



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y DETECCIÓN DE METABOLITOS
SECUNDARIOS DE EXTRACTOS HEXÁNICOS Y METANÓLICOS DE LA
ESPECIE *Parkinsonia praecox* (Ruiz López & Pavon) Hawkins.

DANIELA RAMONA TORREALBA RIVAS

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

CUMANÁ, 2008

ACTIVIDAD BIOLÓGICA Y DETECCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS
DE EXTRACTOS HEXÁNICOS Y METANÓLICOS DE LA ESPECIE *Parkinsonia
praecox* (Ruiz López & Pavon) Hawkins.

APROBADO POR:

Prof. Oscar Crescente
Asesor

Jurado Principal

Jurado Principal

DEDICATORIA

A

Mama Antonia, siempre te llevo en mi corazón.

Mi reina bella, mi mamá Iraima, por tanto amor y apoyo incondicional.

Mi papá Oscar Torrealba, por su amor, consejos y paciencia.

Mi esposo Cesar Miguel, por su apoyo constante y motivación.

Mi hermana Karina por ser un ejemplo a seguir.

Mis hermanos Oscarina y Oscar Rafael, que les sirva de estímulo para seguir con sus carreras.

AGRADECIMIENTOS

A

Dios, que me ha demostrado que todo lo puede, gracias por darme todas las llaves y darme fortaleza en los momentos más difíciles.

Mi profesor Oscar Crescente, por creer en mí, aconsejarme y rescatarme, gracias a él fue posible el inicio y la culminación de este trabajo.

Mi amiga Nellybert, por acompañarme siempre y llenar mis días de alegría.

Mis amigas y compañeras de estudio Yubelin y Fabiola por ayudarme y colaborar conmigo cuando más las necesité.

Mi amigo, Licenciado José Gregorio Lanza, por su ayuda incondicional, consejos y dedicación, gracias por todo tu tiempo y por ser tan generoso.

Mis papas cumaneses, papá César y mamá Jeannette, por toda su colaboración y apoyo.

Las Licenciadas Diamela Castillo y Shailili Moreno, por sus valiosos consejos.

Licenciado Juan Carlos Monteverde por indicarme el camino a seguir.

Todas aquellas personas que contribuyeron a la realización de este trabajo.

ÍNDICE

Pág.

LISTA DE TABLAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	8
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
CONCLUSIONES.....	24
RECOMENDACIONES.....	25
BIBLIOGRAFÍA.....	26

LISTA DE TABLAS

	Pág.
1. Cepas bacterianas utilizadas en la evaluación de la actividad antibacteriana.....	13

2.	Cepas de hongos utilizadas para evaluar la actividad antifúngica	14
3.	Rendimiento obtenido de los extractos de los diferentes órganos de <i>Parkinsonia praecox</i>	17
4.	Análisis fitoquímico de los extractos de los diferentes órganos de <i>Parkinsonia praecox</i>	19
5.	Actividad antibacteriana, expresado en mm de diámetro del halo de inhibición.....	20
6.	Actividad antifúngica, expresado en mm de diámetro del halo de inhibición.....	21
7.	Toxicidad de los extractos metanolicos y hexanicos de <i>Parkinsonia praecox</i> frente a <i>Artemia salina</i>	21
8.	Valores de CL ₅₀ correspondientes al bioensayo de <i>Artemia salina</i>	22

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
1.	<i>Parkinsonia praecox</i> . a. Hábitad en estado vegetativo; b. Hábitad en floración; c. Rama; d. Hoja; e.Tallo; f. Flor y fruto.....	6

2. <i>Parkinsonia praecox</i>	8
3. Esquema del procedimiento seguido para la obtención de los extractos crudos.....	9
4. Esquema del procedimiento empleado para determinar la actividad antibacteriana	14
5. Esquema del procedimiento empleado para determinar la actividad antifúngica.....	15
6. Procedimiento seguido para la realización de la prueba de <i>Artemia salina</i>	16

LISTA DE ABREVIATURAS

EMH: Extracto metanólico de las hojas.
EMF: Extracto metanólico de los frutos.
EMT: Extracto metanólico del tallo.
EHT: Extracto hexánico del tallo.
EHH: Extracto hexánico de las hojas.
EHF: Extracto hexánico de los frutos.

CL₅₀: Concentración Letal media.
AMH: Agar Müller Hinton.
PDA: Agar Papa dextrosa.
T.A: Temperatura Ambiente.
ATCC: Asociación americana de cultivos tipo.
DMSO: Dimetilsulfóxido.
SSF: Solución salina fisiológica.

RESUMEN

Se evaluó el efecto de los extractos hexánicos y metanólicos de la especie *Parkinsonia praecox* sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas, hongos filamentosos y levaduriformes. Los extractos mostraron actividad inhibitoria de manera variada ante las bacterias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis*. Todos los extractos presentaron actividad antimicótica frente a *Aspergillus niger*. El extracto metanólico de tallo presentó actividad frente a *Candida albicans* y *Penicilium* sp. A cada uno de los extractos también se le realizó el bioensayo contra el crustáceo *Artemia salina* donde el EHH presentó valores por debajo de la concentración letal media (CL₅₀), lo que sugiere la presencia de sustancias potencialmente activas. El análisis fitoquímico de los extractos de la especie *Parkinsonia praecox* mostró reacción positiva ante las diferentes pruebas de alcaloides, flavonoides, triterpenos, esteroides, saponinas y polifenoles. Los resultados demuestran que esta especie vegetal puede ser una potencial fuente de compuestos químicos con una marcada actividad biológica.

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos remotos en la historia de la humanidad, la medicina siempre ha sido considerada la ciencia principal. El conocimiento de la anatomía humana y de los efectos beneficiosos de las plantas fue adelantando paralelamente durante siglos en el estudio de la medicina (1).

Las plantas medicinales son todas aquellas plantas que contienen uno o más principios activos, los cuales, administrados en dosis adecuadas, producen un efecto curativo a las enfermedades del hombre y los animales. La característica más importante de muchos de estos principios activos es su distribución relativamente restringida en la naturaleza, que en algunos casos se limita a especies o subespecies únicas; en consecuencia, son una manifestación de la individualidad del organismo que los contiene. A estos compuestos se les ha atribuido una gran variedad de funciones, aunque muchas de éstas no se han determinado con certeza. El hecho de contener más de un principio activo hace que una planta medicinal pueda servir para tratar diferentes afecciones o trastornos. Estos principios activos se pueden incorporar de muchas formas como, por ejemplo, tomando una infusión realizada con la planta seca y de manera natural, o comprando cápsulas o aceites en las casas naturistas (1).

Todos los pueblos del mundo han usado las plantas medicinales para atender sus problemas de salud. En Asia, su utilización se remonta a más de 10 000 años. En occidente, los primeros en popularizar el estudio de las plantas medicinales fueron los griegos y los romanos, aún cuando mucho antes se usaban en rituales mágicos o conjuros (2). Otro ejemplo de la antigüedad del uso de las plantas medicinales fue dado por los primeros nativos americanos, quienes tenían ciertos conocimientos herbarios. Tal es el caso de la infusión que preparaban con la corteza de la quina (o árbol de la salud), la cual bastaba para curar al hombre atacado de fiebre, y como las fiebres eran las únicas fuerzas que podían abatir a sus dominadores, los nativos ocultaban este valioso remedio. En la medicina de los griegos, el estudio de la anatomía y la cirugía tenía un peso relevante, pero también daban importancia a la dieta y a las plantas con propiedades medicinales;

por ejemplo, Hipócrates, uno de los fundadores de la medicina actual, afirmaba que el principio básico de la terapéutica era la fuerza curativa de la naturaleza y que el médico sólo potenciaba esta propiedad de la naturaleza con los fármacos, la dieta y la cirugía. En esta misma época, Carteabas, famoso herborista, escribió un manual en el que detallaba 400 plantas con sus aplicaciones (1,2).

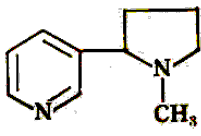
Los siglos XVII y XVIII marcaron el auge en el uso de las plantas medicinales y aromáticas con fines curativos. A partir de la década de los 40, la industria químico-farmacéutica se desarrolló por nuevos conocimientos y la innovación tecnológica que generó la sustitución de productos naturales por los sintéticos (2).

En la actualidad, el deterioro ambiental y la evidencia de que los fármacos sintéticos provocan efectos negativos colaterales han estimulado el consumo de productos naturales (2).

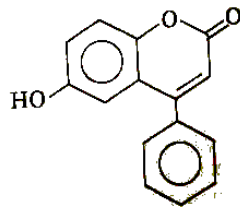
Según la Organización Mundial de Salud (OMS), se calcula que de las dos terceras partes de la población mundial, 4000 millones de personas recurren al uso de plantas medicinales. En América Latina, donde gran parte de la población no tiene acceso a un programa de salud primario y medicinas sintéticas, el uso y comercio de las plantas medicinales se ha incrementado por razones económicas, sociales y culturales (3).

Innumerables estudios científicos en el mundo, demuestran la cantidad de principios activos o metabolitos secundarios contenidos en las plantas medicinales y otros que comprueban día a día el efecto medicinal de aquellos (4,5). Actualmente, se sabe que la mayoría de las plantas utilizadas con fines medicinales contienen principios activos y que, paradójicamente, en muchos casos, éstos son metabolitos secundarios de las mismas; es decir, sustancias aparentemente no esenciales para el funcionamiento de las células vegetales y que, por consiguiente, no forman parte en las transformaciones bioquímicas comunes, a diferencia de los metabolitos primarios que presentan utilidades

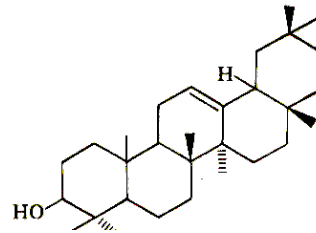
definidas y que son comunes a todos los seres vivos. Entre los metabolitos secundarios conocidos hasta el momento, se tienen los alcaloides, flavonoides, triterpenos, esteroides, taninos, saponinas entre otros (6), cuyas estructuras se ilustran a continuación:



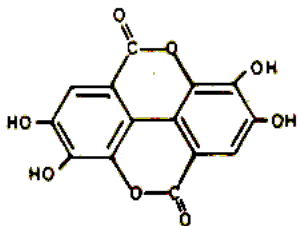
Alcaloide



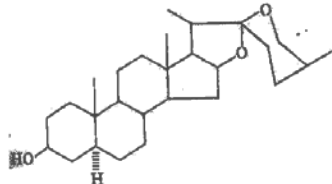
Flavonoide



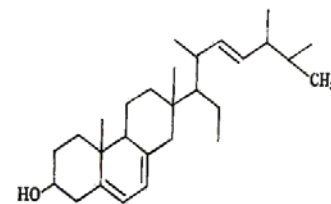
Triterpeno



Tanino



Saponina



Esterol

Generalmente, los remedios elaborados a base de plantas medicinales presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos. En las plantas, los principios activos se hallan siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van a potenciarse entre si, de forma que, en general, no se acumulan en el organismo y sus efectos indeseables están limitados (7,8,9).

Los productos naturales obtenidos de las plantas tienen sobre el organismo humano diferentes acciones que, bien usados, pueden ayudar a solucionar grandes problemas de salud, e incluso, prevenirlos. Pero si se usan en forma irracional, pueden en algunos casos ocasionar muerte por intoxicación. A pesar de esto último, es conocido que los constituyentes químicos aislados de una planta pueden ser usados directamente como fármacos o material de partida para la síntesis de medicamentos o también pueden servir como modelo para la elaboración de sustancias biológicamente activas (4,10).

Se conocen aproximadamente 260 000 especies de plantas, de las cuales sólo un 10% se consideran medicinales, lo que indica lo mucho por investigar y el gran potencial sobre futuros medicamentos (8).

La familia Caesalpiniaceae sirve como ejemplo para ilustrar la diversidad de compuestos químicos o metabolitos secundarios que se pueden encontrar en las especies vegetales. Esta familia comprende una variedad de especies leñosas y de abundante valor florístico, cuyo origen está en las regiones subtropicales y tropicales. *Parkinsonia praecox*, una especie perteneciente a esta familia, es un árbol pequeño, armado, tallos y ramas verdes, de 10-20 m o más, frecuentemente pubescente, con tronco de 30 cm de diámetro; es xerófilo bien adaptado a su ambiente seco y caluroso, tiene espinas de 0,5-1 cm de largo; hojas bipinnadas, pinnas usualmente un par, 2-3 cm de largo, divergente; folíolos de 5-8 pares, oblongos, ápice redondeado, 3-6 mm de largo; racimos 1-3 por nudo, de 1-1,5 cm de largo; flores 1-6 con pedicelos de 5-10 mm de largo; cáliz estrecho y prolongado hacia la base, el tubo estrechándose mucho más después de la anthesis, oblícuo, 2,5 mm de ancho, los dientes de 5 mm de largo; pétalos pálidos o profundamente amarillos, el más superior de 9-11 mm de largo, 6-8 mm de ancho; ovario glabro; fruto 3-6 cm de largo, 0,6-1 cm de ancho, agudo en ambos extremos, planos y papiráceos, no constreñido entre las semillas; semillas 1-2, oblongas, compresas, pardo-grisáceas, de 1 cm de largo (11).

En cuanto a la actividad biológica de esta familia se ha estudiado *Brownea ariza Bentham* (Caesalpiniaceae) conocida popularmente por sus propiedades hemostáticas. De quien, a través de una investigación experimental, se le determinó actividad coagulante en los extractos obtenidos a partir de la corteza (11).

Hay muchos reportes en diversas especies de esta familia, donde se le atribuyen actividad antihelmíntica, como la evaluación realizada a *Senna atomaria* (L.), la cual se le determinó este tipo de actividad, aparte de presentar resultados positivos ante pruebas diferentes para alcaloides, taninos y glicósidos cianogénicos

La especie *Parkinsonia praecox* se encuentra en selvas bajas, a altitudes que van de los 200 m a los 1100 m sobre el nivel del mar (11).

Son pocos los trabajos, desde el punto de vista químico y biológico, que se han realizado de esta especie. Con respecto a sus usos medicinales, se cita a la corteza como astringente, antidisentérica, antihemorrágico, febrífugo y antiespasmódico (12).

Parkinsonia praecox, en Venezuela es conocida comúnmente como cuica o palo verde, y además de presentar una extensa distribución en el Oriente de Venezuela, específicamente en el estado Sucre, no es conocida por sus propiedades medicinales. Razón por la cual se seleccionó, con la finalidad de realizar un estudio de la actividad biológica y de la posible detección de algunos metabolitos secundarios, ya que implicaría un primer reporte científico de esta planta, en el país.



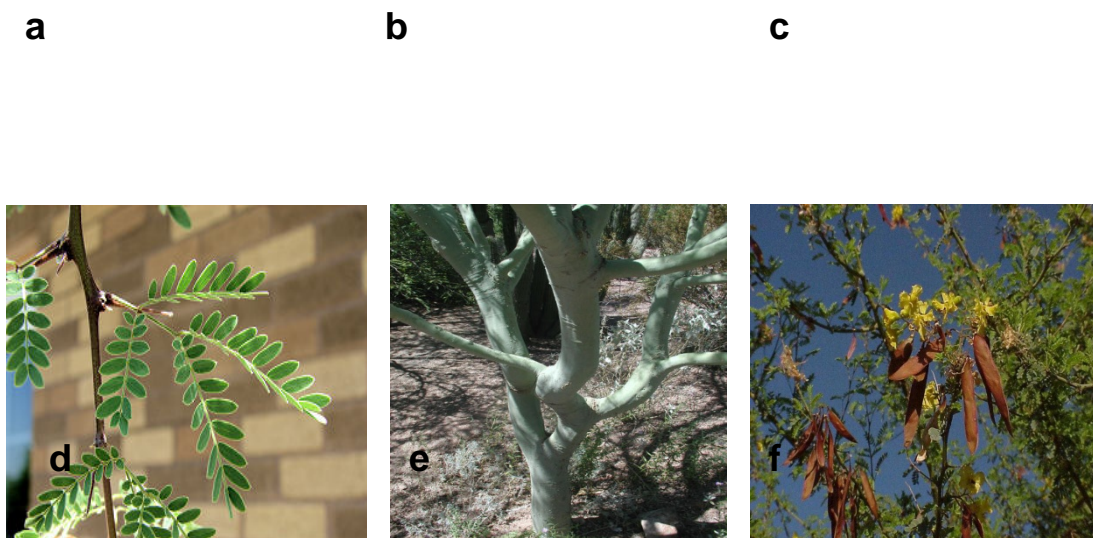


Fig. 1. *Parkinsonia praecox*. a. Hábitad en estado vegetativo; b. Hábitad en floración; c. Rama; d. Hoja; e. Tallo; f. Flor y fruto

Es importante el estudio de carácter biológico y químico sobre una especie vegetal, en este caso *Parkinsonia praecox*, ya que proporcionaría la identificación de los posibles metabolitos secundarios que en ella se encuentren presentes, así como la posibles utilidad de estos como agentes terapéuticos o como patrones para la elaboración de medicamentos modernos.

METODOLOGÍA

Muestreo del material vegetal

La especie *Parkinsonia praecox*, fue recolectada en los jardines de la urbanización Villa Venezia de la ciudad de Cumaná, estado Sucre. Seguidamente, una muestra representativa de la planta se trasladó al Herbario Isidro Ramón Bermúdez Romero (IRBR) del Departamento de Biología del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente, donde su taxonomía fue identificada por el profesor Luís Cumana. Posteriormente, el resto de la planta fue llevada al laboratorio 412 de Productos Naturales del Departamento de Química del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente, donde sus distintos órganos (tallos, hojas y frutos) se

deshidrataron a temperatura ambiente y a la sombra. En la figura 2, se observa una muestra representativa de la especie vegetal.

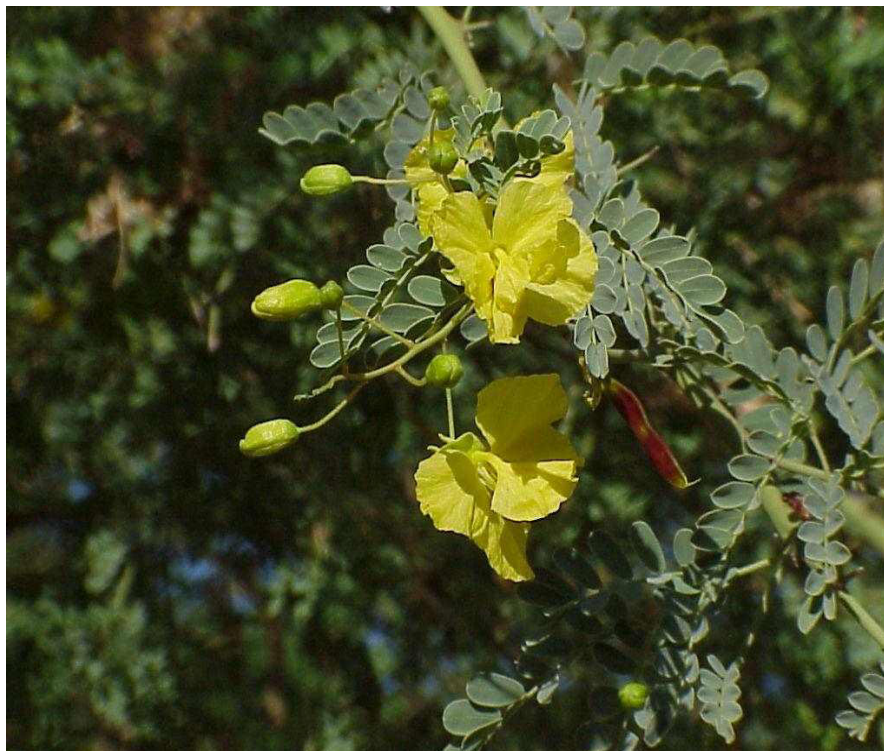


Figura 2. *Parkinsonia praecox*

Obtención de los extractos hexánicos y metanólicos del material vegetal

Una vez deshidratado el material vegetal, fue triturado cada órgano por separado, en un molino eléctrico marca Thomas; posteriormente, se realizaron extracciones sucesivas con hexano hasta agotamiento y después con metanol. Ambos extractos fueron concentrados a presión reducida a una temperatura de 35°C, en un rotaevaporador marca Buchi modelo R-200. (18). En la figura 3 se observa un esquema resumido de todo el procedimiento del muestreo del material vegetal y de obtención de los extractos crudos (7,13).

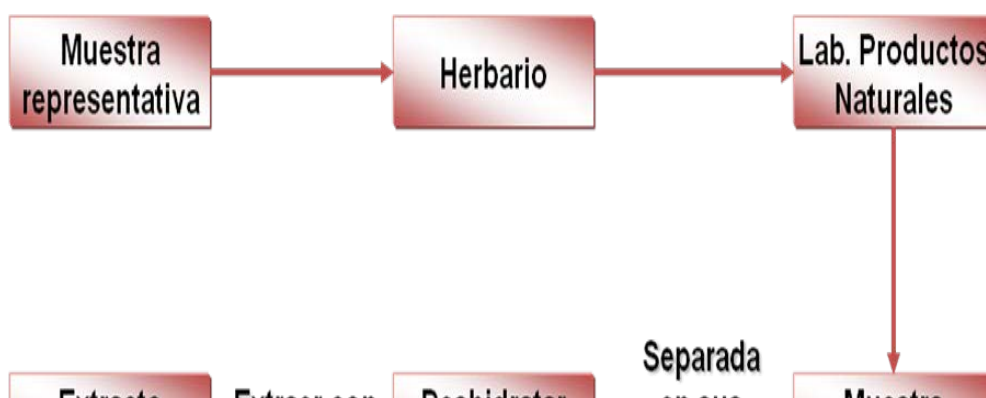


Figura 3. Esquema del procedimiento seguido para la obtención de los extractos crudos.

Análisis fitoquímico

Para detectar los diferentes metabolitos secundarios que pudieran encontrarse en los extractos obtenidos, se realizaron algunos procedimientos que involucraron reacciones químicas, los cuales proporcionaron la información necesaria para conocer sobre la posible presencia de alcaloides, saponinas, esteroides, triterpenos, flavonoides, taninos, polifenoles, antraquinonas y glicósidos cianogénicos (6,14). A continuación, se describen las pruebas realizadas, a cada uno de los extractos, para la detección de los metabolitos secundarios antes mencionados.

Alcaloides

El extracto crudo casi seco se disolvió con HCl al 10 % se agitó con cloroformo y, posteriormente, separado. La fase acuosa fue alcalinizada y extraída con

cloroformo, las tres fases fueron analizadas para alcaloides, por separado, utilizando los reactivos de Dragendorff y Wagner, lo que permitió detectar, con la formación de precipitados anaranjados y marrones, la posible presencia de alcaloides básicos, débilmente básicos o sales cuaternarias de amonio, respectivamente (6,9).

Saponinas

Las saponinas se manifiestan por la formación de espuma persistente cuando la muestra vegetal es agitada con agua, también se confirmó su presencia con la producción de hemólisis en agar sangre colocando discos impregnados con los extractos vegetales (15). Una parte del crudo total se hidrolizó (HCl 10 %), se concentró y se extrajo con acetato de etilo. Si las sapogeninas (agliconas de saponinas) estaban presentes, se encontraban en la fracción orgánica con otros materiales no hidrolizables.

Esteroles y triterpenos

El extracto vegetal fue retomado en HCl al 10 % y se extrajo en cloroformo. La fase orgánica fue tratada con 2 ó 3 gotas del reactivo de Liebermann-Burchard, recién preparado. La aparición de una coloración roja o marrón indicaba la posible presencia de triterpenos. En cambio, una coloración verde, se consideraba un resultado positivo para esteroides (4,20).

Flavonoides

El crudo total fue desgrasado con éter de petróleo y el residuo tratado con HCl concentrado y virutas de magnesio; la formación de una coloración roja (al cabo de 10-20 minutos) es indicativa de la presencia de flavonoides. También, se acudió a otra prueba colocando una gota del extracto total sobre un papel de filtro

y se roció con una solución de cloruro de aluminio al 1 % en etanol; la aparición de una mancha amarilla fluorescente bajo la luz UV era indicativa, igualmente, de flavonoides (6,9,14).

Taninos y polifenoles

Los compuestos fenólicos se detectaron por la coloración parda que producen en presencia de una solución de cloruro de hierro (III) al 1%. Para ello, el extracto crudo fue retomado con agua y filtrado antes de la reacción con el cloruro de hierro (III). El crudo, también, fue tratado con una solución de gelatina al 1 % en NaCl al 1 % y si se producía una precipitación, ésta era indicativa de la presencia de taninos (7,13).

Antraquinonas

El crudo se extrajo con KOH (0,5 mol/l), posteriormente, fue filtrado y acidificado con ácido acético y después agitado con benceno. Cuando la capa orgánica tomaba una coloración roja, al alcalinizarla con hidróxido de amonio, se consideró positivo para antraquinonas (6,9).

Glicósidos cianogénicos

Al material fresco y macerado se le añadieron unas gotas de cloroformo se calentó entre 50 °C y 70 °C en tubo cerrado y los vapores se pusieron en contacto con un papel de filtro impregnado en una solución al 1 % en ácido pícrico en carbonato de sodio al 10 %. Los compuestos cianogénicos se manifestaron con una coloración roja sobre el papel de filtro. El tiempo de reacción varía, ya que puede tomar hasta dos horas (9).

Glicósidos cardiotónicos

La posible presencia de glicósidos cardiotónicos se detectó por reacción con una mezcla 1:1 recién preparada, de ácido 3,5-dinitrobenzoico al 2 % y KOH (0,5 mol/l). la aparición de una coloración azul, se consideró como un resultado positivo para esta prueba (9).

PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La actividad biológica de cada uno de los extractos de *Parkinsonia praecox*, se evaluó mediante la utilización de los siguientes bioensayos:

Actividad antibacteriana

obtenidas, se utilizaron cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas (tabla Para evaluar el efecto antibacteriano de los extractos y las distintas fracciones 1) pertenecientes a la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC), otras fueron donadas por el Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Biología.

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en la evaluación de la actividad antibacteriana.

Microorganismos	Origen	Coloración de Gram
<i>Bacillus subtilis</i>	Laboratorio de Bacteriología	Gram positivo
<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC) 6538	Gram positivo
<i>Salmonella enteritidis</i>	Laboratorio de bacteriología	Gram negativo
<i>Citrobacter freundii</i>	Laboratorio de bacteriología	Gram positivo
<i>Escherichia coli</i>	(ATCC) 10536	Gram negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC) 9920	Gram negativo

Este bioensayo se realizó, por medio de la técnica de susceptibilidad antimicrobiana o método de difusión en placas, que consistió en probar la eficacia de una sustancia, posiblemente antimicrobiana, en medio de cultivo Agar Müller-Hinton, en el cual se sembraron (en placas de Petri) cada una de las suspensiones de las bacterias, con concentración conocida (1×10^8 bacterias/ml), preparadas por

comparación con un patrón comercial Mc Farland 0,5. Luego, discos de papel de filtro Whatman N° 3, de 5 mm de diámetro, fueron impregnados con 7 μ l del extracto obtenido para cada órgano de la planta y colocados sobre las placas sembradas. Luego se incubaron a 4°C durante 12 horas, para permitir la difusión del extracto. Posteriormente, se incubaron a 37 °C durante 24 horas, para permitir el crecimiento bacteriano. Los extractos que presentaron inhibición del crecimiento bacteriano formaron un halo alrededor del disco, el cual fue expresado en mm (21,22) (Figura 4).

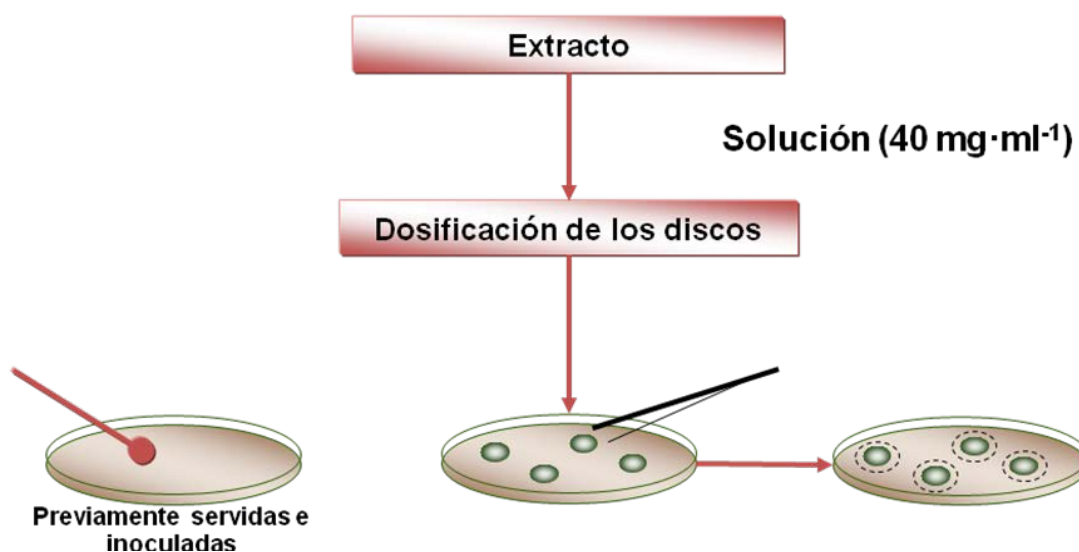


Figura 4. Esquema del procedimiento empleado para determinar la actividad antibacteriana.

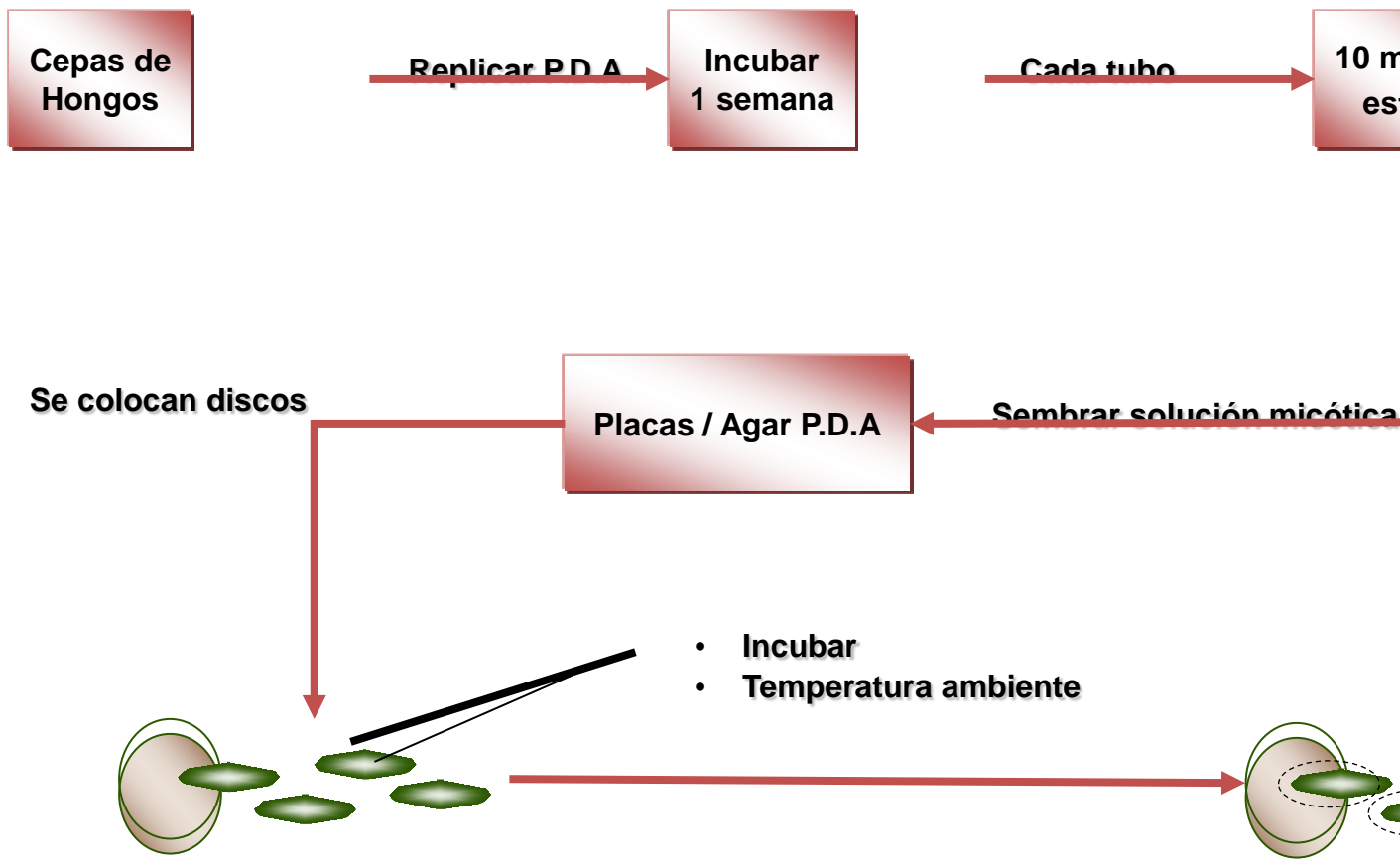
Actividad antimicótica

La actividad antimicótica provocada por los extractos en estudio, se evaluó sobre tres cepas de hongos fitopatógenos, proporcionadas por el Laboratorio de Micología del Departamento de Bioanálisis, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre. Una cepa de hongo patógeno certificada (tabla 2), perteneciente a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), y otra cepa patógena que fue proporcionada por Laboratorio de Micología del mismo Departamento.

Tabla 2. Cepas de hongos utilizadas para evaluar la actividad antifúngica.

Microorganismos	Origen	Característica
<i>Candida albicans</i>	(ATCC) 10231	Oportunista
<i>Candida</i> sp.	Laboratorio de Micología	Oportunista
<i>Aspergillus niger</i>	Laboratorio de Micología	Fitopatógeno
<i>Fusarium</i> sp.	Laboratorio de Micología	Fitopatógeno
<i>Penicilium</i> sp.	Laboratorio de Micología	Fitopatógeno

Este bioensayo consistió en incubar por una semana, a temperatura ambiente las cepas de hongos (*Aspergillus niger*, *Fusarium* sp., *Penicilium* sp.) sobre tubos inclinados de Agar Papa Dextrosa (APD); transcurrido este tiempo se añadieron 10 ml de agua destilada estéril, agitando y filtrando para obtener una suspensión de esporas de cada cepa incubada. En cambio, con las levaduras (*Candida*) se hizo una suspensión directa de las colonias en solución salina estéril. Luego, la suspensión micótica se inoculó sobre placas de Petri previamente servidas con APD. Discos de papel de filtro Whatman N° 3, de 5 mm fueron impregnados con 7 μ l del extracto y colocados sobre las placas inoculadas, las cuales, se incubaron durante 48 horas a temperatura ambiente para permitir el crecimiento fúngico. Los extractos que presentaron inhibición del crecimiento fúngico formaron un halo alrededor del disco, el cual fue medido en mm (16,17,19) (Figura 5).



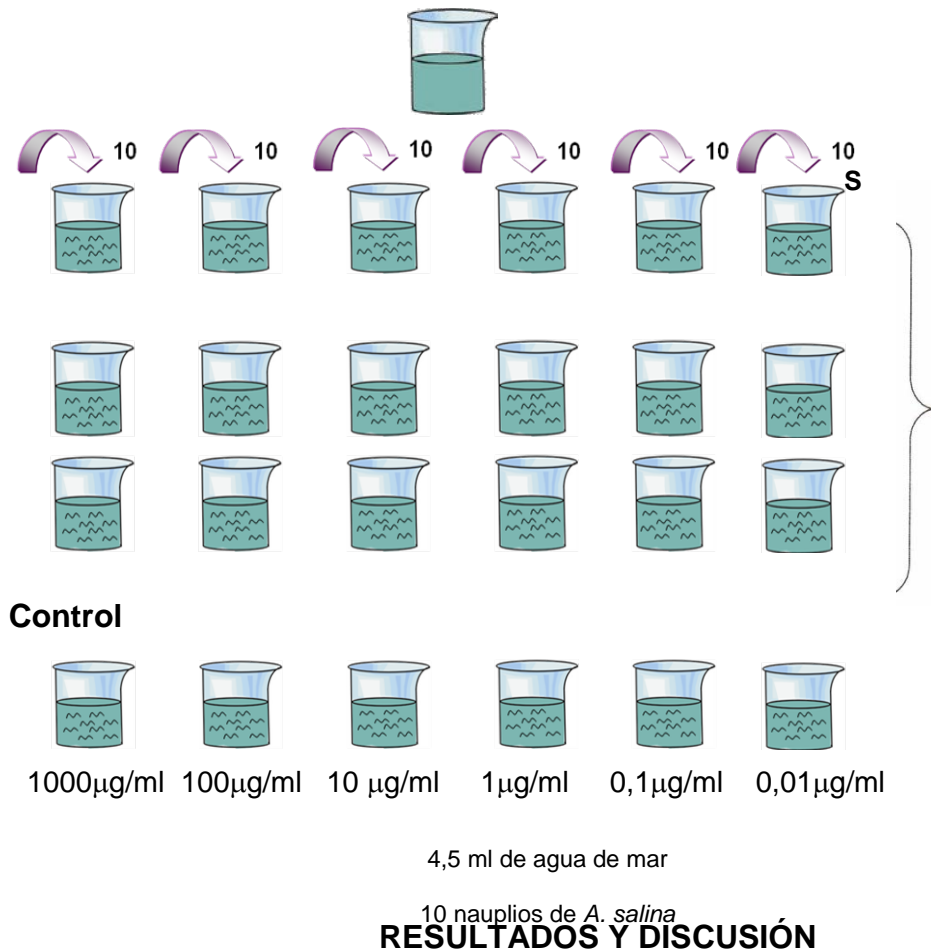
Madubunyi (1995)

Figura 5. Esquema del procedimiento empleado para determinar la actividad antifúngica

Actividad tóxica

La determinación del grado de toxicidad de los extractos, se realizó preparando soluciones patrones disolviendo 50 mg de cada extracto en 0,5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) o agua; luego, se agregaron 4,5 ml de agua destilada. A partir de cada solución patrón se prepararon diluciones seriadas agua de mar filtrada. A cada solución se agrego 10 nauplios del crustáceo *Artemia salina*, eclosionados con 24 horas de anticipación. Por cada concentración, se realizaron 4 réplicas, además de un control con igual número de réplicas. A las 24 horas se

determinó la mortandad de los organismos y, con estos datos, se calculó la concentración letal media (CL_{50}) con la ayuda de un programa de computación estadístico (Finney.dos), con límites de confianza del 95 % (17,19). En la figura 6, se aprecia un esquema del procedimiento seguido en esta prueba.



Análisis del porcentaje de rendimiento obtenido de los extractos hexánicos y metanólicos.

Se procedió a realizar cada una de las extracciones y a determinar su rendimiento porcentual, donde los extractos metanólicos presentaron un rendimiento mayor que el de los extractos hexánicos, lo que demuestra que esta especie vegetal es más rica en compuestos polares, solubles en metanol, que en no polares, los cuales se solubilizan en solventes como el hexano.(Tabla 3)

Tabla 3. Rendimiento obtenido de los extractos de los diferentes órganos de *Parkinsonia praecox*.

Órgano	Masa del órgano (g)	del Extracto	Masa del extracto (g)	% Rendimiento
Hojas	387,3	Hexánico	2,1	0,54
		Metanólico	4,0	1,03
Tallo	127,0	Hexánico	1,0	0,79
		Metanólico	9,9	7,80
Fruto	110,0	Hexánico	0,8	0,73
		Metanólico	1,6	1,45

ANÁLISIS FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

A los diferentes extractos, tanto metanólicos como hexánicos, se le realizó el análisis fitoquímico respectivo (tabla 4), en el cual se pudieron apreciar resultados positivos de manera variada ante las diferentes pruebas para alcaloides en todos los extractos, en lo que respecta a la segunda fase orgánica y la fase acuosa para los EHT y EMF, respectivamente. También se observaron resultados similares en la segunda fase orgánica y en la fase acuosa para EHT, EMF, EMH y EMT.

En cuanto a los flavonoides, se observan resultados positivos para EMH en la primera prueba (HCl + Mg) y para todos los extractos en la segunda prueba (AlCl₃) salvo el EHH. Todos los extractos dieron resultados positivos para saponinas y polifenoles. La presencia de taninos sólo se observó en el EMF. En el EMH, se detectó la presencia de esteroides, así como triterpenos en EHF, EHT, EMF y EMT.

Se observan resultados negativos para algunos metabolitos. Esto no es indicativo de que no están presentes, sino que pudo ocurrir que no se encontraban a una

concentración apreciable para ser detectados por los reactivos utilizados, o que la cantidad de extracto crudo empleado no fue suficiente.

Baldizán y colaboradores realizaron un estudio de los metabolitos secundarios de varias especies de la familia de las leguminosas, observando la presencia de alcaloides en *Acacia*, *Caesalpinia*, *Centrocema*, *Erythrina*, *Lonchocarpus*, *Mimosa*, *Piptadenta* y *Prosopis*. Flavonoides en *Acacia*, *Bahuinia*, *Caesalpinia*, *Cassia*, *Erythrina*, *Lonchocarpus*, *Mimosa*, *Piptadenta* y *Prosopis*. Taninos en *Acacia*, *Calliandra*, *Cassia* y *Prosopis*. Cianógenos en *Acacia*, *Caesalpinia* y *Prosopis* (20).

Medina y García encontraron taninos, polifenoles y saponinas en un estudio realizado con 10 especies de leguminosas (*Albizia*, *Lysiloma*, *Gliricida* entre otras) (21). Las especies del género *Lotus* presentan variación significativa en el contenido de taninos entre sí e intra-población, tanto en hoja, como en tallo y en raíz (22).

Tabla 4. Análisis fitoquímico de los extractos de los diferentes órganos de la especie *Parkinsonia praecox*.

Familia de compuestos	Fases	Reactivo	EHF	EHH	EHT	EMF	EMH	EMT
Alcaloides	Primera fase orgánica	Dragendorff	-	-	-	-	-	-
		Wagner	-	-	-	-	-	-
	Segunda fase orgánica	Dragendorff	+	+	+	+	+	+
		Wagner	-	-	+	+	-	-
	Fase acuosa	Dragendorff	+	+	+	+	+	+
		Wagner	+	-	-	+	+	+
Flavonoides	Primera prueba	HCl+Mg	ND	ND	ND	-	+	-
	Segunda	AlCl ₃	+	-	+	+	+	+

	prueba					
Saponinas	ND	ND	ND	+	+	+
Esteroles	-	-	-	-	+	-
Triterpenos	+	-	+	+	-	+
Polifenoles	ND	ND	ND	+	+	+
Taninos	ND	ND	ND	+	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-	-
Glicósidos	-	-	-	-	-	-
Cianogénicos						
Glicósidos cardiotónicos	-	-	-	-	-	-

+: Presencia -: Ausencia ND: No detectado

EMF: Extracto metanólico de los frutos

EHF: Extracto hexánico de los frutos

EMH: Extracto metanólico de las hojas

EHH: Extracto hexánico de las hojas

EMT: Extracto metanólico del tallo

EHT: Extracto hexánico del tallo

Pruebas de actividad biológica

En la tabla 5, se observa que los diferentes extractos metanólicos mostraron actividad antibacteriana frente los microorganismos *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis*. Todos los microorganismos mostraron resistencia a los extractos hexánicos.

Tabla 5. Actividad antibacteriana de los extractos, expresada en mm de diámetro del halo de inhibición.

Microorganismos	EHF	EHH	EHT	EMF	EMH	EMT
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-	14	10	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	14	14	13
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	-	-

<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	10	11	13
-------------------------------	---	---	---	----	----	----

EMF: Extracto metanólico de los frutos

EHF: Extracto hexánico de los frutos

EMH: Extracto metanólico de las hojas

EHH: Extracto hexánico de las hojas

EMT: Extracto metanólico del tallo

EHT: Extracto hexánico del tallo

Actividad antifúngica

En la tabla 6, se observa la sensibilidad del hongo *Aspergillus niger* frente a los diferentes extractos y el efecto de los extractos metanólicos sobre *Penicilium* sp. Sólo el EMT mostró actividad inhibitoria contra la *Candida albicans*.

Tabla 6. Actividad antifúngica de los extractos, expresados en mm de diámetro de inhibición.

Cepas Fúngicas	EHF	EHH	EHT	EMF	EMH	EMT
<i>Candida</i> sp.	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	7
<i>Aspergillus Níger</i>	15	12	14	37	25	35
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-	-	-
<i>Penicilium</i> sp.	-	-	-	33	20	50

EMF: Extracto metanólico de los frutos

EHF: Extracto hexánico de los frutos

EMH: Extracto metanólico de las hojas

EHH: Extracto hexánico de las hojas

EMT: Extracto metanólico del tallo

EHT: Extracto hexánico del tallo

Actividad tóxica

Cuando se realizó la prueba de *Artemia salina* se hizo con el objetivo de determinar cuan tóxicos son los extractos que se están estudiando, para esto se utilizó la metodología propuesta por Meyer y colaboradores, 1982 (17), en la cual valores de CL₅₀ iguales o inferiores a 30 mg/ml se consideran como soluciones interesantes

Se observan, en la tabla 7, los resultados del bioensayo de *Artemia salina* practicado a los extractos, a partir de los cuales se calcularon sus respectivos CL₅₀.

Tabla 7. Toxicidad de los extractos frente a *Artemia salina*.

Extractos	Número de nauplios muertos en 24 horas					
	1000 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	0,1 µg/ml	0,01 ug/ml
EMF	32	32	0	0	0	0
EMH	35	8	2	0	0	0
EMT	30	5	0	0	0	0
EHF	0	0	0	0	0	0
EHH	40	40	13	2	1	3
EHT	20	0	0	0	0	0

EMF: Extracto metanólico de los frutos

EHF: Extracto hexánico de los frutos

EMH: Extracto metanólico de las hojas

EHH: Extracto hexánico de las hojas

EMT: Extracto metanólico del tallo

EHT: Extracto hexánico del tallo

Tabla 8. Valores de CL₅₀ correspondientes al bioensayo de *Artemia salina*.

Extracto	CL ₅₀	Intervalo	Método
Hexánico – Tallos	170,75x10 ¹¹	0 – ∞	Logit
Hexánico – Hojas	8,14	4,33 – 16,33	Moving Average
Hexánico – Frutos	–	–	–
Metanólico – Tallos	414,07	283,64 – 644,84	Moving Average
Metanólico – Hojas	230,70	147,39 – 373,03	Probit
Metabólico – Frutos	70,04	45,35 – 113,22	Moving Average

Es necesario explicar que esta prueba se utiliza en forma generalizada ya que existe una correlación positiva con las células cancerígenas 9KB, es decir, que si se observa una actividad contra *Artemia Salina* se espera encontrar un posible compuesto que se caracterice como tóxico o citotóxico con posible potencial anticancerígeno y/o antitumoral.

Se pudo observar que el EHT y el EHF, además del EMT y el EMH na concentración letal media muy superior al valor propuesto por Meyer para catalogar un compuesto como tóxico o citotóxico, en este caso se puede observar una toxicidad sumamente baja; sin embargo, el EMF posee una concentración de 70 mg/ml a lo que se pudiera argumentar que, aunque este valor se aleja un poco de la concentración base, la presencia de compuestos tóxicos en este extracto es muy relevante y no se puede ignorar. Quizás con una purificación de este extracto se pueda observar con mayor claridad la actividad citotóxica del extracto (o los extractos), y finalmente el EHH presenta un CL₅₀ de 8,14 mg/ml; un valor inferior a 30 mg/ml; lo que indico la gran actividad toxica del extracto frente a *Artemia Salina*, lo que revelo la presencia de un posible compuesto anticancerígeno y/o antitumoral.

CONCLUSIONES

La evaluación fitoquímica de los extractos de los diferentes órganos de la especie en estudio reveló la posible presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas, esteroides, triterpenos y polifenoles.

Los extractos metanólicos mostraron actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis*.

Todos los extractos presentaron actividad frente al hongo *Aspergillus niger*.

Candida albicans fue sensible al EMT.

Los extractos metabólicos mostraron actividad antifúngica sobre *Penicillium* sp.

El EHH mostró actividad tóxica contra *Artemia salina*.

RECOMENDACIONES

Colectar diferentes muestras de la especie vegetal, en distintas regiones y en diferentes épocas del año para comparar los resultados de los diferentes extractos.

Realizar fraccionamientos para determinar cuales son los componentes responsables de la actividad biológica y tóxica.

Incentivar programas destinados al estudio de las propiedades antitumorales de plantas típicas de nuestro país en líneas celulares que representan los procesos cancerosos de más alta incidencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Muñoz, F. 2000. *Plantas medicinales y aromáticas*, Edición Munér-Prensa. Madrid, España.
2. Brack, E. Perú. 2003. *Diez mil años de domesticación*. Editorial Bruño. Lima, Perú.
3. Torrez, H. 1998. *La diversidad biológica y su conservación en América Latina*. Ediciones ULCN. Argentina.
4. Schnee, L. 1984. *Plantas comunes de Venezuela*. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
5. De La Rúa, A. 1983. *El poder curativo de las hierbas*. Intermedio Editores S.A. Bogotá.
6. Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. *Fitoquímica orgánica*. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
7. Wills, R.; Bone, K. y Morgan, M. 2000. Herbal products and active constituents, modes of action and quality control. Nutrition Research Reviews. *Journal of the American Medical Association*, 13: 47-77.

8. Albornoz, A. 1980. *Productos naturales: sustancias y drogas extraídas de las Plantas*. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
9. Domínguez, X. 1973. *Métodos de investigación fitoquímica*. Editorial Limusa, México.
10. Lee Torres, C. 1997. *Remedios caseros en la medicina popular. El uso de las plantas medicinales en los trastornos de salud*. Editorial Kinesis, Caracas.
11. Aristigueta, L. 1973. *Familias y géneros de los árboles de Venezuela*. Facultad de Ciencias Escuela de Biología. Universidad Central de Venezuela.
12. Guevara, I. 2005. *Árboles y arbustos del ornato público de Cumaná*. Trabajo Presentado Como Requisito Parcial Para Optar a la Categoría de Profesor Asociado. Universidad de Oriente. Venezuela.
13. Davyt, D.; Dellacassa, E.; Ferreira, P.; Menéndez, P.; Moyna, P. y Vázquez, A. 1991. Phytochemical study of medicinal plants from Uruguay. *Fitoterapia*, LXII (6):519-521.
14. Luu, C. 1975. Notes on the traditional pharmacopoeia of French Guyana. *Plant Med. Phytother.*,9:125-135.
15. Bauer, A.; Kirby, W. y Sherris, J. 1966. Antibiotic susceptibility single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45:493.
16. Madubunyi, I. 1995. Antimicrobial activities of the constituents of *Garcinia kola* seeds. *International Journal of Pharmacognosy*,33: 232-237.
17. Meyer, B.; Ferrigni, N.; Putnam, J.; Jacobsen, L.; Nicols, D. y McLaughlin, J. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*,45:31-34.

18. Calvet, E. 1953. *Química general aplicada a la industria*. Salvat Editores, Barcelona.

19. Stephan, C. 1977. *Methods for Calculating an LC50*. En: American Society for Testing and Materials (ASTM) Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation, pp. 64 – 84, F. L. Mayer and J. L. Hamelink, Editors. ASTM STP 534, Philadelphia, Pennsylvania.

20. Baldizán, A.; Domínguez, C.; García, D.; Chacón, E. y Aguilar, L. Metabolitos secundarios y patrón de selección de dietas en el bosque deciduo tropical de los llanos centrales venezolanos. *Zootecnia tropical*, 24(3):213-232.

21. Medina, M. y García, D. *Zootecnia tropical*, 24 (4): 233-250.

22. Escaray, F.; Estrella, J.; Pesqueira, J.; Pieckenstain, F.; Damiani, F.; Paolucci, F. y Ruiz, O. 2007. Taninos condensados en leguminosas del género *Lotus*, 37 (1), 34-35.

Hoja de Metadatos

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

Se evaluó el efecto de los extractos hexánicos y metanólicos de la especie *Parkinsonia praecox* sobre bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos filamentosos y levaduriformes. Los extractos mostraron actividad inhibitoria de manera variada ante las bacterias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis*. Todos los extractos presentaron actividad antimicótica frente *Aspergillus niger*. El extracto metanólico de tallo presentó actividad frente a *Candida albicans* y *Penicillium* sp. A cada uno de los extractos también se le realizó el bioensayo contra el crustáceo *Artemia salina* donde el EHH presentó valores por debajo de la concentración letal media (CL₅₀), lo que indica que posiblemente posee propiedades citotóxicas o antitumorales. El análisis fitoquímico de los extractos de la especie vegetal mostraron reacción positiva ante las diferentes pruebas de alcaloides, flavonoides, triterpenos, esteroides, saponinas y polifenoles. Los resultados demuestran que esta especie vegetal puede ser una potencial fuente de compuestos químicos con una marcada actividad biológica.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail				
Crescente, Oscar	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input checked="" type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	2.740.540			
	e-mail	ocrescente@gmail.com			
	e-mail				
Campos, Isabel	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	8.309.182			
	e-mail	ycampos@sucre.udo.edu.ve			
	e-mail				
Herrera, Hernando	ROL	CA <input type="checkbox"/>	AS <input type="checkbox"/>	TU <input type="checkbox"/>	JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5.872.352			
	e-mail	Herreram40@hotmail.com			
	e-mail				
e-mail					

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2008	11	13

Lenguaje: Spa

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis_romanmarivas	.doc

Alcance:

Espacial: Sucre (Opcional)

Temporal: Temporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado

Área de Estudio:

Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso –
5/5

Derechos:

Los autores garantizamos en forma permanente a la Universidad de Oriente el derecho de aclarar y difundir, por cualquier medio, el contenido de esta tesis. Esta difusión será con fines estrictamente científicos y educativos, pudiendo cobrar la Universidad de Oriente una suma destinada a recuperar parcialmente los costos involucrados. Los autores nos reservamos los derechos de propiedad intelectual así como todos los derechos que pudieran derivarse de patentes industriales o comerciales.

DANIELA TORREALBA
AUTOR 1

AUTOR 2

AUTOR 3

AUTOR 4

OSCAR CRESCENTE
TUTOR

ISABEL CAMPOS
JURADO 1

HERNANDO HERRERA
JURADO 2

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:

