



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



"Dr. ALFREDO NICOLÁS USUBILLAGA DEL HIERRO"

**Tamizaje Fitoquímico y Evaluación de la Actividad Antibacteriana de los
Extractos Etanólicos de hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L.**

(Trabajo presentado como requisito para optar al grado de Licenciado en
Bioanálisis)

Autor:

Jesús A. Sajaju G.

C.I: 19.951.707

Tutora:

Dra. Darly Villalobos

Mérida, Agosto de 2019

Dedicatoria

*A mi Mama, **Nancy Guedez**, por y para ti mi logro, gracias por la confianza, la paciencia y el amor, lo hemos logrado, te estaré eternamente agradecido por todo, y tu felicidad será el verdadero motivo de mi celebración, amo ser tu hijo.*

*A mi Abuela **María Guedez**, hermosa, gracias por tu cariño y compañía, tus oraciones han dado su fruto, tú catire siempre te lleva en su corazón y me siento feliz de celebrar este logro contigo.*

*A mi tía **Daipi Guedez**, con tu ejemplo de trabajo duro me enseñaste que se consiguen grandes cosas, gracias por el amor y el apoyo en este largo camino.*

*A **Luisana Aragoza**, hermana, que esto te sirva de ejemplo de que los sueños se hacen realidad, solo hay que trabajar duro, no te rindas jamás voy simplemente unos pasos adelante, te espero en la meta para abrazarnos, te amo hermana.*

*A mi Tierra **Guasdualito**, mi estado **Apure** y mi río **Arauca** los llevo tatuados en mi piel, espero regresar algún día con eso que salí a buscar.*

*A los que se fueron demasiado pronto: **Yexis Coiran**, tía llevo en mi corazón tus últimas palabras, **Luis Aragoza** viejo espero donde estés puedas ver y celebrar este logro con nosotros, **Desire Silva** amiga comparto mi triunfo contigo, **Argenis Santana** compañero espero que ese día estés con cada uno de nosotros, **Neida Zavala** siempre serás mi doña y mi negra, gracias por hacerme sentir uno más de los tuyos; **Luis Maldonado**, gracias por dejarme de regalo a una amiga, a todos gracias por la ayuda desde allá arriba.*

*Y a **Mí** por mi esfuerzo, no fue fácil pero todos los días valieron la pena, amo ser quien soy y en quien me he convertido, lo he logrado...*

Agradecimientos

A **DIOS**, mi más fiel compañero de aventuras, el honor y la gloria sea para ti en tu nombre encomiendo siempre mi espíritu, sueños y logros.

A **Daniela Becerrit**, por los momentos vividos, por el apoyo incondicional, por hacerme parte de tu familia y enseñarme que para hacer los sueños realidad a veces debemos estar despiertos, a tu lado vi atardeceres hermosos, juntamos recuerdos del tamaño del mar, y solo estamos empezando, hemos vivimos de todo, pero una amistad no tiene límites.

A **Iris Maldonado**, por enseñarme que los humanos también tenemos súper poderes siendo mi heroína favorita, de la palabra compromiso tú me diste el ejemplo, por ser la mejor tía que un hermano puede soñar, y la hija de un padre que se fue estando muy orgulloso, gracias por siempre dejarme tomar de tu vino, yo siempre te dejare probar mi pan.

A **Carla Liendo**, por ser mi amiga y mi colega más querida, que con amor y ejemplo me enseñó que en la carrera podemos encontrar muchas cosas y no solo microscópicas, que la competencia de un colega siempre debe ser quien ayuda a brillar más al otro, te estaré siempre agradecido.

A **Frank Humbria**, mi mejor amigo, gracias por demostrarme que a pesar de las adversidades siempre podremos lograr lo que nos propongamos, que este logro sea uno de muchos que celebremos juntos.

A **Deivis Arellano**, por tu voluntad de ayudarme, gracias por estar cuando lo necesite, espero que Dios te lo multiplique, amigo en bendiciones te estaré siempre agradecido.

A **Luis Ramirez**, por ser ese hermano mayor que encuentras lejos de casa y te motiva a seguir adelante.

A **Isabel Gamarra**, porque cuando no hubo nadie me prestaste tus manos, tus hombros y siempre hubo espacio en tu vida, familia y mesa para mí.

A **Blanyel Nieto**, gracias por la paciencia y el amor a la hora de enseñarme, fueron de gran ayuda tus lecciones, te llevare siempre en mi corazón, de las mejores cosas que me enseñaste fue ser mejor persona.

A la profesora **Darly Villalobos** no solo por ser una gran tutora y transmitirme su conocimiento sino también por depositar su confianza en mí, y a pesar de los vientos del camino quedarse a mi lado, mi cariño, respeto y

agradecimiento para Usted profe.

*A la **Universidad de los Andes** por ser ese escenario donde creí siempre que los sueños se hacían realidad y hoy soy testigo de eso, si me dieran la oportunidad de escoger otro lugar para ello, siempre te elegiría a ti, fue, es y será un honor haber sido parte de tus aulas.*

*Al **Laboratorio de Actinomicetos** de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, por el apoyo brindado para la realizar la parte experimental de este trabajo.*

*A mis **compañeros**: Daniela Salinas, Yoselyn Velandia, Diegris Vivas, Yarima Aranguren, Andrés Guillen, Natacha Aguilar, Tatiana López, Daisy Gonzales, María Fernanda Avila, Krystal Zambrano, Jesús Leen, Moisés Hernández, Dayana de Frenza, Dileivi Rosales por su compañía, por tantos momentos, por hacer más ameno el camino, complacido de haber compartido este viaje con ustedes.*

*A las **Familias**: Coiran, Becerrit Zavala, Monsalve Angulo, Liendo Almarza, Dávila Salina por hacerme un puesto en su mesa y compartir su cariño conmigo.*

*A los **Profesores**: Judith Velazco, Evelyn Alvarez, Carmen Lozano, Zulay Labrador, Daniela Montilla, Indra Cordero, Clara Díaz, Oduar Salazar, Julio Rojas, por siempre compartir lo mejor de sus talentos y hacerlo con entrega y amor es un gusto haber sido su alumno.*

*A **María Alejandra Blanco**, por ser ese motivo de inspiración, ya que en un viaje como este, a veces se necesita más, mucho más que un salón de clase, se necesita verdad en lo que somos, encontrarla fue un golpe de suerte y es maravilloso no solo intitularla como profesora, sino como Madrina y Amiga, se le quiere mucho.*

ÍNDICE GENERAL

	pág.
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN	x
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	4
EL PROBLEMA.....	4
Planteamiento del Problema	4
Justificación de la investigación	7
Objetivos de la investigación	8
Objetivo general	8
Objetivos específicos	8
Alcances y Limitaciones	9
CAPITULO II.....	10
MARCO TEÓRICO	10
TRABAJOS PREVIOS	10
ANTECEDENTES HISTÓRICOS	11
BASES TEORICAS	13
Aspectos generales de la familia Acanthaceae	13
<i>Características botánicas</i>	<i>13</i>
<i>Distribución geográfica</i>	<i>13</i>
Género <i>Ruellia</i>	14
<i>Ruellia tuberosa</i> L.	15
<i>Características botánicas</i>	<i>15</i>
<i>Distribución geográfica en Venezuela de <i>Ruellia tuberosa</i> L</i>	<i>16</i>
<i>Clasificación taxonómica</i>	<i>17</i>
Tamizaje fitoquímico.....	17
Extractos.....	17
<i>Técnica para la obtención de extractos</i>	<i>18</i>

Metabolitos Secundarios	18
<i>Flavonoides:</i>	19
<i>Cumarinas:</i>	20
<i>Saponinas</i>	20
<i>Alcaloides:</i>	21
<i>Taninos:</i>	22
<i>Glucósidos y glucósidos cardiotónicos:</i>	23
<i>Quinonas:</i>	24
<i>Triterpenos y esteroides:</i>	24
<i>Fenoles:</i>	25
<i>Carbohidratos:</i>	26
Bacterias	27
1. <i>Staphylococcus aureus</i>	28
2. <i>Enterococcus faecalis:</i>	28
3. <i>Escherichia coli</i>	29
4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
5. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	30
Actividad antibacteriana	30
Método de difusión de agar (Kirby – Bauer) en pozo modificado para determinación de actividad antibacteriana	32
Definición Operacional de Términos	33
Operacionalización de las variables	35
Hipótesis	38
CAPITULO III	39
MARCO METODOLOGICO	39
Tipo de investigación	39
Diseño de la investigación	39
Población y Muestra	40
<i>Unidad de Investigación</i>	40
<i>Selección del tamaño muestral</i>	40
Sistema de Variables	40
Procedimientos de la Investigación	40
<i>Recolección de la muestra</i>	40

<i>Obtención de los extractos crudos de la especie vegetal.....</i>	41
<i>Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de Ruellia tuberosa L.....</i>	42
<i>Preparación de los extractos crudos para la determinación de la actividad antibacteriana.....</i>	48
<i>Determinación de la actividad antibacteriana por el método de difusión de agar (Kirby – Bauer) en pozo modificado.....</i>	48
Diseño de Análisis.....	50
CAPITULO IV.....	51
RESULTADOS Y DISCUSION.....	51
<i>Resultados.....</i>	51
<i>Tamizaje fitoquímico.....</i>	51
<i>Actividad antibacteriana.....</i>	61
<i>Discusión.....</i>	62
CAPÍTULO V.....	65
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	65
<i>Conclusiones.....</i>	65
<i>Recomendaciones.....</i>	66
Bibliohemerografía.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	pág.
Tabla 1: Especies del género <i>Ruellia</i> L	14
Tabla 2: Clasificación taxonómica de <i>Ruellia tuberosa</i> L	17
Tabla 3: Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas, tallo y raíces de <i>Ruellia tuberosa</i> L. frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas	36
Tabla 4: Operacionalización de la variable independiente: Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas, tallo y raíces de <i>Ruellia tuberosa</i> L	37
Tabla 5: Protocolo para el tamizaje fitoquímico de <i>Ruellia tuberosa</i> L	43
Tabla 6: Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas, tallo y raíces de <i>Ruellia tuberosa</i> L	52
Tabla 7: Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas, tallos y raíces de <i>Ruellia tuberosa</i> L	60
Tabla 8: Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces de <i>Ruellia tuberosa</i> L	61

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	pág.
Figura 1. Distribución y hábitat de la familia Acanthaceae	13
Figura 2: Hojas, tallos y raíces de <i>Ruellia tuberosa</i> L	16
Figura 3. Distribución Geográfica de <i>Ruellia tuberosa</i> L	16
Figura 4: Estructura de la Hesperidina	19
Figura 5: Estructura de la Umbelliferona	20
Figura 6: Estructura de la digitonina.....	21
Figura 7: Estructura de la Estrictina	22
Figura 8: Estructura del ácido gálico	23
Figura 9: Estructura de la fructosa	23
Figura 10: Estructura de la <i>p</i> -benzoquinona	24
Figura 11: Estructura del β -Sitosterol.....	25
Figura 12: Estructura del colesterol.....	25
Figura 13: Estructura básica de los fenoles.	26
Figura 14: Estructura de la celulosa.....	27
Figura 15: Extractos obtenidos.	41
Figura 16: Procedimiento de la investigación.....	42
Figura 17: Extractos de hojas, tallos y raíces de <i>Ruellia tuberosa</i> L. preparados para la inoculación en la placa.....	48
Figura 18: Halos de inhibición.....	50



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



"Dr. ALFREDO NICOLÁS USUBILLAGA DEL HIERRO"

Tamizaje Fitoquímico y Evaluación de la Actividad Antibacteriana de los Extractos Etanólicos de hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L

Autor: Jesús A. Sajajú G.
Tutora: Dra. Darly Villalobos
Fecha: Julio 2019

RESUMEN

El estudio de la fitoquímica de las plantas siempre ha sido de gran interés para el ser humano, y más aún en un mundo tan cambiante como el nuestro. En esta investigación se estudiaron las propiedades de *Ruellia tuberosa* L. por tanto el objetivo que orienta este trabajo fue: Realizar el tamizaje fitoquímico y la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L. La metodología se enfocó en un tipo de investigación evaluativa, pues se determinaron los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas, tallos y raíces; en cuanto al diseño este fue de campo y laboratorio, este último con el fin de realizar los análisis respectivos en la planta. El tamizaje fitoquímico se realizó mediante pruebas cualitativas para la determinación de los metabolitos y la evaluación de la actividad antibacteriana se realizó usando el método de difusión de agar Kirby-Bauer en pozo modificado. Los resultados obtenidos revelaron en el tamizaje fitoquímico la presencia de glucósidos cardiotónicos, fenoles y carbohidratos en todos los extractos de la planta. Asimismo los extractos etanólicos de hojas y tallos resultaron positivos para esteroides, y los extractos etanólicos de hojas y raíces resultaron positivos para flavonoides. En cuanto a la actividad antibacteriana los extractos de los tallos y raíces exhibieron actividad moderada frente a *E. faecalis*.

Palabras Clave: Tamizaje Fitoquímico; Actividad Antibacteriana; Extractos Etanólicos; *Ruellia tuberosa* L

INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional está presente en todas las culturas del mundo, la cual se define como el conjunto de todos los conocimientos y prácticas usadas en la prevención, diagnóstico y eliminación de desequilibrios físicos, mentales o sociales, este conocimiento fue transmitido de generación en generación de forma oral y escrita, las plantas han sido usadas como medicina alrededor del mundo por milenios: éstas fueron la medicina original en todas las culturas y en las civilizaciones más grandes (Cruz y López, s/f).

Por tanto, el hombre desde su surgimiento creó las condiciones para vivir mejor, atenuar enfermedades y mejorar la calidad de vida. Pero no es en este siglo donde se utilizaron por primera vez las plantas con el fin de curar afecciones. El interés por la medicina tradicional, que incluye terapias con medicación basada en hierbas, se ha incrementado considerablemente, por lo que se ha tomado la decisión de ocuparse de las formas tradicionales de medicina y explorar las posibilidades de utilizarlas en la atención primaria de salud (Escalona, Tase, Estrada y Almaguer, 2015).

Pérez (2008) explica que las plantas "... contienen en algunos de sus órganos, principios activos, los cuales, administrados en dosis suficientes producen efectos curativos en las enfermedades de los hombres". También afirma que se calcula que de las 260.000 especies de plantas que se conocen en la actualidad el 10% se puede considerar medicinales, es decir que ciertos componentes de estas plantas ejercerán una acción farmacológica sobre el ser humano. Cabe destacar, que estos principios activos pueden ser sustancias simples o bien mezclas complejas.

Por otra parte, existen diversas investigaciones sobre plantas en busca de sustancias con actividad antimicrobiana que sean útiles al hombre, con el fin de inhibir las diferentes formas de resistencia que han adquirido los

microorganismos. Se ha demostrado que algunas plantas contienen principios activos con actividad antimicrobiana entre los cuales se encuentran alcaloides, esteroides, taninos, flavonoides, quinonas, terpenoides, entre otros (Suarez, 2009).

En los últimos años ha surgido un notable crecimiento del interés por los fitomedicamentos, lo que no se limita solo, a los países en desarrollo y mercados nacionales e internacionales, sino que las autoridades sanitarias y la opinión pública se han interesado por la inocuidad y la calidad de estos medicamentos. El 80 % de la población mundial, más de cuatro mil millones de personas, utiliza las plantas como principal remedio medicinal, según señala la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2004).

En función de lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo de investigación se realizó el tamizaje fitoquímico y se evaluó actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L., recolectada en la localidad de Guasdualito-Estado-Apure.

El proceso metodológico que se desarrolló consistió en la obtención de los extractos crudos de *Ruellia tuberosa* L., la ejecución del tamizaje fitoquímico y la evaluación de la actividad antibacteriana por medio del método el método de difusión de agar (Kirby – Bauer) en pozo modificado.

Este trabajo está estructurado por cinco Capítulos:

Capítulo I, El Problema: que engloba, planteamiento del problema, formulación del problema, justificación de la investigación, objetivos de la investigación, así como también alcances y limitaciones de la Investigación.

Capítulo II, Marco Teórico: que presenta, trabajos previos, bases teóricas, antecedentes históricos, definición de términos, sistema de variables, además la operacionalización de variables y el sistema de hipótesis.

Capítulo III, Marco Metodológico: que explica, enfoque de la investigación, tipo de investigación, diseño de investigación, población y muestra,

instrumento de recolección de datos, procedimientos o metodología y el diseño de análisis.

Capítulo VI, Resultados y Discusiones.

Capítulo V, Conclusiones y Recomendaciones.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

La situación de las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes en las Américas es extremadamente seria, pues existe un número elevado de enfermedades infecciosas, entre ellas merecen una mención especial, el cólera, que penetró en las Américas a través de Perú y produjo una epidemia en el país que se extendió a todos los países de la región excepto Uruguay en Sudamérica y los países del Caribe (Riverón, 2002). El cólera, a pesar de que se puede prevenir y tratar fácilmente, mata anualmente a cerca de 100.000 personas en comunidades que sufren también el azote de la pobreza y los conflictos armados (OMS, 2018).

Entre las principales enfermedades emergentes y reemergentes que son actualmente motivo de alarma en la región figuran la enfermedad de Lyme, la diarrea por criptosporidiosis y la afección causada por *Escherichia coli* en los Estados Unidos; el dengue y la fiebre amarilla en el Brasil; la malaria farmacorresistente por *Plasmodium falciparum* en algunas zonas de la cuenca amazónica y las infecciones por hantavirus en el Cono Sur. También es de gran preocupación la resistencia generalizada de varias especies bacterianas a los antibióticos, como en el caso del agente causal de la tuberculosis (Panam, 2000).

La fármacoresistencia de algunos microorganismos, que en determinados casos se intensifica paulatinamente, menoscaba gravemente la lucha contra enfermedades, que ocasionan, 10 millones de defunciones anuales en el mundo. El uso irracional o inapropiado de los antibióticos ha sido el factor determinante en el surgimiento de cepas bacterianas resistentes (Panam, 2000). Las bacterias resistentes más frecuentes son *Escherichia coli*,

Klebsiella pneumoniae, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, seguidas de *Salmonella* spp. (Lindmeier, 2018).

Hoy los científicos, quienes presentan demora a la hora de elaborar medicamentos alternos para reemplazar a los que han perdido eficacia, están buscando un nuevo logro, probando microbios en fuentes tan diversas como tierra, cuevas y sangre del dragón de Komodo. Pero a pesar de estos extraordinarios avances, nos estamos quedando sin antibióticos efectivos. Las bacterias letales resistentes a la penicilina o a los más de 100 antibióticos diferentes que se han desarrollado, ya están matando a unas personas cada año. Si no se combate, la cifra global podría aumentar a 10 millones al año para 2050 (Jinks, Lee, Sharland, Rex, Gertler, Diver y Farrar, 2016).

El hombre sigue buscando en la flora de su habitat compuestos naturales de forma empírica que ayuden con sus aflicciones, todo esto por sus conocimientos ancestrales y que en la actualidad la explotación de la misma continua, ya que existe un numeroso grupo de plantas sin explorar lo que genera un recurso bastante importante en cuanto a principios activos y la utilidad de los mismos. Dadas las complicaciones mundiales que están teniendo los productos sintéticos medicinales, por las reacciones adversas que provocan en los pacientes, sumado a la contaminación que genera su fabricación, el personal de la salud acude cada vez con más frecuencia a los productos naturales para enfrentar los problemas que requiere el combate de las enfermedades que atacan a las diferentes poblaciones del mundo (Guerra, Cabrera, Sánchez y Almeida, 2011).

Petunia silvestre (*Ruellia tuberosa* L.), cracker plant en inglés, es una planta silvestre muy vistosa y abundante. Florece profusamente durante casi todo el año, y como se reproduce con facilidad por medio de semillas, llega a formar macizos naturales muy hermosos con flores de varios tonos violáceos.

Esta pequeña y maravillosa planta también posee numerosas propiedades medicinales en sus hojas y raíces, tales como antiinflamatoria, antibiótico natural, previene problemas de próstata y se bebe como infusión para la diabetes (Telma, 2011). Es llamada comúnmente, además de yuquilla, raíz de Barreto, oreja de ratón, peonilla, escopetilla, explota-plota y se puede decir que la llaman más o menos de otras treinta maneras.

El uso tradicional de las plantas por comunidades indígenas, tiene una validez indudable toda vez que el conocimiento se ha transmitido de generación en generación sin influencias externas. Pero en la actualidad, con el incremento en las comunicaciones, vialidad e intercambio cultural, tenemos el deber de validar los usos tradicionales urbanos, mediante el análisis profundo de la composición química de la planta, su actividad biológica, su posible toxicidad, sin olvidar la correcta identificación de la planta (Ciangherotti, Maldonado, Orsini, Perdomo, Álvarez, Salazar e Israel, 2013).

www.bdigital.ula.ve

En función de lo descrito anteriormente, en este trabajo de investigación se pretende aportar y ampliar un poco más la información que tenemos sobre las plantas medicinales, específicamente sobre *Ruellia tuberosa* L., por ejemplo: Carlos Ciangherotti y cols, (2013), Farmacéutico y PhD en Farmacología nos comparte información de *Ruellia tuberosa* L. enfocada en la raíz de la planta, mientras que por otra parte los Doctores: Carlos Enrique Beltrán Villanueva, Dr. Fredyc Díaz Castillo, Dr. Harold Gómez Estrada (2013) realizaron sus estudios sobre las hojas de la planta. Sin duda alguna la planta posee compuestos activos en diferentes partes, pero los beneficios serían más amplios si incluyeran en estas investigaciones el tallo; para lo cual es recomendable el tamizaje fitoquímico, como una herramienta en la investigación del tipo de metabolitos secundarios que se encuentran en la planta.

En esta investigación se evaluó la actividad antibacteriana y se determinó la composición química de las hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L. recolectadas en la localidad de Guasualito en el Estado Apure – Venezuela.

Justificación de la investigación

El estudio de la fitoquímica de las plantas siempre ha sido de gran interés para el ser humano, y más aún en un mundo tan cambiante como el nuestro, si se hace una revisión bibliográfica encontramos registros de plantas con propiedades medicinales o mejor dicho con principios activos desde antes de cristo. Sin embargo, hoy día *Ruellia tuberosa* L. es una planta muy conocida no solo por su parte ornamental, sino por sus propiedades medicinales para diferentes patologías que pueda padecer el ser humano (Ciangherotti y cols, 2013).

En virtud de lo antes planteado, la presente investigación se justifica porque se realizara el tamizaje fitoquímico y se evaluara la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L., puesto que en los antecedentes encontrados se realiza actividad antibacteriana con extractos de otros alcoholes solamente en hojas y raíces.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, esta investigación se justifica desde dos perspectivas (teórica y metodológica). Desde la perspectiva teórica, la investigación permitirá corroborar teorías sobre el tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana sobre *Ruellia tuberosa* L., las cuales servirán para otras investigaciones y para aportar solución a los problemas bacteriológicos y posibles usos medicinales a partir de los datos que se presenten. En el mismo orden de ideas, metodológicamente, el diseño empleado para obtener los datos sobre el problema en estudio, servirá de

base para futuras investigaciones no solo para el estudio de plantas sino en otras áreas investigativas especialmente en el área de la medicina.

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Realizar el tamizaje fitoquímico y evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L. recolectada en la población de Guasualito, del Estado Apure - Venezuela, en el Instituto de Investigaciones Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde enero 2019 hasta junio 2019.

www.bdigital.ula.ve

Objetivos específicos

- Determinar cuantitativamente por medio del tamizaje fitoquímico la presencia de metabolitos secundarios en *Ruellia tuberosa* L.
- Evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas, tallos y raíces por medio del método de difusión de agar Kirby-Bauer en pozo modificado.

Alcances y Limitaciones

Alcances

Hernández, Fernández y Baptista (2014), plantean que “el alcance de una investigación no se debe pensar en una tipología, ya que más que una clasificación, lo único que indica dicho alcance es el resultado que se espera obtener del estudio”. (p. 85). En tal sentido, se presenta un alcance descriptivo puesto que se pretende determinar los metabolitos secundarios que posee *Ruellia tuberosa* L. así como también evaluar la actividad antibacteriana de los mismos. Tales alcances se obtuvieron desde enero hasta junio 2019.

Limitaciones

Hernández y cols, (2014) señalaron que las limitaciones de una investigación pueden ser técnicas, teóricas y de recursos económicos. Para esta investigación una de las limitantes es la escasa información sobre las propiedades antibacterianas y tamizaje fitoquímico de la *Ruellia tuberosa* L., puesto que son muy pocas las investigaciones que se han realizado sobre ella. Por otro lado, como factor externo a la investigación resultó una limitante, los problemas de cortes de energía eléctrica en el país, lo cual dificultó la culminación de la fase experimental con los extractos etanólicos de la planta y darle fin a la parte escrita de dicha investigación.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

TRABAJOS PREVIOS

Ciangherotti, C., Cegarra, J., Usubillaga, A., Rodríguez, M., Bermúdez, J., Mata, R. & Israel, A. (2016) presentaron un trabajo titulado: Evaluación fitoquímica preliminar y actividad hipoglicemiante aguda del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. en ratas con diabetes experimental. El objetivo de este trabajo fue evaluar el perfil fitoquímico preliminar y el contenido de polifenoles totales del extracto de *Ruellia tuberosa* L., así como también sus efectos agudos sobre la glicemia en ratas diabéticas. El análisis fitoquímico preliminar fue realizado tanto por cromatografía de capa fina (TLC) como por reacciones en solución. El análisis fitoquímico del *Ruellia tuberosa* L. mostró la posible presencia de flavonoides en TLC y en la prueba con solución de amonio. También se observó la presencia de compuestos fenólicos en TLC. Las soluciones acuosas de *Ruellia tuberosa* L. no produjeron espuma por lo que descartaron la presencia de saponinas. Asimismo, no fue determinada la presencia de terpenos, glicósidos cardíacos, alcaloides, taninos, resinas, antraquinonas y estilbenos. Concluyeron que el extracto de la raíz tiene un importante contenido de compuestos fenólicos que se acerca a la validación del uso tradicional de la planta.

Por otro lado, Samy, M., Sugimoto, S., Matsunami, K., Otsuka, H. & Kamel, M. (2015) reportan en el género *Ruellia* la presencia de flavonoides, lignanos, glicósidos fenólicos, megastigmano glicósidos y esteroides. De *Ruellia tuberosa* L. se han aislado: β -sitosterol, estigmasterol, campesterol, lupeol, betulinol, alcaloides (indol-3-carboxialdehído), flavonoides (apigenin-

7-O-glucosido), ligninas (ligniresinol-3 α -O- β -D-glucopiranosido) y fenoles (siringina). Así mismo, informan sobre las múltiples actividades farmacológicas y biológicas del género *Ruellia*, tales como curaciones de heridas, efectos cardiotónicos, antihiper glucémicos, antioxidantes, antimicrobianos, antibacterianas, anticancerígeno, antinociceptivo, antiinflamatorio, citotóxico y gastroprotectores.

De la misma forma el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *R. tuberosa* L. resultó positivo para taninos, flavonoides, saponinas, triterpenos/esteroides y quinonas (Beltrán y cols, 2013).

Con respecto a la actividad antibacteriana de *R. tuberosa* L. se encontró que a través del método de difusión en disco el extracto acuoso de toda la planta a una concentración de 100 mg/mL inhibió el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus spp*, *Serratia spp*, *Bacillus spp* y *Shigella sonnei* (Arirudran, Saraswathy y Krishnamurthy, 2011). Así mismo, el extracto metanólico de la raíz de *R. tuberosa* L. a una concentración de 25 μ g/ μ l presentó buena actividad frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Kader, Parvin, Chowduri y Haque, 2012).

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Al hacer revisión bibliográfica se encuentran diferencias entre los múltiples textos históricos sobre el origen de la curación por medio de plantas. La verdad es que entre los primeros pobladores que se beneficiaron con las plantas están los asiáticos, por ejemplo China. Más tarde, lo hicieron los pueblos egipcios y hebreos, así como griegos y romanos. Las primeras descripciones de plantas medicinales surgen en los trabajos de Hipócrates, Teofrasto, Galeno y Celso, entre otros (Martínez, 2005).

Entre los tantos usos terapéuticos que se le han atribuido a las plantas, tenemos la manera de combatir gérmenes capaces de dar origen a diversas enfermedades Borghi (2012), cita a Kilham Chris, de Medicine Hunte, quien plantea que las plantas pueden ayudar a combatir los gérmenes de dos maneras: uno, pueden reforzar el sistema inmunológico. Y dos, algunas hierbas pueden incluso matar a los gérmenes de forma absoluta.

Desde el descubrimiento de los primeros antibióticos, los microorganismos han sido capaces de evadir su acción; es por esta razón que la salud se ve afectada negativamente, pues las bacterias se vuelven resistentes a los antibióticos. Los gérmenes también evolucionan, aparecen nuevos y antiguos microbios resistentes a los antibióticos. Durante los 4 millones de prehistoria las infecciones humanas fueron infrecuentes porque el hombre primitivo (hace 10.000 años) vivía aislado y sin animales cerca, lo que evitaba la diseminación de las infecciones. Las poblaciones crecieron y domesticaron animales favoreciendo la aparición de epidemias, con la colaboración de la falta de higiene y reducción en la inmunocompetencia por dietas hipocalóricas e hipoproteicas, así, las infecciones se convirtieron en limitantes del tamaño poblacional, permitiendo las diseminaciones de tifoidea, cólera, lepra, influenza, tuberculosis, entre otros (Cabrera, Gómez y Zuñigan, 2007).

Uno de los primeros reportes sobre *Ruellia tuberosa* L. data de 1986, donde Urtiaga en el libro Índice de enfermedades en plantas de Venezuela y Cuba, le atribuye propiedades diuréticas, purgantes y eméticas, mientras que sus raíces eran utilizadas para combatir fiebres, tos ferina, neumonía y peritonitis.

BASES TEÓRICAS

Aspectos generales de la familia Acanthaceae

Características botánicas

La familia Acanthaceae en Venezuela se encuentra representada por plantas generalmente herbáceas, anuales o perennes, algunas lianas, a veces arbustivas, raro árboles. Sus tallos herbáceos o leñosos geniculados erectos a veces volubles, glabros o pubescentes, cilíndricos y angulosos. Sus hojas son opuestas y decusadas, simples y exestipuladas. Sus flores son perfectas desde actinomorfas hasta zigomorfas, generalmente bracteadas y con bractéolas, a veces de vivos colores. Flores aisladas o en racimos, espigas o en racimos de cimas. Su cáliz persistente, y su fruto una cápsula loculicida (drupa en algunos géneros), a menudo dedehiscencia elástica, con valvas que se arquean y con jaculadores (retináculos) (Hokche, Berry y Huber, 2008).

Distribución geográfica

Principalmente nativas de los trópicos, aunque algunas se extienden a las regiones templadas. Los grandes centros de dispersión son Indomalasia, África, Brasil y América central (Figura 1).

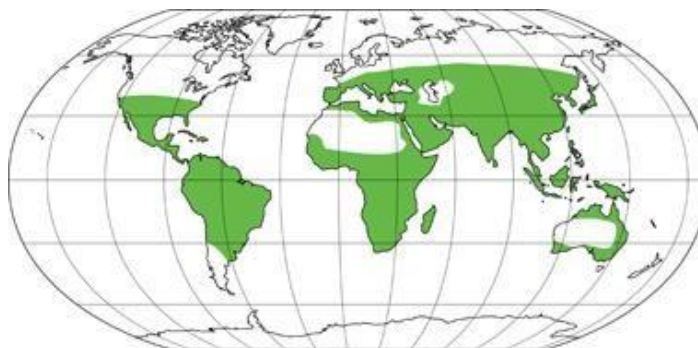


Figura 1. Distribución y hábitat de la familia Acanthaceae.

Fuente: «Laboratorio de sistemática de plantas vasculares» Por M. Bonifacino, M. Rosado, y A. Souza, 2017, Uruguay.

Género *Ruellia*

Ruellia es un género de plantas con flores que pertenece a la familia Acanthaceae. Son hierbas perennes o arbustos. Con hojas elípticas, ovadas, ovado-lanceoladas, obovadas u oblongo-espátuladas, ápice acuminado u obtuso, base atenuada o aguda, los márgenes enteros, undulados, crenados o dentados. Inflorescencias de varias formas, terminales o axilares, o las flores solitarias, éstas frecuentemente grandes y vistosas, regulares, a veces curvadas, pediceladas o sésiles; corola generalmente infundibuliforme, azulada, blanca, amarilla o roja, el tubo generalmente angosto y la porción ensanchada frecuentemente campanulada. Sus frutos pueden ser claviformes, elípticos o cilíndricos (Hokche y cols, 2008).

A continuación se presentan las especies del género *Ruellia* L. en Venezuela.

Tabla 1: Especies del género *Ruellia* L.

<i>R. asema</i>	<i>R. macrophylla</i>
<i>R. bolivarensis</i>	<i>R. malaca</i>
<i>R. brittoniana</i>	<i>R. menthoides</i>
<i>R. carmenaemiliae</i>	<i>R. paniculata</i>
<i>R. ciliatiflora</i>	<i>R. pterocaulon</i>
<i>R. delascioi</i>	<i>R. pulverulenta</i>
<i>R. erythropus</i>	<i>R. saeri</i>
<i>R. exostemma</i>	<i>R. salmenoresis</i>
<i>R. fulgida</i>	<i>R. sprucei</i>
<i>R. geminiflora</i>	<i>R. steyermarkii</i>
<i>R. humboldtiana</i>	<i>R. tuberosa</i>
<i>R. inundata</i>	<i>R. tubiflora</i>
<i>R. liesneri</i>	<i>R. wurdackii</i>

Fuente: Hokche y cols, 2008.

***Ruellia tuberosa* L.**

Características botánicas

La *Ruellia tuberosa* L. es una especie de planta herbácea perteneciente a la familia Acanthaceae, originaria de Jamaica, que se conoce en Venezuela con el nombre de yuquilla, en alusión a sus raíces fibrosas, que semejan en pequeña escala al conocido tubérculo.

Sus flores son de color azul-morado, con cinco lóbulos redondeados, que suelen engalanar a esta hierba durante casi todo el año (Figura 2). Su fruto es una capsula de unos 20 milímetros de longitud, con más de 20 semillas, que explotan cuando estas están en contacto con la humedad, crece en forma silvestre en matorrales xerofíticos con poca lluvia, en todo el Caribe, México, América Central y América del sur (Guyana, Surinam, Venezuela, Colombia, Perú). También se encuentra en sudeste de Asia, África, India y Pakistán (Ciangherotti y cols, 2013).

El género *Ruellia* L. comprende alrededor de 150 especies nativas del trópico y templado Norte y Sur de América. En Venezuela existen 26 especies del género (Cabrera, 2005).

Su nombre científico viene de: el género *Ruellia* L., que fue nombrado en honor de Jean Ruelle, herborista y médico de Francisco I de Francia y traductor de varios trabajos de Dioscórides y su especie *tuberosa* es un epíteto latino que significa "tubular". Se conoce vulgarmente como:

- Yuca de puerco (Islas de Provincia y Santa Catalina – Colombia)
- Triquitraque (Mariquita - Colombia)
- Copia lilo (Santa Marta- Colombia)
- Wild cassava (Islas de Provincia y Santa Catalina - Colombia).
- Yuquilla - Explota – explota (Apure – Venezuela) (Cabrera, 2005).



Figura 2: Hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L.

Fuente: Autor

Distribución geográfica en Venezuela de Ruellia tuberosa L.

Este tipo de plantas es más frecuentes en hábitat cálidos; en Venezuela se encuentra a lo largo de todo el territorio nacional, como se muestra en la Figura 3 (Amazonas, Anzoátegui, Apure, Aragua, Bolívar, Carabobo, Delta-Amacuro, Distrito-Federal, Falcón, Guárico, Lara, Mérida, Miranda, Monagas, Nueva Esparta, Portuguesa, Sucre, Táchira, Trujillo y Zulia) (Hokche y cols, 2008).

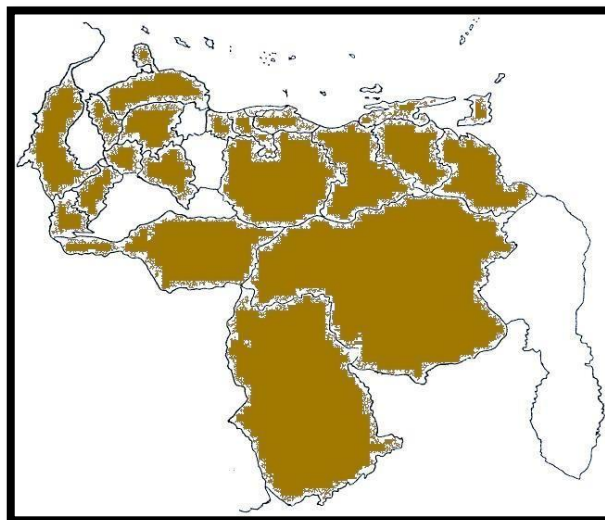


Figura 3. Distribución Geográfica de *Ruellia tuberosa* L.

Fuente: Autor

Clasificación taxonómica

Tabla 2: Clasificación taxonómica de *Ruellia tuberosa* L.

División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Acanthaceae
Genero	<i>Ruellia</i> L.
Especie	<i>Ruellia tuberosa</i> L.

Fuente: «Nuevo catálogo de la flora vascular de Venezuela» por Hokche y cols, 2008. Venezuela.

Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de cambios de color y aparición de precipitados. Este tiene como propósito la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y debe de interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico (Palacios, s/f).

Extractos

Son preparaciones concentradas de consistencia líquida, sólida o intermedias, obtenidas de materia vegetal o animal. Se prepara bien sea por maceración, percolación u otros métodos con el uso de etanol u otros solventes (Barbé, 2001).

Técnica para la obtención de extractos

Para Barbé (2001), la obtención de los extractos puede realizarse por:

- ***Percolación:*** para ello, debe reducirse la materia a fragmentos de tamaño adecuado, debe mezclarse a fondo con una parte del disolvente elegido y dejarse en reposo durante un tiempo determinado. Posteriormente es llevado a un percolador y finalmente el residuo puede prensarse y el líquido exprimido puede reunirse con el percolado.
- ***Maceración:*** consiste en mezclar a fondo con el disolvente extractivo, dejar reposar en un envase cerrado durante algún tiempo determinado, luego se separa el residuo del líquido extractivo. La concentración de los extractos se realizara generalmente a baja presión y a una temperatura adecuada.

www.bdigital.ula.ve ***Metabolitos Secundarios***

Son moléculas orgánicas que no cumplen ningún rol fisiológico en los vegetales en su crecimiento y el desarrollo, aunque en los últimos tiempos se ha considerado el hecho de que si cumplen alguna función en la planta, por ejemplo: protección frente a la agresión de algunos microorganismos. Generalmente se encuentran en cantidades relativamente pequeñas y su producción puede ser extendida o restringida a familias, géneros, o especies particulares (Palacios, 2013).

La clasificación de los metabolitos secundarios puede hacerse de acuerdo con su estructura, a su bioformación, a la fuente de producción o a su acción biológica. Aparentemente, el criterio más acertado es aquel que usa la biosíntesis como denominador común, la cual en su esquema básico, engloba la formación de los metabolitos primarios y secundarios (Marcano, 2002).

A continuación, se describen los metabolitos secundarios, que con mayor frecuencia se pueden encontrar en las plantas:

Flavonoides:

Los flavonoides sin ser metabolitos primarios, se encuentran casi en cualquier vegetal superior, hay más de 8000 compuestos conocidos de plantas vasculares mientras que en los vegetales inferiores: algas, hongos, bacterias los compuestos fenólicos principales son quinonas y xantonas y a estos deben su color, por ello se habla que la función de los flavonoides en las plantas son variadas, es decir, le aportan pigmentación a las flores. En cuanto a la actividad de los flavonoides en las plantas se encuentra los antioxidantes, antiinflamatorios y de secuestradores de radicales libres, agentes antimicrobiales y antinutricionales, fotoreceptores y protectores contra la luz UV, agentes quelantes de metales, atractores visuales para los insectos, entre otros (Castillo y Medina, 2013).

La hesperidina es un flavonoide que forma parte de los cítricos y se localiza especialmente en la parte blanca que rodea la pulpa de estas frutas (Castillo y Medina, 2013). Ilustramos su estructura química en la Figura 4:

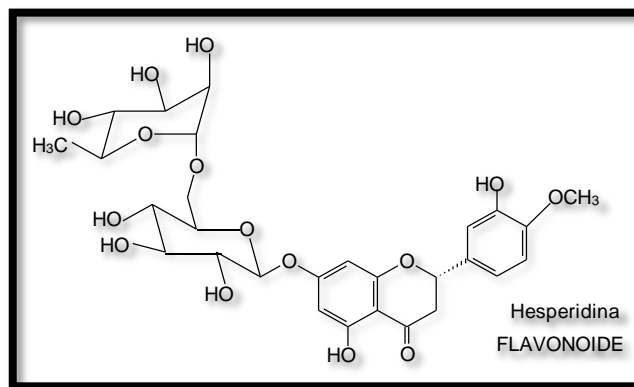


Figura 4: Estructura de la Hesperidina.

Fuente: Autor

Cumarinas:

Las α -pironas que se generan por la lactonización del ácido *o*-cumárico se conocen como cumarinas y están ampliamente distribuidas en el reino vegetal.

Las cumarinas se encuentran en su mayoría oxigenadas en C-7, por ejemplo umbelliferona, muy frecuente en las plantas de la familia Umbellíferas. La umbelliferona absorbe fuertemente la radiación ultravioleta en varias longitudes de onda y se utiliza en filtros solares (Pérez, 2008). Su estructura se muestra en la Figura 5.

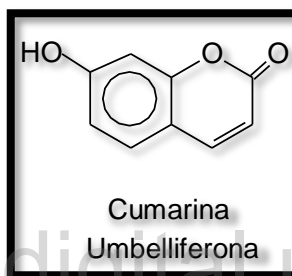


Figura 5: Estructura de la Umbelliferona.

Fuente: Autor

Saponinas:

Se llaman saponinas a un grupo de sustancias glicósidas que se disuelven en agua y poseen propiedad de formar espuma al agitar la solución. Por hidrólisis (ácida, microbiológica o enzimática) de una saponina se obtienen carbohidratos y una aglicona: "sapogenina", la cual estructuralmente puede ser de tipo esteroidal (C-27) o triterpenoidal (C-30). Estos compuestos se aíslan de diferentes fuentes vegetales directa (Gunsha, 2013).

En general, las esteroidales, menos numerosas que las triterpenoidales conocidas, son más importantes como materia prima para la fabricación de hormonas sintéticas, mientras que las triterpenoidales son potencialmente más aplicables en forma directa (Gunsha, 2013). Un ejemplo de una

saponina es la digitonina (Figura 6) la cual es aislada de las semillas de *Digitalis purpurea*.

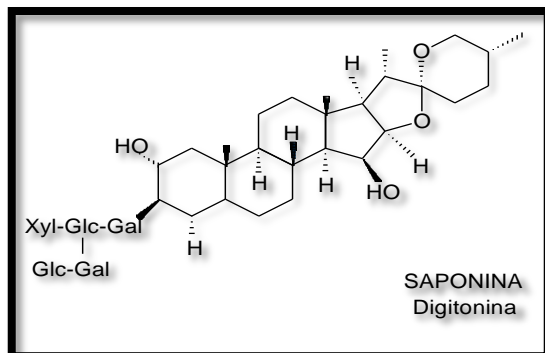


Figura 6: Estructura de la digitonina.

Fuente: Autor

Alcaloides:

Son bases orgánicas que se aíslan principalmente de las plantas superiores, son casi siempre incoloros excepto la berberina que es amarilla y la sanguinarina que es roja, sólidos cristalinos en su mayoría, ópticamente activos, generalmente levorrotatorios como la quinina y cinchonidina o dextrorrotatorios como la cinchonina y laudanosina, y el nitrógeno, que debe estar presente para que una molécula sea catalogada como alcaloide, forma parte de uno o varios ciclos (Marcano y Hasegawa, 2002).

Su actividad, principalmente a nivel de sistema nervioso, fue el motor de las primeras investigaciones en productos naturales. Algunos alcaloides se han manifestado como altamente tóxicos, y otros en dosis apropiadas, son drogas comúnmente usadas en medicina, por ejemplo, la morfina (Marcano y Hasegawa, 2002).

Los alcaloides constituyen el grupo más grande de metabolitos secundarios de plantas. Se encuentran en las semillas, raíces, cortezas y hojas; en estado libre o como glicósidos o formando sales con ácidos orgánicos. Un ejemplo es la estricnina (Figura 7), es uno de los alcaloides más enérgicos, se extrae de diversas plantas del género *Strychnos*, entre

ellas el haba de San Ignacio y de la nuez vómica. Es de sabor amargo muy intenso y muy tóxico, su ingestión produce convulsiones tetánicas (Castillo y Medina, 2013).



Figura 7: Estructura de la Estricnina.
Fuente: Autor

Taninos:

Los taninos son polímeros polifenólicos solubles en agua, de alto peso molecular. La presencia de un gran número de grupos hidroxilo fenólicos les brinda la capacidad de formar complejos principalmente con las proteínas y en menor medida con iones metal, aminoácidos y polisacáridos. Se pueden encontrar en arbustos y árboles forrajeros, leguminosas, frutas, cereales y granos. Los taninos se dividen en dos grupos: hidrolizables (TH) y condensados (TC) (Vélez, Campos y Sánchez, 2014).

Los taninos han recibido gran atención porque permiten modificar la composición de ácidos grasos en los productos provenientes de los rumiantes (carne o leche) (Vélez y cols, 2014). Como ejemplo de taninos, tenemos el ácido gálico el cual es usado en la industria farmacéutica como patrón para determinar el contenido de fenoles mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu. A continuación su estructura química (Figura 8).

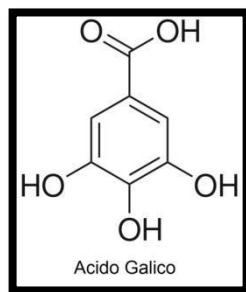


Figura 8: Estructura del ácido gálico.
Fuente: Autor

Glucósidos y glucósidos cardiotónicos:

Son condensaciones de aldosas o cetosas cíclicas, donde el hidrogeno del OH es reemplazado por un grupo alquilo o arilo. La hidrólisis completa de los glucósidos generalmente son monosacáridos tales como glucosa, fructosa (Figura 9), manosa y galactosa (Albornoz, 1980).

Los agentes cardiotónicos y sus principios activos son glucósidos esteroidales. Estos se clasifican en dos categorías, dependiendo del anillo lactónico en sus agliconas: cardenólidos, una lactona de cinco miembros, y bufanólidos, una lactona de seis miembros. Los primeros se encuentran siempre en plantas como glicósidos pero los segundos se presentan tanto en animales (sapos) como en vegetales (Castillo y Medina, 2013).

Las drogas que contienen glicósidos esteroidales afectan específicamente al dinamismo y ritmo de la insuficiencia cardiaca (Castillo y Medina, 2013).

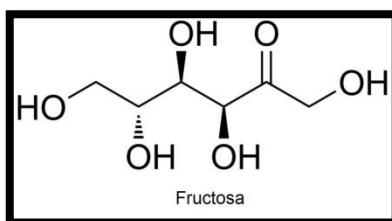


Figura 9: Estructura de la fructosa
Fuente: Autor

Quinonas:

Las quinonas son dicetonas cíclicas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles siendo reversible esta reacción. Las quinonas derivan su nombre del miembro más simple de la serie *p*-benzoquinona (Figura 10) (Castillo y Medina, 2013).

Las quinonas constituyen un grupo importante de pigmentos vegetales y animales. Su coloración es desde amarillo pálido hasta casi negro, generalmente lo encontramos en la corteza de las plantas. Pero contribuyen muy poco en el color de la planta y generalmente se encuentran en estado libre (Castillo y Medina, 2013).

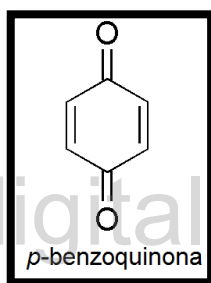


Figura 10: Estructura de la *p*-benzoquinona.

Fuente: Autor

Triterpenos y esteroides:

Son terpenos compuestos de 30 carbonos, generalmente son generados por unión cabeza-cabeza por dos cadenas de 15 carbonos, cada una de estas formado por unidades de isopreno unidas cabeza-cola, en total formado por 6 unidades de isopreno. Su estructura es generalmente tetracíclicos y pentacíclicos, estas pueden contener grupos cetónicos, hidroxilo y ácido carboxílico. Un ejemplo de triterpenos es el β -Sitosterol, que se muestra en la Figura 11 (Castillo y Medina, 2013).

Los triterpenos han sido estudiados rigurosamente debido en parte, a su relación con los esteroides, los cuales han llamado poderosamente la

atención desde hace tres cuartos de siglo. Los triterpenos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza tanto en el reino vegetal como en el reino animal (Castillo y Medina, 2013).

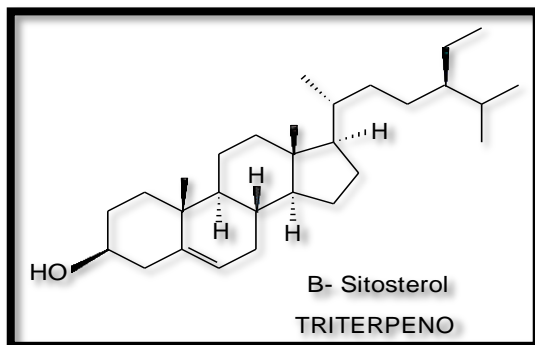


Figura 11: Estructura del β -Sitosterol

Fuente: Autor

Los esteroides son derivados del núcleo del ciclopanoperhidrofenantreno o esterano, que se compone de carbono e hidrógeno formando cuatro anillos fusionados, tres hexagonales y uno pentagonal. Como ejemplo está el colesterol, que se muestra en la Figura 12 (Castillo y Medina, 2013).

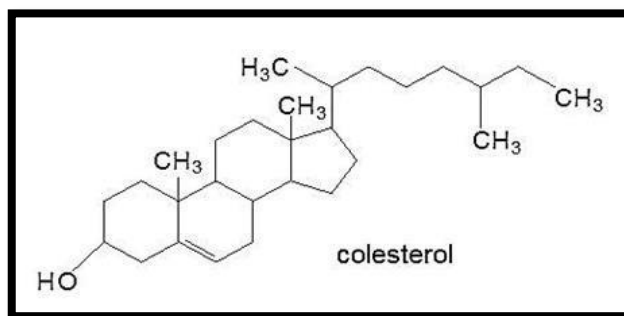


Figura 12: Estructura del colesterol.

Fuente: Autor

Fenoles:

Los compuestos fenólicos se refieren a un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilo y que ocurren frecuentemente como glicósidos, combinados con unidades de

azúcar. La estructura base de un compuesto fenólico se muestra en la Figura 13 (Castillo y Medina, 2013).

Son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua, pueden ser detectados por el intenso color verde, púrpura, azul o negro, que producen cuando se les agrega una solución acuosa o alcohólica al 1% de cloruro férrico. Su naturaleza aromática les permite que tengan una intensa absorción en la región UV del espectro siendo este método muy importante para su identificación (Castillo y Medina, 2013).

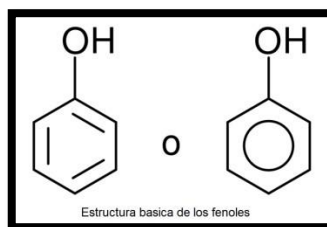


Figura 13: Estructura básica de los fenoles.

Fuente: Autor

Carbohidratos:

Forman un grupo de compuestos que contienen carbono (C), hidrógeno (H) y oxígeno (O). Son los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza. Las plantas verdes y las bacterias fotosintetizadoras los producen en el proceso conocido como fotosíntesis, durante el cual absorben el dióxido de carbono del aire y, por acción de la energía solar, producen glucosa y otros compuestos químicos necesarios para que los organismos sobrevivan y crezcan. De los glúcidos más sencillos, *monosacáridos*, el más importante es la *glucosa*. Dos monosacáridos unidos producen un "*disacárido*", cuyo ejemplo más importante encontramos en la sacarosa, la lactosa y la maltosa. Los *polisacáridos* son enormes moléculas formadas por uno o varios tipos de unidades de monosacáridos (González y Raisman, 2004).

En los organismos vivos los hidratos de carbono tienen funciones estructurales y de almacenamiento de energía. En la función estructural tenemos como ejemplo: la *celulosa* que es el principal glúcido estructural en las plantas, hasta un 40% en las paredes celulares (Figura 14), mientras que en los animales invertebrados el polisacárido *quitina* es un componente básico del exoesqueleto de los artrópodos y en los cordados las capas celulares de los tejidos conectivos contienen hidratos de carbono. Entre los glúcidos de almacenamiento de energía las plantas usan al almidón y los animales al glucógeno; (cuando se necesita la energía, las enzimas los descomponen en glucosa) (González y Raisman, 2004).

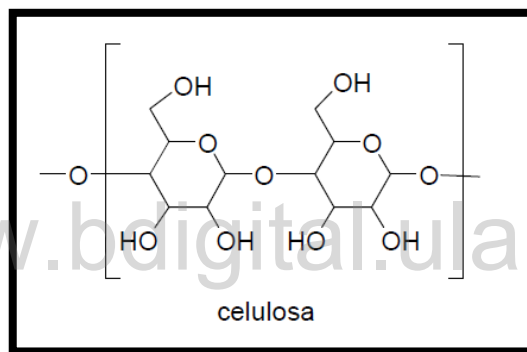


Figura 14: Estructura de la celulosa.

Fuente: Autor

Bacterias

Las bacterias son microorganismos unicelulares de tipo procariótico, es decir, son organismos que solo se pueden observar al microscopio, constituidos por una sola célula autónoma que además no tiene membrana nuclear. Las bacterias pueden ser alargadas (bacilos), esféricas (cocos) o en forma espiral (espirilos). Se pueden asociar en grupos; cuando se agrupan por parejas se llaman diplococos, cuando forman cadenas bacterianas se llaman estreptococos y cuando se agrupan en racimos se llaman

estafilococos. A continuación se describe cinco tipos de bacterias (Castro, 2014).

1. *Staphylococcus aureus*

Los *Staphylococcus* son bacterias aeróbicas presentes en el medio ambiente y en la flora normal de humanos y animales. Son cocos Gram positivos que crecen como racimo de uvas y se diferencian de los estreptococos por ser catalasa positivo. Las especies se clasifican en *Staphylococcus aureus* que son coagulasa positivos y *Staphylococcus Epidermidis* y *Saprophyticus* que son coagulasa negativo (Arteaga y Arteaga, 2005).

Los *S. aureus* son causa común de infecciones piógenas en piel y otros padecimientos como osteomielitis, artritis séptica, infecciones profundas, abscesos, neumonía, empiema, endocarditis, pericarditis, meningitis y enfermedades mediadas por sus toxinas incluyendo intoxicación alimenticia, fiebre escarlatina, síndrome de piel escaldada y síndrome de choque tóxico (Arteaga y Arteaga, 2005).

2. *Enterococcus faecalis*:

Los *Enterococcus* son cocos Gram-positivo, encontrados solos, en pares o formando cadenas y eventualmente pueden tener una morfología cocobacilos. Son anaerobios facultativos y tienen un rango óptimo de crecimiento entre 30 y 35 °C. Todas las especies crecen en caldos con 6,5% de NaCl e hidrolizan la esculina en la presencia de sales biliares. Son organismos catalasa negativa, pero en algunas oportunidades pueden ser catalasa positiva y el ácido láctico es el producto final de la fermentación de la glucosa (Herrera, Vargas y Campos, 1998).

Las bacterias del género *Enterococcus* han adquirido un papel relevante en las dos últimas décadas, principalmente debido al aumento del número de

casos intrahospitalarios, representando en la actualidad la tercera causa de infección nosocomial. La incidencia anual aproximada de bacteriemia por *E. faecalis* es de uno a dos episodios por cada 1.000 pacientes hospitalizados. Su prevalencia como patógeno nosocomial ha aumentado debido a la selección de estos microorganismos en relación con el uso de antibióticos de amplio espectro sin actividad frente a enterococos, al incremento de procedimientos terapéuticos y de monitorización invasivos en pacientes graves y al aumento del número de pacientes inmunocomprometidos, fundamentalmente neutropénicos (Herrera y cols, 1998).

3. *Escherichia coli*

Son bacilos Gram-negativos poco exigentes en sus necesidades nutritivas y relativamente resistentes a los agentes externos. La bacteria se presenta como bastones Gram-negativos, son pequeños, oblongos, finos; se mueven por medio de flagelos periticos, algunas cepas pueden tener cápsulas y ser inmóviles. Se estima un periodo de incubación de 12 a 60 horas, siendo la media de 48 horas. Causa principalmente colitis hemorrágicas que afectan a cualquier grupo de edad, pero las tasas de infección son máximas en niños menores de cinco años y van decreciendo con la edad. La sintomatología son calambres abdominales seguidos de diarreas acuosas y sanguinolentas (López y Guevara, 2002).

4. *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es un bacilo Gram-negativo, aerobio obligado, móvil, con forma de bastón y con un solo flagelo. Posee una membrana citoplasmática interna y una celular externa. Entre ambas se encuentra el espacio periplásmico que contiene peptidoglicano.

Para demostrar la existencia de *P. aeruginosa* en infecciones del aparato

respiratorio inferior pueden utilizarse diversas técnicas, como: muestra de esputo, aspiración traslaríngea-trastraqueal, broncoscopia y lavado broncoalveolar. Los cultivos de sangre deberán tomarse siempre durante la fase aguda de la neumonía. También existen pruebas de detección directa rápida con anticuerpos fluorescentes para identificar antígenos en improntas, extendidos y secciones de tejidos (Farías, Medina y Chavarría, 2005).

5. *Klebsiella pneumoniae*

Es una bacteria Gram-negativa. Poseen una cápsula prominente que da un aspecto mucoso a las colonias aisladas. Producen neumonía lobular primaria adquirida en la comunidad e infecciones de heridas y del aparato urinario (Murray, Rosenthal y Phaller, 2009).

Actividad antibacteriana

Una sustancia antibacteriana se define como la capacidad de un producto (antibiótico) de lograr su efecto y se basa en la medición de un algún atributo del producto por ejemplo, su efecto inhibitorio ante un microorganismo (halos de inhibición él cual se determina normalmente por métodos de análisis microbiológicos) (Pedraza y Castellanos, 2009).

La actividad de un antibiótico puede ser demostrada mediante un efecto inhibitorio de las sustancias en cuestión cuando es evaluado frente a un microorganismo. En un análisis, se compara cuantitativamente el efecto de una muestra sobre un sistema biológico con el efecto producido por una preparación estándar en las mismas condiciones y para la cual ya se ha determinado exactamente su actividad obteniendo así un valor estándar de referencia. Si se prueban las muestras en diferentes concentraciones se puede determinar una concentración mínima inhibitoria, mínima del antibiótico hacia ese microorganismo (Pedraza y Castellanos, 2009).

El fenómeno de resistencia tiene un sustrato genético intrínseco o adquirido que se expresa fenotípicamente por mecanismos bioquímicos. De esta manera puede observarse la resistencia desde un ambiente biológico y el otro bioquímico. (Pedraza y Castellanos, 2009).

Se conoce como resistencia natural a los mecanismos permanentes determinados genéticamente, no correlacionables con el incremento de dosis del antibiótico. Un ejemplo de esto es la resistencia de la *Pseudomona aeruginosa*, a las bencilpenicilinas y al trimetropin sulfametoxazol; bacilos Gram-negativos aeróbicos a clindamicina (Pedraza y Castellanos, 2009).

La resistencia adquirida aparece por cambios puntuales en el ADN (mutaciones) o por adquisición de este (plásmidos, trasposones, integrones). En el primero se dan casos tales como la transformación de una betalactamasa en una betalactamasa de espectro extendido o como en el caso de mutaciones de los genes que codifican las porinas con el consecuente bloqueo del ingreso del antibiótico al interior del microorganismo (Pedraza y Castellanos, 2009).

Según Sussmann, Matos y Restrepo (2013) existen otras denominaciones de resistencias como lo son:

- **Resistencia relativa o intermedia:** ocurre un incremento gradual de la CMI (concentración mínima inhibitoria) a través del tiempo. Para obtener un efecto terapéutico es necesario alcanzar niveles séricos y tisulares adecuados. La susceptibilidad o resistencia del germen en este caso es dependiente de la concentración.
- **Resistencia absoluta:** sucede un incremento súbito de la CMI durante o después de la terapia. Es inefectivo el incremento de la dosis clínica usual. Ejemplo de ellos es la *Pseudomona spp* resistentes a la gentamicina y el *Streptococcus pneumoniae* altamente resistente a penicilina y levofloxacina.

- **Pseudoresistencia:** ocurre una resistencia *in vitro* pero una gran efectividad *in vitro*.

Se denomina tolerancia antibiótica al fenómeno en el cual la diferencia entre la MBC (concentración bacteriana mínima) y la CMI es muy grande en lo cual ocurre con relaciones MBC/CMI mayores de 8 lo que permite la persistencia del microorganismo (Sussmann y cols, 2013).

Igualmente desde el punto molecular y bioquímico existen básicamente tres mecanismos por medio de los cuales una bacteria puede hacerse resistente al efecto del antibiótico, a saber:

- **Inactivación del antibiótico:** se realizan mediante enzimas que hidrolizan el antibiótico)
- **Alteración del sitio blanco del antibiótico:** en este mecanismo de resistencia bacteriana se modifican algunos sitios específicos de la anatomía celular, como la pared celular, subunidad 50s, 30s ribosomales.
- **Barreras de permeabilidad:** incluye 3 componentes básicos:
 - Estructura de la membrana externa de la bacteria.
 - Las porina: canales inespecíficos que excluyen el antibiótico por el tamaño molecular.
 - Características fisicoquímicas del antimicrobiano: en el caso de los medicamentos hidrofílicos (imipenem) requieren la presencia de porinas para su transporte al interior de la célula (Sussmann y cols, 2013).

Método de difusión de agar (Kirby – Bauer) en pozo modificado para determinación de actividad antibacteriana.

El método de difusión en agar, está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles (Barry, Amsterdam, Coyle, Gerlach y Thornsberry, 1979).

La técnica está basada en el método original de Kirby-Bauer. Este método de difusión en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos. 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 (National Committee for Clinical Laboratory, 1997).

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 mezclado con el inóculo de la bacteria correspondiente y sobre el cual una vez solidificado se realizan los pozos de forma equidistante con la inversa de una pipeta Pasteur estéril. A continuación se procede a su incubación a temperatura adecuada por 24 horas (Bata, Debiao y Saikia, 2006). Luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos de las distintas sustancias sobre el microorganismo estudiado, con el antibiótico de control. La lectura de los resultados representa la actividad *in vitro* de la sustancia.

Definición Operacional de Términos

Plantas Herbáceas: llamadas vulgarmente hierba o yerba, son plantas que no presentan órganos decididamente leñosos. Los tallos de las hierbas son verdes y mueren generalmente al acabar la buena estación, siendo sustituidos por otros nuevos si la hierba es vivaz (Solomon, Berg y Martin, 2004).

Fitoquímica: La fitoquímica es una disciplina científica que tiene como objeto el aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias producidas por los vegetales (Ambientum, s/f.).

Matorral xerofítico: es un ecosistema ubicado en regiones de escasa precipitación y alta temperatura donde prevalece la vegetación xerófila. La vegetación predominante, del tipo arbustivo, ha desarrollado características particulares que les permite vivir en ambientes desfavorables (Alanís, Jiménez, Mora, Martínez, Mata, Collantes y Rubio, 2015).

Raíces fibrosas: Los sistemas de raíces fibrosas, también llamados sistemas de raíces difusas, fasciculadas, o adventicias, son estructuras de raíces caracterizadas por numerosas raíces de igual tamaño que se extienden en una red compleja desde la base de la planta. El sistema de raíces fibrosas exhibe una gran diferencia con el sistema de raíces primarias en cuanto a desarrollo, estructura y ventajas de supervivencia (Solomon, Berg y Martin, 2004).

Inflorescencia: es un conjunto de flores que brotan de un mismo tallo. En algunas plantas, como por ejemplo en la magnolia o el tulipán, brota una única flor, por lo que se dice que tiene una inflorescencia uniflora. En el caso de que conste de más de una, como en el gladiolo o el trigo, se dice que tienen inflorescencias plurifloras (Sánchez, s/f).

Rotavapor: son dispositivos o equipos que normalmente puedes encontrar entre la maquinaria de un laboratorio y que sirven para evaporar solventes orgánicos o acuosos, con la finalidad de facilitar el trabajo de todo proceso que los necesite (Harwood y Moody, 1989).

Ligninas: es uno de los biopolímeros más abundantes en las plantas y junto con la celulosa y la hemicelulosa conforma la pared celular de las mismas en una disposición regulada a nivel nano-estructural, dando como resultado redes de lignina-hidratos de carbono. Está presente en todas las plantas vasculares, y al igual que muchos otros componentes de la biomasa, se forma mediante la reacción de fotosíntesis (Chávez y Domine, 2013).

Operacionalización de las variables

Las variables de una investigación son características presentes o ausentes en la población de estudio. Es necesario transformarlas en conceptos con la finalidad de medirlas a través de indicadores específicos (Pallella y Martins, 2010). En tal sentido, las variables de esta investigación fueron las siguientes: variable dependiente (VD): Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas, tallo y raíces de *Ruellia tuberosa* L. frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas; y variable independiente (VI): Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 3: Operacionalización de la variable dependiente: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L. frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas

1. Variable	2. Tipo de Variable	3. Definición conceptual ¿Qué es?
Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas, tallo y raíces de <i>Ruellia tuberosa</i> L. frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.	<ul style="list-style-type: none"> - Dependiente - Continua 	Se define como la capacidad de un compuesto de lograr inhibir, matar o impedir la acción patógena de un microorganismo (Pedraza y Castellanos, 2009).
4. Definición Operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicadores
La actividad antibacteriana se puede medir usando el método de difusión de agar Kirby-Bauer en pozo modificado.	<ul style="list-style-type: none"> - Ausencia de microorganismos - Presencia de microorganismos 	de Medición del halo de inhibición en el agar.

(Sajajú y Villalobos, 2019)

Tabla 4: Operacionalización de la variable independiente: Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L.

1. Variable	2. Tipo de Variable	3. Definición conceptual ¿Qué es?
Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas, tallo y raíces de <i>Ruellia tuberosa</i> L.	- Independiente	Son moléculas orgánicas encontradas en los vegetales que ayudan a la protección frente a la agresión de algunos microorganismos. Se encuentran en cantidades relativamente pequeñas y su producción puede ser extendida o restringida a familias, géneros, o especies particulares (Palacios, 2013).
4. Definición Operacional ¿Cómo se mide?	5. Dimensiones	6. Indicadores
Se miden con pruebas cualitativas generando reacciones de color o precipitación.	<ul style="list-style-type: none"> - Ausente (-) - Escaso (+) - Moderado (++) - Abundante (+++) 	<ul style="list-style-type: none"> - Aparición de un precipitado o cambio de color. - Ausencia de un precipitado o cambio de color.

(Sajajú y Villalobos, 2019)

Hipótesis

La *Ruellia tuberosa* L., presenta antecedentes en los que se demuestra que los extractos de sus raíces y hojas contienen metabolitos secundarios como flavonoides, triterpenos, fenoles, entre otros, cabe esperar que el extracto etanólico de las hojas, tallo y raíces contenga compuestos químicos similares a los identificados hasta ahora y que estos posean, además, actividad antibacteriana sobre cepas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

www.bdigital.ula.ve

CAPITULO III

MARCO METODOLOGICO

Tipo de investigación

Los tipos de investigación son: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa (Hurtado, 2012). En tal sentido, esta investigación es evaluativa ya que se basa en determinar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L. así como también, en evaluar la actividad antibacteriana de este extracto frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Diseño de la investigación

Hurtado (2012), describe que el diseño de investigación se refiere a las estrategias que se implementan para recolectar la información en una fuente determinada, en un tiempo específico y en una cantidad o amplitud asociada a lo que se quiere saber. En tal sentido, esta investigación tuvo un diseño de campo y de laboratorio, contemporáneo, transversal y multivariante, donde la especie en estudio se recolecto de un ambiente natural y los datos experimentales se recolectaron en el Instituto de Investigaciones Dr. Alfredo Nicolás Usubillaga del Hierro y en el Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Población y Muestra

Unidad de Investigación

Las unidades de investigación de este estudio son las hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L., procedentes del Estado Apure- Venezuela.

Selección del tamaño muestral

La muestra de este estudio fue seleccionada de manera aleatoria, según la disponibilidad de la especie vegetal ubicada en la ciudad de Guasualito, estado Apure.

Sistema de Variables

Las variables que guardaron relación con el objetivo de esta investigación fueron las siguientes:

- Variable dependiente (VD): Actividad antibacteriana del extracto de las hojas, tallo y raíces de *Ruellia tuberosa* L. frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- Variable independiente (VI): Metabolitos secundarios presentes en el extracto de las hojas, tallo y raíces de *Ruellia tuberosa* L.

Procedimientos de la Investigación

Recolección de la muestra

La muestra de este estudio fue recolectada en el Municipio Páez, parroquia Guasualito, sector Las Carpas a una altitud de 131 m.s.n.m., ubicado en Guasualito, Estado Apure, e identificada por un Taxónomo

especialista como fue el Ingeniero Juan Carmona de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes del estado Mérida-Venezuela en el año 2017.

Obtención de los extractos crudos de la especie vegetal.

Las hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L. se secaron a temperatura ambiente y a la sombra durante dos semanas, se separaron todas las partes de la planta que se estudiaron (hojas, tallos y raíces). Posteriormente, todo el material se molió obteniéndose 6,59 gr de hojas, 13,14 gr de tallos y 20,21 gr de raíz. Todas estas partes por separado se sometieron a extracción exhaustiva por maceración utilizando etanol al 96-98% durante 48 horas. Se realizaron 2 filtraciones de los extractos con 100 mL de etanol y se llevaron al rotavapor, obteniéndose finalmente 2,15 gr de extracto de hojas, 3,18 gr de extracto del tallo y 3,59 gr de extracto de raíz. Los extractos obtenidos se muestran en la Figura 15.



Figura 15: Extractos obtenidos.
Fuente: Autor.

Determinación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en los extractos de *Ruellia tuberosa* L.

El procedimiento general de la investigación se muestra en Figura 16. La presencia de metabolitos secundarios se determinó mediante un tamizaje fitoquímico cualitativo, usando procedimientos estándares de análisis descritos a continuación en la Tabla 5.



Figura 16: Procedimiento de la investigación
Fuente: Autor

Tabla 5: Protocolo para el tamizaje fitoquímico de *Ruellia tuberosa* L

Metabolito secundario	Prueba	Procedimiento
Alcaloides	Wagner (Dominguez,1979)	Se disolvió una porción del extracto en 2 mL de HCl al 5%, posteriormente se agitó, filtró, y se tomó una alícuota a la cual se le adicionó gotas del reactivo de Wagner Mayer y Dragendorff, respectivamente. Un precipitado rojo pardo (Wagner), blanco o amarillento (Mayer) y rojo-anaranjado (Dragendorff) indicó la presencia de alcaloides.
	Mayer (Dominguez,1979)	
	Dragendorff (Dominguez,1979)	
Glucósidos	NaOH (Shyamala-Gowri y Vasantha, 2010)	Se disolvió una porción del extracto en 1 mL de H ₂ O, luego se adicionaron gotas de NaOH acuoso 1N. Un color amarillo indicó la presencia de glucósidos.
Glucósidos cardiotónicos	Keller's (Cohn, 1909)	Se disolvió 10 mg de cada extracto en el reactivo de Keller y se le adicionó unas gotas de H ₂ SO ₄ concentrado. Un anillo marrón en la interfaz indicó la presencia de glucósidos con dos desoxiazúcares o para estos azúcares.
	Legal (Domínguez, 1979)	Se adicionaron 2 ó 3 gotas (0,5 mL) de piridina al extracto, luego una gota de solución de nitroprusiato de sodio (acuoso y reciente) al 5% y finalmente 3 gotas de NaOH 2N. Un color rojo intenso indicó la presencia para cardenólidos o lactonas α , β -insaturadas.

Tabla 5: Protocolo para el tamizaje fitoquímico de *Ruellia tuberosa* L. (cont.)

Metabolito secundario	Prueba	Procedimiento
Saponinas	Altura de la espuma (Orantes, 2008)	En un tubo de ensayo se colocó 1 mL del extracto, luego se agitó vigorosamente durante 1 minuto y se midió con una regla la altura de la espuma. La formación de una espuma de 8 mm-1 cm y estable por 30 min indicó la presencia de saponinas.
	Bicarbonato de sodio (Shyamala-Gowri y Vasantha, 2010)	A 5 gotas del extracto diluido se le añadió 1 mL de H ₂ O y una gota de solución saturada de NaHCO ₃ . Luego se mezcló y se agitó vigorosamente durante 3 minutos. La formación de una espuma en forma de panal de abejas indicó la presencia de saponinas.
Flavonoides	Shinoda (Domínguez, 1979)	A 1 mL de extracto diluido se le adicionó una pequeña cantidad de magnesio metálico y 3 gotas de HCl concentrado. Un color rojo, naranja, rojo-azuloso y violeta indicó la presencia de flavonas, flavononas, flavonoles, flavononoles o xantonas. Ocasionalmente los flavonoles, las flavanonas y flavononoles dan colores verdes o azules.
	NaOH 10% (Domínguez, 1979)	La formación de una coloración de amarillo a rojo indicó la presencia de xantonas y flavonas. Una coloración café a naranja indicó la presencia de flavonoles. Una coloración púrpura a rojizo indicó la presencia de chalconas. Una coloración azul indicó la presencia de antocianinas.
	Pews (Shaibu, Saka, Alhaji, Abba, Shuaibu e Ibrahim, 2014)	A 1 mL de extracto diluido se le agregó aproximadamente 2 mg de polvo de zinc más unas gotas de ácido clorhídrico 5N. La formación de una coloración intensa indicó la presencia de flavononoles.

Tabla 5: Protocolo para el tamizaje fitoquímico de *Ruellia tuberosa* L. (cont.)

Metabolito secundarios	Prueba	Procedimiento
Taninos	Inicio	Se disolvió en 10 mL de etanol por 5 minutos 100 mg del extracto, posteriormente se extrajo con 25 mL de agua destilada, llevando a ebullición durante 15 minutos. Luego se dejó en reposo hasta alcanzar temperatura ambiente, posteriormente se adicionó 0,2 mL de disolución de NaCl al 10% p/v y se filtró con papel de filtro cualitativo. El filtrado obtenido se distribuyó en partes iguales en cinco tubos de ensayo, los cuales fueron sometidos a distintos procedimientos tales como:
	Blanco	No se le agregó ningún reactivo o sustancia, sólo fue añadido el filtrado obtenido.
	Gelatina 1 % (Orantes, 2008)	Se le agregó 4 gotas de disolución acuosa de gelatina 1 %. Un precipitado indicó la presencia de taninos. Se le agregó 4 gotas de disolución de gelatina- sal (1 % gelatina + 10 % de NaCl).
	Gelatina 1 %-sal 10 % (Orantes, 2008)	Un precipitado indicó la presencia de taninos.
	FeCl₃ 10 % (Orantes, 2008)	Se le agregó 4 gotas de disolución acuosa de FeCl ₃ 10 % p/v. Un color grisáceo-negro y negro- azulado indicó la presencia de catecol y pirogalol.
	KFe(CN)₆ 1 % (Orantes, 2008)	Se le adicionó 1 gota de KFe(CN) ₆ 1 %. Un color azul indicó la presencia de compuestos fenólicos.

Tabla 5: Protocolo para el tamizaje fitoquímico de *Ruellia tuberosa* L. (cont.)

Metabolito secundario	Prueba	Procedimiento
Triterpenos y esteroides	Salkowski (Domínguez, 1979)	Se disolvió 100 mg del extracto en 2 mL de cloroformo, luego se adicionó cuidadosamente 1 mL de H ₂ SO ₄ hasta formar doble fase. Un color marrón rojizo en la interfase indicó la presencia de un anillo esteroideo.
	Rosenthaler (Domínguez, 1979)	A una pequeña porción del extracto concentrado se le adicionó 3 gotas del reactivo de Rosenthaler y luego se estratificó con 2 gotas de H ₂ SO ₄ concentrado. La formación de una interfase de color violeta indicó la presencia de triterpenoides.
	Lieberman Bouchard (Domínguez, 1979)	A una pequeña porción del extracto concentrado se le añadió 1 mL de ácido acético anhidro y luego se estratificó con 2- 3 gotas de H ₂ SO ₄ concentrado. Posteriormente, se dejó en reposo por 5 minutos. La formación de una interfase azul, verde, rosa, rojo y violeta indicó la presencia de esteroides y triterpenoides.
Fenoles	FeCl₃	A una alícuota del extracto alcohólico se le añadió 3 gotas de FeCl ₃ al 5% en solución salina fisiológica (NaCl al 0,9% en agua) Una coloración verde intensa indicó la presencia de taninos pirocatecólicos. Una coloración azul intensa indicó la presencia de taninos pirogalotánicos.

Tabla 5: Protocolo para el tamizaje fitoquímico de *Ruellia tuberosa* L. (cont.)

Metabolitos Secundarios	Prueba	Procedimiento
Quinonas y antraquinonas	NH₄OH (Domínguez, 1979)	A 10 mg de cada extracto se le adicionó 1 gota de hidróxido de amonio concentrado. Un color rojo indicó la presencia de antraquinonas.
	H₂SO₄ conc. (Domínguez, 1979)	A 10 mg de cada extracto se les adicionó 1 gota de ácido sulfúrico concentrado. Un color rojo indicó la presencia de quinonas.
	Benceno (Rajesh, Latha, Selvamani y Rajesh-Kannan, 2010)	Se disolvió 10 mg de cada extracto con 1 mL de benceno, luego se filtró y se les adicionó 0,5 mL de solución de amoniaco al 10 % y se mezcló. Un color rosa, rojo y violeta en la fase inferior indicó la presencia de antraquinonas.
Carbohidratos	Molisch (Shaibu, Saka, Alhaji, Abba, Shuaibu e Ibrahim, 2014)	A 2 mL del extracto acuoso se le adicionaron 3 gotas del reactivo de Molisch, y se dejó caer por las paredes del tubo lentamente y sin agitación 1 mL de H ₂ SO ₄ concentrado. La formación de un anillo violeta en la interfaz indicó la presencia de carbohidratos.
	Fehling (Shaibu, Saka, Alhaji, Abba, Shuaibu e Ibrahim, 2014)	A 2 mL del extracto acuoso se le adicionó 5 mL de una mezcla formada por 2,5 mL de reactivo de Fehling A y 2,5 mL de reactivo de Fehling B, luego se hirvió en baño de maría por 2 minutos Un precipitado rojo ladrillo indicó la presencia de azúcares reductores.
Cumarinas	NH₄OH	A una pequeña porción del extracto se le adicionó 0,5ml de etanol y 2 gotas de NH ₄ OH concentrado. La presencia de fluorescencia azul o verde indicó la presencia de cumarinas.

Preparación de los extractos crudos para la determinación de la actividad antibacteriana

Los extractos fueron preparados a partir de una solución madre de 500 ppm en DMSO, usando 50 mL de extracto de cada parte de la planta en pozos de 6 mm. En la Figura 17 se muestran los extractos finalmente preparados.



Figura 17: Extractos de hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L. preparados para la inoculación en la placa.

Fuente: Autor

Determinación de la actividad antibacteriana por el método de difusión de agar (Kirby – Bauer) en pozo modificado

- Bacterias de ensayo:
Se seleccionaron 5 especies de las cuales 2 son bacterias Gram positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212), y 3 especies bacterianas son Gram negativas (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 23357, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).
- Preparación de los pre-inóculos bacterianos:
Las cepas a ensayar se incubaron en agar Mueller–Hinton a 37° C por 16 a 18 horas antes de hacer el ensayo microbiano. Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa en aro estéril, en una solución de NaCl al 0,85% previamente estéril, hasta alcanzar la

turbidez del patrón de MacFarland N-0,5 equivalentes a $10^{6.8}$ UFC/mL.

➤ Preparación de las placas:

A cada placa se le colocaron 20 mL del agar Mueller-Hinton previamente preparado y esterilizado a una temperatura que no superó los 40°C mezclado con 2 mL de la suspensión de esporas, posteriormente se dejó solidificar a temperatura ambiente.

➤ Determinación de la actividad antibacteriana por el método de difusión de agar (Kirby – Bauer) en pozo modificado:

Cada placa solidificada preparada con el medio e inóculo bacteriano se le procedió a realizar los pozos con la inversa de una pipeta Pasteur estéril quedando unos pozos de 6 mm, a cada pozo se le adicionó 50 µL del extracto previamente preparado; se usó un control positivo representado por un antibiótico comercial y un control negativo representado por el Dimetil sulfoxido (DMSO) el cual utilizamos para disolver la muestra.

➤ Preincubación e incubación:

Después de preparadas las placas, se dejaron a temperatura ambiente por 30 minutos para que las muestras difundieran y finalmente se incubaron a 37°C por 24 horas en atmósfera aeróbica.

➤ Lectura de los halos de inhibición:

Finalizado el tiempo de incubación se procedió a medir con una regla milimetrada los halos de inhibición (Figura 18).

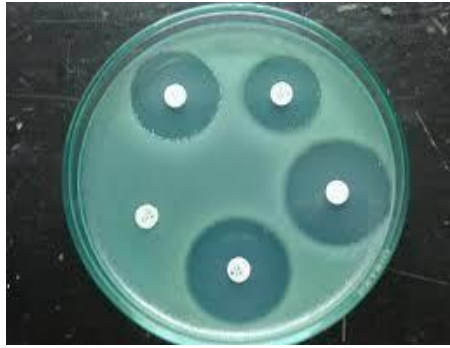


Figura 18: Halos de inhibición.

Fuente: https://www.google.co.ve/search?q=antibiograma&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwizqfLv_sHbAhWCzIMKH71CSQQ_AUICigB#imgrc=C136G29glz8lGM:

Diseño de Análisis

Los datos recolectados en la fase interactiva del proceso de investigación fueron analizados a través de un enfoque cuantitativo y cualitativo ya que fueron expresados numéricamente y se realizó descripciones y observaciones (Palella y Martins, 2010).

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSION

Resultados

Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de las hojas, tallo y raíces de *Ruellia tuberosa* L. se realizó mediante pruebas químicas con la adición de diversos reactivos, mencionados anteriormente en la Tabla 4. Por medio de estas pruebas se determinaron resultados positivos que se evidencian en la Tabla 5.

Usando un análisis cualitativo se determinó la presencia de diferentes metabolitos secundarios en el extracto etanólico, tales como: glucósidos, glucósidos cardiotónicos, flavonoides, taninos, carbohidratos y triterpenos y esteroides (Tabla 6).

Tabla 6: Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L.

Metabolito Secundario	Prueba	Control	Resultado
Alcaloides	Wagner		
	Mayer		
	Dragendorff		
Cumarinas	NH ₄ OH		

Tabla 6: Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L. (Cont.)

Metabolito Secundario	Prueba	Control	Resultado
	Mollisch		
Carbohidratos	Fehling		

Tabla 6: Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L. (Cont.)




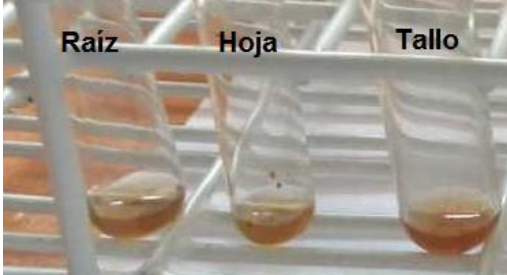
Metabolito Secundario	Prueba	Control	Resultado
Saponinas	Altura de la espuma		
	Bicarbonato		

Tabla 6: Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L. (Cont.)

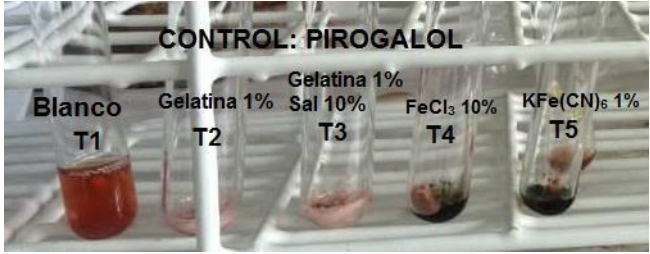


Metabolito Secundario	Prueba	Control	Resultado
Taninos	Gelatina 1%		
	Gelatina 1% - Sal 10%		
	FeCl ₃ 10%		
	KFe(CN) ₆ 1%		
Fenoles	FeCl ₃ (ac)		

Tabla 6: Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L. (Cont.)



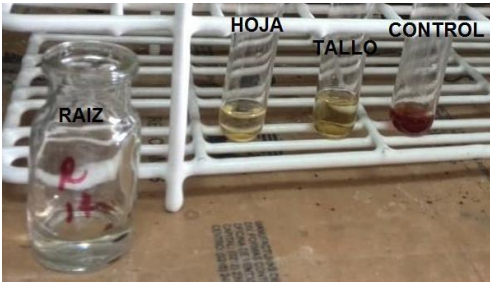
Metabolito Secundario	Prueba	Control	Resultado
	NH ₄ OH		
Quinonas	H ₂ SO ₄		
	Benceno		

Tabla 6: Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L. (Cont.)

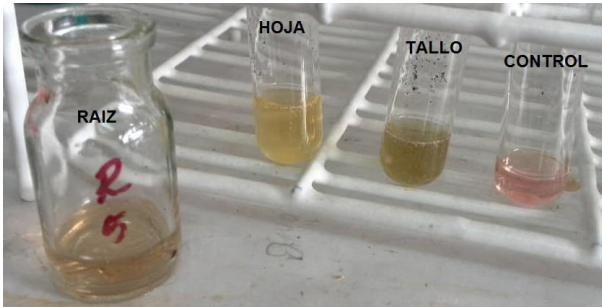
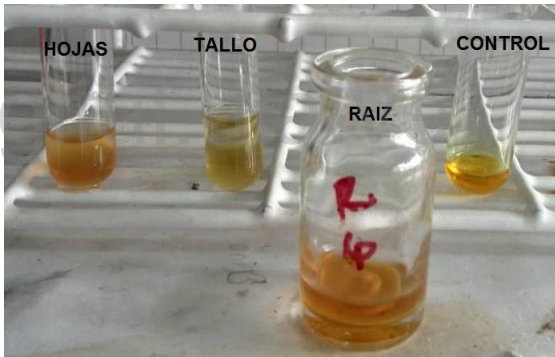
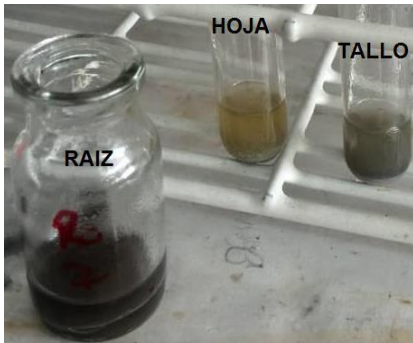
Metabolito Secundario	Prueba	Control	Resultado
	Shinoda		
Flavonoides	NaOH 10%		
	Pew's		

Tabla 6: Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L. (Cont.)



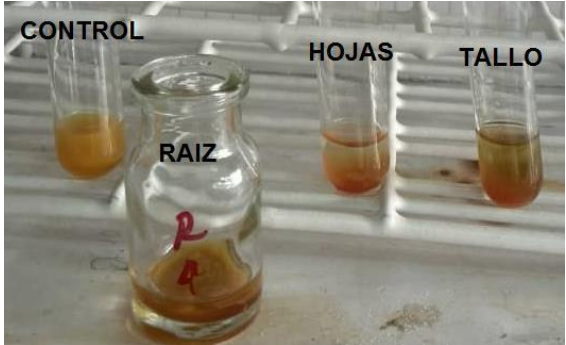
Metabolito Secundario	Prueba	Control	Resultado
	NaOH		
Glucósidos y glucósidos cardiotónicos	Keller-Killiani		
	Legal		

Tabla 6: Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L. (Cont.)

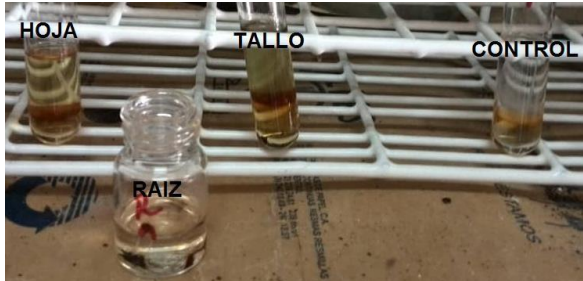
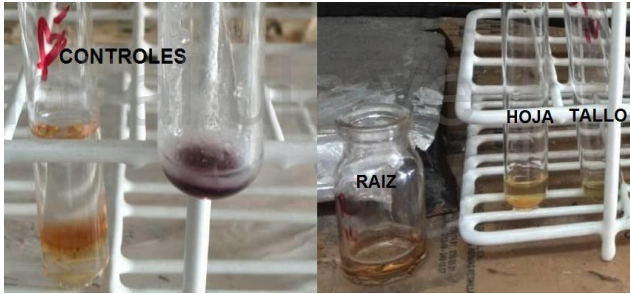
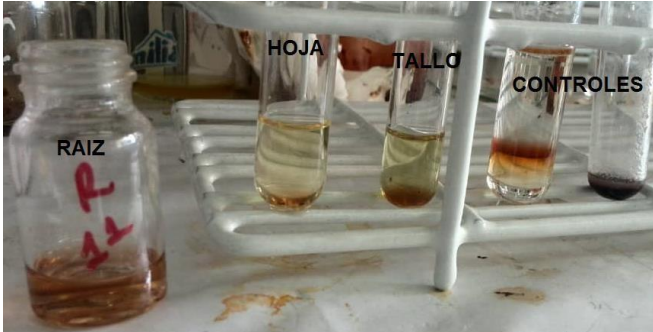
Metabolito Secundario	Prueba	Control	Resultado
	Salkowski	HOJA, TALLO, RAIZ	
Triterpenos y esteroides	Rosenthaler	RAIZ	
	Lieberman Bouchard	HOJA, TALLO, RAIZ	

Tabla 7: Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L.

Metabolito secundario	Pruebas	Resultados		
		Hojas	Tallos	Raíces
Alcaloides	Wagner	-	-	-
	Mayer	-	-	-
	Dragendorf	-	-	-
Cumarinas	NH ₄ OH	-	-	-
Carbohidratos	Molisch	+	++	+++
	Fehling	+	++	+++
Saponinas	Altura de la espuma	-	-	-
	Bicarbonato	-	-	-
Taninos	Gelatina 1%	-	-	-
	Gelatina 1% - Sal 10%	-	-	-
	FeCl ₃ 10%	+	+	+
	KFe(CN) ₆ 1%	-	-	-
Fenoles	FeCl ₃ (ac)	+	+	+
Quinonas	NH ₄ OH	-	-	-
	H ₂ SO ₄	-	-	-
	Benceno	-	-	-
Flavonoides	Shinoda	-	-	-
	NaOH 10%	+	-	+
	Pew's	-	-	-
Glucósidos y glucósidos cardiotónicos	NaOH	-	-	+
	Keller-Killiani	-	-	-
	Legal	+	+	+
Triterpenos y esteroides	Salkowski	+	+	-
	Rosenthaler	-	-	-
	Lieberman Bouchard	-	-	-

- = Ausente, + = escaso, ++ = moderado, +++ = abundante.

Actividad antibacteriana

Usando el método de difusión de agar (Kirby – Bauer) en pozo modificado se midieron los halos de inhibición de los extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L. a una concentración de 500 ppm (Tabla 8).

Tabla 8: Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces de *Ruellia tuberosa* L.

Gram positivas	Halo de inhibición (mm)			
	Hojas	Tallos	Raíces	Oxitetraciclina 100 ppm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-	-	11
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	8	8	12
Gram negativas	Halo de inhibición (mm)			
	Hojas	Tallos	Raíces	Oxitetraciclina 100 ppm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	11
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	-	-	-	11

Discusión

Los resultados del tamizaje fitoquímico coinciden con los reportados por otros investigadores. Chothani y cols, en 2010, informaron sobre la presencia de los flavonoides, apigenina y luteolia, en las hojas de *R. tuberosa*. De la misma forma Wagner, Danniger, Iyengar, Seligrau, Farkas, Subramannian y Nair, 1971, extrajeron estigmasterol, β -sitosterol, campesterol y apigenina de las partes aéreas de *R. tuberosa*. Otros investigadores también han comunicado la detección de flavonoides y fenoles en los extractos de todas las partes de la planta, incluyendo la raíz (Arirudran y cols, 2011; Chothani y cols, 2011; Chothani y cols, 2012).

Es importante mencionar, que los resultados de la composición química pueden variar según la escogencia del solvente para el proceso de extracción, pues éste influye en la detección de los distintos componentes de la planta, además de ciertos factores que pueden influir en la síntesis de metabolitos secundarios tales como el ritmo circadiano, la temperatura, la disponibilidad de agua, la radiación ultravioleta, sus nutrientes, entre otros (Becker, Santos, Kagimura y Matiello, 2015). Cabe destacar que no se encontraron datos sobre *R. tuberosa* recolectada en Guasualito (Estado Apure- Venezuela), la mayoría de la información reportada son para especies de la India, solo un estudio informa para una muestra recolectada en Caracas –Venezuela (Ciangherotti y cols, 2016).

La presencia de flavonoides en el extracto acuoso de la raíz pudieran ser los principales responsables de la actividad antiinflamatoria y antinociceptiva, que se le atribuye a la planta, debido a su conocida capacidad de inhibir a las enzimas que participan en la síntesis de diferentes eicosanoides (Pastorello, Ciangherotti, Varela, López-Gramko, Orsini y Israel, 2012). Así mismo, los flavonoides también han sido señalados como los responsables de la

actividad antidiabética que destaca como principal uso de la planta (Behari, Goyal y Streibl, 1981; Singh, Pandey, Pandey, y Singh, 2002).

Los resultados obtenidos para el tamizaje fitoquímico se pueden considerar aceptables, ya que coinciden con muchos de los trabajos experimentales antes expuestos, esto indica, una vez más, que *R. tuberosa* es una fuente potencial de metabolitos secundarios químicamente relevantes como fenoles y flavonoides.

En relación a la actividad antibacteriana no se ubicaron investigaciones donde se reporte la actividad de *R. tuberosa* frente a *E. faecalis*, pero sí frente a otras bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Los extractos metanólico y de acetato de etilo de las partes aéreas de *R. tuberosa* exhibieron buena actividad frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa* (Wiat, Hannah, Yassim, Hamimah y Sulaiman, 2005). Por otro lado, el extracto alcohólico de toda la planta a través del método de difusión en disco no presentó actividad frente a *E. coli* a una concentración de 100 mg/mL, más sin embargo, sí inhibió el crecimiento de *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*. Así mismo, el extracto acuoso resultó negativo para *E. coli* y *P. aeruginosa* (Arirudran y cols, 2011). El extracto metanólico de la raíz de *R. tuberosa* a una concentración de 25 µg/mL por el método de difusión en disco exhibió halos de inhibición frente a *S. aureus* (13 mm), *E. coli* (18 mm) y *P. aeruginosa* (17 mm) (Kader y cols, 2012).

Cabe destacar que estas comparaciones solo se hacen para tener un punto de referencia, no pueden realizarse comparaciones absolutas ya que los métodos empleados para la determinación de la actividad antibacteriana no son iguales. Adicionalmente, la actividad antibacteriana de los extractos vegetales depende de la concentración empleada, del tipo de cepa bacteriana ensayada y de los metabolitos secundarios presentes en los extractos (Vadlapudi y Kaladhar, 2012).

En general puede afirmarse que la actividad antibacteriana exhibida por los extractos etanólicos de los tallos y raíces de *R.tuberosa* frente a *E. faecalis* no fue buena dado que el halo de inhibición presentado es muy limitado (8 mm).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- ✓ El tamizaje fitoquímico reveló la presencia de glucósidos cardiotónicos, fenoles, flavonoides, carbohidratos y esteroides en los extractos de las diferentes partes de la planta.
- ✓ Todos los extractos etanólicos (hojas, tallos y raíces) evidenciaron la presencia de glucósidos cardiotónicos, fenoles y carbohidratos.
- ✓ Se determinó la presencia de flavonoides en los extractos etanólicos de hojas y raíces.
- ✓ Los extractos etanólicos de hojas y tallos resultaron positivos para esteroides.
- ✓ Los extractos etanólicos de tallos y raíces exhibieron actividad moderada frente a *E. faecalis*.
- ✓ Constituye el primer reporte sobre la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces de *R. tuberosa* recolectada en el Estado Apure- Venezuela.

Recomendaciones

- ✓ Verificar por otros métodos la presencia en los extractos de glucósidos cardiotónicos, ya que hasta el momento no se encontró bibliografía que respalde la presencia de este tipo de metabolitos en el género *Ruellia*.
- ✓ Realizar un fraccionamiento biodirigido de los extractos, que permita aislar e identificar los compuestos presentes en los extractos.
- ✓ Determinar a todos los extractos el contenido de fenoles a través del método de Folin-Ciocalteu y de flavonoides totales, así como la actividad antioxidante por método del poder captador del radical libre DPPH•.

www.bdigital.ula.ve

Bibliohemerografía

- Alanís, E., Jiménez, J., Mora, A., Martínez, J., Mata, J., Collantes, A. & Rubio, E. (2015). Estructura y diversidad del matorral submontano contiguo al área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México. *Acta botánica mexicana*, 113, 01-19.
- Albornoz, A. (1980). *Productos Naturales: Estudio de las sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela.
- Ambientum. (s/f). Diccionario de términos medioambientales. Recuperado de: <https://www.ambientum.com/diccionario-de-terminos-medioambientales-letra/f>
- Arirudran, B., Saraswathy, A. & Krishnamurthy, V. (2011). Estudio farmacognóstico y fitoquímico preliminar sobre *Ruellia tuberosa* L. *Pharmacognosy Journal*, 3(23), 91-95.
- Arteaga, R. & Arteaga, M. (2005). Infecciones estafilocócicas. *Revista de la Sociedad Boliviana de Pediatría*, 44(3), 178-180. Recuperado de: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102406752005000300010&lng=es&tlng=es.
- Bata M., Debiao L. & Saikia A. (2006). Antibacterial activity of the crude extract of chinese Green Tea. *African Journal of Biotechnology*, 7(19), 1571.
- Barbé, R. C. (2001). *Preparados farmacéuticos y para farmacéuticos*. España: Masson.
- Barry A. L., Amsterdam D., Coyle M. B., Gerlach E. H. & Thornsberry C. (1979). Simple Inoculum Standardizing System for Antimicrobial Disk Susceptibility Test. *J. Clin. Microbiology*, 10, 910.
- Behari, M., Goyal, M. & Streibl, M. (1981). Natural Products from *Ruellia tuberosa* L. *J Indian Chem Soc*, 58, 176-177.
- Becker O.S., Santos, Z.M.Q., Kagimura, F.Y. y Mattiello, S.P. (2015). Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid contents in *Stachytarpheta cayennensis*, (Rich.) Vahl (Verbenaceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 9(17), 569-575.
- Beltrán, C., Díaz, F. & Gómez, H. (2013). Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(4), 619-631.

Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000400013&lng=es&tlng=es.

Borghi, A. (2012). Chris Kilham, de Medicine Hunte. Recuperado de: <http://www.sanasana.com/latinohealthmagazine/hierbas-que-combaten-germenes-bacterias-y-virus/>.

Cabrera, I. (2005) *Las plantas y sus usos en las Islas de Provincia y Santa Catalina*. Colombia: Editorial Universidad del Valle.

Cabrera, M., Gómez, R., y Zuñigan, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismo de supervivencia y adaptación. *Revista Colombia Médica*, 38 (2). Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/cm/v38n2/v38n2a07.pdf>

Castillo, C. & Medina, C. (2013). *Identificación de metabolitos secundarios presentes en la planta nativa cucharilla (Oreocallis grandiflora) (Tesis de grado)*. Universidad Nacional del Callao, Perú.

Castro, A. (2014). *Bacteriología medica Segunda Edición. Manual moderno*. México. Recuperado de: https://www.academia.edu/13509918/bacteriologia_medica_basada_en_problemas_castro_2ed_medilibros_com.

Chávez, M. & Domine, M. (2013). Lignina, estructura y aplicaciones: métodos de despolimerización para la obtención de derivados aromáticos de interés industrial. *Av. cien. ing.*, 4(4), 15-46. Recuperado de: <https://pdfs.semanticscholar.org/db2c/eac3b930e6c8ea4d0da80912f57ad8c50b58.pdf>.

Chothani, D., Patel, M., Mishra, S & Vaghasiya, H. (2010). Review on *Ruellia tuberosa* L. *Pharmacognosy Journal*, 2(12), 506-512.

Chothani, D., Patel, M. & Mishra, S. (2011). Phytochemical screening and physicochemical evaluation on various parts of *Ruellia tuberosa* linn. *Ethnopharmacol.* Recuperado de: <http://www.inventi.in/Article/ep/228/10.aspx>

Chothani, D., Patel, M. & Mishra, S. (2012). HPTLC Fingerprint Profile and Isolation of Marker Compound of *Ruellia tuberosa*. *Chromatography Res Inter*, 2012, 1-6.

Ciangherotti, C., Cegarra, J., Usubillaga, A., Rodriguez, M., Bermudez, J., Mata, R. & Israel, A. (2016). Evaluacion fitoquimica preliminar y actividad hipoglicemiante aguda del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. en ratas con diabetes experimental. *Revista Facultad de Farmacia*, 79(1), 37-44. Recuperado de:

https://www.researchgate.net/profile/Israel_Anita/publication/311495657_Preliminary_phytochemical_screening_and_acute_hypoglycemic_effects_of_the_aqueous_extract_of_Ruellia_tuberosa_L_root_in_experimental_diabetes_in_rats/links/58493ff708ae95e1d1689dd1/Preliminary-phytochemical-screening-and-acute-hypoglycemic-effects-of-the-aqueous-extract-of-Ruellia-tuberosa-L-root-in-experimental-diabetes-in-rats.pdf

- Ciangherotti, C., Maldonado, A. M., Orsini, G., Perdomo, L., Alvarez, M., Salazar, M. & Israel, A. (2013). Efecto protector de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. sobre el daño renal inducido por la diabetes experimental. *Archivos venezolanos de farmacología y terapéutica*, 32(4), 57-66.
- Cohn, A. I. (1909). Test and reagents chemical and microscopical known by their author's names, together with an index of subjects. *J. Wiley & Sons*, 154.
- Cruz, D. & López, V. (s/f). *Plantas Medicinales*. México. Recuperado de: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/fig/Plantas_medicinales_Seminario_Final_Silva_Nataly.pdf.
- Domínguez, X. (1979). *Métodos de investigación fitoquímica* (1a ed.). México: Limusa.
- Escalona, L., Tase, A., Estrada, A. & Almaguer, M. (2015). Uso tradicional de plantas medicinales por el adulto mayor en la comunidad serrana de Corralillo Arriba. Guisa, Granma. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(4), 429-439.
- Farías, E., Medina, R. & Chavarría, J. (2005). Neumonía nosocomial por *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista de Medicina Interna*, 21, 368-379. Recuperado de: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2005/mim055f.pdf>.
- González, A. & Raisman, J. (2004). Azúcares o Glúcidos. Hipertextos del área de la biología. Recuperado de: <http://www.biologia.edu.ar/macromoleculas/azucar.htm>.
- Guerra, D., Cabrera, D., Sánchez, Y. & Almeida, M. (2011). Tamizaje fitoquímico y evaluación de la actividad antibacteriana del extracto seco de la tintura de *Siwetenia mahogoni* (Caoba antillana). *Revista Química Viva*, 1(10), 42-50.
- Gunsha, L. (2013). *Elaboración de un emulsionante cosmético a base de las saponinas del agua de lavado de Quinoa (Chenopodium quinoa) en erpe*. (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Ecuador.

- Harwood, L.M. & Moody, C.J. (1989). *Experimental organic chemistry: Principles and Practice* (Illustrated edition). USA: Blackwell Science Ltd.
- Hernández, S., Fernández, C. & Baptista L. (2014). *Metodología de la investigación*. (Sexta edición). México: Editorial McGraw-Hill interamericana.
- Herrera, L., Vargas, A. & Campos, M. (1998). Aislamientos de *Enterococcus* spp., resistentes a la vancomicina, en muestras de heces de niños costarricenses. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 33(1-2), 29-38. Recuperado de: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461998000100004&lng=en&tlng=es.
- Hokche, O., Berry, P. E. & Huber, O. (2008). *Nuevo catálogo de la flora vascular en Venezuela*. Caracas: Fundación Instituto Botánico de Venezuela.
- Hurtado, J. (2012) *El Proyecto de Investigación. Comprensión holística de la metodología y la investigación*. Caracas: Quirón Ediciones.
- Jinks, T., Lee, N., Sharland, M., Rex, J., Gertler, N., Diver, M., Farrar, J. (2016). Un tiempo para la acción: la Resistencia antimicrobiana necesita una respuesta global. *Bulletin of the World Health Organisation*, 94(8), 558. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/305739943_A_time_for_action_antimicrobial_resistance_needs_global_response.
- Kader, A., Parvin, S., Chowduri, A. & Haque, E. (2012). Antibacterial, antifungal and insecticidal activities of *Ruellia tuberosa* (L.) Root extract. *J bio-sci*, 20, 91-97.
- Lindmeier, C. (2018). Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo. Bangkok. Recuperado de: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibioticresistance-found/es/>.
- López, W. & Guevara, J. (2002). Infección Por *Escherichia coli* Enterohemorrágica. *Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Ricardo Palma*, 3(1), 38-41. Recuperado de: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/rfmh_urp/v03_n1/a12.htm.
- Marcano, D. & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Caracas, Venezuela: Editorial Torino.
- Martínez, J. (2005). *Las plantas medicinales y su seguridad*. Barcelona: Nexus Medica.

- Murray, P., Rosenthal, K. & Pfaller, M. (2009). *Microbiología Médica* (6a. ed.). Madrid: Elsevier Science.
- National Committee for Clinical Laboratory. (1997). Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. *National Committee for Clinical Laboratory standards*, 17(1).
- Organización Mundial de la salud. (2004). Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales. Ginebra. Recuperado de: <https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>.
- Organización Mundial de la salud. (2018). 10 amenazas a la salud mundial en 2018. México. Recuperado de: <https://www.who.int/features/2018/10-threats-global-health/es/>.
- Orantes, E. (2008). *Tamizaje fitoquímico de la especie vegetal guatemalteca Quararibeayunckeri Standley Subsp. Izabalensis W.S. Alverson ex Véliz (Bombacaceae)*. (Tesis de grado). Universidad San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Panam, J. (2000). Respuesta de la OPS al peligro de las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes. *Rev Panam Salud Pública*, 7(4), 278-282.
- Palacios, M. (2013). Texto digital de farmacognosia y fitoquímica. Universidad Católica de Chimbote. Facultad de Ciencias de la Salud. Perú. Recuperado de: http://www.academia.edu/5271729/UNIVERSIDAD_CAT%C3%93LICA_LOS_ANGELES_DE_CHIMBOTE_FACULTAD_DE_CIENCIAS_DE_LA_SALUD_ESCUELA_PROFESIONAL_DE_FARMACIA_Y_BIOQU%C3%8DMICA_TEXTO_DIGITAL_DE_FARMACOGNOSIA_Y_FITOQU%C3%8DMICA.
- Palacios, M. (s/f). Metabolitos primarios y secundarios. Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. Recuperado de: http://files.selvafarma.webnode.es/200000192-6def76ee8d/TEMA_04.pdf.
- Parella, S. & Martins, P. (2010). *Metodología de la investigación cuantitativa*. (3a. ed.). Caracas: FEDUPEL.
- Pastorello, M., Ciangherotti, C., Varela, M., López-Gramko, J., Orsini, G. & Israel, A. (2012). Actividad antiinflamatoria y analgésica del extracto acuoso de la raíz de *Ruellia tuberosa* L. *Revista Facultad de Farmacia*, 75(1).

- Pedraza, P. & Castellanos, H. (2009). *Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibioticos de administración intravenosa a través de métodos IN VITRO*. (Tesis de Grado). Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. Recuperado de: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis326.pdf>
- Pérez, I. (2008). Uso de Plantas Medicinales. *Revista Intercultural*, 23-26. Veracruz, México. Recuperado de: http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/8921/1/tra6_p23-26_2010-0.pdf.
- Riverón, R. (2002). Enfermedades emergentes y reemergentes: un reto al siglo XXI. *Revista Cubana de Pediatría*, 74(1), 7-22.
- Rajesh, P., Latha, S., Selvamani, P. & Rajesh-Kannan, V. (2010). Phytochemical screening and toxicity studies on the leaves of *Capparis sepiaria* Linn. (Capparidaceae). *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 01(01), 41-46.
- Samy, M., Sugimoto, S., Matsunami, K., Otsuka, H. & Kamel, M. (2015). Componentes químicos y actividad biológica del genero *Ruellia*. *International Journal of Pharmacognosy*, 2(6), 270-279. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Mamdouh_Samy/publication/280114487_Chemical_Constituents_and_Biological_Activities_of_Genus_Ruellia/links/55aadc3b08ae481aa7fbcc72.pdf.
- Samy, M., Sugimoto, S., Matsunami, K., Otsuka, H., Khalil, H. & Kamel, M. (2015). Estudios biológicos sobre constituyentes químicos de *Ruellia patula* y *Ruellia tuberosa*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(1), 64-67. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Mamdouh_Samy/publication/277510196_Biological_studies_on_chemical_constituents_of_Ruellia_patula_and_Ruellia_tuberosa/links/556e2ecd08aeab777226a251.pdf.
- Sánchez, M. (s/f). ¿Qué son las inflorescencias?. *JardineriaON*. Recuperado de: <https://www.jardineriaon.com/que-son-las-inflorescencias.html>.
- Shaibu, M., Saka, S., Alhaji, I., Abba, K., Shuaibu, A., & Ibrahim, A. (2014). Preliminary phytochemical and elemental analysis of aqueous and fractionated pod extracts of *Acacia nilotica* (Thorn mimosa). *Veterinary Research Forum*, 5(2), 95-100.
- Shyamala-Gowri, S. & Vasantha, K. (2010). Phytochemical screening and antibacterial activity of *Syzygium cumini* (L.) (Myrtaceae) leaves extracts. *Int. J. Pharm Tech Res.*, 2(2), 1569-1573.
- Singh, R., Pandey, H., Pandey, R. & Singh, B. (2002). A Triterpenoid from *Ruellia tuberosa* Linn. *Indian J Chem*, 41(B), 1754-1756.

- Solomon, E. P., Berg, L. R. & Martin, D. W. (2004). *Biology*. EEUU: Cengage Learning.
- Suarez, M. (2009). Ayer y hoy de las plantas medicinales. Cuba. Recuperado de: <http://www.sld.cu/sitios/rehabilitacion/temas.php?idv=856>.
- Sussmann, O., Mattos, L. & Restrepo, A. (2013). Resistencia bacteriana. *Univ Med. Enero*, 43(1), 20-26.
- Telma, J. (2011). Petunia Silvestre (*Ruellia Tuberosa*). México. Recuperado de: <https://telmajr.wordpress.com/tag/plantasmedicinales/page/5/?iframe=true&preview=true%2Ffeed%2F>.
- Urtiaga, R. (1986). *Índice de enfermedades en plantas de Venezuela y Cuba*. Barquisimeto.
- Vadlapudi, V. & Kaladhar, D. (2012). Antimicrobial study of plant extracts of *Datura metel* L. against some important disease causing pathogens. *Asian Pac. J. Trop. Dis*, 94-97.
- Vélez, M., Campos, R. & Sánchez, H. (2014). Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17, 489 – 499.
- Wagner, H., Danniger, H., Iyengar, N., Seligrau, O., Farkas, L., Subramannian, S. & Nair, A. (1971). Apigenin glycoside from *Thunbergia fragrans* and *Ruellia tuberosa*. *Chem. Ber*, 104, 2681.
- Wiat, C., Hannah, M., Yassim, M., Hamimah, H. & Sulaiman, M. (2005). Anti-microbial activity of *Ruellia tuberosa* L. *American Journal of Chinese Medicine*, 33(4), 683–685.