



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
CÁTEDRA COMPONENTE DE  
INVESTIGACIÓN  
TRABAJO DE GRADO II  
MÉRIDA - VENEZUELA



[www.bdigital.ula.ve](http://www.bdigital.ula.ve)  
**Actividad Antibacteriana y Tamizaje Fitoquímico de los  
Frutos de *Duranta erecta* (Verbenaceae)**

**Autor:** Soto Abreu Yandira

CI: 20.397.150.

**Tutora:** Prof. Alida Pérez.

**Mérida, 2019**



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA  
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
CÁTEDRA COMPONENTE DE  
INVESTIGACIÓN  
TRABAJO DE GRADO II  
MÉRIDA - VENEZUELA



**Actividad Antibacteriana y Tamizaje Fitoquímico de los  
Frutos de *Duranta erecta* (Verbenaceae)**

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

Trabajo de Grado para Optar al Título de Licenciada en Bioanálisis

**Autor:** Soto Abreu Yandira

CI: 20.397.150.

**Tutora:** Prof. Alida Pérez.

**Mérida, 2019**

## Dedicatoria

A Dios Todopoderoso por bendecirme cada día, acompañarme y guiarme siempre a lo largo de este camino, darme fortaleza y ánimo para seguir adelante y no permitirme desmayar en los problemas, enseñándome a encarar las adversidades sin perder las fuerzas, ni desfallecer en el intento.

A mis padres Yajaira Abreu y Freddy Soto por el apoyo, esfuerzo y amor incondicional e inmensurable, por ser el pilar fundamental de mi vida, formadores de mis valores morales y espirituales, quienes son mi guía y mi aliento en cada momento, gracias por estar siempre, esta meta es para ustedes. A mis hermanos por siempre estar apoyándome y acompañándome, por ser mi ayuda fiel en todo momento, los Amo.

A mi abuela Cecilia, por todo su apoyo, ayuda y amor incondicional en todo momento, por sus consejos y palabras de aliento.

A mi tíos y cada uno de mis familiares que estuvieron brindándome su apoyo durante estos años, por el respaldo, por estar siempre cuando los necesité.

A todos mis amigos por el apoyo mutuo, las palabras de aliento, respaldo y amistad ofrecida.

¡A todos ustedes, Gracias!

## **Agradecimientos**

A Dios mi fiel compañero, a la Virgen María y al Santo Niño de la Cuchilla, quienes supieron guiarme y darme la fortaleza para culminar esta meta.

A nuestra alma mater, Universidad de los Andes, por abrirnos sus puertas y permitirnos adquirir conocimientos invaluableles y experiencias inolvidables. A la Facultad de Farmacia y Bioanálisis y profesores miembros, por los conocimientos impartidos, acertada orientación y constante estímulo con lo cual forman parte importante de este logro académico.

A mi estimada profesora Alida Pérez Colmenares tutora de esta investigación, quien con su arduo trabajo, asesoría y dedicación se logró la culminación de este Trabajo de Grado, a usted mi agradecimiento.

Al Departamento de Bioquímica y al Instituto de Investigaciones por los espacios prestados, e igualmente a todos nuestros profesores asesores encargados de la elaboración y corrección de este trabajo.

¡A todos ustedes, Gracias!

## ÍNDICE DE CONTENIDO

Dedicatoria .....	iii
Agradecimientos .....	iv
RESUMEN.....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
<b>CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....</b>	<b>15</b>
Planteamiento del problema .....	15
Justificación de la Investigación.....	17
Objetivos de la Investigación .....	18
Objetivo General .....	18
Objetivos Específicos .....	18
Alcances y Limitaciones de la Investigación .....	19
Alcances de la Investigación .....	19
Limitaciones de la Investigación .....	19
<b>CAPITULO II. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>20</b>
Trabajos Previos .....	20
Bases Teóricas.....	22
Familia Verbenaceae .....	22
Aspectos botánicos .....	22

Distribución geográfica.....	24
Composición química.....	24
Actividad biológica .....	26
Género <i>Duranta</i> .....	28
Aspectos Botánicos.....	28
Composición química.....	28
Actividad farmacológica .....	29
<i>Duranta erecta</i> .....	29
Aspectos Botánicos.....	30
Composición química.....	31
Actividad farmacológica.....	32
Productos naturales .....	33
Biosíntesis de productos naturales.....	34
Extracto vegetal .....	37
Técnicas de obtención de los extractos.....	39
Estudio fitoquímico.....	40
Análisis fitoquímico preliminar .....	40
Bacterias .....	42
Bacterias Gram positivas .....	42
Género <i>Staphylococcus</i> .....	43

<i>Staphylococcus aureus</i> .....	43
<i>Enterococcus faecalis</i> .....	44
Bacterias Gram negativas .....	45
Familia Enterobactereoceae.....	46
Familia Pseudomonadaceae .....	47
Actividad antibacteriana .....	48
Evaluación de la actividad antibacteriana.....	49
Resistencia a los antibacterianos .....	52
Mecanismo de resistencia a los antibacterianos.....	52
Resistencia natural.....	53
Resistencia adquirida .....	54
Antibióticos.....	57
<b>Mecanismos de acción de los antibacterianos</b> .....	57
Definición de términos .....	60
Concentración Mínima Inhibitoria .....	60
Infección.....	60
Metabolitos.....	60
Operacionalización de las Variables.....	61
Hipótesis .....	63
<b>CAPITULO III. MARCO METODOLÓGICO.....</b>	<b>64</b>

Tipo de investigación.....	64
Diseño de investigación.....	64
Población y muestra .....	65
Unidad de Investigación .....	65
Selección del Tamaño de la Muestra .....	65
Sistema de Variables .....	65
Procedimientos de la investigación.....	66
Colocación de los discos impregnados .....	73
Preincubación e incubación de las placas .....	73
Lectura de las placas .....	73
<b>CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>75</b>
Resultados .....	75
Discusiones .....	83
<b>Capítulo IV. Conclusiones y Recomendaciones.....</b>	<b>85</b>
Conclusiones.....	85
Recomendaciones.....	86
<b>BIBLIOHEMEROGRAFÍA .....</b>	<b>87</b>

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación Taxonómica de <i>Duranta erecta</i> . .....	30
Tabla 2. Operacionalización de la variable independiente. ....	62
Tabla 3. Operacionalización de la variable dependiente. ....	62
Tabla 4. Bacterias empleadas para el estudio de la actividad antibacteriana de la especie <i>D. erecta</i> . ....	70
Tabla 5. Diluciones empleadas para la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de la especie <i>D. erecta</i> . ....	72
Tabla 6. Antibióticos empleados como control positivo para el estudio de la actividad antibacteriana .....	72
Tabla 7. Metabolitos identificados mediante el tamizaje fitoquímico. ....	76
Tabla 8. Halos de inhibición de los controles positivos usados como referencia en las cepas bacterianas .....	79
Tabla 9. Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos etanol y hexano de la especie <i>D. erecta</i> .....	80

## Índice de Figuras

Figura 1. Diodantunezona.....	25
Figura 2. Algunos triterpenos de la Familia Verbenaceae.....	26
Figura 3. Algunos Flavonoides de la Familia Verbenaceae.....	26
Figura 4. Hojas y frutos de <i>Duranta erecta</i> . Tomado de “Cuidados de la planta <i>Duranta repens</i> , <i>Duranta erecta</i> o Flor celeste” por Guerrero M, 2014. ....	31
Figura 5. Algunos compuestos obtenidos de la especie <i>D. erecta</i> . ....	32
Figura 6. Pared celular de las bacterias Gram positivas. ....	43
Figura 7. Bacteria Gram positiva <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	44
Figura 8. Bacteria Gram positiva <i>Enterococcus faecalis</i> .....	45
Figura 9. Pared celular de las bacterias Gram negativas.....	46
Figura 10. Bacteria Gram negativa <i>Escherichia coli</i> .....	47
Figura 11. Bacteria Gram negativa <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	47
Figura 12. Bacteria Gram negativa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . ....	48
Figura 13. Identificación de esteroides y triterpenos: Prueba de Lieberman Bourchard.....	77
Figura 14. Identificación de taninos: Reacción de cloruro férrico. ....	77
Figura 15. Identificación de flavonoides: Reacción de Shinoda.....	77
Figura 16. Identificación de saponinas: Prueba de la espuma. ....	77
Figura 17. Identificación de taninos: prueba de la gelatina.....	77

## Índice de Esquema

Esquema 1. Plan de Trabajo .....	74
----------------------------------	----

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

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

Actividad antibacteriana y tamizaje fitoquímico de los frutos de  
***Duranta erecta*** (Castor Durante)

**Autor:** Soto Abreu. Yandira Isbell.

**Tutora:** Prof. Alida Pérez.

**RESUMEN**

www.bdigital.ula.ve

En la presente investigación se determinó la composición química y la actividad antibacteriana de los extractos de los frutos de *Duranta erecta*. Los extractos de los frutos se prepararon mediante la técnica de maceración en frío, con solventes de polaridad creciente (hexano y etanol), las soluciones se concentraron hasta sequedad. La determinación cualitativa de metabolitos secundarios, se realizó mediante screening fitoquímico, identificando la presencia de esteroides y triterpenos en los extractos de hexano y etanol, así como la presencia de compuestos fenólicos, saponinas y taninos solo en el extracto de etanol. La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de Kirby-Bauer (difusión en agar con disco) frente a cepas ATCC de *E. faecalis*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli*, el extracto etanólico, inhibió el desarrollo de *E. faecalis*, *K. pneumoniae* y *E. coli* a una CIM de 15,65 µg/mL y para *P. aeruginosa* una CIM de 500 µg/mL. Así mismo el extracto de hexano, presentó actividad frente *E. faecalis* y *P. aeruginosa* con una CIM de 500 µg/mL, del mismo modo, fue activo contra a *K. pneumoniae* y *E. coli* con una CIM de 15,65 µg/mL para ambas especies.

**Palabras claves:** *Duranta erecta*, Actividad antibacteriana, tamizaje fitoquímico.

## INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales nació con el hombre, desde tiempos prehistóricos hasta comienzos del siglo XIX, donde se utilizaron por ensayo y error. Esta práctica médica pasó y se perfeccionó de generación en generación, por lo que se le denominó medicina tradicional (Lizcano y Vergara, 2008).

La mayoría de las plantas medicinales presentan efectos fisiológicos múltiples debido a que poseen más de un principio activo, éstos corresponden a compuestos químicos propios de la planta, es por esto que existe un gran interés por parte de los investigadores en estudiar los métodos y sustancias naturales que posean propiedades antibacterianas contra microorganismos patógenos (Aricapa, 2009).

La prevalencia de las enfermedades infecciosas se produce en respuesta a los cambios ecológicos globales, al comportamiento humano irracional, a los cambios y adaptaciones microbianas y a la crisis en las medidas de salud pública, que a su vez han generado el fenómeno de resistencia a los antibióticos en cepas patógenas bacterianas, que es un problema a nivel mundial (García, 2006).

Además, el uso inadecuado e indiscriminado de antibióticos en el control y prevención de enfermedades ha provocado la aparición de nuevas formas clínicas, así como localizaciones no habituales y diseminación de nuevos mecanismos de resistencia antibacteriana, lo que justifica los diferentes cambios en el perfil de sensibilidad y resistencia presentados por los agentes etiológicos de infecciones nosocomiales (Torres, 2014).

La OMS ha reconocido la necesidad de elaborar nuevos antibacterianos capaces de combatir agentes patógenos resistentes y señalan que esto tiene

vital importancia si se desea reducir la repercusión de la resistencia antimicrobiana en un futuro (OMS, 2011).

En este sentido, la investigación está dirigida al estudio de nuevos aportes provenientes de las plantas, como es el caso de *Duranta erecta* perteneciente a la familia Verbenaceae, la cual es una planta utilizada con fines ornamentales en jardines tropicales y subtropicales de todo el mundo, posee diversas propiedades farmacológicas como actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica (Ogbuagu y col, 2015).

Este trabajo de investigación está estructurado en V capítulos. El capítulo I, denominado El Problema, contiene los siguientes elementos: Planteamiento del Problema, Hipótesis, Objetivos y Justificación de la investigación. El Capítulo II o Marco Teórico abarca: Trabajos previos, Bases Teóricas, Definición de Términos y Operacionalización de las Variables. El Capítulo III o Marco Metodológico comprende: Tipo de investigación, Diseño de la Investigación, Población y Muestra, Procedimiento de la investigación. El capítulo IV: Resultados y Discusiones. Y por último el capítulo V: Conclusiones y Recomendaciones. Al final se ordenó la Bibliohemerografía.

# **CAPÍTULO I**

## **EL PROBLEMA**

### **Planteamiento del problema**

Uno de los problemas más importantes que afecta la salud pública a nivel mundial, es el incremento de resistencia bacteriana a los antibióticos sintéticos utilizados comúnmente, por lo tanto, las dificultades en los tratamientos de las enfermedades infecciosas ha ido incrementando (García, 2015).

La resistencia a los antibacterianos (o farmacorresistencia) se produce cuando los microorganismos, sean bacterias, virus, hongos o parásitos, sufren cambios que hacen que los medicamentos utilizados para curar las infecciones dejen de ser eficaces. Los que son resistentes a la mayoría de los antibacterianos se conocen como multiresistentes. Dicho fenómeno, es muy preocupante porque las infecciones por estos, pueden causar la muerte del paciente, transmitirse a otras personas y generar grandes costos tanto para los pacientes como para la sociedad. La resistencia a los antibacterianos es el término más amplio ante los diferentes tipos de microorganismos y abarca a los medicamentos antibacterianos, antivirales, antiparasitarios y fungicidas (OMS, 2011).

Por consiguiente, la resistencia a los antibacterianos se ve facilitada por el uso inadecuado de los medicamentos, como, por ejemplo, cuando se

toman dosis insuficientes o no se finalizan los tratamientos prescritos. Los medicamentos de mala calidad, las prescripciones erróneas y las deficiencias de la prevención y el control de las infecciones son otros factores que facilitan la aparición y la propagación de la farmacorresistencia. La falta de empeño de los gobiernos en la lucha contra estos problemas, las deficiencias de la vigilancia y la reducción del arsenal de instrumentos diagnósticos, terapéuticos y preventivos también dificultan el control de la farmacorresistencia (OMS, 2011).

Por tal razón, se mantiene la investigación de nuevos agentes antibacterianos con el fin de superar las dificultades de resistencia bacteriana. Las plantas aportan una gran cantidad de compuestos químicos con actividad antibacteriana; los metabolitos secundarios de las plantas han ganado un creciente interés debido a su posible uso como agentes antibacterianos y antioxidantes, pues muchos tratamientos medicinales a base de plantas fueron y son extraordinariamente eficaces, debido a su contenido de fitoquímicos y a su poco o nulo efecto tóxico (García, 2015).

Es por ello, que existe la necesidad de estudiar los principios activos y metabolitos secundarios de las plantas, realizando un tamizaje fitoquímico de las mismas (García, 2015).

Cabe resaltar, que hay pocos trabajos realizados sobre *Duranta erecta*, haciéndose mucho más importante su estudio, es por ello que se plantea determinar la actividad antibacteriana y la composición química de los frutos de esta especie. Tomando en cuenta lo anteriormente expuesto, se formula lo siguiente:

¿Cuál es la relación entre la actividad antibacteriana y la composición química de los frutos de *Duranta erecta*?

## Justificación de la Investigación

La resistencia a los antibacterianos y su incidencia en los últimos años a nivel mundial, es uno de los principales problemas al combatir una enfermedad causada por bacterias. Actualmente, hay gran número de antibióticos disponibles para el clínico, aunque se dan casos de carencia de tratamiento efectivo en algunas infecciones, ya que los agentes antibacterianos son incapaces de eliminar diversas cepas o dichos microorganismos han desarrollado múltiples mecanismos que les permite resistir a la acción de los más nuevos y potentes antibacterianos (García, 2015).

En la actualidad ha surgido la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas, esto debido a que las bacterias han creado mecanismos que las hacen microorganismos multiresistentes, lo que resulta en un problema de salud pública que se acrecienta cada día más. Por consiguiente, las plantas han sido utilizadas, porque ofrecen una gran variedad de beneficios y propiedades para el organismo principalmente para el tratamiento y alivio de diversas afecciones, trastornos o molestias (Rodríguez, 2017).

En este sentido, ha aumentado el interés por los agentes antibacterianos de origen natural ya que brindan numerosas ventajas, puesto que son menos tóxicos para el organismo y de menor costo lo que los hace más accesibles para la humanidad. Entre los beneficios de los productos naturales, se puede mencionar que han sido utilizados como antibacterianos, antiinflamatorios, antioxidantes, diuréticos, antipiréticos, tranquilizantes entre otros (García, 2015).

Los productos naturales como agentes antibacterianos son aquellos que provienen de las plantas y que son capaces inhibir el crecimiento de los microorganismos o de eliminarlos. Por tal razón, sus usos dependen del lugar afectado y de la enfermedad concreta como por ejemplo: antibacterianos

naturales para heridas, infecciones de garganta, genitourinarias, conjuntivitis, otitis, afecciones dermatológicas, entre otras más (García, 2015).

En este orden de ideas, el estado Mérida posee plantas medicinales cuyas propiedades no han sido estudiadas por completo, y con el objetivo de obtener conocimiento en cuanto a las posibles propiedades farmacológicas se ha seleccionado la planta medicinal *Duranta erecta* perteneciente a la familia Verbenaceae, que posiblemente pueda tener propiedades antibacterianas.

Esta investigación se basó en evaluar la actividad antibacteriana de los extractos de la planta *Duranta erecta* contra bacterias patógenas utilizando el método de difusión del disco en agar (Prueba de Kirby-Bauer).

### **Objetivos de la Investigación**

www.bdigital.ula.ve

#### **Objetivo General**

Determinar los metabolitos secundarios y la actividad antibacteriana de los extractos de los frutos de la especie *Duranta erecta*.

#### **Objetivos Específicos**

- Obtener los extractos mediante el método de maceración en frío de los frutos de la especie *D. erecta* utilizando solventes de polaridad creciente (hexano y etanol).
- Identificar cualitativamente la composición química de los extractos preparados previamente mediante pruebas de coloración y/o precipitación.

- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos anteriormente descritos frente a cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas utilizando el método de difusión en agar.
- Establecer la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos de los frutos de la especie *D. erecta*.

## **Alcances y Limitaciones de la Investigación**

### ***Alcances de la Investigación***

Determinar la composición química y la actividad antibacteriana de los extractos de los frutos de *D. erecta* para proporcionar nuevos datos de posibles fuentes de principios activos para la industria farmacéutica que podrían ser utilizados para la elaboración de nuevos antibióticos y erradicación de enfermedades causadas por estos microorganismos.

### ***Limitaciones de la Investigación***

Para esta investigación la limitación estuvo determinada por las constantes fallas de electricidad e internet impidiendo completar y conseguir la información, así como el rápido desarrollo de la parte experimental por el uso de materiales y equipos que necesitan del sistema eléctrico, agua y gas. En este sentido, se puede mencionar, además el elevado costo de los insumos y reactivos para culminar el presente trabajo.

## CAPITULO II

### MARCO TEÓRICO

#### Trabajos Previos

Luna, A. (2015), realizó una investigación titulada “Estudio Fitoquímico de Espino Chivo (*Duranta triacantha*)”. Escuela Superior Politécnica De Chimborazo. Facultad De Ciencias, Escuela De Bioquímica Y Farmacia. Riobamba-Ecuador, con el objetivo de extraer, purificar e identificar metabolitos secundarios, utilizando métodos cromatográficos; la especie vegetal recolectada en el cantón Guano, se preparó por maceración en etanol, se concentró y determinó las propiedades físicas y químicas, resultando un extracto líquido verdoso dulce, con densidad 0,985 g/mL, pH= 5,89 e índice de refracción 1,362 y por pruebas colorimétricas presentó los grupos funcionales de sesquiterpenolactonas, alcaloides, benzoquinonas y taninos. Para la purificación cromatográfica se preparó el subextracto clorofórmico y subsubextracto hexánico, después de realizar cromatografías en columna, microcolumna y placas preparativas con cortes de bandas se logró el aislamiento de 1,3,4,7-tetrahidroxi-9,10-antraquinona, 1'5'-oxi-7-hidroxi-flavona y 7-hidroxi-flavananol. Este estudio fitoquímico comprueba la presencia de flavonoides cuyas propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antisépticas benefician la piel.

De la misma manera, Ogbuagu y col (2015), publicaron un artículo denominado “Determinación Cuantitativa de Algunos Metabolitos Secundarios y Efectos Anti-bacterianos de los Extractos de *Duranta erecta*”.

Departamento de Química Pura e Industrial, Facultad de Ciencias Físicas, Universidad de Nigeria. Los análisis se realizaron sobre extracto de metanol y de hexano de las hojas de *Duranta erecta* para determinar cualitativa y cuantitativamente la presencia de metabolitos. El cribado fitoquímico mostró en el extracto metanólico la presencia de taninos (0,49 mg / 100 g), flavonoides (0,85 mg / 100 g), alcaloides (0,14 mg / 100 g) y saponinas (0,78 mg / 100 g), mientras que el extracto de *n*-hexano presentó alcaloides (0,18 mg / 100 g) y flavonoides (1,70 mg / 100 g). La actividad antibacteriana de los extractos se evaluó frente a algunas bacterias patógenas humanas; *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella Typhi* y *Bacillus cereus* a 600 mg/mL, 300 mg/mL, 150 mg/mL y 75 mg/mL, por el método de difusión de agar. El resultado de la actividad antibacteriana mostró actividades contra el crecimiento de *Proteus mirabilis* (CIM 129 mg/mL), *Bacillus subtilis* (CIM141 mg/mL), *Salmonella Typhi* (CIM 81 mg/mL) y *Bacillus cereus* (CIM 100 mg/mL) mientras que el extracto de *n*-hexano no mostró ninguna actividad contra el crecimiento de las bacterias ensayadas.

Por otro lado, Bangou (2012), presentó un artículo denominado "Actividades Antioxidantes y Antibacterianas de Cinco Especies de *Verbenaceae* de Burkina Faso". Laboratorio de Bioquímica y Química Aplicada (LABIOCA), Universidad de Burkina Faso, África. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar las actividades antioxidantes y antibacterianas de los extractos de metanol de cinco especies de la familia *Verbenaceae* y para cuantificar sus polifenoles. La actividad antibacteriana se midió en bacterias serotipadas y bacterias patógenas, utilizando el método de difusión de placas de agar. En conjunto *Duranta erecta* L. dio la mejor actividad antioxidante y antibacteriana (22,33 mm del halo de inhibición) a concentración de 25 µg/mL. Este resultado se obtuvo en bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus epidermidis*. Estos hallazgos podrían justificar parcialmente los usos tradicionales de esta planta.

En el mismo orden de ideas, McConnell y col (2010), presentaron un artículo titulado “Evaluación de la Actividad Larvica de los Extractos Foliare de *Duranta erecta* Linn. (Verbenaceae) sobre las Larvas de *Culex quinquefascitatus*”. El presente estudio se realizó para evaluar la propiedad insecticida de los extractos de metanol (ME) y agua (AqE) de las hojas de *Duranta erecta* contra Larvas de *Culex quinquefascitatus*, el cual es vector principal de la filariasis, enfermedad parasitaria de la India. El cribado fitoquímico preliminar de los extractos mostró la presencia de azúcares, taninos, saponinas, esteroides, alcaloides, fenoles, flavonoides, glicósidos y triterpenos. Ambos extractos de *Duranta erecta* tuvieron actividad larvica.

## **Bases Teóricas**

### **Familia Verbenaceae**

Las Verbenáceas incluyen más de 30 géneros y alrededor de 1200 especies herbáceas, arbustos o árboles, distribuidas principalmente en zonas tropicales. Se destacan los géneros *Aloysia*, *Duranta*, *Lantana*, *Lippia*, *Petrea*, *Phyla* y *Verbena*, entre otros (Martínez y col, 2014).

### **Aspectos botánicos**

Estas especies generalmente se encuentran en formas de hierbas, arbustos, árboles de pequeño tamaño y algunas lianas, siendo varios miembros xerofíticos y espinosos. Hojas: generalmente opuestas, enteras o divididas; sin estípulas y en ocasiones muy reducidas, lo que se compensa por el carácter asimilador de los tallos. Flores: generalmente zigomorfas a

subactinomorfos, perfectos, dispuestos en inflorescencias racimosas (Múlgura, 2003).

Son plantas herbáceas, arbustivas o arborescentes, a veces trepadoras con frecuencia aromáticas al estrujarse, por lo general provistas de diferentes tipos de pubescencia; tallos y ramas a menudo cuadrangulares y/o huecos en su interior; hojas opuestas o verticiladas, rara vez alternas, desprovistas de estípula, sésiles o pecioladas, laminas por lo común simples, de borde frecuentemente serrado o crenado a más o menos profundamente lobado o partido; inflorescencias esencialmente de tipo racemoso, en forma de espigas o racimos espiciformes, en ocasiones con las flores algo inmersas en el raquis, a veces condensadas a manera de cabezuelas, generalmente bracteadas; flores normalmente hermafroditas, ligera a marcadamente zigomorfas; cáliz gamosépalo, usualmente con 4 ó 5 (a veces hasta 8) dientes o lóbulos, por lo común persistente y acrescente en la fructificación; corola tubulosa, a menudo hipocraterimorfa, a veces infundibuliforme, abriéndose en un limbo con 4 ó 5 lóbulos más o menos desiguales entre sí, estambres insertos en el tubo corolino, comúnmente inclusos, por lo general 4, leve a notablemente didínamos, en ocasiones 2, a veces acompañados por 1 ó 2 estaminodios; ovario frecuentemente sobre un disco basal, súpero, por lo común bicarpelar, en ocasiones tetracarpelar, bi- o tetralocular, con un óvulo en cada lóculo, estilo casi siempre terminal, estigma entero o con más frecuencia bi- o tetralobado, a veces oblicuo o con las ramas muy desiguales, por lo común incluso; fruto seco o carnoso, que puede permanecer cerrado o se abre en 2 ó 4 mericarpios; semilla por lo común 1, rara vez 2 por mericarpio, por lo general desprovista de endosperma. Numerosos representantes de la familia se cultivan en calidad de ornamentales, entre ellos *Duranta repens* L (espino blanco) (Rzedowski y Calderón, 2002).

Este grupo de plantas presenta una taxonomía sumamente complicada, en donde la circunscripción, tanto de la propia familia, como de muchos de

sus géneros y especies es incierta. Siguiendo el criterio moderno, aceptado en el trabajo sintético de Thorne, se restringe en esta flora el concepto de la familia Verbenaceae solamente a lo que con anterioridad se consideraba como subfamilia *Verbenoideae*, a exclusión de los géneros *Callicarpa*, *Clerodendron* y *Tetraclea*, que pasan a formar parte de las Labiatae (Rzedowski y Calderón, 2002).

### **Distribución geográfica**

La distribución de la familia Verbenaceae se considera cosmopolita, con excepción del Ártico, la Antártida, y los desiertos más secos. La familia es más abundante en los Trópicos. Los árboles se encuentran en elevaciones bajas y medias, donde ocupan áreas de bosques abiertos, laderas boscosas, márgenes de bosques, y matorrales de bosques primarios. Los arbustos y hierbas son encontrados en pastizales y sabanas bien drenados, laderas secas, llanuras aluviales y riberas de ríos (Smith y col, 2004).

En Venezuela está representada en todo el territorio nacional desde el nivel del mar hasta los 3.000 y más metros de altura con unos pocos géneros nativos (*Verbena*) o en cultivo (*Aloysia*) (López, 1977).

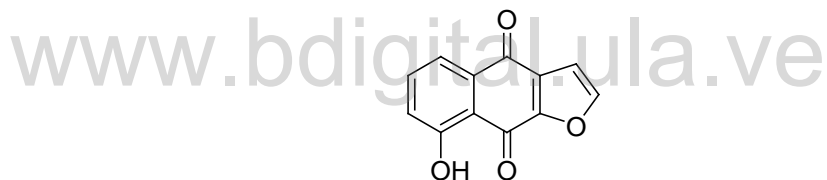
### **Composición química**

La familia Verbenaceae, se caracteriza por tener gran variedad de compuestos químicos. Entre estos se encuentran los monoterpenos como la piperitona y la carvona; monoterpenos oxigenados como el citral; hidrocarburos sesquiterpénicos y sus derivados oxigenados. Esta plantas producen terpenos como el limoneno y compuestos fenólicos (Martínez y col, 2014; Celis y col, 2007).

Se ha verificado la presencia de terpenos, flavonoides, alcaloides y furanonaftoquinonas como diodontunezona (Figura 1) en el extracto hidroalcohólico de especies de esta familia (Galvis, 2014). Otros estudios fitoquímicos han identificado la presencia de triterpenos como el ácido lantanólico (Rodríguez y col, 2012). Además, en un estudio previo del extracto de hexano de *Lantana trifolia* (Verbenaceae) se detectó la presencia de triterpenos y esteroides, mediante diferentes técnicas cromatográficas (Valerino, 2009). A continuación se presentan algunos compuestos aislados de esta familia:

- Furano Naftoquinonas

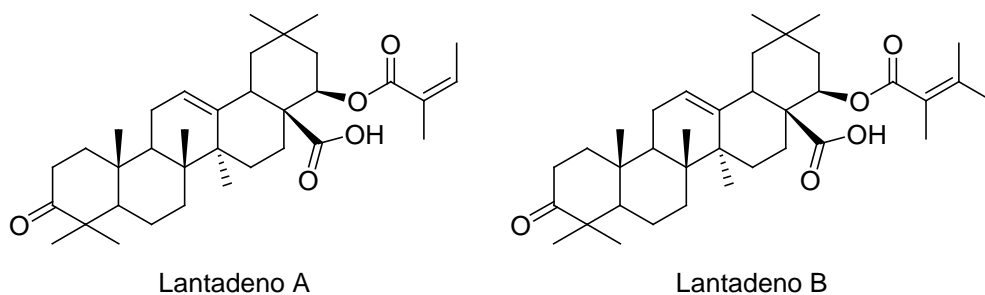
La Diodantunezona (figura 1) se han encontrado en el extracto hidroalcohólico de la especie *Lantana camara* perteneciente a esta familia (Galvis, 2014).

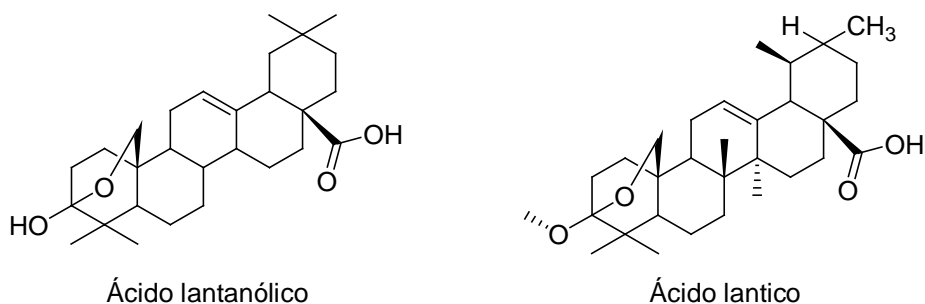


**Figura 1. Diodantunezona**

- Triterpenos

Entre los triterpenos que han sido reportados para la familia Verbenaceae se encuentran Lantadeno A y Lantadeno B, ácido lantanólico y ácido lantico (Figura 2).

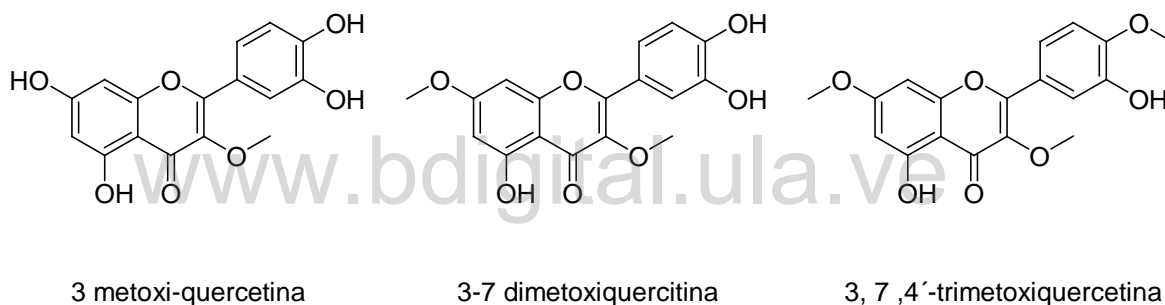




**Figura 2.** Algunos triterpenos de la Familia Verbenaceae

- Flavonoides

Entre los flavonoides que han sido aislado de esta familia se encuentran, 3-7 dimetoxiquercetina y 3, ,4'-trimetoxiquercetina (Figura 3) (Galvis, 2014).



**Figura 3.** Algunos Flavonoides de la Familia Verbenaceae

### Actividad biológica

Varias especies de la familia Verbenaceae, han presentado actividad larvicida (contra las larvas de *Aedes aegypti*), junto con actividades antiplasmódica, insecticida, antifúngica, antioxidante y efectos de relajación muscular (Celis, 2007) y antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli* (Montanari, 2011).

En un estudio del extracto de *Lippia organoides* (Verbenaceae), se determinó un quimiotipo “Felandreno”, rico en flavonoides, particularmente,

en pinocembrina, posee una alta actividad antioxidante, ello se explica, posiblemente, por el contenido alto de flavonoides (Martínez y col, 2014).

Investigaciones han mostrado que el aceite esencial de dicha familia, presenta actividad fungistática contra *Candida albicans* y *Candida krusei* (Rodríguez y col, 2012).

Por otra parte, los aceites esenciales de especies de plantas de la familia Verbenaceae mostraron un efecto protector antioxidante *in vitro*, medido en un sistema lipídico modelo (emulsión del ácido linoleico), igual o mayor que la vitamina E, antioxidantes natural y sintético ampliamente usados en la industria. Siendo el aceite de *L. camara* el más activo de todos, seguido del aceite de *L. alba* (Stashenko y col, 2003).

Además, se han encontrado especies como *Lantana camara* la cual ha sido reportada como una planta invasiva y reconocida alrededor del mundo por sus diferentes usos tradicionales como agente anticancerígeno, agente efectivo contra la dismenorrea y abortivo. De la misma forma se ha reportado actividad antiespasmódico y antipirética (asociada a un alcaloide conocido como lantamina presente en la corteza del tallo y las raíces de esta especie) (Galvis, 2014).

En este sentido, se han obtenido resultados de actividad inhibitoria en promastigotes de *Leishmania chagasi* de los aceites de *Lippia origanoides* y *Lippia alba* pertenecientes a dicha familia. De igual manera, el aceite de *L. origanoides* presento efectos bacteriostáticos, en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, en concentraciones superiores a las concentraciones activas para la amoxicilina, presentando una actividad cercana al 40% de la actividad del antibiótico, para cada bacteria (Celis y col, 2007).

## **Género *Duranta***

*Duranta* es un género que comprende arbustos, pertenece a la familia Verbenácea, la cual presenta cerca de 36 especies; distribuida desde México a América del Sur y las Antillas. Es ampliamente cultivada como planta ornamental en jardines tropicales y subtropicales de todo el mundo, y se ha convertido y naturalizado en muchos lugares. Se considera una especie invasora en Australia, China, Sudáfrica y en varias islas del Pacífico (Arrieta y col, 2014).

### **Aspectos Botánicos**

Son arbustos que alcanzan un tamaño de 2-4 m de alto, con espinas o frecuentemente inermes, de denso follaje color verde claro amarillento con hermosas flores en racimos lilas, blanquecinas o azules, florece a fines de la primavera o principios de verano. Requiere suelo fértil y suelto, riegos moderados, se adapta al sol y semisombra, se reproduce por semillas en primavera o esquejes semileñosos del verano. Las plantas se siembran individualmente o como setos vivos, tanto en parques como en separadores de vías y en jardines (Gómez y González, 2013).

### **Composición química**

Hay pocos estudios con respecto al género *Duranta*, sin embargo, hay informes sobre la presencia de flavonoides, alcaloides, acetofenona, cumarinas, iridoides, diterpenos, triterpenos, saponinas, hidratos de carbono, glucósidos fenólicos, glucósidos esteroides y esteroides (Luna, 2015).

## **Actividad farmacológica**

Se ha demostrado en especies como *Duranta triacantha* que ha sido utilizada para eliminar manchas en la piel, hongos e irritaciones cutáneas. El fruto maduro contiene mucílago, por lo que es utilizado para elaborar cosmético y para tratar quemaduras. La infusión de las hojas, flor y el fruto se ha utilizado para tratar resfríos, fiebre y tos. Además, estudios fitoquímicos comprueban la presencia de flavonoides y taninos cuyas propiedades antioxidantes, antiinflamatorios y antisépticos benefician a la piel, además se aporta con estudios sobre la planta y para su uso comercial en la industria farmacológica y cosmética (Luna, 2015).

Otros estudios bibliográficos indicaron que se han utilizado para dolores de cabeza, dolor de muelas, cicatrización de heridas, diuréticos. También se han investigado actividad antibacteriana, antioxidante, antifúngica (Ogbuagu y col, 2015).

### ***Duranta erecta***

La especie *Duranta erecta* L. también conocida científicamente como *Duranta repens* L y vulgarmente como Flor celeste o Duranta. El nombre genérico fue dado en honor de Castor DURANTE, medico de Roma, que murió en 1599 en Viterbo (López, 1977). Su clasificación taxonómica se indica en la tabla 1.

**Tabla 1. Clasificación Taxonómica de *Duranta erecta*.**

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	
Reino	Plantae
Orden	Lamiales
Phyllum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Familia	Verbenaceae
Género	<i>Duranta</i>
Especie	<i>Duranta erecta</i>

**Clasificación taxonómica.** Tomado de “*Manual para Jardíneros*” por Correa y Palacios, 2010.

### Aspectos Botánicos

Son arbustos que alcanza un tamaño de 2–4 m de alto, con espinas o frecuentemente inermes. Hojas opuestas, simples, obovado-espátuladas a elípticas, 3.2–7 cm de largo y 1.5–3 cm de ancho, ápice agudo (a redondeado), base atenuada, margen entero o con pocos dientes irregulares en la mitad superior, glabrescentes, tricomas cuando están presentes dispersos, cortos y adpresos. Inflorescencia racimos, terminales y axilares, a veces presentándose como panículas, frecuentemente recurvada o péndula, bractéolas 3–4 mm de largo; cáliz angostamente tubular, truncado en el ápice con 5 dientes diminutos de 0.5–1 mm de largo; corola zigomorfa, más o menos hipocrateriforme, azul, lila o blanca, con tubo angosto, estigma diminuto. Fruto estrecho y completamente envuelto por el cáliz acrescente, con apariencia abayada, jugoso (puede ser un poco amargo), amarillo a anaranjado brillante (Rodríguez, 2014).

Los frutos de *D. erecta* se caracterizan por ser amarillos, redondos y dispuestos en racimos colgantes (Figura 9); y al ser ingeridos por el hombre causan somnolencia, fiebre, náusea, vómito y convulsiones. Se describe en la literatura la muerte de niños que han ingerido los frutos presentando además los siguientes síntomas: pupilas dilatadas, pulso rápido, inflamación y enrojecimiento de los labios y párpados (Guerrero, M 2014).

Esta planta se siembra en jardines como ornamental; existen cultivos con diferentes colores de las flores, que atraen a insectos como a las mariposas y los frutos a las aves (Guerrero, M 2014).

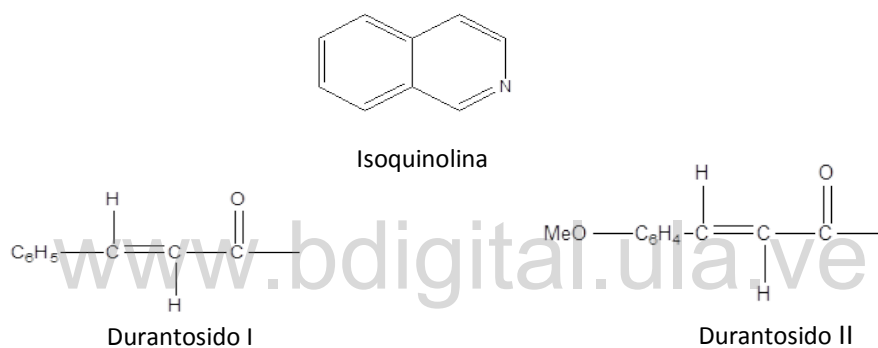


**Figura 4.** Hojas y frutos de *Duranta erecta*. Tomado de “Cuidados de la planta *Duranta repens*, *Duranta erecta* o Flor celeste” por Guerrero M, 2014.

### **Composición química**

Dentro de sus fitoconstituyentes están los alcaloides, flavonoides, glicósidos, compuestos fenólicos, saponinas, esteroides, los taninos y terpenoides, se informan como base de sus propiedades terapéuticas eficaces. Los otros constituyentes importantes que contribuyen a las propiedades remediadoras son el duranteol, la pectolinaringenina, repennoside, repeninas (Ogbuagu y col, 2015).

En el fruto se han identificado los alcaloides, isoquinolina y un derivado de la 5,6-dihidro-7H-2-piridina además de los monoterpenos durantósidos I y II y repenósido. Las hojas y frutos de *Duranta repens* contienen un glicósido saponínico y la presencia de ácido cianhídrico. El monoterpeno durantósido ha sido detectado en hojas y tallos con hojas, además de la amida en la última muestra. Se ha demostrado que la isoquinolina presenta una acción tóxica provocando la muerte de larvas de insectos (Guerrero, 2014). Según estudios hechos por la Dra. Yolanda de Febres Cordero, de la Facultad de Farmacia ULA, se ha comprobado en el fruto ácido benzoico (López, 1977).



**Figura 5.** Algunos compuestos obtenidos de la especie *D. erecta*.

### Actividad farmacológica

Investigaciones han demostrado que *Duranta erecta* tiene actividad antibacteriana contra el crecimiento de *Proteus mirabilis*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella Typhi* (Ogbuagu y col., 2015).

En este sentido, se ha obtenido actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiséptica debido a la presencia de flavonoides y taninos (Luna, 2015).

Además, se ha determinado actividad antibacteriana en bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus epidermidis*. A su vez se determinó actividad antioxidante (Bangou, 2012).

Por otro lado, se ha encontrado actividad antifúngica en los extractos de las hojas específicamente contra todos *los Aspergillus spp.* Pero la actividad fue más alta contra *Aspergillus fumigatus* (Sharma y col, 2012).

En un cribado fitoquímico preliminar de los extractos mostraron la presencia de azúcares, taninos, saponinas, esteroides, alcaloides, fenoles, flavonoides, glicósidos, triterpenos y ácido carboxílico. Ambos extractos de *Duranta erecta* tienen actividad larvívica contra Larvas de *Culex quinquefasciatus* (McConnell y col., 2010),

### **Productos naturales**

Hoy en día, en los países en desarrollo, los extractos de los órganos de las plantas son usados por gran porcentaje de su población como remedios caseros para su atención primaria en salud. Para este propósito, se emplean diferentes partes de las plantas: bulbos, tallos, flores, frutos, semillas y corteza (Rejón y col, 2011). Por este motivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incentiva la obtención de medicamentos a partir de los recursos naturales (Luján y col, 2008).

En la actualidad existe una preferencia casi mayoritaria por parte de la población mundial sobre el uso de los productos naturales en el tratamiento y la prevención de muchas enfermedades, estos han dotado a la industria farmacéutica de muchos de sus compuestos líderes (Álvarez y col, 2008).

En este sentido, los productos naturales, son aquellos compuestos sintetizados por los seres vivos, denominado “producto natural” o “metabolito secundario”, aquel que es propio de una especie, se le conoce también como producto químico, en la mayoría de los casos no tiene utilidad aparente para el ser que lo sintetiza, a diferencia de los metabolitos primarios o productos bioquímicos que presentan una utilidad definida y que son comunes a todos

los seres vivos: carbohidratos, lípidos, proteínas, entre otros (Marcano y Hasegawa, 2002).

La clasificación de los metabolitos secundarios puede hacerse de acuerdo a sus estructuras, a su bioformación, a la fuente de producción o a su acción biológica. En estos casos es inevitable la superposición. Por ejemplo, por ser moléculas generalmente polifuncionales es difícil ubicarlas en un determinado grupo químico, debido a que dos compuestos totalmente diferentes tienen la misma acción, o la misma fuente de producción puede originar simultáneamente compuestos muy distintos. 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 y Hasegawa, 2002).

### **Biosíntesis de productos naturales**

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

Los metabolitos secundarios se forman por distintas vías y como siguiendo el criterio biogénético, una misma clase de compuestos por ejemplo los alcaloides, puede tener varios orígenes (Marcano y Hasegawa, 2002).

Todos los compuestos orgánicos están constituidos por carbono e hidrógeno, a menudo contienen oxígeno y menos frecuentemente azufre, fósforo y halógenos. La formación de los productos naturales comienza con la fotosíntesis que tiene lugar en las plantas superiores, algas y algunas bacterias. Es un proceso endotérmico que requiere de luz solar: aquellos organismos incapaces de absorber la luz, obtienen su energía de la degradación de carbohidratos. Tales compuestos pueden en realidad, ser resultados de sistemas enzimáticos particulares de una dada clase de organismos, que incluyen variedades y/o mutantes que cambian su

metabolismo de acuerdo a las condiciones ambientales (Marcano y Hasegawa, 2002).

Se sabe que la concentración de ciertos metabolitos aumenta cuando el vegetal se encuentra en estado de estrés. Las condiciones biomiméticas: condiciones de laboratorio que tratan de imitar a las producidas por el sistema enzimático, pueden representar ese estado de estrés en el organismo vivo y generar ciertos esqueletos no abundantes y a veces específicos, para la especie bajo estudio. La formación de metabolitos primarios y secundarios en la biosíntesis ocurre a través de reacciones enzimáticas (Marcano y Hasegawa, 2002).

Las plantas sintetizan cientos de compuestos, pero en cantidades menores, encontrándose en estos los metabolitos secundarios (Waizel y Waizel, 2005). Dentro de los metabolitos secundarios se encuentran:

- ✓ **Alcaloides:** son bases orgánicas que se aíslan principalmente de las plantas superiores. Su actividad fisiológica, principalmente a nivel de sistema nervioso, fue el motor de las primeras investigaciones en productos naturales. Algunos se han manifestado como altamente tóxicos, y otros en dosis apropiadas, son drogas comúnmente usadas en medicina (ej. Morfina). Estos compuestos son casi siempre incoloros, sólidos cristalinos (los alcaloides de tabaco son líquidos), y el nitrógeno, casi siempre, forma parte de uno o varios ciclos (Marcano y Hasegawa, 2002).
- ✓ **Taninos:** son polifenoles naturales, que son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en varios sectores del reino de las plantas superiores (Álvarez, 2011). Se pueden dividir en hidrolizables y condensados, en función de que puedan o no ser hidrolizadas. Se han descrito más de 30 taninos que pueden inhibir hongos y bacterias. Son metabolitos secundarios de las plantas, fenólicos, no

nitrogenados, solubles en agua y no en alcohol ni solventes orgánicos. Abundan en la corteza de los robles (Domingo y col, 2003).

- ✓ **Saponinas:** son compuestos preformados de tipo glicósidos, con una o más cadenas de azúcar y de alto peso molecular. Las saponinas han sido intensamente estudiadas en la búsqueda de nuevas alternativas de control de enfermedades (Apablaza y col, 2002). Además, se caracterizan por ser solubles en agua y poseen la propiedad de formar espuma al agitar la solución (Marcano y Hasegawa, 2002).
- ✓ **Flavonoides:** son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, entre otros. 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 a estos deben su color (Martínez y col, 2002).
- ✓ **Terpenos:** Están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y su frecuencia y abundancia están íntimamente ligados a factores genéticos y climáticos. La unidad fundamental que define estos esqueletos contiene cinco átomos de carbono y se le conoce como isoprenol (Marcano y col, 1991).
- ✓ **Triterpenos:** Son los terpenos de 30 carbonos. Son por lo general originados por la unión cabeza-cabeza de dos cadenas de 15 carbonos, cada una de ellas formada por unidades de isopreno unidas cabeza-cola, son componentes de las ceras de las superficies de las plantas, como el ácido oleanólico (Devlin, 2004).
- ✓ **Esteroides:** Son compuestos orgánicos derivados del núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano que se compone de

vitaminas y hormonas formando cuatro anillos fusionados, tres con seis átomos y uno con cinco; posee en total 17 átomos de carbono. En los esteroides esta estructura básica se modifica por adición de diversos grupos funcionales, como carbonilos e hidroxilos (hidrófilos) o cadenas hidrocarbonadas (hidrófobas) (Devlin, 2004).

- ✓ **Fenoles:** Los compuestos fenólicos están formados por un anillo aromático unido por lo menos a un grupo hidroxilo. La estructura más sencilla es la del ácido benzoico, pero con otros sustituyentes en el anillo se forman ácidos fenólicos como el cafeico, ferulico, cumárico y cinámico, comunes en los vegetales. Dicha composición les proporcionan propiedades bactericidas, fungicidas y antivirales. Además, a algunos ésteres de ácidos fenólicos se les atribuye propiedades antitumorales (Bedascarrasbure y col., 2004).
- ✓ **Antraquinonas:** se localizan principalmente en vegetales superiores, hay ejemplos de compuestos provenientes de insectos y de microorganismos. También se aislaron derivados reducidos de antraquinonas como antronas y sus enoles respectivos: antranoles. El ácido acético es aceptado como su precursor biogenético casi exclusivo (Marcano y Hasegawa, 2002).

### **Extracto vegetal**

Es un concentrado que se obtiene al tratar material vegetal con solventes apropiados, tales como agua, alcohol, hexano, diclorometano, entre otros, puede ser una preparación de consistencia líquida (extractos fluidos y tinturas), semisólida (extractos blandos o densos), o sólida (extractos secos), obtenida a partir de drogas vegetales en estado generalmente seco. Se pueden obtener la totalidad o parte de la planta a través de técnicas extractivas como: maceración, lixiviación, digestión, infusión, destilación, decocción, extracción continua (González, A 2004).

En este sentido, el proceso de maceración permite que los principios activos (que son la parte activa de la planta, la que tiene acción “terapéutica”) del vegetal pasan al disolvente. De esta forma, pueden ser utilizados con mucha más facilidad y precisión tanto en la industria farmacéutica, como en la alimenticia (Dewick, 2002). En general, los extractos se pueden clasificar de la siguiente manera (López, 2011):

✓ **Por su consistencia:**

- Líquidos (extractos fluidos o tinturas). Se encuentran en diferentes diluciones.
- Semisólidos (extractos blandos o densos). Suelen ser extractos concentrados, lo que se consigue evaporando parte del disolvente. No es común encontrarlos en las herboristerías.
- Sólidos (extractos secos). El disolvente ha sido completamente evaporado. Se suelen vender como capsulas que contienen dentro el extracto en polvo. Son los más utilizados en la medicina natural, ya que contienen muchos principios activos en poco volumen.

✓ **Por el disolvente utilizado:**

- Hidroalcohólicos: El alcohol parece ser el disolvente más eficaz y, por eso este es el tipo de extracto más comúnmente utilizado en perfumería y en la industria farmacéutica, ya que permiten obtener extractos ricos en sustancias mucilaginosas, taninos, sales, flavonoides, entre otras.
- Oleados: Son obtenidos de plantas con principios liposolubles, tales como esencias, carotenos y pigmentos. Necesitan de la adición de estabilizadores y antioxidantes ya que son sensibles a la oxidación.
- Secos: se obtienen por la concentración de los licores extractivos, mediante evaporización al vacío o por atomización.

## **Técnicas de obtención de los extractos**

Las principales técnicas extractivas son: maceración en frío, lixiviación o percolación, digestión, infusión, destilación, evaporación, separación por disolución y reflujo (Albornoz, 1980).

En la presente investigación se utilizó como técnica para la obtención del extracto la maceración en frío, la cual consiste en remojar el material pulverizado, con el solvente, para que éste penetre la estructura celular y disuelva las sustancias. El material se agita esporádicamente por un periodo mínimo de dos días, y hasta por semanas, al cabo del cual se decanta el líquido, filtrando y exprimiendo el material foliar residual (Albornoz, 1980).

El extracto obtenido anteriormente, se filtra y se concentra para reducir su volumen; al evaporar el solvente, queda un residuo no volátil. Para que se cumpla la evaporación se necesita proveer el calor necesario para aumentar la energía cinética de las moléculas para que abandonen la superficie del líquido. La concentración puede lograrse mediante dos modalidades: evaporación simple y evaporación al vacío, para este trabajo de investigación se utilizó esta última, ya que ofrece las ventajas de recuperar gran parte del solvente y es más rápida. Se utilizan los rotavaporadores, donde el balón contentivo de la mezcla, rota en ángulo sobre agua caliente, lo cual permite que el solvente se desparrame sobre las paredes del balón, ofreciendo mayor superficie de evaporación (Albornoz, 1980).

## Estudio fitoquímico

La fitoquímica comprende el estudio de los metabolitos secundarios de origen vegetal y la metodología que se sigue depende de los objetivos de tales estudios. Hoy en día la fitoquímica se orientan hacia el aislamiento e identificación de compuestos biológicamente activos, especialmente encauzados a atacar dolencias que afectan a toda la humanidad y que cobran a diario más vidas: afecciones cardiovasculares, diabetes; así como otras enfermedades endémicas: malaria tripanosomiasis y otras (Marcano y Hasegawa, 2002).

### Análisis fitoquímico preliminar

Para determinar la presencia de ciertos grupos químicos en una planta se efectúan una serie de pruebas, que dependiendo de las características estructurales y solubilidad puede realizarse la identificación de los mismos. Entre estas pruebas se encuentran:

- ✓ **Ensayo de Liberman-Bourchard (Triterpenos y/o esteroides):** Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por poseer ambos un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo  $\beta$  y en la posición 5-6. Se considera positiva la prueba cuando aparecen coloraciones roja, verde o azul (Martínez y col, 2004).
- ✓ **Prueba de la espuma (saponinas):** Extracto acuoso se agita. La aparición de espumas es indicio de estos compuestos (Marcano y Hasegawa, 2002).
- ✓ **Ensayo de Dragendorff, Wagner y Mayer (alcaloides):** Se basa generalmente en la combinación de los alcaloides con metales

pesados. Se llevan a cabo en solución acuosa ácida. Los reactivos más utilizados para la precipitación de los alcaloides son ácidos de elevado peso molecular. Como el reactivo yodado de Dragendorff (yodo bismutato pótasio, precipitado rojo-naranja); el reactivo de Mayer (mercurio tetrayodado pótasio, precipitado blanco-amarillento) y el reactivo Wagner (yoduro de potasio, precipitado marrón) (Domínguez, 1973).

- ✓ **Ensayo de Hidróxido de amonio (cumarinas):** se basa en la apertura y solubilización en medio básico. Las cumarinas se caracterizan por su intensa absorción de la región UV del espectro, las cuales al ser examinadas a la luz ultravioleta presenta coloración exaltada en presencia de amoniaco (Tamayo y col, 2011).
- ✓ **Ensayo de Bomtrager (quinonas):** La naftoquinonas y antraquinonas libres al ser tratadas con la solución de hidróxido amónico forman complejos de color rojo cereza. Esta reacción es utilizada para la detección directa de quinonas en los extractos vegetales (Tamayo y col, 2011).
- ✓ **Ensayo de Shinoda (flavonoides):** el zinc en polvo reacciona con ácido clorhídrico concentrado. El hidrógeno generado produce por reducción el ión flavilio de color rojo escarlata (Varia desde rosa muy débil hasta el rojo escarlata). Todos los flavonoides, excepto chalconas, auronas e isoflavonas dan positiva esta reacción (Domínguez, 1973).

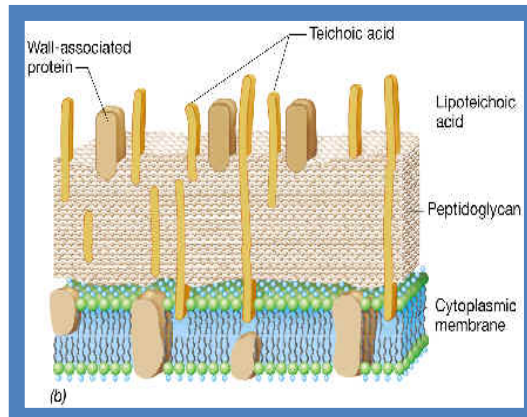
## **Bacterias**

Las bacterias poseen una estructura relativamente simple. Son microorganismos procariotas, es decir, microorganismos unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi, ni retículo endoplásmico; se reproducen por división asexual. La pared celular que rodea las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas: una pared celular grampositiva con una gruesa capa de peptidoglucano y una pared celular gramnegativa con una delgada capa de peptidoglucano, así como una membrana externa. Algunas bacterias carecen de pared celular y compensan su ausencia sobreviviendo tan sólo en el interior de la célula del organismo anfitrión o en un ambiente hipertónico (Murray y col, 2009).

Las bacterias se pueden clasificar según la capacidad de retención de la tinción de Gram (microorganismos Gram positivos y Gram negativos) y por la forma de cada célula (cocos, bacilos, espirilos) (Murray y col, 2009).

### **Bacterias Gram positivas**

Son aquellas que poseen una pared celular gruesa, que consta de varias capas y está formada principalmente por peptidoglucano que rodea la membrana citoplasmática (Figura 6). El peptidoglucano es un exoesqueleto en forma de malla con una función semejante a la del exoesqueleto de los insectos. Sin embargo, y a diferencia de esta última estructura, el peptidoglucano de la célula es lo suficientemente poroso como para permitir la difusión de los electrolitos a la membrana plasmática. La célula Gram positiva puede también poseer otros componentes, como los ácidos teicoicos y lipoteicoicos y polisacáridos complejos (Murray y col, 2009).



**Figura 6.** Pared celular de las bacterias Gram positivas.

Existen gran variedad de bacterias Gram positivas pero se describirán a continuación las empleadas para este estudio o las más importantes desde el punto de vista clínico:

### **Género *Staphylococcus***

En este sentido, los géneros de las bacterias Gram positivas como *Staphylococcus* son catalasa positivos y hasta hace poco formaban parte de la familia *Micrococcaceae* junto a los géneros *Planococcus* y *Stomacoccus*. Tentativamente el género *Staphylococcus* se colocó dentro de la familia *Bacillaceae* junto a otros géneros, *Bacillus*, *Gamella*, *Listeria*, *Planococcus*, entre otros. Los *Staphylococcus* son cocos Gram positivos, inmóviles, aerobios y anaerobios y el diaminoácido en el peptidoglicano es la L-lisina. El género *Staphylococcus* posee alrededor de 30 especies, de las cuales destacaremos *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) (Seija, 2006).

### ***Staphylococcus aureus***

Se destaca como un importante patógeno humano, produce infecciones tanto en la comunidad como a nivel hospitalario. En la comunidad, las infecciones por *S. aureus* (figura 7) son a menudo agudas, piogénicas y

superficiales, aunque también puede producir, con menor frecuencia, infecciones profundas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda. A nivel nosocomial *S. aureus* es un importante agente de infecciones de herida quirúrgica, de prótesis y otras. También *S.aureus* es causa de una serie de infecciones producidas por toxinas como el síndrome del shock tóxico, la intoxicación alimentaria y el síndrome de piel escaldada (Seija, 2006).

**Figura 7.** Bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus*.

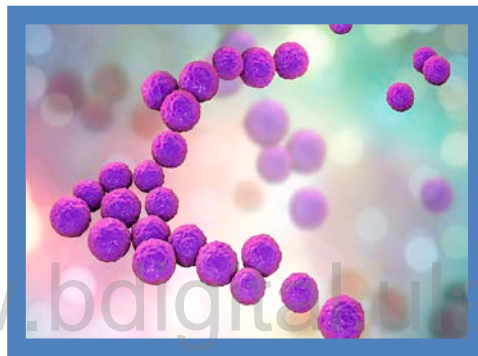


## Enterococcus faecalis

El género *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) es una bacteria Gram positiva comensal (figura 8), que habita el tracto gastrointestinal de humanos y otros mamíferos. Sin embargo puede causar infecciones comprometidas en humanos, especialmente en ambiente hospitalario. La existencia de *Enterococcus* se potencia porque ha tenido la habilidad de adquirir resistencia a prácticamente a todos los antibióticos en uso. El hábitat normal de estos es el tubo digestivo de animales de sangre caliente. Son indicadores de contaminación fecal, por lo que su presencia en los alimentos indica falta de higiene o defectuosas condiciones de conservación, excepto en alimentos en los que interviene como flora bacteriana natural de procesos fermentativos, como es el caso de quesos, embutidos crudos e incluso productos cárnicos. Son muy resistentes a condiciones adversas

(congelación, desecación, tratamiento térmico, entre otros (Murray y col, 2009).

*E. faecalis* es una bacteria inmóvil, anaerobia facultativa y fermenta la glucosa sin producir gas. No presenta una reacción con catalasa en presencia de peróxido de hidrógeno, puede producir una reacción pseudocatalasa si se cultiva en agar sangre, sin embargo ésta es muy débil. *E. faecalis* puede vivir en ambientes extremos que incluyen pH altamente alcalino de 9,6 y elevadas concentraciones de sal (Murray y col, 2009).

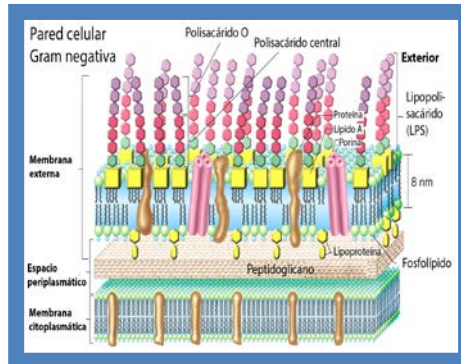


**Figura 8.** Bacteria Gram positiva *Enterococcus faecalis*

### **Bacterias Gram negativas**

Poseen paredes celulares más complejas (tanto desde el punto de vista estructural como químico) que las células Gram positivas. Desde el punto de vista estructural, la pared celular contiene dos capas situadas en el exterior de la membrana citoplasmática. Inmediatamente por fuera de la membrana citoplasmática se encuentra una delgada capa de peptidoglucano que representan tan sólo un 5 % a 10 % del peso de la pared celular. Además, dicha pared no contiene ácidos teicoicos ni lipoteicoicos (Figura 9). Poseen

de manera exclusiva una membrana exterior, ubicada en la parte de afuera de la capa de peptidoglucano (Murray y col, 2009).



**Figura 9. Pared celular de las bacterias Gram negativas.**

Existen gran variedad de bacterias Gram negativas pero se describirán a continuación las empleadas para este estudio.

### **Familia Enterobacteriaceae**

La familia Enterobacteriaceae son bacilos cortos Gram negativos que miden entre 0,5 y 1,5  $\mu\text{m}$  de ancho por 2-4  $\mu\text{m}$  de largo. La mayoría aerobios facultativos y crecen en medios nutritivos sensibles, son flora habitual del tracto gastrointestinal. En medios de cultivos forman colonias mucoides o secas relativamente grandes cuyo hábitat es el tubo intestinal del hombre y los animales. La familia incluye muchos géneros entre ellos: *Escherichia coli* (Figura 10), *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* y otras (Urbina y Villamizar, 2012).

La familia Enterobacteriaceae son anaeróbicas o aeróbicas facultativas, antigénicas complejas y producen diversas toxinas y otros factores de virulencia. Se caracterizan desde el punto de vista bioquímico por la capacidad de sus miembros para reducir los nitratos a nitritos y para

fermentar la glucosa para la producción de ácidos o ácido y gas (Urbina y Villamizar, 2012).



**Figura 10.** Bacteria Gram negativa *Escherichia coli*.



**Figura 11.** Bacteria Gram negativa *Klebsiella pneumoniae*.

### **Familia Pseudomonadaceae**

La familia Pseudomonadaceae, son bacilos especialmente capaces de degradar muchos compuestos distintos, sin embargo no pueden degradar polímeros a monómeros. Son bacterias mesófilas que poseen megaplásmidos de 600 Kb, son megaplásmidos degenerativos porque es en ellos donde se encuentran los genes que se utilizan para degradar los diferentes compuestos. Las bacterias del género *Pseudomonas* son muy ubíquas y se encuentran en suelos, aguas, y ambientes intrahospitalarios.

Son muy resistentes a antibióticos lo que origina que los pocos patógenos que se dan en este género sean muy peligrosos (Murray y col, 2009).



**Figura 12.** Bacteria Gram negativa *Pseudomonas aeruginosa*.

### **Actividad antibacteriana**

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

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

más de 150 componentes. Atribuyéndose la actividad antibacteriana de los aceites esenciales a los terpenoides (Urbina y Villamizar, 2012).

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

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

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antibacterianos es de gran importancia para el correcto manejo de las infecciones clínicas. Las pruebas de sensibilidad o antibiograma, tienen como principal objetivo evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos y su resultado se utiliza como factor predictivo de la eficacia clínica de un tratamiento. Las pruebas de sensibilidad definen la actividad *in vitro* de un antibacteriano frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. Los ensayos de sensibilidad han de estar estandarizados y sujetos a procesos de control que aseguren su reproducibilidad (Herrera, 1999).

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

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

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

**Método de tiras de epsilon:** Es un método alternativo para el estudio cuantitativo de la sensibilidad antimicrobiana, sencillo y se correlaciona bien con el método de dilución en caldo. Consiste en una tira de plástico no porosa que incorpora un ambiente predefinido de antimicrobiano, se inocula la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de Etest sobre su superficie produciéndose la difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar. Tras la incubación se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica (Wayne, 1997).

**Dilución en caldo:** El crecimiento se realiza en un medio líquido, en el que se ha realizado una dilución conocida del antimicrobiano. En función del volumen de medio utilizado tenemos dos tipos: Macrodilución que es el volumen superior o igual a 1 mL y microdilución suelen emplear volúmenes de 0,1 mL (Wayne, 1997).

**Método de ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligada a enzimas):** Permite medir el crecimiento bacteriano, debido a su alta sensibilidad y especificidad, este método ha sido reportado en trabajos de investigación enfocados en la búsqueda de sustancias naturales inhibitoras del crecimiento de microorganismos (Eloff, 1998).

Para reportar la actividad antimicrobiana de una sustancia pura o de composición definida, el resultado a obtener debe relacionar a la sustancia

en estudio con una medida de su bioactividad. Generalmente, la actividad antibacteriana se reporta con la IC<sub>50</sub> y CIM, la IC<sub>50</sub> antibacteriana reporta la concentración que inhibe el 50% de crecimiento bacteriano, y la CIM (concentración inhibitoria mínima) expresa la concentración más baja de sustancia que inhibe dicho crecimiento (Eloff, 1998).

Esta metodología tiene como ventajas el uso de pequeñas cantidades de sustancias de prueba para desarrollar una microdilución. El crecimiento del inóculo se verifica por el aumento de la turbidez en el medio, lo cual se registra en un lector de ELISA (Eloff, 1998).

**Difusión en agar (Técnica de Kirby Bauer):** La técnica de difusión en agar, es cualitativa y sus resultados se pueden interpretar únicamente como sensible (S), y resistente (R). En esta técnica, el inóculo bacteriano es llevado a una concentración igual a la del estándar 0,5 de Mc Farland que corresponde a 10<sup>6-8</sup> UFC/mL, luego es aplicado sobre la superficie de una placa seca de agar Müeller-Hinton, solo o enriquecido, de acuerdo a las exigencias nutricionales de la bacteria en estudio. La cepa se debe sembrar sobre la superficie del medio de forma tal que se logre un crecimiento uniforme. Una vez realizado esto, en un plazo no mayor de 15 minutos, se deben colocar los discos con el antibiótico. Luego, se incuba la placa a la temperatura y requerimientos de oxígeno del microorganismo en estudio, generalmente a 37 °C en aerobiosis. Pasado el tiempo se observará la placa y cada halo de inhibición será medido. Los diámetros alrededor de cada disco son cotejados en las tablas del CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) y será reportado como sensible, intermedio o resistente de acuerdo al resultado obtenido (Herrera, 1999).

## **Resistencia a los antibacterianos**

La resistencia a los antibacterianos (RAM) es la capacidad de adaptación de los microorganismos que les permite crecer en presencia de antibacterianos. Si bien cualquier tipo de microorganismo puede desarrollar esta capacidad, la problemática es más grave en las bacterias. Ante la variedad de antimicrobianos disponibles, los microorganismos pueden ser resistentes a uno, varios, la mayoría o todos ellos. Las consecuencias de una infección por gérmenes resistentes incluyen, entre otras, mayor duración de la infección, mayor mortalidad, internaciones más prolongadas (OMS, 2011)

La RAM se produce cuando los microorganismos (bacterias, hongos, virus y parásitos) sufren cambios al verse expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos, antipalúdicos o antihelmínticos, por ejemplo). Como resultado, los medicamentos se vuelven ineficaces y las infecciones persisten en el organismo, lo que incrementa el riesgo de propagación a otras personas (OMS, 2011)

### **Mecanismo de resistencia a los antibacterianos**

El uso de los antibacterianos para el tratamiento de las infecciones ha sido relacionado, prácticamente siempre, a la aparición de cepas resistentes a ellos. Los conocimientos disponibles sobre los diferentes mecanismos de resistencia, tanto fenotípicos (resistencias cruzadas y resistencias asociadas) como bioquímicos y genéticos, han permitido establecer unas buenas bases para la terapéutica, así como para la búsqueda de nuevos antibacterianos (Ruiz y Guillén, 2005).

La relevancia de estos conocimientos en el ámbito terapéutico se hace evidente cuando en los estudios sistemáticos de sensibilidad *in vitro* que se utilizan habitualmente en los laboratorios de microbiología no se detecta la resistencia a un antibacteriano a pesar de que el microorganismo objeto de

estudio posee la dotación genética necesaria para expresar dicha resistencia. En estas situaciones el conocimiento de los mecanismos de resistencia y la elección de los antibacterianos más idóneos para detectar dichas resistencia resulta vital para evitar fracasos terapéuticos (Ruiz y Guillén, 2005).

La interpretación conjunta de la resistencia a varios antibacterianos de la misma familia o de diferentes familias, la deducción del posible mecanismo de resistencia y la posterior generación del informe con el antibiograma (patrón de sensibilidad a los antibacterianos) es lo que se ha denominado antibiograma interpretativo. Los microorganismos presentan dos tipos de resistencia que pueden ser naturales, adquiridas o terapéuticas (Ruiz y Guillén, 2005):

### **Resistencia natural**

La resistencia natural está asociada a una vía de biosíntesis natural presente en el microorganismo, no todos estos son inicialmente sensibles a todos los antibacterianos, sino que un determinado microorganismo puede ser resistente a un antibacteriano sin necesidad de que medie ninguna adquisición (Ruiz y Guillén, 2005).

En este sentido, es una propiedad específica de las bacterias y su aparición es anterior al uso de los antibióticos. En este caso, todas las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibióticos y eso les permite tener ventajas competitivas con respecto a otras cepas y pueden sobrevivir en caso que se emplee ese antibiótico (Díaz, 2003).

## Resistencia adquirida

La resistencia adquirida se refiere, cuando en una especie que es naturalmente sensible a un antibacteriano aparecen cepas de la misma especie con resistencia a dicho antibacteriano. La resistencia terapéutica está influida por muchos factores, como los dependientes del hospedador, los relacionados con el antibacteriano, los relacionados con el paciente y los relacionados con los microorganismos por tal motivo, el fracaso terapéutico de un tratamiento puede deberse a la resistencia bacteriana ya sea natural o adquirida (Ruiz y Guillén, 2005).

Puede existir el origen no genético de la farmacorresistencia ya que en la mayor parte de las acciones antibacterianas es necesaria la replicación de las bacterias. Por lo tanto, los microorganismos que carecen de actividad metabólica (no se multiplican) son fenotípicamente resistentes a los fármacos. Sin embargo, su progenie es sensible. Por otra parte, la mayoría de los microorganismos resistentes a fármacos emerge como resultado de algún cambio genético y una serie de procesos de selección por los antibacterianos (Jawetz, 2011).

Dentro de la resistencia adquirida se presentan las siguientes formas:

- ✓ **Resistencia cromosómica:** surge como resultado de una mutación espontánea en un locus que regula la sensibilidad determinado antibacteriano. La presencia del antibacteriano sirve como mecanismo de selección para suprimir a los microorganismos sensibles y fomentar la proliferación de los mutantes resistentes. Constituyen una causa rara de resistencia clínica a los fármacos. Los mutantes cromosómicos por lo general son resistentes gracias a un cambio en un receptor estructural para un fármaco. Por lo tanto, la proteína P 12 en la subunidad 30 S del ribosoma bacteriano sirve como receptor para el enlace de la

estreptomicina. La mutación en el gen que regula a esa proteína estructural provoca resistencia a la estreptomicina. La mutación también puede provocar la pérdida de PBP, lo que hace que estos mutantes sean resistentes a los  $\beta$ -lactámicos (Jawetz, 2011).

- ✓ **Resistencia extracromosómica:** con frecuencia las bacterias contienen elementos genéticos extracromosómicos llamados plásmidos. Algunos plásmidos transportan genes de resistencia a uno, y con frecuencia a varios, antibacterianos. Los genes de los plásmidos para resistencia antibacteriana suelen regular la formación de enzimas que pueden destruir a los antibacterianos. Así, los plásmidos establecen la resistencia a las penicilinas y cefalosporinas al transportar genes para la formación de las  $\beta$ -lactamasas. Los plásmidos codifican las enzimas que acetilan, adenilan o fosforilan diversos aminoglucósidos, para enzimas que determinan el transporte activo de las tetraciclinas a través de la membrana celular, y para otras. El material genético y los plásmidos se pueden transferir a través de traducción, transformación y conjugación (Jawetz, 2011).

- **Transducción:** es una recombinación genética en las bacterias mediada por bacteriófagos. En términos simples, una partícula de transducción puede considerarse como el ácido nucleico bacteriano en un fago cubierto. Incluso una población de fagos líticos puede contener algunas partículas en las cuales la cubierta del fago está rodeado por ADN derivado de la bacteria más que del propio fago. Tal población se ha utilizado para transferir genes de una bacteria a otra. Los fagos atemperados son los vehículos preferidos para la transferencia genética porque la infección de las bacterias receptoras bajo condiciones que favorecen la lisogenia reduce la lisis celular y por tanto favorece la supervivencia de las cepas recombinantes (Jawetz, 2011).
- **Transformación:** la captación directa de ADN donado por bacterias receptoras depende de su competencia para la transformación. La

competencia natural es poco común entre bacterias y algunas de estas cepas son transformables solo en presencia de factores de competencia, que se producen en un punto específico en el ciclo de crecimiento. Otras cepas sufren transformación natural con rapidez y esos organismos ofrecen una promesa para la ingeniería genética por la facilidad con la cual incorporan ADN modificado a sus cromosomas. Se encuentran bacterias transformables competentes naturalmente en varios géneros, lo que incluye *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus pneumoniae* (Jawetz, 2011).

- **Conjugación:** los plásmidos son los elementos genéticos que más a menudo se transfieren por conjugación. Las funciones genéticas necesarias para la transferencia están codificadas por los genes *tra*, que son transportados por plásmidos autotransmisibles. Estos últimos pueden movilizar otros plásmidos o porciones del cromosoma para su transferencia. En algunos casos se logra la movilización porque los genes *tra* proporcionan las funciones necesarias para la transferencia de un plásmido por lo demás no susceptible de transmisión. Entre otros casos los plásmidos autotransmisibles se integran con el AND de otro replicón y, como una extensión de sí mismo aportan cadenas de ADN a la célula receptora (Jawetz, 2011).

- ✓ **Resistencia cruzada:** algunos microorganismos que son resistentes a cierto fármaco también son resistentes a otros fármacos que comparten otro mecanismo de acción. Este tipo de relación existe principalmente entre fármacos con similitud química o que tienen un modo similar de enlace o acción en determinadas clases de fármacos, el núcleo activo de la sustancia química es tan similar entre distintos congéneres que la resistencia cruzada es extensa (Jawetz, 2011).

## Antibióticos

Se definen como antibióticos aquellos metabolitos secundarios producidos por ciertos microorganismos que son capaces de inhibir el crecimiento de otros microorganismos, o aún de destruir. El descubrimiento accidental de la penicilina, el primer antibiótico aislado de *Penicillium notatum* por el bacteriólogo inglés Alexander Fleming (1929), no llamo la atención hasta el año 1940, cuando se abrió el camino para la búsqueda de nuevos antibióticos; tres años más tarde se estableció la producción industrial de la penicilina. Desde entonces se han descubierto más de 5.000 antibióticos diferentes de los cuales aproximadamente solo el 1% está en uso práctico en las áreas de medicina, agricultura y veterinaria (Marcano y Hasegawa, 2002).

### Mecanismos de acción de los antibacterianos

Los antibacterianos actúan de diversas formas: por toxicidad selectiva, inhibiendo la síntesis, y función de la membrana celular, inhibiendo la síntesis de proteínas o inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos (Jawetz, 2011).

El antibacteriano ideal exhibe toxicidad selectiva, lo que significa que el fármaco es nocivo para el microorganismo patógeno sin dañar al hospedador. La toxicidad selectiva es relativa y no absoluta. Esto implica que un fármaco a la concentración que tolera el hospedador es nocivo para el microorganismo infeccioso, siendo una función de receptor específico necesario para la fijación del fármaco o bien depende de la inhibición de algún acontecimiento bioquímico indispensable para la bacteria patógena pero no para el hospedador.

Los mecanismos de acción de los antibióticos se pueden describir bajo cuatro encabezados:

1. Inhibición de la síntesis de la pared celular.
2. Inhibición de la función de la membrana celular.
3. Inhibición de la síntesis de proteínas.
4. Inhibición de las síntesis de ácidos nucleicos.

1. **Inhibición de la síntesis de la pared celular:** las bacterias poseen una capa externa rígida, llamada pared celular. La pared celular conserva la forma y tamaño del microorganismo, cuya presión osmótica interna es elevada. Cuando la pared celular se lesiona o su formación se inhibe, la célula se lisa. En un ambiente hipertónico, la formación de la pared celular provoca la formación de “protoplastos” bacterianos esféricos en los microorganismos Gram positivos o “esferoplastos” en los microorganismo Gram negativos; estas variedades están limitadas por una membrana citoplasmática frágil. Si estos protoplastos o esferoplastos se colocan en un ambiente con tonicidad ordinaria captan líquidos rápidamente, se edematizan y se explotan. Las muestras obtenidas de pacientes que reciben tratamientos con antibióticos que actúan sobre la pared celular a menudo exhiben bacterias edematosas o con formas raras (Jawetz, 2011).

2. **Inhibición de la función de la membrana celular:** el citoplasma de las células vivas está limitado por la membrana citoplasmática, que sirve como barrera selectiva de permeabilidad, lleva a cabo funciones de transporte activo y, por lo tanto, regula la composición interna de la célula. Cuando se altera la integridad funcional de la membrana citoplasmática, las macromoléculas e iones salen de la célula y la célula se daña o muere. La membrana citoplasmática de las bacterias tiene una estructura distinta a la de las células animales y es dañada

con más facilidad por cierto fármacos. Por lo tanto, es posible la quimioterapia selectiva (Jawetz, 2011).

3. **Inhibición de la síntesis de proteínas:** las bacterias poseen ribosomas 70S, mientras que las células de mamíferos tienen ribosomas 80S. Las subunidades de cada tipo de ribosomas, su composición química y sus especificidades funcionales son lo suficientemente distintas como para explicar la razón por la que los antimicrobianos inhiben la síntesis de proteínas en los ribosomas bacterianos sin tener efectos importantes en los ribosomas de mamíferos. En la síntesis normal de proteínas microbianas, el mensaje del ARNm se “lee” simultáneamente en diversos ribosomas que se encuentran dispersos en la tira del ARNm. Estos se denominan polisomas (Jawetz, 2011).
4. **Inhibición de la síntesis de los ácidos nucleicos:** puede producirse mediante la inhibición de la proliferación bacteriana al unirse fuertemente con la polimerasa de ARN dependiente del ADN de las bacterias, también mediante inhibición microbiana del ADN bloqueando a la ADN girasa, así como la inhibición competitiva por el centro activo de ciertas enzimas (Jawetz, 2011).

El desarrollo de drogas antimicrobianas revolucionó la medicina, sin embargo la evolución natural de los organismos vivos provoca la adaptación de los microorganismos a condiciones adversas con el desarrollo concurrente de la resistencia a las drogas, es por ello que es necesario hablar de la resistencia antimicrobiana (Marcano y Hasegawa, 2002).

## **Definición de términos**

### **Concentración Mínima Inhibitoria**

Es la concentración más baja de un antibacteriano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación, la concentración inhibitoria mínima es importante en diagnósticos de laboratorios para confirmar la resistencia de microorganismo a un agente antibacteriano y además monitorizar la actividad de los nuevos agentes antibacterianos (Ruíz y Guillém, 2005).

### **Infección**

Es un término clínico que indica la contaminación, con respuesta inmunológica y daño estructural de un hospedero, causada por un microorganismo patógeno, es decir, que existe invasión con lesión tisular por esos mismos gérmenes (hongos, bacterias, protozoos, virus, priones), sus productos (toxinas) o ambos a la vez (Tortora y col, 2007).

### **Metabolitos**

Un metabolito es cualquier molécula utilizada, o producida durante el metabolismo. El metabolito primario se forma esencialmente al mismo tiempo que las nuevas células y la curva de producción es casi paralela a la curva de población celular, con solo un retraso mínimo. Los Metabolitos secundarios no se producen hasta que el microorganismo haya completado en gran parte su fase de crecimiento logarítmica (Tortora y col, 2007).

## **Operacionalización de las Variables**

Es un proceso metodológico que consiste en descomponer deductivamente las variables que componen el problema de investigación, partiendo desde lo más general a lo más específico; es decir que estas variables se dividen (Definición conceptual, definición operacional, dimensiones e indicadores). Ahora bien, una variable es operacionalizada con la finalidad de convertir un concepto abstracto en uno empírico, susceptible de ser medido a través de la aplicación de un instrumento (Moreno, 2013; ver Tabla 2).

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

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

Variable	Tipo	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensión	Indicador
Composición química de los extractos de los frutos de la especie <i>D. erecta</i>	Independiente	Estudio de los diferentes compuestos que están presentes en los extractos de los frutos.	A través del tamizaje fitoquímico de los extractos	Alcaloides Cumarinas Compuestos fenólicos Flavonoides Quinonas Saponinas Taninos Triterpenos-esteroles.	Reacciones químicas de coloración y/o precipitación.

**Autor: Soto Y (2019).**

**Tabla 3.** Operacionalización de la variable dependiente.

Variable	Tipo	Definición Conceptual	Definición Operacional	Dimensión	Indicador
Actividad antibacteriana de los extractos de los frutos de <i>Duranta erecta</i> .	Dependiente	Cualquier sustancia química capaz de impedir el crecimiento o proliferación de un microorganismo, e incluso puede favorecer a la muerte del mismo, sin causar daño aparente al organismo que lo porta.	Por medio del método de Kirby- Bauer.	Cepas de <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i> .	Resistente Sensible  Presencia o ausencia de halo inhibición

**Autor: Soto Y (2019).**

### **Hipótesis**

Diversas especies del género *Duranta* reportan actividad antibacteriana y una composición química variada, en tal sentido, se espera que los extractos de los frutos de *Duranta erecta*, presenten metabolitos secundarios con actividad antibacteriana.

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

## **CAPITULO III**

### **MARCO METODOLÓGICO**

#### **Tipo de investigación**

Según Hurtado (2008), los tipos de investigación están relacionados con el logro esperado durante el proceso de investigación. Específicamente, puede ser exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. En este caso la investigación fue definida bajo un tipo de investigación confirmatoria, ya que se basó en verificar la composición química y la actividad antibacteriana de los extractos de los frutos de *Duranta erecta* (Verbenaceae).

#### **Diseño de investigación**

El diseño de la investigación se refiere a las diferentes estrategias que utilizó el investigador para responder a las preguntas de investigación (Palella y col, 2010). Adicionalmente, Hurtado (2010) refirió que el diseño tiene relación con el *dónde* y *cuándo*, se recopilara la información necesaria, así como la amplitud de la misma, con el fin de responder la interrogante planteada.

Esta investigación se realizó con un diseño experimental debido a que la especie vegetal fue sometida a determinadas condiciones, estímulos o tratamientos para observar los efectos o reacciones. El estudio se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones de la

Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes en un lapso de tiempo determinado.

## **Población y muestra**

### ***Unidad de Investigación***

Estuvo representada por la especie vegetal *Duranta erecta* (Verbenaceae) recolectada en el Sector Santa Eduvigis en Ejido, Municipio Campo Elías del Estado Mérida. La muestra identificada por el Ingeniero Forestal Juan Carmona adscrito a la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de Los Andes (ULA).

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

La muestra estuvo integrada por la recolección de 1000 gramos de frutos frescos de la especie vegetal recolectada en el Sector Santa Eduvigis en Ejido, Municipio Campo Elías del Estado Mérida.

## **Sistema de Variables**

Las variables relacionadas con el propósito de la investigación fueron:

- a) Variable Independiente (VI): Composición química de los extractos de los frutos de la especie *D. erecta*.
- b) Variable Dependiente (VD): Actividad antibacteriana de los extractos de los frutos frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

## Procedimientos de la investigación

### 1. Recolección del material vegetal

Las muestras de la planta de *Duranta erecta*, fueron recolectadas en el Sector Santa Eduvigis en Ejido, Municipio Campo Elías del Estado Mérida. Tomándose aproximadamente 1000 g de la misma, posteriormente, se almacenó a temperatura ambiente, en un contenedor plástico para su posterior tratamiento y obtención de los extractos en el Instituto de Investigaciones la Facultad de Farmacia y Bioanálisis ULA.

### 2. Preparación de extractos vegetales

Los frutos se separaron de la planta, aproximadamente 1000 g, luego se secó en una estufa a temperatura no mayor de 40°C, posteriormente, se realizó el proceso de pulverización mediante un mortero, para obtener los extractos por maceración, lo cual consistió en remojar el material vegetal seco y pulverizado, con los solventes correspondientes (hexano y etanol) por un período de una semana con la finalidad de que estos penetraran la estructura celular, y disolviera las sustancias y compuestos, al cabo del cual se decantó el líquido, se filtró y se exprimió el material foliar residual. Este proceso se repitió tres veces durante una semana para cada uno de los solventes utilizados (hexano y etanol) hasta el agotamiento del material vegetal.

- **Remoción o evaporación del solvente**

Los extractos obtenidos previamente, se concentraron a presión reducida en un rotavapor a una temperatura de 60°C. Los concentrados residuos (no volátiles) obtenidos con cada solvente se colocaron en unos recipientes color ámbar prepesados y se dejaron secar totalmente a temperatura ambiente. Seguidamente se pesaron

nuevamente los recipientes contentivos de los extractos y por diferencia se obtuvo los pesos secos correspondientes. El peso del extracto de hexano fue 100,35 g; mientras que para el extracto etanol el peso fue de 162,89 g.

### **3. Análisis fitoquímico**

Se realizó mediante reacciones químicas destinadas a determinar la presencia de metabolitos secundarios en el material vegetal, siguiendo el procedimiento según Miranda y Cuellar, (2000). En tal sentido se realizaron los siguientes ensayos:

#### **✓ Identificación de esteroides y triterpenos.**

- **Reacción de Lieberman Bourchard:** en dos tubos de ensayos limpios, secos y debidamente identificados, se tomaron pequeñas cantidades de los extractos previamente llevados a sequedad, y se adicionó diclorometano a cada tubo hasta que cubriera la muestra, posteriormente se colocaron en el baño ultrasónico, y se les añadió 0,5 mL de anhídrido acético, y luego se adicionó cuidadosamente por las paredes del tubo 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. La reacción se interpreta positivo cuando aparecen coloraciones violeta, verde o azul. Al formarse una coloración azul o verde en la interface, hay presencia de esteroides; si la coloración es rosa, rojo, magenta o violeta habrá presencia de triterpenos.

#### **✓ Identificación de taninos**

Para la identificación fue necesario realizar el siguiente ensayo: a una porción de cada extracto se le adicionó 2 mL de agua destilada y 3 gotas de cloruro de sodio al 10% se calentó a ebullición por un minuto, enfriando y filtrando. Posteriormente se dividió el filtrado en 3 tubos de ensayos, el 3<sup>er</sup> sirvió como testigo.

- **Reacción de cloruro férrico:** se adicionó al primer tubo 1 gota de cloruro férrico al 10%, la formación de coloraciones indica la presencia de compuestos fenólicos: de azul a negro derivados del ácido gálico y coloraciones verde derivados del catecol.
  - **Reacción con gelatina al 10%:** al segundo tubo. Se le colocó 2 gotas de reactivo de gelatina. La formación de un precipitado blanco indica presencia de taninos.
- ✓ **Identificación de cumarinas:**
- **Reacción con hidróxido de amonio:** se concentró otra porción de los extractos y se les adicionaron 0,5 mL de etanol y dos gotas de hidróxido de amonio concentrado. Se considera positiva la prueba si se presenta una fluorescencia azul-violeta bajo la luz ultravioleta.
- ✓ **Identificación de flavonoides:**
- Para realizar la determinación de flavonoides fue necesario realizar el siguiente ensayo. Se disolvió una porción del extracto en 6 mL de etanol y se dividió en 2 tubos. El primer tubo se usó para la reacción de Shinoda y el segundo se utilizó como blanco.
- **Reacción de Shinoda:** se adicionaron 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado, si se obtiene una coloración roja indica la presencia de auronas o chalconas. Luego se colocó un trozo de magnesio metálico, si se forma una coloración naranja indica la presencia de flavonas, si es rojo flavonoides y si es magenta flavononas.
- ✓ **Identificación de quinonas.**
- **Reacción de hidróxido de amonio:** se adicionó una gota de hidróxido de amonio concentrado a cada extracto. Se considera positiva la prueba para antraquinonas al tener la presencia de una coloración roja que aparece en los primeros minutos.

- ✓ **Identificación de saponinas:** Estas se manifiestan por la formación de una espuma cuando se agita el material vegetal con agua. Esta espuma dificulta la extracción.

#### **4. Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de los frutos de la especie *Duranta erecta*.**

La actividad antibacteriana se realizó por el método de difusión en agar con discos. Esta prueba se desarrolló en el Laboratorio de Investigaciones de Bioquímica General de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de los Andes.

##### **Preparación de las muestras**

Se trabajó con los extractos de hexano y etanol, realizando las siguientes diluciones: 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, 31,25 ppm y 15,65 ppm. EL solvente utilizado fue dimetil sulfóxido (DMSO).

##### **Bacterias estudiadas**

Para este estudio se seleccionaron cinco especies de bacterias: dos especies que pertenecen a las bacterias Gram positivas y tres pertenecientes a las bacterias Gram negativas de referencia internacional de la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC), provenientes del cepario del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis (Tabla 4).

**Tabla 4.** Bacterias empleadas para el estudio de la actividad antibacteriana de la especie *D. erecta*.

<b>Cepas Gram positivas:</b>	<b>Cepas Gram negativas:</b>
<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</b>	<b><i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</b>
<b><i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212</b>	<b><i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357</b>
	<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853</b>

### **Preparación de las placas**

En placas de Petri se preparó el medio de cultivo colocándose 20 mL de agar Müeller Hinton (HIMEDIA ®) estéril, dejándose solidificar a temperatura ambiente.

### **Preparación de los pre-inóculos bacterianos**

Se empleó un medio de cultivo Müeller Hinton. Para la determinación de la actividad antibacteriana las cepas fueron repicadas 12 horas antes provenientes del Área de Medios de Cultivos y Esterilización del Laboratorio de preparación de prácticas bacteriológicas de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis del Estado Mérida. Posteriormente fueron utilizadas para preparar el pre-inóculo los cuales se incubaron a 37 °C por 18 horas, ya que es en ese tiempo donde las bacterias adquieren los nutrientes necesarios para su crecimiento, específicamente cuando alcanzan su fase exponencial o de multiplicación en la curva de crecimiento bacteriano.

### **Preparación de los inóculos bacterianos**

Una vez que se obtuvieron las cepas bacterianas frescas y purificadas se preparó el inóculo bacteriano con la ayuda de un asa estéril, tomándose de esta manera una pequeña cantidad de colonias para luego ser suspendidas en una solución de NaCl al 0,85% (5 mL en tubos 13x100 previamente

estéril, hasta que alcanzó una turbidez equivalente al patrón 0,5 de Mac Farlan ( $10^{6-8}$  UFC/mL) (Koneman y col, 2005).

### **Inoculación de las placas**

Una vez preparadas las placas se inocularon en forma homogénea la superficie de cada una de ellas con los inóculos bacterianos, utilizando para ellos un hisopo de algodón estéril.

### **Preparación de los discos**

Se utilizaron discos de papel filtro de 6 mm de diámetro para realizar la actividad antibacteriana, los cuales se esterilizaron con luz ultravioleta (LUV), durante toda una noche. Previo a la preparación del inóculo, se impregnaron los discos de papel filtro con 10  $\mu$ L de los extractos (hexano y etanol) a una concentración comprendida entre 500-15,65 ppm (Tabla 5). También se utilizaron discos de antibióticos comerciales como control positivo con el fin de medir la sensibilidad de los microorganismos a estudiar (tabla 6) y como control negativo discos impregnados con el solvente dimetil sulfóxido (DMSO) para verificar que son los extractos los que provocan el halo de inhibición y no los solventes.

**Tabla 5.** Diluciones empleadas para la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de la especie *D. erecta*.

Extractos: EH y EE	
Solución madre (ppm)	500
Diluciones (ppm)	250
	125
	62,5
	31,25
	15,65

EH: Extracto de Hexano, EE: Extracto de Etanol.

**Tabla 6.** Antibióticos empleados como control positivo para el estudio de la actividad antibacteriana

Bacterias	Antibióticos comerciales		
	E (15 µg)	AMP (10 µg)	PIP (100 µg)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	P	NP	NP
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	NP	P	NP
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	NP	NP	P
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	NP	NP	P
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	NP	NP	P

E: Eritromicina; AMP: Ampicilina; PIP: Piperacilina; P: Antibiótico probados; NP: No probado.

### **Colocación de los discos impregnados**

En las placas de Petri con agar Müller Hinton (HIMEDIA ®) previamente inoculadas con cada cepa, se colocaron los discos impregnados con 10 µL de las respectivas diluciones de los extractos vegetales.

### **Preincubación e incubación de las placas**

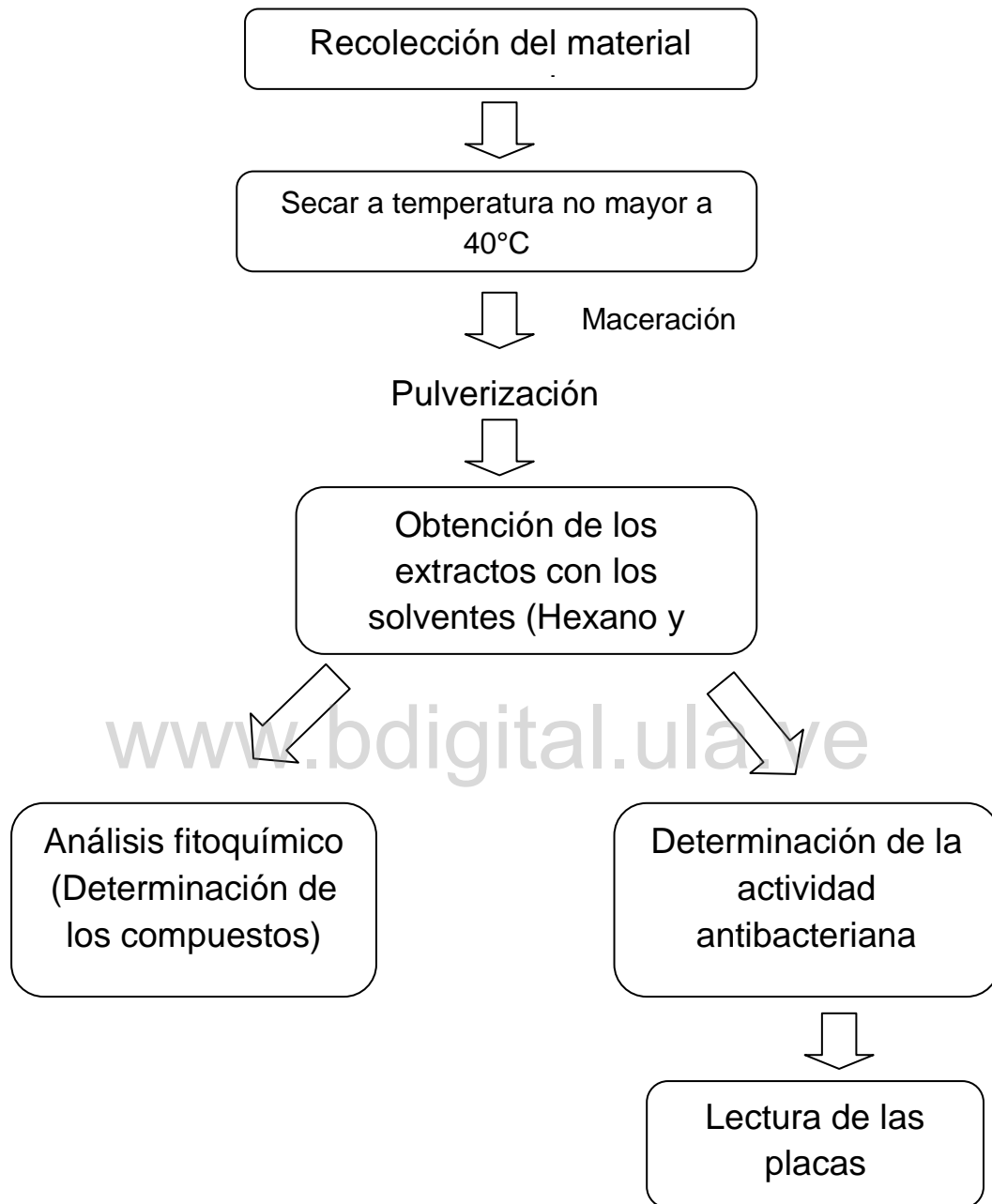
Después de haber colocado los discos en las placas con agar Müller Hinton estas se dejaron en la nevera a una temperatura de 4 °C aproximadamente durante 30 minutos (preincubación) con la finalidad de que los discos impregnados con los extractos en sus diferentes diluciones difundieran a través del agar para luego llevarlas a la estufa durante 24 horas a 37 °C en posición invertida en atmosfera aeróbica.

### **Lectura de las placas**

Luego de ser incubadas cada una de las placas por un lapso de tiempo de 24 horas estas fueron revisadas para realizar la lectura de las mismas con una regla milimetrada. Donde se consideró un resultado positivo o sensible (actividad antibacteriana), cuando se observó un halo de inhibición alrededor del disco, y se tomó como un resultado negativo o resistente (sin actividad bacteriana), la ausencia de dicho halo.

El diámetro de la zona de inhibición, producto de la actividad antibacteriana de los extractos de los frutos de la especie *D. erecta* se expresó en mm.

### Esquema 1. Plan de Trabajo



## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### Resultados

- ✓ **Obtención de los extractos de los frutos de la especie de *D. erecta*.**

En lo que respecta a la obtención de los extractos de los frutos de *D. erecta* con los solventes de hexano y etanol se obtuvo un rendimiento de 10,03 % (100,35 gramos) y 16,28 % (162,89 gramos) respectivamente.

- ✓ **Tamizaje fitoquímico**

El análisis fitoquímico de los extractos de los frutos de *D. erecta* se realizó mediante pruebas químicas cualitativas, lo cual permitió determinar la presencia de los metabolitos secundarios que se muestran en la tabla 7:

**Tabla 7.** Metabolitos identificados mediante el tamizaje fitoquímico.

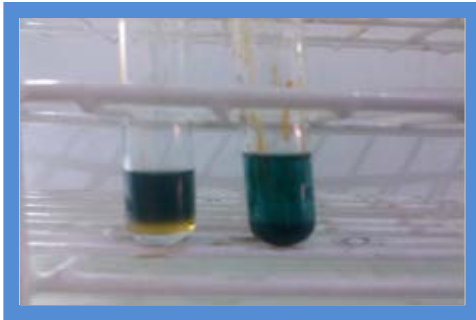
Pruebas	Metabolitos	EH	EE
Reacción de Lieberman-Bourchard	Esteroles y Triterpenos	++	++
Reacción de cloruro férrico	Compuestos fenólicos	-	+
Reacción de Shinoda	Flavonoides	-	-
Reacción de la espuma	Saponinas	ND	++
Reacción de la gelatina	Taninos	ND	+
Prueba de Hidróxido de amonio	Cumarinas	-	-
Ensayo de Borntranger	Quinonas	-	-

**EH:** Extracto de Hexano; **EE:** Extracto de etanol, **(-):** Ausente, **(+):** Presente, **(++):** Abundante, **ND:** No determinado.

Los resultados obtenidos del estudio fitoquímico, realizado a los extractos de la especie de *D. erecta* fueron los siguientes:

Para triterpenos y/o esteroides se realizó la reacción de Lieberman-Bourchard observándose un cambio de color a verde lo que indica la presencia de triterpenos y esteroides (figura 13). Por otra parte, para la identificación de los taninos (Figura 14) se utilizó la reacción de tricloruro férrico se observó el cambio de azul a negro lo que evidencia la presencia de compuestos fenólicos.

De igual manera, para la determinación de flavonoides (Figura 15), se realizó la reacción de Shinoda no se observó ningún cambio de color en los extractos de hexano y etanol, lo que indica la ausencia de los mismos. A su vez, mediante la reacción de la espuma del extracto etanólico se evidenció la formación de espuma manteniéndose por más de 30 minutos, indicando la presencia de saponinas (Figura 16). Cabe destacar que en la determinación de cumarinas no hubo evidencia de la fluorescencia azul-violeta bajo la luz ultravioleta, lo que indica ausencia de estos compuestos en ambos extractos.



**Figura 13.** Identificación de esteroides y triterpenos: Prueba de Liebermann Bourchard



**Figura 14.** Identificación de taninos: Reacción de cloruro férrico.



**Figura 15.** Identificación de flavonoides: Reacción de Shinoda.



**Figura 16.** Identificación de saponinas: Prueba de la espuma.



**Figura 17.** Identificación de taninos: prueba de la gelatina.

✓ **Actividad antibacteriana de los extractos de los frutos de la especie *D. erecta***

Para el estudio de la actividad antibacteriana de las cepas ATCC ensayadas, se tomó en cuenta para la elección de los grupos controles positivos las recomendaciones que establece el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos por sus siglas en inglés CLSI 2017, la cual determina qué tipo de antibiótico debe usarse con cada especie de las cepas bacterianas, seleccionando así para las cepas ATCC Gram positivas: *Enterococcus faecalis* el antibiótico ampicilina de 10 µg de tipo β-lactámico donde el halo de inhibición para este control es  $\geq 17$  mm, para *Staphylococcus aureus* el control positivo fue la eritromicina de 15 µg antibiótico de tipo macrólido donde el halo de inhibición para este control es  $\geq 23$  mm.

Para las cepas ATCC Gram negativas: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Escherichia coli*, el control positivo fue piperacilina de 100 µg de tipo β-lactámico, donde el halo de inhibición para estas especies debe ser según el control  $\geq 21$  mm.

Con respecto a las mediciones y observaciones realizadas en el laboratorio a los halos de inhibición de los controles positivos para las especies ATCC Gram positivas las lecturas de estos fueron las siguientes: para *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* la lectura fue de 32 mm para ambas especies. Mientras que para las cepas ATCC Gram negativas *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Escherichia coli* la lectura fue 32 mm para las tres especies bacterianas. Medidas que son aceptadas para estas especies ATCC según las recomendaciones del CLSI 2017 (Tabla 8).

**Tabla 8.** Halos de inhibición de los controles positivos usados como referencia en las cepas bacterianas

Cepas bacterianas ATCC	Halos de inhibición en mm					
	Eritromicina 15 µg		Ampicilina 10µg		Piperacilina 100µg	
	CLSI	CE	CLSI	CE	CLSI	CE
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	≥ 23	32	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	-	-	≥ 17	32	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-	-	≥21	27
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	-	-	-	-	≥21	27
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 23357	-	-	-	-	≥21	27

**mm:** milímetros; **CLSI:** Lectura de los halos de inhibición recomendados por el Instituto de Estándares de Laboratorios Clínicos, **CE:** (cepas ensayadas) lectura de los halos de inhibición de los antibióticos realizados en el laboratorio frente a las cepas ATCC.

✓ **Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos de la especie de *D. erecta*.**

Para la determinación de la actividad antibacteriana de los extractos de hexano y etanol de *D. erecta* se realizaron una serie de diluciones a partir de 500 µg/mL hasta 15, 65 µg/mL con la finalidad de conocer cuál es la menor concentración de los extractos que posee actividad antibacteriana, el solvente utilizado para estas diluciones fue dimetil sulfóxido (DMSO).

**Tabla 9.** Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos etanol y hexano de la especie *D. erecta*.

Microorganismos	Concentración (ppm)	Halos de Inhibición (mm)		Halos de Inhibición (mm)		
		EETC	EHTC	PIP	AMP	ERI
<i>Staphylococcus aureus</i>	500	0	0			32
	250	0	0			
	125	0	0			
	62,5	0	0			
	31,25	0	0			
	15,62	0	0			
<i>Enterococcus fecalis</i>	500	7	7		32	
	250	7	0			
	125	7	0			
	62,5	7	0			
	31,25	7	0			
	15,62	7	0			
<i>Escherichia coli</i>	500	10	9	27		
	250	10	9			
	125	10	9			
	62,5	10	9			
	31,25	9	9			
	15,62	9	9			

**Tabla 9.** Resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de *D. erecta* (Continuación).

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

mm: milímetros.

Por su parte el extracto etanólico de la especie *D. erecta*, inhibió el desarrollo de la bacteria Gram positiva *Enterococcus faecalis* con un halo de inhibición de 7 mm y valor de CIM de 15,62 µg/mL.

Con respecto a las bacterias Gram negativas presentó inhibición en las especies *Klebsiella pneumoniae*, y *Escherichia coli* con halos de inhibición de 7mm, y 9 mm respectivamente y valor de la CIM de 15,62 µg/mL para ambas especies y para *Pseudomonas aeruginosa* un halo de inhibición de 8 mm y valor de CIM de 500 µg/mL (el rango de concentración del extracto estuvo comprendido entre (500 µg/mL hasta 15,62 µg/mL).

Así mismo el extracto de hexano de la especie *D. erecta*, inhibió el desarrollo de la bacteria Gram positiva *Enterococcus faecalis* con un halo de inhibición de 7 mm y valor de CIM de 500 µg/mL.

Del mismo modo, inhibió el desarrollo de las bacteria Gram negativas *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* con halos de inhibición de 7 mm, y 9 mm respectivamente, y valor de la CIM de 15,62 µg/mL para ambas especies, y para *Pseudomonas aeruginosa* un halo de inhibición de 7mm y valor de CIM de 500 µg/mL.

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

## Discusiones

En relación a la composición química, Agwu y col, 2016, realizaron un estudio en la Universidad de Benin, Nigeria, denominado Bioeficacia del extracto de las hojas de *Duranta erecta* como productos botánicos contra mosquitos transmisores de la fiebre amarilla, los resultados obtenidos a través de un cribado fitoquímico en cuanto a la composición química mostraron la presencia de los siguientes compuestos: taninos, saponinas, alcaloides, flavonoides, glucósidos y antraquinonas. Resultados que se asemejan a los obtenidos en el presente estudio en relación a la composición química de los extractos de los frutos aun cuando sean las mismas especies en ambas investigaciones difieren en algunos compuestos lo que puede ser atribuido a que fueron estudiados en distintas partes de la planta. Coincidiendo en la presencia de saponinas y taninos.

Por otra parte, Luna, 2015 en un estudio realizado en Riobamba, Ecuador, titulado “Estudio Fitoquímico De Espino Chivo (*Duranta triacantha*)” con el objetivo de extraer, e identificar metabolitos secundarios, utilizando métodos cromatográficos, comprobando a través de estudios fitoquímicos la presencia de flavonoides y taninos cuyas propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antisépticas benefician la piel. Resultados similares a los obtenidos en el presente estudio, a pesar de ser distintas especies tienen en común la presencia de taninos.

De igual modo, Sánchez 2017, realizó en la Universidad Nacional de Trujillo, Perú, un estudio farmacognóstico de las hojas de *Duranta mutisii*, mediante un tamizaje fitoquímico, obteniéndose la presencia de fitoconstituyentes como: compuestos fenólicos, glucósidos cardiotónicos, esteroides, alcaloides, taninos, flavonoides, azúcares reductores, resinas y aminoácidos predominando una mayor cantidad de fitoconstituyentes en el extracto etanólico. Es importante destacar que la composición química descrita para *Duranta mutisii* es similar a la determinada en el presente estudio para *Duranta erecta* teniendo en cuenta que aunque sean del mismo género son especies diferentes. Además, se determinó eficacia antibacteriana sobre la microflora salival como *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sanguis* teniendo correlación con la presente investigación donde también se observó inhibición frente a las bacterias Gram positivas. Sin embargo, es importante acotar que el presente estudio determinó actividad antibacteriana frente a bacterias Gram negativas, lo cual es de interés ya que estas bacterias producen una variedad de infecciones como resultado de la resistencia a antibióticos clásicos que han desarrollado.

Uvidia 2012, evaluó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y subextractos etéreos y clorofórmico de *Duranta triacantha juss*, *Callistemon speciosus*, y *Tagetes minuta*, encontrándose que el extracto de *Duranta triacantha juss*, presentó actividad frente a *Staphylococcus aureus* y actividad parcial frente a *Candida albicans* como agente micótico. En tal sentido, esta investigación se correlaciona con el presente estudio debido a que los extractos obtenidos de *D. erecta* produjo inhibición contra una bacteria Gram positiva (*E. faecalis*), a pesar de ser especies distintas.

## Capítulo IV

### Conclusiones y Recomendaciones

#### Conclusiones

- El estudio fitoquímico realizado a los extractos de la especie de *D. erecta* permitió determinar la presencia de esteroides y triterpenos en los extractos de hexano y etanol; así como la presencia de compuestos fenólicos, saponinas y taninos en el extracto de etanol.
- El extracto etanólico de la especie *D. erecta* inhibió el desarrollo de la bacteria Gram positiva *Enterococcus faecalis* con una CIM de 15,65 µg/mL, con respecto a las bacterias Gram negativas presentó valores de CIM de 15,65 µg/mL (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*) y 500 µg/mL (*Pseudomonas aeruginosa*) en las cepas ensayadas.
- El extracto de hexano inhibió el desarrollo de la bacteria Gram positiva *Enterococcus faecalis* con valor de CIM de 500 µg/mL. Del mismo modo, inhibió el desarrollo de las bacterias Gram negativas *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* con valor de la CIM de 15,65 µg/mL para ambas especies y para *Pseudomonas aeruginosa* con un valor de CIM de 500 µg/mL.
- Los extractos de evaluados fueron activos frente a la bacterias ensayadas con unas CIM bajas lo contribuye a ampliar la posibilidad de nuevos fármacos antibacterianos que puedan mejorar el proceso

salud enfermedad debido a la multiresistencia de estas bacterias como problema de salud pública en la actualidad.

### **Recomendaciones**

- Los resultados obtenidos de actividad antibacteriana que presentaron los extractos de hexano y etanol de los frutos de la especie *D. erecta*, sugieren la posibilidad de realizar futuros estudios encaminados a determinar su actividad sobre un espectro bacteriano mayor, así como sobre otros microorganismos (hongos y parásitos).
- Continuar con el estudio de esta planta *D. erecta* ya que al poseer varios principios activos en su composición química, pueden valorarse otras actividades biológicas y farmacológicas de importancia.

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

## BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Agwu J, Odo G, Ekeh F, Uwagbae, Ehilegbu C (2016). Bioefficacy of *Duranta erecta* leaf extract on yellow fever and dengue vector, *Aedes aegypti* Linn. in Nigeria. Universidad de Benin. Nigeria
- Albornoz, A (1980). Productos Naturales: Estudio de las Sustancias y Drogas Extraídas de las Plantas. Universidad Central de Venezuela. Caracas Venezuela.
- Álvarez A, Del Barrio G (2008). Propiedades antivirales de plantas del genero *Phyllanthus*. Revista Cubana de Farmacia, 42 (1), 1-14.
- Álvarez, M (2011). “Taninos Y Flavonoides”. Universidad Central Del Ecuador.
- Apablaza G, Díaz M, San Martin R, Moya E (2002). Control de oidio de las *Curcubitaceas* con saponinas presentes en extractos de *Quillay* (Quillaja saponaria). Ciencias Investigación Agrícola, 29 (2), 89-90.
- Aricapa D (2009). Actividad antimicrobiana de plantas sobre microorganismos cariogénicos. (Trabajo de grado). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias Básicas. Bogotá, Colombia.
- Arrieta M, Díaz J (2014). Cultivo de *Duranta*. [Artículo en línea]. Disponible en: <http://standuranta.blogspot.com>
- Bangou M (2012), “Actividades antioxidantes y antibacterianas de cinco especies de Verbenaceae de Burkina Faso”. Laboratorio de Bioquímica y Química Aplicada (LABIOCA), Universidad de Burkina Faso. África.
- Becerra F (2013). Actividad Antimicrobiana de Plantas de uso Medicinal en la localidad de Tlalchy, Ixhuacán de Los Reyes. (Trabajo Especial de Grado) de la Universidad de México. Veracruz México.
- Bedascarrasbure E, Maldonado L, Álvarez A, Rodríguez E (2004). Contenido de Fenoles y Flavonoides del Propoleos Argentino. Acta Farmacológica Bonaerense, 23 (3), 369-72.

- Calixto M (2006). Plantas medicinales utilizadas en odontología. Parte I. Kiru, 3 (23), 80-85.
- Celis C, Rivero E, Hipólito I, Martínez J (2007). "Estudio comparativo de la composición y actividad biológica de los aceites esenciales extraídos de *Lippia alba*, *Lippia organoides*, Especies de la FAMILIA Verbenaceae". (Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de química). Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga.
- Correa L, Palacios C (2010). "Manual para Jardíneros". Jardín Botánico Medellín. Pag. 100.
- Devlin T (2004) Bioquímica (4ta Edición). Barcelona: Editorial Reverte.
- Dewick P (1991). The biosynthesis of shikimate metabolites. Natural Reports, Editorial: Mundo, pp 149-170.
- Díaz L (2003). Trabajos de revision . RESISTENCIA BACTERIANA. Obtenido de [http://www.bvs.sld.cu/revistas/mil/vol32\\_1\\_03/mil07103.pdf](http://www.bvs.sld.cu/revistas/mil/vol32_1_03/mil07103.pdf)
- Domingo D, Lopez-Brea M (2003). Plantas con accion antimicrobiana. Servicio de microbiología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, 16 (4), 386-387.
- Domínguez Z (1973). Métodos de Investigación Fitoquímica. Editorial Limusa. México, pp. 69- 76.
- Galvis D (2014). Evaluación Del Efecto de Embriofetotoxicidad de Extracto de *Lantana Camara* en Roedores. Tesis presentada(o) como requisito parcial para optar al título de: Magister en Ciencias Farmacéuticas. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C., Colombia.
- García C (2006). Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias con resistencia múltiple. (Tesis). Universidad Autónoma Agraria. México.
- García D (2015). Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de dos especies de plantas del género

- Amaranthus* aplicado sobre cepas de interés clínico en el periodo Diciembre de 2013.(Tesis de Grado). Riobamba-Ecuador. 7-8.
- Gómez L, González, G (2013). Ciclo de vida de *mada durantae* y evaluación de daños causados a las plantas ornamentales urbanas del género *Duranta* (Verbenaceae). Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa (S.E.A.), nº 52. En Medellín, Colombia. 137–140.
- González A (2004). Obtención De Aceites Esenciales Y Extractos Etanólico. Universidad Nacional De Colombia. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreaconzalezvilla.2004>.
- Guerrero M (2014). Cuidados de la planta *Duranta repens*, *Duranta erecta* o *Flor celeste*. [Artículo en línea]. Disponible en: <http://durantaseninstegar.blogspot.com/>.
- Herrera M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Metodología de Laboratorio. Revista médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera, 34.
- Jawetz, Melnick, Adelberg (2011). Microbiología Médica, (25a ed). Editorial McGraw-HILL Interamericana, pp.3-44.
- Koneman E, Allen S, Janda W, Schereckenberger P, Winn W (2005). Diagnóstico Microbiológico. (5a ed). Editorial Médica Panamericana, pp. 52-63
- Marcano D, Hasegawa M (1991). Fitoquímica orgánica. Universidad Central de Venezuela. Caracas: Litopar.
- Marcano D, Hasegawa M (2002). Fitoquímica orgánica. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- Martínez A (2005). Flavonoides. (Tesis para optar al título de doctoren química). Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín.
- Martínez J; Durán D, Córdoba Y, Caballero D, Stashenko E (2014). Estudio comparativo de la composición química y la actividad antioxidante de los aceites esenciales de algunas plantas del género *Lippia* (Verbenaceae)

- cultivadas en Colombia. Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. Revista Académica Colombia. 38 (Supl.): 89-105.
- Martínez M, Valencia A, Ospina G, Jiménez F, Mesa M (2004). "Manual de Prácticas de Laboratorio de Farmacognosia y Fotoquímica". Departamento de Farmacia, Universidad de Antioquia. Medellín.
- Martínez S, González J & Tuñón J (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. (Revisión Nutrición Hospitalaria). Universidad de León y Hospital de León. España.
- McConnell M, Balasubraman M, Rajan K (2010). Evaluation of the larvicidal activity of the leaf extracts of *Duranta erecta* Linn. (Verbenaceae) on the larvae of *Culex quinquefascitatus*. Larvicidal activity of crude extracts of *Duranta erecta* on mosquito Journal of Biopesticides. 582 – 585
- Miranda M, Cuellar A (2000). Farmacognosia y productos naturales. Editorial Feliz Valera. La Habana. pp. 32
- Montanari R, Barbosa L, Carvalho A (2011). "Chemical Composition And Antibacterial Activity Of Essential Oils From Verbenaceae. Departamento de Química, Universidad de Federal de Viçosa. Brasil.
- Moreno, E (2013). Metodología de la investigación pautas para hacer tesis.
- Múlgura M. E. 2003 Verbenaceae. Tribu II. *Lantaneae*, parte A. En Anton, A.M. & F.O. Zuloaga Fl. Fanerog. Argent. 8: 43- 46 pp . [Artículo en línea]. Disponible en: <http://exa.unne.edu.ar/biologia/diversidadv/documentos/ANGIOSPERMAS/Asterideas/Euasterideas%20I%20o%20Lamiideas/Lamiales/10-Verbenaceae.pdf>
- Murray P, Rosenthal K, Pfaller M (2009). Microbiología Médica. (6ta edición). Barcelona-España. GEA Consultoría Editorial S.L.
- Lizcano A, Vergara J (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales frente a microorganismos patógenos y Fitopatógenos. (Trabajo de

- grado). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias. Bogotá, Colombia.
- López N (2011). Obtención y Aplicación de Extractos Naturales. Revista de Centro Nacional de Tecnología y Seguridad Alimentaria. Pp15-19.
- Luján M, Pérez C (2008). Cribado para evaluar actividad antibacteriana y antimicótica en plantas utilizadas en medicina popular de Argentina. Revista Cubana de Farmacología. 42 (2), 1-10.
- Luna, A (2015). Estudio Fitoquímico De Espino Chivo (*Duranta triacantha*). (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Bioquímica y Farmacia. Riobamba. Ecuador.
- Ogbuagu,S, Okoro K, Akpuaka M, Ogbuagu J, Ekpunobi U (2015). Quantitative Determination of Some Secondary Metabolites and the Anti - Bacterial Effects of the Leave Extracts of *Duranta erecta*. American Journal of Biomedical Science and Engineering Departamento de Química Pura e Industrial, Facultad de Ciencias Físicas. Universidad, Awka. Estado de Anambra, Nigeria. Vol. 1, No. 5, 2015, pp. 82-87.
- OMS (2011). Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos.  
Disponible en: <http://www.who.int/world-healthday/2011>
- Rejón J, Placer D, Roldan G (2011). Pruebas no condicionadas en ratones para evaluar la actividad ansiolítica de sustancias extraídas de plantas. Medica Bogotá (Colombia), 52 (1), 78-89.
- Rodríguez F, Oliveira L & Saraiva M. (2007). "Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from Cordia Verbenacea DC leaves". Pharmacognosy Research
- Rodríguez G (2017). Actividad antimicrobiana e inmunoestimulante de bacterias aisladas de ambientes marinos extremos en Baja California Sur. (Tesis de Grado). Baja California Sur. 21-22.
- Rodríguez S (2014). Cultivode*Duranta*.blogspot.com. [Artículo en línea].

Disponible en: <http://cultivodeduranta.blogspot.com/2014/11/duranta-duranta-un-genero-de-con-flores.html>

- Ruiz A, Guillen S (2005). Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. (2a ed). Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana, pp. 98-247.
- Rzedowski J, Calderón G (2002). Verbenaceae. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán. Obtenido de: <http://www1.inecol.edu.mx/publicaciones/resumenes/FLOBA/Flora%20100.pdf>.
- Sánchez E (2017). Estudio Farmacognóstico de las hojas de *Duranta mutisii*. L.f. “tantal” y Formulación de un fitofármaco. (Tesis de Grado). Universidad de Trujillo-Perú.
- Sharma P, Khandelwal S, Singh T, Vijayvergia R (2012). Phytochemical Analysis And Antifungal Potential Of *Duranta Erecta* Against Some Phytopathogenic Fungi. Laboratorio de Patología y Bioquímica de Plantas, Departamento de Botánica, Universidad de Rajastha. La India.
- Stashenko E, Jaramillo B, Martínez J (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. Revista Académica Colombia. 27 (105): 579-597. ISSN 0370-3908.
- Sejia V (2006). Etiopatología Microbiológica. (2a ed). Ed WB Saunders. pp. 17-18.
- Tamayo R, Verdecia A, Mojera I (2011). Tamizaje Fitoquímico de los extractos alcohólicos, etéreo y acuosos de las hojas y tallo de la *Isocarpha cubana* B. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 15(3).
- Tortora G, Funke B, Case C (2007). Introducción a la Microbiología. 9na ed. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. pp: 98,153-155,247.

- Torrealba D. (2008). Actividad biológica y detección de metabolitos secundarios de extractos hexánicos y metanólicos de la especie *Parkinsonia praecox* (Ruiz López & Pavon) Hawkins. (Trabajo de Grado) Universidad de Oriente – Venezuela.
- Torres C. (2014). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos frente a patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. (Tesis). Universidad Nacional de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. Lima, Perú.
- Urbina F, Villamizar D (2012). Análisis del Aceite Esencial de la Especie *Piper eriopodon* y Determinación de su Actividad Antimicrobiana. Trabajo de grado. Universidad de los Andes. Mérida (Venezuela): Facultad de Farmacia y Bioanálisis. pp: 1, 20-24, 48-53.
- Uvidia A (2012). Determinación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y subextracto etéreo y clorofórmico de *Duranta triacantha juss*, *Callistemon speciosus*, y *Tagetes minuta*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. (Tesis de Grado). Riobamba- Ecuador.
- Valerino A, González T, Gracia T (2009). Estudio fitoquímico y de actividad alelopática del extracto de n-hexano del follaje de *Lantana trifolia* L. Santiago de las Vegas, Ciudad de La Habana, Cuba. Revista CENIC Ciencias Químicas, Vol. 40, No. 1, 2009.
- Waizel J, Waizel S (2005). Algunas plantas utilizadas popularmente en el tratamiento de enfermedades respiratoria. Parte I. An Orl Mexico, 50 (4), 76-87.
- Wayne PA. (1997). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCCLS) Approved Standard M2-A6.