



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

EVALUACIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA Y
TÓXICA DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICOS Y METANÓLICOS DE
Tabebuia rosea (Bertol) A-DC.

NELLYBERT DEL VALLE AGUILERA MALAVER

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

CUMANÁ, 2008

EVALUACIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA Y
TÓXICA DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICOS Y METANÓLICOS DE
Tabebuia rosea (Bertol) A-DC.

APROBADO POR:

Prof. Oscar Crescente
Asesor

Jurado Principal

Jurado Principal

DEDICATORIA

A:

Mis Padres por que este logro es de ellos.

Mis Hermanos, que le sirva como estímulo.

Mi hijo, Rubén David.

AGRADECIMIENTOS

A

Dios, gracias a él estoy cumpliendo esta meta.

Mis padres, Nelly y Robert no se puede describir su gran ayuda y apoyo. Los amo.

Mi esposo por toda su ayuda, apoyo y motivación.

Mi suegro y mi suegra por ayudarme en todo momento.

Mi amiguita, Daniela Torrealba, por estar allí en las buenas y en las malas apoyándome sin dejarme caer y a mi amiga Fabiola por su ayuda a lo largo de la carrera.

El profesor Oscar Crescente por permitirme realizar este proyecto con él, por su asesoría.

José Gregorio Lanza, por su gran ayuda incondicional en la experimentación y en la teoría gracias estar siempre allí aclarando mis dudas y a Diamela Castillo, por su ayuda en el laboratorio y con los resultados.

Mi profesora Ivelise Guevara por aparecer en el momento cuando mas la necesitaba y brindarme mucho más que su ayuda, gracias mi Ángel.

A la profesora Mercedes Acosta

Daniel Pérez por las pequeñas grandes cosas, esas que parecen insignificantes pero son realmente importantes.

Todos los que de alguna forma me han ayudado.

MIL GRACIAS!!

ÍNDICE

	Pág.
LISTA DE TABLAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
INTRODUCCIÓN.....	1
METODOLOGÍA.....	5
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
CONCLUSIONES.....	23
RECOMENDACIONES.....	24
BIBLIOGRAFÍA.....	25

LISTA DE TABLAS

	Pág.
1. Cepas bacterianas utilizadas en la evaluación de la actividad antibacteriana.....	9
2. Cepas de hongos utilizadas para evaluar la actividad antifúngica ...	11
3. Rendimiento obtenido de los extractos de los diferentes órganos de <i>Tabebuia rosea</i> (Bertol) A-DC	15
4. Análisis fitoquímico de los extractos de los diferentes órganos vegetales.....	16
5. Efecto antibacteriano, expresado en mm de diámetro del halo de inhibición.....	18
6. Efecto antifúngico, expresado en mm de diámetro del halo de inhibición.....	19
7. Toxicidad de los extractos frente a <i>Artemia salina</i>	20
8. Valores de CL ₅₀ correspondientes al bioensayo de <i>Artemia salina</i>	21

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
1. <i>Tabebuia rosea</i> (Bertol) A-DC.....	5
2. Procedimiento empleado para determinar la actividad antibacteriana de los extractos vegetales de <i>Tabebuia rosea</i> (Bertol) A-DC	10
3. Procedimiento empleado para determinar la actividad antifúngica de los extractos vegetales de <i>Tabebuia rosea</i> (Bertol) A-DC	12
4. Esquema de la preparación de la solución esporangial fúngica.....	13
5. Esquema para la evaluación de la toxicidad frente a <i>Artemia salina</i>	14

LISTA DE ABREVIATURAS

EMF: Extracto metanólico de las flores.
EMH: Extracto metanólico de las hojas.
EMT: Extracto metanólico del tallo.
EHF: Extracto hexánico del flores.
EHH: Extracto hexánico de las hojas.
EHT: Extracto hexánico de las tallo.
CL₅₀: Concentración letal media.
AMH: Agar Müller Hinton.
APD: Agar papa dextrosa.
TA: Temperatura ambiente.
ATCC: Colección americana de cultivos tipo.
DMSO: Dimetilsulfóxido.
SSF: Solución salina fisiológica

RESUMEN

En La especie *Tabebuia rosea* (Bertol) A-DC. se han identificado varios compuestos con actividad biológica por lo que se decidió evaluar la actividad de los extractos hexánicos y metanólicos de la misma, para esto fue separada en sus diferentes órganos y se evaluó la actividad antifúngica, el efecto de dichos extractos sobre bacterias de tipo Gram positivas y Gram negativas, además, a cada extracto se le realizó el bioensayo con *Artemia salina* para estimar el grado de toxicidad de cada uno de los extractos. Una vez comprobada la actividad biológica, se realizó un análisis fitoquímico, donde los diferentes extractos de la especie vegetal mostraron reacción positiva ante las diferentes pruebas de alcaloides, flavonoides, triterpenos, esteroides, saponinas y polifenoles. Todos los extractos mostraron actividad inhibitoria, de manera variada, ante las diferentes bacterias en estudio, salvo el extracto metanólico de las flores, el cual no presentó actividad antibacteriana. En cuanto a la actividad antifúngica los diferentes extractos dieron resultados activos frente a *Aspergillus niger*, *Candida albicans* y *Penicillium* sp. El EMH arrojó un valor de concentración letal media (CL₅₀), en, cercano al valor que se considera como tóxico. Los resultados de esta investigación demuestran que *Tabebuia rosea* (Bertol) A-DC, es una potencial fuente de metabolitos secundarios con marcada actividad biológica.

INTRODUCCIÓN

Las plantas se han utilizado desde hace siglos como agentes terapéuticos. En el continente americano, los nativos, por su curiosidad innata, conocieron los productos naturales; es decir, compuestos suministrados por la naturaleza. Asimismo, supieron de muchas plantas nativas de su ambiente natural productoras de sustancias que emplearon como digestivos, febrífugos, anti-inflamatorios, sedantes, analgésicos, estimulantes, colorantes, perfumes, entre otros. Hoy en día, esta práctica terapéutica continúa vigente en nuestros pueblos y en las últimas décadas se ha intensificado la investigación científica (1).

El conocer los constituyentes químicos de las plantas que exhiben actividad biológica es deseable, no sólo para descubrir nuevos agentes terapéuticos, o justificar la acción terapéutica de una planta en particular, sino que esta información permite detectar nuevas fuentes de materiales para la síntesis de sustancias químicas útiles al hombre y a los animales. Estos constituyentes pueden ser usados directamente como fármacos o materia prima para la síntesis de medicamentos y también pueden servir como modelos para la síntesis de sustancias biológicamente activas de importancia económica (2).

El conocimiento sobre los usos de las plantas es considerado actualmente un campo abierto a las nuevas tecnologías y a los enfoques transdisciplinarios, que son necesarios para poder desentrañar los secretos encerrados en los bosques de la inexplorada geografía venezolana, para ponerlos al servicio del hombre en equilibrio con la naturaleza (3).

La fitoquímica provee herramientas importantes para resolver problemas planteados por diversas disciplinas científicas tales como la genética,

fitofisiología, ecología, taxonomía, entre otras (1). Asimismo, conduce a la identificación, a través de métodos químicos, de compuestos que la mayoría de las veces son materia prima de la fabricación de medicamentos elaborados. Entre los compuestos identificados hasta ahora están los alcaloides, flavonoides, triterpenos, esteroides, taninos, saponinas y glicósidos cianogénicos. Éstos pueden ser metabolitos secundarios de las plantas, 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 (4).

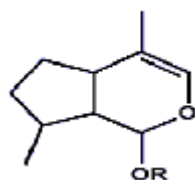
Existen alrededor de 250 000 especies vegetales, la mayor parte, ubicadas en las zonas tropicales. De esa enorme cantidad, el hombre sólo ha podido reconocer, desde el punto de vista de su actividad biológica alrededor de 3 000, esto implica que aún queda mucho por investigar (5,6).

En los últimos años, 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 variedad de microorganismos (7).

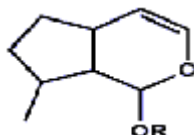
La familia Bignoniaceae está representada, predominantemente, por especies leñosas e incluye varios géneros de árboles grandes y muchos géneros medianos. La mayor importancia económica de esta familia está en la horticultura, con muchas especies cultivadas por sus flores vistosas. Esta familia es predominantemente tropical y cultivada en el norte de Sudamérica con aproximadamente 120 géneros y 650 especies. Se citan para la flora de la Guayana venezolana 38 géneros y 131 especies (8).

En el género *Tabebuia*, se han identificado varios compuestos, siendo común el lapachol, que ha sido patentado como un agente anticancerígeno por los

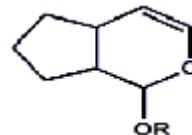
laboratorios Pfizer. En varias especies, se han encontrado naphtho y antraquinonas, y glicósidos iridoide (9).



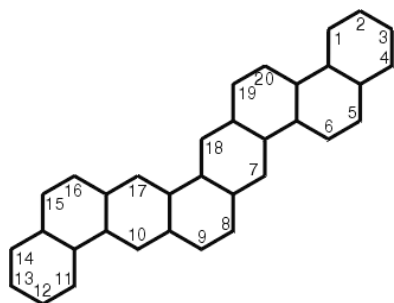
10-C-iridoide



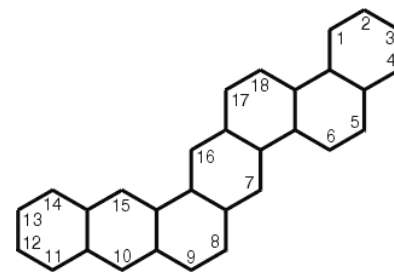
9-C-iridoide



8-C-iridoide

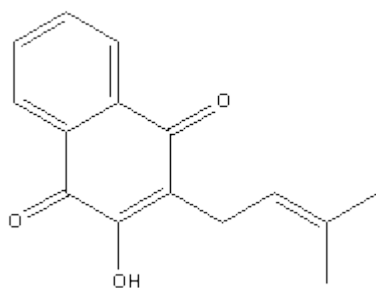


Benzo[c]nafto[2,1-m]pentafeno

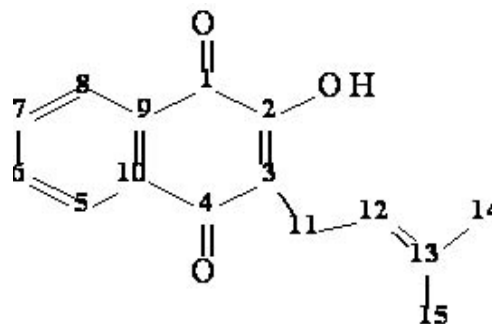


Nafto[1,2-c] pentafeno

La especie *Tabebuia rosea* ha sido bien estudiada; así, en la fracción ácida de la madera del tronco se ha aislado lapachol; de la fracción neutra se ha separado dehidrotectol, dehidro-alfa-lapachona, dehidro-iso-alfa-lapachona, sitostenona y sitosterol; de la corteza del tallo se obtuvo lapachol, lupenona y B-sitosterol; en la corteza se logró aislar un iridoide, compuesto al que se atribuyen propiedades antimaláricas (9).



lapachol



1lapachol(C₁₅H₁₄O₃)

Esta especie se describe como: árbol parcial o totalmente caducifolio, de copa más o menos extendida, hojas opuestas, pecioladas, palmaticompuestas pentafoliadas; folíolos oblongos; inflorescencias corimbosas terminales grandes, flores bisexuales, vistosas, blancas, rosadas o morado lila; sépalos unidos formando un tubo con lóbulos irregulares, persistentes en el fruto. Pétalos unidos en forma de embudo, pentalobulados. Estambres fértiles 4, didínamos, epipétalos; estaminodio 1. Fruto cápsula loculicida, semillas numerosas, aladas (10).

Entre los usos que se le ha dado a estos árboles está: maderable (11, 12), ornamental, por el vistoso colorido de sus flores (13). Con respecto a las propiedades medicinales, la infusión de hojas de esta especie es utilizada para la disentería, para acelerar el parto, reducir la diarrea y calentura y la corteza cocida sirve para contrarrestar la diabetes, paludismo, tifoidea y parasitosis (9); antiasmática, abscesos, disentería, gripe, hemorragias, hemorroides, heridas, menstruación, sarna y várices (1); asma, artritis, cataratas, sarna (14); menstruación, vómitos (15). Recientemente, en la comunidad de Campoma, ha sido reportado el uso del agua de las hojas para golpes (16). Sin embargo, está citada en la base de datos de Botanical Dermatology por causar dermatitis por contacto debido a la presencia de potentes alérgenos en la raíz, corteza del tallo y madera (10).

La gran diversidad del reino vegetal lo convierte en una excelente alternativa para descubrir posibles fuentes de sustancias naturales de interés en la medicina y en la farmacología. Frente a esta realidad, el presente estudio se realizó con el objetivo de evaluar las propiedades antibacterianas antifúngicas y tóxicas de extractos hexánicos y metanólicos de la especie *Tabebuia rosea*.

METODOLOGÍA

Muestreo del material vegetal

Las muestras de *Tabebuia rosea* (Bertol) A-DC. fueron recolectadas en los jardines de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Cumaná, estado Sucre. Se tomó una porción de la planta de aproximadamente 30 cm que contenía hojas, flores y frutos y trasladada al Herbario Isidro Ramón Bermúdez Romero (IRBR) del Departamento de Biología del Núcleo de Sucre de la Universidad de Oriente, con el fin de corroborar su identificación. Una vez verificada su identificación, el resto de la planta fue trasladada al laboratorio 412 de productos naturales, ubicado en Departamento de Química, de la Universidad de Oriente del Núcleo de Sucre, donde fue separada en sus distintos órganos (hojas, tallos y flores) los cuales se deshidrataron a temperatura ambiente y bajo la sombra.



Figura 1. *Tabebuia rosea* (Bertol) A-DC.

Obtención de los extractos hexánicos y metanólicos del material vegetal

Una vez deshidratado el material vegetal, cada órgano fue triturado 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. (17).

Análisis fitoquímico

Para detectar los diferentes metabolitos secundarios que se encontraban 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 (4,18). A continuación, se describen las pruebas realizadas, a cada uno de los extractos, para la detección de los metabolitos secundarios ya mencionados.

Alcaloides

El extracto crudo casi seco se disolvió con HCl al 10% y fue agitado con un solvente inmiscible (cloroformo) y, posteriormente, separado. La fase acuosa fue alcalinizada y extraída con un solvente inmiscible, 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 (4,19).

Saponinas

Las saponinas, glicósidos de compuestos esteroidales y triterpenoidales se manifiestan por la formación de espuma persistente, por 10 minutos o más,

cuando la muestra vegetal es agitada con agua, esta espuma, muchas veces, dificulta la extracción. Una parte del crudo total fue hidrolizada (HCl 10%), concentrada y extraída en cloroformo. Si las saponinas (agliconas de saponinas) estaban presentes, se encontraban en la fracción orgánica con otros materiales no hidrolizables (4).

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 esteroles (4,19).

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 (0,5mol/l). Una coloración azul, se consideró como un resultado positivo para esta prueba (19).

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 (4,18,19).

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 (18,19).

Antraquinonas

El crudo se extrajo con KOH (0,5mol/l), posteriormente, fue filtrado y acidificado con ácido acético y después agitado con benceno. Si la capa orgánica tomaba una coloración roja, al alcalinizarla con hidróxido de amonio, se consideró positivo para antraquinonas (4,19).

Glicósidos cianogénicos

Al material fresco macerado, se le añadieron unas gotas de cloroformo y fue calentado entre 50°C y 70°C en tubo cerrado, 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 (4).

Pruebas de la actividad biológica

La actividad biológica de cada uno de los extractos de *Tabebuia rosea* (Bertol)A-DC. , se evaluó mediante la utilización de los siguientes bioensayos:

Actividad antibacteriana

Para evaluar el efecto antibacteriano de los extractos y las distintas fracciones obtenidas se utilizaron cepas bacterianas Gram positivas y Gram negativas

(tabla 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>Escherichia coli</i>	(ATCC) 10536	Gram negativo
<i>Citrobacter freundii</i>	Laboratorio de bacteriología	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 disco, que consistió en probar la eficacia de una sustancia, posiblemente antimicrobiana, en medio de cultivo Agar Müller-Hinton, en el cual se sembró (en placas de Petri) cada una de las suspensiones de las bacterias con concentración conocida (1×10^8 UFC/ml) preparadas por comparación con un patrón comercial Mc Farland 0,5. Luego, discos de papel de filtro Whatman N° 3, de 5mm de diámetro fueron impregnados con 7 μ l del extracto obtenido para cada órgano de la planta y colocados sobre las placas sembradas. Las placas 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 medido en mm (20). (Figura 2).

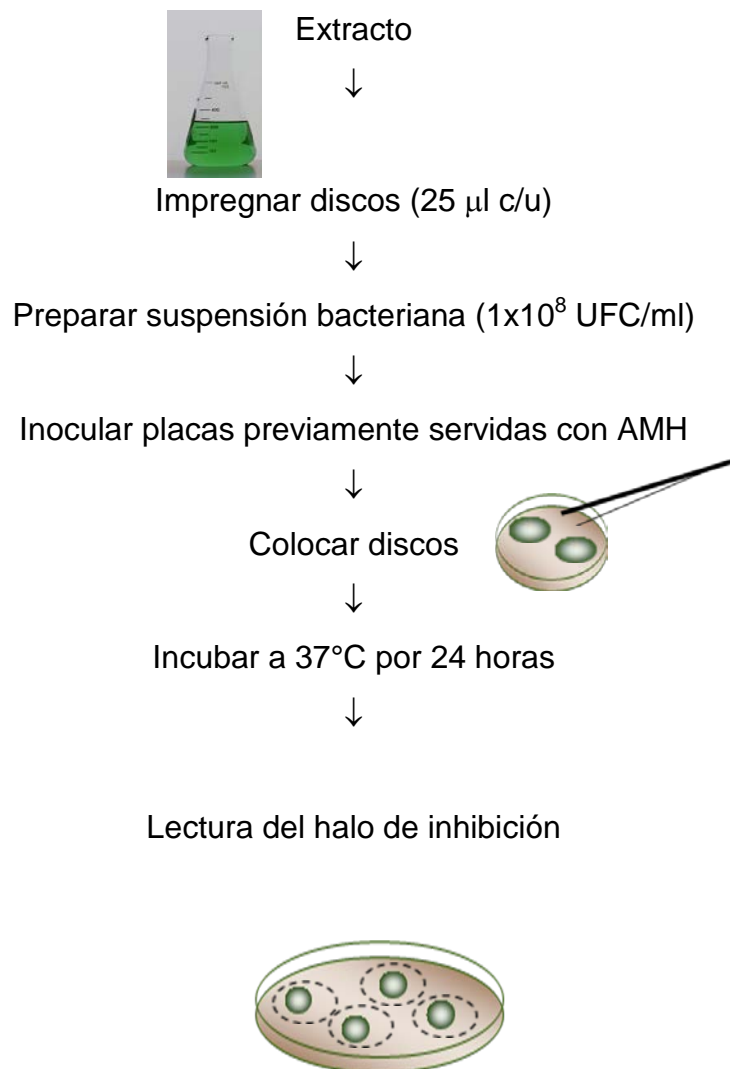


Figura 2. Procedimiento empleado para determinar la actividad antibacteriana de los extractos vegetales de *Tabebuia rosea* (Bertol) A-DC.

Actividad antimicótica

La actividad antimicótica provocada por los extractos en estudio, se evaluó sobre tres cepas de hongos fitopatógenos y una cepa patógena proporcionados por el Laboratorio de Micología del Departamento de Biología, Universidad de

Oriente, Núcleo de Sucre, más una cepa de hongo patógeno certificada (tabla 2), perteneciente a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC).

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>Penicillium</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, *Penicillium* sp) sobre tubos inclinados de Agar Papa Dextrosa (APD); transcurrido este tiempo, se añadieron 10ml de agua destilada estéril, agitando y filtrando para obtener una suspensión de esporas de cada cepa incubada. En cambio, con las levaduras (*Candida* sp) 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 10 ó 5 mm fueron impregnados con 7 µl del extracto y colocados sobre las placas inoculadas, posteriormente, 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 (20,21,22). (Figura 3).

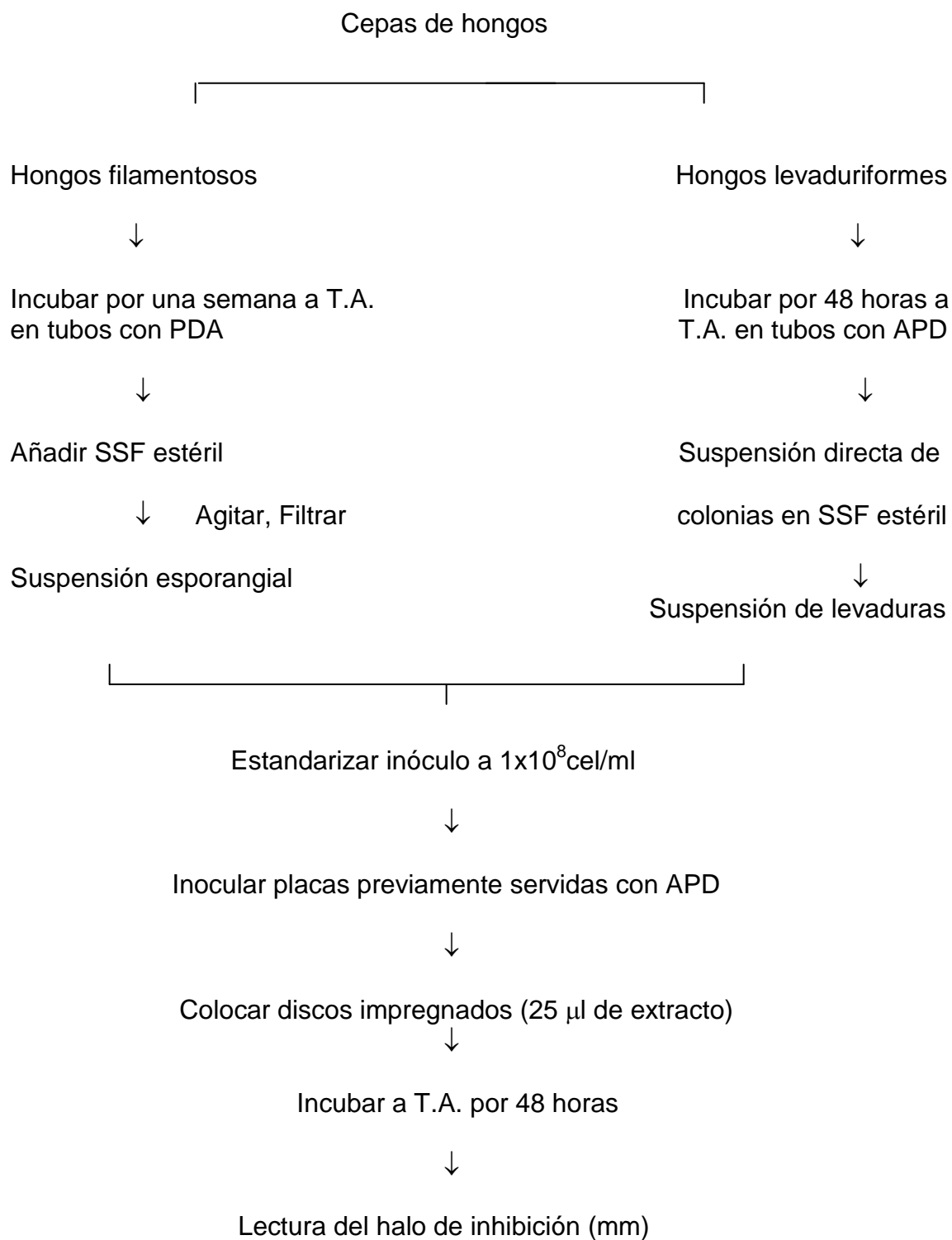


Figura 3. Procedimiento empleado para determinar la actividad antifúngica de los extractos vegetales de la especie *Tabebuia rosea* (Bertol) A-DC.

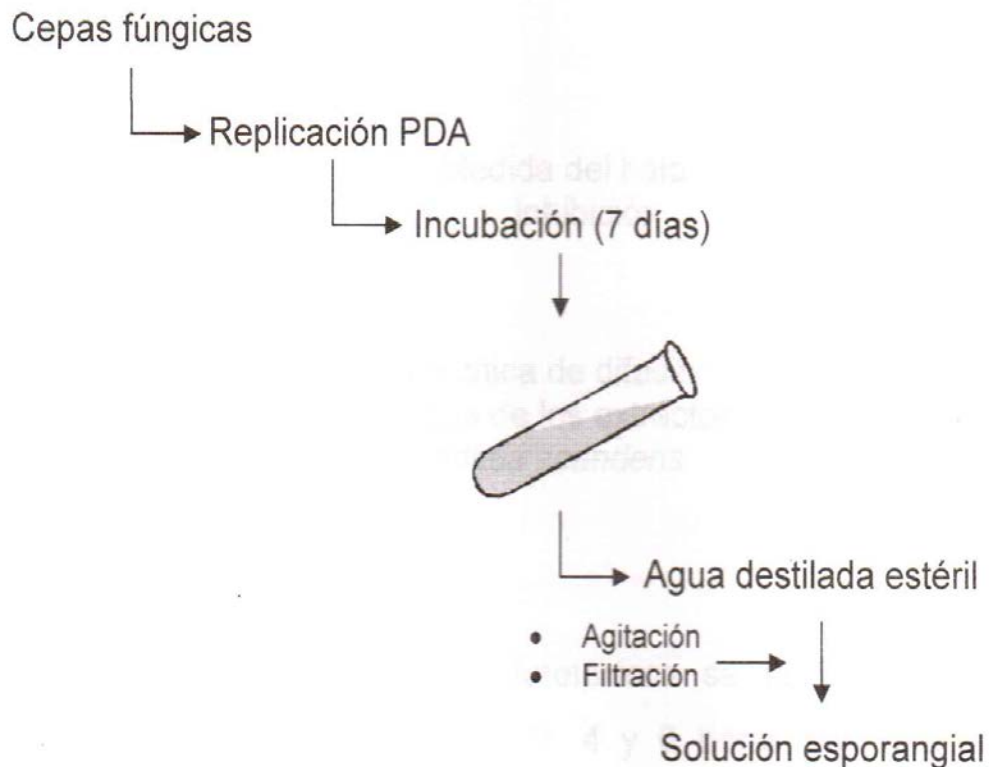


Figura 4. Esquema de la preparación de la solución esporangial fúngica.

Actividad tóxica

Para la determinación del grado de toxicidad de los extractos, se prepararon soluciones patrones a partir de 50 mg de cada extracto en 0,5 ml de un solvente apropiado como dimetilsulfóxido (DMSO) o agua, luego se agregaron 4,5 ml de agua destilada. A partir de esta solución se prepararon otras soluciones de menor concentración con agua de mar filtrada. Seguidamente, se agregaron a cada solución, 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 (CL₅₀) con la ayuda de un programa de computación estadístico (Finney.dos), con límites de confianza del 95% (23,24,25).

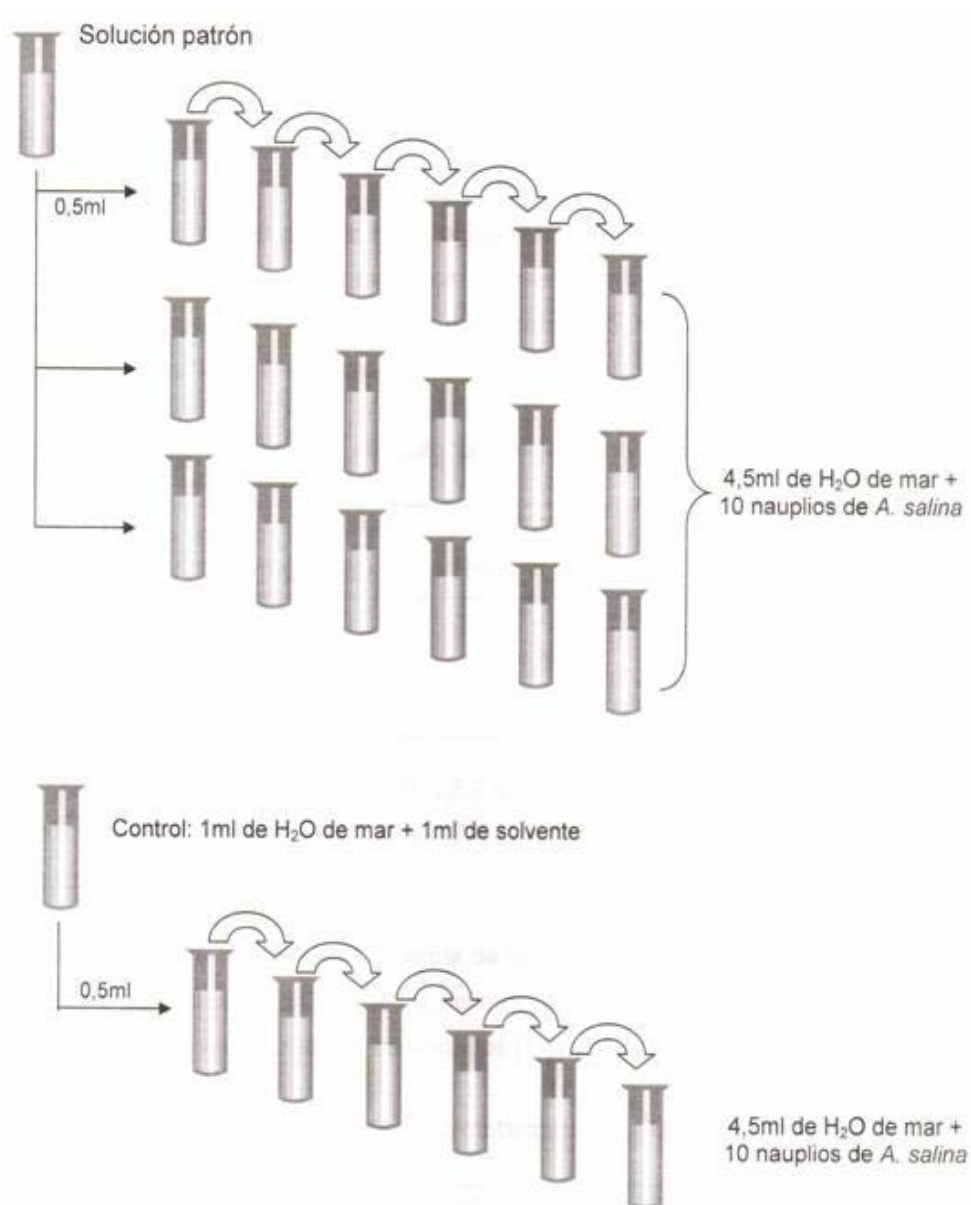


Figura 5. Esquema para la evaluación de la toxicidad frente *Artemia salina*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

Las hojas se encontraban en mayor cantidad, ya que constituían el órgano más abundante en la planta, seguido del tallo, y por último, las flores. 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. Toda esta información se encuentra resumida en la Tabla 3.

Tabla 3. Rendimiento obtenido de los extractos de los diferentes órganos de *Tabebuia rosea* (Bertol) A-DC.

Órgano	Masa del órgano (g)	Extracto	Masa del extracto(g)	% Rendimiento
Hojas	408,3	Hexánico	2,3	0,6
		Metanólico	3,8	0,9
Tallo	400,3	Hexánico	0,7	0,2
		Metanólico	6,0	1,5
Flor	90,6	Hexánico	0,7	0,8
		Metanólico	7,0	7,7

Análisis fitoquímico de los extractos vegetales

A cada uno de los extractos, tanto metanólicos como hexánicos, se le realizó el estudio fitoquímico (Tabla 4), en el cual se pudo observar resultados positivo para alcaloides, con reactivo de Dragendorff, las fases orgánicas y acuosas en EMF y la segunda fase orgánica del EHT; mientras que, con el con reactivo

de Wagner se detectó en la segunda fase orgánica de los EHT y EHH y en la fase acuosa del EMF. Los flavonoides dieron resultados positivos para todos los extractos excepto para aquellos donde la prueba no se determina. Sólo en el EHH dio resultado positivo para esteroides. Saponinas, triterpenos y polifenoles arrojaron resultados positivos para todos los extractos metanólicos ya que para los hexánicos no son detectables. Taninos, antraquinonas, glicósidos cianogénicos y glicósidos cardiotónicos indicaron resultados negativos para todos los extractos.

Tabla 4. Análisis fitoquímico de los extractos de los diferentes órganos vegetales.

Familia de compuestos	Fases	Reactivo	EMF	EMH	EMT	EHF	EHH	EHT
Alcaloides	Primera fase orgánica	Dragendorff	-	-	+	-	-	-
		Wagner	-	-	-	-	-	-
	Segunda fase orgánica	Dragendorff	-	-	+	-	-	+
		Wagner	-	-	-	+	+	-
	Fase acuosa	Dragendorff	-	-	+	-	-	-
		Wagner	+	-	-	-	-	-
Flavonoides	Primera prueba	HCl	+	+	+	ND	ND	ND
	Segunda prueba	Magnesio	+	+	+	+	+	+
Saponinas			+	+	+	ND	ND	ND
Esteroides			-	-	-	-	+	-
Triterpenos			+	+	+	-	-	-
Polifenoles			+	+	+	ND	ND	ND
Taninos			-	-	-	ND	ND	ND
Antraquinonas			-	-	-	-	-	-
Glicósidos			-	-	-	-	-	-
Cianogénicos			-	-	-	-	-	-
Glicósidos cardiotónicos			-	-	-	-	-	-

+: Presencia -: Ausencia ND: No detectado

EMF: Extracto metanólico de flores, EMH: Extracto metanólico de hojas, EHH: Extracto hexánico de flores, EMH: Extracto hexánico de hojas, EHT: Extracto hexánico del tallo. EMT: Extracto metanólico de tallo.

Cabe destacar que, aunque algunas pruebas dieron negativas para algunos metabolitos, no se puede eliminar la posibilidad de que se encuentren presentes, ya que pudo ocurrir que algunos de ellos no estuvieran en concentraciones apreciables para poder ser detectados por los reactivos utilizados.

Los resultados anteriores, concuerdan en su mayoría con los propuestos por *Payo et al.*, en el año de 1996, donde obtuvieron resultados positivos de manera variada para metabolitos como flavonoides, taninos, triterpenos, esteroides y saponinas. Estos investigadores experimentaron con dos especies de la familia Bignoniaceae (*Tabebuia cumcifolia* y *Tabebuia litoralis*), obteniéndose resultados similares en cada ensayo. Esto indica, una vez más, que esta familia es una fuente potencial de metabolitos secundarios de este tipo (26).

Estos resultados se pueden considerar aceptables, ya que coinciden con los obtenidos en varios trabajos experimentales, tal es el caso del realizado en el 2006, por *Baldizan et al.*, y estudiaron varias especies de bignoniáceas, donde determinaron la posible presencia de fenoles, saponinas y compuestos con características alcaloidales. Las especies estudiadas en este caso fueron *Tabebuia chrysantha* (flores), donde se obtuvieron resultados positivos para alcaloides y fenoles; *Tabebuia billbergii* (flores y hojas), mostrando posible presencia de saponinas, alcaloides y compuestos fenólicos. Otra bignoniácea, estudiada fue *Godmania macrocarpa* (hojas), donde detectaron nuevamente fenoles y saponinas (27).

Dominicis et al. (1995) observaron resultados positivos para saponinas (hojas y tallo) en la especie *Catalpa punctata* y resultados positivos para alcaloides (tallo) y saponinas (hojas y tallo) en *Tabebuia leptoneura*, ambas especies pertenecientes a la familia Bignoniaceae (28). *Fernández et al.* observaron resultados positivos para saponinas y alcaloides (tallo) en la especie *Tabebuia shaferi* (29).

PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA

En la Tabla 5, se observa que el extracto hexánico de las flores no mostró actividad antibacteriana y que el microorganismo *Citrobacter freundii* presentó resistencia a todos los extractos, además los EMH, EMT, EHF y EHT fueron activos frente a *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*; asimismo, el EMT también mostró actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli* y el EMT frente a *Salmonella enteritidis*. El EHH tuvo efecto antibacteriano frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis*.

Tabla 5. Efecto antibacteriano, expresada en mm de diámetro del halo de inhibición.

Microorganismos	EMF	EMH	EMT	EHF	EHH	EHT
<i>Bacillus subtilis</i>	-	7	9	7	-	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	8	8	8	7	13
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	10	9	7	8	9
<i>Escherichia coli</i>	-	-	9	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	-	-	-	-	6	7

EMF: Extracto metanólico de flores, EHF: Extracto hexánico de flores, EMH: Extracto metanólico de hojas, EHH: Extracto hexánico de hojas, EMT: Extracto metanólico de tallo, EHT: Extracto hexánico de tallo

Es bueno señalar, que generalmente las bacterias Gram negativas son más resistentes que las Gram positivas y esto se asocia a diferentes estructuras de sus membranas (30). Las bacterias Gram positivas presentan una única membrana celular con una generosa capa externa de peptidoglicano; mientras que, las bacterias gram negativas poseen una membrana plasmática interna y una membrana celular externa, entre las cuales hay una delgada capa de peptidoglicano. La permeabilidad de las membranas a los antibióticos y el

transporte de moléculas a través de las barreras son factores importantes a considerar en el caso de las bacterias gran negativas, que tienen dos membranas que obstaculizan a los agentes antimicrobianos que tienen como blanco de acción el interior de la célula (31).

Es importante considerar que en este trabajo se probó la actividad de los extractos crudos, es decir, no se fraccionó el compuesto original, por ello, los componentes se hallan menos concentrados y mezclados. Por esta razón, se presume que al fraccionar y por ende, concentrar cada componente, posiblemente su actividad sea potenciada. No obstante, al existir mezcla de componentes es probable que se presenten reacciones de sinergismo o antagonismo entre ellos.

Actividad antifúngica

En la Tabla 6, se observa la sensibilidad del hongo *Aspergillus niger* frente a los diferentes extractos y el efecto del EMT sobre la *Candida albicans* y el EHH sobre el *Penicilium* sp.

Tabla 6. Efecto antifúngico, expresados en mm de diámetro del halo de inhibición.

Cepas fúngicas	EMF	EMH	EMT	EHF	EHH	EHT
<i>Candida</i> sp.	-	-	-	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	7	-	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	15	15	14	23	19	20
<i>Fusarium</i> sp.	-	-	-	-	-	-
<i>Penicilium</i> sp.	-	-	-	-	22	-

EMF: Extracto metanólico de flores, EMH: Extracto metanólico de hojas, EMT: Extracto metanólico de tallo. EHH: Extracto hexánico de flores, EMH: Extracto hexánico de las hojas, EMT: Extracto hexánico de tallo.

La actividad antibacteriana y antifúngica presentada por *Tabebuia rosea*, se puede deber a los posibles constituyentes químicos presentes en los extractos

de esta especie. Es bueno recordar, que de las muchas especies de *Tabebuia* se han identificado y aislado compuestos con marcados efectos bactericidas, fungicidas, antisépticos, antivirales entre otros. Tal es el caso de los extractos etanólicos extraídos de *Tabebuia serratifolia* que mostraron actividad frente a *Gloeophyllum trabeum* y *Trametes versicolor*, dos hongos responsables de la pudrición de la madera. Una separación cromatográfica del extracto etanólico permitió el aislamiento de lapachol [2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona, que demostró ser el principio activo (32). El lapachol fue un compuesto químico aislado de *Tabebuia avellenedae*, el cual presenta en su mayoría todos los efectos biológicos presentados anteriormente (33).

Efecto tóxico contra *Artemia salina*

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 µg/ml
EMF	3	0	0	0	0	0
EMH	40	10	18	5	6	7
EMT	0	0	0	0	0	0
EHF	13	3	1	0	0	0
EHH	4	0	0	0	0	0
EHT	2	0	0	0	0	0

EMF: Extracto metanólico de flores, EMH: Extracto metabólico de hojas, EMT: Extracto metanólico de tallo, EHH: Extracto hexánico de las flores, EMH: Extracto hexánico de hojas, EMT: Extracto hexánico de tallo.

La prueba de *Artemia salina* tiene una correlación positiva con las células cancerígenas 9KB; es decir, de encontrar un posible compuesto que se

caracterice como citotóxico podríamos estar hablando de un posible compuesto anticancerígeno. El EMH presenta un CL_{50} de 43,58 a lo que podemos argumentar que, aunque este valor se aleja un poco de la concentración base de 30 mg/ml (23), la presencia de compuestos tóxicos es muy relevante y no podemos ignorarla. Quizás con la purificación de este extracto se pueda conseguir un posible compuesto antitumoral o anticancerígeno que podría ayudar a subsanar los problemas de salud de la sociedad actual.

Tabla 8. Valores de CL_{50} correspondientes al bioensayo de *Artemia salina*.

Extracto	Método	Intervalo	CL_{50}
Hexánico – Tallos	Logit	0 – ∞	$170,75 \times 10^{11}$
Hexánico – Hojas	Probit	4861,77 – ∞	74660,31
Hexánico – Flores	Probit	1219,87 – 62167,29	3717,16
Metanólico – Tallos	–	–	–
Metanólico – Hojas	Moving Average	26,36 – 73,90	43,58
Metanólico – Flores	Logit	0 – ∞	$226,78 \times 10^7$

Dubin *et al.* (2001) extrajeron de la madera del lapacho la B-lapachona que es una o-naftoquina y en sus estudios observaron la acción inhibitoria del crecimiento de células que producen cáncer de laringe, melanoma, cáncer de ovario, de mama, próstata, pulmón, colon adenocarcinoma y leucemia (34).

Hussain *et al.* (2007) estudiaron la actividad citotóxica del lapachol presente en la especie *Tabebuia avellenedae*, posiblemente dicho compuesto es el responsable de la actividad tóxica de la especie *Tabebuia rosea* (33). A pesar de tratarse de una prueba inespecífica, el bioensayo de *Artemia salina* constituye una herramienta que ofrece un ensayo general rápido, confiable y económico que permite seleccionar productos naturales u otras sustancias con potencial biológico, siendo así útil en el monitoreo de fraccionamientos destinados a hallar componentes activos.

Cuando se halla un componente tóxico contra *Artemia salina*, se abren varias expectativas, ya que no se trata únicamente de la posibilidad de que posea propiedades anticancerosas, que por si solo representaría un beneficio invaluable para el hombre, sino que abarcaría también una amplia gama de posibilidades en cuanto al uso que se le pueda dar a dicho compuesto, como por ejemplo ser utilizados como pesticidas y conservantes de alimentos que al ser de origen de origen natural, una vez verificada su inocuidad en humanos y establecida la dosis de uso, contribuirían a evitar la contaminación de los alimentos, suelo y aguas (23).

CONCLUSIONES

En los extractos de los diferentes órganos de *Tabebuia rosea* (Bertol) A-DC., se detectó la posible presencia de alcaloides, flavonoides, saponinas, esteroides, triterpenos y polifenoles.

El extracto metanólico de las flores no mostró actividad antibacteriana.

Salmonella enteritidis fue sensible a los extractos hexánicos de las hojas y del tallo y *Escherichia coli* fue sensible al extracto metanólico del tallo.

Aspergillus niger fue sensible a todos los extractos hexánicos y metanólicos.

Ninguno de los extractos presentó actividad frente a *Candida* sp y *Fusarium* sp.

Candida albicans fue sensible a el extracto metanólico de tallo y *Penicillium* sp fue muy sensible al extracto hexánico de hojas.

El EMH posiblemente presente propiedades tóxica contra *Artemia salina*.

RECOMENDACIONES

Realizar fraccionamientos bioguiados con la finalidad de determinar cuáles son los componentes químicos responsables de la actividad antimicrobiana y tóxica de los extractos empleados en el estudio.

Realizar otras pruebas que permitan evaluar el potencial biológico que ofrecen estos metabolitos secundarios.

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

BIBLIOGRAFÍA

1. Albornoz, A. 1980 *Productos naturales: sustancias y drogas extraídas de las plantas*. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
2. Kaplan, M. y Gottlieb, O. 1990. Busca racional de principios activos en plantas. *Interciencia*, 15(1):6-29.
3. Rodríguez, V. 1983. *Plantas de la medicina popular venezolana de venta en herbolarios*. Publicación de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales. Editorial Sucre. Caracas.
4. Marcano, D. y Hasegawa, M. 1991. *Fitoquímica orgánica*. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
5. 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.
6. De la Rúa, A. 1983. *El Poder curativo de las hierbas*. Intermedio Editores S.A. Bogotá.
7. 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.
8. Gentry (1997) Bignonaceae. En: *Flora of the Venezuelan Guayana* J.A. Steyermark P.E. Berry and B.K. Holst (Gen.eds) Volume 3: Araliaceae-Cactaceae. P.E. Berry, k. Yatskievych y B.K. Holst(Vol.eds). Missouri Botanical Garden, St. Louis.
9. Batis, A.; Alcocer, M.; Gual, M.; Sánchez, C. y Vázquez- Yanes.1999. *Árboles y arbustos nativos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación*. Instituto de Ecología. UNAM. Mexico. DF.
10. Guevara, I. 2005. *Árboles y arbustos del ornato público de Cumaná*. Trabajo Presentado Como Requisito Parcial Para Optar a la Categoría de Profesor Asociado a la Univesidad de Oriente. Venezuela.
11. Hoyos, J. 1974. *Guía de árboles de Venezuela*. Sociedad de Ciencias Naturales. La Salle. Monografía N° 32. Caracas.
12. Hoyos, J. 1978. *Flora tropical ornamental*. Sociedad de Ciencias Naturales. La Salle. Monografía N°24. ED.2. Caracas.

13. Cumana, L.; Delgado, R. y Cabeza, P. 1989. *Estudio florístico de la península de Araya*, Distrito Autónomo Sucre, Estado Sucre, Venezuela. Departamento de Biología, Herbario IRBR. , Postgrado en Biología Aplicada. Universidad de Oriente, Cumaná.
14. Medina, N. 1995. *Etnobotánica de plantas medicinales y fotoquímica de algunas especies hemostáticas y antiinflamatorias en el parque nacional Mochima, Estado Sucre*. Trabajo de Pregrado. Departamento de Biología. UDO. Cumaná.
15. Pompa, G. 1976. *Medicamentos indígenas*. Edición 43. Editorial América. España.
16. Velásquez, E. 2003. *Etnobotánica en la comunidad de Campoma, Estado Sucre, Venezuela*. Trabajo de Pregrado. Departamento de Biología. UDO. Cumaná.
17. Calvet, E. 1953. *Química general aplicada a la industria*. Salvat Editores, Barcelona.
18. Luu, C. 1975. Notes on the traditional pharmacopoeia of french Guyana. *Planta Médica Phytotherapy*, 9:125-135.
19. Domínguez, X. 1973. *Métodos de investigación fotoquímica*. Editorial Limusa, México.
20. Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J. 1966. Antibiotic susceptibility single disk method. *American Journal Of Clinical Pathology*, 45:493.
21. Koneman, E.; Allen, S.; Dowell, V.; Janda, W.; Sommer, H.; y Winn, W. 1988. *Diagnostico microbiológico*. Editorial Medica Panamericana, Buenos Aires.
22. Madubunyi, I. 1995. Antimicrobial activities of the constituents of Garcinia kola seeds. *International Journal of Clinical Phatology*, 33:323-237.
23. Meyer, B.; Ferrigni, N.; Putnam. J.; Jacobsen, L.; Nicols, D. y McLaughlin, J. 1982. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active constituents. *Planta Medica*, 45:31-34.
24. Estaba, A. 1986. *Propiedades fototóxicas y antibacteriales de algunas plantas de la Familia Asteraceae*. Trabajo de Pregrado. Departamento de Biología, UDO. Cumaná, Venezuela.

25. 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.
26. Payo, A.; Oquendo, M. y Oviedo, R. 1996. Tamizaje fotoquímico preliminar de plantas que crecen en holguín. *Revista cubana de farmacia*. Ciudad de la Habana.
27. 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.
28. Dominicis, M.; Oquendo, M.; Batista, M. y Herrera, P. 1995. Tamizaje de alcalóides y saponinas de plantas que crecen en Cuba.II. Península de Guanahacabibes. *Revista cubana de enfermería*. Ciudad de la Habana, 11(3):21-22.
29. Fernández, H.; Batista, M. y Sarduy, R. 1995. Tamizaje de alcalóides y saponinas en plantas que crecen en Cuba.III. Sierra del Rosario. *Revista cubana de enfermería*. Ciudad de la Habana, 11(3):23-24.
30. Griffin, S.; Grant, S. y Markham, J. 2001. Role of outer membrane of *Escherichia coli* AG100 and *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 and resistance/susceptibility to monoterpenes of similar chemical structure. *Journal of Essential Oil Research*, 13:380-386.
31. Koneman, E. 1999. *Diagnostico microbiológico*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. Argentina.
32. Velásquez, J.; Rojas, L. y Usubillaga, A. 2004. Actividad antifúngica de una naftoquinona obtenida de *Tabebuia serratifolia*, 12(1):64-69.
33. Hussain, H.; Kroh, K.; Uddin, V.; Abbas, G. y Green, I. 2007. *Lapachol: an overview*. V2.145.141.U.S.A.
34. Dubin, M.; Fernández, S. y Stoppani, A. 2001. Citotóxicidad de la β -lapachona: una o-naftoquina con posibles usos terapeuticos. *Medicina*, 61:343-350.

Hoja de Metadatos

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

Título	Evaluación química y actividad antibacteriana, anti fúngica y tóxica de los extractos hexánicos y metanólicos de <i>tabebuia rosea</i> (bertol) a-dc.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
	Aguilera Malaver, Nellybert del Valle	CVLAC
e-mail		nellyberta78@hotmail.com
e-mail		
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Actividad antibacteriana
extractos
Hexánicos
Metanólicos

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

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Bioanálisis

Resumen (abstract):

En La especie *Tabebuia rosea* (Bertol) A-DC. se han identificado varios compuestos con actividad biológica por lo que se decidió evaluar la actividad de los extractos hexánicos y metanólicos de la misma, para esto fue separada en sus diferentes órganos y se evaluó la actividad antifúngica, el efecto de dichos extractos sobre bacterias de tipo Gram positivas y Gram negativas, además, a cada extracto se le realizó el bioensayo con *Artemia salina* para estimar el grado de toxicidad de cada uno de los extractos. Una vez comprobada la actividad biológica, se realizó un análisis fitoquímico, donde los diferentes extractos de la especie vegetal mostraron reacción positiva ante las diferentes pruebas de alcaloides, flavonoides, triterpenos, esteroides, saponinas y polifenoles. Todos los extractos mostraron actividad inhibitoria, de manera variada, ante las diferentes bacterias en estudio, salvo el extracto metanólico de las flores, el cual no presentó actividad antibacteriana. En cuanto a la actividad antifúngica los diferentes extractos dieron resultados activos frente a *Aspergillus niger*, *Candida albicans* y *Penicillium* sp. El EMH arrojó un valor de concentración letal media (CL₅₀), en, cercano al valor que se considera como tóxico. Los resultados de esta investigación demuestran que *Tabebuia rosea* (Bertol) A-DC, es una potencial fuente de metabolitos secundarios con 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	
Martínez, Rosa	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5.871.422
	e-mail	rosamm@cantv.net
	e-mail	
Díaz, Josefa	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input checked="" type="checkbox"/>
	CVLAC	5.007.425
	e-mail	diazvv@hotmail.com
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2008	11	18

Lenguaje: Spa

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

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TesisTOTALNELLY	.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

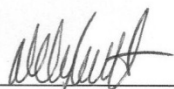
Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente (UDO). Núcleo de Sucre

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.



NELLYBERT AGUILERA
AUTOR 1

AUTOR 2

AUTOR 3

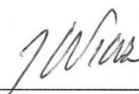
AUTOR 4



OSCAR CRESCENTE
TUTOR



ROSA MARTÍNEZ
JURADO 1



JOSEFA DÍAZ
JURADO 2

POR LA SUBCOMISIÓN DE TESIS:

