 7,8 ppm, de los extractos de hexano y etanol (Tabla 5).

**Tabla 5.** Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de las hojas de *T. coronaria*.

Microorganismos	Concentración (ppm)	Halos de Inhibición (mm) extractos		Halos de Inhibición (mm)		
		EETC	EHTC	PIP	AMP	ERI
<b><i>Staphylococcus aureus</i></b>	500	7	7			33
	250	7	7			
	125	7	7			
	62,5	7	7			
	31,25	7	7			
	15,62	7	7			
	<b>7,8</b>	<b>7</b>	<b>7</b>			
<b><i>Enterococcus faecalis</i></b>	500	0	0		32	
	250	0	0			
	125	0	0			
	62,5	0	0			
	31,25	0	0			
	15,62	0	0			
	7,8	0	0			
<b><i>Escherichia coli</i></b>	500	7	7	24		
	250	7	7			
	125	7	7			
	62,5	7	7			
	31,25	7	7			
	15,62	7	7			
	<b>7,8</b>	<b>7</b>	<b>7</b>			

**TABLA 5. Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de la hojas de *T. coronaria* (Continuación)**

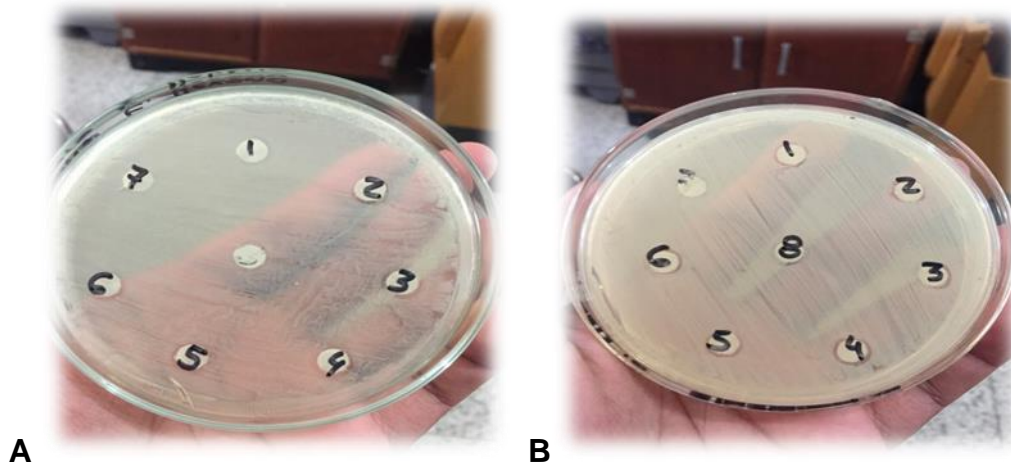
Microorganismos	Concentración (ppm)	Halos de Inhibición (mm)		Halos de Inhibición (mm)		
		EETC	EHTC	PIP	AMP	ERI
	500	12	7			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	250	12	7	27		
	125	12	7			
	62,5	12	7			
	31,25	12	7			
	15,62	12	7			
	<b>7,8</b>	<b>12</b>	<b>7</b>			
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	500	7	8	27		
	250	7	8			
	125	7	8			
	62,5	7	8			
	31,25	7	8			
	15,62	7	<b>8</b>			
	7,8	7	0			

**EHTC:** Extracto de hexano de las hojas de *T. coronaria*. **EETC:** Extracto de etanol de las hojas de *T. coronaria*. **PIP:** Piperacilina. **AMP:** Ampicilina. **ERI:** Eritromicina.

Los extractos de hexano y etanol de las hojas de *T. coronaria* resultaron activos contra las cepas de *Klebsiella pneumoniae* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (B) (Figura 5), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, sin embargo, ambos extractos fueron inactivos en contra la cepa de *Enterococcus faecalis*.

En el caso de *Klebsiella pneumoniae* el extracto de hexano presentó una concentración inhibitoria mínima de 15,62 ppm y el resto de las CIM no pudo ser determinada ya que son concentraciones menores a 7,8 ppm y no se cuenta con los instrumentos analíticos para seguir diluyendo la muestra.

**Figura 5.** Halos de inhibición de los extractos de hexano de la hoja de *Tabernaemontana coronaria*.



**Concentraciones utilizadas:** 8: 10000 ppm, 7: 500 ppm, 6: 250 ppm, 5:125 ppm, 4: 62,5 ppm, 3: 31,25 ppm, 2: 15,62 ppm, 1: 7,8 ppm. **A:** ATCC de *Klebsiella pneumoniae*. **B:** ATCC de *E. coli*.

www.bdigital.ula.ve

## Discusión

En esta investigación el tamizaje fitoquímico reveló la presencia de alcaloides, esteroides, compuestos fenólicos y flavonoides en el extracto de etanol, sin embargo, en el extracto de hexano solo se evidenció la presencia de esteroides, estos resultados son congruentes con los estudios previos de *T. coronaria* en los cuales se reporta la determinación de compuestos alcaloidales, terpenoides, fenólicos y taninos en los extractos etanólicos y acuosos (Pratchayasakul y cols, 2008).

Con respecto a la actividad antibacteriana, los extractos de hexano y etanol evaluados a diferentes concentraciones fueron activos frente a las cepas ensayadas a concentraciones de 7,8 ppm, estos resultados son de

suma importancia porque validan el uso medicinal de las hojas de *T. coronaria*.

Investigaciones anteriores determinaron la actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antioxidante, analgésica y antitumoral de extractos etanólicos y acuosos de diferentes partes de *T. coronaria*, así como de los alcaloides que han logrado aislarse de la misma, atribuyendo la mayoría de las actividades a los compuestos alcaloidales y flavonoides (Pratchayasakul y cols, 2008). También se determinó que la variabilidad del clima, ubicación geográfica y otros factores influyen en la composición fitoquímica de la especie (Sumanthi y Devipriya, 2016). Cabe destacar que en este estudio el extracto de hexano fue activo contra las cepas ensayadas y que en su composición química se determinó la presencia de esteroides, sin embargo es necesario acotar que no se realizó la prueba de alcaloides por problemas de solubilidad con los reactivos por lo cual se presume que este extracto también presente alcaloides y que su actividad se deba a este tipo de metabolitos secundarios.

De este modo, esta investigación representa un aporte desde el punto de vista fitoquímico y biológico de esta planta ya que no hay reportes de la composición química y actividad antibacteriana de *Tabernaemontana coronaria* recolectada en Venezuela.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### Conclusiones

El tamizaje fitoquímico de los extractos de las hojas de *Tabernaemontana coronaria*, reveló la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, alcaloides y esteroides en el extracto etanólico. Por otra parte, en el extracto de hexano se determinó la presencia de esteroides. Asimismo, se estableció la ausencia de saponinas, taninos, cumarinas y quinonas en ambos extractos.

La actividad antibacteriana frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Klebsiella pneumoniae* de los extractos de hexano y etanol de las hojas de *T. coronaria* se presentó a concentraciones entre 500 y 7,8 ppm, sin embargo la cepa de *E. fecalis* fue resistente en todo el intervalos de concentraciones evaluado.

La CIM del extracto de hexano fue de 15,62 ppm para *Klebsiella pneumoniae*, para el resto de las concentraciones de los extractos que fueron evaluados la CIM estuvo por debajo de 7,8 ppm, sin embargo, no pudo establecerse debido a que las concentraciones a evaluar eran muy bajas y no se contaba con el material necesario para realizarla.

Los extractos de hexano y etanol de las hojas de *Tabernaemontana coronaria* poseen propiedades antibacterianas significativas contra las cepas Grampositivas y Gramnegativas ensayadas, considerándose como posible fuente natural para el desarrollo de nuevos antibióticos.

### **Recomendaciones**

Aislar, identificar y cuantificar los metabolitos secundarios presentes en los extractos de hexano y etanol de las hojas de *T. coronaria*

Evaluar diversas actividades biológicas (antifúngica, antiparasitaria, citotóxica, antioxidante) de los extractos y compuestos mayoritarios de *T. coronaria*.

Realizar estudios de toxicidad de los productos fitoquímicos de *T. coronaria*.

Estudiar la composición química y la actividad farmacológica de otras partes de la especie *T. coronaria* (tallos, tronco, raíz).

## REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRAFICAS

- Agra M., França P., Barbosa-Filho J. (2007). Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 17. 114-140.
- Atanasov A., Waltenberger B., Pferschy-Wenzig E., Linder T., Wawrosch C., Uhrin P., Temml V., Wang L., Schwaiger S., Heiss E., Rollinger J., Schuster D., Breuss J., Bochkov V., Mihovilovic M., Kopp B., Bauer R., Dirsch V., Stuppner H. (2015). Descubrimiento y reabastecimiento de productos naturales derivados de plantas farmacológicamente activos: una revisión. *Biotechnology Advances*. 33. 1582-1614.
- Bado I., Cordeiro, V., Garcia, L. Robino, V. Seija, R. Vignoli. (2010). Principales grupos de antibióticos. *Temas de Bacteriología y Virología Médica*. Montevideo. 631-647.
- Bing-Jie Z, Xi-Feng T, Mei-Fen B, Xiu-Hong Z, Ling N, Xiang-Hai C. (2015). Alcaloides citotóxicos de *Tabernaemontana officinalis*. *Phytochemistry*. 120. 46-52.
- Boligon, Piana, Felli, Nunes, Vendruscolo, Cordenonsi, Weiblen, Lovato, Hartz, Campos y Linde (2015). Análisis de HPLC y actividad antimicrobiana, antimicobacteriana y antiviral de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. *Journal of applied biomedicine*. 13. 7-18.
- Breitbach, U. B., Niehues, M., Lopes, N. P., Faria, J. E., & Brandao, M. G. (2013). Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. *Journal of Ethnopharmacology*. 147. 180-189.

- Bruneton J. (2001). Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales. 2da Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Carmona F. Pereira A. (2013). Medicamentos a base de plantas: conceptos antiguos y nuevos, verdades y malentendidos. Revista Brasileira de Farmacognosia. 23. 379-385
- Collard, P. (1976). The development of Microbiology. Cambridge University.
- Daniel M., Sabnis S. (1978). Chemotaxonomical studies on Apocynaceae. Indian Journal of Experimental Biology. 16. 512-3.
- Ezcurra, C. (1981). Revisión de las Apocináceas de la Argentina. Darwiniana 23. 367-474.
- Endress and Bruyn. (2000). A revised classification of the Apocynaceae. The Botanical Review. 66. 1-56.
- Ferreira, T. ., Moreira, C., Cária, N., Victoriano, G., Silva Jr, W.F. Magalhães, J.C. (2014). Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. Revista Brasileira de Plantas Medicas. 16. 290–298.
- Gallegos-Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. 77.
- García D. (2015). Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de dos especies de plantas del género *Amaranthus* aplicado sobre cepas de interés clínico en el periodo Diciembre de 2013. Tesis de Grado. Riobamba, Ecuador. 7-8.
- Gentry, A. H. (2001). Apocynaceae. In: W.D. Stevens, C. Ulloa Ulloa, A. Pool & O.M. Montiel (eds.). Fl. Nicaragua. Monographs in Systematic Botany. Missouri Botanical Garden. 85. 116–132.

- González A. (2004). Obtencion de aceites y extractos etanolicos de plantas del amazonas. Departamento de Ingenieria Quimica. Universidad Nacional de Colombia, sede Manizales.
- Granados, R. Villaverde, M. (2002). Microbiologia. Madrid, España. Editorial Parainfo.
- Guida A., De Battista G., Bargardi S. (2017). Actividad antibacteriana de alcaloides de *Tabernaemontana catharinensis*. Cátedra de Microbiología General-Bioquimica. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Misiones, Argentina.
- Guijarro, M. (2007). Las Plantas Medicinales y su seguridad. Journal Nexus Médica. 120-170
- Henriques A, Melo A., Moreno P., Ene L., Henriques J., Schapoval E. (1996). *Ervatamia coronaria*: chemical constituents and some pharmacological activities. Journal Ethnopharmacology. 50. 19–25.
- Hernández, S., Fernández, C., y Baptista, M. (2010). Metodología de la investigación. Definición del alcance de la investigación a realizar: exploratoria, descriptiva, correlacional o explicativa, México, D.F., México, McGraw-Hill.
- Herrera M. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Metodología de Laboratorio. Revista médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera. 34.
- Heywood, V. H. (1985). Las plantas con flores. Editorial Reverté. España. 329
- Hurtado J. (2010). El “acerca de” contenidos de la investigación en: El proyecto de investigación. Comprensión holística de la Metodología de la investigación. 6<sup>ta</sup>. Ed. Caracas, Bogotá: Ediciones Quirón.

- Iladiba. (1998). Resistencia bacteriana, supervivencia del más apto. vol. XII, Madrid, España.
- Jain S., Sharma P., Ghule S., Jain A. (2013). Jain, In vivo anti-inflammatory activity of *Tabernaemontana divaricata* leaf extract on male albino mice, Chinese Journal of Natural Medicine. 11. 472-476.
- Poornima K and Gopalakrishnan V. (2014). Actividad contra el cáncer de Tabernaemontana coronaria, en carcinógeno inducido a células limpias y células renales con carcinoma. Chinese Journal of Biology. 2014.
- Khandaker, S., Sajan Das, O., Akhter, R., Shahriar, M. (2016). *In vivo* pharmacological investigations of the crude extracts of *Calamus viminalis* (L.). Journal of Pharmacognosia and Phytochemistry. 5. 263–269.
- Kirtikar K., Basu B. (1975). Indian Medicinal Plants, v-2. Dehradun, India. Bishen Mahendra Pal Singh. 842-4.
- Kuklinski C. (2000). Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas. Barcelona España, Ediciones Omega.
- Lim K., Thomas N., Abdullah Z., Kam T. (2009). Secotabersonine alkaloids from *Tabernaemontana corymbosa*. Phytochemistry. 70. 424-429.
- Sethuraman M., Aishwarya V., Kamal C., Jebakumar T. Immanuel E. (2012). Los estudios sobre Ervatina – El fitoconstituyente anticorrosivo de la *Ervatamia coronaria*. Arabian Journal Chemistry. 10. 522-530.
- Mandal M., Mukherji S. (2001). A study on the activities of a few free radicals scavenging enzymes present in five roadside plants, Journal Enviromental Biology. 22. 301-305.

- Marcano, D. y Hasegawa, M. (2012). Fitoquímica orgánica. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Márquez R. (1999). Alcaloides en la semilla de *Tabernaemontana coronaria* (Apocynaceae) y evaluación de la actividad mutagénica. Bogotá. Trabajo de grado Postgrado en Biología con énfasis en fitoquímica. Microficha. Pontificia Universidad Javeriana.
- Martínez, A (2005). Flavonoides. (Tesis para optar al título de doctor en química). Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín.
- Martínez Ávila Y, Gómez López LL. (2013). Impacto social de una estrategia de intervención sobre prescripción racional de medicina verde en Céspedes durante 2011. Revista Cubana de Plantas Medicinales.
- Marzocca A. y Milano V. (1954). Las plantas cultivadas en la Tierra del Fuego. IDIA. 80. 1-40.
- Mateos, P. (2010). Agentes antimicrobianos y microorganismos. Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca. Salamanca, España. Versión española: "El desarrollo de la Microbiología", Editorial Reverté.
- Menecucci, Mucellini, Machado, Higashi, Ribeiro, Porto, Pilau, Goncalves, y Braz (2019), Látex de *Tabernaemontana catharinensis* (A. DC) — Apocynaceae: una alternativa para la producción de compuestos biológicamente activos. Industrial Crops and Products. 129. 74-84.
- Medina, J. (2000). Guía de antimicrobianos y tratamiento de las infecciones. Madrid, España. Ediciones Díaz de Santos.
- Muniyandi A., Thomas P., Sheu J., Pitchairaj G. (2017). Potencial antioxidante y anticataractogénico in vitro de nanopartículas de plata biosintetizadas utilizando un extracto etanólico de hojas de

*Tabernaemontana divaricata*. Biomedicine and Pharmacotherapy. 91. 467-475.

Nicola C., Salvador M., Escalona Gower A., Moura S., Echeverrigaray S. (2013). Chemical constituents antioxidant and anticholinesterasic activity of *Tabernaemontana catharinensis*. Science World Journal. 10.

Parella, S., Martins, F. (2010). Metodología de la Investigación Cuantitativa. Fedupel, Caracas.

Pereira C., Marques M., Barreto A., Siani A., Fernandes E., Meireles M. (2004). Extraction of indole alkaloids from *Tabernaemontana catharinensis* using supercritical CO<sub>2</sub> + ethanol: an evaluation of the process variables and the raw material origin. Journal Supercritical Fluids. 30. 51-61.

Pérez, C. (2008). El Uso de las Plantas Medicinales. Revista Intercultural. 47-120

Perry M. (1980). Plantas medicinales de Asia oriental y sudoriental: propiedades y usos atribuidos. Cambridge, London. Editorial MIT Press.

Poornima K., Gopalakrishnan V. (2014). Anticancer activity of *Tabernaemontana coronaria* against carcinogen induced clear cell renal cell carcinoma. Chinesse Journal of Biology. 8.

Pratchayasakul W., Pongchaidecha, A., Chattipakorn, N., Chattipakorn, S. (2008). Ethnobotany & ethnopharmacology of *Tabernaemontana divaricata*. Indian Journal of Medical Research. 127. 317-318

Pratchayasakul W, Pongchaidecha A, Chattipakorn N, Chattipakorn S. (2008). Ethnobotany and ethnopharmacology of *Tabernaemontana divaricate*. Indian Journal of Medical Research. 127. 317-335

- Quintans-Júnior L., Silva D., Siqueira J., Souza M., Almeida R., Silva-Júnior R. (2007). Anticonvulsant properties of the total alkaloid fraction of *Rauvolfia ligustrina* Roem. et Schult. in male mice. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 17. 176-180.
- Raven P., Hong Y. (1995). *Flora of China* Editorial Committee. Science Press & Missouri Botanical Garden Press, Beijing y St. Louis. 16. 1-479.
- Rocha L., Almeida J., Macedo R., Barbosa-Filho L. (2005). A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*. 12. 514-535.
- Romero, Raul. (2000). *Microbiología y parasitología humana*. Ciudad de México, Mexico. Editorial Panamericana.
- Seeff, B. (2008). *Complementary and Alternative Medicine In Chronic Liver Disease*. Summary of an NIH workshop. 47-223.
- Senez. (1976). *Microbiología General*. Primera edición española. Madrid, España. Editorial Alhambra.
- Sharma P., Cordell G. (1988). Heyneanine hydroxyindolenine, a new indole alkaloid from *Ervatamia coronaria* var. plena. *Journal of Natural Products*. 51. 528-531.
- Soares D., Pereira C., Meireles M., Saraiva E. (2003). Anti-Leishmania (L.) amazonensis activity of supercritical CO<sub>2</sub> + ethanol extracts from *Tabernaemontana catharinensis*. *Revista Instituto Medicina Tropical de Sao Paulo*. 45. 110.
- Souza W., Brehmer F., Nakao L., Stinghen A., Santos C. (2007). Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 17. 191-196.
- Stryer Lubert, Berg Jeremy, Tymoczko John. (2007). *Bioquímica*. Barcelona, España. Editorial Reverte.

- Sumanthi, R., Devipriya, S. (2016). Antibiograma de *Candida albicans*, utilizando extractos de hojas de *Tabernaemontana divaricata*. International Journal of Current Research in Biology and Medicine. 1. 6-13.
- Urbina F, Villamizar D (2012). Análisis del Aceite Esencial de la Especie *Piper eriopodon* y Determinación de su Actividad Antimicrobiana. Trabajo de grado. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. 1. 20-24, 48-53.
- Van Beek T.A., Kuijlaars F., Thomassen P., Verpoorte R., Baerheim Svendsen A. (1984). Antimicrobially active alkaloids from *Tabernaemontana pachysiphon*. Phytochemistry. 3. 1771-1778.
- Van Beek T., Verpoorte R., Svendsen A., Leeuwenberg A., Bisset N. (1984). *Tabernaemontana* L. (Apocynaceae): a review of its taxonomy, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology. 10. 1-156.
- Vander, A. (2008). Plantas medicinales, las enfermedades y su tratamiento por las plantas. Editorial y Librería Sintés, Barcelona, España, 253.
- Verpoorte, R. and Baerheim Svendsen, A. (1978). Alkaloids of *Strychnos dolichothyrsa*. Journal of Pharmaceutical Sciences. 67. 171-174.
- Verpoorte, R., Tjssin A Tsoi, A., Doorne, H. van and Baerheim Svendsen, A. (1982). Medicinal plants of Surinam. I. Antimicrobial activity of some medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 5. 221-226.
- Watson, L., y Dallwitz. (1992). Las familias de plantas con flores: descripciones, ilustraciones, identificación y recuperación de información. Nordic Journal of Botany. Versión: 1 de junio de 2019.
- Wayne P. (1997). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCCLS) Approved Standard M2-A6.