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

# DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE *Plumeria inodora* Jacq

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de**

**Licenciados en Bioanálisis**

www.bdigital.ula.ve

**Autores:**
Materan L José D
C.I. 19.102.373
Mejías C Antonio J
C.I 19.592.055
**Tutor**: Prof. Rojas, Luis

**Mérida, Octubre de 2017**



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por siempre estar con nosotros, darnos la vida, y permitirnos lograr las metas trazadas.

A la Santísima Virgen María y al Dr. José Gregorio Hernández.

A nuestros familiares, padres y hermanos por su paciencia y apoyo incondicional, por sus consejos sabios por siempre estar en los momentos buenos y malos.

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por la sabiduría, paciencia y fuerza para seguir adelante.

A nuestros padres y abuelos por siempre estar en las buenas y malas, guiamos y llevarnos de su mano.

A nuestros hermanos que han sido nuestros amigos incondicionales.

A nuestros familiares por siempre apoyamos en cada paso.

A nuestros amigos incondicionales quienes han caminado con cada uno de nosotros, durante estos largos años.

A nuestro Tutor y Prof. Luis Rojas, por el conocimiento ofrecido, paciencia, dedicación y esmero absoluto para la culminación de este trabajo.

A la Prof. Rosa Aparicio, Yndra Cordero y Alida Pérez por sus conocimientos aportados en la parte experimental.

A todo el personal del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis

A la ilustre Universidad de Los Andes, por los conocimientos aportados a través de los más destacados profesionales

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## INDICE GENERAL


| | pág. |
|---|---|
| DEDICATORIA | iii |
| AGRADECIMIENTOS | iv |
| ÍNDICE GENERAL | v |
| ÍNDICE DE TABLAS | vii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | ix |
| ÍNDICE DE ESQUEMAS | x |
| ÍNDICE DE ANEXOS | xi |
| RESUMEN | xii |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| **CAPÍTULO I. EL PROBLEMA** | 3 |
| Planteamiento del Problema | 3 |
| Justificación de la Investigación | 4 |
| Objetivos de la Investigación | 5 |
| *Objetivo General* | 5 |
| *Objetivos Específicos* | 6 |
| Alcances y Limitaciones de la Investigación | 6 |
| **CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO** | 8 |
| Trabajos Previos | 8 |
| Antecedentes Históricos | 9 |
| Bases Teóricas | 11 |
| *Generalidades de la Familia Apocynaceae* | 11 |
| *Género Plumeria* | 11 |
| *Farmacología de genero Plumeria* | 12 |
| *Actividad antibacteriana de las especies de Plumeria* | 13 |
| *Constituyentes químicos* | 14 |
| *Plumeria inodora* Jacq | 19 |
| *Tamizaje Fitoquímico* | 20 |
| *Métodos de obtención de extractos vegetales* | 23 |
| *Análisis Cromatográfico* | 25 |


www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

*Actividad Antibacteriana* 27
*Bacterias Gram negativas* 28
*Bacterias Gram positivas* 29
*Antibióticos y agentes quimioterapéuticos* 30
*Métodos para evaluar la actividad antibacteriana* 31
Definición operacional de Términos 32
Operacionalización de las Variables 33
Hipótesis 35
**CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO** 36
Tipo de Investigación 36
Diseño de la Investigación 36
Población y muestra 37
*Unidad de Investigación* 37
*Selección del Tamaño Muestral* 37
Sistema de Variables 38
Procedimientos de la Investigación 38
Diseño de Análisis 47
**CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN** 48
Resultados 48
Discusión 65
**CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES** 68
Conclusiones 68
Recomendaciones 69
**BIBLIOHEMEROGRAFÍA** 70
ANEXOS 78

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## ÍNDICE DE TABLAS


| Tablas | | pág. |
|---|---|---|
| **1** | Situación de *Plumeria inodora* Jacq, en la sistemática botánica | 19 |
| **2** | Operacionalización de la Variable Dependiente | 34 |
| **3** | Operacionalización de la Variable Independiente | 35 |
| **4** | Microorganismos de ensayo | 41 |
| **5** | Antibióticos comerciales utilizados como control positivo para cada cepa ensayada | 42 |
| **6** | Componentes Identificados en el extracto de Hexano de las hojas de *Plumeria inodora* Jacq. | 48 |
| **7** | Componentes Identificados en el extracto de Diclorometano de hojas de *Plumeria inodora* Jacq. | 49 |
| **8** | Componentes Identificados en el extracto Etanólico de hojas de *Plumeria inodora* Jacq. | 50 |
| **9** | Componentes Identificados en el extracto de Hexano del tallo de *Plumeria inodora* Jacq. | 51 |
| **10** | Componentes Identificados en el extracto de Diclorometano del tallo de *Plumeria inodora* Jacq | 52 |
| **11** | Componentes Identificados en el extracto Etanólico del tallo de *Plumeria inodora* | 53 |
| **12** | Actividad antibacteriana y determinación de la CMI del extracto de Diclorometano con hojas de *P. inodora* J | 54 |
| **13** | Actividad antibacteriana y determinación de la CMI del extracto de Diclorometano de los tallos de *P. inodora* J | 56 |
| **14** | Actividad antibacteriana y determinación de la CMI del extracto Etanólico de las hojas de *P. inodora* J | 58 |
| **15** | Actividad antibacteriana y determinación de la CMI del extracto Etanólico de los tallos de *P. inodora* J | 60 |
| **16** | Screnning Fitoquímico de los Extractos de *Plumeria inodora* Jacq. De las hojas y el tallo con los disolventes elegidos: Hexano, Diclorometano y Etanol acetilado. | 62 |


www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## ÍNDICE DE FIGURAS


| FIGURAS | | pág. |
|---|---|---|
| **1** | Ejemplo de compuestos identificados en los extractos del género *Plumeria*. | 14 |
| **2** | Alcaloides aislados en las plantas del género *Plumeria.* | 15 |
| **3** | Principales iridoides aislados en las plantas del genero *Plumeria* | 16 |
| **4** | Esteroides aislados del genero *Plumeria obtusifolia* | 16 |
| **5** | Triterpenos aislados de *Plumeria obtusa* | 17 |
| **6** | Compuestos fenólicos aislados del género *Plumeria* | 18 |
| **7** | Flavonoides aislados del género *Plumeria*. | 19 |
| **8** | Especie *Plumeria inodora Jacq* | 20 |
| **9** | Actividad antibacteriana del Extracto de Diclorometano de las hojas de *Plumeria inodora* Jacq. | 55 |
| **10** | Actividad antibacteriana del Extracto de Diclorometano de los tallos de *Plumeria inodora* Jacq. | 57 |
| **11** | Actividad antibacteriana del Extracto Etanólico de hojas de *Plumeria inodora* Jacq | 59 |
| **12** | Actividad antibacteriana del Extracto Etanólico del tallo de *Plumeria inodora* Jacq. | 61 |
| **13** | Identificación de Esteroles y Triterpenos | 63 |
| **14** | Identificación de Alcaloides | 63 |
| **15** | Identificación de Flavonoides | 64 |
| **16** | Identificación de Cumarinas | 64 |


www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## ÍNDICE DE ESQUEMAS


| ESQUEMAS | | pág. |
|---|---|---|
| **1** | Procedimientos de la investigación | 46 |


www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## ÍNDICE DE ANEXOS


| ANEXOS | | pág. |
|---|---|---|
| **1** | Cromatograma General y los compuestos mayoritarios del análisis del extracto de hexano de las hojas de *Plumeria inodora* Jacq. | 78 |
| **2** | Cromatograma General y los compuestos mayoritarios del análisis de los componentes químicos del extracto de Diclorometano de las hojas de *Plumeria inodora* Jacq. | 79 |
| **3** | Cromatograma General y Compuestos Mayoritarios del análisis de los componentes químicos del extracto Etanólico de las hojas de *Plumeria inodora* Jacq. | 80 |
| **4** | Cromatograma General, los compuestos mayoritarios del análisis de los componentes químicos del extracto de Hexano de los tallos de *Plumeria inodora* Jacq. | 81 |
| **5** | Cromatograma General y los compuestos mayoritarios del análisis de los componentes químicos del extracto de Diclorometano de los tallos de *Plumeria inodora* Jacq | 82 |
| **6** | Cromatograma General y Compuestos Mayoritarios del análisis de los componentes químicos del extracto Etanólico de los tallos de *Plumeria inodora* Jacq. | 83 |


www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

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

# DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO DE *Plumeria inodora* Jacq

**Autores**
Materan José
Mejías Antonio
**Tutor**: Prof. Rojas, Luis.

## RESUMEN

Los indicadores de evidencias de conocimiento tradicional, científico y documentado de la especie *P. inodora* J. Son escasos, por esta razón el objetivo de esta investigación Confirmar la actividad antibacteriana y realizar el Screening Fitoquímico de los extractos obtenidos de las hojas y tallos de *Plumeria inodora* Jacq, en el Laboratorio de Productos naturales A del Instituto de Investigación y el Laboratorio investigaciones en Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, desde diciembre de 2014 hasta septiembre 2017. La investigación fue de tipo confirmatoria con un diseño de campo, de laboratorio, transversal y bivariante. La unidad de investigación fueron los tallos y las hojas. Se realizó la obtención de sus extractos con los siguientes solventes: Hexano, Diclorometano y Etanol. Para la caracterización química se utilizó Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de Masas. El análisis de la actividad antibacteriana (AA) se realizó mediante el método de Difusión en Agar. Resultados: los componentes químicos mayoritarios para los 3 solventes fueron: hexadecanoico (Ácido Palmitico), Isopropil hexadecanoato, Isopropil palmitato. El Screnning reveló la presencia de esteroles y terpenos en la mayoría de las muestras y algunos alcaloides. Los microorganismos con sensibilidad fueron *Staphylococcus aureus, Enterococcus feacalis, Pseudomonas Aeuruginosa y Escherichia coli*. En conclusión la especie de *P. inodora* J. Tiene amplio alcance para aislar diversos componentes fitoquímicos, permitiendo evaluar su selección farmacológica para obtener un mejor valor terapéutico. El extracto con mayor (AA) fue el diclorometano y el de mayor rendimiento el etanol.

**Palabras claves**: Actividad antibacteriana, Screnning fitoquímico, Extracto, Solvente



www.bibdigital.ula.ve
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

# INTRODUCCIÓN

Las plantas tienen la habilidad de expresar diferentes características y estas variaciones podrían ser anatómicas o morfológicas, lo que ha generado un aumento en la descripción de especies o variedades. Durante las últimas décadas en el ámbito científico los productos naturales han sido utilizados arduamente en la búsqueda de nuevos fármacos que reduzcan, inhiban y en muchos casos eliminen los diversos síntomas de numerosas enfermedades. Para determinar la composición química de las plantas medicinales y conocer sus constituyentes biológicamente activos pueden seguirse metodologías que van desde un análisis fitoquímico preliminar hasta estudios químicos sistemáticos bioguiados. (Sanabria, Valera, Maciel y Mendoza, 2014; Carvajal, Hata, Sierra y Rueda, 2009).

El extracto crudo es una sustancia concentrada de metabolitos secundarios de una planta, los cuales cumplen diversas funciones de gran importancia. Se dice que estos compuestos han sido creados en el laboratorio químico de la naturaleza para proteger y prolongar la vida de la planta, ya que a menudo constituyen un medio de defensa frente a depredadores, actuando como repelentes de insectos, microorganismos, hongos y animales herbívoros, previniendo así la destrucción de flores y hojas. Las Apocynaceae son una familia de las dicotiledóneas que comprenden gran variedad de especies. Sera de gran valor conocer el ámbito taxonómico de las especies de este género *Plumeria inodora* Jacq, en Venezuela, en vista de la indeterminación en cuanto a los caracteres inespecíficos de identificación y la necesidad de elaborar una revisión actualizada de este taxón que ayude a identificar las distintas especies, para contribuir a clarificar el estatus taxonómico y su distribución geográfica (Morales, 2005).

La importancia de esta investigación radica en confirmar la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de la hoja y el tallo de *Plumeria*



www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

*inodora* Jacq, recolectadas en el Estado Mérida en la localidad de Lagunillas. La metodología a implementar en esta investigación estuvo representada por la recolección de la planta *Plumeria inodora* Jacq, posteriormente se realizó el secado, molido y se combinó con solventes de creciente polaridad para la obtención de los respectivos extractos.

La presente investigación se estructuró en cinco capítulos: el primero denominado El Problema, constituido por el planteamiento del problema, la justificación e importancia de la investigación, el objetivo general y objetivos específicos, así como los alcances y limitaciones de la investigación; seguidamente en el Segundo Capítulo; se mencionan los trabajos previos, antecedentes históricos o epistemológicos, bases teóricas, definición de términos y operacionalización de variables; en el Tercer Capítulo titulado Marco Metodológico ordenado con 7 subtítulos, tipo de investigación, diseño de la investigación, población y muestra, sistema de variables, matriz de registro, metodología de investigación y diseño de análisis. El Cuarto Capítulo, descrito como resultados y discusión. El Quinto Capítulo titulado conclusiones y recomendaciones.

www.bdigital.ula.ve

El objetivo de esta investigación fue confirmar la actividad antibacteriana y realizar un Screening fitoquímico de los extractos obtenidos de las hojas y tallos de *Plumeria inodora* Jacq, en el Laboratorio de Productos naturales A del Instituto de Investigación y el Laboratorio investigaciones en Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, desde diciembre de 2014 hasta septiembre 2017.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

# CAPITULO I

## EL PROBLEMA

### Planteamiento del problema

A lo largo de la historia las enfermedades han ocasionado múltiples infecciones trayendo consigo un aumento en la morbilidad y eventualmente mortalidad, más que todo en la población infantil. Por otra parte afortunadamente la mayoría de estas son procesos auto limitados, ya que son de etiología viral. Un tratamiento antibacteriano puede ser óptimo o efectivo, esto dependerá no solo de la sensibilidad del patógeno al antibiótico si no de las propiedades farmacológicas donde se obtendrán concentraciones adecuadas tanto en el nivel alcanzado, como en el tiempo de permanencia en el sitio de la infección (Manual de antibióticos en pediatría, 2007).

www.bdigital.ula.ve

En conexión con lo expuesto desde hace algún tiempo, se han utilizado los productos derivados de las plantas para uso medicinales, lo que ha generado un aumento con los años. Esto ocurre debido a una serie de factores de los cuales podemos destacar el conocimiento específico de su composición química, y el hecho de que en la actualidad dicha utilización se basa en numerosos ensayos farmacológicos *in vivo* como *in vitro*, así como en ensayos químicos, el grupo de los productos naturales en los últimos años ha despertado un gran interés debido a la creencia popular que son más eficaces y seguros que los medicamentos de síntesis o por recientes tendencias en salud que buscan suplementar la alimentación (Guevara, Luengas y Garavito,2010).



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Es por ello que los investigadores hoy en día descubren propiedades medicinales en las plantas, lo cual ha generado importantes aportes que no tienen una clara extrapolación terapéutica, ocasionada en algunos casos por la falta de recursos económicos o de información. Mayormente en el terreno de la oncología y la antibióticoterapia es donde surgen con mayor frecuencia los descubrimientos a partir de productos naturales (Lorenzo, *y cols.,* 2008). Debido a las diversas enfermedades asociadas a microorganismos que se han venido descubriendo a lo largo de los años y que algunas han tenido una respuesta positiva frente a especies vegetales gracias a sus propiedades biológicas las cuales pueden ayudar a tratar y controlar dichas patologías se ha planteado el siguiente tema de investigación y originada la siguiente interrogante:

¿En qué medida se corresponde la actividad antibacteriana de los extractos de *Plumeria inodora* Jacq, y los patrones de susceptibilidad en cepas de bacterias ATCC Gram positivas y Gram negativas, en el Laboratorio de Productos naturales A del Instituto de Investigación y el Laboratorio investigaciones en Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, desde diciembre de 2014 hasta septiembre 2017?

www.bdigital.ula.ve

## Justificación de la Investigación

Al tener el conocimiento que una planta posee propiedades medicinales, y se desea utilizar con fines de investigación, uno de los problemas más importantes es la determinación de la fuente biológica por lo cual es importante que se conozcan las características botánicas de la especie, su taxonomía y la distribución geográfica de la especie en este caso la *Plumeria*, debido a que el hábitat de las especies están limitadas a regiones, se pueden llegar a excluir familias enteras de plantas o puede haber la posibilidad de que el principio activo derive de una planta perteneciente a



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

una de las familias características de la región de origen. Es por ello que ésta investigación asumió un valor teórico, una utilidad metodológica y una implicación práctica (Morales, 2005).

La justificación teórica de esta investigación nos permitió conocer que en Venezuela los estudios de obtención de extractos tienen una elevada credibilidad por parte de las zonas rurales y urbanas puesto que forman parte de sus costumbres, de allí radica la importancia de conocer en cada planta sus propiedades. En los últimos años se ha observado un incremento en la incidencia de enfermedades bacterianas, debido al aumento de pacientes inmunocomprometidos y el uso de agentes antimicrobianos de amplio espectro, lo que los hace altamente susceptibles a este tipo infecciones, por lo cual el avance de la fitoterapia es cada vez mayor, esto se evidencia en que las plantas medicinales representan más del 80 % de la utilidad médica. Finalmente, la implicación práctica de esta investigación estuvo relacionada con los resultados obtenidos durante el proceso de obtención del extracto de la planta y la medición de su actividad antibacteriana.

www.bdigital.ula.ve

Por lo antes expuesto, se decidió estudiar la especie *Plumeria inodora* Jacq, proveniente de Lagunillas, Mérida, estado Mérida. Con este trabajo de investigación se espera contribuir al conocimiento de la actividad antibacteriana que pueda presentar esta planta.

## Objetivos de la investigación

### *Objetivo General*

Confirmar la actividad antibacteriana y realizar el Screening Fitoquímico de los extractos obtenidos de las hojas y tallos de *Plumeria inodora* Jacq, en el Laboratorio de Productos naturales A del Instituto de Investigación y el Laboratorio investigaciones en Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, desde diciembre de 2014 hasta septiembre 2017.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

### *Objetivos Específicos*

- Verificar la composición fitoquímica por medio de la realización del Screening fitoquímico.
- Identificar cualitativamente la composición química de los extractos mediante el uso de pruebas químicas y técnicas de Cromatografías como Cromatografía en Capa fina (CCP) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).
- Determinar la actividad antibacteriana de los extractos crudos de las hojas y los tallos de la especie *Plumeria inodora* Jacq.

## ALCANCES Y LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

### *Alcances de la investigación*

www.bdigital.ula.ve

Los alcances de esta investigación se relacionaron con la profundidad del conocimiento que los investigadores pretenden obtener. En tal sentido, se consideró la propuesta de Hernández, Fernández y Baptista (2010) quienes refirieron lo siguiente:

> Si hemos decidido, una vez hecha la revisión de la literatura, que nuestra investigación vale la pena y debemos realizarla, el siguiente paso consiste en visualizar el alcance que tendrá. No se deben considerar los alcances como “tipos” de investigación, ya que, más que ser una clasificación, constituyen un continuo de “causalidad” que puede tener un estudio (p.50).

En concordancia con lo anterior, este estudio permitió determinar la composición química de los diferentes extractos obtenidos de la especie *Plumeria inodora* Jacq*,* recolectada en la localidad de Lagunillas, Estado Mérida, y demostrar si presentan o no actividad antibacteriana.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

### *Limitaciones de la investigación*

Las limitaciones iniciales fueron durante la recolección de la planta en estudio *Plumeria inodora* Jacq, debido a la ubicación la cual se encuentra en el estado Mérida en la localidad de Lagunillas situada a 1070 msnm con una temperatura aproximada a 24 °C y con pocas precipitaciones. Los constantes cambios climáticos, han afectado el hábitat de las mismas, esto origino otra limitación a esta investigación.

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## CAPITULO II

## MARCO TEORICO

### Trabajos previos

Los antecedentes reseñan el registro de trabajos precedentes sobre el tema en estudio efectuados por investigadores de instituciones de educación superior y de otra índole, en relación con el fenómeno de estudio. Así mismo, para el año 2014 Sanabria, Valera, Maciel y Mendoza en su trabajo intitulado *Metabolitos secundarios en siete biotipos de Plumeria en el estado Lara, Venezuela,* con el objetivo de identificar y cuantificar metabolitos secundarios producidos por los diferentes materiales vegetales del género *Plumeria* que pueden ser de interés en su reconocimiento taxonómico. Esto se realizó por cromatografía en capa fina y se evidenció la presencia diferencial de alcaloides en los órganos considerados, y cuyas concentraciones muestran una proporción 3:2:1 para el tallo, seguido por la hoja y por último la flor. No se detectaron flavonoides, fenoles ni saponinas, en ningún material o condición; mientras que en las flores, se destacó la presencia de aceites esenciales. Este trabajo respalda la investigación porque los autores consideran un evento de estudio parecido ya que determinaron la presencia de alcaloides y no se detectaron saponinas.

www.bdigital.ula.ve

Seguidamente en el año 2014 Choudhary, Kumar y Singh en su trabajo intitulado *Aislamiento y caracterización de los alcaloides antimicrobianos de Plumeria alba* (flores) *contra patógenos alimentarios*. Realizado en india con el objetivo de este estudio fue explorar los posibles alcaloides de *Plumeria alba* y su actividad frente a microorganismos patógenos y de deterioro de los alimentos. Un total de seis bacterias patógenas, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538,



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

*Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* MTCC 3224, y *Shigella flexneri* ATCC 12022 se ensayaron contra el extracto de alcaloides de las flores de *P. alba* bajo condiciones *in vitro*. El ensayo antibacteriano se evaluó utilizando la difusión de pozos y los valores mínimos de concentración inhibitoria (CIM) fueron analizados mediante el método de microdilución en caldo, el perfil de los extractos se determinó mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de masas (GC-ME). Los resultados obtenidos fueron: la CIM revelo que *Shigella flexneri* ATCC 12022 fue el microorganismo más sensible (7,5 µg mL) seguido por *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (15 µg/mL). *Escherichia coli* ATCC 8739 fue más resistente al extracto con un Valor MIC> 60 µg/ml$^{-1}$. El resultado del análisis GC-ME del extracto de la flor de *Plumeria alba* reveló la presencia de 11 alcaloides basados en su tiempo de retención y los índices de retención. Se puede concluir que la formulación de fármacos antimicrobianos que contengan el extracto de flor de *P. alba* para controlar los patógenos transmitidos por los alimentos es factible. Este artículo se relaciona con la investigación, ya que los autores utilizaron cepas ATCC *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli.*

www.bdigital.ula.ve

## Antecedentes históricos

En el año 2008 Gupta, Mazumder, Gomathi y Thamil en su trabajo intitulado *Actividad antimicrobiana de extractos de metanol de Plumeria acuminata Ait. hojas y las raíces de Tephrosia purpurea (Linn.)*, realizado en India. En el cual determinaron la actividad antimicrobiana del extracto de metanol de las hojas de *Plumeria acuminata* Ait., *in vitro* por el método de difusión en disco de agar, donde los extractos metanólicos brutos inhibieron el crecimiento tanto de bacterias Gram positivas (*Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus y Micrococcus luteus*) como de bacterias Gram negativas (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa y Salmonella*



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

*typhimurium*). Ambos extractos a una concentración comprendida entre 250 µg/mL y 1000 µg/mL mostraron actividad inhibidora contra todas las bacterias ensayadas. El extracto también mostró significativa actividad antifúngica frente a *Aspergillus niger* y *Candida albicans*. Concluyendo que todos los microorganismos ensayados mostraron susceptibilidad dependiente de la dosis hacia los extractos de metanol.

Destacamos los aportes de Abad, Bahsas, Delgado, Amaro y Neil, realizado en Canadá en el año 2006 intitulado *Actividad antimicrobiana y estudio fitoquímico preliminar de Mandevilla veraguasensis (Seem.) Helms. (*Apocynaceae*)* donde demostraron la actividad antimicrobiana y estudio fitoquímico preliminar de *Mandevilla veraguasensis* (Seem.) Helms. (Apocynaceae), en el cual se probaron la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto en acetato de etilo de las hojas de esta especie. Se observó una moderada actividad frente a las bacterias Gram positivas *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, la cual puede ser atribuida, en parte, a los flavonoides 4´-*O*-metil-kaempferol y quercetina aislados de este extracto. Concluyendo que posee actividad inhibidora del crefcimiento de bacterias Gram positivas.

www.bdigital.ula.ve

En el año 2002 en Brasil. Barbosa, Bacchi, Sakuda, Ohara, Younes y Varella confirmaron, en la siguiente investigación intitulada *La actividad antibacteriana de los extractos de* Apocynaceae *y la CMI (concentración mínima inhibitoria) de extracto orgánico del tallo de Tabernaemontana angulata*. En el cual estudió la actividad antimicrobiana de 11 especies de Apocynaceae del Amazonas, sobre: *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y Candida albicans* realizadas en placas de microtitulación de 96 pocillos. Se obtuvieron 38 extractos acuosos y orgánicos. Concluyendo que el extracto orgánico obtenido del tallo de *Tabernaemontana angulata* presentó actividad contra *Sthaphylococcus aureus*, la concentración mínima inhibitoria fue de 2,50 a 1,25 mg/mL. El Cloranfenicol fue utilizado como estándar. En el extracto activo se detectaron alcaloides y triterpenos.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## Bases Teóricas

### *Generalidades de la Familia* Apocynaceae

Se reconocen 5031 especies dentro de esta familia, divididas en 402 géneros. La familia Asclepiadoideae está ahora incluida en la de Apocynaceae (Endress y Bruyn, 2000).

Hay cinco subfamilias:

- Rauvolfioideae*,* 980 especies en 42 géneros.
- Apocynoideae, 860 especies en 77 géneros.
- Periplocoideae, 180 especies en 31 géneros.
- Secamonoideae, 170 especies en 9 géneros.
- Asclepiadoideae, 2365 especies en 214 géneros.

www.bdigital.ula.ve

La familia está distribuida en las regiones tropicales del mundo entero. Son plantas herbáceas, lianas árboles o arbustos. Las hojas son enteras, simples y opuestas o verticiladas. Las flores son hermafroditas y regulares (Daniel y Sabnis, 1978).

Algunos géneros importantes son: *Plumeria, Allamanda, Melodinus, Vinca, Carissa, Strophanthus.* A nivel de la sistemática botánica, la familia Apocynaceae se sitúa en: la división Spermatophyta y sub-división Angiospermae y en la clase Dicolyledonea (Spichiger, Savolainen, Figeat, y Jeanmonod*.,* 2000).

### *Género Plumeria*

*Plumeria* se origina desde los trópicos del Nuevo Mundo, desde el sur de México hasta el norte de Sudamérica, pero se ha introducido en todas las áreas tropicales del mundo y ahora es común en Asia sudoriental. Este género tiene valor medicinal en la medicina popular. *Plumeria rubra* ha sido utilizado como febrífugo, purgante, y en el tratamiento de la lepra. En



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

América del Sur, las decocciones de hojas, la corteza, y el duramen se usan como un antihelmíntico, purgante, emenagogo, y en el tratamiento de diversas infecciones de la piel. Los extractos de diversas especies de *Plumeria* han demostrado significativa actividad: antibacteriana, antifúngica, y actividad antiviral (Spichiger *y cols*., 2000).

El género *Plumeria* debe su nombre, en honor, al botánico francés Charles Plumier (1646-1704). Su nombre vernáculo es Frangipanier, que viene del italiano Frangipani el cual elaboro un perfume muy apreciado en el siglo XII; cuatro siglos después los viajeros europeos descubren en el Caribe estas plantas con un perfume similar. El género *Plumeria* comprende siete especies: *P. alba, P. filifolia, P. inodora, P. obtusa, P. pudica, P. rubra, P. subsessilis,* repartidas en las Islas Occidentales justo al norte de la América del Sur, sin embargo cabe destacar que la especie *Plumeria pudica*, es endémica de Venezuela y Colombia (Allorge, 1996).

Las Frangipanier son parte de bellos arboles tropicales con flores muy vistosas, estas son utilizadas principalmente como ornamentales pero también como medicinales. La leche que se obtiene de la *Plumeria inodora Jacq.,* es, por ejemplo, utilizada para quitar las verrugas (Allorge, 1996).

www.bdigital.ula.ve

### *Farmacología del género Plumeria*

El género *Plumeria* se conoce como una fuente de iridoides. Estos poseen diversas propiedades beneficiosas. Además, presentan una capacidad para mejorar la función hepática y la capacidad para estimular la excreción de ácidos biliares, así como actividad antimicrobiana, actividad antitumoral, actividad antiviral y actividad antiinflamatoria (Kamariah, Lim, Baser, Ozek, y Demirci., 1999).

Diferentes especies de *Plumeria* se utilizan para la curación de reumatismo, diarrea, blenorrea, enfermedades venéreas, lepra, psicosis y diuresis etc. También se han investigado especies de *Plumeria* para el



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

aislamiento de triterpenoides, que exhibieron actividad alguicida, antibacteriana y actividades citotóxicas (Choudhary, Kumar, Singh, 2014).

### *Actividad antibacteriana de las especies de Plumeria*

Se investigó el extracto metanólico de hojas de *P. acuminado* para sus actividades antimicrobianas *in vitro* mediante el método de difusión de discos de agar. El extracto inhibió ambos microorganismos Gram positivos (*Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus* y *Micrococcus luteus*) y Gram negativos (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium*). Los aceites esenciales obtenidos de las flores de tres especies malasias de *Plumeria*, a saber *P. rubra L, P. acutifolia Poir, P. obtusa L.* se analizaron por GC / ME y se identificaron 27 componentes, 7 de ellos se separaron e identificaron a partir de *P. rubra*, 1 componente de *P. obtusa* y 19 componentes de *P. acutifolia*. Los componentes principales encontrados en las tres especies son ácido 2-hidroxibenzoico éster fenilmetílico y dos hidrocarburos alcanos (nanodecano y heneicosano). Las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales (a 2 µL por disco) se determinaron mediante el método de difusión de agar utilizando ocho diferentes cepas microorganismos *Escherichia coli* (bacterias Gram negativas), *Staphylococcus aureus y Bacillus cereus* (bacterias Gram positivas), *Candida albicans y C. humicola* (levadura), y *Trichophyton mentagrophytes, T. rubrum y Microsporumcanis* (hongos). La inhibición de amplio espectro fue exhibida por el aceite esencial de *P. obtusa* El extracto inhibió todos los microorganismos ensayados excepto *E. coli*. La mayor zona de inhibición fue mostrada por el aceite esencial de *P. obtusa* contra *C. humícola*. En otro estudio, la fracción de *n*-hexano del extracto metanólico bruto de la corteza del tallo de *P. rubra* mostró concentración mínima inhibitoria de 13,5, 11,8, 8,5 y 16,9 mg/mL e indujo un máximo de 91,53, 92,84, 94,69 y 85,29 % de

www.bdigital.ula.ve



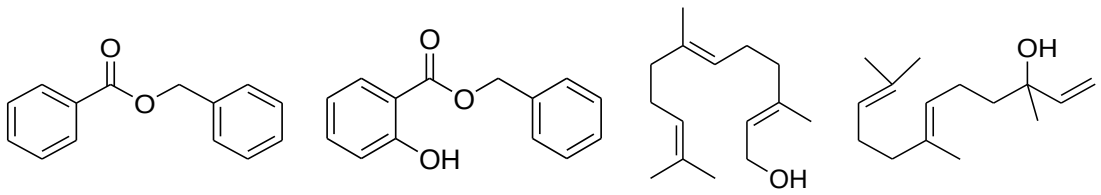
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

inhibición del crecimiento contra *S. aureus, E. cloacae, P. aeruginosa y S. marcescens* (Choudhary *y cols.,* 2014).

### *Constituyentes químicos*

Los glicósidos de iridoide fueron los primeros compuestos medicinalmente activos aislados de las especies de *Plumeria*. Posteriormente, el látex y el aceite de algunas de estas especies, se encontró que tenían otros componentes activos medicinales como esteroles, carbohidratos, taninos, triterpenoides y alcaloides. Componentes similares fueron posteriormente aislados de varios extractos de raíces y partes superficiales de estas plantas en variadas composiciones. Se lograron identificar: Benzoato de bencilo **(1),** Salicilato de bencilo **(2),** (2*E*,6*E*)-Farnésol **(3)** y (*E*)-nérolidol **(4)** estos son compuestos de estructura molecular simple y de peso molecular no tan elevado (< 400 $g.mol^{-1}$) (Figura 1) (Choudhary *y cols*., 2014; Kamariah *y cols*., 1999).

www.bdigital.ula.ve




Benzoato de bencilo (**1**) | Salicilato de bencilo (**2**) | (2*E*,6*E*)-farnesol (**3**) | (*E*) nerolidol (**4**)

**Figura 1.** Ejemplo de compuestos identificados en los extractos del género *Plumeria*.

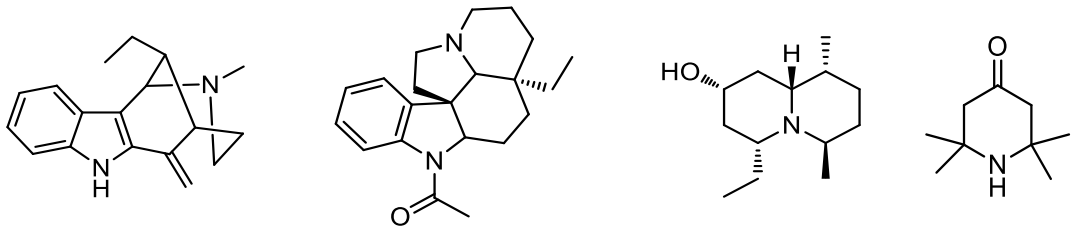
#### a) *Alcaloides*

Los alcaloides no son metabolitos secundarios aislados corrientemente de las especies de *Plumeria*. Solamente se han reportado la presencia de cuatro: uleina **(5)** y la demetoxiaspidospermina **(6)** dos alcaloides indólicos



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

aislado de la *Plumeria lancifolia,* la plumerinina **(7)** aislada de los tallos de *Plumeria rubra y la* vincubina **(8)** aislada con rendimientos altos de 3 a 3,5 % a partir de los tallos de la *Plumeria sericifolia* (Figura 2) (Kazmi, Ahmed, Ahmed y Malik*.,* 1989; Cuellar y Tejera*.,* 1976).



Uleina **(5)** Demetoxiaspidospermina **(6)** Plumerinina **(7)** Vincubina **(8)**

**Figura 2.** Alcaloides aislados en las plantas del género *Plumeria.*

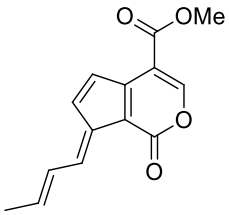
***b) Iridoides***

www.bdigital.ula.ve

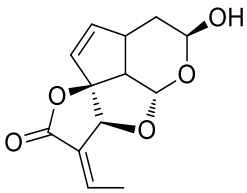
Los iridoides son la clase de compuestos más importantes en el género *Plumeria*, ya que casi todas las especies los contienen. En la literatura se encuentra una centena de estas estructuras aisladas de diversas especies de *Plumeria*. Estas son casi siempre las responsables de la actividad biológica de estas plantas y sus extractos. Entre las sustancias aisladas frecuentemente figuran fluvoplumierina **(9),** allamcina **(10),** plumericina **(11),** isoplumericina **(12),** allamandina **(13),** alfa y beta-allamcidina **(14** y **15).** Algunas agliconas han podido ser aisladas bajo la forma de glicosidos. La 1-beta-plumierida **(16)** esta, por ejemplo, presente en diversas especies de *Plumeria* y son derivadas de ácidos carboxílicos: la 15-demetilplumierida **(17),** que ha sido encontrada en *Plumeria rubra* (Figura 3) (Kardono, Tsauri, Padmawinata, y Kinghorn 1990).



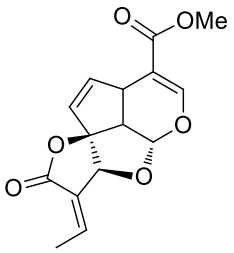
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)



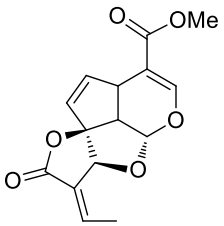
Fluvoplumierina **(9)**



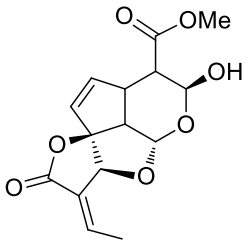
Allamcina **(10)**



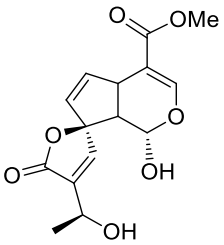
Plumericina **(11)**



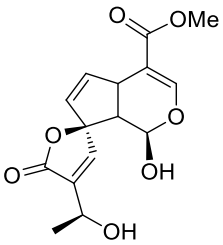
Isoplumericina **(12)**



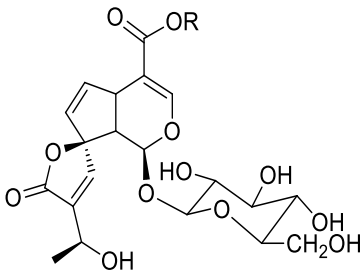
Allamandina **(13)**



*α*-allamcidina **(14)**



*β*-allamcidina **(15)**



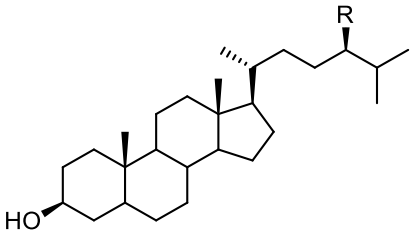
1*β*-plumierida, R=Me **(16)**
15-demetilplumierida, R=H **(17)**

**Figura 3.** Principales iridoides aislados en las plantas del genero *Plumeria.*

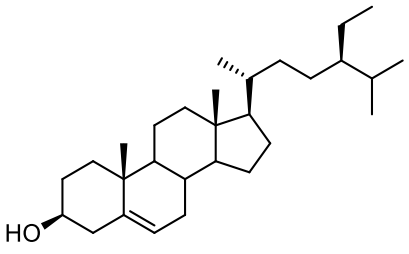
www.bdigital.ula.ve

***c) Esteroides***

Los esteroides no son muy estudiados en el género *Plumeria*. Un solo trabajo fue realizado sobre la *Plumeria obtusifolia,* y condujo al aislamiento de stigmasterol **(18),** campesterol (**19**) y sitosterol **(20)** (figura 4), estas son sustancias naturales encontradas ampliamente en el reino vegetal (Bruneton, 2001).



Stigmasterol, R=Et **(18)**
Campesterol, R=Me **(19)**



3*β*-sitosterol **(20)**

**Figura 4.** Esteroides aislados del genero *Plumeria obtusifolia.*

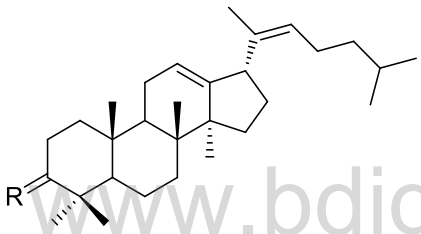


Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

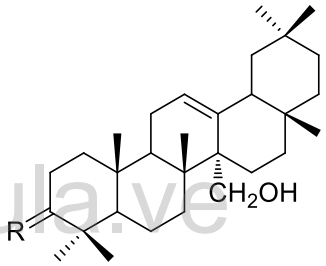
***d) Triterpenos***

Numerosos triterpenos tetra- y pentacíclicos han sido aislados del género *Plumeria*, estos pertenecen a las series de ursanos, oleananos, lupanos y dammaranos. Estos pueden igualmente presentar una función ácido carboxílico libre o pueden estar esterificados por ácidos como el *p*-hidroxifenilpropanoico o *p*-hidroxibenzoico. El dammara-12,20(22)Z-dién-3-one **(21),** dammara-12,20(22)Z-dién-3 (3-ol **(22),** oléan-12-ene-3 (3,27-diol **(23),** hidroxiolean-12-en-3-one **(24),** obtusaline **(25),** obtusol **(26),** los ácidos oleanólico, betulínico y ursólico han sido aislados de *Plumeria obtusa,* la especie más estudiada a nivel del aislamiento de triterpenos (Figura 5) (Siddiqui, Ilyas, Rasheed, y Begum*.,* 2004).

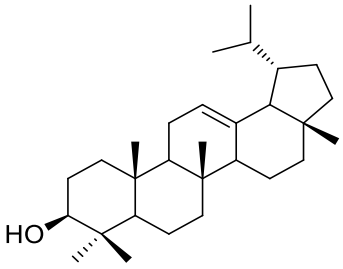
www.bdigital.ula.ve



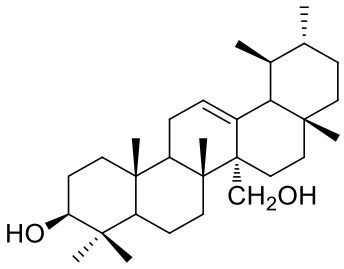

dammara-12,20(22)Z-dién-3-one, R=O **(21)**
dammara-12,20(22)Z-dién-3*β*-ol, R=OH, H **(22)**




oléan-12-ene-3*β*,27-diol, R=OH, H **(23),**
hidroxiolean-12-en-3-one, R=O **(24)**




obtusaline **(25)**




obtusol **(26)**

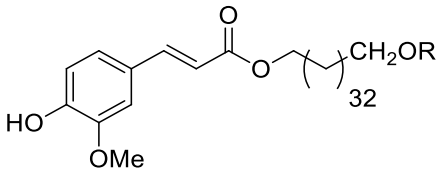
**Figura 5.** Triterpenos aislados de *Plumeria obtusa.*



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

### *e) Compuestos fenólicos*

Los ferulatos de 34-*O*-acetil-tetratriacontanilo **(27)** y de 34-hidroxi-teratriacontanilo **(28),** han sido aislados respectivamente de las especies *P. bicolor* y *P. rubra L. forma acuminate* (Figura 6) (Daniel y Sabnis, 1978) (Dobhal y cols., 1999).



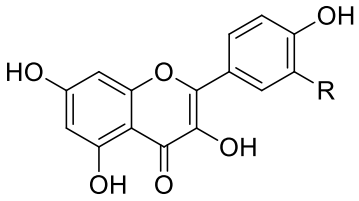

(R=$COCH_3$) ferulatos de 34-*O*-acetil-tetratriacontanilo **(27)**

(R=H) ferulato de 34-hidroxi-teratriacontanilo**(28)**

**Figura 6.** Compuestos fenólicos aislados del género *Plumeria*.

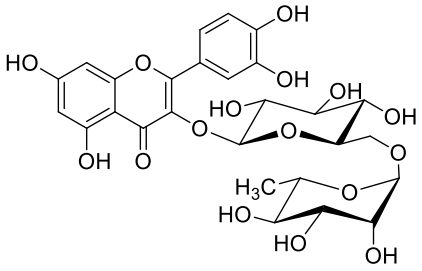
Algunos flavonoides han sido aislados. Entre estos tenemos: Kaempferol **(29)**, quercetina **(30**) han sido aisladas de especies de *P. rubra L. forma acuminate Sant*., *P. rubra, P. rubra* var. *alba* y la rutina **(31)** se aisló a partir de *P. rubra* de *P. alba*, la hiperosido **(32)** a partir de *P. alba* y un nuevo flavan-3-ol glicosil, el plumerubrosido **(33),** de *P. rubra* (Figura 7). (Daniel y Sabnis, 1978; Kardono y cols., 1990; Gunasingh, Barnabas, Nagarajan, y Pharm 1979).

www.bdigital.ula.ve




Kaempferol, R=H **(29)**

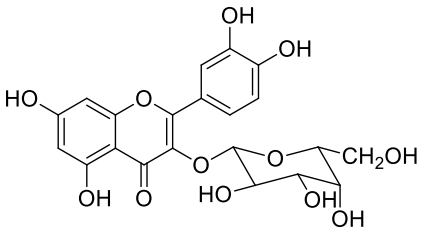
Quercetina, R=OH **(30)**



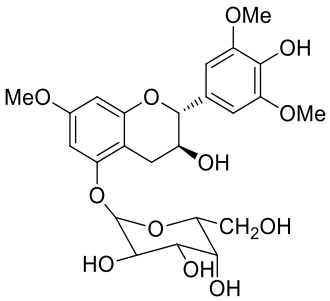

Rutina **(31)**



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)




Hiperosido **(32)**




Plumerubrosido **(33)**

**Figura 7.** Flavonoides aislados del género *Plumeria*.

### ***Plumeria inodora* Jacq.**

Arbusto de 3 a 5 m de alto, hojas romboideas, agudas atenuadas en la base, de unos 22 cm de largo por 6 cm de ancho, glabras en la cara superior, pubescentes en las nerviaciones de la cara inferior; las venas principales se anastomosan y forman una vena marginal. Inflorescencias cimosas; pedúnculos secundarios desarrollados, con muchas flores terminales. Flores con pedicelos de 8 a 12 mm de largo. Brácteas presentes, deltoideas, de 1 a 2 mm de largo. Cáliz con lóbulos deltoideos, de 1 a 2 mm de largo. Corola subinfundibuliforme, blanca algunas veces con el centro amarillento; tubo de 20 a 25 mm de largo. Frutos en folículos de 5 a 10 cm de largo (figura 8). La situación taxonómica de la *Plumeria inodora* Jacq, se muestra en la tabla 1. Distribuida en el norte de Sudamérica y Antillas. En Venezuela es frecuente en la Cordillera de la Costa (Kamariah *y cols.,* 1999).

www.bdigital.ula.ve

**Tabla 1.** Situación de *Plumeria inodora* Jacq, en la sistemática botánica.

| | |
|---|---|
| **División** | Spermatophyta |
| **Sub-división** | Angiospermae |
| **Clase** | Dicotyledoneae |
| **Sub-clase** | Asteridae |
| **Orden** | Gentianales |



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

| | |
|---|---|
| **Familia** | Apocynaceae |
| **Sub-familia** | Plumeroideae |
| ***Genero*** | *Plumeria* |
| ***Especie*** | *Plumeria inodora* Jacq. |

Continuación de la tabla 1.



Fuente: Tutor

www.bdigital.ula.ve

**Figura 8.** Especie *Plumeria inodora* Jacq.

### *Tamizaje fitoquímico*

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo, con el fin de buscar metabolitos secundarios tales como; alcaloides, cumarinas, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, antraquinonas, saponinas, glucósidos cardiotónicos, taninos, terpenos, esteroides y



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

mucílagos, utilizando procedimientos estándares de análisis como cromatografía de capa fina (CCF) y formación de precipitados (Palacios, 2013). Algunos de los ensayos existentes, para los diferentes grupos de metabolitos secundarios son:

***Alcaloides***

La extracción de estos compuestos depende tanto de la naturaleza del material a procesar como de las estructuras químicas y por ende, de las propiedades físicas de los alcaloides presentes que se desean separar del material biológico. Por estar casi siempre en forma de sal son solubles en agua, además pueden utilizarse solventes orgánicos, si son transformados a sus bases libres por alcalinización. Las bases cuaternarias son casi siempre solubles en agua por lo que debe recurrirse a su precipitación por formación de complejos con solución de yodo-yoduro de potasio (Reactivo de Wagner), bicloruro de mercurio, tetrayoduro de potasio (Reactivo de Mayer), nitrato de bismuto pentahidratado (Reactivo de Dragendorff), solución de ácido pícrico (Reactivo de Hager), entre otros (Marcano y Hasegawa, 2002).

www.bdigital.ula.ve

***Terpenos***

Con el nombre de terpenos o isoprenoides se conoce a un conjunto de sustancias que conforman uno de los grupos de fitoquímicos más difundido. Estos compuestos tienen un origen biosintético común y, aunque con estructuras químicas muy distintas, todos ellos proceden de la condensación del isopreno (2-metil-1,3-butadieno), un hidrocarburo de 5 átomos de carbono. Los terpenos se encuentran principalmente en los alimentos de color verde, en productos derivados de la soja y en los cereales (López, Miguel y Aleixandre 2012).



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

***Compuestos fenólicos***

Los fenoles son sustratos muy reactivos a la sustitución aromática electrofílica, porque los electrones no enlazantes del grupo hidroxilo estabilizan al complejo sigma que se forma por ataque en la posición orto o para. Para la identificación de los mismos, se utilizará el ensayo con $FeCl_3$, en esta reacción el $Fe^3+$, se une al grupo fenóxido para formar complejos. Esta respuesta se debe al ataque producido por el ion $Cl^-$ al hidrogeno del grupo -OH, provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al $Fe^3+$. Dicha reacción se caracteriza por generar soluciones vivamente coloreadas (azul, verde y violeta). Si el color es amarillo débil, el mismo que el $FeCl_3$, la reacción se considerará negativa. Algunos fenoles no dan coloración, como la hidroquinona, ya que se oxidan con el reactivo a quinona (Wade, 2004).

***Flavonoides***

www.bdigital.ula.ve

Sin ser metabolitos primarios se encuentran casi siempre en cualquier vegetal superior. Los flavonoides pueden encontrarse en la naturaleza tanto en forma libre (agliconas) como en forma de O- y C- heterósidos, que es lo más frecuente. Generalmente, los flavonoides libres contienen grupos fenólicos que se disuelven en soluciones de hidróxidos alcalinos. La alta reactividad de estos grupos permite el establecimiento de puentes de hidrógeno o uniones covalentes, su intervención en reacciones de oxidación y reducción, y la formación de complejos con iones metálicos como el cobre ($Cu^2+$), hierro ($Fe^2+$), magnesio ($Mg^2+$) y zinc ($Zn^2+$). Para la caracterización de estos compuestos se utilizan técnicas basadas en la presencia de grupos fenólicos, que al añadirles álcalis (NaOH, KOH) se produzca una coloración amarilla o la intensificación del color de la disolución inicial de la droga. El compuesto 2- aminoetildifenilborato reacciona en metanol con el grupo hidroxilo de los flavonoides en la posición 2´ del anillo B para formar el 2´-



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

difenilborato del flavonoide correspondiente, estos compuestos presentan una coloración amarilla característica (Marcano y Hasegawa, 2002).

***Saponinas***

Se denominan saponinas a un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial de ésta, por lo tanto, al agitar sus soluciones, se forma una espuma abundante y relativamente estable (ensayo de la Espuma). Por hidrolisis de las mismas con ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada generalmente sapogenina, la cual posee un esqueleto esteroidal o triterpenoidal (Mena, *y cols.,* 2015).

***Taninos***

Los taninos son compuestos químicos de carácter fenólico de alto peso molecular, no cristalizables que forman con el agua soluciones coloidales de reacción ácida y de sabor astringente. Se distinguen dos grupos básicos de taninos que difieren por su estructura y su origen biogenético: taninos hidrolizables y condensados o catéquicos. Los taninos hidrolizables por tratamiento con ácidos se separan en azúcares y ácidos fenólicos, mientras que los condensados no se degradan. Los primeros, son compuestos reductores que forman sales complejas coloreadas con todos los metales ($FeCl_3$) y precipitan con acetato de plomo y alcaloides. También poseen la propiedad de coagular la gelatina o de curtir la piel (Delporte, 2010).

www.bdigital.ula.ve

***Métodos de obtención de extractos vegetales***

Maceración: es un proceso de extracción solido-liquido, donde la materia prima posee una serie de compuestos solubles en el líquido de extracción que son los que se pretenden extraer. Consiste en remojar la materia prima fragmentada con el solvente para que este penetre la estructura celular y



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

disuelva las sustancias. El material se agita esporádicamente por un periodo mínimo de dos días. Luego se decanta el líquido, filtrando y exprimiendo el residuo (Albornoz, 1980; Burdock, 1975).

Lixiviación: es un proceso que consiste en disolver selectivamente, en un disolvente apropiado, los componentes mayoritarios o los elementos traza de una muestra o un metal líquido, se trata de un proceso inverso a la precipitación. Otro nombre que recibe esta técnica es disolución selectiva (Valcárcel y Gómez, 1988).

Destilación: es el proceso de evaporar una sustancia, condensar los vapores y devolverlos al estado líquido. La destilación comprende variantes, según si el material vegetal fresco o seco puede alterarse por la ebullición del agua. Generalmente se utiliza el arrastre con vapor, macerando el material con agua en un balón, e inyectando a través de esta masa una corriente de vapor, el agua condensada contiene la sustancia arrastrada la cual se separa por decantación (Albornoz, 1980).

www.bdigital.ula.ve

Extracción por solución: Precisa una mayor inversión que la extracción por arrastre de vapor, pero genera un rendimiento casi duplicado respecto a los sistemas anteriores, además de obtenerse «prácticamente todos» los compuestos presentes en la matriz herbácea: volátiles, grasas, ceras, pigmentos, etc. Por otra parte, precisa de equipos de vacío para poder obtener los aceites absolutos, con altos costes operativos en comparación con los de extracción por arrastre o EFS. Y sobre todo es necesario utilizar disolventes orgánicos como alcoholes, hidrocarburos, éteres, etc (Palomino, 2001).

Extracción sólido – líquido: cuando se trata de una muestra sólida, se pulveriza y a continuación, se extraen los analitos mediante un disolvente en



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

el que sean muy solubles, que los diferencie de las sustancias presentes en la matriz, que han de ser muy insolubles en ese disolvente. Se suele hacer con agitación, temperatura o ultrasonidos para una mayor eficacia. Normalmente se somete a centrifugación tras la extracción para eliminar los sólidos que hayan podido quedar (Palomino, 2001).

Extracción líquido – líquido: consiste en extraer los analitos de una muestra líquida mediante un disolvente inmiscible en ella, como puede ser una fase acuosa con un disolvente orgánico no miscible. El pH es fundamental para conseguir buen rendimiento (Palomino, 2001).

Extracción por centrifugación: los extractos y aceites obtenidos por este proceso tienen características aromáticas superiores a las conseguidas por extracción por arrastre de vapor. Al no ser un proceso térmico, sus propiedades son más estables, por los antioxidantes naturales presentes. Aun así, la fricción interna de la materia prima provoca un aumento de temperatura no controlable que puede implicar una degradación térmica y un oscurecimiento del extracto. Este cambio requiere el empleo de equipos de purificación adicionales con altos costes operativos que incrementan el precio final del producto (Palomino, 2001).

www.bdigital.ula.ve

Extracción en fase sólida: se emplean columnas o cartuchos capaces de retener el analito, que se extrae posteriormente con un pequeño volumen de disolvente (Palomino, 2001).

### *Análisis Cromatográfico*

Las técnicas cromatográficas se basan en la separación de las sustancias presentes en una mezcla compleja al poner ésta en contacto con una fase móvil (líquido o gas) y otra estacionaria (sólida o líquida) que permanece fija. Las sustancias van a migrar a través de la fase estacionaria arrastradas por



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

la fase móvil, a distinta velocidad según su afinidad o solubilidad en una u otra fase. Las sustancias más afines por la fase estacionaria migrarán más despacio, y las más afines por la fase móvil, más deprisa. Ajustando los parámetros cromatográficos, conseguiremos separar todos los componentes. Los tres tipos más comunes son la cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía de gases (CGL) y la de líquidos (HPLC) (Palomino, 2001).

Cromatografía en Capa Fina (CCF): se emplea en controles de todo tipo de productos naturales, habiéndose establecido como método analítico muy importante en las farmacopeas modernas. Permite identificar de forma rápida y bajo coste los componentes presentes en un determinado material vegetal. También se puede emplear como método semicuantitativo (Palomino, 2001).

Cromatografía de Gases (CG): la cromatografía de gases o cromatografía gas – líquido (CGL) se emplea para sustancias volátiles o volatilizables, como son los aceites esenciales. Se emplea como fase móvil un gas, y como fase estacionaria un líquido contenido en una columna capilar, de diámetro muy pequeño y varios metros de longitud, que va enrollada en el interior del cromatógrafo. Se trabaja a alta temperatura, para que los componentes de la mezcla se mantengan volatilizados. Es la técnica más selectiva y la recomendada por la Farmacopea Europea como el método estándar para el análisis los mismos. Permite separar e identificar aceites esenciales, alcanfor, ácidos vegetales, algunos alcaloides como los del opio y tabaco, resinas de cannabis, y compuestos esteroideos como sapogeninas y heterósidos cardiotónicos. Es un método a la vez cuantitativo y cualitativo. Esta técnica, acoplada con Espectrometría de Masas (CG-EM), permite obtener el espectro de masas de cada componente, con el cual se obtiene el peso molecular e información estructural. Existen bases de datos con los espectros de masas de muchos componentes. Más recientemente se han

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

desarrollado columnas cromatográficas quirales para la separación de componentes ópticamente activos (Palomino, 2001).

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC): HPLC son las siglas en inglés de High Pressure Liquid Chromatography. Esta técnica permite separar e identificar moléculas de estructura química muy similar, incluso isómeros. Se aplica a compuestos no volátiles, como heterósidos, alcaloides, lípidos, esteroides, glúcidos, flavonoides, y a sustancias termolábiles, como las proteínas y vitaminas. Tanto la fase móvil como la estacionaria son líquidas, de distinta polaridad, de modo que la separación de las sustancias ocurre en base a este parámetro. Se trabaja a temperatura ambiente, pero se bombean las fases móviles a presión. El resultado en ambos casos (CGL y HPLC) es un cromatograma, que muestra los compuestos separados y el área del pico de cada uno de ellos, que es proporcional a su concentración (Palomino, 2001).

www.bdigital.ula.ve

## *Actividad Antibacteriana*

### *Bacterias*

Son microorganismos procariotas, es decir, unos microorganismos unicelulares sencillos, sin membrana nuclear, mitocondrias, aparato de Golgi ni retículo endoplásmico que se reproducen por división asexual. La pared celular que rodea a las bacterias es compleja, y existen dos formas básicas; una pared Gram positiva con una gruesa capa de peptidoglucano y una pared Gram negativa con una delgada capa de peptidoglucano, así como una membrana externa. El organismo humano está habitado por miles de especies bacterianas distintas; mientras algunas mantienen una relación parasitaria temporal, otras habitan en el ser humano de manera permanente. También se pueden encontrar en el ambiente, como el aire, el agua y los alimentos. Aunque muchas son relativamente avirulentas, otras son capaces



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

de provocar enfermedades potencialmente mortales (Koneman *y cols.,* 2008).

### *Clasificación bacteriana*

Se pueden clasificar según su capacidad de retención de la tinción de Gram y por la forma de cada célula: cocos, bacilos y espirilos (Murray, Rosenthal, y Pfaller*,* 2009).

### *Bacterias Gram Negativas*

La pared celular de las Gram negativas es más compleja (estructural y químicamente). Desde el punto de vista estructural, una pared celular Gram negativa 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 representa tan solo un 5-10 % del peso de la pared celular, además esta pared no contiene ácidos teicocicos ni lipoteicoicos. Se conocen que las bacterias Gram positiva son más susceptibles a los aceites esenciales que las Gram negativa, por cuanto unas son más resistentes que las otras, la efectividad de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales está relacionada con el contenido de algunos constituyentes altamente activos y de la especie de la planta, estas bacterias se tiñen de color rojo (Murray *y cols.,* 2009).

www.bdigital.ula.ve

Las cepas que se utilizaron para llevar a cabo este estudio fueron

### *Klebsiella pneumoniae*

Es un bacilo Gram negativo, fermenta la lactosa, la mayoría produce colonias sumamente mucoides en placas debido a la producción de una cápsula de polisacárido abundante y todas son inmóviles. Son indol negativas. *Klebsiella* es característicamente resistente a múltiples



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

antibióticos. Además de la resistencia natural de este microorganismo a la ampicilina y a la carbenicilina (Puerta y Mateos, 2010).

***Pseudomonas aeruginosa***

Es un bacilo Gram negativo, oxidasa positivo y pueden crecer a temperaturas superiores a 42 °C. Las cepas de esta especie presentan un característico color verde brillante, debido a la producción de los pigmentos piocianina, de color azul, y pioverdina, de color amarillo fluorescente, los cuales juntos le dan dicha coloración. Es un habitante común de agua, suelos y plantas. En los hospitales puede ser encontrada en respiradores, humidificadores, vertederos, duchas, piscinas de hidroterapia y ocasionalmente en las manos de los trabajadores de la salud. Es un patógeno oportunista, responsable de una amplia gama de infecciones, principalmente nosocomiales (Lujan, 2014).

www.bdigital.ula.ve

***Escherichia coli***

Es el microorganismo de vida libre que mejor se ha estudiado. Son bacilos Gram negativo, anaerobios facultativos, fermentadores y oxidasa negativo pueden ser móviles (la mayoría) o inmóviles, son parte de la familia *Enterobacteriaceae,* la mayor parte de ellas fermentan la lactosa y son capaces de producir indol a partir de triptófano (Murray *y cols.,* 2009; Puerta y Mateos, 2010).

***Bacterias Gram Positivas***

Son aquellas que poseen una pared celular, la cual se presenta como una capa gruesa y homogénea, denominada pared celular, Poseen una pared celular interna y una pared de peptidoglucano, el peptidoglucano es un exoesqueleto que da consistencia y forma esencial para replicación y supervivencia de la bacteria. No poseen membrana externa, estas presentan



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

40 capas de pared mureína, están compuestas por otros componentes como ácidos teicoicos y lipoteicoicos, estas bacterias se tiñen de color azul ya que retienen el colorante. Estas bacterias son más sensibles a los antibióticos que las Gram Negativas (Murray *y cols.,* 2009).

Las que se utilizaron para llevar a cabo este estudio fueron:

**Especies de *Staphylococcus***

El género *Staphylococcus* está formado por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0,5 a 1,5 µm, agrupados como cocos únicos, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los *Staphylococcus* producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus y Enterococcus* los cuales son catalasa negativos (Cervantes, García y Paz, 2014).

www.bdigital.ula.ve

***Enterococcus faecalis***

Son células esféricas u ovoides, de tamaño 0,6-2,0 × 0,6-2,5 µm. Son cocos Gram positivos, no formadores de endosporas. Se presentan en forma de pares o de cadenas cortas. Son no mótiles. Son anaerobios facultativos, quimiorganotrofos, con metabolismo fermentativo. *E. faecalis* es más abundante en el tracto gastrointestinal de los humanos, lo cual podría explicar su prevalencia en los aislamientos clínicos, además de su virulencia incrementada (Díaz, Rodríguez y Zhurbenko 2010).



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

### *Antibióticos y agentes quimioterapéuticos*

Son sustancias producidas por el metabolismo de organismos vivos, principalmente hongos microscópicos y bacterias, que poseen la propiedad de inhibir el crecimiento o destruir microorganismos. También existen sustancias producidas de manera sintética que poseen la misma acción que pueden tener los antibióticos; a éstas se les conoce con el nombre de sustancias quimioterapéuticas (Sánchez, 2006)

Se pueden clasificar según el mecanismo de acción, por lo que hoy en día encontramos una variedad de antibióticos; considerando lo anterior encontramos aquellos que inhiben la síntesis de la pared celular, proteínas, ácidos nucleicos, actividad enzimática y los que alteran la integridad de la membrana (Koneman, 2008).

### *Método para evaluar la actividad antibacteriana*

www.bdigital.ula.ve

Existen 4 métodos para evaluar la actividad antibacteriana de un extracto crudo, que pueden mostrar cuáles agentes son más eficaces contra un patógeno y dan una estimación de la dosis terapéutica adecuada (Murray *y cols*., 2009).

- ✓ Pruebas de sensibilidad por dilución (Puede ser en caldo o en agar)
- ✓ Pruebas de sensibilidad por difusión en agar (Prueba de Kirby – Bauer).
- ✓ Antibiograma ATB Rapad (bioMeriux)
- ✓ Método de la cinta o Epsilómetro Etest® (AB BIODISK).

**Prueba de sensibilidad por difusión en agar**

Es empleada en patógenos aerobios o facultativos de crecimiento rápido y así ahorrar tiempo y medios de cultivo. El principio de esta técnica se basa en colocar un disco impregnado de antibiótico en agar, en el que previamente se ha inoculado la bacteria objeto de la prueba, el disco va a



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

captar humedad y el antibiótico difunde radialmente hacia fuera a través del agar, produciendo un gradiente de concentración de antibiótico. A medida que aumenta la distancia desde el disco, disminuye la concentración del antibiótico. Si el agente inhibe el crecimiento bacteriano, en torno al disco se forma un anillo claro. Cuanto más ancha es la zona que rodea al disco más sensible es el patógeno (Prescott, Harley, Klein, 2003).

En la actualidad, la prueba de difusión en agar más empleada es el método de Kirby Bauer, que fue desarrollado a principio de la década de 1960 por William Kirby, A. W. Bauer en la Escuela de Medicina de Washington. Se puede decir que los resultados obtenidos son de gran valor clínico para iniciar, mantener o modificar una antibióticoterapia (Ramírez *y cols.,* 2006).

## Definición operacional de términos

### Extracción

www.bdigital.ula.ve

Es la técnica más empleada para proceder a la separación y purificación de los componentes de una mezcla o para aislar un compuesto orgánico de sus fuentes naturales. Puede definirse como la separación de un componente de una mezcla por medio de un disolvente orgánico (inmiscible con el agua) en contacto con una fase acuosa. Lo que en realidad se realiza en una extracción es la transferencia de una sustancia de una fase a otra, normalmente de una fase acuosa a una orgánica (Valcárcel y Gómez, 1988).

### Solvente

Se denomina solvente a la sustancia en la cual se dispersa molecularmente el soluto. También se le conoce como componente continuo o dispersor. Los más utilizados son alifáticos, aromáticos, alcoholes, esteres, cetonas e hidrocarburos (Velázquez y Ordorica, 2009).



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## Acetilación

La Acetilación es una reacción química que se llama ethanoylation en la nomenclatura de IUPAC. Describe una reacción que introduzca un grupo funcional del acetilo en una pasta química. La reacción química opuesta se llama deacetylation - es el retiro del grupo del acetilo. El proceso de introducir un grupo del acetilo da lugar a un grupo del acetoxi. Implica la substitución de un grupo del acetilo para un átomo de hidrógeno activo. Una reacción que implica el repuesto del átomo de hidrógeno de un grupo de oxhidrilo con un grupo del acetilo (CH3 CO) entonces rendiría un éster específico, el acetato (Wade, 2002).

## Fitoquímica

Significa sustancias químicas de las plantas que aunque no se consideran esenciales para nuestro metabolismo, sin embargo son beneficiosas a largo plazo para nuestra salud. Se agrupan en clases de acuerdo a su función y sus características estructurales, de los cuales se considera que los Terpenos, los Fenoles y los Tioles, son los más estudiados. Constituye la evolución más reciente de alimentos funcionales y enfatiza las fuentes vegetales de la mayoría de los compuestos preventivos de enfermedades (Chasquibol, *y cols.,* 2003).

www.bdigital.ula.ve

## Operacionalización de Variables

Según Palella y Martins (2010), la operacionalización de las variables es el procedimiento mediante el cual se determinan los indicadores que caracterizan a las variables de una investigación. Esta definición operacional asigna significado a una variable, describiéndola en términos observables y comparables para poder identificarla. Para establecer el sistema de variables es necesaria la definición conceptual y la operacionalización de las mismas, es decir, de las dimensiones y los indicadores de cada una. Por lo tanto, las



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

variables se operacionalizan para convertir los conceptos abstractos en empíricos, con el fin de medirlos a través de un instrumento.

Las Tablas 2,3 representan la operacionalización de las variables presentes en la investigación desarrollada, en relación con la actividad antibacteriana de los extractos de *Plumeria inodora* Jacq, según los patrones de susceptibilidad en cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, en el Laboratorio de Productos naturales A del Instituto de Investigación y el Laboratorio investigaciones en Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, desde diciembre de 2014 hasta septiembre 2017.

**Tabla 2:** ***Operacionalización de la variable Dependiente***

| **1. Variable** | **2. Tipo de Variable** | **3. Definición Conceptual** |
|---|---|---|
| **Actividad Antibacteriana** | Dependiente<br>Discreta | Capacidad de producir un efecto que inhibe a los microorganismos mediante una serie de eventos. (Casellas., 2011). |
| **4. Definición Operacional** | **5. Dimensiones** | **6. Indicador** |
| Se puede medir a través del antibiograma y se reconoce por medio del halo de inhibición | Sensible<br>Resistente | Halo de inhibición |

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**Tabla 3*: Operacionalización de la variable Independiente***

| 1. Variable | 2. Tipo de Variable | 3. Definición Conceptual |
|---|---|---|
| **Extractos crudos de la *Plumeria inodora Jacq*.** | Independiente discreta | Consisten en la fracción no volátil de los principios activos (Murray *y cols*., 2009). |
| **4. Definición Operacional** | **5. Dimensiones** | **6. Indicador** |
| Cantidad del extracto obtenido por extracción sólido-líquido | Presente Ausente | Cantidad en mililitros del extracto |

## Sistema de Hipótesis

www.bdigital.ula.ve

### *Hipótesis Afirmativa (Ha)*

Si existe relación de causa-efecto entre la actividad antibacteriana de los extractos crudos de hojas y tallos obtenidos de la *Plumeria inodora* Jacq y las cepas ATCC utilizadas en el Laboratorio de investigaciones en Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, desde diciembre de 2014 hasta septiembre 2017

### *Hipótesis Nula (Ho)*

No existe relación de causa-efecto entre la actividad antibacteriana de los extractos crudos de hojas y tallos obtenidos de la *Plumeria inodora* Jacq y las cepas ATCC utilizadas en el Laboratorio de investigaciones en Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, desde diciembre de 2014 hasta septiembre 2017



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

# CAPITULO III

# MARCO METODOLÓGICO

El marco metodológico define los métodos, técnicas, instrumentos, estrategias y procedimientos a utilizar en la investigación que se va a desarrollar. Según Hurtado (2010), la metodología es el área del conocimiento que estudia los métodos generales de las disciplinas científicas, incluyendo los métodos, las técnicas, las tácticas, las estrategias y los procedimientos que utilizara el investigador para lograr los objetivos de su estudio.

## Tipo de Investigación

www.bdigital.ula.ve

Según Hurtado, los tipos de investigación están relacionados con el logro expresado durante el proceso de la misma. Específicamente, pueden ser: exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmativa y evaluativa. En tal sentido, el nivel de la investigación desarrollada fue de tipo confirmatoria porque intenta comprobar o no si existe actividad antibacteriana, además experimental debido a que se estudió la realidad en su contexto natural a través de la recolección de las partes aéreas referentes a la planta *Plumeria inodora* Jacq, permitiendo determinar si existe actividad antibacteriana.

## Diseño de la Investigación

Según Palella y Martins (2010), los diseños de la investigación se determinan por las estrategias utilizadas para responder las interrogantes de



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

la investigación y desarrollar los objetivos. A su vez, Hurtado (2010), propuso que el diseño está relacionado con el cómo, dónde, cuándo y el cuánto de la información a recolectar. En tal sentido, este estudio correspondió con un diseño de campo, de laboratorio, transversal y bivariable De campo porque las hojas y los tallos de *Plumeria inodora* Jacq se recolectaron directamente en la localidad de Lagunillas del estado Mérida. De laboratorio porque las muestras de hojas y tallos fueron procesadas en el Laboratorio de Productos naturales A del Instituto de Investigación y el Laboratorio de investigaciones en Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, con el fin de obtener los extractos de hexano, diclorometano y etanólico; además de realizar los procedimientos relacionados con el análisis fitoquímico de la especie *Plumeria inodora* Jacq. El diseño también fue transversal y contemporáneo ya que los datos se obtuvieron en el presente y una sola vez en la unidad de investigación. El diseño bivariable se refiere a que el evento de estudio estuvo conformado por dos variables.

www.bdigital.ula.ve

## Población y muestra

### *Unidad de Investigación*

Estuvo representada por las hojas y tallos de *Plumeria inodora* Jacq que se recolectaron en la localidad de Lagunillas, Estado Mérida y las cepas ATCC que se encuentran en el Laboratorio de investigaciones en Bioquímica de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Se escogieron aquellas hojas y tallos que no estuvieran secos y no presentaran otros signos de deterioro.

### *Selección del Tamaño Muestral*

El tamaño de la muestra estuvo representado por las hojas y los tallos frescos de la planta en estudio, se recolectaron 1220 gramos de hojas y 4810



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

gramos de tallo, tomando en cuenta que el porcentaje de humedad forma parte del peso total, el cual se disminuira después del secado.

## Sistema de Variables

Las variables en esta investigación fueron sistematizadas en dependiente e independiente, considerando el marco teórico y los objetivos. La variable dependiente fue: la actividad antibacteriana de los extractos de *Plumeria inodora* Jacq. La variable independiente fue el extracto de *Plumeria inodora* Jacq.

## Procedimiento de la Investigación

Para la obtención del extracto de *Plumeria inodora* Jacq, se utilizó el método de extracción por maceración y la determinación de la actividad antibacteriana se realizó por el método difusión en disco de agar según Kirby Bauer, el procedimiento a seguir se explicará a continuación:

www.bdigital.ula.ve

### *Recolección de la planta*

La planta fue recolectada en la población de Lagunillas del estado Mérida, en su medio natural, e identificada por el Prof. Luis Rojas y el Ing. Juan Carmona de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

### *Secado y molienda de la planta recolectada*

El material recolectado 1220 gramos de hojas y 4810 gramos de tallos, fue destinado al proceso de secado y molienda (hojas y tallos). Dando así un peso de: tallos 285 gramos secos y hojas 135,28 gramos secos.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

### *Preparación de los extractos*

Una vez secado y molido el material vegetal fue sometido a un proceso de extracción por maceración sólido-líquido durante 48 horas con 300mL del solvente elegido: Hexano, Diclorometano y Etanol.

El proceso de maceración consistió en poner en contacto la planta seca y molida con solventes durante varios días. Este proceso da como resultado un equilibrio de concentración entre el extracto y el solvente, y depende de factores que estén unidos al extracto como por ejemplo su naturaleza, el tamaño de la partícula, su contenido de humedad, cantidad y factores que están relacionados con el solvente como por ejemplo la cantidad y la selectividad. El rendimiento del extracto disminuye cuando la relación con el solvente aumenta. El aumento del extracto es factor importante, porque aumenta la permeabilidad de la pared celular y la difusión del solvente. La velocidad con que se obtiene el requilibrio está en función del tamaño de la partícula del extracto molido, así como, el grado de hinchamiento de las células y de las propiedades del solvente como por ejemplo su viscosidad y su polaridad (Sharapin *y cols*., 2000).

www.bdigital.ula.ve

El extracto etanólico es polar al ocurrir la acetilación arrastra los grupos OH disponibles lo que permite una mejor identificación de los constituyentes de la muestra.

### *Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).*

La separación e identificación de los componentes del extracto crudo de *Plumeria inodora* Jacq, se realizó en un cromatógrafo de gases modelo 6890, equipado con detector de masas marca Hewlett Packard Modelo 5973, inyector automático y una columna capilar HP-5MS de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm de espesor de la película. Temperatura de la fuente 230 º C; temperatura del cuádruplo 150 º C; gas portador helio ajustado a una



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

velocidad lineal de 34 cm/s; energía de ionización 70 eV; amplitud del scan 40-500 amu; 3,9 scans $s^{-1}$. El volumen inyectado fue de 1,0 µL de una solución de 5 mg de cada extracto en hexano, acetona, con relación de reparto de 1:1. El programa de temperatura fue el siguiente: temperatura inicial de 100 º C con incremento de 5 º C por minuto hasta una temperatura final de 260 º C, con un tiempo de recorrida de 50 minutos. La determinación de los componentes se realizó mediante comparación de los espectros de masas de la librería Wiley 6$^{ta}$ Edición (Adams, 2007).

### *Determinación de la actividad antibacteriana*

Fue realizada en el laboratorio de investigaciones en Bioquímica perteneciente al departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo tutoría de la Prof. Yndra Cordero y la Prof. Alida Pérez. El método utilizado durante este procedimiento fue el de difusión en agar con discos según Kirby Bauer, las bacterias usadas en este estudio fueron de referencia internacional, pertenecientes a la colección de cultivos tipo americano (Velasco *y cols*., 2007).

www.bdigital.ula.ve

### *Preparación del inoculo bacteriano*

Los cultivos bacterianos de las cepas ATCC, fueron sembrados en caldo de Müller-Hinton, e incubados a 37 °C durante 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. Para la reactivación de las cepas se sembraron por estría en placas de agar Müller-Hinton con el fin de obtener colonias aisladas de las cuales se tomó una pequeña cantidad de colonias con asa en aro para ser suspendidas en una solución de cloruro de sodio al 0,85 % estéril, seguidamente el inoculo bacteriano se ajustó con solución salina fisiológica al patrón de turbidez de Mac Farland N°0,5 ($10^{6-8}$ UFC/mL).



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

| | | |
|---|---|---|
| **Bacterias Gram positivas** | ***Staphylococcus aureus*** | **ATCC 25923** |
| | ***Enterococcus faecalis*** | **ATCC 25853** |
| **Bacterias Gram negativas** | ***Pseudomonas aeruginosa*** | **ATCC 25853** |
| | ***Escherichia coli*** | **ATCC 25922** |
| | ***Klebsiella neumoniae*** | **ATCC 23357** |

**Tabla 4:** Microorganismos de ensayo

### *Preparación de las placas e inoculación*

A cada placa se le coloco 20 mL del agar Müeller-Hinton previamente preparado y esterilizado, con un total de 40 placas. (35 para actividad y 5 para preinóculo). Posteriormente se dejó solidificando a temperatura ambiente para su uso. Una vez preparadas las placas cada inoculo se sembró con un hisopo estéril sobre la superficie del agar girando sucesivamente dicha placa en ángulos de 90º (Velasco *y cols*., 2007).

www.bdigital.ula.ve

### *Preparación y colocación de discos*

Se impregnaron discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro con 10µL de los extractos, de igual manera se impregnaron discos con los diluentes (hexano, diclorometano y etanol) el Dimetilsulfóxido fue utilizado como control negativo. Los controles positivos de susceptibilidad para cada cepa ensayada, estuvieron representados por discos estándares de antibiótico comercial según las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standars Institute (CLSI, 2017). Tal como se muestra en la tabla 5 a fin de inhibir el crecimiento bacteriano. Una vez que las placas fueron debidamente inoculadas, sobre su superficie se colocaron en forma equidistante los discos impregnados con las diluciones y los controles negativos. Las concentraciones de los extractos utilizadas fueron: 10000 ppm, 5000 ppm, 2500 ppm, 1250 ppm y 625 ppm.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

| Microorganismo | Antibiótico | [] (µL) |
|---|---|---|
| ***Staphylococcus aureus*** | Eritromicina | 15 µL |
| ***Enterococcus faecalis*** | Ampicilina | 10 µL |
| ***Pseudomonas aeruginosa*** | Piperacilina | 100 µL |
| ***Escherichia coli*** | Piperacilina | 100 µL |
| ***Klebsiella pneumoniae*** | Piperacilina | 100µL |

**Tabla 5:** Antibióticos comerciales utilizados como control positivo para cada cepa ensayada

www.bdigital.ula.ve

### *Preincubación e incubación*

Las placas de Agar Müller Hinton fueron preincubadas a 4 °C durante 18 horas aproximadamente para permitir la difusión de los extractos y solventes, posteriormente se incubaron durante 24 horas a 37° C (Velasco *y cols.,* 2007).

### *Lectura de las pruebas*

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a examinar cada una de las placas, en las cuales se consideró como positivo la presencia de un halo de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor del disco; por el contrario la ausencia de este halo se interpretó como negativo.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

### *Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI):*

Se determinó la CMI del extracto en estudio, solo para los microorganismos que mostraron actividad antibacteriana, para ello se realizaron las siguientes diluciones: 10000 ppm, 5000 ppm, 2500 ppm, 1250 ppm y 625 ppm.

### *Screening fitoquímico*

Fue realizado en el Laboratorio A de productos naturales Dr. Carl Seelkopf bajo la supervisión de la Prof. Alida Pérez y la Prof. Ysbelia Obregón. El procedimiento inicio agregando una porción (aproximadamente 100g) del extracto a cada tubo de ensayo. Los extractos obtenidos fueron concentrados y se les realizo el test de identificación, según la literatura: a) Esteroles y Triterpenos, b) Saponinas, c) Taninos, d) Alcaloides, e) Flavonoides f) Quinonas y g) Cumarinas. Para el Screening se procedió con los siguientes ensayos:

www.bdigital.ula.ve

***Reconocimiento de Esteroles y Triterpenos***

En este ensayo se utilizó la reacción de Liebermann-Burchard empleada para diferenciar las estructuras esteroidales de las triterpenoides, las primeras producen coloraciones azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado o púrpura.

Procedimiento: en un tubo de ensayo limpio y seco, tomar una pequeña cantidad de extracto etanólico previamente llevado a sequedad, adicionar cloroformo o diclorometano en cantidad suficiente, que cubra la muestra.
Colocar en el Ultrasonido hasta disolver la muestra, añadir 0,5 de anhídrido acético, adicionar cuidadosamente por las paredes del tubo 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Observar y anotar los cambios de coloración.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

***Reconocimiento de Saponinas***

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroidal como triterpénica.

Prueba de altura y estabilidad de espuma: en un tubo de ensayo colocar 1 mL de solución acuosa del extracto, agitar vigorosamente durante un minuto y tomar la altura de la espuma, en caso de que se presente. Si se forma abundante espuma espere aproximadamente 5 minutos, es prueba presuntiva en la presencia de saponinas en la muestra

***Reconocimiento de Taninos/compuestos fenólicos***

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal.

Procedimiento: a un 1 mL del extracto adicionar 2 mL de agua destilada y 2 gotas de cloruro de sodio al 10 %. Calentar a ebullición por un minuto, enfriando y filtrando. Dividir en 3 tubos por extracto y el cuarto tubo usarlo como testigo.

www.bdigital.ula.ve

Reacción de Cloruro Férrico: adicionar al primer tubo 1 gota de cloruro férrico al 1 %, la formación de coloración indica la presencia de compuestos fenólicos

Reacción con Gelatina: al segundo tubo colocar 2 gotas del reactivo de gelatina. La formación de un precipitado blanco indica la presencia de taninos

Reacción con Ferrocianuro de potasio al 1 %: al tercer tubo se le agrega una gota de ferrocianuro de potasio al 1 %. La formación de una coloración azul indica la presencia de compuestos fenólicos

***Reconocimiento de Alcaloides***

En este ensayo se utilizaron los reactivos de Mayer, Wagner y Dragendorff.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Procedimiento: tomar una porción de cada extracto y adicionar entre 5 a 10mL de ácido clorhídrico al 10 %, calentar en baño maría por 5 minutos, enfriar y filtrar. Posteriormente dividir e filtrado en 3 tubos (1mL) de ensayo identificados para cada reactivo. Adicionar en su respectivo tubo cada reactivo de trabajo, hasta la aparición de turbidez o precipitados.

***Reconocimiento de Flavonoides***

Procedimiento: se disuelven 2 mL del extracto en 6 mL de etanol y se divide en 3 tubos. El tercero se utilizará como blanco.

Reacción de Shinoda: adicionar 2 gotas de ácido clorhídrico; si se obtiene una coloración roja indica la presencia de auronas o chalconas. luego se coloca un trozo de magnesio metálico, si se forma una coloración naranja o roja, indica la presencia de flavonas; si es rojo flavononas y si es magenta flavononas.

Reacción de hidróxido de sodio al 10 %: se adicionan 0,5 mL gotas de hidróxido de sodio si se forma una coloración de amarillo a rojo, indica la presencia de xantonas y flavonas; de café a naranja de flavonoles; de púrpura a rojizo de chalconas y azul de antocianinas

www.bdigital.ula.ve

***Reconocimiento de Quinonas***

Reacción con hidróxido de amonio: se adiciona una gota del hidróxido de amonio concentrado al extracto. Se considera positiva la prueba para antraquinonas al tener la presencia de una coloración roja que aparece en los 2 primeros minutos.

***Reconocimiento de Cumarina***

Reacción de Hidróxido de Amonio: se concentra una porción del extracto y se le adicionan 0.5 mL de etanol y 2 gotas de hidróxido de amonio concentrado. Se considera positiva la prueba si presenta una fluorescencia azul-violeta bajo la luz ultravioleta.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## Procedimientos de la investigación

**Esquema 1.**

***Plumeria inodora* Jack**

1- Recolección de la planta en estudio



2- Secado y Molienda de las partes a estudiar: la hoja y el tallo



3- Preparación de la solución con los 3 solventes para su posterior maceración por 48 horas a temperatura ambiente

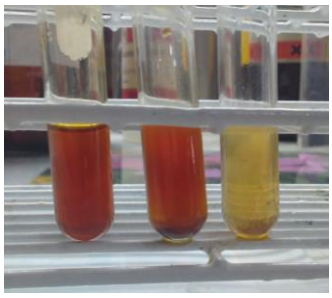


4- Obtención del extracto por rota - evaporación



digital.uc

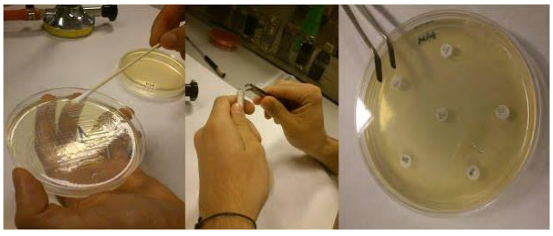
5- Realización del Screening Fitoquímico



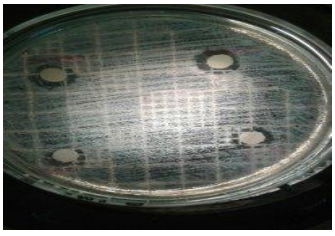
6- Identificación de los componentes individuales por medio de cromatografía de gases acoplados a espectrometría de masas



7- Determinación de la actividad antibacteriana del extracto en estudio



8- Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria





Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## Diseño de Análisis

El análisis de los datos fue realizado a través de un enfoque cuantitativo. Al respecto, Palella y Martins (2010) refirieron que el enfoque cuantitativo se refiere a la expresión numérica de los datos y al análisis realizado a través de operaciones matemáticas. En tal sentido, en esta investigación los datos fueron expresados en unidades de concentración, con el fin de obtener la información relacionada con el evento de estudio. Sin embargo, el tamizaje fitoquímico a pesar de que fue expresado cualitativamente, dejo entrever una frecuencia predominante de metabolitos secundarios con respecto a la ausencia de algunos de ellos.

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## CAPÍTULO IV

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Resultados

La Determinación de los componentes químicos del extracto de Hexano de hojas de *Plumeria inodora* Jacq. Procedente de la población de Lagunillas del municipio Sucre del Estado Mérida por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

**Tabla 6. Componentes Identificados en el extracto de Hexano de las hojas de *Plumeria inodora* Jacq.**

www.bdigital.ula.ve

| N° P | T.R | % ÁREA | COMPUESTOS |
|---|---|---|---|
| 1 | 9,45 | 5,43 | Tetradecano |
| 2 | 10,80 | 3,79 | Octadecano |
| 3 | 11,59 | 1,03 | Pentadecano |
| 4 | 18,52 | 1,98 | Isopropil miristato |
| **5** | **21,17** | **8,37** | **Ácido hexadecanoico (Ácido Palmitico)** |
| **6** | **22,38** | **13,44** | **Isopropil hexadecanoato** |
| 7 | 24,01 | 3,38 | Fitol |
| 8 | 24,18 | 1,72 | Ácido linoleico |
| 9 | 24,34 | 1,06 | Ácido 9,16-octadecadienoico |
| 10 | 24,46 | 7,24 | Ácido 5,8,11-octadecatrienoico |
| 11 | 25,39 | 6,73 | Isopropil linoleato |
| **12** | **25,52** | **17,91** | **Éster etilíco del ácido 9,12,15-octadecatrienoico** |
| 13 | 23,95 | 1,39 | Éster isopropilo del ácido octadecanoico |
| 14 | 29,24 | 1,35 | Ácido eicosanoico |
| 15 | 30,40 | 1,54 | Pentacosano |
| 16 | 33,52 | 3,25 | Docosano |
| 17 | 36,15 | 7,69 | Escualeno |
| 18 | 37,79 | 8,04 | Nonacosano |

N°P: número de pico, T.R: Tiempo de retención, % de área.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Determinación de los componentes químicos del extracto de Diclorometano de las hojas de *Plumeria inodora* Jacq procedente de la población de Lagunillas del municipio Sucre del Estado Mérida por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).

**Tabla 7. Componentes Identificados en el extracto de Diclorometano de las hojas de *Plumeria inodora* Jacq.**

| N° P | T.R | % ÁREA | COMPUESTOS |
|---|---|---|---|
| 1 | 17,48 | 8,18 | Loliolido |
| 2 | 18,54 | 1,46 | Fukinanolido |
| **3** | **21,21** | **12,08** | **Ácido hexadecanoico (Ac. Palmitito)** |
| 4 | 22,82 | 1,39 | *α*-D-glucopiranosil pentaacetato |
| 5 | 22,96 | 0,96 | *β*-D-glucopiranosil pentaacetato |
| 6 | 24,01 | 9.22 | Fitol |
| 7 | 24,16 | 1,64 | D-manitol |
| 8 | 24,39 | 2,77 | Ácido linoleico |
| **9** | **24,51** | **11,14** | **Metil linoleato** |
| 10 | 28,07 | 2,46 | Plumericina |
| 11 | 30,39 | 1,91 | n-nonadecano |
| 12 | 33,50 | 3,01 | Heptacosano |
| **13** | **36,14** | **18,93** | **Escualeno** |
| 14 | 37,76 | 9,59 | Octacosano |

N°P: número de pico, T.R: Tiempo de retención, % de área

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Determinación de los componentes químicos del extracto Etanólico de las hojas de *Plumeria inodora* Jacq. Procedente de la población de Lagunillas del municipio Sucre del Estado Mérida por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).

**Tabla 8. Componentes Identificados en el extracto Etanólico acetilado de las hojas de *Plumeria inodora* Jacq.**

| N° P | T.R | % ÁREA | COMPUESTOS |
|---|---|---|---|
| 1 | 6,01 | 2,44 | Triacetin (Glicerol triacetato) |
| 2 | 12,71 | 1,61 | Ácido Hexadecanoico (Ac. Palmitito) |
| 3 | 13,14 | 2,57 | Etil *α*-D-glucopiranosa-tetraacetato |
| 4 | 13,40 | 7,2 | D-fructopiranosa tetraacetato |
| 5 | 13,57 | 6,52 | *β*-D-glucopiranosa pentaacetato |
| 6 | 13,66 | 7,76 | D-gulosa pentaacetato |
| 7 | 14,40 | 3,36 | Ácido linoleico |
| 8 | 14,44 | 3,03 | Ácido oleico |
| 9 | 14,95 | 3,30 | D-mannoheptulosa hexaacetato |
| 10 | 16,34 | 4,34 | Glucoheptitol heptaacetato |
| **11** | **17,77** | **30,77** | **PM: 352, 43 (100 %), 69 (46,4 %), 95 (33,7 %), 81 (31,4 %), 55 (28,6 %), 80 (24,5 %), 67 (24,1 %), 209 (22,1 %), 129 (22,0 %), 94 (21,4 %)** |
| **12** | **17,98** | **21,85** | **PM: 337, 43 (100 %), 69 (46,7 %), 81 (36,2 %), 95 (33,0 %), 129 (31,6 %), 67 (28,6 %), 100 (22,8 %), 79 (21,7 %, 55 (20,8 %), 93 (20,4 %)** |

N°P: número de pico, T.R: Tiempo de retención, % de área

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Determinación de los componentes químicos del extracto de Hexano de los tallos de *Plumeria inodora* Jacq. Procedente de la población de Lagunillas del municipio Sucre del Estado Mérida por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).

**Tabla 9. Componentes Identificados en el extracto de Hexano de los tallos de *Plumeria inodora* Jacq.**

| N° P | T.R | % ÁREA | COMPUESTOS |
|---|---|---|---|
| 1 | 9,46 | 2,41 | Tetradecano |
| 2 | 11,61 | 1,27 | Pentadecano |
| 3 | 13,77 | 2,61 | Guanidina |
| **4** | **21,24** | **29,76** | **Ácido Hexadecanoico (Ac. Palmitico)** |
| 5 | 22,38 | 6,22 | Ácido isopropil Hexadecanoico |
| 6 | 24,02 | 1,53 | Fitol |
| **7** | **24,42** | **28,43** | **Ácido linoleico** |
| 8 | 24,88 | 1,90 | Ácido octadecanoico (Ac. Esteárico) |
| 9 | 25,4 | 4,55 | Linoleato de etilo |
| 10 | 25,5 | 2,97 | Ester isopropilo del ácido elaidico |
| 11 | 30,41 | 5,54 | Pentacosano |
| **12** | **33,52** | **7,48** | **Heptacosano** |
| 13 | 36,14 | 1,44 | Escualeno |
| 14 | 37,79 | 3,3 | Nonacosano |

N°P: número de pico, T.R: Tiempo de retención, % de área

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Determinación de los componentes químicos del extracto de Diclorometano de los tallos de *Plumeria inodora* Jacq procedente de la población de Lagunillas del municipio Sucre del Estado Mérida por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).

**Tabla 10. Componentes Identificados en el extracto de Diclorometano de los tallos de *Plumeria inodora* Jacq.**

| N° P | T.R | % ÁREA | COMPUESTOS |
|---|---|---|---|
| 1 | 12,53 | 1,39 | Nonanoico |
| 2 | 20,50 | 1,62 | Tetradecanoico |
| 3 | 21,17 | 5,50 | Ácido Hexadecanoico (Ac. Palmitico) |
| **4** | **22,39** | **33,84** | **Isopropil ester del ácido palmítico** |
| 5 | 24,2 | 2,06 | Ácido heptadecanoico |
| 6 | 24,35 | 7,18 | Ácido linoleico |
| **7** | **25,40** | **17,98** | **Isopropil linoleato** |
| **8** | **25,50** | **12,14** | **Isopropilo éster del ácido elaidico** |
| 9 | 25,94 | 4,25 | Isopropil éster del ácido esteárico |
| 10 | 29,24 | 2,79 | Ácido eicosanoico |
| 11 | 30,40 | 2,49 | Pentacosano |
| 12 | 33,52 | 3,23 | Eicosano |
| 13 | 36,14 | 2,35 | Escualeno |
| 14 | 37,78 | 1,36 | Nonacosano |

N°P: número de pico, T.R: Tiempo de retención, % área

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Determinación de los componentes químicos del extracto Etanólico de los tallos de *Plumeria inodora* Jacq. Procedente de la población de Lagunillas del municipio Sucre del Estado Mérida por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)

**Tabla 11. Componentes Identificados en el extracto Etanólico acetilado de los tallos de *Plumeria inodora* Jacq.**

| N° P | T.R | % ÁREA | COMPUESTOS |
|---|---|---|---|
| **1** | **6,01** | **14,23** | **Glicerol triacetato (Triacentin)** |
| **2** | **8,21** | **10,82** | **4 metilfenil-metanodiol acetato** |
| 3 | 11,97 | 1,83 | Iditol hexaacetato |
| 4 | 12,68 | 2,99 | *α*-Etil sorbosida tetraacetato |
| 5 | 12,82 | 2,36 | Fructopiranosa tetracetato |
| 6 | 13,04 | 3,11 | Éster etílico del ácido hexadecanoico |
| **7** | **13,37** | **24,54** | **Isopropil palmitato** |
| 9 | 13,53 | 8,26 | *α* -D-glucopiranosa pentaacetato |
| 10 | 13,61 | 8,39 | *β*-D-glucopiranosa pentaacetato |
| 11 | 14,07 | 1,17 | Ester etílico del ácido 9-octadecanoico |
| 12 | 14,35 | 2,09 | Ácido 9,12-octadecadienoico |
| 13 | 14,39 | 1,5 | Acido 9-octadecanoico |
| 15 | 14,89 | 2,65 | Etilestearato |
| 16 | 14,93 | 1,43 | Éster isopropilo del ácido elaidinico |

N°P: número de pico, T.R: Tiempo de retención, % de área

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**Determinación de la actividad antibacteriana del extracto crudo de *Plumeria inodora* Jacq.**

Los extractos crudos obtenidos de las hojas y los tallos de *Plumeria inodora* Jacq. Fueron sometidos a las pruebas de susceptibilidad antibacteriana, leyendo el halo de inhibición, y posteriormente calculando la concentración mínima inhibitoria, mediante el método de difusión en agar. Se realizó en los microorganismos que mostraron zona de inhibición, preparando diluciones de concentración: 10000 ppm/µL, 5000 ppm/µL, 2500 ppm/µL, 1250 ppm/µL y 625 ppm/µL, de la mezcla de los extractos con los solventes elegidos, se usaron antibióticos de referencia para los controles. La actividad antibacteriana de los extractos crudos se determinó frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas.

**Tabla 12. Actividad antibacteriana y determinación de la CMI del extracto de Diclorometano con hojas de *P. inodora* J.**

www.bdigital.ula.ve

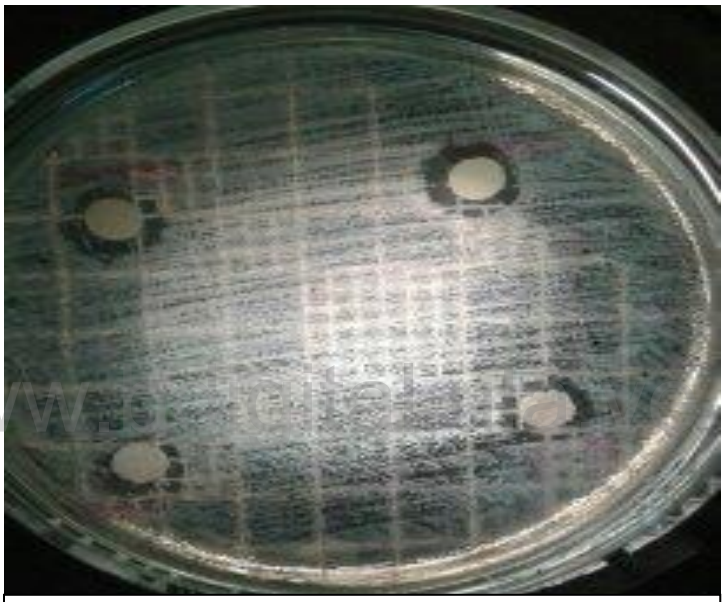
| Microorganismos | Diclorometano (hojas) | | | | | Control + | | | NG | CMI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 10000 ppm | 5000 ppm | 2500 ppm | 1250 ppm | 650 ppm | Eri 15 µg | Amp 10µg | Pip 100µg | DMSO | |
| *S. aureus* ATCC 25923 | 7mm | - | - | - | - | 17mm | | | - | 10000 ppm |
| *E. faecalis* ATCC 29212 | 7mm | 7mm | 7mm | - | - | | 26mm | | - | 2500 ppm |
| *P. aeruginosa* ATCC 25853 | 19mm | 11mm | 10mm | 8mm | 7mm | | | 27mm | - | 650 ppm |
| *E. coli* ATCC 25922 | - | - | - | - | - | | | 34 mm | - | - |
| *K. pneumoniae* ATCC 23357 | - | - | - | - | - | | | 31mm | - | - |

Eri: Eritromicina, Amp: Ampicilina, Pip: Piperacilina y CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

En la tabla 13 están representados los resultados de la actividad antibacteriana del extracto de *Plumeria inodora* Jacq. Con el solvente Diclorometano los cuales muestran que el extracto presentó actividad contra *S. aureus, E. faecalis* y *P. aeruginosa*.



Actividad antibacteriana de la cepa de *Enterococcus feacalis* ATCC 29212

**Figura 9. Actividad antibacteriana del Extracto de Diclorometano de las hojas de *Plumeria inodora* Jacq**.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**TABLA 13. Actividad antibacteriana y determinación de la CMI del extracto de Diclorometano de los tallos de *P. inodora* J**

| Microorganismos | Diclorometano (tallos) | | | | | Control + | | | NG | CMI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 10000 ppm | 5000 ppm | 2500 ppm | 1250 ppm | 650 ppm | Eri 15 µg | Amp 10µg | Pip 100µg | DMSO | |
| *S. aureus* ATCC 25923 | - | - | - | - | - | 17mm | | | - | - |
| *E. faecalis* ATCC 29212 | - | - | - | - | - | | 26mm | | - | - |
| *P. aeruginosa* ATCC 25853 | 7mm | 7mm | 7mm | - | - | | | 27mm | - | 2500 ppm |
| *E. coli* ATCC 25922 | 9mm | 8mm | 7mm | 7mm | 7mm | | | 34 mm | - | 650 ppm |
| *K. pneumoniae* ATCC 23357 | - | - | - | - | - | | | 31mm | - | - |

Eri: Eritromicina, Amp: Ampicilina, Pip: Piperacilina y CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

www.bdigital.ula.ve

En la tabla 14 están representados los resultados de la actividad antibacteriana del extracto de Diclorometano de los tallos de *Plumeria inodora* Jacq. Los cuales muestran que el extracto presentó actividad contra *E. coli* y *P. aeruginosa*.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)



Actividad antibacteriana de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922

www.bdigital.ula.ve

**Figura 10. Actividad antibacteriana del Extracto de Diclorometano de los tallos de *Plumeria inodora* Jacq.**



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**TABLA 14. Actividad antibacteriana y determinación de la CMI del extracto Etanólico de las hojas de *P. inodora* J**

| Microorganismos | Etanólico (hojas) | | | | | Control + | | | NG | CMI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 100000 ppm | 5000 ppm | 2500 ppm | 1250 ppm | 650 ppm | Eri 15 µg | Amp 10µg | Pip 100µg | DMSO | |
| *S. aureus* 25923 | - | 9mm | 8mm | 7mm | 7mm | 30mm | | | - | 650 ppm |
| *E. faecalis* 29212 | - | 8mm | 8mm | 7mm | 7mm | | 31mm | | - | 650 ppm |
| *P. aeruginosa* 25853 | - | 11mm | 10mm | 8mm | 7mm | | | 27mm | - | 650 ppm |
| *E. coli* 25922 | - | 11mm | 10mm | 8mm | 7mm | | | 31mm | - | 650 ppm |
| *K. pneumoniae* 23357 | - | - | - | - | - | | | 34mm | - | - |

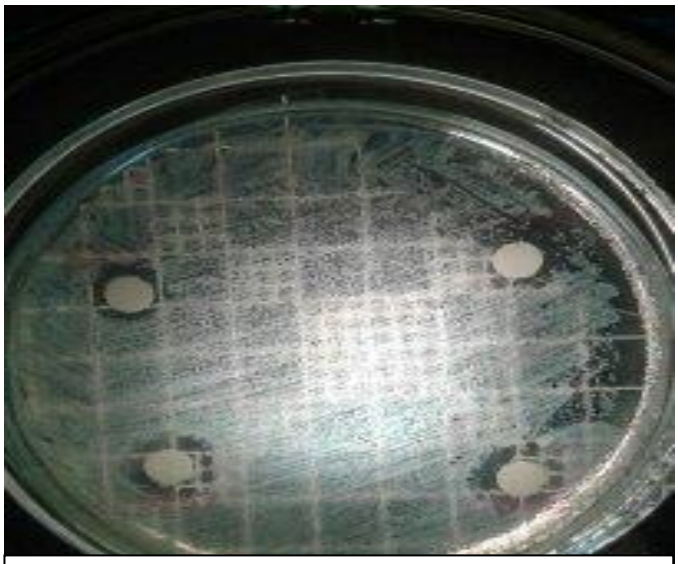
Eri: Eritromicina, Amp: Ampicilina, Pip: Piperacilina y CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

www.bdigital.ula.ve

Los resultados que se observan en la tabla 15, revelan que la actividad antibacteriana del extracto Etanólico de las hojas de *Plumeria inodora* Jacq. Sobre los microorganismos multiresistentes *S. aureus E. faecalis, P. aeruginosa* y *E. coli*, la cual fue muy evidente, es posible que los compuestos que conforman este extracto de esta especie vegetal posean un principio activo con poder potencial antibacteriano sobre patógenos resistentes a la terapia antibiótica convencional.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)



Actividad antibacteriana de la cepa de *S. aureus* 25923

www.bdigital.ula.ve

**Figura 11. Actividad antibacteriana del Extracto Etanólico de hojas de *Plumeria inodora* Jacq**



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**TABLA 15. Actividad antibacteriana y determinación de la CMI del extracto Etanólico de los tallos de *P. inodora* J**

| Microorganismos | Etanólico (tallos) | | | | | Control + | | | NG | CMI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 100000 ppm | 5000 ppm | 2500 ppm | 1250 ppm | 650 ppm | Eri 15 µg | Amp 10µg | Pip 100µg | DMSO | |
| *S. aureus* ATCC 25923 | - | 7mm | 7mm | 7mm | 6mm | 30mm | | | - | 650 ppm |
| *E. faecalis* ATCC 29212 | - | 10mm | 9mm | 8mm | 8mm | | 31mm | | - | 650 ppm |
| *P. aeruginosa* ATCC 25853 | - | 10mm | 10mm | 10mm | 8mm | | | 27mm | - | 650 ppm |
| *E. coli* ATCC 25922 | - | 11mm | 10mm | 9mm | 8mm | | | 31mm | - | 650 ppm |
| *K. pneumoniae* ATCC 23357 | - | - | - | - | - | | | 34mm | - | - |

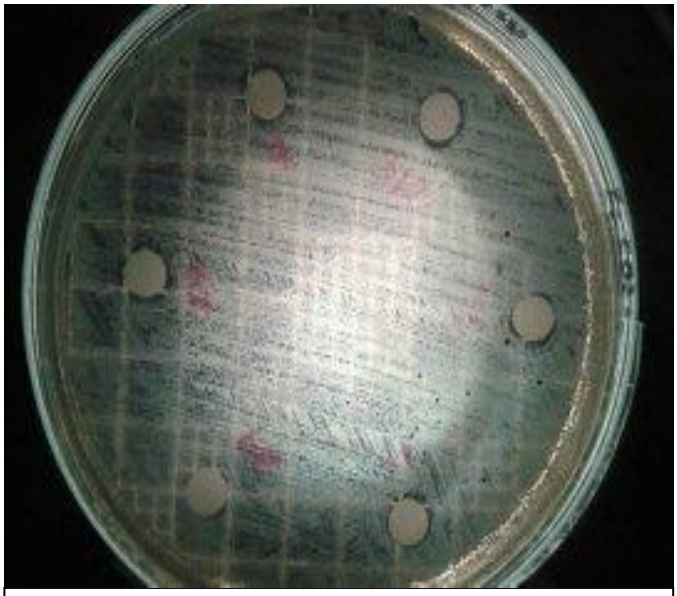
Eri: Eritromicina, Amp: Ampicilina, Pip: Piperacilina y CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

www.bdigital.ula.ve

En la tabla 16 están representados los resultados de la actividad antibacteriana del extracto Etanólico de los tallos de *Plumeria inodora* Jacq. Los cuales muestran que el extracto presentó actividad contra *S. aureus, E. feacalis, E. coli* y *P. aeruginosa.*



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)



Actividad antibacteriana de la cepa de *S. aureus* 25923

www.bdigital.ula.ve

**Figura 12. Actividad antibacteriana del Extracto Etanólico del tallo de *Plumeria inodora* Jacq.**



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**Tabla 16: Screnning Fitoquímico de los Extractos de *Plumeria inodora* Jacq. De las hojas y tallos con los disolventes elegidos: Hexano, Diclorometano y Etanol.**

| PRUEBA DE IDENTIFICACIÓN | EXTRACTO DE HOJA | | | | EXTRACTO DE TALLO | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Reconocimiento de Esteroles y Triterpenos | HEXANO | DICLORO | ETANOL | ACETILADO | HEXANO | DICLORO | ETANOL |
| | ++ | ++ | ++ | | ++ | ++ | _ |
| Reconocimiento de Saponinas | ND | ND | _ | | ND | ND | _ |
| Reconocimiento de Taninos (compuestos fenólicos) Cloruro férrico | ND | ND | + | | ND | ND | + |
| Reacción con gelatina | ND | ND | _ | | ND | ND | _ |
| Reacción con ferrocianuro de potasio al 1 % | ND | ND | | | ND | ND | |
| Reconocimiento de alcaloides Reactivo de Mayer | ND | ND | + | + | ND | ND | + |
| Reactivo de Wagner | ND | ND | + | + | ND | ND | + |
| Reactivo de Dragendoff | ND | ND | + | + | ND | ND | + |
| Reconocimiento de Flavonoides Reacción de Shinoda | _ | _ | ++ | | _ | _ | ++ |
| Reconocimiento de quinonas Reacción de hidróxido de amonio | _ | _ | _ | | _ | _ | _ |
| Reconocimiento de Cumarina Reacción con hidróxido de amonio con U.V | _ | _ | _ | | _ | _ | _ |

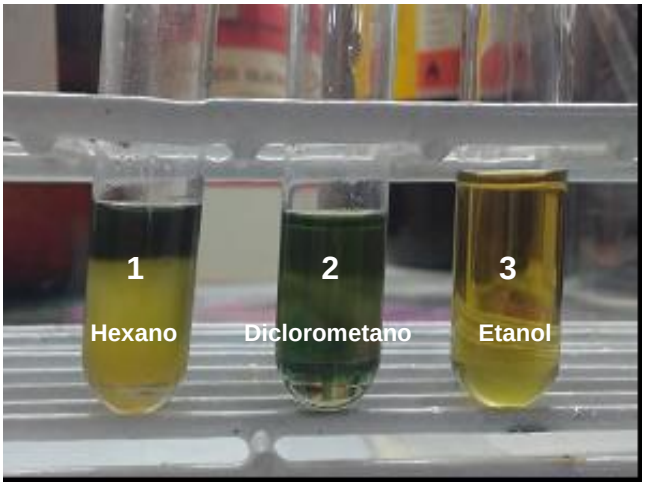
ND = NO DETERMINADO

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**Identificación de Esteroles y Triterpenos**

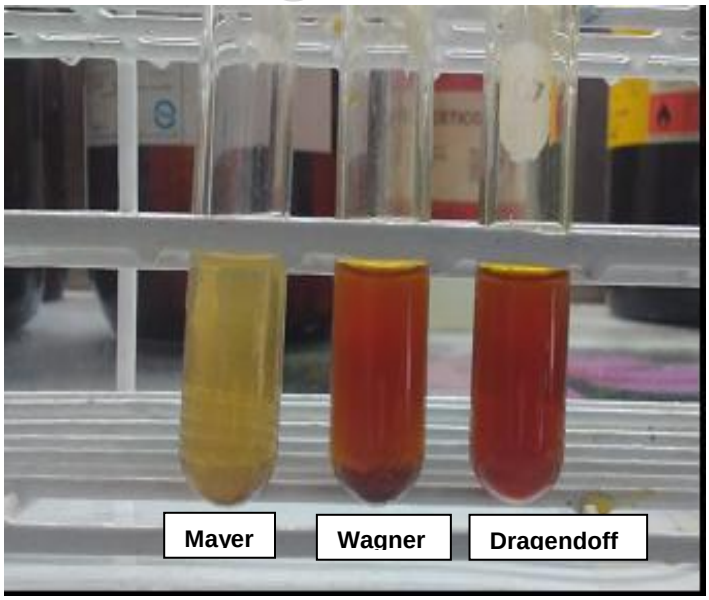



**Fuente: autor**

**Figura 13. Identificación de Esteroles y Triterpenos.** Se obtuvo un resultado positivo en los tubos 1 y 2. Lo que indica la presencia de esteroles y triterpenos para el extracto del tallo de *Plumeria inodora* Jacq. En el tubo 3 el resultado fue negativo.

www.bdigital.ula.ve

**Identificación de Alcaloides**



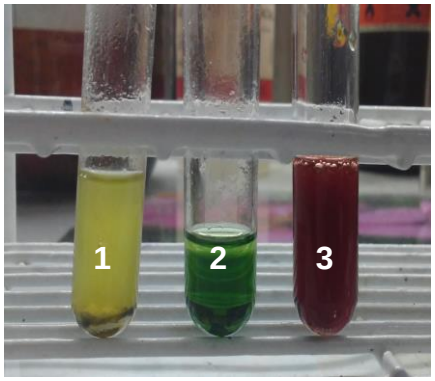

**Fuente: autor**

**Figura 14. Identificación de Alcaloides.** Se obtuvo un resultado positivo para los reactivos, Mayer, Wagner y Dragendoff. Esto indica la presencia de alcaloides en el extracto de las hojas y el tallo de *Plumeria inodora* Jacq.



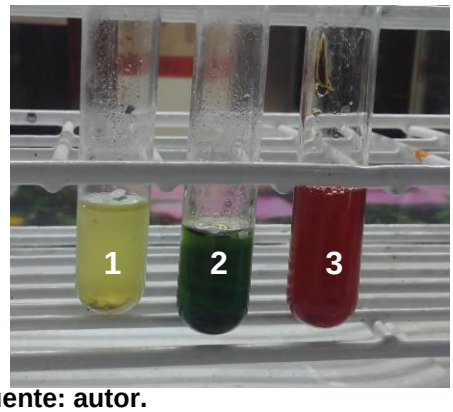
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

**Identificación de Flavonoides**




**Fuente: autor.**

**Tallo**




**Fuente: autor.**

**Hoja**

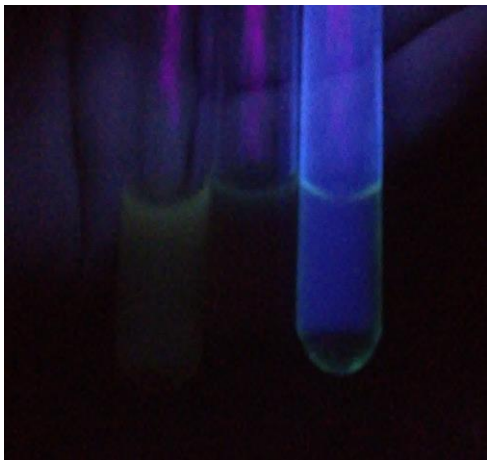
**Figura 15.** I**dentificación de Flavonoides.** Se obtuvo un resultado positivo para la reacción de Shinoda en el tubo 3, esto indica la presencia de Flavonoides en el extracto etanólico de las hojas y el tallo de *Plumeria inodora* Jacq.

www.bdigital.ula.ve

**Identificación de Cumarinas y Quinonas**



**Fuente: autor.**



**Fuente: autor.**

**Figura 16. Identificación de Cumarinas y Quinonas.** Se obtuvo un resultado negativo para esta reacción de Hidróxido de Amonio con luz ultravioleta, esto indica la ausencia de Cumarinas en los extractos de las hojas y los tallos de *Plumeria inodora* Jacq. También indica la ausencia de quinonas ya que no se observó la coloración roja al adicionar el reactivo.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## Discusión

Luego de la recolección de la planta *Plumeria inodora* Jacq, y de la obtención de su extracto con el solvente hexano. Los resultados conseguidos por medio de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, el componente químico en mayor proporción fue el Éster etilíco del ácido 9,12,15-octadecatrienoico en una cantidad de 17,91 %, Isopropil hexadecanoato en una cantidad de 13,44 % seguido del Ácido hexadecanoico (Ácido Palmitico) en una cantidad de 8,37 %. Para el mismo solvente pero del tallo de *P. inodora* Jacq. El compuesto químico en mayor cantidad fue ácido hexadecanoico (ácido palmítico) en una cantidad de 33,84 %, seguido del Ácido linoleico en una cantidad de 28,43 %, por último, el Heptacosano en una cantidad de 7,48 %. El Screnning para este compuesto arrojó un resultado positivo para esteroles y triterpenos. En cuanto a su actividad antibacteriana no se realizó porque, según algunos estudios el solvente hexano no genera inhibición de crecimiento en las cepas analizadas en este estudio.

www.bdigital.ula.ve

Seguidamente el extracto de las hojas con el solvente Diclorometano arrojó los siguientes compuestos mayoritarios: escualeno en una cantidad de 18,93 %, seguido del ácido hexadecanoico en una cantidad de 12,08 % por último el Metil linoleato en una cantidad de 11,14 %. Para el mismo extracto pero del tallo los compuestos mayoritarios fueron Isopropil ester del ácido palmítico en una cantidad de 33,84 %. Seguido del Isopropil linoleato en una cantidad de 17,98 %, en último lugar el Isopropilo éster del ácido elaidico en una cantidad de 12,14 %. El resultado del Screnning fue el siguiente: positivo para esteroles y triterpenos. Su actividad antibacteriana mostro que los microorganismos *S. aureus, E. coli* y *P. aeruginosa* presentaron sensibilidad mostrando halos de inhibición desde 7 hasta 19mm de diámetro con una Concentración Mínima Inhibitoria que oscila entre 650 a 2500 ppm/µL, esto coincide con el estudio realizado por Gupta y cols. (2008) En el cual obtuvieron como resultado actividad inhibidora para ambos



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

extractos a una concentración comprendida entre 250 µg/mL y 1000 µg/mL contra las bacterias antes mencionadas.

Posteriormente el extracto de hojas de *Plumeria inodora* Jacq. Con el solvente etanol al analizarlo en el equipo de cromatografía no se logró un resultado adecuado por lo que fue necesario realizar una acetilación a la muestra para mejorar su identificación, sin embargo a pesar de que se obtuvieron compuestos mayoritarios, no se lograron identificar porque no se encontraron en las bases de datos del equipo: Wiley, NIST y HP. No obstante, es necesario destacar sus pesos moleculares 352,43 g/mol y 337,43 g/mol. Para el tallo los compuestos mayoritarios fueron: Isopropil palmitato en una cantidad de 24,54 %, Glicerol triacetato (Triacentin) en una cantidad de 14,23 %, por último, el 4 metilfenil-metanodiol acetato en una cantidad de 10,82 %. El resultado del Screnning Fotoquímico fue positivo para esteroles y triterpenos, compuestos fenólicos, alcaloides y flavonoides. La obtención de alcaloides y triterpenos se relaciona con los autores Barbosa y cols. (2002) donde en sus resultados confirman que en el extracto activo se encuentran alcaloides y triterpenos. Adicionalmente, en la literatura científica existen reportes que refieren la utilidad de los esteroles como alimentos funcionales (López, Miguel y Aleixandre, 2012). Su actividad antibacteriana muestra que el extracto presentó sensibilidad contra *E. coli, S. aureus, E. faecalis* y *P. aeruginosa*, mostrando halos de inhibición desde 11 a 7 mm de diámetro, En cuanto a la Concentración Mínima Inhibitoria no se pudo determinar en todas las cepas por problemas técnicos en la Facultad. Este resultado se correlaciona con el obtenido por Choudhary y cols. (2014), en el cual *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (15 µg/mL) fue uno de los más sensibles y *Escherichia coli* ATCC 8739 fue el más resistente al extracto con un Valor CMI> 60 µg/mL.

www.bdigital.ula.ve

Los resultados presentados anteriormente sugieren que los extractos obtenidos de *Plumeria inodora* Jacq. por medio de la técnica de extracción por maceración sólido-líquido, podrían aplicarse como tratamiento y/o



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

coadyuvante antimicrobiano en las cepas estudiadas y semejantes, teniendo en cuenta la necesidad imperativa de caracterización y/o estudios estructurales de estos compuestos con lo cual podría profundizarse en el mecanismo de acción de los mismos sobre los agentes etiológicos de diversas patologías, siendo así un gran aporte para la salud pública y generando un mayor aporte al sector de la salud en el país.

Del proceso de identificación por CG-EM se puede inferir: en las hojas tiene como principales componentes químicos con el solvente hexano: ácidos grasos e hidrocarburos de cadena larga, para el diclorometano: ácidos grasos e hidrocarburos, Plumiricina (Iridoide), Loliolido (Benzofurano) y Fukinanolido, seguidamente para el etanólico compuestos más polares como: azúcares, ácidos grasos libres en pequeña cantidad y dos posibles alcaloides. Los componentes en mayor proporción para el tallo con el solvente hexano fueron: ácidos grasos e hidrocarburos de cadena larga, para el solvente diclorometano: ácidos grasos e hidrocarburos y por último para el compuesto etanólico: azúcares y ácidos grasos libres.

www.bdigital.ula.ve

Uno de los metabolitos secundarios encontrados fueron los alcaloides lo cual coincide con lo expuesto por Marcano y Hasegawa (2002) quienes afirmaron que la presencia de alcaloides es característico de la familia Apocynaceae y que son compuestos de utilidad quimiotaxonómica. Es importante destacar la ausencia de los taninos y saponinas los cuales han sido categorizados como compuestos antinutricionales, además el hallazgo de compuestos fenólicos, debido a que existen estudios que resaltan que estos compuestos son bien tolerados por los animales y tienen acción antioxidante (Chasquibol *y cols*., 2003). Sería también interesante que se despertara el interés en otros investigadores sobre la realización de estudios de la cuantificación de metabolitos secundarios en esta materia prima, con el fin de analizar los niveles críticos de los mismos en relación al efecto antinutricional.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

# CAPÍTULO V

# CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## Conclusiones

Una vez análizados los resultados y planteada la discusión, se puede inferir que de los tres solventes utilizados hexano, diclorometano y etanol de la planta en estudio *Plumeria inodora* Jacq. El Etanol presento mayor rendimiento. Los principales componentes químicos encontrados, en las hojas y los tallos fueron: ácidos grasos e hidrocarburos. Los componentes fitoquímicos hallados: alcaloides, esteroles y tritertepenos. Estos tienen un amplio uso por sus propiedades. Los alcaloides pueden ser utilizados como drogas, según la dosis, y la duración del tratamiento, además ser desde analgésicos, anestésicos o curativos de ciertas enfermedades. Los esteroles sirven como precursores para una variedad de productos con actividades biológicas específicas (por ejemplo, las hormonas esteroides)

www.bdigital.ula.ve

Además, presentó actividad antibacteriana frente a los microrganismos utilizados en este estudio, siendo el extracto de diclorometano (hojas) el que presento mayor inhibición para la cepa de *P. aeruginosa* ATCC 25853. Las cepas control representan microorganismos responsables de enfermedades nosocomiales, que en la actualidad presentan gran resistencia a los antibióticos comerciales. Aquí radica el gran valor y aporte de esta investigación debido a que los extractos con los diferentes solventes presentaron susceptibilidad, sin embargo existieron problemas durante su realización ocasionado por la poca información que se puede encontrar sobre la *Plumeria inodora* Jacq.

Debido a que es necesario un estudio de caracterización molecular de estos extractos, en aras de plantear mecanismos de acción antibacteriana, pudiendo entonces discutir acerca de su aplicación terapéutica en el



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

tratamiento y control de las enfermedades ocasionadas por las mismas, así como también de efectos adversos o colaterales sobre los pacientes en los cuales se aplican, por cual esta investigación queda abierta para su posterior continuación.

## Recomendaciones

- Debido a que esta especie se encuentra poco documentada y estudiada, se recomienda su investigación, ya que se está demostrando que podría ser una herramienta muy útil e innovadora en cuanto a terapia antibacteriana.

- Sería conveniente incentivar su posible uso a empresas farmacológicas, frente a microorganismos como *E. coli, S. aureus, E. faecalis* y *P. aeruginosa.*

www.bdigital.ula.ve

- Continuar con el trabajo de investigación de los diferentes extractos obtenidos de la especie *Plumeria inodora* Jacq. Para determinar otras propiedades biológicas e indentificar los compuestos hallados que no se encontraron dentro de las bases de datos Wiley,NIST y HP.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

## BIBLIOHEMEROGRAFÍA


Abad, A., Bahsas, A., Delgado, P., Amaro, L., y Towers, N. (2006). Actividad antimicrobiana y estudio fitoquímico preliminar de *Mandevilla veraguasensis (Seem.) Helms. (*Apocynaceae*)*. *Avances en química*, 1 (3), 29-34.

Adams, R.P. (2007). Identification of essential oil components by Chromatography/Mass Spectometry. 4 Ediccion. Illinois, Estados Unidos; Allured Publishing Corporation.

Albornoz, A. 1980. Productos Naturales, Sustancias y Drogas Extraídas de Plantas. Caracas, Venezuela.; Publicaciones UCV.

Arias, F.G. (2006). *El Proyecto de Investigación: Introducción a la Metodología Científica*. Quinta Edición. Caracas, Venezuela: Editorial Episteme.

Allorge, L. (1996). Espèces et combinaisons nouvelles d'Apocynacées-*Tabernaemontanoïdées Plumeria*. *Succulentes*, *19.* 23-27.

Balestrini, M. (2001). *Como se elabora el Proyecto de Investigación.* Caracas, Venezuela: Consultores Asociados Servicio Editorial.

Barbosa, I., Bacchi, E., Kaneko, T., Taba, M., Naim, R., y Drauzio, A. (2002). Antibacterial activity of Apocynaceae extracts and MIC of Tabernaemontana angulata stem organic extract. *Revista Brasileira de Ciências FarmacêuticasBrazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 38* (1), 89-94.

Burdock, G. A. (1975). Fernaroli's, Handbook of flavor ingredients. New York, Estados Unidos: Editorial C.R.C Press.

Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales*. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A.

Casellas, J. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud*


www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

*Publica,* *30* (6), 519-528. Disponible en: http://www.scielosp.org/pdf/rpsp/v30n6/a04v30n6. Consulta realizada Diciembre 2014.

Carvajal, L., Hata, Y., Sierra., N Martínez, y Rueda, D. (2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá. *Revista Colombia Forestal*, *12*. 161-170.

Cervantes, E., García, R., y Paz, S. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio, 61* (1), 28-40.

Cuellar, A., y Tejera, O. (1976) Informes preliminares de la vincubina. *Revista Cubana Farmacéutica*, *9*(2), 25-30.

Chasquibol, N., Lengua, L., Delmás, I., Rivera, D., Bazán, D., Aguirre, R., y Bravo., M. (2003). Alimentos funcionales o fitoquímicos, clasificación e importancia. *Revista Peruana de ingeniería química*, *5* (2), 9-20.

Choudhary, M., Kumar, V. y Singh, S. (2014). Phytochemical and Pharmacological activity of *Genus Plumeria*: An updated review. *International Journal of Biomedical And Advance Research, 5*(6), 266-272.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Edición: 27.

Daniel, M y Sabnis, S. (1978). Chemotaxonomical studies on *Apocyanaceae*. Indian Journal of Experimental Biology, *16*, 512-513.

Delporte, C. (2010). Farmacognosia Trabajos prácticos. Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica. Manual práctico. Santiago, Chile.

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Díaz, M., Rodríguez, C., y Zhurbenko, R. (2010). Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, *48*(2),147-161. Recuperado de http://scielo.sld.cu/pdf/hie/v48n2/hie06210.pdf

Dobhal, M., Hasan, A., Sharma, M., y Joshi, B. (1999) Ferulic acid esters from. *Plumeria* bicolor. *Phytochemistry*, *51*, 319-321.

Endress, M., y Bruyins, P. (2000). A revised classification of the Apocynaceae s.l. *The Botanical Review 66*(1).1-56.

Guevara, H., Luengas, P., y Garavito, G. (2010). Revisión documental de los productos naturales legalmente autorizados para su mercado en Colombia. *Revista Colombia Médica*, *41* (2), 129-140.

Gunasingh, C., Barnabas, G., Nagarajan, S., y Pharm, J. (1980) Phytochemical and pharmacological studies of *Phyla Nodiflora (Verbenaceae*): a review*. Pakistan Journal of Pharmaceutical Researc, 42*, 178-179.

www.bdigital.ula.ve

Gupta, M., Mazumder, R., Gomathi, P., Selvan, P., y Thamil, V. (2008). Actividad antimicrobiana de extractos de metanol de *Plumeria acuminata Ait.* hojas y Tephrosia purpurea (Linn.) Pers. raíces. *Formerly Natural Product Radiance, 7*(2), 102-105. Recuperado de http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/5651.

Hernández, S., Fernández, C., y Baptista, L. (2010). *Metodología de la investigación. Quinta edición*. Recuperado de: http://www.academia.edu/6399195/Metodologia_de_la_investigacion_5ta_Edicion_Sampieri.

Hurtado de Barrera, J. (2010). *Metodología de la Investigación Holística Guía para la compresión holística de la ciencia*. Cuarta



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Edición. Quirón Ediciones S.A. Cooperativa Editorial Magisterio: Bogotá, Colombia Ciea-Sypal: Caracas, Venezuela.

Kamariah, A., Lim, L., Baser, K., Ozek, T., y Demirci, B. (1999). Composition of the essential oil of Plumeria obtusa L. *Flavour and Fragrance Journal*, *14*, 237-240. recuperado de https://www.researchgate.net/publication/240326755_Composition_of_the_essential_oil_ofPlumeria_obtusa_L

Kardono, L., Tsauri, S., Padmawinata, K., y Kinghorn, A. (1990). Evaluation of the Potential Cancer Chemotherapeutic Efficacy of Natural Product Isolates Employing *in vivo* Hollow Fiber Tests. *Phytochemistry*, *29*, 2995-2997.

Kazmi, S., Ahmed, Z., Ahmed, W., y Malik, A. (1989) Plumerinine a novel lupine alkaloid from plumeria rubra. *Heterocycles, 29*(10), 1901-1906.

Koneman, E., Washington, W., Stephen, A., Procop, G., Janda, W., Schrecjenberger, P., y Woods, G. (2008). *Diagnóstico Microbiológico. Texto y Atlas en Color*. 6ª, Edición. Madrid, España: Editorial Panamericana.

López, N., Miguel, M., y Aleixandre, A. (2012). Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud. Revista *Nutrición clínica y dietética hospitalaria, 32*(3), 81-91. Recuperado de http://revista.nutricion.org/PDF/PROPIEDADES.pdf

Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J., Moro, M. y Portelés, A. (2008). *Farmacología Básica y Clínica*. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.

Lujan, D. (2014) *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, 48* (4): 465-74. Recuperado de: Edición. Editorial Panamericana, Madrid España.

www.bdigital.ula.ve



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Sanabria., M. Valera, R., Maciel, N., y Mendoza, A. (2014). Metabolitos secundarios en siete biotipos de *Plumeria* en el estado Lara, Venezuela. *Revista de la Facultad de Agronomía*, *1*. 423-434. Recuperado de http://www.revfacagronluz.org.ve/PDF/suplemento_2014/fito/fitosupl12014423434.pdf

Manual de Antibióticos en Pediatría. (2007). Sociedad Venezolana de Puericultura y Pediatría. Caracas, Venezuela: Editorial Médica Panamericana C.A.

Marcano, D. y Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica.* Caracas, Venezuela; Editorial Torino.

Mena, L., Tamargo, B., Salas, E., Plaza, L., Blanco, Y., Otero, A., y Sierra, G. (2015). Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales, 20*(1) ,106-116. Recuperado de http://scielo.sld.cu

www.bdigital.ula.ve

Morales, F. (2005). Estudios en las Apocynaceae neotropicales XIX: La familia Apocynaceae *(*Apocynoideae, Rauvolfioideae*)* en Costa Rica. *Revista Darwiniana, 43*, (1-4), 90-191.

Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2009). *Microbiología Médica* Sexta Edición. Barcelona, España: Editorial Elsevier.

Palacios, M., (2013). Guía de Farmacognosia y Fitoquímica. Universidad Católica “Los Ángeles de Chimbote”. Chimbote, Perú.

Palella, S. y Martins, F. (2010). *Metodología de investigación cuantitativa.* Caracas, Venezuela. Editorial: Fedeupel.

Palomino, O. (2001). Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales. Apuntes del Curso de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI).



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Puerta, A., y Mateos, F. (2010). Enterobacterias. *Medicine*, *10*(51), 26-31. Recuperado de http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Enterobacterias_Medicine2010.pdf

Prescott, L., Harley, J. y Klein D. Microbiología. (2004) España; Mcgraw-Hill/ Interamericana de España.

Ramírez, A., García, E., Longa, A., Sánchez, K., Nieves, M., Velasco, J., Araque, M. y Mosqueda, N. (2006). Manual Práctico de Bacteriología General. Primera edición. Mérida, Venezuela.

Sánchez C. (2006). *Antibióticos, ayer, hoy y mañana*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

Siddiqui, B., Ilyas, F., Rasheed, M., y Begum, S. (2004). Investigation of the methanolic extract of the aerial parts of *Lippia nodiflora*. Linn. *Led Phytochemistry*, *65*. 2077-2084.

www.bdigital.ula.ve

Sharapin, N. Machado, L. Souza, E. Rocha, E. Macedo, E y López, J. (2000) *Fundamentos de tecnología de productos Fitoterapéuticos*. Bogotá, Colombia: Convenio Andrés Bello.

Spichiger, R. E., Savolainen, V. V., Figeat, M., y Jeanmonod D. (2002). Botanique systématique des plantes à fleurs. Lausana, Suiza : PPUR presses polytechniques.

Valcárcel, M. C., y Gómez, A. H. (1988). Técnicas de separación. Barcelona, España;Reverte.

Velasco, J., Rojas, J., Salazar, P., Rodríguez, M., Díaz, T., y Morales, A. (2007) Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia origanoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. *Natural Product Communications*, *2*(1). 85-88.

Velázquez, M., y Ordorica, M. (2009). Soluciones. *mlvm/maov/julio*. 1-10.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

Wade, L.G. (2004). *Química orgánica* 5ª Edición. Estados Unidos; Pearson Prentice Hall.

www.bdigital.ula.ve



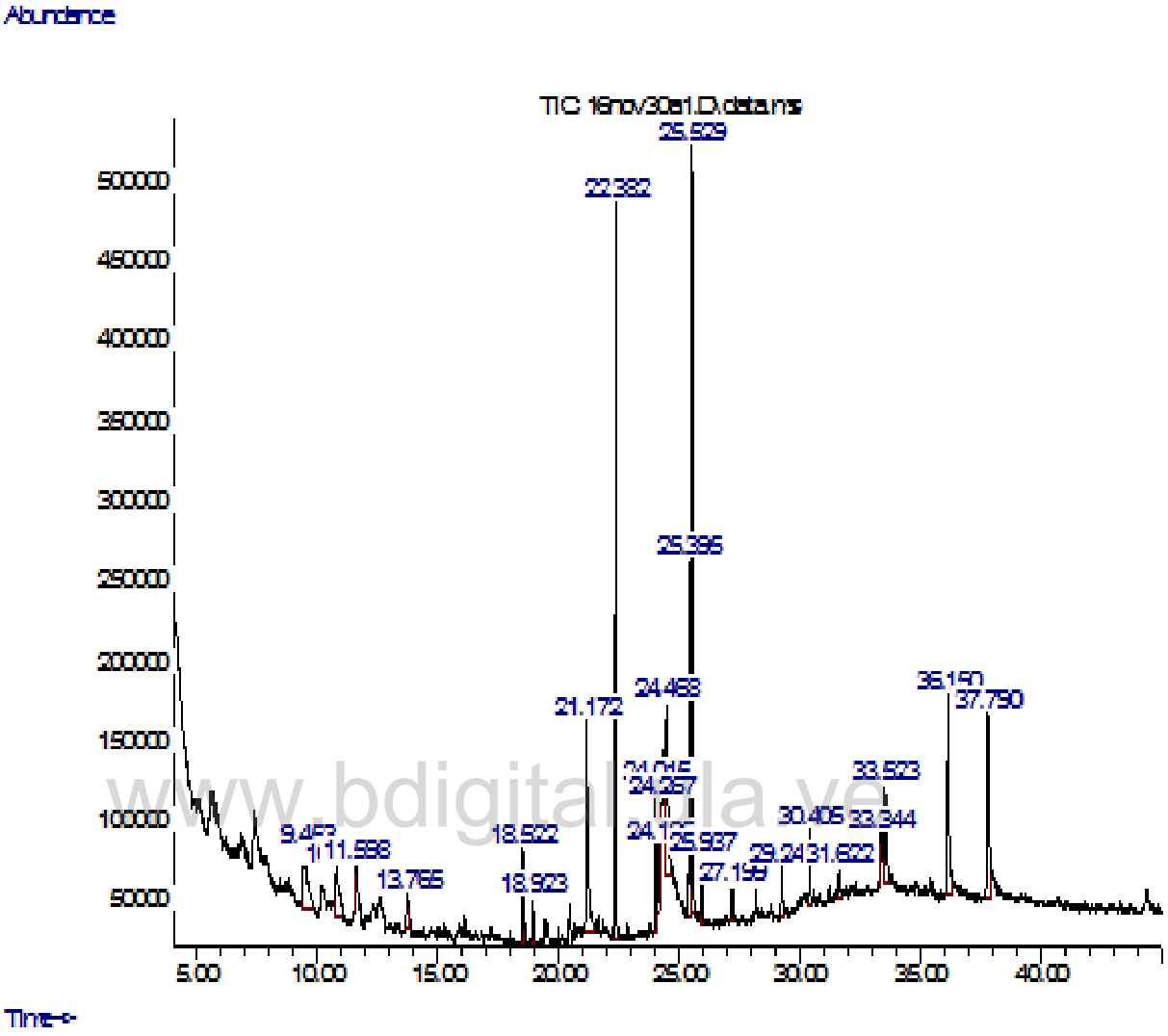
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

# ANEXOS

www.bdigital.ula.ve



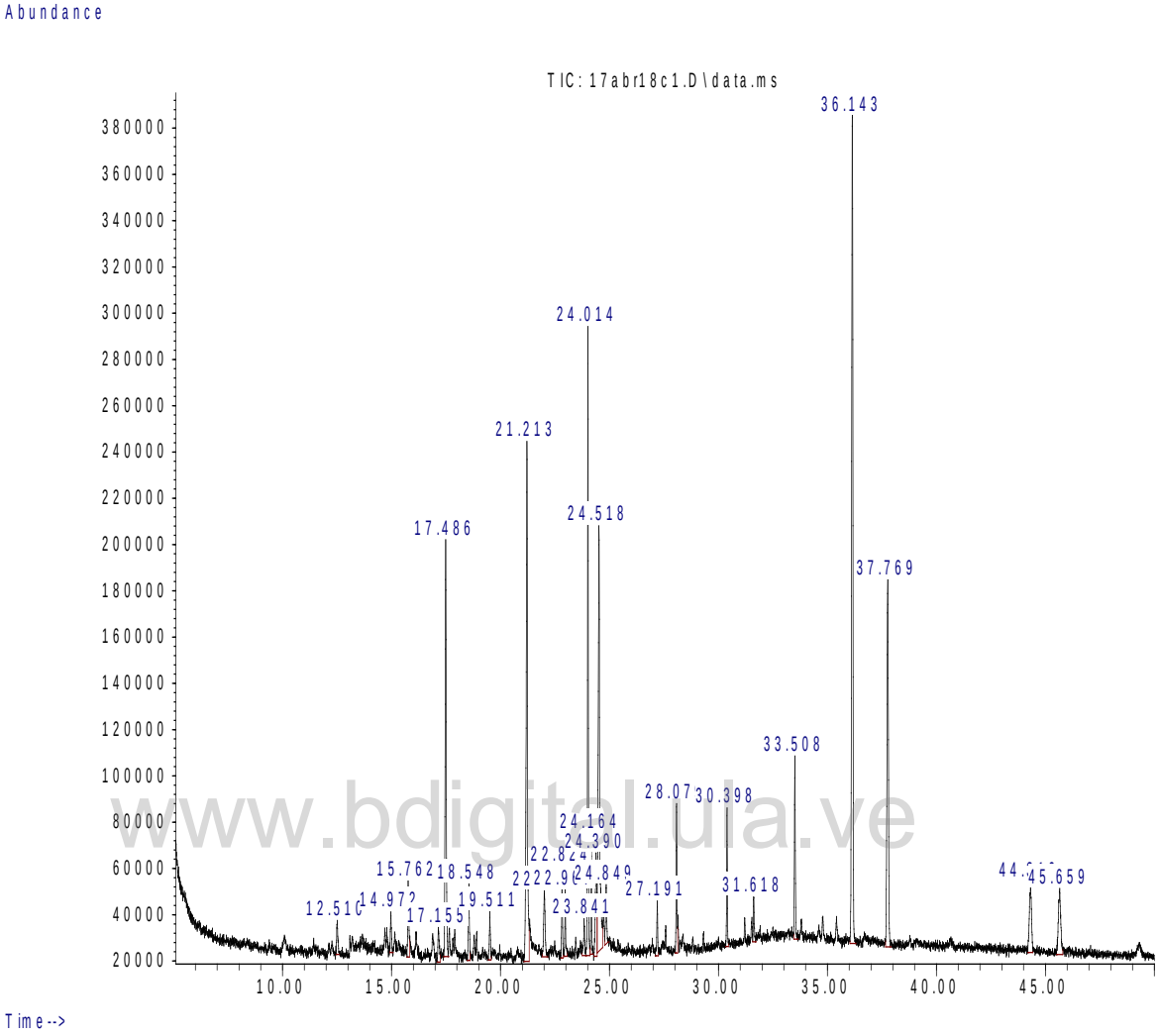
Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)




**Anexo 1.** Cromatograma General y los compuestos mayoritarios del análisis del extracto de hexano de las hojas de *Plumeria inodora* Jacq.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

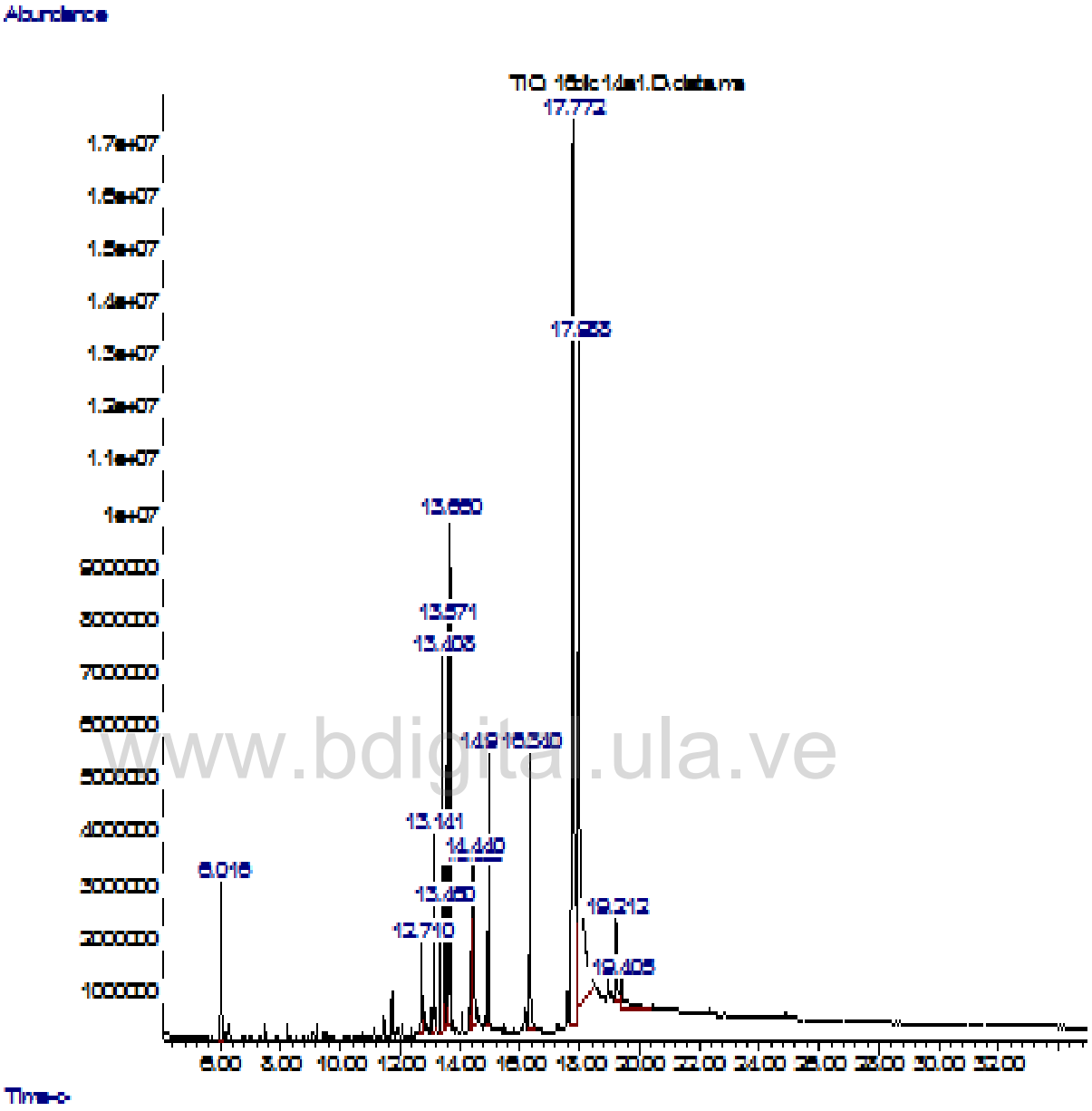



www.bdigital.ula.ve

**Anexo 2**. Cromatograma General y los compuestos mayoritarios del análisis de los componentes químicos del extracto de Diclorometano de las hojas de *Plumeria inodora* Jacq.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

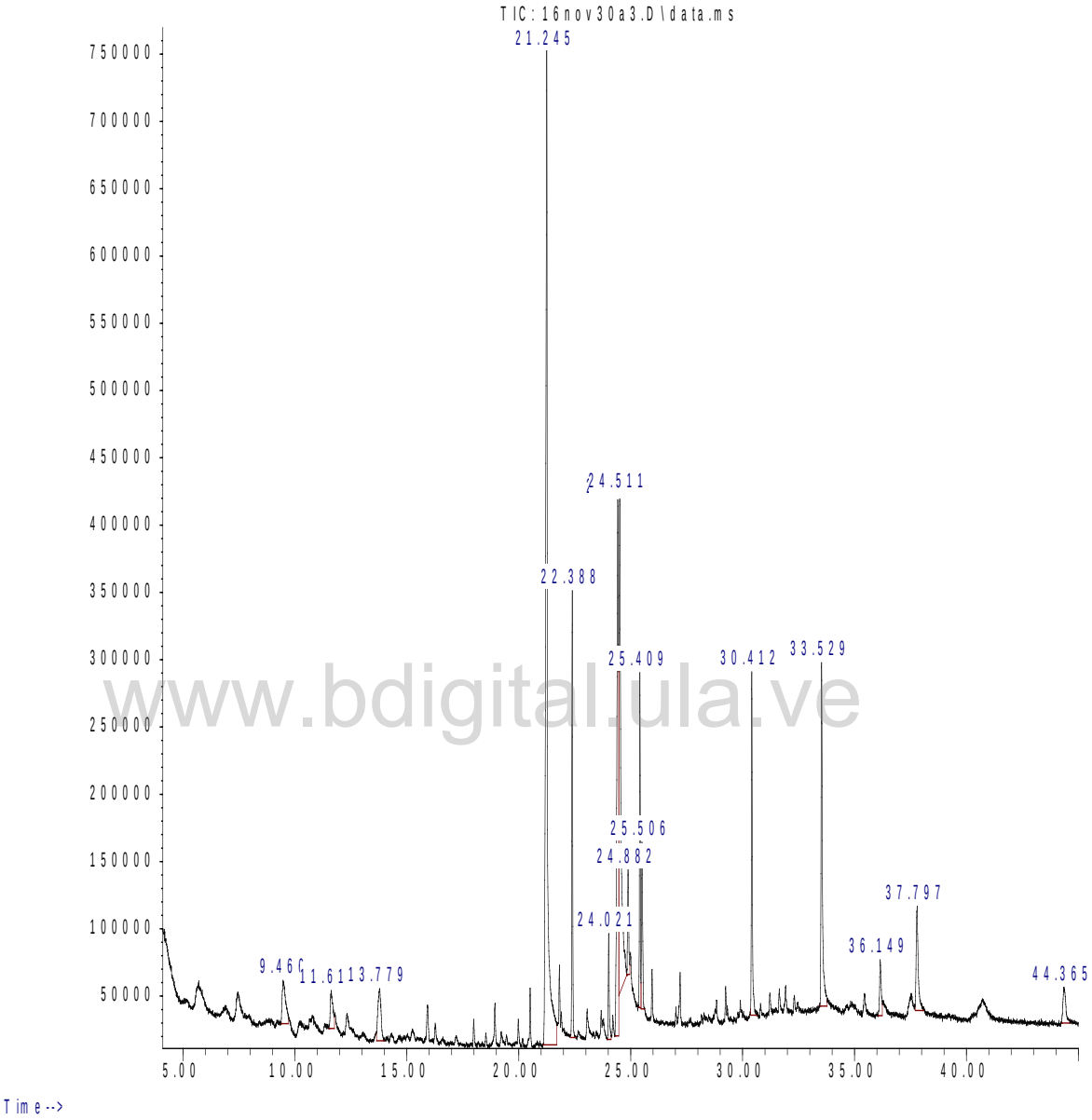



**Anexo 3.** Cromatograma General y Compuestos Mayoritarios del análisis de los componentes químicos del extracto Etanólico de las hojas de *Plumeria inodora* Jacq.



www.bdigital.ula.ve

Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

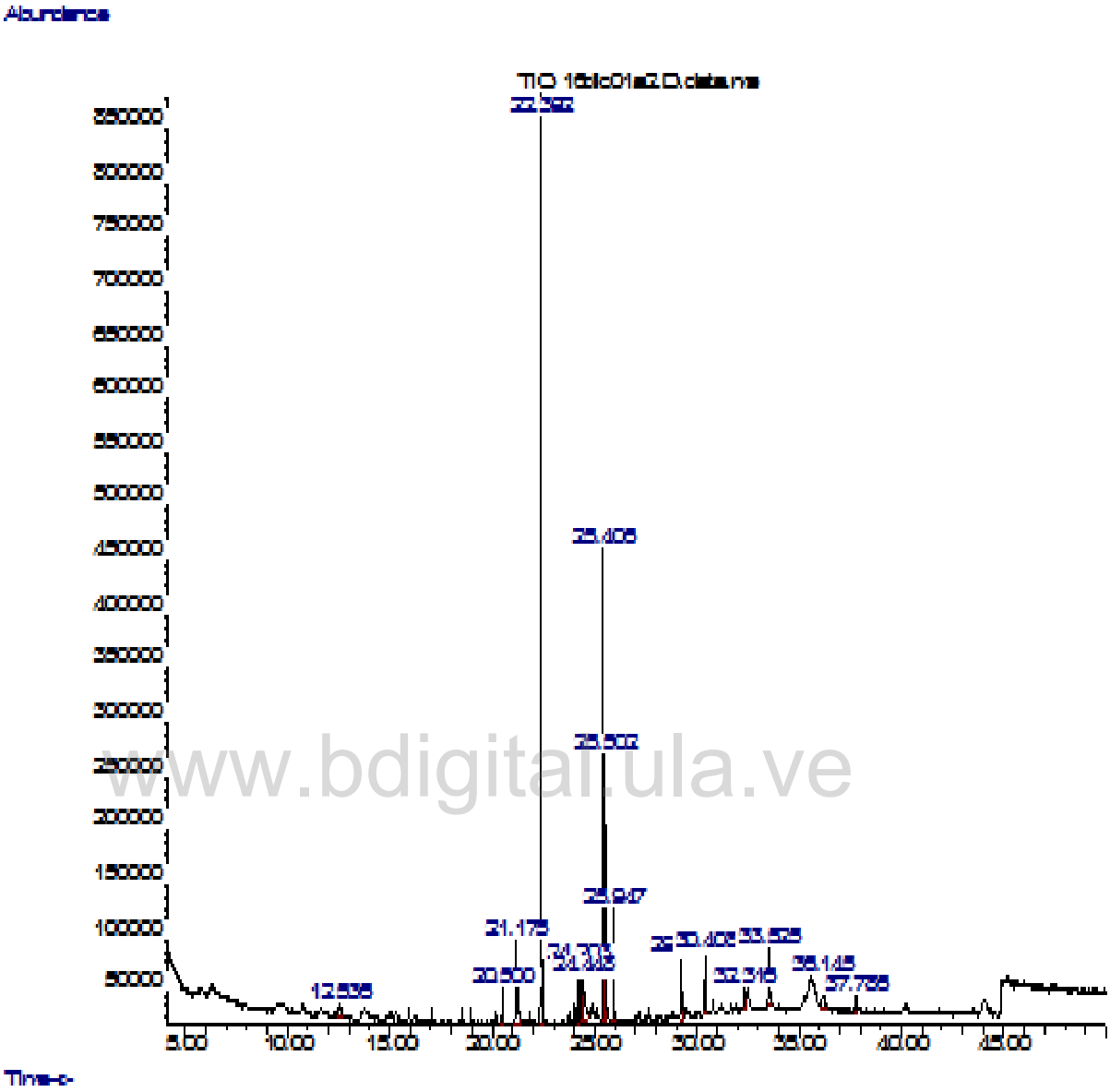



www.bdigital.ula.ve

**Anexo 4.** Cromatograma General, los compuestos mayoritarios del análisis de los componentes químicos del extracto de Hexano de los tallos de *Plumeria inodora* Jacq.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)

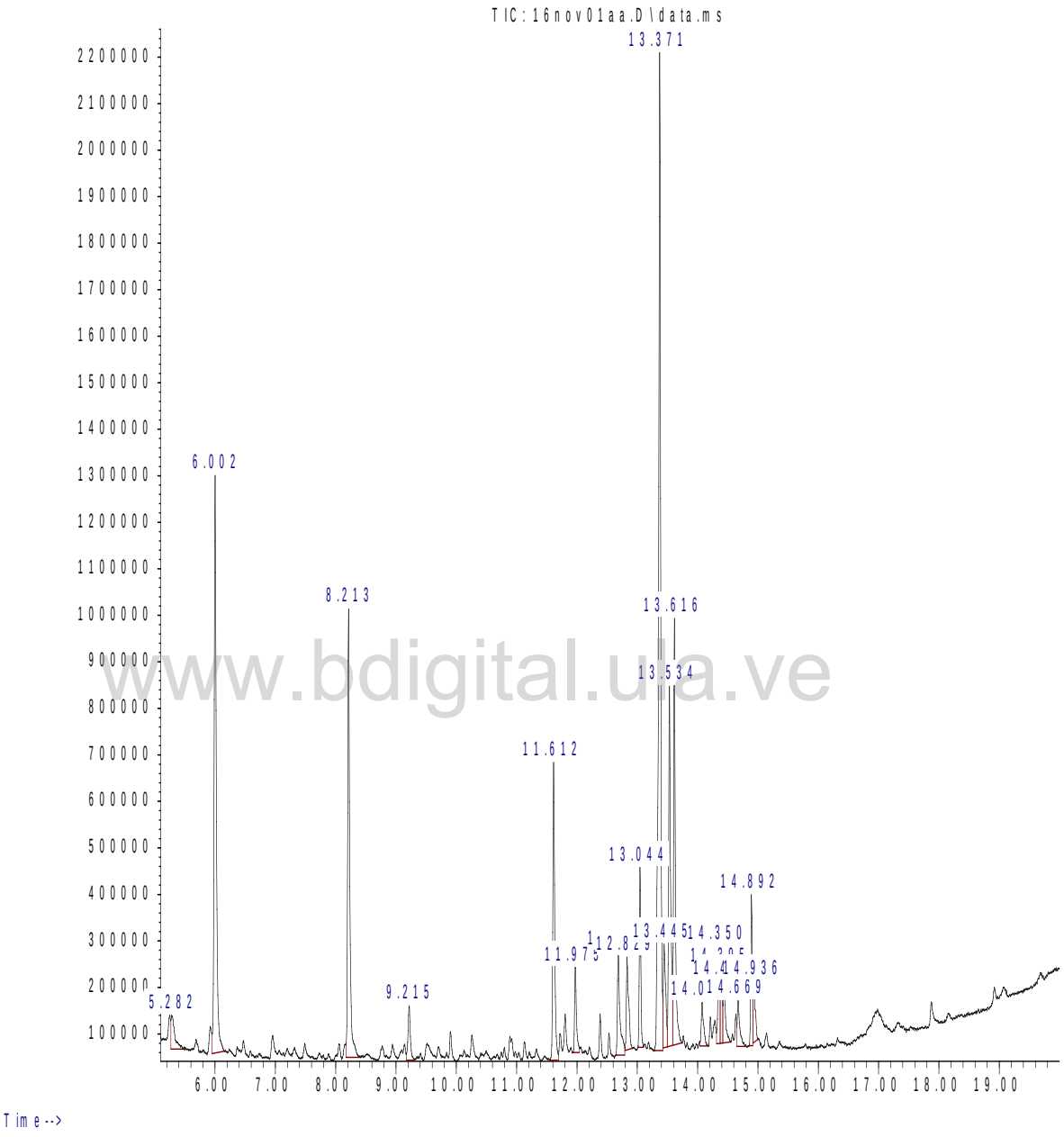



www.bdigital.ula.ve

**Anexo 5.** Cromatograma General y los compuestos mayoritarios del análisis de los componentes químicos del extracto de Diclorometano de los tallos de *Plumeria inodora* Jacq.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)




www.bdigital.ula.ve

**Anexo 6.** Cromatograma General y Compuestos Mayoritarios del análisis de los componentes químicos del extracto Etanólico de los tallos de *Plumeria inodora* Jacq.



Atribución - No Comercial-Compartir Igual 3.0 Venezuela (CC BY - NC - SA 3.0 VE)