



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

EVALUACIÓN FITOQUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
EXTRACTOS DE *Coccoloba uvifera* Jacq. (POLYGONACEAE) DE LA
LOCALIDAD DE EL PEÑÓN. CUMANÁ, ESTADO SUCRE
(Modalidad: Tesis de Grado)

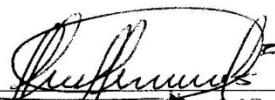
YOLIMAR DEL VALLE GÁMEZ FARÍAS

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

CUMANÁ, 2012

EVALUACIÓN FITOQUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE
EXTRACTOS DE *Coccoloba uvifera* Jacq. (POLYGONACEAE) DE LA
LOCALIDAD DE EL PEÑÓN. CUMANÁ, ESTADO SUCRE

APROBADO POR:



Prof. Hernando Herrera, MSc
Asesor



Dr. William Henriquez
Coasesor



Jurado Principal



Jurado Principal

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE FIGURAS	v
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	1
Recolección del material vegetal	10
Obtención de los extractos vegetales	11
Análisis fitoquímicos	11
Alcaloides.....	11
Saponinas	11
Flavonoides	12
Esteroles y triterpenos	12
Taninos y polifenoles	12
Pruebas de actividad biológica.....	13
Actividad antibacteriana.....	13
Actividad fototóxica.....	13
Obtención de la fracción de flavonoides de <i>Coccoloba uvifera</i> Jacq	14
El proceso de fraccionamiento se muestra en la figura 6.....	17
Caracterización de estructura de los compuestos químicos	18
Espectro de infrarrojo (IR).....	18
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	1

Análisis del porcentaje de rendimiento obtenido de los extractos hexánicos y metanólicos.	19
Análisis fitoquímico	19
Actividad biológica	21
Actividad fototóxica.....	23
Actividad antibacteriana de la fracción de flavonoides de <i>Coccoloba uvifera</i> Jacq.	26
Fraccionamiento de la fracción F ₄ enriquecida de flavonoides de <i>Coccoloba uvifera</i> Jacq.	28
Caracterización de estructura de los compuestos químicos	29
Espectroscopía infrarroja (IR).....	29
CONCLUSIONES	33
BIBLIOGRAFÍA	1
HOJA DE METADATOS	41

DEDICATORIA

A:

Nuestro señor Jesucristo por ser mi guía, luz y fuerza en cada unos de los momentos de mi vida.

Mis padres Flérida de Gámez y Gilberto Gámez por ser los pilares fundamentales en la realización de esta meta, siempre apoyándome y dándome consejos en cada paso que doy.

Mis hermanos y sobrinos por su amor, apoyo e impulso: Romer , Roberth , Rosbiannys y mi pequeño Eri, a mis dos grandes hermanas a quienes amo muchísimo Johana y Yoilmarys por siempre darme ánimos en los momentos que desmayaba, dándome seguridad y confianza.

Mis abuelos, tíos y primos quienes siempre han creído en mí y por todo el amor dado.

Mis grandes amigas (os) a quienes quiero muchísimo y compartí muy gratos momentos durante el desarrollo de mi carrera en especial Nairobis Seijas, Karla Marín, Lianesa Marcano, Juneydis Aguilera, Mayra Franco, Aurines Rodríguez, Karina Aguirre, Génesis Campos y Oscar Llovera, y a todas aquellas que no mencione gracias por su apoyo, compañía y amistad en cada uno de los momentos vividos durante mi estadía en la escuela de Bioanálisis.

AGRADECIMIENTOS

A:

Mi tutor Hernando Herrera, por su apoyo, dedicación y ayuda en cada punto a realizar de esta tesis.

El profesor Willian Henríquez, por dedicar su tiempo, compartir sus conocimientos y experiencias, los cuales me ayudaron para la culminación de este trabajo de investigación.

El Dr. Oscar Crescente, por la colaboración prestada en el Laboratorio 412.

La profesora Alina Bravo, por su invaluable ayuda.

La familia Moreno, Shaililli y la Sra Maria por su grata colaboración. De manera muy especial, a Oralys y José, por siempre apoyarme y brindarme su amistad incondicionalmente.

Todos mis compañeros del Laboratorio 412 del Departamento de Química, por la colaboración prestada cuando lo necesite.

Todos aquellos que ayudaron en el logro de esta meta, muchísimas Gracias!!!!!!

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en la evaluación de la actividad biológica de los extractos.	1
Tabla 2. Rendimiento obtenido de los extractos de los diferentes órganos de <i>Coccoloba uvifera</i>	19
Tabla 3. Análisis fitoquímico de los extractos de los diferentes órganos de la especie <i>Coccoloba uvifera</i>	20
Tabla 4. Actividad antibacteriana de los extractos de tallos y hojas en n-hexano, y metanol de <i>Coccoloba uvifera</i> Jacq.	23
Tabla 5. Actividad antibacteriana y fototóxica de los extractos metanólicos de hojas (EMH) y el extracto metanólico de tallos (EMT) de <i>Coccoloba uvifera</i> Jacq. Expresados como diámetro del halo de inhibición en mm.	24
Tabla 6. Actividad antibacteriana y fototóxica de los extractos hexánicos de hojas (EHH) y el extracto metanólico de tallos (EHT) de <i>Coccoloba uvifera</i> Jacq. Expresados como diámetro del halo de inhibición en mm.	25
Tabla 7. Fracciones obtenidas del extracto de flavonoides de <i>Coccoloba uvifera</i> Jacq mediante cromatografía de columna.	1
Tabla 8. Efecto antibacteriano de la fracción de flavonoides de <i>Coccoloba uvifera</i> Jacq.	27
Microorganismos	27
E(mm de inhibición)	27
E: fracción de flavonoides de <i>Coccoloba uvifera</i> Jacq; Nota: concentración usada (150 µg /discos).....	27
Tabla 9. Efecto antibacteriano de las fracciones derivadas de la fracción de flavonoides de <i>Coccoloba uvifera</i> Jacq. Expresadas como diámetro del halo de inhibición en mm.	28
Tabla 10. Subfracciones obtenidas de la fracción activa (F ₄) del extracto de flavonoides <i>Coccoloba uvifera</i> Jacq mediante cromatografía columna.	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la quercetina.....	5
Figura 2. Isoflavonas.....	6
Figura 3. Estructura de la 5,7,4'-trihidroxi-isoflavona.	7
Figura 4. Planta <i>Coccoloba uvifera</i> Jacq.....	10
Figura 5. Esquema de obtención de la fracción de flavonoides a partir del extracto metanólico de las hojas de <i>Coccoloba uvifera</i> Jacq.....	16
Figura6. Esquema del fraccionamiento por cromatografía de columna de la fracción de flavonoides de <i>Coccoloba uvifera</i> Jacq.....	17
Figura 7. Espectro de infrarrojo (IR) de la subfracción F _{4.1}	30

RESUMEN

De la especie *Coccoloba uvifera*, colectada en la localidad de el Peñón, Cumaná, estado Sucre, se obtuvo un rendimiento de los extractos metanólicos de las hojas (%) y tallos (%) superior al obtenido en hexano de hojas (%) y tallos (%). La evaluación de las diferentes familias de metabolitos secundarios presentes en estos extractos dieron positivos para alcaloides, saponinas, flavonoides y polifenoles en los extractos en metanol de hojas y tallos, mientras que para los extractos en hexano solo dieron positivo para esteroides en ambos órganos. En la evaluación de la actividad antibacteriana, el extracto en metanol de las hojas resultó ser el más eficaz que todos los otros extractos frente a las diferentes cepas ensayadas, siendo la especie *Bacillus subtilis* más sensible frente a este extracto, hubo variabilidad en los halos de inhibición con diámetros entre 8 y 22 mm, siendo el mayor (22 mm) contra *Bacillus subtilis* y el menor contra *Staphylococcus aureus* (8 mm). Probablemente este efecto ejercido por los extractos se debe a la presencia de familias de compuestos presentes en los mismos, tales como: alcaloides, saponinas, flavonoides y polifenoles reportadas previamente como potenciales agentes antibacterianos. El fraccionamiento biodirigido permitió concentrar una fracción enriquecida en flavonoides.

Palabras o Frases Claves:

INTRODUCCIÓN

El interés del hombre por conocer el uso medicinal de las plantas deviene de su relación con la naturaleza y el aprovechamiento que ha hecho de ésta en diversas circunstancias, en que la salud propia así lo ha requerido. Durante las guerras, epidemias, las grandes recesiones económicas, las luchas de independencias nacionales en todo el mundo, invasiones territoriales, por motivos religiosos y/o socio-políticos, además de la herencia ancestral de generación en generación en el uso alternativo de la fitomedicina, no pocas veces la han empleado con notable efectividad, bien para sanar, prevenir y evitar mayores complicaciones en cuanto a heridas, infecciones y virosis, entre otros; así como, para aplicaciones correctivas diversas en cicatrices y defectos fisiológicos (Lindorf *et al.*, 1985).

Durante el siglo veinte, resurgieron los estudios del uso de plantas medicinales en los medios urbanos. Ésto se debe, en parte, al incremento del precio entre las medicinas de venta en farmacias, lo que ha contribuido a que diferentes segmentos de la población, especialmente los de menores recursos, hagan uso más frecuente de las plantas como una solución alternativa para enfrentar los problemas de salud (Guaríchez *et al.*, 2007).

Estudios en plantas medicinales han demostrado que la mayoría de ellas contienen sustancias que pueden ser utilizadas para propósitos terapéuticos. Algunos de estos agentes perduran hasta nuestros días, tales como la quinina y la emetina, entre otros. En el campo de los antibióticos, los agentes antibacterianos obtenidos de plantas superiores, particularmente usados en la medicina tradicional para el tratamiento de infecciones, presentan una actividad significativa contra bacterias y hongos (Alonso, 2003).

Dado el continuo aumento de la resistencia microbiana y la preocupación creada por la falta de fármacos clínicamente útiles con nuevas formas de acción, la búsqueda de moléculas con actividad antimicrobiana que posean estructuras y/o mecanismos de acción diferentes, es de fundamental transcendencia. Los vegetales superiores se han mostrado como una rica fuente de moléculas bioactivas que han proporcionado, tanto fármacos útiles por sí mismos, como estructuras novedosas para el desarrollo de nuevos compuestos de uso terapéutico. Ésto incluye aquellos que poseen, actividad citotóxica, antiinflamatoria, analgésica, antimalárica, entre otras; es por ello que la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos antimicrobianos es, en la actualidad, un área de investigación activa (Silva *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008).

Del reino vegetal se extrae la mayor parte de los medicamentos que el hombre utiliza para aliviar o curar las dolencias que le aquejan. Si todos comprendieran la importancia de su estudio, en lo que tiene relación directa con la salud, habría más conciencia de lo fundamental de preservar sano el medio ambiente natural (Carvajal, 1990; Rodríguez, 2005).

Según Almagboul *et al.* (1985) han sido reportados numerosos estudios realizados en extractos de plantas con actividad biológica. Estos productos vegetales han demostrado tener un interesante potencial activo contra una gran variedad de microorganismos; además, en las plantas superiores, la actividad antibacteriana no es desconocida, puesto que se tiene conocimiento de diversos trabajos realizados en el área, desde hace mucho tiempo (Alonso, 2003).

Osborn (1943) comprobó la actividad de sesenta y tres géneros de plantas pertenecientes a varias familias, las cuales mostraron su capacidad de inhibir el crecimiento de las especies bacterianas *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Mori *et al.* (1987) encontraron una sustancia en *Eleagnus glabra* que presentó actividad contra *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus aureus*. Por otro lado, Silva y

Martins (2000) demostraron que la planta *Rubrus urticaefolius* tiene potente efecto bactericida contra determinadas especies, como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Martínez *et al.* (2000) observaron que el extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius raddi* era capaz de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Lapenna *et al.* (2003) demostraron que extractos obtenidos de plantas como *Mangifera indica* y *Psidium guineense* tienen una gran actividad antibacteriana.

Pérez (2007) comprobó que el extracto hexánico de *Oedogonium capillare* mostró una marcada actividad contra *Bacillus subtilis*. Por otra parte, Moreno *et al.* (2007) obtuvieron extractos hexánicos y metanólicos de las hojas de la planta *Ipomea quamoclit*, los cuales presentaron actividad antibacteriana de amplio espectro sobre las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Escherichia coli*.

Parra *et al.* (2007), en un estudio realizado en Argentina, aplicaron sobre cepas bacterianas, extractos de arbustos de uso popular, como la cáscara de la granada, la cual presentó actividad inhibitoria frente a *Shigella flexneri*; ésta podría usarse como terapia alternativa preventiva y/o terapéutica frente a daños causados por este microorganismo.

Mengoni *et al.* (2007) estudiaron la actividad antimicrobiana de extractos obtenidos a partir de hojas de *Rosemary rosmarinus officinalis* L. sobre *Pseudomonas aeruginosa*, la cual resultó ser una planta con importante actividad microbicida y una potencial fuente para reemplazar o incrementar la actividad de algunos de los antibióticos comúnmente utilizados. De igual modo, Tereschuk *et al.* (2007) hallaron que los flavonoides obtenidos de *Tagetes minuta* exhibían actividad bactericida contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

Alcalde *et al.* (2007) comprobaron la actividad farmacológica y fitoquímica de la especie *Chiliotrichum diffusum* (Asteraceae) y evidenciaron como principales constituyentes químicos, sustancias fenólicas de estructuras variables. Estas sustancias, además de ser marcadores quimiotaxonómicos, muestran distintas actividades biológicas, destacándose actividad antiinflamatoria, antihipertensiva, antiséptica y antineoplásica. La mayoría de estas especies, corresponden a la familia de plantas superiores, fanerógamas. Entre ellas la familia Polygonaceae, contiene numerosas especies que han sido utilizadas por sus propiedades medicinales y curativas. Tal es el caso de las plantas conocidas como acederilla y romaza; la primera es usada como laxante, para combatir la tos y curar “impurezas de la sangre”, mientras que la romaza es empleada como desinflamatorio, contra golpes y hematomas (Delascio, 1985).

Se sabe que la mayoría de las plantas utilizadas con fines medicinales contienen principios activos y que, paradójicamente, en muchos casos, estos 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 (Marcano y Hasegawa, 2002).

Los principios activos de las plantas pueden ser sustancias simples como (alcaloides) o bien mezclas complejas (resinas, aceites esenciales, entre otros.) Los compuestos más comunes son los azúcares, otros componentes activos de las plantas que se encuentran muy frecuentemente en los órganos que las conforman son los ácidos grasos y los ácidos orgánicos; además se pueden encontrar mucílagos, vitaminas, compuestos fenólicos y polifenólicos, entre otros (Ramírez *et al.*, 2002)

Los flavonoides son metabolitos secundarios vegetales de origen biosintético mixto, se encuentran principalmente en frutas, vegetales, granos y algunas bebidas como el vino. Los niveles de flavonoides en los alimentos procesados son alrededor de 50% menos de lo que se encuentran en los mismos alimentos frescos (Martínez *et al.*, 2002). Son sustancias de interés por las diferentes actividades farmacológicas que presentan, así, se tienen que el flavoxato presenta un efecto relajante sobre el músculo liso similar a la papaverina; la dimeflina actúa como estimulante respiratorio y la perflavona ha sido utilizada como vasodilatador coronario (De la Rúa, 1999). De particular importancia, han sido los flavonoides que integran el complejo de vitamina P conocida también como bioflavonoides, sustancias a las cuales se les ha atribuido la capacidad de disminuir la permeabilidad y la fragilidad capilar. Dentro de ellos, se puede mencionar la hesperidina, quercetina (figura 1) diosmetina, leucocianidina y la rutiniana (Winkel, 2001).

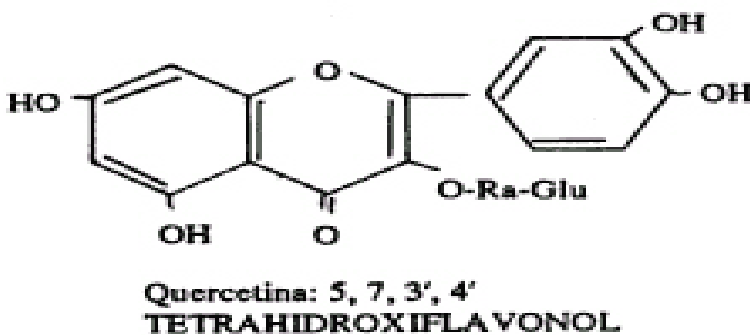


Figura 1. Estructura de la quercetina.

Dentro de los flavonoides también se encuentran las isoflavonas figuras (2 y 3), las cuales están dentro de un grupo llamado fitoestrógenos (estrógeno vegetal), el cual es el nombre genérico usado para definir compuestos que no son esteroideos (Rivero *et al.*, 2007).

Los fitoestrógenos más comunes son: lignanos, coumestanos e isoflavonas, siendo

estos últimos los más potentes y los que han despertado mayor interés de investigación. Las características comunes entre los fitoestrógenos es la presencia de un anillo fenólico, el cual les permite ligarse a los receptores de estrógeno, produciendo una actividad estrogénica débil en comparación con la del estrógeno estradiol (Rivero *et al.*, 2007).

Además, es importante mencionar que los estrógenos tienen dos efectos opuestos para el cáncer, dependiendo de la dosis; grandes dosis inhiben el desarrollo de tumores de seno, mientras que pequeñas dosis promueven el crecimiento de tumores. Estos efectos también se aplican para los fitoestrógenos o isoflavonas, es decir, las isoflavonas pueden estimular o inhibir el crecimiento de tumores (Solari, 2004).

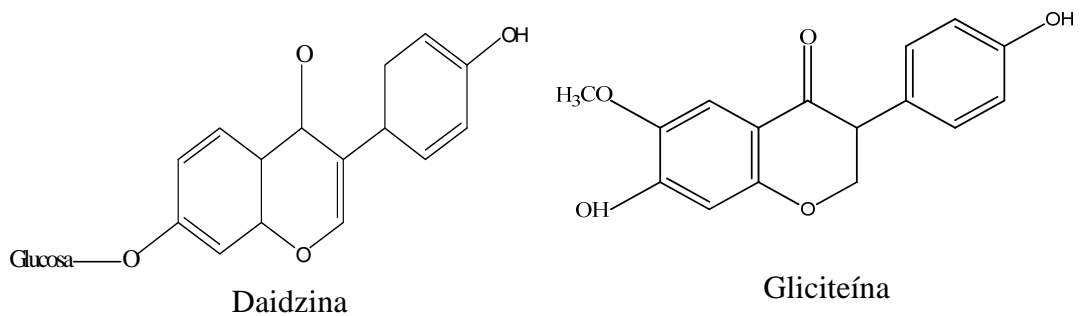


Figura 2. Isoflavonas

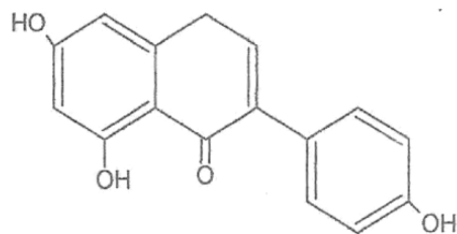


Figura 3. Estructura de la 5,7,4'-trihidroxi-isoflavona.

La separación e identificación de principios activos de origen vegetal implica un conjunto de procedimientos que involucran un fraccionamiento monitoreado por bioensayos, en los cuales se evalúa la actividad biológica que incluye antibiosis, fototoxicidad, entre otros, empleando para ellos métodos eficaces y que han sido desarrollados en los últimos años (Carpenter, 1995).

En este sentido, la antibiosis es el efecto ejercido por un antibiótico, el cual es un compuesto químico utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos; éstos se agrupan en función de su mecanismo de acción sobre el agente causante de la infección, algunos de ellos lesionan la pared de la célula; otros alternan la membrana celular, la mayor parte de ellos inhiben la síntesis de ácidos nucleicos o proteínas, los polímeros constituyentes de las células bacterianas. Algunos de los fármacos más empleados interfieren con la síntesis de peptidoglicanos, el principal componente de la pared celular (Carpenter, 1995).

Algunos fármacos antibacterianos actúan sobre el ARN mensajero, alterando su mensaje genético. Así, al realizarse el proceso de traducción del ARN defectuoso, las proteínas producidas no son funcionales (Carpenter, 1995).

En cuanto a la fototoxicidad, ésta puede definirse como el daño causado a la célula, inducido por la luz, el cual es iniciado por un compuesto fotosensibilizante. El daño fotosensibilizado a las moléculas biológicas es iniciado con la absorción de energía

luminosa por el compuesto fototóxico, pasando la molécula del estado fundamental (S_0) a un estado excitado (S_1). Este estado excitado puede sufrir varios cambios entre los cuales se destaca, la pérdida de energía por emisión de calor o luz y regreso al estado fundamental (Rabeck, 1982).

La importancia de la evaluación biológica en las investigaciones fitoquímicas radica en que el fraccionamiento de los extractos dirigidos por los bioensayos permite aislar e identificar por métodos químicos el o los compuestos, que después sirven como droga o fármaco de origen natural o como prototipo para la síntesis de sustancias terapéuticamente útiles (Liendo, 1995).

El proceso de fraccionar y separar agentes con actividad biológica de especies vegetales comienza con la extracción del material vegetal seco, con solventes de polaridad diferente (generalmente hexano y etanol), para separar los constituyentes químicos según su solubilidad en tales solventes, preparándose así los extractos crudos (Henríquez, 1995). El aislamiento de metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica de los extractos vegetales se logra mediante la combinación de técnicas cromatográficas, dentro de las cuales se destaca la cromatografía de columna, filtración en gel y bidimensional de papel (Still *et al.*, 1978; Target *et al.*, 1979).

La elucidación de las estructuras de los compuestos se logra mediante el uso de técnicas espectroscópicas convencionales, que comprende infrarrojo (IR), ultravioleta (UV), entre otras (Henríquez, 1995).

De la naturaleza cada día se obtienen innumerables sustancias, muchas de ellas de gran complejidad y con utilidades novedosas, sobre todo cuando estos usos son medicinales o farmacológicos (De la Rúa, 1999).

En la familia Polygonaceae se encuentran agrupadas las especies del género *Coccoloba*, muchas de ellas son utilizadas para combatir enfermedades y algunas de estas plantas han sido analizadas desde el punto de vista de su actividad biológica y constitución química. Las hojas secas de *Coccoloba barbadensis* son utilizadas en México para tratar enfermedades de los riñones en adultos (Zamora, 1992).

La especie *Coccoloba uvifera* Jacq. (figura 4) es una planta perteneciente a esta familia. Es un árbol oriundo de América tropical, el cual mide de seis a nueve metros de alto, tronco retorcido, posee hojas simples, fruto globoso de color morado oscuro y dispuesto en racimos; además, se produce por semillas, es apropiado para lugares cercanos al mar y sus frutos son un excelente astringente (Hoyos, 1978; Silva *et al.*, 2008). La corteza, el tronco y las raíces de *C. uvifera*, llamada también “kino de mar” y “uvero de playa”, se utilizan para curar disenterías crónicas y persistentes (Azuaje, 1986; Weaver y Anderson, 2006). Se determinó que el extracto acuoso de esta planta combate los efectos de *Mycobacterium tuberculosis* (Shiyou, 2010). De las hojas de esta especie vegetal se aislaron flavonoides (Oliveira, 2008), al igual Moreno *et al.* (2008) utilizaron semillas de *C. uvifera* Jacq, donde identificaron el ácido gálico, ácido hexenodioico como constituyente activo de las semillas de *C. uvifera* y demostraron que éstas presentaban actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium*. Dentro de la gran diversidad del reino vegetal, la especie *C. uvifera* Jacq se presenta como una excelente alternativa para descubrir posibles fuentes de sustancias naturales de gran interés en la medicina y la farmacología, lo cual pudiera contribuir al avance de estas disciplinas, así mismo como el control de diversas enfermedades que aquejan a la humanidad, evitando la propagación de patologías que pudieran causar epidemias.

Frente a esta realidad, se evaluaron las propiedades fitoquímicas y antibacterianas de extractos crudos de *Coccoloba uvifera* Jacq., contra especies bacterianas patógenas al ser humano.

METODOLOGÍA

Recolección del material vegetal

El material vegetal fue recolectado en las zonas verdes de la localidad de El Peñón, Cumaná, estado Sucre. Se obtuvo un aproximado de 2 kg de planta por muestreo. Una muestra de la planta fue llevada al Herbario Isidro Ramón Bermúdez Romero (IRBR), adscrito al Departamento de Biología del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente (UDO), donde se realizó su identificación taxonómica



Figura 4. Planta *Coccoloba uvifera* Jacq.

Obtención de los extractos vegetales

Una vez en el laboratorio, los diferentes órganos (hojas y tallo) se deshidrataron a temperatura ambiente y a la sombra; posteriormente, cada órgano se pulverizó por separado, en un molino eléctrico marca Thomas. El material resultante fue pesado y separado en dos partes, aproximadamente iguales, utilizando una balanza de platos marca Ohaus, de 610 g de capacidad, para su posterior extracción sucesiva con solventes como n-hexano y metanol, por varios días, hasta su agotamiento. Posteriormente, los solventes fueron evaporados a presión reducida en un rotaevaporador marca Büchi, modelo 461, a 35°C, obteniéndose los extractos crudos de cada órgano (Marcano y Hasegawa, 2002).

Análisis fitoquímicos

Para detectar las diferentes familias de compuestos presentes en los extractos vegetales, se llevaron a cabo pruebas químicas específicas, las cuales permitieron apreciar la presencia o ausencia de alcaloides, saponinas, flavonoides, esteroides, triterpenos, taninos y polifenoles, siguiendo la metodología convencional (Marcano y Hasegawa, 2002).

Alcaloides

El extracto crudo se evaporó hasta sequedad, se resuspendió en ácido clorhídrico (HCl) al 10%, se agitó con cloroformo y posteriormente se separó. La fase acuosa se alcalinizó con hidróxido de amonio y se extrajo nuevamente con cloroformo. Las tres fases se ensayaron con un reactivo de Dragendorff sobre placas de sílica gel para detectar alcaloides básicos, débilmente básicos o sales cuaternarias de amonio, respectivamente. En caso de ser positiva la prueba, se evidenció la presencia de alcaloides por una coloración rojiza-naranja (Marcano y Hasegawa, 2002).

Saponinas

La presencia de saponinas se puso de manifiesto por la formación de espuma

persistente, por 15 minutos, cuando se agitó vigorosamente el extracto metanólico con agua destilada (Marcano y Hasegawa, 2002).

Flavonoides

Una vez que el extracto crudo fue desgrasado con n-hexano, se llevó hasta sequedad y se trató con HCl concentrado, más virutas de magnesio. La reacción se consideró positiva al producirse una coloración roja cuando se dejó la muestra en reposo por 10-20 minutos. Otra prueba consistió en colocar una gota del extracto desgrasado, la cual se absorbió en un papel de filtro, se colocó en contacto con vapores de amoníaco, al producirse algún cambio de color se evidenció la presencia de flavonoides, por otro lado cuando se rocío el extracto crudo con una solución de cloruro de aluminio al 1% en etanol; la aparición de una mancha fluorescente bajo la luz UV fue indicativo de la presencia de flavonoides (Marcano y Hasegawa, 2002).

Esteroles y triterpenos

El extracto crudo se hidrolizó con HCl al 10%, el hidrolizado se concentró y se extrajo con cloroformo. La fase orgánica se mezcló con el reactivo de Liebermann-Burchard (1 ml de anhídrido acético y 1 ml de cloroformo a 0°C), más unas gotas de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de una coloración violeta indicó la presencia de triterpenos; en cambio una coloración verde se consideró como resultado positivo para los esteroles insaturados (Marcano y Hasegawa, 2002).

Taninos y polifenoles

Los compuestos fenólicos se detectaron al producirse una coloración parda, en presencia de una solución de cloruro de hierro (III) al 1%. Para ello, el extracto se evaporó hasta sequedad y el residuo se retomó en agua; posteriormente, se filtró y se hizo reaccionar con cloruro de hierro (III), produciéndose una coloración parda, indicativo de la presencia de fenoles. En el caso de los taninos, éstos se evidencian cuando se produce un precipitado color blanco al tratarse la solución con gelatina al

1% en cloruro de sodio (NaCl) (Marcano y Hasegawa, 2002).

Pruebas de actividad biológica

Actividad antibacteriana

Se comprobó el efecto antibacteriano de los extractos, fracciones y/o compuestos aislados de la especie vegetal en estudio, utilizando los microorganismos señalados en la tabla 1, los cuales son cepas bacterianas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés), de origen comercial.

El efecto antibacteriano de los extractos se determinó mediante la técnica de susceptibilidad antimicrobiana o método de difusión en disco, llamada antibiograma (Bauer *et al.*, 1966), la cual consistió en impregnar discos estériles de papel filtro Watman N° 3, de 5 mm de diámetro con 10 µl, de una solución del extracto o fracción a una concentración de 15 mg/ ml, lo que equivale a una dosis de 150 µg /discos. Estos discos fueron colocados en la superficie de placas de Petri, previamente servidas con agar Müller-Hinton, e inoculadas con suspensión de las cepas bacterianas a utilizar con concentración conocida (1×10^8 UFC/ml), las cuales se compararon con un patrón MacFarland. Luego, las placas se conservaron en refrigeración a 5°C por 12 horas (para permitir la difusión del extracto en el agar), y seguidamente, se incubaron a 37°C durante 24 horas (Bauer *et al.*, 1966).

Finalmente, se evidenció la acción antibiótica que producían los extractos sobre las cepas de los diferentes microorganismos, con la aparición de halos de inhibición alrededor de los discos. Los diámetros de estos halos se midieron con una regla milimetrada (Bauer *et al.*, 1966).

Actividad fototóxica

Los compuestos fototóxicos son aquellos que por acción de la luz ocasionan daños a las células del microorganismo sobre el cual se ensayan; la presencia de éstos en los

extractos vegetales se evaluó siguiendo una técnica modificada, en la que los discos de papel filtro Whatman N° 3 de 5 mm de diámetro impregnados con 10 µl de una solución del extracto o compuesto aislado fueron irradiados por intervalos de 2, 4 y 6 horas con una lámpara de inmersión de mercurio de alta presión, de 450 W, colocada 30 cm por encima de los discos. La sensibilidad del crecimiento de las cepas bacterianas, por efecto de la acción del compuesto fototóxico, se determinó mediante el método de sensibilidad antibacteriano (Luu, 1975; Tabuti *et al.*, 2003).

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en la evaluación de la actividad biológica de los extractos.

Microorganismos	Coloración de Gram*
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Positiva
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9634	Positiva
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 6538	Positiva
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9920	Positiva
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 25416	Negativa
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ATCC 23055	Negativa
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Negativa
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 25922	Negativa
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10536	Negativa

ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo; * reacción a la coloración de Gram de las diferentes cepas bacterianas.

Obtención de la fracción de flavonoides de *Coccoloba uvifera* Jacq

El extracto metanólico (15, 44 g) fue disuelto con agua destilada y tratado con acetato de plomo al 4% en agua, en proporción de (1:1); se dejó en reposo por 24 horas y después se filtró la solución, que fue concentrada por rotaevaporación. El concentrado fue extraído con acetato de etilo y cloroformo, luego fue concentrado a presión reducida tal como se muestra en la figura 5 (Harborne *et al.*, 1975).

Fraccionamiento de la fracción de flavonoides de *Coccoloba uvifera* Jacq a través de técnicas cromatográficas

El fraccionamiento de la fracción de flavonoides se realizó empleando la técnica de cromatografía de columna. En ésta se usó una columna de 60 cm de longitud y 2 cm de diámetro, usando Sephadex LH-20 como fase estacionaria. Para la fase móvil fueron usadas mezclas de solventes como cloroformo, acetato de etilo y metanol. En el desarrollo de la cromatografía de columna se lograron obtener eluatos, que fueron agrupados por cromatografía de capa fina analítica (usando como adsorbente sílica gel 60 mesh) según fuera su similitud de los desplazamientos de las bandas en cada eluato, agrupando en fracciones todas aquellas con similitud de recorrido, posteriormente las fracciones obtenidas fueron concentradas rotaevaporando a presión reducida a 37°C.

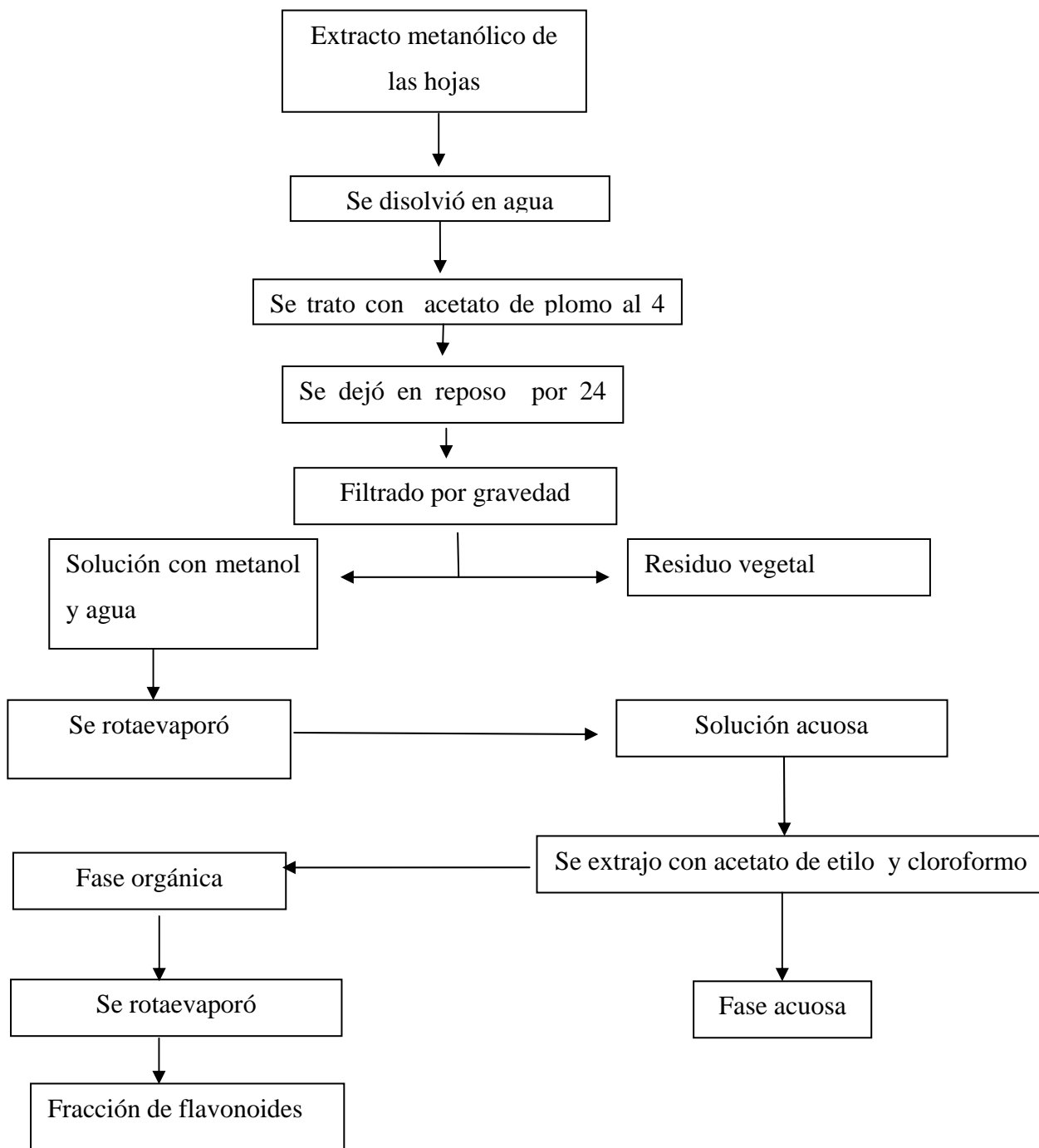


Figura 5. Esquema de obtención de la fracción de flavonoides a partir del extracto metanólico de las hojas de *Coccoloba uvifera* Jacq.

Fraccionamiento de la fracción cuatro (F₄) proveniente de la fracción de flavonoides *Coccoloba uvifera* Jacq.

Por cromatografía de columna, se realizó el fraccionamiento de la fracción F₄, en la cual se usó una columna de 15 cm de longitud y 2 cm de diámetro, usando sílica gel como fase estacionaria. Para la fase móvil fueron usadas mezclas de solventes como cloroformo y acetato de etilo. Una vez obtenidas las subfracciones de la fracción activa F₄ se procedió a purificarlas por cromatografía de columna (CC), la pureza de cada una de las subfracciones se evidenció por el desplazamiento de las bandas, para esta técnica se usaron placas de vidrio servidas con sílica gel de 60 mesh y con diferentes mezclas de solventes (cloroformo y acetato de etilo) donde se hicieron las corridas de las diferentes subfracciones.

El proceso de fraccionamiento se muestra en la figura 6.

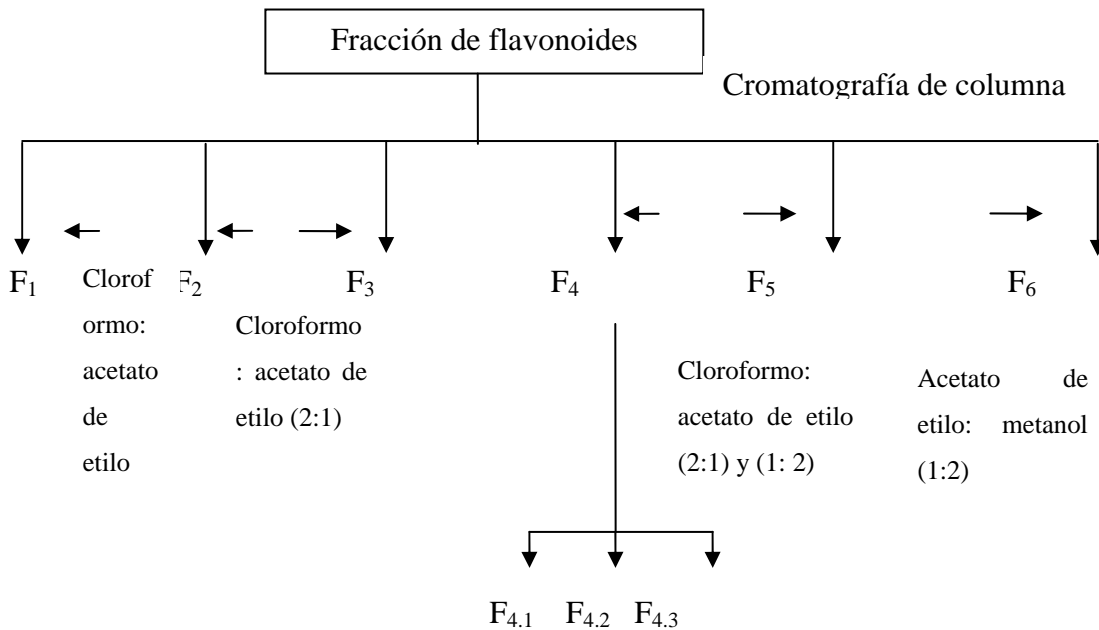


Figura6. Esquema del fraccionamiento por cromatografía de columna de la fracción de flavonoides de *Coccoloba uvifera* Jacq.

Caracterización de estructura de los compuestos químicos

Espectro de infrarrojo (IR)

Se evaluó la presencia de grupos funcionales presentes en las fracciones derivadas de la cromatografía de columna, bidimensional de papel y capa fina, empleando la técnica de espectroscopia infrarroja, la cual se realizó en pastillas de bromuro de potasio (KBr) sólido-KBr vs KBr-aire con 24 barridos, a resolución de 2 cm^{-1} , en un espectrofotómetro Perkin Elmer, modelo 16 PC. El procedimiento consistió en mezclar una pequeña cantidad del sólido perteneciente a las fracciones con KBr anhídrido, triturando luego en un mortero de ágata de forma que se homogenizó la mezcla, para así obtener unas pastillas que se compactaron en una prensa a $1,05 \times 10^9\text{ kg/m}^2$ de presión. Estos espectros se realizaron en el Instituto Venezolano de Investigaciones científicas (IVIC) (Skoog *et al.*, 2001).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

En la tabla 2, se presenta el porcentaje de rendimiento obtenido para los cuatros extractos vegetales, evidenciándose que las hojas se encontraban en mayor cantidad, debido a que constituían el órgano más abundante en la planta, seguido del tallo. 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 apolares, los cuales, se solubilizan en solventes como el hexano.

Tabla 2. Rendimiento obtenido de los extractos de los diferentes órganos de *Coccoloba uvifera*.

Órgano	Masa del órgano(g)	Extracto	Masa del extracto(g)	% Rendimiento
Hojas	610	Hexánico	4,7	0,77
		Metanólico	50,1	8,21
Tallo	321	Hexánico	2,8	0,87
		Metanólico	39,8	12,40

%; porcentaje

Análisis fitoquímico

La familia Polygonaceae, está considerada como uno de los tantos grupos de vegetales prometedores en cuanto a su potencial como fuente de principios biológicamente activos. El género *Coccoloba* ha sido objeto de varios estudios, entre los cuales destaca el realizado por Moreno (2008), en el que se reporta una variedad de constituyentes químicos tales como: flavonoides, saponinas, polifenoles y taninos,

coincidiendo con los resultados obtenidos en las evaluaciones específicas realizadas a los extractos crudos de la especie en estudio. En la tabla 3 se muestra el análisis fitoquímico realizado a los extractos de los diferentes órganos de la especie *Coccoloba*, donde se evidencia la presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas y polifenoles en los dos extractos metanólicos, mientras que los hexánicos no contienen flavonoides y, al no ser solubles en agua o alcohol, no se les pudo determinar la posible presencia de alguna familia de compuestos. Sin embargo, se observó la presencia de esteroides, debido a que los extractos hexánicos son abundantes en grasas. Los compuestos como los alcaloides, saponinas, flavonoides entre otros que están presentes en la planta son metabolitos secundarios, posiblemente los responsables de la actividad biológica del extracto que los contiene.

Tabla 3. Análisis fitoquímico de los extractos de los diferentes órganos de la especie *Coccoloba uvifera*.

Familia de compuestos	EMH	EMT	EHH	EHT
Alcaloides	+	+	-	-
Saponinas	+	+	-	-
Flavonoides	+	+	-	-
Taninos	-	-	-	-
Polifenoles	+	+	-	-
triterpenos	+	-	-	-
esteroides	+	-	+	+

+: Presencia; -: No se detectó; EMH: extracto metanólico de la hoja; EMT: extracto metanólico del tallo;

EHH: extracto hexánico de la hoja; EHT: extracto hexánico del tallo.

Los alcaloides fueron detectados en los extractos preparados de *Coccoloba uvifera*, lo cual contrasta con los análisis reportados por Moreno (2008), donde no se evidenciaron los alcaloides en hojas de *Coccoloba uvifera*, hecho que sugiere la variabilidad de los metabolitos secundarios según el hábitat en el que se encuentre la planta en el momento de estudio, o el estado fisiológico de la planta para el tiempo

del muestreo (Marcano y Hasegawa, 2002).

Actividad biológica

Una amplia variedad de vegetales son apreciados por su potencial terapéutico, atribuido al contenido de componentes químicos bioactivos (Fostes y Briggs, 2005).

En la industria farmacéutica, las plantas son la materia prima más importante para la obtención de drogas quimioterapéuticas, ya que exhiben efectos farmacológicos aplicables para el tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas y enfermedades crónico degenerativas, como diabetes y cáncer (Fostes y Briggs, 2005).

A fin de obtener principios bioactivos medicinales inocuos al ser humano y eficaces, se ha intensificado la búsqueda de fitoquímicos de origen vegetal y derivados de vegetales, considerados como alimentos funcionales que puedan ser evaluados biológicamente por medio de bioensayos (Livermore, 2004).

La búsqueda de sustancias con actividad antibacteriana en fuentes tradicionales como las plantas superiores, es tan importante porque existe la posibilidad de encontrar metabolitos con buena actividad biológica frente a bacterias resistentes a antibióticos y otras propiedades que permitan su utilización como agentes quimioterapéuticos (Livermore, 2004).

En los bioensayos antibacterianos de los extractos en n-hexano y metanol de las hojas y tallos de *Coccoloba uvifera* se evidenció que, los extractos crudos de las hojas resultaron ser más activos que los de los tallos. En la tabla 4, se muestran los resultados donde se observa que el extracto en metanol de las hojas tuvo mayor actividad biológica frente a bacterias Gram positivas como: *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y *Bacillus subtilis*, en comparación con el efecto ejercido sobre las Gram negativas como: *Pseudomona aeruginosa*. De manera similar el extracto en

metanol del tallo presentó actividad frente a diferentes cepas bacterianas, pero en menor población de bacterias puesto que inhibió solo tres especies bacterianas y el extracto en metanol de las hojas inhibió el crecimiento de siete.

Según Araujo (2008), La actividad antibacteriana ejercida por los diferentes extractos es debida probablemente a la presencia de metabolitos secundarios como: alcaloides, flavonoides, taninos, polifenoles, entre otros que actúan a nivel de adhesinas y proteínas de las paredes bacterianas.

Los terpenos son activos frente a bacterias; se cree que esta actividad antimicrobiana se deba a perturbación de la estructura de la membrana celular por su naturaleza lipofílica. Además se considera que la acción de los fenoles y polifenoles contra los microorganismos es por medio de la inhibición enzimática posiblemente por acción sobre los grupos sulfhidrilos de sus aminoácidos de cisteína o por medio de reacciones más inespecíficas con proteínas bacterianas (Araujo, 2008).

Tabla 4. Actividad antibacteriana de los extractos de tallos y hojas en n-hexano, y metanol de *Coccoloba uvifera* Jacq.

Microorganismos	Extracto (mm de inhibición)			
	A	B	C	D
<i>Escherichia coli</i>	19	0	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	8	5	0	0
<i>Salmonella thypimurium</i>	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	22	0	0	0
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	18	0	0	0
<i>Micrococcus luteus</i>	11	18	0	0
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	14	8	0	0
<i>Enterococcus faecalis.</i>	13	0	0	0

A: Extracto en metanol de las hojas; B: Extracto en metanol del tallo; C: Extracto en hexano de las hojas

D: Extracto en hexano del tallo. Nota: concentracion usada (150 µg /discos)

Actividad fototóxica.

Tanto el extracto hexánico de la hoja (EHH) como el extracto metanólico de la misma (EMH) son levemente fototóxicos y con una marcada actividad ante las cepas bacterianas indicadas en las tablas 5 y 6. El extracto metanólico del tallo (EMT) y el extracto hexánico del tallo (EHT) no presentaron fototoxicidad, pero si una leve acción frente a bacterias, como se muestran en las tablas 5 y 6. Los halos de inhibición fueron variando sus diámetros a medida que aumentaban las horas de irradiación con la luz UV, lo que indica la existencia de algún compuesto fototóxico responsable de inhibir parcial o totalmente el crecimiento bacteriano.

Los compuestos químicos cuando son irradiados por luz UV sufren cambios estructurales ocasionando que cepas bacterianas sean sensibles frente a los mismos. Además, el daño fotosensibilizado a las moléculas biológicas es iniciado con

absorción de energía luminosa por el compuesto fototóxico. Debe tenerse presente que el diámetro de las zonas de inhibición, también depende de la capacidad de difusión de las sustancias químicas y su potencia bacteriana (Kemp, 1991).

La fototoxicidad permite determinar el comportamiento de extractos en diferentes vegetales cuando se ensayan frente a microorganismos, donde el compuesto fototóxico reacciona directamente con el sustrato biológico, en todo el proceso ocurren cambios energéticos, rearrreglo de átomos y enlaces dentro de las moléculas (Kemp, 1991).

Tabla 5. Actividad antibacteriana y fototóxica de los extractos metanólicos de hojas (EMH) y el extracto metanólico de tallos (EMT) de *Coccoloba uvifera* Jacq. Expresados como diámetro del halo de inhibición en mm.

Extractos	Microorganismos	Tiempo de irradiación (horas)			
		0	2	4	6
EMH	<i>Bacillus subtilis</i>	13	17	15	16
	<i>Escherichia coli</i>	20	15	12	14
	<i>Staphylococcus aureus</i>	12	15	20	20
EMT	<i>Bacillus subtilis</i>	19	SC	SC	SC
	<i>Escherichia coli</i>	15	SC	SC	SC
	<i>Staphylococcus aureus</i>	16	SC	SC	SC

SC: Sin cambio; Nota: concentración usada (150 µg /discos).

Tabla 6. Actividad antibacteriana y fototóxica de los extractos hexánicos de hojas (EHH) y el extracto metanólico de tallos (EHT) de *Coccoloba uvifera* Jacq. Expresados como diámetro del halo de inhibición en mm.

Extractos	Microorganismos	Tiempo de irradiación (horas)			
		0	2	4	6
EHH	<i>Bacillus subtilis</i>	0	5	15	16
	<i>Escherichia coli</i>	0	10	12	14
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0	17	18	18
EHT	<i>Bacillus subtilis</i>	8	SC	SC	SC
	<i>Escherichia coli</i>	10	SC	SC	SC
	<i>Staphylococcus aureus</i>	12	SC	SC	SC

SC: Sin cambio; Nota: concentración usada (150 µg /discos).

Cabe destacar que el EMH tuvo actividad fototóxica y fue eficaz frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, lo que sugiere que este extracto pudiera compararse con antibióticos de “amplio espectro”, obteniéndose de éste, metabolitos de importancia, como son los flavonoides, a los cuales se les realizó una serie de pruebas biológicas.

Fraccionamiento de la fracción de flavonoides de *Coccoloba uvifera* Jacq a través de técnicas cromatográficas

Del fraccionamiento de la fracción de flavonoides de *Coccoloba uvifera* sobre Sephadex LH-20, empleando solventes de diferentes polaridad (ver tabla 7) se obtuvieron una serie de eluatos que fueron agrupados por su similitud de los valores de R_f en fracciones.

En la tabla 7, se presentan el número de fracciones con sus respectivas masas y el solvente en el cual eluyeron; la fracción F₄ (118 mg) fue la que presentó mayor masa, mientras que la fracción F₅ (21 mg) la de menor masa.

Actividad antibacteriana de la fracción de flavonoides de *Coccoloba uvifera* Jacq.

Estudios realizados con compuestos polifenólicos y especialmente los flavonoides, demuestran su capacidad antioxidante y su significativa contribución en la dieta, así como su efecto en la prevención de diversas enfermedades, como: cardiovasculares, cancerígenas, bacterianas y neurológicas (Kuskoski, 2002). La prueba antibacteriana fue un pilar fundamental a la hora de decidir la orientación en el desarrollo y desempeño del fraccionamiento, por tal motivo se aplicó la técnica propuesta por Harborne para flavonoides al extracto metanólico de las hojas de *Coccoloba uvifera* Jacq, y sobre la base de los resultados obtenidos en las pruebas fitoquímicas.

A la fracción obtenida de las hojas de *Coccoloba uvifera* Jacq (fracción en cloroformo de flavonoides, E), se le realizó un análisis bacteriano, dando como resultado un extracto capaz de inhibir cepas bacterianas usadas en este bioensayo y además los halos de inhibición variaron desde 11 mm hasta 18 mm de diámetro, siendo la cepa bacteriana *Escherichia coli* la de mayor sensibilidad seguido de la de *Bacillus subtilis*, las demás cepas resultaron resistentes, lo cual se aprecia en la tabla 8.

El aumento de microorganismos resistentes a los agentes antimicrobianos es el principal problema al que se enfrenta la ciencia médica en el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas (Barrera *et al.*, 2003; Ávila *et al.*, 2006). Esta problemática tiene mayor incidencia en alteraciones orgánicas como tuberculosis, malaria, cólera, neumonías que en conjunto constituyen la causa de muerte de más de 10 millones de individuos a nivel mundial (Ritchie *et al.*, 2001).

La actividad de las fracciones o subfracciones (150 µg /discos) frente a las bacterias se realizó usando la técnica de difusión en agar antes descrita. En la tabla 9, se puede apreciar que la fracción 4 (F₄) presentó actividad antibacteriana *in vitro* frente a:

Escherichia coli, *Enterobacter cloacae*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* mostrando halos de inhibición de 19, 10, 8, 18, 6 mm, respectivamente, lo que demuestra que esta fracción es la más activa frente a las bacterias ensayadas.

Tabla 7. Fracciones obtenidas del extracto de flavonoides de *Coccoloba uvifera* Jacq mediante cromatografía de columna.

Fracción	N° de eluatos	Masa (mg)	Solventes	Proporción (v/v)
F ₁	1-7	88	Cloroformo: acetato de etilo	(2:1)
F ₂	8-12	66	Cloroformo: acetato de etilo	(2:1)
F ₃	13-14	54	Cloroformo: acetato de etilo	(2:1)
F ₄	15-21	118	Cloroformo: acetato de etilo	(2:1)
F ₅	22-32	21	Cloroformo: acetato de etilo	(1:2)
F ₆	33-42	73	Acetato de etilo: metanol	(1:2)

F₁-F₆: fracciones derivadas del fraccionamiento de flavonoides; v/v: proporción volumen- volumen.

Tabla 8. Efecto antibacteriano de la fracción de flavonoides de *Coccoloba uvifera* Jacq

Microorganismos	E(mm de inhibición)
<i>Escherichia coli</i>	18
<i>Staphylococcus aureus</i>	0
<i>Bacillus subtilis</i>	11
<i>Micrococcus luteus</i> .	0
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0
<i>Enterobacter cloacae</i> .	0
<i>Enterobacter faecalis</i>	0

E: fracción de flavonoides de *Coccoloba uvifera* Jacq; Nota: concentración usada (150 µg /discos)

Tabla 9. Efecto antibacteriano de las fracciones derivadas de la fracción de flavonoides de *Coccoloba uvifera* Jacq. Expresadas como diámetro del halo de inhibición en mm.

Microorganismos	Fracción(mm)					
	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅	F ₆
<i>Escherichia coli</i>	0	0	0	19	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	6	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>	0	0	0	18	0	0
<i>Micrococcus luteus</i>	0	0	0	8	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	10	0	0
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0	0	0	0	0	0

F₁- F₆: fracciones del uno al seis derivadas del fraccionamiento de la fracción de flavonoides.

Fraccionamiento de la fracción F₄ enriquecida de flavonoides de *Coccoloba uvifera* Jacq.

En la tabla 10, se muestra el fraccionamiento de la fracción F₄ por cromatografía de columna usando como fase móvil mezclas de solventes con cloroformo y acetato de etilo, los diferentes eluatos agrupados en tres subfracciones, se observa la masa (mg), el porcentaje y las diferentes proporciones volumen / volumen en las cuales fueron corridas las muestras. Además por cromatografía de capa fina se determinó que la fracción F_{4,1} fue la que presentó mayor pureza

Tabla 10. Subfracciones obtenidas de la fracción activa (F₄) del extracto de flavonoides *Coccoloba uvifera* Jacq mediante cromatografía columna.

Fracción	N° de eluatos	Masa (mg)	Solventes	Proporción (v/v)
F _{4.1}	1-5	53,1	Cloroformo	-
F _{4.2}	6-7	13,9	Cloroformo	-
F _{4.3}	7-10	4,7	Cloroformo: acetato de etilo	(3:1)

F_{4.1}-F_{4.3}: Subfracciones derivadas de la fracción activa F₄; v/v: proporción volumen- volumen.

Caracterización de estructura de los compuestos químicos

Espectroscopía infrarroja (IR)

El uso de la espectroscopía infrarroja permite asignar estructuras a las moléculas orgánicas, basada en el hecho de que cada grupo funcional muestra un conjunto característico de absorciones en el infrarrojo. El conjunto de bandas que conforman el espectro se deben a que la absorción de luz infrarroja produce aumentos en las frecuencias de “stretching” (alargamiento) y “bending” (flexión) de los enlaces entre los átomos. La frecuencia de vibración y de flexión de un enlace está determinada, principalmente por la masa de los átomos que participan en él y por la fuerza del enlace. Los enlaces que caracterizan a los grupos funcionales tienen frecuencias específicas a las cuales absorben, y bandas de absorción características en la región infrarroja del espectro (Porter, 1989).

La identificación se hace por comparación con bandas representativas de absorción ya reportadas para los grupos funcionales comunes (Fox y Whitesell, 2001).

La fracción F₄ mostró mayor actividad frente a bacterias ensayadas, por lo que se decidió evaluar para la realización de infrarrojo la subfracción derivada de la misma; para ésto se tomó en cuenta la masa de todas las subfracciones, siendo la F_{4.1} (figura 7) la fracción con mayor masa y pureza, facilitando de esta manera la lectura de las

bandas observadas en el espectro de la fracción.

El análisis de infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR) de la muestra F_{4.1} en bromuro de potasio (KBr), generó un espectro que presenta una banda con un stretching entre 3200-3700, se puede asociar al stretching teórico de los grupos hidroxilos (OH), unidos a anillos aromáticos que aparecen a una señal de 3600.

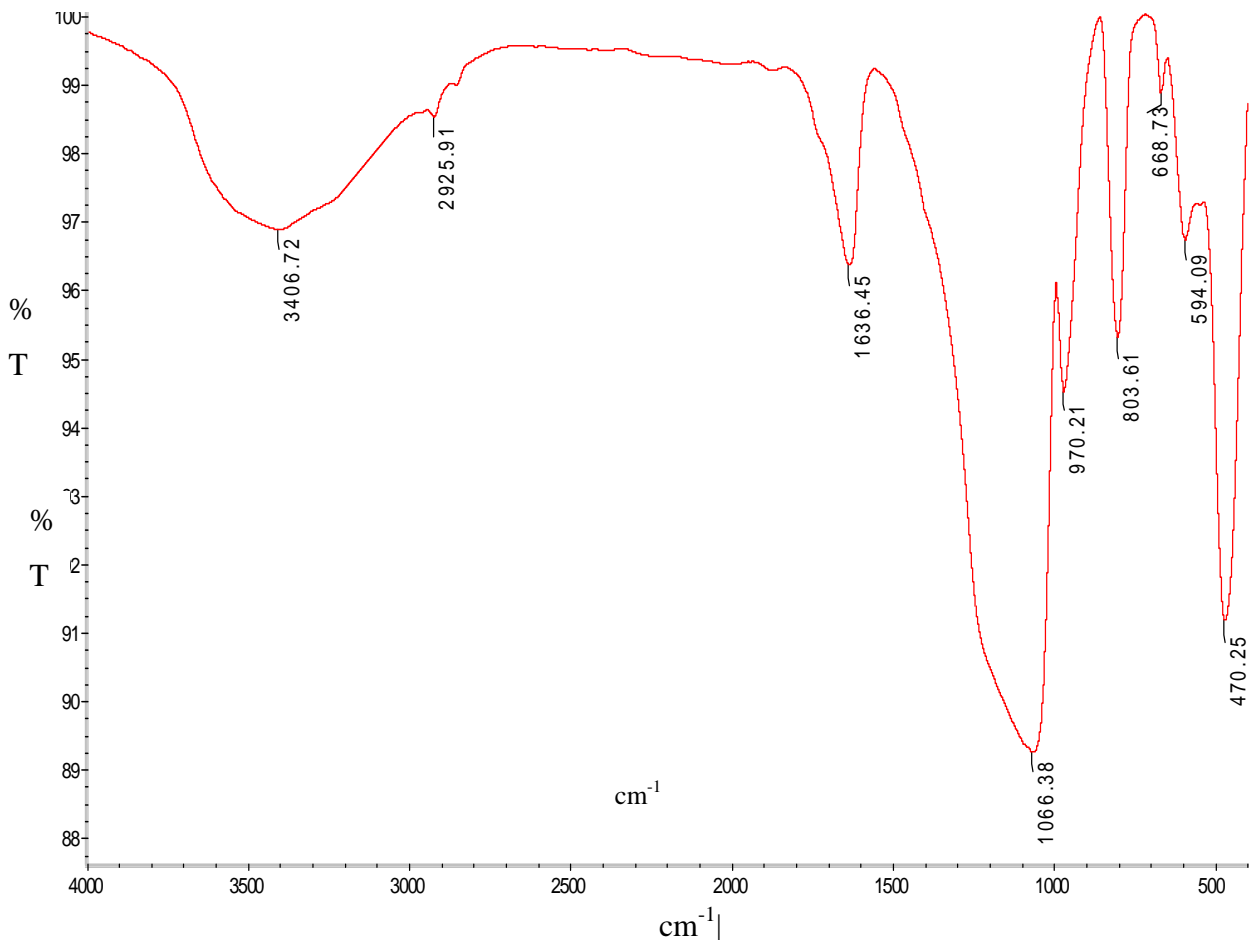


Figura 7. Espectro de infrarrojo (IR) de la subfracción F_{4.1}

Cabe destacar que en la región de 2800-2900 aparecen señales asociadas a enlaces de

átomos de carbono de hibridación sp^2 relacionadas a los enlaces C-H de anillos aromáticos. Además, se muestran señales entre 1600, correspondientes a dobles enlaces carbono carbono (C=C) presentes en compuestos flavonoicos, tal como se muestra en la figura 8; no obstante entre 1000- 1400 se denota el alargamiento de enlaces simples C-O posiblemente de los grupos hidroxilos que están como sustituyentes en el anillo de dichos compuestos. Cabe resaltar que muchos compuestos de naturaleza flavonoidea han sido reportados como metabolitos bioactivos propios de esta planta, diversos autores reportan resultados similares a los encontrados en la presente investigación. Kawasaki, *et al.* (1986) describen, en un estudio realizado en Japón, la presencia de los flavonoides foeniculina, myricetina-3-*O*-glucósido, y quercetina-3-*O*-rhamnósido, los cuales tienen una marcada actividad biológica.

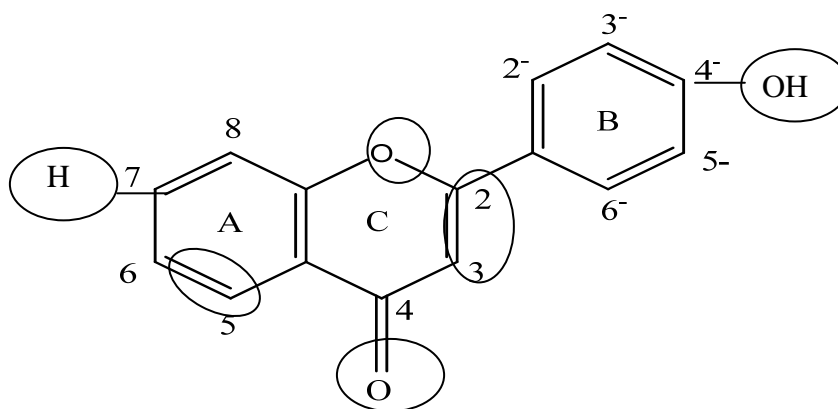


Figura 8. Estructura base de un flavonoide

De igual manera, Moreno (2008) reportó la presencia de flavonoides en la hoja y tallo del extracto metanólico de la *Coccoloba uvifera*, así como también la presencia de los ácidos gálico y hexenóidico, responsables de actividad antibacteriana. Por todo lo anteriormente expuesto, se pudiera inferir que posiblemente los flavonoides son los responsables de la actividad biológica exhibida por este extracto.

CONCLUSIONES

Coccoloba uvifera es una especie vegetal que presenta en su constitución: alcaloides, saponinas, flavonoides, polifenoles, triterpenos y esteroides.

La hoja de *C. uvifera*, posee principios activos capaces de ejercer actividad frente a bacterias Gram positivas como *Bacillus subtilis* y Gram negativas como *Escherichia coli*.

El extracto hexánico de las hojas resultó tener poca actividad frente a bacterias.

La fracción F₄ resultó ser la más activa biológicamente frente a las cepas ensayadas.

El espectro de infrarrojo realizado a la subfracción F_{4.1} demostró la presencia de grupos hidroxilos (OH), enlaces C-H y dobles enlaces carbono carbono (C=C) presentes en compuestos flavonoides, pertenecientes a las hojas de *Coccoloba uvifera*.

BIBLIOGRAFÍA

Alcalde, S.; Gorzalczany, S.; Flores, M.; Córdoba, O.; Höcht, C. y Taira, C. 2007. Evaluación farmacológica en relación al perfil fitoquímico del decocto de flores de *Chilotrimum diffusum* (G.F) K. (Asteraceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(6): 315-316.

Almagboul, A.; Bashir, A.; Farouk, A.; Karin, A y Salib, M. 1985. Antimicrobial activity of certain sudanese plants used in folkloric medicine. Screening for antibacterial activity. *Fitoterapia*, 56(6): 331-337.

Alonso, J. 2003. Bosques y selvas tropicales como fuentes de medicamentos. *Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica*, 2(2): 16-21.

Araujo, J. 2008. Actividad antimicrobiana de plantas. *Artículos Científicos*, 7: 6-12.

Ávila, L.; Baquero, E.; Viña, A. y Murilo, E. 2006. Actividad antibacteriana de *Diplostegium tolimense* Cuatrec. (Asteraceae) frente a *Staphylococcus aureus*. *Revista Científica de América Latina*, 13(1): 55-60.

Azuaje, R. 1986. *Los indígenas y sus plantas curativas*. Editorial Panapo. Caracas-Venezuela.

Barrera, F.; Forascepi, C. y Godoy, M. 2003. Antibióticos en neumonía. *Boletín del Departamento de Pediatría*, 14(2): 1-11.

Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, I. y Turk, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-

496.

Carpenter, P. 1995. *Microbiología*. Cuarta edición. Editorial Interamericana. México.

Carvajal, L. 1990. *Plantas que curan*. Editorial Panapo. Caracas – Venezuela.

De La Rúa, A. 1999. *El Poder curativo de las hierbas*. Editorial Intermedio. Bogotá –Colombia.

Delascio, F. 1985. *Algunas plantas usadas en la medicina empírica venezolana*. Dirección de Investigaciones Biológicas. Caracas.

Foster, B.; Arnason, J. y Briggs, C. 2005. Natural health products and drugs disposition. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45(1): 203-226.

Fox, M. y Whitesell, J. 2001. *Química orgánica*. Segunda edición. Editorial Pearson. Estados Unidos.

Guaríchez, L.; Alberto, M.; Nieva, M.; Zampini, I. y Isla, M. 2007. Actividad antiinflamatoria de Flavonoides naturales estructuralmente relacionados. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(6): 313-314.

Harborne, J.; Mabry, T. y Barz, W. 1975. *The flavonoids*. Editorial Springer. New York.

Henríquez, W. 1995. Compuestos con actividad biológica de *Chromolaena odorata* (L) King et Robinson. Trabajo de Pregrado. Departamento de Química, Universidad

de Oriente, Cumaná.

Hoyos, J. 1978. *Flora tropical ornamental*. Editorial Texto. Caracas – Venezuela.

Kawasaki, M.; Kanomata, T. y Yoshitma, K. 1986. Flavonoids in the leaves of twenty eight Polygonaceous. *Botanical Magazine Tokyo*, 99(1): 63-74.

Kemp, W. 1991. *Organic spectroscopy*. Editorial Mac Milan. Londres.

Kuskoski, E.; Asuero, A.; Parrilla, C.; Troncoso, A. y Fett, R. 2004. Actividad antioxidante de pigmentos antociánicos. *Ciencia de Tecnología de Alimentos*, 24(4): 10-12.

Lapenna, E.; Medina, G.; Díaz, L.; Aguillón, K. y Marín. H. 2003. Actividad bactericida y fungicida de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional Venezolana. *Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 34(1): 55-56.

Liendo, G. 1995. Actividades biológicas de algunos constituyentes químicos de *Bacharis trinervis* (Lam.) y *Choromolaena odorata*(L.) K. At R. Trabajo de Pregado. Departamento de Química, Universidad de Oriente, Cumaná.

Lindorf, H.; Parisca, L. y Rodríguez, P. 1985. *Botánica*. Tercera edición. Editorial Biblioteca de la Fundación la Salle. Caracas - Venezuela.

Livermore, D. 2004. The need for new antibiotics. *Clinical Microbiology Infection*, 10 (4): 1-9.

Luu, C. 1975. Notes on the traditional pharmacopoeia of French Guyana. *Phytotherapy*, 9: 125-135.

Marcano, D. y Hasegawa, M. 2002. *Fitoquímica orgánica*. Universidad Central de Venezuela. Caracas.

Martínez, J.; González, J. y Tuñón, M. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6):271-278.

Martínez, J.; López, M.; Morejón, Z. y Rubalcaba, Y. 2000. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius raddi* (copal). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 5(1): 23-25.

Mengoni, E.; Castañeda, N.; Centron, D.; Moreno, S.; Pivetta, O.; Cafferata, E. y Vojnov, A. 2007. Uso potencial de extractos de romero sobre aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de pacientes con fibrosis quística. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(6): 354-355.

Moreno, S. 2008. Actividad biológica y análisis químico de extractos orgánicos de *Coccoloba uvifera* J. Trabajo de Pregrado. Departamento de Química, Universidad de Oriente, Cumaná.

Moreno, S.; Crescente, O.; Henríquez, W.; Liendo, P. y Herrera, H. 2008. Three constituents with biological activity from *Coccoloba uvifera* seeds. *Ciencia*, 16(1): 84-89.

Moreno, S.; Herrera, H.; Crescente, O.; Valera, H.; Moreno, A.; Mundaray, R. y Materano, Y. 2007. Evaluación fitoquímica y actividad antibacteriana de los extractos de *Ipomea quamoclit* L. (Convolvulaceae). *Saber*, 19(2): 205-209.

Mori, A.; Chikao, N.; Nubuysae, E. y Shinkichi, T. 1987. Antibacterial activity and mode of action of plants Flavonoides against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26(8): 2231-2234.

Oliveira, P.; Dos Santos, S.; Guarda, L. y Lyra, R. 2008. Los componentes químicos de las hojas y el tallo de *Coccoloba mollis* Casaretto (Polygonaceae). *Revista Brasileira Farmacognosia*, 18(1): 12-15.

Osborn, M. 1943. On the occurrence of antibacterial substances in the green plants. *Journal of Phytopathology*, 24(1): 227-233.

Parra, V.; Gaudioso, C.; Cecilia, M. y Silva, C. 2007. Evaluación de la actividad antimicrobiana de hierbas de uso popular sobre *Shigella*. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(6): 373-374.

Pérez, R. 2007. Actividad antimicrobiana de *Odegonium capillare*. *Farmacéuticas*, 38(3): 26-29.

Porter, L. 1989. *Methods in plant biochemistry*. Editorial Press. Estados Unidos.

Rabeck, J. 1982. Experimental methods in photochemistry and photobiology. *Plant Physiology*, 71(4): 387-389.

Ramírez, V.; Palma, M. y Vega, E. 2002. Plantas medicinales. *Centro Medicinal de Información de Medicamentos*, 3(2): 1-130.

Ritchie, J.; Rabbino, H.; Puente, L. y James, J. 2001. Toward a dynamic theory of antibiotic resistance. *System Dynamics*, 4(16): 287-319.

Rivero, J.; Aguilar, A.; Martínez, J.; Martínez, M. y Serrano, H. 2007. Los fitoestrógenos y el efecto de su consumo. *Agricultura Técnica*, 3(67): 325-331.

Rodríguez, A. 2005. Fitoterapia. Bases científicas y legales para su aplicación. *Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica*, 4(4): 71-74.

Shiyou, L.; Yuan, W.; Antoun, M. y Balick, M. 2010. Screening of the flora of Puerto Rico for potential antimalarial bioactivities. *Pharmaceutical Crops*, 1(1):1-17.

Silva, A.; Oliva, M.; Vieira, M. y Fernández, G. 2008. trioccy in *Coccoloba cereifera* Schwacke (Polygonaceae), a narrow endemic and threatened tropical species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 5(51): 1003-1010.

Silva, J. y Martins, A. 2000. Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 5(1): 26-29.

Silva, P.; Bertucci, A.; Cerderia, M.; Olivaro, C.; Ramos, D. y Vásquez, A. 2007. Actividad antimicrobiana de plantas del bosque de galería del río Uruguay. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(6): 317-318.

Skoog, D.; West, D.; Holler, F. y Crouch, S. 2001. *Química analítica*. Séptima edición. Editorial McGraw- Hill. México.

Solari, M. 2004. Las isoflavonas y su función renal. *Nutrinfo*, 1(2): 3-40.

Still, W.; Kahn, M. y Mitra, A. 1978. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *Journal Organic Chemistry*,

43(14): 2923-2925.

Tabuti, J.; Lye, K. y Dhillion, S. 2003. Traditional herbal drugs of bulamogi, uganda plants, use and administration. *Journal Organic Chemistry*, 88(2): 19-44.

Target, N.; Kilcoyne , J y Green, D. 1979. Vacuum liquid chromatography an alternative to common chromatographic methods. *Journal Organic Chemistry*, 44(26): 4962-4964.

Tereschuk, M.; Quarenghi, M.; González, M. y Baigori, M. 2007. Actividad antimicrobiana de flavonoides aislados de *Tagetes minuta* del noa. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(6): 364-367.

Weaver, R. y Anderson, P. 2006. Botany section. *Tri-ology*, 5(45): 1-16.

Winkel, S. 2001. It takes a garden how work on diverse plant species has contributed to an understanding of flavonoide metabolism. *Plant Physiology*, 127(2): 1399-1404.

Zamora, M. y Pola, C. 1992. Medicinal plants used in some rural populations of Mexico. *Ethnopharmacology*, 35(3): 229-257.

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	Evaluación Fitoquímica Y Actividad Antibacteriana De Extractos De <i>Coccoloba Uvifera</i> Jacq. (POLYGONACEAE) De La Localidad De El Peñón. Cumaná, Estado Sucre
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
GÁMEZ F. YOLIMAR DEL V.	CVLAC	17.897.584
	e-mail	yoligamez1@hotmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

<i>Coccoloba uvifera</i>
Extracto en metanol de las hojas y tallos
Extracto en hexano de las hojas y tallos
Actividad antibacteriana de plantas

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

De la especie *Coccoloba uvifera*, colectada en la localidad de el Peñón, Cumaná, estado Sucre, se obtuvo un rendimiento de los extractos metanólicos de las hojas (%) y tallos (%) superior al obtenido en hexano de hojas (%) y tallos (%). La evaluación de las diferentes familias de metabolitos secundarios presentes en estos extractos dieron positivos para alcaloides, saponinas, flavonoides y polifenoles en los extractos en metanol de hojas y tallos, mientras que para los extractos en hexano solo dieron positivo para esteroides en ambos órganos. En la evaluación de la actividad antibacteriana, el extracto en metanol de las hojas resultó ser el más eficaz que todos los otros extractos frente a las diferentes cepas ensayadas, siendo la especie *Bacillus subtilis* más sensible frente a este extracto, hubo variabilidad en los halos de inhibición con diámetros entre 8 y 22 mm, siendo el mayor (22 mm) contra *Bacillus subtilis* y el menor contra *Staphylococcus aureus* (8 mm). Probablemente este efecto ejercido por los extractos se debe a la presencia de familias de compuestos presentes en los mismos, tales como: alcaloides, saponinas, flavonoides y polifenoles reportadas previamente como potenciales agentes antibacterianos. El fraccionamiento biodirigido permitió concentrar una fracción enriquecida en flavonoides

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

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Hernando Herrera Mata	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input checked="" type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	5.872.532
	e-mail	herreram40@hotmail.com
	e-mail	
	e-mail	
	e-mail	
	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/>
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año Mes Día

2012	07	13
------	----	----

Lenguaje: Spa

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis–Gamezy.doc	Aplication/MSWord

Alcance:

Espacial : Nacional (Opcional)

Temporal: Temporal (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo:

Licenciatura en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio:

Bioanálisis

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

UNIVERSIDAD DE ORIENTE

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN°0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.



Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

Cordialmente,

JUAN A. BOLANOS CUNELA
Secretario




C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/marija

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso- 6/6

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009) : “los Trabajos de Grado son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y sólo podrán ser utilizados para otros fines con el consentimiento del Consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario para su autorización”.



Gómez Lolimar
Autor



Herrera Hernando
Asesor