



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



CÁTEDRA DEL COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN
"Dr. José Rafael Luna"

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y SINÉRGICA DE EXTRACTOS DE
Tectona grandis L. f. AL COMBINARSE CON ANTIBIÓTICOS ESTÁNDAR
FRENTE A CEPAS BACTERIANAS DE REFERENCIA EN LA FACULTAD
DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS (ULA)**

Trabajo de Grado para optar a la licenciatura en Bioanálisis

Autora: María Y. Roa Zambrano

Tutora: Johanna C. Hernández

Cotutor: Luis F. Rojas Beltrán

Mérida, 2019

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso por ser la luz de mi vida y darme la oportunidad, el entusiasmo y la fortaleza de culminar mis estudios brindándome salud y amor cada día de mi existencia.

Desde lo más profundo de mi corazón a mis padres Santiago y Francisca por ser ejemplo de perseverancia, humildad, amor incondicional y sacrificio, por sus palabras de aliento en cada momento, por creer y confiar en mí, por los consejos y valores que me han hecho ser una mejor persona.

A Oscar por ser parte importante en mi vida, por haberme apoyado en los momentos más difíciles, por la paciencia, por ser mi equilibrio, brindarme su apoyo y alentarme día a día.

A Eusnaiker por su paciencia y comprensión, gracias por demostrarme su apoyo, confianza, amistad, cariño y amor.

Al profesor Luis B. Rojas, gracias por toda su ayuda y consejos, estaré eternamente agradecida.

A mi tía Juana por su apoyo y consejos durante toda esta etapa.

AGRADECIMIENTOS

A la ilustre y ejemplar Universidad de Los Andes, por abrir sus puertas para recibir la educación de sus mejores Profesores que hacen vida en ella.

Al instituto de investigación de la facultad de farmacia y Bioanálisis de la universidad de los Andes porque me abrieron las puertas para la realización de la presente Tesis.

A la profesora Jhoanna Hernandez y Alida Pérez mil gracias por su valiosa colaboración y asesoramiento en la dirección del presente trabajo investigativo.

A la Dra. Rosa Aparicio, Dios lo bendiga por la enseñanza impartida; gracias por su tiempo y por sus acertadas opiniones en la realización de este trabajo.

A la profesora María Eugenia Lucena y al profesor Luis Rojas, por aceptar ser parte de este proyecto, por el tiempo que dedicaron para que esto hoy sea realidad, por su excelencia como profesionales y por ser fuente de inspiración al transmitir vocación y entrega por lo que se hace.

A aquellas personas que estuvieron a mi lado al momento de emprender esta experiencia, escuchándome, transmitiéndome positividad y sembrando amor en mi corazón para enfrentar cualquier adversidad.

Y a todas aquellas personas que de una u otra manera colaboraron con este trabajo, muchas gracias.

RESUMEN

En la presente investigación, se evaluó la actividad antibacteriana y sinérgica de los extractos de hojas y corteza de *Tectona grandis* L. f. concentrados y diluidos frente a cepas bacterianas de importancia clínica. La metodología incluyó la adquisición, secado, maceración, molienda, preparación de los extractos crudos y concentración por rotaevaporación, análisis fitoquímico y análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, la actividad antibacteriana y la evaluación sinérgica se realizaron por el método de difusión en agar.

Permitiendo comprobar la presencia de flavonoides, triterpenos, fenoles, alcaloides y esteroides que han sido reportados con actividad antimicrobiana. Así como los compuestos mayoritarios de la corteza (hexano), el ácido linoleico 35,26 % ácido oleico 27,40 % y el ácido hexadecanoico 18,36 %. En (diclorometano) Friedoolean-6-eno 40,91 %, y en (etanol) el compuesto mayoritario Lupeol 60,04 %,

En los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana se encontró que los extractos presentaban diversos grados de inhibición frente a los microorganismos de estudio, con rangos de CIM que oscilaron entre 10 y 0,65 mg/mL. También se observó un leve sinergismo en *E. coli* y piperacilina y *E. faecalis* y penicilina mientras que en *K. pneumoniae* y *S. aureus* no se observaron cambios significativos, el efecto positivo o sinérgico, posiblemente se da por el mecanismo de sumación, debido a que ambas sustancias producen el efecto por mecanismos diferentes y juntos dan como resultado un efecto mayor.

Palabras claves: Actividad antibacteriana, análisis fitoquímico, *Tectona grandis* L. f, resistencia bacteriana, sinergismo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTOS	vi
RESUMEN	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I. EL PROBLEMA.	
Planteamiento del Problema.....	3
Justificación de la Investigación.....	4
Objetivos de la Investigación.....	5
Objetivo General.....	5
Objetivos Específicos.....	5
Formulación de la Hipótesis.....	6
CAPITULO II. MARCO TEORICO	
Trabajos Previos.....	7
Antecedentes Históricos.....	9
Bases Teóricas.....	11
Familia Lamiaceae.....	11
Clasificación Taxonómica de la Familia Lamiaceae.....	11
Género <i>Tectona</i>	13
Usos de <i>Tectona grandis</i> L. f. en la medicina tradicional.....	15
Extractos Vegetales.....	16
Extracción.....	17
Maceración.....	18
Análisis de Extractos Vegetales.....	18
	VI

Cromatografía de Gases.....	19
Espectrometría de Masas.....	20
Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas.....	21
Metabolitos Secundarios Con Propiedades Beneficiosas Sobre la Salud.....	22
Tamizaje Fitoquímico de Metabolitos Secundarios.....	24
Métodos para Evaluar la Actividad Antibacteriana.....	27
Métodos de difusión en agar.....	27
Desventajas del Método de difusión.....	27
Espectro de Actividad Antibacteriana.....	28
Antibióticos.....	29
Clasificación de los Antibióticos Según su Mecanismo de Acción.....	29
Resistencia a Antimicrobianos Mediada por Microorganismos.....	33
Bacterias.....	34
Definición de Términos.....	36
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	
Enfoque de la Investigación.....	38
Tipo y Diseño de la Investigación.....	38
Población y Muestra.....	38
Procedimiento o Metodología.....	39
Extracción de los Compuestos Activos de <i>Tectona grandis</i> L. f.....	39
Separación e Identificación de los Componentes Químicos Presentes en los Extractos.....	39
Determinación de la Actividad Antibacteriana por el Método de Difusión en Agar (Kirby-Bauer).....	40
Evaluación del Efecto Sinérgico.....	42
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Análisis Fitoquímico Preliminar de Extractos de <i>Tectona grandis</i> L. f.....	43
Composición Química de Extractos Vegetales de la Corteza de <i>Tectona grandis</i> L. f.....	44
	VII

Evaluación de la Actividad Antibacteriana de los Extractos.....	46
DISCUSIÓN	49
CAPÍTULO V. CONCLUSIÓN	55
RECOMENDACIONES	56
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	57

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Usos y actividad de algunos géneros de la familia Lamiaceae.....	12
Tabla 2. Clasificación de los Antibióticos de Acuerdo a su Composición Química.....	31
Tabla 3. Metabolitos Secundarios Presentes en los Extractos de Hojas de <i>Tectona grandis</i> L. f.....	43
Tabla 4. Metabolitos Secundarios Presentes en los Extractos de Corteza de <i>Tectona grandis</i> L. f.....	43
Tabla 5. Compuestos Identificados en el Extracto de la Corteza <i>Tectona</i> <i>grandis</i> L. f. por Medio de CG-EM.....	45
Tabla 6. Actividad Antibacteriana de Extractos de <i>T. grandis</i> L. f.....	46
Tabla 7. Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).....	47
Tabla 8. Concentración Mínima Inhibitoria (CIM).....	47
Tabla 9. Sinergismo Combinando los Extractos de Hojas <i>T. grandis</i> L. f. y sus Diluciones con Penicilina Frente a <i>E. faecalis</i>	48
Tabla 10. Sinergismo Combinando los Extractos de <i>T. grandis</i> L. f. y sus Diluciones con Piperacilina frente a <i>E. coli</i>	48

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Hojas y Frutos de <i>Tectona grandis</i> L. f.....	13
Figura 2. Estructura Química del Lupeol.....	44
Figura 3. Estructura Química del Ácido Linoleico	45
Figura 4. Estructura Química del Ácido Oleico.....	45
Figura 5. Estructura Química del tetracosano.....	46
Figura 6. Estructura Química del Ácido hexadecanoico.....	46
Figura 7. Estructura Química del Heneicosano.....	46

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos antiguos, en el mundo ha existido una extensa variedad de plantas con principios activos que tienen actividad farmacológica, por esta razón han sido utilizados como fuentes de elaboración de fármacos o preparados tradicionales, contra diversos microorganismos, todo esto con el objetivo de prevenir o curar ciertas enfermedades infecciosas (Njimoh y col., 2015). En la actualidad numerosos microorganismos han desarrollado múltiples mecanismos que le permiten resistir a la acción de los más nuevos y potentes agentes antimicrobianos (Fuente, Villarreal, Díaz y García, 2016).

Es importante mencionar que los antibióticos son sustancias producidas principalmente por el metabolismo de bacterias y hongos, pero también pueden ser obtenidos por síntesis química para inhibir el crecimiento o destruir dichos microorganismos, sin embargo se ha aumentado la proliferación de cepas resistentes por la aplicación inadecuada de ciertos fármacos, lo cual también ha sido provocado por malentendidos sociales, que no diferencian entre infecciones bacterianas y virales, y por un miedo generalizado a las bacterias basado en falsa información, favoreciendo el fracaso de los tratamientos (Fuente y col., 2016).

De hecho en las últimas décadas se ha incrementado significativamente las infecciones causadas por microorganismos, debido a que desarrollan resistencia a los antibióticos tanto de origen sintético como natural, utilizados para tratar infecciones ocasionadas por patógenos, representando un grave problema a nivel hospitalario, terapéutico, epidemiológico y de salud pública, ya que cada vez que los pacientes ingresan a hospitales adquieren una o más infecciones que no existían o estaban en proceso de incubación al momento del ingreso al hospital (Serra-Valdés, 2017).

Ahora bien, la emergencia de la resistencia bacteriana ha generado nuevos intereses en la búsqueda de medicamentos con poder antibacteriano y es por ello, que

los productos naturales desempeñan un papel fundamental porque constituyen fuentes de moléculas bioactivas. De esta manera el estudio de las plantas medicinales ha adquirido relevancia por ser una herramienta para muchos investigadores en todo el mundo, en la búsqueda de sustancias con actividad antibacteriana, demostrándose la existencia de una amplia gama de productos y extractos de plantas que tienen actividad contra algunos microorganismos, lo que contribuye de alguna manera u otra erradicar o contrarrestar la prevalencia de ciertas enfermedades infecciosas (Purushotham y col., 2010; Serra-Valdés, 2017).

Con relación al estudio de las plantas, la especie botánica *Tectona grandis* L. f pertenece a la familia Lamiaceae, es la especie más importante del género *Tectona*, es conocida por su nombre vulgar como Teca, es el árbol tropical más plantado en el mundo, crece hasta 50 metros de altura, su madera tiene gran resistencia al deterioro de las termitas y hongos; farmacológicamente la planta ha sido investigada revelando propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antipiréticas, citotóxicas, analgésicas, hipoglucemiante y antiplasmodial. Los principales ingredientes activos que son responsables de esta acción son la tectoquinona, el lapachol y el deoxilapachol; además de estos, la teca contiene otros fitoquímicos, como los triterpenoides, alcaloides, esteroides, lignanos, ésteres grasos y compuestos fenólicos, algunos autores indican que metabolitos en particular la quinina (alcaloide) mostraron propiedades antimicrobianas, tales como antifúngica y actividades alelopáticas (Lanka, 2017).

De allí la importancia de conocer si los compuestos activos aislados presentes en los extractos de las hojas y corteza de *Tectona grandis* L. f. actúan en sinergismo con antibióticos como piperacilina, penicilina, gentamicina, eritromicina, y clindamicina para inhibir el crecimiento bacteriano en condiciones experimentales, en esta investigación, se utilizó el método de sensibilidad por difusión en agar debido a que es económico, tienen fácil aplicabilidad y de óptimos resultados.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

Desde tiempos prehistóricos el hombre ha utilizado las plantas con fines medicinales bajo diversas formas farmacéuticas, tales como infusiones, decocciones, cápsulas, comprimidos, jarabes, gotas, aceites esenciales, entre otros (Gallegos-Zurita, 2016). Así mismo, las plantas han sido una piedra angular en la medicina tradicional por tener una habilidad casi sin límites de sintetizar compuestos químicos, que en muchos casos actúan como mecanismos de defensa contra algunos microorganismos (Castillo, Pascual, Cunhanune, Lorente y Cañete, 2014).

Es importante resaltar que en la actualidad, sigue siendo indispensable el estudio científico de las plantas y el desarrollo de nuevos fármacos o combinaciones terapéuticas debido a los problemas de eficacia, asequibilidad y resurgimiento de resistencias bacterianas (Hemaiswarya, Kruthiventi y Doble, 2008). La falta de antibióticos eficaces es un tema de competencia mundial, pues tiene el potencial de afectar a todos los seres humanos, esto amenaza con desmejorar la atención médica moderna si no se controla el problema, la resistencia a los antibióticos llevará a la transmisión mundial de infecciones intratables, al deterioro masivo de la salud y a la pérdida de vidas, pues cada vez existen más especies de bacterias, que causan una serie de enfermedades (Perozo, 2014).

Las plantas son conocidas por producir una enorme variedad de pequeñas moléculas que tienen propiedades antibacterianas, el aislamiento y fraccionamiento de estos compuestos puros a veces conducen a una reducción o pérdida de la actividad, esto probablemente ocurre porque algunos de los compuestos actúan en sinergismo para combatir las infecciones (Hemaiswarya, y col., 2008). Por esta razón aumenta la necesidad de estandarizar y dar prioridad a los extractos de plantas

como un nuevo enfoque en el tratamiento de infecciones microbianas (Njimoh y col., 2015).

En investigaciones fitoquímicas realizadas en especies de *Tectona* se han encontrado fenoles, glucósidos, alcaloides, esteroides, esteres grasos, lignanos, triterpenoides, flavonoides, antraquinonas, naftoquinonas y apocarotenoides (Alabi y Oyeku., 2017; Dokuparthi y col., 2017). Estudios anteriores soportan la hipótesis, al demostrar que compuestos activos aislados de *Tectona grandis* L. f. como el lapachol, la antraquinona, tectoquinona y el dehidro-landa-alfa-lapachona, tienen potente actividad antibacteriana (Lanka, 2017).

De acuerdo a esta problemática se plantea la siguiente interrogante: ¿Cuál será el efecto producido en cepas bacterianas de referencia internacional *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29912), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Escherichia coli* (ATCC 25992), y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), al combinar extractos de hojas y corteza de *Tectona grandis* L. f. con antibióticos estándar?

Justificación de la Investigación

En la actualidad, la resistencia bacteriana representa un problema muy grave al que nos enfrentamos día a día, ya que las infecciones ocasionadas por patógenos multirresistente, dificultan el tratamiento, aumentan los costos del tratamiento e incrementan la morbilidad y la mortalidad de los enfermos afectados (Maciques-Rodríguez, Castro, Machado y Manresa, 2002). Entre los microorganismos patógenos que han causado resistencia a antimicrobianos tenemos:

Entre los Gram positivos *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, que produce infecciones de heridas, neumonía y septicemia; y entre los Gram negativos *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, que causa infecciones urinarias, sepsis, gastroenteritis e insuficiencia renal, su aparición es cada vez más frecuente en los aislamientos como productoras de β -lactamasa de espectro extendido (BLEE), los

cuales además son resistentes a otros antibióticos no β -lactámicos y *Pseudomonas aeruginosa*, causante de septicemias y neumonías particularmente en pacientes con fibrosis quística o inmunodeprimidos (Brooks, Carroll, Butel y Morse, 2008).

Por esta razón, se pretende demostrar el efecto sinérgico al combinar extractos vegetales con antibióticos (piperacilina, penicilina, gentamicina, eritromicina, y clindamicina), contribuyendo de esta forma con el desarrollo de nuevos fármacos extendiendo el espectro de la actividad y logrando mejorar el efecto terapéutico para reducir la resistencia y combatir los microorganismos causantes de infecciones.

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Determinar la actividad antibacteriana y el efecto producido al combinar antibióticos estándar con extractos de hojas y corteza de *Tectona grandis* L. f. frente a cepas bacterianas de referencia ATCC.

Objetivos Específicos

1. Recolectar la muestra (hojas frescas y corteza) de la especie botánica *Tectona grandis* L. f.
2. Extraer los compuestos activos presentes en las hojas y corteza de *T. grandis* L. f. por la técnica de maceración utilizando solventes como hexano, diclorometano y etanol.
3. Realizar el análisis fitoquímico de los extractos vegetales mediante pruebas químicas cualitativas de coloración y precipitación.
4. Identificar los compuestos activos presentes en los extractos de *T. grandis* L. f por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).
5. Comprobar la actividad antibacteriana de cada extracto puro frente a bacterias Gram positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) y

bacterias Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) mediante el método de difusión en agar (Kirby-Bauer).

6. Determinar la CIM frente a cada microorganismo por el método de difusión en agar.
7. Determinar el sinergismo, midiendo los halos de inhibición formados al combinar los extractos vegetales que mostraron actividad antibacteriana con antibióticos estándar por el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) frente a dichas cepas bacterianas.

Formulación de la Hipótesis

La especie botánica *T. grandis* L. f. ha sido objeto de diferentes estudios fitoquímicos, mostrando actividad antibacteriana con base a esto se plantea la posibilidad de que se produce un efecto sinérgico al combinar los extractos de *T. grandis* con antibióticos estándar frente a cepas bacterianas de referencia *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. coli* (ATCC 25992), *E. faecalis* (ATCC 29912), *K. pneumoniae* (ATCC 23357) y *S. aureus* (ATCC 25923).

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

En los últimos años se han realizado numerosas publicaciones relacionadas con productos naturales y su actividad antimicrobiana enfocándose principalmente en los productos naturales como fuentes de moléculas bioactivas que tienen la capacidad de actuar como antibióticos, este interés se ha generado debido a que la resistencia bacteriana es el principal obstáculo para la eficacia terapéutica de los antibióticos, pues no solo puede anular la acción curativa si se manifiesta en el curso del tratamiento, sino que tiene a la larga consecuencias más graves para el conjunto de la población, ya que provoca la desaparición de las cepas susceptibles y la propagación de las resistentes (Ramírez y Castaño, 2009).

Lanka, (2017), en su publicación indica que la madera y corteza de la especie *Tectona grandis* L. f. tiene actividad antimicótica y antibacteriana inhibiendo el crecimiento de bacterias Gram positivas como *S. aureus*, *B. subtilis* y Gram negativas como *P. aeruginosa*, por el método de difusión en agar.

En otra investigación realizada por Bitchagno y col., (2015) se demostró la actividad antibacteriana de extractos etanólicos de *Tectona grandis* L. f. determinando las concentraciones mínimas inhibitorias (CIM) y las concentraciones mínimas bactericidas (CMB) por el método de micro-dilución en caldo, dando como resultado que el extracto crudo tiene actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (PA 01), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 11296) y *Escherichia aérogenes* (ATCC 13048) con una CIM que va desde 0,064 hasta 0,256 mg/mL.

Los compuestos aislados en este estudio tectograndona, 6-metil-1,4-dihidroxi antraquinona presentaron una potente actividad contra *E. coli* (0,032 mg/mL) y *E.*

aérogenes (0,016 mg/mL); este último compuesto también presentó una actividad antibacteriana considerable contra *P. aeruginosa* (0,128 mg/mL) y el ácido 2β-hidroxiursólico mostró una actividad antibacteriana moderada (0,064 a 0,128 mg/mL) contra todas las bacterias probadas. La respuesta de las bacterias a los compuestos probados varía de un microorganismo a otro esta diferencia en la susceptibilidad se puede explicar por la diferencia en la composición de la pared celular y/o contenido genético de plásmidos que se pueden transferir fácilmente de una cepa bacteriana a otra (Bitchagno y col., 2015).

Devadiga, Vidya y Saiduta, (2015). Realizaron un estudio con nanopartículas de plata biosintetizadas usando el extracto acuoso de hojas de teca donde se evidenció el efecto antibacteriano sobre *E. coli* y *S. aureus* mediante un método de dilución determinaron una concentración mínima inhibitoria de 0,025 mg/mL frente a estas bacterias patógenas por lo que sugieren que es ideal para aplicaciones médicas y terapéuticas.

Igualmente Mahesh y Jayakumaran, (2010) también demostraron la actividad antibacteriana de extractos de hojas, corteza y madera de *T. grandis* L. f. contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603), cepas hospitalarias de *Salmonella paratyphi* y *Proteus mirabilis* por ensayo de difusión radial.

Purushotham y col., (2010). Realizaron un tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de hojas de *Tectona grandis* L. f. reportando la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, antraquinonas y naftoquinonas, así como también evaluaron la actividad sinérgica del extracto 0,125 mg/mL en combinación con un antibiótico estándar tetraciclina 0,062 mg/mL mediante el método de difusión en agar Kirby-Bauer. Se encontró que la concentración mínima inhibitoria era menor cuando se combinaba la tetraciclina con el extracto de *Tectona grandis* L. f. *Salmonella typhimurium* y *klebsiella pneumoniae* demostrando un mayor sinergismo, mientras que en *Citrobacter freundii* se observó un efecto antagónico.

Estos resultados sugieren que la planta puede ser una fuente de sustancias bioactivas que podrían tener una actividad de amplio espectro debido a que mostraron actividad tanto en bacterias Gram negativas como en las Gram positivas, el sinergismo observado indica que los inhibidores de la síntesis de proteínas fueron los que presentaron un mayor efecto sinérgico junto con el ácido fólico e inhibidores de la síntesis de la pared celular bacteriana, por el contrario los inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos mostraron débil sinergismo con extractos de la planta (Purushotham y col., 2010).

Antecedentes Históricos

Desde hace milenios el hombre ha utilizado productos naturales en el tratamiento y cura de las enfermedades. La mayoría de las veces, las propiedades medicinales de éstos se descubrieron casualmente y pasaron luego a formar parte de la tradición médica de los pueblos (Cárdenas, 1996).

Se ha descrito que pueblos prehistóricos tuvieron un conocimiento amplio sobre las plantas medicinales, lo que conllevó posteriormente al desarrollo de sistemas terapéuticos que combinaban tanto elementos empíricos, como racionales, religiosos y mágicos. La necesidad por controlar estos últimos aspectos, condujo a las sociedades primitivas a exaltar la condición del sacerdote, el brujo y el curandero (Díaz y Suárez, 2000).

El uso de los productos naturales como medicamentos, se remonta a las civilizaciones antiguas, se desarrollaron en los valles de los principales ríos de África y Asia. En otro sentido, los hebreos creían que su Dios era el único capaz de curar, y a él correspondía el don de curación de los médicos, pero a su vez en la Biblia y en el Talmud se describe el uso que hicieron los hebreos de ciertos remedios vegetales, y especialmente de un mineral, la sal (Díaz y Suárez, 2000).

En otras partes del mundo, especialmente en Oriente, se ha probado todo tipo de remedios a base de plantas, con fines terapéuticos. Se conoce de textos chinos sobre

remedios que datan de los últimos cinco siglos como son el *Sehn Nong Ben Zing* (El Libro de las hierbas de Sehn Nong), que cuenta con más de 2000 años de antigüedad, así mismo monumental *Pents' ao Kang-mu*, del gran naturalista chino Li Shih-chen, describía más de mil plantas y casi cuatrocientas sustancias animales, además de examinar cerca de once mil cien prescripciones (Díaz y Suárez, 2000).

En Grecia, Hipócrates mostró un enfoque racional y empírico de la medicina mediante escritos de los médicos de ésta escuela, citaban unos doscientos fármacos de origen vegetal; así mismo la principal guía de plantas medicinales de la antigüedad correspondió a Pedanio Discórides, entre los años 50 A.C. y 70 D.C.

En el renacimiento en el siglo XIV aparecen una serie de obras sobre plantas medicinales cuyos autores son miembros de la Escuela de Salerno (centro médico cumbre de la cultura médica mundial); como Perpósito, Platearius y Silvaticus. En 1498 D.C. se imprime la primera farmacopea, y la Botánica que hasta aquel momento había sido patrimonio exclusivo de médicos, boticarios y yerba teros. Por otro lado, el descubrimiento de América permite que a Europa llegue un gran número de plantas y semillas oriundas del Nuevo Mundo. En la edad moderna el arte de la alquimia asumió un papel capital en la preparación de medicinas, relegando a un segundo lugar las curaciones naturales (Díaz y Suárez, 2000).

En el siglo XIX surgió el Thomsonianismo, una práctica botánica de la medicina, dirigida por el norteamericano Samuel Thomson, que creó un “sistema con reminiscencias de la patología humoral de Galeno”. Ofrecía remedios vegetales que pretendían ser más suaves y seguros, que los poderosos y rudos procedimientos que propugnaban los practicantes de la medicina tradicional (Díaz y Suárez, 2000).

A finales del siglo XIX, con el nacimiento de la química moderna y de la farmacognosia, se realizaron los primeros estudios fitoquímicos principalmente de las plantas traídas del Viejo Mundo. De la misma época se conocen los trabajos adelantados por naturalistas ingleses sobre la flora de la Amazonía, importantes para la taxonomía y la farmacognosia (Díaz y Suárez, 2000).

Los primeros pobladores del territorio venezolano fabricaron venenos con especies vegetales, y los utilizaron como medio para aliviar el sufrimiento físico causado por la fatiga o por la enfermedad, y para la caza de animales. (Díaz y Suárez, 2000).

Bases Teóricas

La Familia Lamiaceae (Labiatae)

Se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, es habitual en regiones de clima cálido y templado, consta de 220 géneros y alrededor de 4000 especies (Naghibi, Mosaddegh, Mohammadi Motamed, y Ghorbani, 2005; Wink, 2003), en Venezuela se encuentran 25 géneros y unas 90 especies (Velázquez, 1997). Está constituida por 14 subfamilias, las cuáles comprenden casi 300 géneros con alrededor de 7500 especies (Group, 2011; Li et al., 2016). Originalmente la familia era conocida por el nombre de Labiada debido a la peculiar forma de la flor, cinco pétalos fusionados en forma de boca con un labio superior. Además contiene gran variedad de compuestos químicos como terpenos, compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides (Naghibi y col., 2005).

Clasificación Taxonómica de la Familia Lamiaceae

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta.

Clase: Magnoliopsida.

Orden: Lamiales.

Familia: Lamiaceae.

Género: *Tectona*.

Especie: *Tectona grandis* L. f.

Nombre común o vulgar: Teca

Tabla 1. Usos y actividad de algunos géneros de la familia Lamiaceae.

Nombre Científico	Uso tradicional	Actividad farmacológica
<i>Ajuga reptans</i>	Reconstituyente, fiebre, asma.	Vasoconstrictor.
<i>Dracocephalum kotschyi</i>	Fiebre, analgésico, reumatismo.	Analgésico, antipirético, antiinflamatorio.
<i>E. glabra</i>	Analgésico, antiinflamatorio.	Antioxidante.
<i>Hyssopus officinalis</i>	Fiebre, reumatismo, diaforético, estimulante.	Relajante Muscular, Hiperglucemia.
<i>Lavandula dentate</i>	Malaria, diarrea, desordenes nerviosos, vómitos, sedante.	Anticonvulsivante, sedante, antiespasmódico.
<i>M. vulgare</i>	Fiebre, nauseas, colitis, bronquitis.	Hipoglucemiante, hipotensor.
<i>Nepeta cataria</i>	Ansiolítico, sedativo, depurativo.	Antimicrobiano y repelente.
<i>Melissa officinalis</i>	Gota, palpitaciones, sedante, diurético, agente saborizante, impotencia, reconstituyente.	Fungitóxico, antimicrobiano, antioxidante
<i>Mentha piperata</i>	Antiflatulento, antiinflamatorio, diurético, reconstituyente.	Antifúngico, antimicrobiano, antialérgico.
<i>Ocimum basilicum</i>	Diurético, reconstituyente, antiinflamatorio.	Antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatorio.
<i>Origanum vulgare</i>	Antiflatulento, reumatismo, sedante, ansiolítico.	Antihiperglucemiante y antifúngico.
<i>Otostegia persica</i>	Analgésico, reumatismo	Antioxidante.
<i>P. abrotanoides</i>	Leishmaniasis.	Leishmanicida
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Migraña, reumatismo, desordenes nerviosos, analgésico, diurético	Insecticida y antioxidante

(Naghibi, y col., 2005)

Género *Tectona*

Árboles grandes con corteza blanda, ramas y ramitas más o menos tetragonos. Hojas deciduas, pecioladas o subsésiles, más bien grandes, largas y anchas, enteras, opuestas o ternadas. Cimas numerosas, multifloras, dispuestas en densas panículas terminales (a veces con algunas cimas axilares más pequeñas en las axilas superiores) (López, 1977).

Así mismo tiene flores hipóginas, actinomorfas. Cáliz gamosépalo, campanulado, cortamente 5-7-lobado, persistente, en la fructescencia grandemente alargado y frecuentemente inflado, que incluye el fruto y se cierra sobre él. Corola gamopétala, hipocraterimorfa, blanca o azulosa; tubo cilíndrico, corto, más o menos igual al cáliz; limbo patente o reflejo, 5-7-partido, de lobos desiguales, recubiertos en la yema, y de garganta pilosa. Estambres 5 o 6 insertos en el tubo de la corola, iguales, exsertos; anteras ovadas, elípticas o elíptico-oblongas, biceldadas, dorsifijas, de tecas paralelas que se abren por endiduras longitudinales. Pistilo simple, alargado, estilo terminal, capilar; estigma muy cortamente bifido, de ramas desiguales; ovario compuesto de dos carpelos, completamente 4-celdado (cada carpelo de 2 celdas), cada celda uniovulada; óvulos laterales o péndulo-laterales, hemianátropos (López, 1977).

También tiene fruto drupáceo, redondeado o débilmente 4-lobado, completamente incluido en el cáliz fructífero acrescente; exocarpo subcarnoso; endocarpo firmemente óseo, 4-celdado, con una pequeña cavidad entre las celdas. Semillas sin endosperma, oleosas y de radícula corta e ínfera (López, 1977). Los constituyentes fitoquímicos aislados en este género son los siguientes: fenoles, neolignanos, flavonoides, glucósidos, alcaloides, esteroides y ésteres grasos (Ramesh y Mahalakshmi, 2014).

El género *Tectona* es originaria de la India, Birmania, Tailandia, Indochina y Malasia. Pero también ha sido plantada en las Filipinas, África, Guyana Británica, Puerto Rico, Cuba, Haití, Jamaica, Trinidad, Honduras, Camboya, Laos, Vietnam y

América Latina, Además tiene tres especies *Tectona phillippensis*, *Tectona grandis* y *Tectona Hamiltoniana* (López, 1977).

La especie botánica *Tectona grandis* L. f. es un árbol grande, que puede alcanzar más de 50 metros de altura, corteza áspera y fisurada de ca. de 12 mm de espesor, blanda, de color café claro; sin olor o sabor característico. Ramas y ramitas gruesas, tetragonas, muy medulosas. Brotes jóvenes furfuráceo-tomentosos con tomento cinéreo u ocráceo, con los nudos distintamente anillados y el tomento más abundante.

Figura 1. Hojas y frutos de *Tectona grandis* L. f.



Hojas (figura 1) son péndulas, deciduas, opuestas, curtipeciadas o subsésiles; pecíolos muy gruesos, aplanados por encima y redondeados por debajo, de 1-5 cm de largo, más o menos marginados; limbos membranáceos o subcoriáceos, verde oscuros y nítidos por la haz, más claros y no nítidos por el envés, ancho-elípticos, de 11-85 cm de largo por 6-50 cm de ancho, agudos o corto-acuminados en el ápice, enteros o repando-denticulados en los márgenes, agudos en la base y decurrentes en un pecíolo alado o abrazadores en la base, ásperos, densamente escamoso y rugosos y aun bulados por la haz, que se vuelven glabros, con un tomento blando por el envés que varía de castaño a ocráceo, a veces estrellado y densamente resinoso-punteado; nervio medio prominente por ambas caras, pero más por el envés; nervios secundarios delgados, 9-15 por semilimbo, ascendentes, algo arcuados y unidos en el margen, promínulos por la haz y prominentes por el envés; reticulación de venas y venitas paralela y abundante (López, 1977).

Flores de cáliz campanulado, amarillo verdoso, de borde 5-7 dentado o lobado; dientes ovados u ovado-oblongos, frecuentemente reflejos, truncados u obtusos. Corola blanca, cortamente hipocraterimorfa, glabra; tubo ampliamente cilíndrico; limbo 5-7-partido, de lobos ovado-elípticos, redondeados en el ápice, imbricados, erectos o reflejos. Estambres 5, insertos debajo de la boca del tubo de la corola, iguales, algo exsertos; filamentos blancos, glabros, filiformes, ampliados y aplanados en la parte basal; anteras amarillas, ovadas u oblongas, ca. de 1mm de largo, dorsifijas ca. de la base. Estilo blanco amarillento, glabrescente más o menos pubescente con pelos ramificados. Estigma blanco amarillento, bifido. Ovario ovado o cónico, densamente pubescente, 4-celdado, cada celda uniovulada (López, 1977).

Cáliz fructífero grandemente acrecido e inflado, hasta 2,5 cm de largo y ancho, glabrado, papiráceo, algo castaño y brillante cuando seco. Fruto subgloboso, más o menos tetragono, aplanado, hasta 1,5 cm de largo y ancho, umbilicado y 4-lobado en el ápice, 4-seminado (rara vez menos por aborto); exocarpo delgado, algo carnoso cuando fresco, tomentoso; endocarpo grueso, óseo, corrugado, 4-celdado, con un lumen central entre las celdas. Semillas oleosas (López, 1977).

Usos de *Tectona grandis* L. f. en la medicina tradicional

La corteza. Se utiliza como astringente, para el estreñimiento, antihelmíntico y depurativo. Se usa en bronquitis, hiperacidez, disentería, sensación de ardor, diabetes y enfermedades de la piel (Nilesh y col., 2017).

La madera. Se usa como laxante, sedante al útero grávido y disentería. El aceite extraído de la madera es el mejor para el dolor de cabeza y la dermatitis aguda (Nilesh y col., 2017).

Las Flores. Son acre, secas y amargas, curan la bronquitis, el aceite extraído de las flores es útil en la sarna y favorece el crecimiento del vello (Nilesh y col., 2017).

Las hojas. Son refrescantes, hemostáticas, antiinflamatorias, depurativas, son útil en inflamaciones, lepra, enfermedades de la piel, prurito, estomatitis, úlceras y

hemorragias; la decocción de hojas frescas o secas se utiliza para trastornos menstruales, hemorragias en general, utilizados en forma de gárgaras para el dolor de garganta; la decocción de las hojas amarillas caídas son utilizadas para la anemia (Nilesh y col., 2017).

Extractos Vegetales

Los extractos vegetales se han definido como un concentrado obtenido por tratamiento de productos vegetales con soluciones apropiadas, tales como agua, etanol o éter de elementos solubles constituido por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de las partes de una planta fresca o seca; se puede elevar la concentración de principios activos procedentes de las plantas por medio de la evaporación del disolvente, sea alcohol o sea agua. Dado que esta evaporación dañaría y alteraría los principios activos, deberá siempre hacerse al vacío, con lo cual se consigue que la evaporación se haga a una temperatura que no supere los 50°C (Lizcano y Vergara, 2008).

De acuerdo a la consistencia los extractos se clasifican en 4 grupos: blandos, firmes, secos y fluidos:

Extractos blandos. Tienen la consistencia de la miel espesa; algunas veces debido a la absorción de la humedad atmosférica, presentan una consistencia menos densa (Lizcano y Vergara, 2008).

Extractos firmes. Como su nombre lo indican deben tener una estrecha semejanza con la masa con la cual se fabrica o manufacturan las píldoras; deben tener las características especiales de no adherirse a los dedos (Lizcano y Vergara, 2008).

Extractos fluidos. Son preparados en una forma tal que el peso del extracto corresponde exactamente al peso de la sustancia empleada como medicamento, desecada al aire y pulverizada (Lizcano y Vergara, 2008).

Extractos secos. Anteriormente se les conocía con la denominación de sales esenciales. Son los extractos en los cuales el disolvente ha sido casi completamente

eliminado contiene tan solo 5 al 8 % de agua, se reducen fácilmente a polvo y facilitan su manipulación y dosificación. la forma farmacéutica de extractos secos aparece en varias farmacopeas, pero no indican un método exacto para la preparación de este tipo de extractos (Lizcano y Vergara, 2008).

Algunos extractos se descomponen al aire, otros absorben humedad atmosférica, algunos se recubren de hongos y permiten el desarrollo de gérmenes bacterianos, por otra parte las alteraciones más frecuentes consisten en modificaciones químicas no aparentes como sucede con los extractos de flores verdes que por la oxidación de la clorofila pierden su color. Los extractos a base de alcaloides, bajan su título esta disminución es especialmente sensible a los extractos blandos y de aspecto firme y menos notorio en los extractos secos. La conservación de extractos debe cumplir las siguientes condiciones:

Se deben conservar protegiéndolos de la luz.

Los envases deben estar bien tapados.

Se deben conservar en un ambiente seco (Lizcano y Vergara, 2008).

Extracción

Separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente, sirviéndose de uno o varios disolventes, donde siempre se obtienen, por lo menos, dos componentes: la solución extraída en su disolvente (extracto) y el residuo. Al embeber la droga con el líquido de extracción se disuelven primero las sustancias a las que el disolvente puede llegar sin obstáculos. Al triturar la droga se destruyen varias células donde el grado de finura creciente favorece la disolución. El tiempo necesario para el equilibrio de concentraciones es parcialmente dependiente del tipo de droga (raíz u hoja) y del grado de trituration. La extracción termina cuando se produce un equilibrio de concentraciones (Guerra-Corado, 2005).

La calidad del extracto vegetal depende de la calidad del material de partida. El contenido en sustancia activa de una droga viene determinado, generalmente, por

factores previos a la cosecha y que pueden tener su origen en el tiempo de recolección, el lugar, el tipo de abono, suelo, factores climáticos etc., así como en los procesos de envejecimiento o degradación que puedan ocurrir durante el secado y almacenamiento de la droga; de ahí que sea necesaria la estabilización de los mismos. Junto a esto es conveniente realizar la estandarización del material de drogas, entendiéndose, por ello, el ajuste a un determinado índice de actividad o a un contenido en sustancia activa prefijado (Guerra-Corado, 2005). Dentro de las operaciones de extracción se encuentran dos grupos: extracción líquido-líquido y extracción sólido-líquido.

Extracción sólido-líquido. Se denomina a la separación preferencial de uno o más componentes de una mezcla sólida por disolución en un solvente líquido. En la industria farmacéutica los dos procedimientos de extracción básicos son maceración y percolación, se suma a éstos la extracción por soxhlet (Guerra-Corado, 2005).

Maceración

El principio consiste en que la droga, con el grado de finura prescrito, se pone en contacto duradero con el solvente, se deben realizar agitaciones frecuentes a lo largo de varios días, tratando de influenciar el gradiente de concentración. Al principio de la extracción este gradiente está en el punto máximo, con el correr de los días, a pesar de la agitación, éste disminuye. Como norma se macera la droga por siete días con agitación frecuente y protegida de la luz solar. (Guerra-Corado, 2005).

Análisis de Extractos Vegetales

La purificación y aislamiento de los principios activos se puede llevar a cabo por métodos fisicoquímicos no cromatográficos o por métodos cromatográficos:

Métodos fisicoquímicos no cromatográficos. Incluyen toda una serie de operaciones como la sedimentación, decantación, centrifugación, filtración, precipitación selectiva, cristalización, partición, entre otros.

Métodos cromatográficos. Comprende un grupo de métodos para separar mezclas moleculares que dependen de las afinidades diferenciales de los solutos entre dos fases no miscibles. La separación de los componentes ocurre debido a la diferente velocidad de elución a través de una fase estacionaria (un sólido poroso o un líquido retenido en un soporte sólido) cuando la mezcla es transportada por una fase móvil (eluyente: puede ser líquido o gaseoso). Las técnicas cromatográficas además de ser métodos para purificar y aislar productos, tienen utilidad cualitativa (identificación), porque el tiempo de retención cromatográfico es una característica de cada sustancia, y cuantitativa (determinación), porque es posible recoger las diferentes fracciones de un cromatograma y determinar la cantidad de componente. La diferente velocidad de elución de los componentes se debe a uno de los siguientes fenómenos: adsorción, partición, de intercambio iónico, de exclusión molecular y de afinidad, las principales técnicas cromatográficas son (Kuklinski, 2000).

1. Cromatografía de adsorción.
2. Cromatografía de partición.
3. Cromatografía de intercambio iónico.
4. Cromatografía por exclusión de tamaño:
5. Cromatografía de afinidad.
6. Cromatografía de capa fina.
7. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
8. Cromatografía de gases (CG) (Kuklinski, 2000).

Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases (CG) es una técnica analítica de separación para resolver numerosos problemas en la industria, medicina, biología y análisis ambiental. Esta técnica es la que ofrece mejor poder de resolución para compuestos orgánicos

volátiles. Su principal limitación se encuentra en la labilidad térmica de los solutos (Valcarcel y Gómez, 1998).

La muestra se inyecta en la fase móvil, la cual es un gas inerte. En esta fase, los distintos componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna, cada soluto presente en la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo que permite su separación: los componentes fuertemente retenidos por esta fase se moverán lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos lo harán rápidamente. Un factor clave en este equilibrio es la presión de vapor de los compuestos (en general, a mayor presión de vapor, menor tiempo de retención en la columna). Como consecuencia de esta diferencia de movilidad, los diversos componentes de la muestra se separan en bandas que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente mediante el empleo de los detectores seleccionados (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Espectrometría de Masas

Es una de las técnicas analíticas más completas que existen ya que su capacidad de identificación proporciona un espectro característico de cada molécula, permite medir la concentración de la sustancia, tiene gran sensibilidad, suministra información isotópica, se puede realizar un espectro en décimas de segundos por lo que puede monitorizarse para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de gases (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Dentro del espectrómetro de masas, se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Además de moléculas ionizadas o iones moleculares también se forman iones fragmento debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de

energía. El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de las moléculas analizadas y de las condiciones del proceso de ionización. Una vez ionizadas las moléculas, se aceleran y se conducen hacia el sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos. La velocidad alcanzada por cada ion será dependiente de su masa. La detección consecutiva de los iones formados a partir de las moléculas de la muestra, produce el espectro de masas de la sustancia, que es diferente para cada compuesto analizado. El espectro de masas puede almacenarse en la memoria del ordenador para compararse con otros espectros y proceder a su identificación o puede estudiarse para averiguar la naturaleza de la molécula que le dio origen (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases capilar (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Ambas técnicas trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles. El único obstáculo serio a la hora de realizar su acoplamiento es que el efluente que emerge de la columna cromatográfica sale a presión atmosférica y debe introducirse en el interior del

espectrómetro de masas que trabaja a alto vacío. Actualmente, el resulta fácil cuando se utiliza la cromatografía de gases capilar, que es el caso más habitual. Por lo tanto, la combinación de estas dos técnicas GC-MS permite la separación e identificación de mezclas complejas (Gutiérrez y Droguet, 2002).

Siguiendo este orden de ideas es importante mencionar, que en las plantas ocurre un conjunto de reacciones químicas donde se sintetizan y degradan sustancias a partir de otras, a este proceso se le denomina metabolismo primario y secundario, los compuestos derivados de este último se denominan metabolitos secundarios productos secundarios o productos naturales los cuales son diferentes para cada planta (Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009). En la actualidad se sabe que estos compuestos tienen una gran cantidad de propiedades benéficas, no solo para las plantas, sino que presentan aplicaciones en campos como la medicina, farmacología, alimentación, industria textil, agronomía, etc. (Montealegre-Pinzón, 2011).

Los metabolitos secundarios se encuentran divididos en cuatro grupos principales que son: terpenos (hormonas, pigmentos o aceites esenciales), compuestos fenólicos (cumarinas, flavonoides, ligninas y taninos), glicosidos (saponinas, glicosidos cardiotónicos, glucósidos cianogenicos, y glucosinolatos) y alcaloides (Ávalos García y Pérez-Urria, 2009).

Metabolitos Secundarios Con Propiedades Beneficiosas Sobre la Salud.

Iridoides. Son un grupo de monoterpenos que presentan como esqueleto de carbono el 1-isopropil-2,3-dimetilciclopentano. Poseen diferentes actividades farmacológicas: antiinflamatoria, antimicrobiana, amebicida, etc. Sin embargo, son también causantes de procesos alérgicos, principalmente dermatitis de contacto (Domínguez, 1973; García y col., 2003; Sánchez y col., 2010).

Saponinas. Son un grupo de glucósidos que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial de esta. Fitoquímicamente se estudian las saponinas como materias primas para la síntesis de hormonas, tienen propiedades anticancerígenas,

antiinflamatorias e hipocolesterolemiantes (Domínguez, 1973; García y col., 2003; Sánchez y col., 2010).

Terpenos. Funcionan como antioxidantes que protegen a los lípidos, a la sangre y a otros fluidos corporales contra el ataque de radicales libres. Ellos previenen el cáncer en muchos órganos como los pulmones, glándulas mamarias, colon, estómago, próstata, páncreas, hígado y piel (Domínguez, 1973; García, Ojeda y Montejo, 2003; Sánchez, Rondón, Hermosilia y Almeida, 2010). Además tienen actividad antiinflamatoria, citotóxica e inmunosupresora y actividad hipoglicémica antiulcerosa, antimalarials y antimicrobianas (Montealegre-Pinzón, 2011).

Polifenoles. Éste es un grupo muy numeroso de sustancias que incluyen familias de compuestos con estructuras diversas, desde algunas relativamente simples, como los derivados de ácidos fenólicos, hasta moléculas poliméricas de elevada masa molecular, como los taninos (hidrolizables y condensados) y las ligninas. Se dividen en isoflavonas, lignanos, flavonoides antocianinas, catequinas (Domínguez, 1973; García y col., 2003; Sánchez y col., 2010).

Lignanos. Son compuestos químicos de bajo peso molecular que se encuentran en muchas frutas y vegetales tales como el brécol. Al igual que los flavonoides, los lignanos tienen una débil actividad estrogénica y compiten con los compuestos estrogénicos normales, no permitiéndoles promover el crecimiento de tumores. Tienen propiedades anticancerígenas y de prevención a enfermedades cardiovasculares (Domínguez, 1973; García y col., 2003; Sánchez y col., 2010).

Flavonoides. Son un grupo de compuestos fenólicos basados en el núcleo flavona. Se encuentran especialmente en frutas y verduras, y están presentes, principalmente, como glucósidos. Distintas clases de flavonoides tienen potenciales propiedades beneficiosas, en particular las antocianinas, flavonas, como la luteolina de las alcachofas, flavonoles, como la quercetina, y flavanos/taninos, como las catequinas y protoantocianidinas. Además de la capacidad antioxidante, algunos flavonoides inhiben la agregación plaquetaria y muestran propiedades anti-virales, anti-

bacterianas, anti-inflamatorias, anti-mutagénicas e inmuno-estimulantes, de las que se derivan sus efectos beneficiosos, tienen propiedades anticancerígenas, antioxidantes y de prevención a enfermedades cardiovasculares (Domínguez, 1973; García y col., 2003; Sánchez y col., 2010).

Alcaloides. Los alcaloides son compuestos que contienen nitrógeno, ampliamente distribuidos en diferentes grupos de plantas. Casi todos los alcaloides son alcalinos y la mayoría es ópticamente activa. Los alcaloides son clásicamente definidos como compuestos básicos, derivados de plantas, farmacológicamente activos, derivados de aminoácidos que contienen uno o más átomos heterocíclicos de nitrógeno. Los alcaloides en las plantas sirven como agentes quimioprotectores y antiherbívoros, o como reguladores del crecimiento, tales como la bien conocida hormona de las plantas, ácido indol-3-acético (IAA, por sus siglas en inglés), un derivado de indol sintetizado a partir de triptófano) (Domínguez, 1973; García y col., 2003; Sánchez y col., 2010).

A nivel de sistema nervioso central pueden actuar como depresores o excitatorios; a nivel del sistema nervioso autónomo pueden ser simpaticomiméticos (simulan los efectos de la adrenalina), simpaticolíticos (bloquean la respuesta producida por la estimulación de receptores adrenérgicos) y anticolinérgicos (reduce o anula los efectos de la acetilcolina); también pueden presentar acción anesteciante, antifibrilante, antitumoral, antipalúdico y amebicida. En los humanos la mayoría de respuestas fisiológicas generadas por los alcaloides se deben a su interacción con neurotransmisores. Los alcaloides pueden ser tóxicos en altas dosis, pero en bajas dosis presentan un alto valor terapéutico como relajantes musculares y tranquilizantes (Montealegre-Pinzón, 2011).

Tamizaje Fitoquímico de Metabolitos Secundarios

Consiste en una serie de pruebas de identificación cualitativa de metabolitos secundarios tales como; alcaloides, cumarinas, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, antraquinonas, saponinas, glucósidos cardiotónicos, taninos, triterpenos,

esteroides y mucílagos, utilizando procedimientos estándares de análisis (cromatografía de capa fina (TLC) y formación de precipitados) (Domínguez, 1973).

Algunos de los ensayos existentes, para los diferentes grupos de metabolitos secundarios son:

Alcaloides. En la prueba de Dragendorff se agrega HCl y el reactivo dragendorff que es yoduro de bismuto. Cuando esta prueba da positiva se evidencia un precipitado de color naranja, esto se debe a que, la reacción de este reactivo, produce sales de los alcaloides que se precipitan y colorean (Montealegre-Pinzón, 2011).

Triterpenoides y esteroides. No hay reacciones verdaderamente específicas para esteroides, ya que otro tipo de sustancias tales como, glicósidos cardiotónicos, triterpenos y saponinas también producen reacciones coloridas, por tener estructuras químicas comunes o análogas. Los requerimientos estructurales para la identificación cualitativa del núcleo esteroideal son los siguientes, un sustituyente-OH en posición C3 y además un doble enlace en el anillo A o B por deshidratación generada por el H₂SO₄. Estas pruebas específicas para esteroides con insaturación en sus anillos causan un cambio de color debido a la deshidratación que se da para la formación de dienos; aquí se da una coloración rosa, violeta, azul y verde (ensayo de Liebermann-Burchard) (Domínguez, 1973).

Flavonoides. Los flavonoides pueden encontrarse en la naturaleza tanto en forma libre (agliconas) como en forma de O- y C- heterósidos, que es lo más frecuente. Generalmente, los flavonoides libres contienen grupos fenólicos que se disuelven en soluciones de hidróxidos alcalinos. La alta reactividad de estos grupos permite el establecimiento de puentes de hidrógeno o uniones covalentes, su intervención en reacciones de oxidación y reducción, y la formación de complejos con iones metálicos como el cobre (Cu⁺²), hierro (Fe⁺²), magnesio (Mg⁺²) y zinc (Zn⁺²). Para la caracterización de estos compuestos se utilizan técnicas basadas en la presencia de grupos fenólicos, que al añadirles álcalis (NaOH, KOH) se produzca una coloración amarilla o la intensificación del color de la disolución inicial de la droga. El

compuesto 2- aminoetildifenilborato reacciona en metanol con el grupo hidroxilo de los flavonoides en la posición 2' del anillo B para formar el 2-difenilborato del flavonoide correspondiente, estos compuestos presentan una coloración amarilla característica (Domínguez, 1973).

Saponinas. Se denominan saponinas a un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial de ésta, por lo tanto, al agitar sus soluciones, se forma una espuma abundante y relativamente estable (ensayo de la Espuma). Por hidrolisis de las mismas con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada generalmente sapogenina, la cual posee un esqueleto esteroideal o triterpenoidal (Domínguez, 1973).

Taninos. Los taninos son compuestos químicos de carácter fenólico de alto peso molecular, no cristalizables que forman con el agua soluciones coloidales de reacción ácida y de sabor astringente. Se distinguen dos grupos básicos de taninos que difieren por su estructura y su origen biogenético: taninos hidrolizables y condensados o catéquicos. Los taninos hidrolizables por tratamiento con ácidos se separan en azúcares y ácidos fenólicos, mientras que los condensados no se degradan. Los primeros, son compuestos reductores que forman sales complejas coloreadas con todos los metales (FeCl_3) y precipitan con acetato de plomo y alcaloides. También poseen la propiedad de coagular la gelatina o de curtir la piel (Domínguez, 1973).

Compuestos fenólicos. Los fenoles son sustratos muy reactivos a la sustitución aromática electrofílica, porque los electrones no enlazantes del grupo hidroxilo estabilizan al complejo sigma que se forma por ataque en la posición orto o para. Para la identificación de los mismos, se utilizará el ensayo con FeCl_3 , en esta reacción el Fe^{+3} , se une al grupo fenóxido para formar complejos. Esta respuesta se debe al ataque producido por el ion Cl^- al hidrogeno del grupo $-\text{OH}$, provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al Fe^{+3} . Dicha reacción se caracteriza por generar soluciones vivamente coloreadas (azul, verde y violeta). Si el color es amarillo débil, el mismo que el FeCl_3 , la reacción se considerará negativa. Algunos

fenoles no dan coloración, como la hidroquinona, ya que se oxidan con el reactivo a quinonas (Domínguez, 1973).

Métodos para Evaluar la Actividad Antibacteriana

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados en tres grupos:

Método de sensibilidad por difusión en agar (Prueba de Kirby – Bauer).

Método de sensibilidad por dilución (Puede ser en caldo o en agar).

Antibiograma ATB Rapad (bioMeriux). (Ramírez y Castaño, 2009).

Métodos de difusión en agar. La técnica está basada en el método de Kirby-Bauer, el fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se coloca un disco de papel filtro de 6mm de diámetro impregnado con una concentración conocida del antibiótico. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco se puede clasificar como sensible, intermedio o resistente de acuerdo a las tablas publicadas por el comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de Estados Unidos de Norte América. Tiene la ventaja de que sus resultados son altamente reproducibles (Ramírez y Castaño, 2009).

Desventajas del método de difusión. La técnica con discos presenta varias desventajas una de ellas es la composición del papel filtro Whatman el cual se compone de celulosa esta a su vez tiene muchos grupos hidroxilos libres presentes en cada glucosa, haciendo que la superficie del disco sea hidrofílica, interviniendo directamente con algunos compuestos catiónicos de los productos naturales absorbiéndolos en la superficie del disco e impidiendo la difusión de estos en el agar,

los compuestos apolares pueden no ser influenciados por dichos grupos hidroxilos y difundir fácilmente en el agar. Esto puede explicar en parte la más alta sensibilidad detectada cuando el método se utiliza directamente en pozo (Ramírez y Castaño, 2009).

En el caso de evaluar varias sustancias los discos de papel filtro deben ponerse en forma equidistantes. A continuación se procede a su incubación a la temperatura adecuada por 24 horas luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos de las distintas sustancias sobre el microorganismo estudiado, con el antibiótico control. La lectura de los resultados representa la actividad *in vitro* de la sustancia (Ramírez y Castaño, 2009).

Es necesario señalar que el tamaño del halo de inhibición es influenciado por varios factores, entre ellos; medio de cultivo en que se realiza la prueba, capacidad de difusión del compuesto, cantidad del inóculo, tiempo de generación del microorganismo, sensibilidad al antibiótico y periodo de incubación. Cualquier variación de estos factores puede afectar el resultado de la prueba, sin embargo, al emplear un procedimiento estándar es posible obtener resultados confiables (Ramírez y Castaño, 2009).

Espectro de Actividad Antibacteriana

Es comparativamente fácil encontrar o desarrollar fármacos eficaces contra células procariontes y que no afecten las células eucariontes humanas. Por ende, la toxicidad selectiva tiene numerosas dianas. El problema resulta más difícil cuando el patógeno es una célula eucarionte, como un hongo, un protozoo o un helminto. Algunos fármacos tienen un espectro reducido de actividad microbiana o gama de microorganismos diferentes que afectan. Mientras que los antibióticos que actúan sobre una amplia variedad de bacterias se denominan antibióticos de amplio espectro (Pabón y Quero, 2016).

Antibióticos

Son sustancias químicas específicas derivadas o producidas por células vivientes, que incluso en pequeñas concentraciones son capaces de inhibir los procesos vitales de los microorganismos; en la práctica, el término antibiótico se utiliza para designar a todas las drogas sistémicas utilizadas para el tratamiento de infecciones bacterianas. Sustancias obtenidas de ciertas células vivas como bacterias, levaduras y hongos que a bajas concentraciones son biostáticos o biocidas para otras formas de vida, especialmente para organismos patógenos o nocivos, los antibióticos pueden ser clasificados por su composición química (Pabón y Quero, 2016; Repetto y Sanz, 1995).

Clasificación de los Antibióticos Según su Mecanismo de Acción.

Inhibición de la síntesis de la pared celular. La pared celular protege la integridad de la bacteria y soporta su gran presión osmótica interna (mayor en las bacterias Gram positivas). La ausencia de esta estructura condicionaría la destrucción del microorganismo, inducida por el elevado gradiente de osmolaridad que suele existir entre el medio y el citoplasma bacteriano. Los antibióticos que inhiben la síntesis de la pared necesitan para ejercer su acción que la bacteria se halle en crecimiento activo, y para su acción bactericida requieren que el medio en el que se encuentre la bacteria sea isotónico o hipotónico, lo que favorece el estallido celular cuando la pared se pierde o se desestructura, están comprendidos por penicilinas, cefalosporinas, vancomicina, bacitracina, oxacilina y nafcilina (Bruneton, 2001).

Alteración de la membrana citoplasmática. La membrana citoplasmática es vital para la célula ya que interviene en el proceso de difusión y transporte activo, y de esta forma controla la composición del medio interno celular. Las sustancias que alteran esta estructura modifican la permeabilidad y provocan la salida de iones potasio, elementos esenciales para la vida bacteriana los antimicrobianos que actúan en esta estructura se comportan como bactericidas, están comprendidos por polimixina, nistatina, anfotericina B (Bruneton, 2001).

Inhibición de la síntesis proteica. La síntesis proteica es uno de los procesos más afectados por la acción de los antimicrobianos, y su inhibición selectiva es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos están formados por dos subunidades (30S y 50S), que contienen ARN ribosómico, en esta estructura diferentes componentes pueden ser lugares de unión para los antimicrobianos. La mayoría de los antibióticos de este grupo tienen actividad bacteriostática, ejemplo, aminoglucósidos, cloranfenicol, eritromicina y tetraciclina (Bruneton, 2001).

Alteraciones del metabolismo o estructura de los ácidos nucleicos. El genoma bacteriano contiene información para la síntesis de proteínas que se transmite a través del ARN mensajero producido a partir de un molde de ADN (transcripción), y para la síntesis de ARN ribosómico que formara parte de los ribosomas bacterianos. La información del ADN debe duplicarse (replicación) cuando la bacteria se divide, para transmitir esta información a la descendencia. La replicación y transcripción del ADN se realiza en varias fases con la participación de diferentes enzimas y sustratos, además del ADN molde, que constituye dianas para la acción de diversos antibióticos. Por lo general, los antibióticos de este grupo no son particularmente selectivos en su acción y comportan cierta toxicidad para las células eucarióticas como son rifamicina, actinomicina D, ácido nalidixico, ciprofloxacina y norfloxacina (Bruneton, 2001).

Bloqueo de la síntesis de factores metabólicos. Para obtener determinados elementos esenciales como los aminoácidos o las bases púricas y pirimidinas de los nucleótidos, se requiere la síntesis de folatos, que algunas bacterias son incapaces de obtener del medio, a diferencia de las células eucariotas. La síntesis de ácido tetrahidrofólico se obtiene a partir de una molécula de pteridina y de ácido paraaminobenzoico (PABA), y mediante la enzima dihidropteroatosintetasa se forma el ácido dihidropteroico. Posteriormente por adición del ácido glutámico se forma el ácido dihidrofólico (ácido fólico), que reducido por la hidrofolato reductasa forma el ácido tetrahidrofólico (ácido folínico), por ejemplo las sulfamidas son análogos del

ácido paraaminobenzoico, y por tanto, compiten por la enzima dihidropteroatosintetasa, impidiendo así la formación de ácido dihidropteroico, precursor del ácido fólico. Estos antibióticos no afectan a las células humanas que obtienen ácido fólico de la dieta entre ellos están trimetropin y sulfonamidas (Bruneton, 2001).

Tabla 2. Clasificación de los Antibióticos de Acuerdo a su Composición Química

Clase	Descripción
Penicilinas	Es un grupo de más de 50 antibióticos con estructura química relacionada. Todas las penicilinas tienen una estructura central común que contiene un anillo β -lactámico denominado núcleo. Las penicilinas se diferencian por las cadenas laterales unidas a sus núcleos. Inhiben la síntesis de la pared celular y, su espectro de acción es sobre las bacterias Gram positivas.
Cefalosporinas	Grupo de antibióticos estrechamente emparentados con las penicilinas. En la actualidad las cefalosporinas se clasifican en cuatro generaciones de acuerdo con el espectro para bacterias Gram negativas y la estabilidad de la droga en presencia de β -lactamasa. Esta clasificación está dejando de ser confiable a medida que la incorporación de nuevos agentes obliga a una mayor cantidad de excepciones y una menor precisión de los criterios para establecer diferencias del espectro antibacteriano.
Carbapenemos	Los carbapenémicos inducen β -lactamasas, pero también son resistentes a estas enzimas; este fenómeno explica su eficacia contra más del 90% de las especies de bacterias Gram negativas.
Monobactámicos	Son análogos naturales o sintéticos de un antibiótico β -lactámico monocíclico aislado de ciertas bacterias del suelo. Los monobactámicos no inducen β -lactamasas.
Inhibidores de β-lactamasas	Las enzimas que abren los anillos β -lactámicos de las penicilinas, las cefalosporinas y los compuestos relacionados con estas clases de drogas, en el nivel de la unión β -lactámica, se

	conocen con el nombre de β -lactamasas. Los inhibidores de las β -lactamasas acilan la enzima a través de la formación de una doble ligadura; por lo tanto se disocian muy lentamente.
Glucopéptidos	Inhiben la síntesis de la pared celular. Su espectro de actividad es solo sobre bacterias Gram positivas
Aminoglucósidos	Constituyen un grupo de antibióticos que contienen uno o más aminoazúcares, como glucosamina o neosamina, unidos por enlaces glucosídicos a un anillo básico (amino o guanidino) de seis átomos de carbono. Los aminoglucósidos son bactericidas e inhiben la síntesis de proteínas
Tetraciclinas	Grupo de antibióticos de amplio espectro. Todas las tetraciclinas ejercen efectos adversos similares. Las diferencias entre los distintos miembros de esta clase radican sobre todo en los índices de absorción, la duración de la acción y la posibilidad de administración parenteral. Las tetraciclinas tienen un efecto bacteriostático.
Anfenícoles	El cloranfenicol, es un antibiótico de amplio espectro con graves problemas de toxicidad. Inhibe la síntesis proteica por unión a la subunidad 50S del ribosoma. Su espectro de acción es sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas.
Macrólidos	Son lactonas macrocíclicas hidroxiladas que contienen 12 a 20 átomos de carbono en el anillo primario. Inhiben la síntesis proteica por unión a la subunidad 50S del ribosoma. Actúan sobre la mayoría de las bacterias Gram positivas y sobre algunas bacterias Gram negativas.
Estreptogramina	Inhiben la síntesis de proteínas por unión a dos sitios separados en la subunidad 50S del ribosoma. Actúan sobre las bacterias Gram positivas.
Sulfonamidas	Son antibióticos bacteriostáticos debido a la similitud estructural con el ácido para-aminobenzoico. Interfieren con la vía del ácido fólico al unirse a la enzima dihidropteroato sintetasa. Su

	acción es sobre bacterias Gram positivas y muchas Gram negativas.
Polipéptidos	La bacitracina y polimixina B, solo se utilizan de forma tópica debido a su alto grado de toxicidad sistémica. Estos compuestos difieren entre sí por sus mecanismos de acción y espectros antibacterianos. La bacitracina es eficaz contra bacterias Gram negativas e inhibe la síntesis de la pared celular. La polimixina B es activa contra bacterias Gram negativas, a través de la ruptura de la membrana citoplasmática bacteriana.
Rifamicinas	El derivado mejor conocido de la familia de las rifamicinas es la rifampicina. Inhiben la síntesis de mRNA.

Fuente: Gennaro, (2003); Forbes y Sahn, (2004); Tortora y col., (2007).

Resistencia a Antimicrobianos Mediada por Microorganismos

Se refiere a la producida por los rasgos codificados genéticamente del microorganismo y es el tipo de resistencia que prueba los métodos de sensibilidad in vitro. La resistencia basada en el microorganismo puede dividirse en dos subcategorías: la resistencia intrínseca o inherente y la adquirida (Pabón y Quero, 2016).

Resistencia intrínseca. Esta resistencia es el resultado del estado normal genético, estructural o fisiológico de un microorganismo. Se considera que es una característica natural y heredada en forma invariable, que se asocia con la inmensa mayoría de cepas que constituyen un grupo un género o una especie bacteriana en particular (Pabón y Quero, 2016).

Resistencia adquirida. Es el resultado de la alteración de la fisiología y la estructura celular, causada por cambios en la composición genética habitual de un microorganismo. A diferencia de la resistencia intrínseca la adquirida puede ser un rasgo asociado con solo algunas cepas de un grupo o especie de microorganismo, pero no con otras. Por consiguiente, la presencia de este tipo de resistencia en

cualquier aislamiento es imprevisible, y esta falta de predictibilidad es la razón fundamental por la que se necesitan métodos de laboratorio para detectar la resistencia. Debido a que todos los mecanismos de resistencias adquiridos están codificados por vía genética, los métodos de adquisición son básicamente los mismos que permiten el cambio o el intercambio genético. Por tanto, la resistencia puede adquirirse por:

1. Mutaciones genéticas.
2. Adquisición de genes de otros microorganismos por medio de los mecanismos de transferencia genética.
3. Una combinación de episodios de mutación y de transferencia genética (Pabón y Quero, 2016).

Bacterias

Los microorganismos, son seres vivos diminutos que individualmente suelen ser demasiado pequeños para ser observados a simple vista. El grupo incluye bacterias, hongos, protozoos y algas microscópicas. También incluyen a los virus, entidades no celulares que a veces se consideran en el límite entre lo vivo y lo inerte. La mayoría de los microorganismos realizan contribuciones fundamentales al bienestar de los habitantes del mundo porque ayudan a mantener el equilibrio de los organismos vivos y las sustancias químicas en el ambiente (Pabón y Quero, 2016).

En el presente proyecto de investigación las bacterias a estudiar serán: Gram positivas (*Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*) y Gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*).

Enterococcus faecalis. Los enterococcus forman parte de la flora intestinal normal, siendo el *enterococcus faecalis* el más común y causa 85 a 90% de las infecciones enterocócicas. Estos microorganismos se transmiten de un paciente a otro principalmente por las manos del personal del hospital, algunos de ellos pueden portar el *enterococcus* en el conducto gastrointestinal; en ocasiones se transmite por

dispositivos médicos. En los pacientes, los sitios más comunes de infección son el aparato urinario, heridas, conducto biliar y sangre. Pueden causar meningitis y bacteriemia en los neonatos; en los adultos pueden causar endocarditis (Brooks y col., 2008).

Staphylococcus aureus. Una infección estafilocócica localizada se presenta como un “grano”, infección de un folículo piloso, o absceso. Frecuentemente hay una reacción inflamatoria intensa localizada y dolorosa, que muestra supuración central y cicatriza con rapidez cuando el pus se drena. La infección con el *Staphylococcus aureus* también puede resultar de la contaminación directa de una herida. Si el microorganismo se disemina y sobreviene bacteriemia pueden producirse endocarditis, osteomielitis hematógena aguda, meningitis o infección pulmonar (Brooks y col., 2008).

Pseudomonas aeruginosa. Con frecuencia se observa en escaso número en la flora intestinal normal y sobre la piel de los humanos, se distribuye extensamente en la naturaleza y es común en ambientes húmedos de los hospitales. Puede colonizar a los humanos normales, en quienes es un saprófito. Produce infección en heridas y quemaduras, formando pus color azul verdoso; cuando se introduce por punción lumbar causa meningitis, e infecciones del aparato urinario cuando la vía de entrada son catéteres, instrumentos o soluciones irritantes. La afección del aparato respiratorio, en especial por aparatos respiratorios contaminados produce neumonía necrosante. Esta bacteria se observa con frecuencia en la otitis externa, leve de los nadadores. En pacientes diabéticos puede causar otitis externa invasora (maligna). En lactantes o personas debilitadas puede invadir el torrente sanguíneo y causar septicemia mortal. En la mayor parte de las infecciones por *P. aeruginosa* los síntomas y signos son inespecíficos y se relacionan con el órgano afectado (Brooks y col., 2008).

Klebsiella pneumoniae. Se encuentra en el aparato respiratorio y en las heces de casi el 5% de las personas sanas. Produce una pequeña proporción (alrededor de 1%)

de las neumonías bacterianas. Pueden causar condensación necrosante hemorrágica extensa del pulmón. En ocasiones provoca infección del aparato urinario y bacteriemia a partir de las lesiones focales en pacientes debilitados. Puede provocar infecciones nosocomiales (Brooks y col., 2008).

Escherichia coli. Es un miembro de la flora intestinal normal. Es la causa más común de infección del aparato urinario y es responsable de casi el 90% de las infecciones urinarias primarias en mujeres jóvenes los signos y síntomas incluyen poliuria, disuria, hematuria y piuria. Las infecciones de las vías urinarias pueden provocar bacteriemia con signos clínicos de sepsis. Por lo general es nefropatógeno. Es causante común en todo el mundo de diarrea, incluyendo a lactantes, es una de las bacterias principales que causan meningitis en los lactantes (Brooks y col., 2008).

El organismo alberga gran cantidad de bacterias que tienen un papel fundamental en la salud de todo ser humano. Una infección bacteriana es inminente cuando estas bacterias se reproducen sin control e invaden otras partes del cuerpo. Las infecciones bacterianas pueden variar en intensidad y ser solo una molestia hasta una seria amenaza para la vida. Estas infecciones bacterianas son probablemente las más fáciles de tratar, pero también pueden ser perjudiciales si no se tratan rápidamente; una de las maneras de tratar o combatir dichas infecciones es con el uso de antibióticos (Pabón y Quero, 2016).

Definición de Términos

Antagonismo

Interacción entre dos o más sustancias donde el efecto combinado es menor que el efecto individual de cualquiera de ellos (Njimoh y col., 2015).

Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Es la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado (Ramírez y Castaño, 2009).

Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)

Es la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas (Ramírez y Castaño, 2009).

Dimetilsulfóxido (DMSO)

El dimetil sulfóxido es un líquido orgánico incoloro, soluble en agua, conocido desde 1953 por sus propiedades como un “súper disolvente” y por su capacidad de penetrar fácilmente en los tejidos animales y vegetales. Debido a sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas se ha empleado en medicina y veterinaria (Álvarez y Larqué-Saavedra, 2004).

Efecto sinérgico

Interacción entre dos sustancias en la cual el efecto biológico combinado de una o más sustancias es mayor que la suma de los efectos de cada elemento solo (Njimoh y col., 2015).

Fitoquímica

Es una disciplina científica que estudia y analiza, de manera cualitativa y cuantitativa, la composición química de los metabolitos secundarios elaborados y en algunos casos almacenados por las plantas. Para esto se basa en la importancia biológica, curativa o social que las plantas presentan, para extraer los compuestos que le confieren estas propiedades y estudiarlos estructuralmente (Montealegre, 2011).

Susceptibilidad

Condición en la que existe una disminución de la resistencia de un individuo frente a una determinada enfermedad o intoxicación y que se experimenta con dosis a exposiciones inferiores a las habitualmente nocivas para el resto de la población (Ramírez y Castaño, 2009)

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Enfoque de la Investigación

La investigación se basa en un enfoque cuantitativo, ya que para responder la pregunta de investigación y probar la hipótesis previamente establecida, se recolectaran datos utilizando uno o más instrumentos de medición, con la finalidad de comprobar el efecto sinérgico entre extractos de hojas y corteza de *Tectona grandis* L. f y antibióticos estándar frente a cepas bacterianas (Hernández-Sampieri, 2003).

Tipo y Diseño de la Investigación

En este tipo de investigación, el estudio será de tipo confirmatorio, ya que estudia si hay relación o no entre una o más variables y cuenta con un diseño experimental que será un experimento puro, ya que intencionalmente se combinaran los extractos de *Tectona grandis* L. f con antibióticos estándar lo que permitirá medir el posible efecto sobre las distintas cepas bacterianas. Además, tendrá un control que permitirá conocer la relación causal entre dichas variables (Hernández-Sampieri, 2003).

Población y Muestra

El grupo de estudio está representado por árboles de Teca del herbario de la Universidad de Los Andes situado en el Vigía, municipio Alberto Adriani del estado Mérida, para este estudio se recolectaron hojas y corteza de *Tectona grandis* L. f, y se depositó una muestra testigo en el herbario Dr. Luís Ruiz Terán Mérida Farmacia (MERF) la identificación la realizó el ingeniero Juan Carmona adscrito al departamento de farmacognosia y medicamentos orgánicos de la facultad de Farmacia y Bioanálisis bajo el *voucher* N° 1021. El análisis fue realizado en abril de 2016.

Procedimiento o Metodología

Extracción de los Compuestos Activos de *Tectona grandis* L. f

Las hojas frescas y corteza de *Tectona grandis* L. f, fueron secadas en una estufa a 40 °C durante 5 días, posteriormente en un mortero de porcelana se molió hasta pulverización. Para la extracción de los compuestos activos se utilizó el método de maceración, colocando en un matraz 100 mL de solvente (hexano, diclorometano y etanol) con aproximadamente 50 gramos de hojas y 50 gramos de corteza pulverizada cada uno por separado durante 72 horas con agitaciones periódicas a temperatura ambiente, produciendo así la difusión de los compuestos activos hacia el solvente (Lima-Aguirre, 2005).

Transcurrido este tiempo las soluciones provenientes de las extracciones fueron sometidas a filtración utilizando un embudo y papel filtro, para luego ser concentradas en un rota evaporador a presión reducida, a una temperatura no mayor a 45 °C, obteniéndose un extracto concentrado al cual se realizó un tamizaje fitoquímico, se evaluó la actividad antibacteriana y la separación e identificación de los componentes por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

El Tamizaje fitoquímico de los extractos de hojas y corteza de *Tectona grandis* L. f. se realizó siguiendo el procedimiento de las técnicas de coloración y precipitación explicadas previamente en las bases teóricas.

Separación e Identificación de los Componentes Químicos Presentes en los Extractos

La identificación de los componentes de extractos de *Tectona grandis* L. f. se realizó mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM). Esta técnica permitió el análisis preciso de masas para la separación, identificación, caracterización y cuantificación de diferentes compuestos químicos, presentes en muestras complejas mediante la combinación de ambas técnicas se

obtuvieron los espectros de masas de los distintos compuestos de las muestras utilizando un cromatógrafo de gases marca Hewlett-Packard modelo 5973.

Se empleo una columna capilar HP5 MS (5% fenil, 95% metilpolisiloxano) de 30 m de longitud y 0,25 mm de diámetro interno, con un espesor de película de 0,25 μm . Se inicio a una temperatura de 100 °C, luego se aplico un calentamiento de 5 °C/min hasta una temperatura final de 260 °C durante 3 minutos. La temperatura de la interface cromatógrafo-espectrómetro se mantuvo a 280 °C; la cámara de ionización a 230°C y cuadrupolo a 150 °C. Se utilizo helio como gas portador a una velocidad de 34 m/s. El análisis se realizo a 70 eV; en un rango de masas de 40 a 500 uma, a una velocidad de 3,9 espectros/segundos. Se inyectó 1.0 μL de la solución de reparto 1:1 (v/v). Los espectros de masas obtenidos proporcionan información sobre el patrón de fragmentación del compuesto, su masa molecular y porcentaje de similitud con los compuestos contenidos en la sexta edición de la base de datos computarizados Wiley reportados en la literatura y MIST.

Determinación de la Actividad Antibacteriana por el Método de Difusión en Agar (Kirby-Bauer)

Microorganismos empleados. Para la evaluación de la actividad antibacteriana, se seleccionaron cepas de referencia internacional de la American Type Culture Collection (ATCC, por sus siglas en ingles). Gram positivas como *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212); Gram negativas como *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 23357), *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Las cuales fueron proporcionadas por el Departamento de Bioanálisis Clínico de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, del Estado Mérida, Venezuela.

Ensayo bacteriano. A partir de las cepas de referencia internacional, se realizó un repique bacteriano en medios de cultivos de agar nutritivo, a excepción de *E. faecalis* que por sus condiciones de crecimiento se repicó en agar tripticasa soya; posteriormente se preparo el inculo bacteriano tomando una o dos colonias con un

asa en aro estéril, transfiriéndolas a una solución de NaCl al 0,85 % hasta alcanzar la turbidez del patrón de MacFarland N-0,5 equivalentes a $10^{6.8}$ UFC/mL.

La determinación de la actividad antibacteriana se llevó a cabo empleando la técnica de difusión de disco en agar o método de Kirby-Bauer. El inóculo previamente preparado fue tomado con ayuda de un hisopo estéril; evitando el exceso de humedad rotando el mismo por las paredes del tubo de ensayo. Seguidamente se sembró la muestra en la placa de agar Muller-Hinton. Una vez sembradas todas las placas con los diferentes microorganismos a ensayar, se colocaron los discos de papel filtro de 6mm de diámetro (previamente sometidos a esterilización con luz ultravioleta (LUV) durante toda una noche), impregnados con 10 μ L de cada extracto puro a una concentración de 10 mg/mL de manera equidistante.

Seguidamente se colocaron en la superficie del agar Muller Hinton inoculado, al igual que los discos de antibióticos comerciales utilizados como controles positivos, con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a evaluar, como control negativo un disco de papel filtro impregnado con DMSO (dimetil sulfóxido). Los antibiogramas se dejaron en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos y luego trasladados a la estufa a 37 °C durante 24 horas.

Tras el periodo de incubación de las cepas se realizó la lectura, midiendo el diámetro de la zona de inhibición alrededor del disco y se expresaron en milímetros (mm), producto de la actividad antimicrobiana del extracto que fue considerada de la siguiente manera:

Resistente. Si se observa crecimiento bacteriano alrededor del disco (no hubo halo de inhibición).

Sensible. Si no se observa crecimiento bacteriano alrededor del disco (hubo un halo de inhibición).

El análisis de concentración mínima inhibitoria (CIM) para los microorganismos que mostraron zonas de inhibición fue determinada por dilución de los extractos, en

los rangos comprendidos entre 5 y 0,65 mg/mL en dimetilsulfoxido (DMSO), colocando 10 µg de cada dilución en el disco de papel. Los valores de CIM se definen como la concentración más baja que inhibe el crecimiento bacteriano. Como control negativo se uso un disco impregnado con DMSO para descartar posible actividad del solvente contra las bacterias ensayadas, todos los análisis se realizaron por duplicado.

Evaluación del Efecto Sinérgico

Y por último se coloco en la placa previamente inoculada los discos de antibióticos comerciales impregnados con 10 µL de cada extracto de *Tectona grandis* L. f. en concentraciones comprendidas entre 10 y 0,65 mg/mL, después de incubarse se midió el diámetro del halo de inhibición con el fin de probar si ocurre un efecto sinérgico o si por el contrario se observa un efecto antagónico.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Análisis Fitoquímico Preliminar de Extractos de *Tectona grandis* L. f.

Los extractos de hoja y corteza de la planta *Tectona grandis* L. f. recolectada en el herbario de la Universidad de Los Andes situado en el Vigía, municipio Alberto Adriani del estado Mérida, obtenidos por el método de maceración con distintos solventes como hexano, diclorometano y etanol, se les realizó ensayos para alcaloides, terpenos, flavonoides, saponinas, fenoles y esteroides (tabla 3 y 4).

Tabla 3. *Metabolitos Secundarios Presentes en los Extractos de Hojas de Tectona grandis* L. f.

Metabolito	Hexano	Diclorometano	Etanol
Alcaloides	+	+	+
Saponinas	ND	ND	-
Fenoles	-	+	+
Esteroides	+	-	-
Triterpenoides	-	-	+
Flavonoides	-	+	+

Leyenda: (+): Positivo; (-): Negativo; (ND): No se detecto

Tabla 4. *Metabolitos Secundarios Presentes en los Extractos de Corteza de Tectona grandis* L. f.

Metabolito	Hexano	Diclorometano	Etanol
Alcaloides	-	-	-
Saponinas	-	-	-
Fenoles	-	-	-
Esteroides	+	-	-
Triterpenoides	-	-	+
Flavonoides	-	-	-

Leyenda: (+): Positivo; (-): Negativo

Es importante recordar, que los resultados de este análisis, deben ser tomados con precaución, pues están hechos de un crudo que contiene gran variedad de

compuestos, muchas veces altamente coloreados. Todo ello interfiere en los resultados de las reacciones indicadas, porque un mismo reactivo puede responder a más de un grupo de sustancias y además se debe considerar que, generalmente se trata de compuestos polifuncionales y por otra parte, la coloración del crudo puede enmascarar las reacciones de color (Marcano y Hasegawa, 2002).

Composición Química de Extractos Vegetales de la Corteza de *Tectona grandis* L. f. por CG-EM

El análisis de los extractos de la corteza de *Tectona grandis* L. f. se realizó empleando un equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), de esta manera fue posible conocer la composición química por la base de datos computarizados Wiley reportados en la literatura y MIST. Se logró identificar 18 componentes, los cuales se expresan en la (tabla 5). Entre los compuestos mayoritarios obtenidos se encuentra el Lupeol (figura 2) con un 60,04 %; seguido de el Friedoolean-6-eno con un 40,91 %; el ácido linoleico con un 35,26 % (Figura 3); el ácido oleico con un 27,40 % (figura 4); también el tetracosano con un 25,83 % (figura 5); el ácido hexadecanoico con un 18,36 % (figura 6); Friedoolean-8-eno-3-ona con un 18,05 % y el heneicosano con un con 12,81 % (figura 7) respectivamente.

Es importante mencionar que el análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas no se le realizó a los extractos de hojas de *Tectona grandis* L. f. debido a que se dañó el equipo por las fallas eléctricas.

Figura 2. Estructura Química del Lupeol

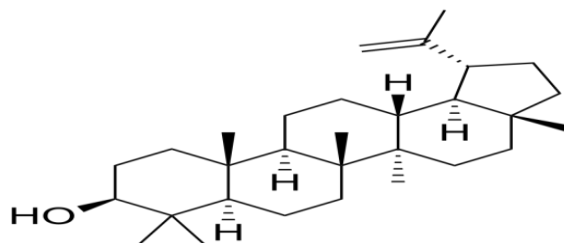


Tabla 5. *Compuestos Identificados en los extractos de la Corteza Tectona grandis L. f. por Medio de CG-EM:*

N° de Pico	Componente	TR	%
1	Ácido hexadecanoico	21,17	18,36
2	α -Metilntraquinona	24,02	4,03
3	Ácido linoleico	24,44	35,26
4	Ácido oleico	24,53	27,40
5	Ácido octedecanoico	24,88	4,24
6	Heneicosano	30,41	3,62
7	Heptacosano	33,52	3,11
8	Ácido hexadecanoico	21,17	3,68
9	α -Metilntraquinona	24,03	4,56
10	Ácido oleico	24,44	3,01
11	β -Amirina	29,24	9,19
12	Heneicosano	30,41	12,81
13	Friedoolean-6-eno	31,83	40,91
14	Tetracosano	33,52	25,83
15	Friedoolean-8-eno-3-ona	31,16	18,05
16	Lupenona	31,19	10,65
17	α -Amirina	32,32	11,05
18	Lupeol	32,75	60,04

Figura 3. *Estructura Química del Ácido Linoleico*



Figura 4. *Estructura Química del Ácido Oleico*

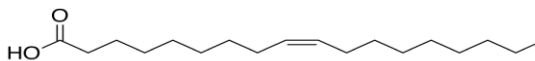


Figura 5. *Estructura Química del tetracosano*

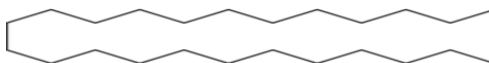


Figura 6. *Estructura Química del Ácido hexadecanoico*

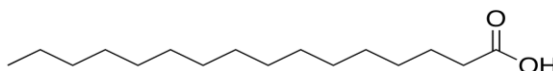
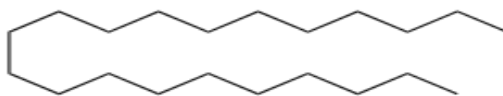


Figura 7. Estructura Química del Heneicosano



Evaluación de la Actividad Antibacteriana de los Extractos

Los extractos de hoja y corteza de *Tectona grandis* L. f. se sometieron a un estudio biológico para evaluar la actividad antibacteriana frente a cinco grupos de microorganismos conocidos y frecuentemente causantes de numerosas patologías; el mismo se realizó mediante la técnica de difusión de disco en agar; las especies a evaluar fueron *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* todas de la colección americana ATCC; se tomó como referencia para el uso de los controles positivos lo establecido por el Comité Nacional para la Normalización de Laboratorios Clínicos (NCCLS) 2015, según las cepas bacterianas de ensayo. Al evaluar la actividad antibacteriana de los extractos vegetales, para evaluar la sensibilidad se realizó a partir de una concentración de 10 mg/mL de cada extracto obtenido; se visualizaron los siguientes resultados tabla 6, el extracto de hexano hoja y etanol corteza no se logró evaluar debido a su bajo rendimiento de extracción.

Tabla 6. Actividad Antibacteriana de Extractos de *T. grandis* L. f.

Microorganismo	Etanol Hoja	Hexano Corteza	Diclorometano Hoja	Diclorometano Corteza
Diámetro de halos de inhibición en (mm)				
<i>S. aureus</i>	10	-	8	-
<i>E. faecalis</i>	17	-	13	-
<i>K. pneumoniae</i>	-	7,5	-	8
<i>E. coli</i>	9	8	7	8
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-

(-): No presento halo de inhibición.

De acuerdo a estos datos, se podría deducir que los extractos de hoja y corteza de *Tectona grandis* L. f. son capaces de inhibir en cierto grado el crecimiento bacteriano, observándose actividad antibacteriana contra las cepas de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* pero no se observó sensibilidad contra *P. aeruginosa*, a las

mismas se les evaluó su concentración mínima inhibitoria. Los extractos puros se diluyeron en DMSO para ser ensayado en aquellas cepas bacterianas que presentaron sensibilidad y así conocer la concentración mínima inhibitoria del extracto vegetal, fueron evaluados a concentraciones de 10; 5; 2,5 y 0,65 mg/mL, obteniéndose los siguientes resultados tabla 7.

Tabla 7. *Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)*

Extracto	Halo de inhibición (mm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>			
CIM (mg/mL)	5	2,5	1,25	0,65
Etanol hoja	9	9	8	8
CH₂Cl₂ hoja	8	-	-	-
	<i>Enterococcus faecalis</i>			
Etanol hoja	11	7	7	-
CH₂Cl₂ hoja	-	-	-	-

El extracto etanólico de hojas de *Tectona grandis* L. f. fue activo frente a *S. aureus* con un halo de inhibición de 8 mm para una CIM de 0,65 mg/mL y frente a *E. faecalis* con un halo de inhibición de 7 mm, siendo su CIM de 1,25 mg/mL; mientras que con diclorometano para *S. aureus* se obtuvo un halo de inhibición de 8 mm para una CIM de 5 mg/mL y *E. faecalis* la CIM fue >5 mg/mL.

Tabla 8. *Concentración Mínima Inhibitoria (CIM)*

Extracto	Halo de Inhibición (mm)			
	<i>Escherichia coli</i>			
CIM (mg/mL)	5	2,5	1,25	0,65
Hexano corteza	8	7	7	7
CH₂Cl₂ corteza	8	7	7	7
Etanol hoja	8,5	7,5	7	7
	<i>Klepsiella pneumoniae</i>			
Hexano corteza	7,5	7,5	7	7
CH₂Cl₂ corteza	-	-	-	-

En el ensayo de *E. coli* en los extractos de corteza tanto de diclorometano como hexano y en el extracto etanólico de hojas se observó que su CIM fue < 0,65 mg/mL; mientras que el extracto hexano-hojas de *T. grandis* L. f. fue activo frente a *K.*

pneumoniae con un halo de inhibición de 7 mm, siendo su CIM de 0,65 mg/mL y con diclorometano corteza la CIM fue mayor a 5 mg/mL tabla 8.

Por otra parte para la evaluación sinérgica se combinó penicilina con el extracto etanólico de hojas de *Tectona grandis* L. f. frente *E. faecalis* observándose un pequeño aumento en el halo de inhibición de 17,5 a 18 mm en concentraciones comprendidas entre 10 y 1,25 mg/mL tabla 9.

Tabla 9. Sinergismo combinando los extractos de hojas de *T. grandis* L. f. y sus diluciones con penicilina frente a *E. faecalis*

<i>Enterococcus faecalis</i>				
Extracto	Halo de Inhibición (mm)			
Concentración (mg/mL)	10	5	2,5	1,25
Etanol hoja + Penicilina	18	18	18	18
Penicilina 10 µg	17,5	17,5	17,5	17,5

La evaluación de la actividad sinérgica se realizó por el método de difusión en agar frente a *E. coli* donde se observó un leve sinergismo al combinar piperacilina 100 µg con los extractos de hojas y corteza de *Tectona grandis* L. f. (tabla 10).

Tabla 10. Sinergismo combinando los extractos de *T. grandis* L. f. y sus diluciones con piperacilina frente a *E. coli*

<i>Escherichia coli</i>					
Extracto	Halo de Inhibición (mm)				
Concentración (mg/mL)	10	5	2,5	1,25	0,65
Hexano corteza + Pe	35	35	35	-	-
CH₂Cl₂ corteza + Pe	35	35	35	35	-
Etanol hoja + Pe	35	35	35	35	35
Piperacilina 100 µg	34	34	34	34	34

Leyenda:(Pe) piperacilina de 100 µg

Es importante resaltar que se obtuvo un resultado diferente al combinar cada extracto y sus diluciones por separado con gentamicina frente a *K. pneumoniae*; y al

combinar eritromicina junto con los extractos frente a *S. aureus*, ya que los halos de inhibición permanecieron del mismo tamaño que el del antibiótico utilizado.

DISCUSIÓN

La resistencia bacteriana demostrada por investigadores de todo el mundo es el motivo por el cual en forma permanente se estén investigando nuevos compuestos. Existe un gran número de estudios en donde la búsqueda se centra en diferentes recursos naturales, principalmente en las plantas, debido a la riqueza en compuestos con diferentes actividades, entre ellas la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos; los diversos mecanismos de acción antibacteriana de las plantas y los posibles metabolitos involucrados han sido estudiados mediante ensayos de susceptibilidad antimicrobiana y análisis fitoquímicos debido a los potenciales usos contra las enfermedades infecciosas (Rodríguez-Pava, Zarate, y Sánchez, 2017).

En el presente estudio se realizó el tamizaje fitoquímico de los extractos de hexano, diclorometano y etanol de hojas y corteza de *Tectona grandis* L. f. revelando la presencia de metabolitos secundarios tales como alcaloides, terpenos, fenoles, flavonoides y esteroides (Tabla 2), estos resultados son similares a los reportados por Degbe y col (2018), donde indican que en las hojas y corteza encontraron fenoles, flavonoides, taninos y polisacáridos, al igual que Purushotham y col (2010), también informaron sobre la presencia de flavonoides, alcaloides, taninos, antraquinonas y naftoquinonas en *Tectona grandis* L. f.

En otro estudio similar realizado por Bitchagno y col (2015), donde determinaron la composición fitoquímica del extracto etanólico de los frutos de *Tectona grandis* L. f. indicando que contienen antraquinonas, polifenoles, esteroides, triterpenos y taninos pero no flavonoides, ni saponinas, al igual que en esta investigación tampoco se detectaron saponinas en las hojas y corteza de esta especie, sin embargo otros autores como Nilesh y col (2017) si las reportan en investigaciones realizadas previamente, esta diferencia se puede explicar debido a que la ausencia o presencia del compuesto podría estar relacionada con el método de extracción, y solventes por los cuales

presentan afinidad química debido al comportamiento polar o apolar del solvente o puede estar relacionada con la concentración del metabolito secundario, que podría estar presente en muy bajas concentraciones lo que impediría su detección (Neyra 2011).

Es importante resaltar que múltiples investigaciones demuestran que metabolitos como taninos, alcaloides, flavonoides y otros compuestos de naturaleza fenólica son responsables de actividades antimicrobianas, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos ya que varios de los extractos analizados de *Tectona grandis* L. f presentaron actividades antibacterianas contra *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. faecalis* y *S. aureus*, pero no contra *P. aeruginosa* (Tabla 6), en lo que respecta a la resistencia que presentó *P. aeruginosa* frente a los extractos, se estima probablemente que al igual que lo sucedido en los estudios de Benkendorff, Davis, y Bremner, (2001) esta resistencia se deba a la estructura de la membrana celular y al alto contenido de guanina-citosina en su ADN.

Ahora bien, el análisis de CG-EM reveló que entre los compuestos mayoritarios del extracto hexánico de la corteza de *Tectona grandis* L. f se encuentra el ácido linoleico (35,26%), ácido oleico (27,40%) y ácido hexadecanoico (ácido palmítico) (18,36%); estos compuestos han sido reportados previamente con actividad antibacteriana (García Luján, Martínez, Ortega, y Castro, 2010). Así mismo un estudio realizado por Pérez-Gutiérrez (2005) también demostró que los ácidos grasos, como el ácido linoleico presentan actividad antibacteriana, por el método de difusión de disco sobre bacterias como *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi*.

Por otra parte en el extracto de diclorometano, los compuestos más abundantes fueron friedoolean-6-eno (40,91%), tetracosano (25,83%) y heneicosano (12,81%) respectivamente, mientras que en el extracto etanólico, se encontró la presencia de lupeol con un (60,04%) (triterpenoide) y friedoolean-8-eno-3-ona con un (18,05%) a

este último extracto no se le determinó la actividad antibacteriana debido al bajo rendimiento de la extracción.

Es importante resaltar, que estos datos están respaldados en un análisis de CG-EM realizado anteriormente por Oyebanji y Ololade (2017), donde al bio-aceite de *Tectona grandis* L. f se le determinó la presencia de 21 compuestos entre los más abundantes se encontró, el ácido palmítico (15 %), ácido oleico (12,3 %), cis-1,9-hexadecadieno (12 %), cis-10-pentadecen-1-ol (12 %), 9octadecenal (12 %), trans-2-octadecadecen-1-ol (12 %), ácido mirístico (5 %) y ácido esteárico (5 %), concluyendo que el bio-aceite fue activo contra todas las bacterias probadas *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *S. typhimurium*, *S. marcescens*, *S. agalactiae* y *S. aureus*, con altas zonas de inhibición (14-30 mm), en concentraciones de 0,25 mg/mL.

Con relación a la actividad antibacteriana observada en este estudio, el extracto de hojas de *Tectona grandis* L. f mostró actividad frente a cepas bacterianas como *E. faecalis*, *S. aureus*, *E. coli* y *K. pneumoniae*, con CIM que van desde 0,65 mg/mL hasta 10 mg/mL; los resultados obtenidos en esta investigación se pueden apoyar con estudios realizados por Bitchagno y col (2015), donde los extractos etanólicos de los frutos de *Tectona grandis* L. f también exhibieron actividad antibacteriana contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. aerogenes*, con CIM desde 0,064 hasta 0,26 mg/mL. En otra investigación realizada por Purushotham y col., (2010), en extractos de hojas de *Tectona grandis* L. f reportaron actividad frente a microorganismos como *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* y *E. coli* con CIM iguales o mayores a 1 mg/mL.

Esta disparidad en las concentraciones mínimas inhibitorias podría estar influenciada por la región donde fue recolectada la planta pues numerosos autores han mencionado la influencia de la zona geográfica sobre la composición química de las plantas (Díaz y Proaño, 2011). Así como también se ha dicho que las condiciones climáticas, variaciones fisiológicas, factores genéticos y depredadores pueden inducir

un cambio en el metabolismo de la planta de forma tal que varíen las concentraciones de los metabolitos secundarios, (Lorenzo y Gonzales, 2010; Aparicio-Zambrano, Rojas-Fermín, Velasco, Usubillaga, Sosa, y Rojas, 2019) los cuales son responsables de variables mecanismos de acción, protegiéndolas del ataque de diversos microorganismos patógenos (Rojas, Pérez, Martínez y Mieles, 2012).

De esta forma existen diferentes fuentes que discuten la administración de metabolitos secundarios en conjunto con los antibióticos para disminuir el grado de resistencia de las bacterias a las drogas antimicrobianas, siendo el objetivo inhibir y en lo posible revertir esa resistencia adquirida y la aparición de nuevas cepas bacterianas multirresistentes, este punto de vista está ganando atención en los investigadores, aunque los estudios de combinación de drogas sintéticas con productos naturales es limitada, se conoce que no solo se puede lograr sinergia entre los productos naturales y drogas sintéticas, sino también el uso exitoso de combinaciones de extractos de plantas en tratamientos de diversos trastornos como procesos inflamatorios, insomnio inducido por el estrés, la osteoartritis, hipertensión e incluso cáncer y VIH (Gutiérrez-Sierra, 2015).

En este estudio nuestro objetivo fue evaluar la interacción farmacológica establecida al combinar cada extracto puro de *Tectona grandis* L. f y sus diluciones con distintos antibióticos en busca de un efecto sinérgico que maximice la actividad del antibiótico frente a *S. aureus*, *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, y *E. coli*. En la tabla (9), donde se observó un leve sinergismo entre los extractos de *Tectona grandis* L. f con piperacilina de 100 µg (β-lactámico) frente a *E. coli*, formando un halo de inhibición de 35 mm, superando el del antibiótico de 34 mm, así mismo se observó que al combinar los extractos de *Tectona grandis* L. f y sus diluciones con penicilina 10 µg (β-lactámico) frente a *E. faecalis*, tabla (10) se evidencio un aumento del halo de inhibición de 18 mm, mientras que el halo del antibiótico fue de 17,5 mm lo que confirma que los componentes del extracto mejoran la acción de estos antibióticos.

Chávez, Díaz, Escalante y Estrada (2008), afirman que en la mayoría de los casos donde se obtiene un efecto positivo o sinérgico, se da por el mecanismo de sumación, debido a que ambas sustancias producen el efecto por mecanismos diferentes y juntos dan como resultado un efecto mayor, como ocurre con el aceite esencial de *Origanum vulgare* el cual potencia la acción antibacteriana de la Gentamicina sobre *E. coli*.

Esto sugeriría que la sinergia con los antibióticos observada en este estudio podría atribuirse a los compuestos presentes en los extractos; ya que se ha demostrado que algunos de estos compuestos, como los polifenoles, ejercen su acción antibacteriana a través de perturbaciones de membrana, esta perturbación de la membrana celular junto con la acción de los β -lactámicos que actúan sobre la pared celular bacteriana inhiben la actividad transpeptidasa de un grupo de proteínas llamadas "proteínas de unión a penicilina" (PBP), involucradas en la síntesis de péptidoglicanos causan la muerte celular, esto podría conducir a un efecto antimicrobiano mejorado (Esimone, Iroha, Ibezim, Okeh, y Okpana, 2006). De la misma forma se ha demostrado que algunos compuestos derivados de plantas pueden mejorar la actividad in vitro de algunos antibióticos inhibidores de peptidoglicano atacando directamente el mismo sitio (es decir, peptidoglucano) en la pared celular (Zhao, Hu, Okubo, Hara, & Shimamura, 2001).

También se ha postulado que los alcaloides se intercalan en la doble cadena del ADN o pueden penetrar la membrana plasmática combinándola y precipitando las proteínas protoplasmáticas y desnaturalizándolas (Aguas y Morales, 2006; Borboa-Flores y col., 2010).

Por otra parte, otros autores han informado que los terpenos tienen actividad antimicrobiana debido a que tienen la capacidad de causar una desestabilización en la integridad y permeabilidad de la membrana, al interferir con la disipación de la fuerza de los protones por lo tanto, la presencia de terpenoides y compuestos fenólicos podrían explicar la actividad antibacteriana observada en el presente estudio (Rodríguez-Pava y col., 2017), por lo que las potencializaciones observadas en el

trabajo posiblemente estén relacionadas con las interacciones químicas de los componentes de los extractos con los antibióticos.

Purushotham y col., (2010), también realizaron una evaluación sinérgica combinando tetraciclina 62,5 mg/mL con 125 mg/mL del extracto metanólico de las hojas de *Tectona grandis* L. f por el método de difusión en agar observándose un efecto sinérgico tanto en bacterias Gram positivas como en las Gram negativas, la diferencia observada respecto a nuestro estudio podría atribuirse a la baja concentración de los constituyentes químicos presentes en el vegetal con actividad antimicrobiana, a la baja concentración del extracto utilizado o quizás al mecanismo de acción del antibiótico utilizado; sin embargo, se deben realizar más estudios para aclarar qué interacciones y cuáles son los mecanismos de acción utilizados por el extracto puro que puedan explicar la sinergia e indiferencias observadas en este estudio.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- En el tamizaje fitoquímico se detectaron metabolitos secundarios tales como alcaloides, terpenos, fenoles, flavonoides y esteroles.
- Se confirmó actividad de los extractos de hojas y corteza de *Tectona grandis* L. f. como agentes antibacterianos frente a patógenos de importancia clínica como *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* y *K. pneumoniae*.
- Mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, se determinó la composición química del extracto de hexano de la corteza de *Tectona grandis* L. f. donde sus compuestos mayoritarios fueron: Ácido linoleico 35,26 %, ácido oleico 27,40 % y ácido hexadecanoico (ácido palmítico) 18,36 %.
- En el extracto de diclorometano de la corteza de *T. grandis* L. f. los compuestos más abundantes fueron friedoolean-6-eno 40,91 %, tetracosano 25,83% y heneicosano 12,81 %.
- Los compuestos mayoritarios, en el extracto etanólico de la corteza fueron lupeol con un 60,04 % (triterpenoide) y friedoolean-8-eno-3-ona con un 18,05 %.
- No se observó sinergia en *K. pneumoniae* y *S. aureus* al combinar extractos de hojas y corteza de *Tectona grandis* L. f. con antibióticos estándar.
- Se observó un leve sinergismo entre los extractos de hojas y corteza de *Tectona grandis* combinados con piperacilina frente a *E. coli*.
- Los extractos de hojas de *Tectona grandis* L. f. potenciaron la actividad antibacteriana de la penicilina frente a *E. faecalis*.

RECOMENDACIONES

- Es recomendable realizar estos ensayos con microdiluciones en tubo para observar si hay actividad con menores concentraciones o se mantienen los mismos resultados a los obtenidos en difusión por agar.
- Se recomienda utilizar mayor cantidad de la planta al momento de realizar la extracción ya que su rendimiento ha sido bajo.

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Aguas, E., & Morales, X. (2006). *Química preliminar y evaluación de la actividad antibacterial del extracto etanólico del tallo de Matelea maritima (Asclepiadiaceae)*. Trabajo de grado, Sincelejo: Universidad de Sucre, Facultad de Educación y Ciencias, Departamento de Biología, p43.
- Alabi, K., & Oyeku, T. (2017). The chemical constituents extractable from teak tree (*Tectona grandis linn*). *Journal of Basic and Applied Science*, 25 (1), 73-80. <https://www.ajol.info/index.php/njbas/index>
- Álvarez, D. M., & Larqué-Saavedra, A. (2004). *La supermolécula, el dimetil sulfóxido: ¿un nuevo regulador del crecimiento vegetal?* Señales y defensa en plantas. 20. Disponible en: https://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/55_3/la_supermolecula.pdf
- Aparicio-Zambrano, R., Rojas-Fermín, L., Velasco, J., Usubillaga, A., Sosa, M., & Rojas, J. (2019). Caracterización química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de las hojas de *Libanothamnus neriifolius* (Asteraceae). *Revista peruana de biología*, 26 (1), 095-100. disponible: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v26i1.15912>
- Ávalos García, A., & Pérez-Urria, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal*, 2 (3), 119-145. Disponible en: <http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798>
- Benkendorff, K., Davis, A., & Bremner, J. (2001). Chemical defense in the egg masses of benthic invertebrates: An assessment of antibacterial activity in 39 mollusks and 4 polychaete. *J. Invertebr. Pathol*, 78 (2), 109-118.

- Bitchagno, G. T., Sama Fonkeng, L., Kopa, T. K., Tala, M. F., Kamdem Wabo, H., Tume, C. B., Tane, P., & Kuate, J. R. (2015). Antibacterial activity of ethanolic extract and compounds from fruits of *Tectona grandis* (Verbenaceae). ***BMC Complementary and Alternative Medicine***, 15 265-266. Disponible en: <https://bmccomplementalternmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-015-0790-5>
- Borboa-Flores, J., Rueda-Puente, E., Acedo-Félix, E., Ponce, J., Cruz-Villegas, M., García-Hernández, J., & Ortega-Nieblas, M. (2010). Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. ***Tropical and Subtropical Agroecosystems***, 12, 539–547.
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., & Morse, S., (2008). ***Microbiología Médica***. México: El Manual Moderno.
- Bruneton, J. (2001). ***Fotoquímica y farmacognosia***. Plantas medicinales 2ª ed. Acibria. 408-501
- Cárdenas. (1996). ***Fundamentos de Farmacología en Terapéutica***. Santa fe de Bogotá. Balcázar impresiones. 3ª ed.1.
- Castillo, M. A., Pascual, Y. M., Cunhanune, L. C., Lorente, C., & Cañete, A. F. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de hojas y semillas de *Morinda citrifolia* L. (noni). ***Revista Cubana de Plantas Medicinales***, 19 (1), 374-382. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962014000400009
- Chávez, L., Díaz, F., Escalante, G., & Montañez, E. (2008). Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*. ***CIMEL***, 13 (2), 48-45.

- Degbe, M., Debieerre, F. Teté, A., Débare, H., Aklikokou, K., Dimier, I., & Gbeassor, M. (2018). Extracts of *Tectona grandis* and *Vernonia amygdalina* have anti-toxoplasma and proinflammatory properties in vitro. *Parasite*, 25:11.
- Devadiga, A., Vidya, K., & Saiduta, M. B. (2015). Timber industry waste-teak (*Tectona grandis* Linn.) Leaf extract mediated synthesis of antibacterial silver nanoparticles. *Nano Letters Internacionales*, 5 (4), 205-214. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40089-015-0157-4>
- Díaz, J. A., & Proaño, D. (2011). Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa-Perú, sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*. *Rev Estomatol Herediana*, 21 (3), 125-130.
- Díaz, M. C., & Suárez, M. J. (2000). *Preparaciones farmacéuticas elaboradas con base en productos naturales*. Disponible en: www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/derecho/dere1/tesis31.pdf.
- Dokuparthi, S. M., Khan, M. A., Anusha, A., Bee, M., Shaibaz., Shahajeb, S., Sunil-Kumar K., & Suthakaran, R. (2017). Acute oral toxicity study of *Tectona grandis* Linn. methanolic seed extract in albino mice. *The Journal of Phytopharmacology*, 6 (3), 183-185. Disponible: www.phytopharmajournal.com
- Domínguez, X. A. (1973). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. México: Limusa,
- Esimone, C., Iroha, I., Ibezim, E., Okeh, C., & Okpana, E. (2006) Evaluación *in vitro* de la interacción entre los extractos de té y la penicilina G contra *Staphylococcus aureus*. *Afr J Biotechnol*, 5: 1082-1086.
- Forbes, B. & Sahm, D. (2004). *Diagnostico Microbiológico*. Buenos Aires: Medica Panamericana.

- Fuente, N. M., Villarreal, J. M., Díaz, M. A., & García, A. P. (2016). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46 (2), 7-16.
- Gallegos-Zurita, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de la Facultad de Medicina*, 77 (4), 327-332. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=37949317002>
- García, D. E., Ojeda, F., & Montejó, I. (2003). Evaluación de los principales factores que influyen en la composición fitoquímica de *Morus alba* (Linn.). Análisis cualitativo de metabolitos secundarios. *Pastos y Forrajes*, 26 (4), 335. Disponible en: <https://payfo.ihatuey.cu/index.php?journal=pasto&page=articulo&op=view&path%5B%5D=814>.
- García Luján, C., Martínez, R. A., Ortega, J. L., & Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química Viva*, 9 (2), 86-96. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86314868005>
- Gennaro, A., (2003). *Remington Farmacia (Tomo 1)*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Group, APG-The Angiosperm Phylogeny. (2011). Angiosperm Phylogeny Website. *version 11*. Retrieved from <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. website:
- Guerra-Corado, A. E. (2005). *Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físico-químicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (phlebodium pseudoaureum) a nivel de laboratorio*. Trabajo de grado, universidad de San Carlos de Guatemala.

- Gutiérrez, M. C., & Droguet, M. (2002). La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes del mal olor. *Boletín Intexter*, 122, 35-41. <https://core.ac.uk/download/pdf/41780740.pdf>
- Gutiérrez-Sierra, A. Y. (2015). *Sinergismo entre el aceite esencial de Pimenta racemosa y antibióticos contra cepas ATCC gramnegativas y grampositivas*. Tesis de grado, universidad de Los Andes, Venezuela.
- Hemaiswarya, S., Kruthiventi, A. K., & Doble, M. (2008). Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Revista Phytomedicine*, 15, 639-652. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599280>
- Hernández-Sampieri, R. (2010). *Metodología de la investigación*. México: McGraw Hill interamericana. 1-613.
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia. Estudio de las Drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural*. Barcelona: Omega.
- Lanka, S. (2017). **Antimicrobial activities of *Tectona grandis* leaf and bark extracts**. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 4 (12), 245-248. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/321669391_antimicrobial_activities_of_tectona_grandis_leaf_and_bark_extracts.
- Li, B., Cantino, P. D., Olmstead, R. G., Bramley, G. L. C., Xiang, C., Ma, Z.-H., Zhang, D. (2016). *A large-scale chloroplast phylogeny of the Lamiaceae sheds new light on its subfamilial classification*. *Scientific Reports*, 6 (1), 34343.
- Lima-Aguirre S. I. (2005). *Análisis de los rendimientos obtenidos de dos especies de eucalipto trabajados en seco a nivel laboratorio y a nivel planta piloto en la extracción de su aceite esencial*. Tesis de Grado, Universidad de San Carlos de Guatemala.

- Lizcano, A. J. & Vergara, J. L. (2008). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Mycianthes rhopaloides y passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos*. Trabajo de grado, Bogotá D.C. Pontificia Universidad Javeriana de Colombia. Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis151.pdf>
- López, S. (1977). *Verbenaceae flora de Venezuela*. Mérida (Venezuela). Universidad de los Andes. 9-10 552-557.
- Lorenzo, P., & Gonzales L. (2010). Alelopatía: una característica ecofisiológica que favorece la capacidad invasora de las especies vegetales. *Ecosistemas*, 19 (1), 79-91.
- Maciques-Rodríguez, R., Castro, B. L., Machado, Omar., & Manresa, D. (2002). Neumonía nosocomial asociada a ventilación mecánica. *Revista Cubana de Pediatría*, 74 (3), 222-232. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475312002000300006&lng=es&tlng=es.
- Mahesh, S. K., & Jayakumaran, N. A. (2010). Antibacterial, Cytotoxic and Antioxidant Potential of Different Extracts from Leaf, Bark and Wood of *Tectona grandis*. *Int. J. Pharm. Sci. Drug. Res*, 2 (2), 155-158. <https://www.semanticscholar.org/paper/Antibacterial%2C-Cytotoxic-andAntioxidant-Potential-Krishna-Nair/366af04e9c4922989a418a94f41a2dc0e0e20>
- Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Orgánica*. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.
- Montealegre-Pinzón, C. (2011). *Etnobotánica preliminar del espíngo (ocotea quixos kosterm) en la medicina tradicional indígena inga, pruebas fitoquímicas y*

evaluación de la actividad antimicrobiana. Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana de Colombia.

Naghbi, F., Mosaddegh, M., Mohammadi Motamed, S., & Ghorbani, A. (2005). Labiatae Family in folk Medicine in Iran: from Ethnobotany to Pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2, 63-79.

Neyra M. (2011). *Evaluación química, posible letalidad y citotoxicidad del alga invasora Kappaphycus alvarezii.* Cumaná: Universidad de Oriente, Escuela de Ciencias, Departamento de Química Disertación Grado Licenciado en Química.

Nilesh, B. C., Kailasam, K. S., & Sachin A. N. (2017). *Tectona grandis* linn: a global overview. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 6 (2), 427-440. Disponible en: file:///C:/Users/Usuario/Downloads/article_wjpr_1485858508.

Njimoh, D. L., Assob, J. C., Mokake, S. E., Nyhalah, D. J., Yinda, C. K., & Sandjon, B. (2015). Antimicrobial Activities of a Plethora of Medicinal Plant Extracts and Hydrolates against Human Pathogens and Their Potential to Reverse Antibiotic Resistance. *International Journal of Microbiology*, 5 (4), 71-56. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2015/547156/>

Oyebanji, J. A. & Ololade, Z. S. (2017). Fast Pyrolysis of *Tectona Grandis* Wood for Bio-Oil: Characterization and Bactericidal Potentials. *Global Journal of Researches in Engineering: A Mechanical and Mechanics Engineering*, 17 (1), 1.

Pabón, J. & Quero, C. (2016). *Estudio del Aceite Esencial y Determinación de la Actividad Antibacteriana de la Especie Botánica Persea caerulea (Ruíz & Pav.) Mez Recolectada en Mérida-Venezuela.* Tesis de grado, Universidad de los Andes Mérida Venezuela.

- Pérez-Gutiérrez, R. M. (2005). Actividad antimicrobiana de ácidos grasos aislados de *Tubifex tubifex*. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 36 (1), 5-10
- Perozo, A. (2014). Resistencia a los Antibióticos ¿Amenaza Global, estamos llegando a la era Post-antibiótico? *Kasmera*, 42 (1), 5-7. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S007552222014000100001
- Purushotham, G., Arun, P., Jayarani, J. J., Vasnthakvmari, R., Sankar, L., & Raviprakash, B. R. (2010). Synergistic in vitro antibacterial activity of *Tectona grandis* leaves with tetracycline. *International Journal of Pharm Tech Research*, 2 (1), 519-523. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/b2fb/1479510ede3c1881303291e4645dda37b1d1.pdf>
- Ramesh, B. N. & Mahalakshmi, A. M. (2014). Teca (*Tectona grandis* Linn.): Una reconocida planta maderera con potenciales valores medicinales. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6 (1): 48-54
- Ramírez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15 (42), 263-268. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84916714049>
- Repetto, M., Sanz, P. (1995). *Glosario de términos toxicológicos*. Versión española.
- Rodríguez-Pava, C. N., Zarate, A. G., & Sánchez, C. (2017). Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. *NOVA*, 15 (27), 119-129 Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1794-24702017000100119&lng=pt&nrm=is&tlng=es

- Rojas, J. N., Pérez, A. F., Martínez, J. G., Mieles, J. U. (2012). *Antibacterial activity of leaf extract Melia azedarach L.* Universidad de Sucre. C, Sincelejo, Sucre, Colombia.
- Sánchez García, Y., Rondón Arias, L., Hermosilla Espinosa, R., & Almeida Saavedra, M. (2010). Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas, tallos y flores de la *Helychrysum bracteatum*. *Revista Química Viva*, 9 (1), 40-45. Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86312852008>
- Serra-Valdés, M. A. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16 (3), 402-419. Disponible en: <http://www.revhabanera.sld.cu/index.php/rhab/article/view/2013>
- Tortora, G., Funke, B. & Case, C., (2007). *Introducción a la Microbiología*. Buenos Aires: Medica Panamericana.
- Valcárcel, M. y Gómez, A. (1998). *Técnicas Analíticas de Separación*. Editorial REVERTÉ. Barcelona- España.
- Velázquez, D. (1997). *Clave para los géneros de Lamiaceae en Venezuela*. Acta Botánica Venezuela 20.93
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64(1), 3-19.
- Zhao, W., Hu, Z., Okubo, S., Hara, Y., & Shimamura, T. (2001). Mecanismo de sinergia entre galato de epigallocatequina y β -lactamas contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. *Agentes Antimicrobianos Chemother* 45: 1737-1742