COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS ESPECIES VEGETALES *Smallanthus pyramidalis* (Arboloco) Y *Alnus acuminata* (Aliso)

MARÍA CAMILA MONTAÑEZ MOYANO

EDWARD FERNEY CASTELLANOS CÁCERES

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS.
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN.
PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN QUÍMICA.
BOGOTÁ D.C 2017

COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL Y EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS ESPECIES VEGETALES *Smallanthus pyramidalis* (Arboloco) Y *Alnus acuminata* (Aliso)

MARÍA CAMILA MONTAÑEZ MOYANO
EDWARD FERNEY CASTELLANOS CÁCERES

TRABAJO DE GRADO.

Director:
LUIS MIGUEL POMBO OSPINA
INGENIERO QUÍMICO, MSc. CIENCIAS BIOLÓGICAS-INMUNOLOGÍA
DIRECTOR DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN
FUNDACIÓN UNIVERSITARIA JUAN N. CORPAS

Codirector:
JAVIER ANDRÉS MATULEVICH PELÁEZ.
LICENCIADO EN QUÍMICA, ESPECIALISTA EN ANÁLISIS QUÍMICO INSTRUMENTAL, MSc. EN CIENCIAS BIOLÓGICAS CON ÉNFASIS EN FITOQUÍMICA, DOCENTE UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS

UNIVERSIDAD DISTRITAL FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS.
FACULTAD DE CIENCIAS Y EDUCACIÓN.
PROYECTO CURRICULAR DE LICENCIATURA EN QUÍMICA.
BOGOTÁ D.C.
2017

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de Investigación en Farmacología Vegetal y Terapéuticas Alternativas (GIFVTA) de la Fundación Universitaria Juan N. Corpas, bajo la dirección del Doctor Luis Miguel Pombo Ospina por su apoyo y disposición de los laboratorios.

A la profesora Paola Borrego Muñoz, por su incondicional apoyo, consejos, confianza y su valiosa orientación en el desarrollo de esta investigación.

Al Co- Director y profesor Javier Andrés Matulevich Peláez por su orientación y apoyo en este trabajo.

Al Grupo de Productos Naturales y Vegetales de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas por el préstamo de equipos para la determinación estructural.

A nuestras familias por su incondicional apoyo y dedicación tanto moral como económica durante nuestras vidas para hacer realidad hoy una meta propuesta de las muchas trazadas que faltan por cumplir.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN **1**

INTRODUCCIÓN **3**

JUSTIFICACIÓN **5**

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA **6**

OBJETIVOS **7**

OBJETIVO GENERAL **7**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS **7**

1. ESTADO ACTUAL DEL TEMA **8**

1.1 Generalidades de la especie *Alnus acuminata* 8

1.1.2 Origen y distribución 9

1.1.3 Usos tradicionales y Propiedades terapéuticas 10

1.1.4 Estudios químicos de *Alnus acuminata* 11

1.1.5 Actividad Biológica de *Alnus acuminata* 13

1.2. Generalidades de la especie *Smallanthus pyramidalis* 14

1.2.1 Origen y distribución 15

1.2.2 Usos tradicionales y Propiedades terapéuticas 16

1.2.3 Estudios químicos de *Smallanthus pyramidalis* 16

1.2.4 Estudios biológicos de *Smallanthus pyramidalis.* 18

1.3 Capacidad antioxidante 18

1.3.1 Ensayo del DPPH$^{\bullet}$ (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) 21

1.3.2 Ensayo ABTS$^{\bullet+}$ (ácido 2,2′-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfonico) 21

1.4 Actividad antimicrobiana 22

1.4.1 Métodos en Agar 23

1.4.2 Cepas 23

2. METODOLOGÍA **27**

2.1 Recolección y selección del material vegetal 27

2.2 Preparación de extractos y fracciones 27

2.3 Marcha Fitoquímica Preliminar (MFP) 29

2.4 Extracción y caracterización química de los aceites esenciales. 30
2.4.1 Identificación de metabolitos volátiles en el aceite esencial 31
2.5 Evaluación de la capacidad antioxidante 32
2.5.1. Ensayo de DPPH$^{\bullet}$ 32
2.5.2 Preparación de la curva de referencia 33
2.5.3 Ensayo de ABTS$^{\bullet+}$ 34
2.6 Cuantificación de fenoles 35
2.7 Análisis estadístico 35
2.8 Actividad antimicrobiana 35
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 39
3.1 Estudios químicos. 40
3.1.1 Estudios químicos de la especie *A. acuminata* (MFP y CCD). 40
3.1.2 Composición química del aceite esencial para la especie *Alnus acuminata*. 43
3.1.3 Estudios químicos de la especie *S. pyramidalis* (MFP y CCD). 43
3.1.4 Composición química del aceite esencial para la especie *S. pyramidalis*. 46
3.2 Capacidad Antioxidante 49
3.2.1 Capacidad antioxidante de la especie *A. acuminata* 50
3.2.2 Capacidad antioxidante de la especie *S. pyramidalis*. 56
3.3 CUANTIFICACION DE FENOLES 61
3.3.1 Cuantificación de fenoles para la especie *Alnus Acuminata*. 62
3.3.2 Cuantificación de fenoles para la especie *Smallanthus pyramidalis*. 63
3.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA 64
3.4.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones y el extracto etanólico de la especie *A. acuminata*. 65
3.4.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto y fracciones para la especie *Smallanthus pyramidalis*. 76
4. CONCLUSIONES 85
5. RECOMENDACIONES 87
6. BIBLIOGRAFÍA 88
7. ANEXOS 94
7.1 Ensayo de decoloración del radical DPPH$^{\bullet}$. 94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Especie vegetal *A. acuminata* (Artunduaga, 2015). 9

Figura 2. Distribución la especie vegetal *A. acuminata.* (Global Biodiversity Information, s.f.) 9

Figura 3. Distribución de *A. acuminata* en Colombia (Ospina, 2005). 10

Figura 4. Especie *S. Pyramidalis* (Nissen, 2014). 14

Figura 5. Distribución la especie vegetal *S. pyramidalis* (Global Biodiversity Information, s.f.)*los puntos amarillos indican los países en los cuales se encuentra distribuida la especie. 15

Figura 6. Distribución de *S. pyramidalis* en Colombia. 16

Figura 7. Mecanismos de reacción por transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrógeno (Orjuela, 2015). 20

Figura 8. Estructura del DPPH$^{\bullet}$ antes y después de la reacción con el antioxidante (Tovar del Rio, 2013)..... 21

Figura 9. (a) Formación del radical ABTS$^{\bullet+}$ (b) reacción del catión radical ABTS$^{\bullet+}$ con compuestos fenólicos (Re R. -Pellegrini, 1999). 22

Figura 10. Diagrama del fraccionamiento líquido-líquido para la especie *A. acuminata.* 29

Figura 11. Marcha fitoquímica preliminar para el extracto etanólico (Sanabria, 1983). 29

Figura 12. Placa CornigStar con las fracciones y extracto de la especie *A. acuminata* para la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH$^{\bullet}$. 33

Figura 13. Placa CornigStar con las fracciones y extracto de la especie *S. pyramidalis* para la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH$^{\bullet}$. 34

Figura 14. Evaluación de la capacidad antioxidante..... 34

Figura 15. Diagrama del procedimiento de la actividad antimicrobiana. 38

Figura 16. TIC del aceite esencial de la especie *S. pyramidalis* analizado por CG-EM. 46

Figura 17. Comparación del % de captación del radical DPPH$^{\bullet}$ del extracto y fracciones para la especie *A. acuminata*. 51

Figura 18. Comparación IC_{50} del extracto y fracciones para la especie *A. acuminata*, calculados por el método de decoloración del radical DPPH$^{\bullet}$. 52

Figura 19. Comparación del % de captación del extracto y fracciones de hojas de *A. acuminata*, por el método decoloración del radical $ABTS^{\bullet+}$..... 53

Figura 20. Comparación de la capacidad antioxidante del extracto y fracciones de *A. acuminata,* calculados por los ensayos $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$..... 56

Figura 21. Curva de calibración del ácido gálico 62

Figura 22. Porcentaje de inhibición del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata* frente a bacterias de tipo Gram positivas. 66

Figura 23. Halos de inhibición de la fracción de **Hex Aa** frente a los microorganismos *Bacillus subtilis (a)* y *Staphylococcus aureus* (b). 67

Figura 24. Porcentaje de inhibición del extracto y fracciones frente a bacterias de tipo Gram negativos. 70

Figura 25. Halos de inhibición del **ExEtOH Aa** (a) frente al microrganismo *Klebsiella pneumoniae* y **RHEt Aa** (b) frente a *Proteus mirabilis*. 71

Figura 26. Halos de inhibición de las fracciones **Hex Aa** (a) y **RHEt Aa** (b) frente al microorganismo *Candida albicans.* 74

Figura 27. Halos de inhibición de las fracciones **Hex Aa** (a) y **AcOEt Aa** (b) frente al microorganismo *Aspergillus brasiliensis*..... 75

Figura 28. Porcentaje de inhibición del extracto y fracciones frente a bacterias de tipo Gram positivas de la especie *S. pyramidalis*. 77

Figura 29. Halos de inhibición de las fracciones **$CHCl_3$ Sp** (a) y **Hex Sp** (b) frente a *Klebsiella pneumoniae* 79

Figura 30. Halos de inhibición de la fracción de **AcOEt Sp** (a) frente a la bacteria *Salmonella typhimurium.* 80

Figura 31. Halos de inhibición de las fracciones **Hex Sp** (a) y **AcOEt Sp** (b) frente a *P. mirabilis.* 81

Figura 32. Porcentaje de inhibición del extracto y fracciones frente a bacterias de tipo Gram positivas *de la especie S. pyramidalis*. 82

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica *A. acuminata*..... 8

Tabla 2. Estudios químicos de *A. acuminata.* 11

Tabla 3: Actividades biológicas de la especie *A. acuminata.*..... 13

Tabla 4. Estudios químicos de *S. pyramidalis.* 17

Tabla 5. Sistema de solventes para cromatografía en capa fina (Borrego, 2010). 30

Tabla 6. Resultados de la marcha fitoquímica preliminar de hojas de la especie vegetal *A. acuminata.* 40

Tabla 7. Perfiles cromatográficos de la especie *A. acuminata*..... 41

Tabla 8. Resultados de la marcha fitoquímica preliminar de hojas de la especie vegetal de *S. pyramidalis.*..... 43

Tabla 9. Perfiles cromatográficos de la especie *S. pyramidalis.* 44

Tabla 10. Composición química relativa del aceite esencial de la especie *S. pyramidalis*. 47

Tabla 11. Porcentaje de Captación de $DPPH^{\bullet}$ del extracto y fracciones para la especie *A. acuminata*. 50

Tabla 12. IC_{50} del extracto y fracciones para la especie *A. acuminata*, calculados por el método de decoloración del radical del radical $ABTS^{\bullet+}$..... 54

Tabla 13. Comparación de la capacidad antioxidante del extracto y fracciones para la especie *A. acuminata,* calculados por los ensayos de $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$. 55

Tabla 14. Porcentaje de Captación de $DPPH^{\bullet}$ del extracto y fracciones para la especie *S. pyramidalis*..... 56

Tabla 15. IC_{50} del extracto y fracciones para la especie *S. pyramidalis*, calculados por el método del $DPPH^{\bullet}$. 57

Tabla 16. IC_{50} del extracto y fracciones para la especie *S. pyramidalis*, calculados por el método de decoloración del radical del radical $ABTS^{\bullet+}$. 58

Tabla 17. IC_{50} del extracto y fracciones para la especie *S. pyramidalis*, calculados por el método de decoloración del radical $ABTS^{\bullet+}$. 59

Tabla 18. Comparación de la capacidad antioxidante de la fracción **AcOEt Sp** para la especie *S. pyramidalis,* calculados por los ensayos $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$. 60

Tabla 19. Curva de calibración del ácido gálico..... 61

Tabla 20. Contenido total de fenoles para las fracciones de $CHCl_3$ Aa, AcOEt Aa y RHEt Aa para la especie *A. acuminata*. 62

Tabla 21 Contenido total de fenoles para la fracción AcOEt Sp para la especie *S. pyramidalis*. 63

Tabla 22. Porcentaje de inhibición frente a *Bacillus subtilis* del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata*..... 65

Tabla 23. Porcentaje de inhibición frente a S*taphylococcus aureus* del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata*. 65

Tabla 24. Porcentaje de inhibición frente a *Escherichia coli* del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata*..... 69

Tabla 25. Porcentaje de inhibición frente a *Pseudomonas aeruginosa* del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata*. 69

Tabla 26. Porcentaje de inhibición frente a *Klebsiella pneumoniae* del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata*. 69

Tabla 27. Porcentaje de inhibición frente a *Proteus mirabilis* del extracto y fracciones de la especie *A.acuminata*. 70

Tabla 28. Porcentaje de inhibición frente a *Salmonella typhimurium* del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata*. 70

Tabla 29. Porcentaje de inhibición frente a *Candida albicans* del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata*. 73

Tabla 30. Porcentaje de inhibición frente a *Bacillus subtilis* del extracto y fracciones de la especie *S. pyramidalis*..... 76

Tabla 31. Porcentaje de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* del extracto y fracciones de la especie *S. pyramidalis*. 76

Tabla 32. Porcentaje de inhibición frente a *Pseudomonas aeruginosa* del extracto y fracciones de la especie *S. pyramidalis*. 78

Tabla 33. Porcentaje de inhibición frente a *Klebsiella pneumoniae* del extracto y fracciones de la especie *S. pyramidalis*. 79

Tabla 34. Porcentaje de inhibición frente a *Salmonella typhimurium* del extracto y fracciones de la especie *S. pyramidalis*. 79

Tabla 35. Porcentaje de inhibición frente a *Proteus mirabilis* del extracto y fracciones de la especie *S. pyramidalis*..... 80

Tabla 36 Porcentaje de inhibición del extracto y fracciones frente a bacterias de tipo Gram positivas de la especie *S. pyramidalis*. 81

Tabla 37. Porcentaje de inhibición frente a *Candida albicans* del extracto y fracciones de la especie *S. pyramidalis*..... 83

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Barrido espectral del DPPH$^{\bullet}$..... 94

Anexo 2. Porcentaje de Captación del radical DPPH$^{\bullet}$ empleando Ácido Gálico. 94

Anexo 3. Curva de referencia del porcentaje de captación de DPPH$^{\bullet}$ v/s concentración de ácido gálico. 95

Anexo 4. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical ABTS$^{\bullet+}$ v/s concentración de ácido gálico. 96

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Cálculo de IR……..……..32

Ecuación 2: Porcentaje de captación de DPPH$^{\bullet}$……..34

Ecuación 3: Determinación de % de inhibición…….38

LISTA DE ABREVIATURAS

CG - EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
EM	Espectrometría de masas
MFP	Marcha Fitoquímica Preliminar
IR	Índice de retención
DPPH$^{\bullet}$	2,2- difenil -1-1 picrilhidracilo
ABTS$^{\bullet+}$	2,2'- azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico
NP/PEG	Difenilboriloxietilamina (NP) y polietilenglicol etanólico 4000 (PEG)
TIC	Corriente Iónica Total
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
ATCC	American Type Culture Collection
NHIS	National Health Interview Survey
PPO	Polifenol oxidase
mm	Milímetros
µL	Micrólitros
µg	Microgramos
mL	Mililitros
EtOH	Etanol
AcOEt	Acetato de etilo
$CHCl_3$	Cloroformo
Hex	Hexano
RHEt	Residuo Hidroalcohólico
IC_{50}	Concentración media Inhibitoria 50
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
AE	Aceite Esencial
M	Monoterpenos
S	Sesquiterpenos
HA	Hidrocarburos Alifáticos
C	Cetona
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
Abs	Absorbancia

RESUMEN

Las especies vegetales *Smallanthus pyramidalis* (Arboloco) y *Alnus acuminata* (Aliso) son conocidas por sus múltiples usos, principalmente como restauradoras de ecosistema hasta algunos usos medicinales como astringente y para calmar las molestias de la gripe e infecciones de la garganta (Avila, 2011); sin embargo, estas cuentan con pocos estudios. El presente trabajo de investigación, abarcó dos aspectos, uno químico y otro biológico.

El aceite esencial (AE) obtenido a partir de las hojas de estas dos especies se obtuvó por hidrodestilación en un equipo tipo Clevenger modificado. La composición química se determinó por cromatografia de gases acoplada a espectrometría de masas (CG – EM), comparando los índices de retención y los espectros de masas con los datos reportados en la literatura. En el AE de *S. pyramidalis* se determinó la presencia de 14 monoterpenos (M), 9 sesquiterpenos (S), 6 hidrocarburos alifáticos (HA) y 1 cetona (C), los cuales constituyen cercan del 50,26 % de la composición relativa total del aceite. El componente mayoritario encontrado fue el espatulenol (11,3%). Para la especie *A. acuminata* se obtuvo un hidrosol el cual se le hizo 3 lavados y un fraccionamiento discontinuo con cloroformo donde se obtuvo 0,8 mL de hidrosol a este se deshidrato con sulfato de sodio anhidro el cual al ser analizado por CG-EM no se evidenció ningún tipo de compuesto en la corriente iónica total (TIC).

El extracto etanólico (**EtOH**) fue obtenido usando un equipo tipo soxhlet con etanol al 96%, a partir de estos se obtuvieron fracciones en orden creciente de polaridad por medio de la técnica de fraccionamiento liquido- liquido, obteniendo fracciones de: hexano (**Hex**), cloroformo (**$CHCl_3$**), acetato de etilo (**AcOEt**), y un residuo hidroalcohólico (**RHEt**)**,** a las cuales se les evaluó la actividad antimicrobiana por medio de la técnica de difusión en disco Kirby-Bauer, la capacidad antioxidante por los métodos de $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$ y se realizó la cuantificación de fenoles por el método Folin-Ciocaulteu.

Para la especie *S. pyramidalis,* la fracción de acetato de etilo (**AcOEt Sp**) y el extracto etanólico (**EtOH Sp**) presentaron el mayor porcentaje de captación de radicales libres, con valores de (88,98 %) y (50,31 %) respectivamente con el método de $DDPH^{\bullet}$, y en el método de $ABTS^{\bullet+}$ se reportaron porcentajes del (82,38 %) y (50,06 %). La actividad antimicrobiana de la fracción de hexano (**Hex Sp**) presentó el mayor porcentaje de inhibición (43,36 %) frente a *Candida albicans;* para la bacteria Gram negativa *Bacillus subtilis* se obtuvo un valor de 18,6 %, en la concentración más alta (184 mg/mL).

La especie *A. acuminata* presentó un alto potencial antioxidante con los dos métodos tanto en las fracciones como en el extracto etanólico (**EtOH Aa**), sin embargo, las fracciones de acetato de etilo (**AcOEt Aa**) y cloroformo (**$CHCl_3$ Aa**) presentaron el mayor porcentaje de captación con respecto a las demás fracciones, ya que estos extractos sobrepasaron el 90% de captación de los radicales $ABTS^{\bullet+}$ y $DPPH^{\bullet}$. Para la actividad antimicrobiana de esta especie se reportó que (**AcOEt Aa)** fue la más activa biológicamente ya que obtuvo un porcentaje de inhibición superior al del control positivo (fluconazol), frente a *C. albicans,* además presentó porcentajes moderados de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* y *Proteus mirabilis*, el residuo **RHEt Aa** fue el que mostró una actividad antimicrobiana más homogénea ya que presentó porcentajes de inhibición en 7 de los 11 microorganismos evaluados. Para los microorganismos *Aspergillus brasiliensis* y *Trichophyton rubrum* no se evidenció inhibición por parte del extracto y fracciones estudiadas.

Palabras claves: *Smallanthus pyramidalis, Alnus acuminata,* aceite esencial capacidad antioxidante, actividad antimicrobiana.

INTRODUCCIÓN

En la sabana de Bogotá existían bosques homogéneos y densos donde estaban representadas más de cincuenta especies autóctonas, según algunos estudios y crónicas antiguas, sin embargo, estos han tendido a extinguirse y hoy apenas existe una veinteava representación de las especies existentes que se han conservado, algunas cultivadas y otras de manera milagrosa en su estado silvestre (Garcia, 1998). Por tal motivo estas especies vegetales requieren de estudios profundos, que permitan un mayor aprovechamiento de estas riquezas etnobotánicas que nos ofrece esta región del país.

En los últimos años se han incrementado los estudios fitoquímicos de gran parte de las especies vegetales que se encuentran en nuestro país. En Colombia se encuentran 27.881 especies de plantas, más del 10% de todas las que se conocen en el mundo. Por siglos, una cantidad significativa de plantas ha sido usada en el país con fines medicinales muy diversos (Zuluaga, 1994) llegando a ser parte de una cultura popular, lo cual ha permitido que dichos conocimientos se puedan trasmitir de generación en generación, llegando a ser uno de los pilares para el descubrimiento de medicamentos empleados actualmente (Borrego, 2010).

Durante milenios, en todo el mundo se ha curado a los enfermos con remedios derivados de plantas o animales. En África y Asia, el 80% de la población se vale de remedios tradicionales y no de la medicina moderna para la atención primaria de la salud. Lo cierto es que la medicina moderna tiene una necesidad imperiosa de contar con nuevos fármacos. Para conseguir que una nueva sustancia supere las etapas de investigación y desarrollo, y llegue a comercializarse, se puede tardar años y la inversión es enorme. Además, la creciente resistencia a fármacos, en parte provocada por el uso indebido de medicamentos, ha vuelto ineficaces a varios antibióticos y otros fármacos que salvan vidas (Shetty, 2010).

Ambas tendencias hacen que científicos y laboratorios farmacéuticos busquen urgentemente nuevas fuentes de fármacos y presten cada vez más atención a la

medicina tradicional. Algunos árboles nativos que aún se encuentran en la sabana de Bogotá son el *S. pyramidalis* y el *A. acuminata*, para los cuales se han reportado pocos estudios químicos y biológicos enfatizados en usos terapéuticos como antioxidante, antimicrobiano, antiinflamatorio, entre otros; por lo descrito anteriormente, este estudio tuvo como objetivo principal realizar un aporte al conocimiento químico y biológico de estas dos especies vegetales.

JUSTIFICACIÓN

A lo largo de la historia de la humanidad, las especies vegetales han sido de vital importancia para el hombre, ya que nos han ayudado a suplir necesidades básicas como alimento y medicina. Por tal razón, se han estudiado desde hace muchos años, demostrando sus grandes efectos biológicos en la salud humana; ya sea como reguladores, inhibidores enzimáticos, conservantes, entre otros. En Colombia existe una gran diversidad de plantas pertenecientes a diferentes familias, para las cuales, se han reportado capacidades antioxidantes, actividades antimicrobianas y citotóxicas (Borrego, 2010).

La sabana de Bogotá se caracteriza por tener algunos de los mejores suelos del país, lo cual se refleja en la alta diversidad biológica que alberga, representada en miles de especies animales y vegetales. Entre las especies vegetales que crecen en esta región del país, se encuentran las especies vegetales *Smallanthus pyramidalis* (Arboloco) y *Alnus acuminata (*Aliso), *son* ampliamente conocidas en la región por su uso en medicina tradicional ya que poseen propiedades astringentes, descongestionantes y son principalmente usadas como analgésicos tópicos, aunque también son empleadas para tratar problemas de diarrea, congestiones en vías respiratorias, hemorroides, reumas, entre otros problemas (Rodríguez, 2010).

El interés por el uso de productos naturales ha aumentado mucho en las últimas décadas según la Encuesta Nacional sobre la Salud (NHIS, por sus siglas en inglés) de 2007 (HEALTH, 2014). Diversos estudios han demostrado el potencial existente de algunas especies vegetales pertenecientes a la sabana de Bogotá como interés farmacológico. Sin embargo, actualmente, son pocas las especies que cuentan con estudios, por tal razón es necesario realizar investigaciones que permitan determinar el potencial farmacológico de algunas especies vegetales como el *S. pyramidalis* y *A. acuminata*, estas especies actualmente cuentan con pocos estudios químicos y biológicos, por tal razón, este proyecto de investigación busca contribuir al conocimiento químico y biológico de estas, a través del estudio químico de los metabolitos volátiles presentes en sus hojas y la evaluación de la capacidad

antioxidante por dos métodos espectrofotométricos ($DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$) y la actividad antimicrobiana por el método de difusión por discos (método de Kirby- Bauer) de sus extractos y fracciones con el propósito de hacer un aporte en la prevención y tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo y el crecimiento microbiano de diferentes cepas de bacterias como lo son Gram positivas, Gram negativas, levaduras y hongos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Presentan capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana los extractos y fracciones de diferentes polaridades obtenidos a partir de las hojas de las especies *Smallanthus pyramidalis* y *Alnus acuminata*? ¿Cuál es la composición química de los aceites esenciales extraídos a partir de las hojas de estas especies vegetales?

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al estudio químico y biológico de las especies *Smallanthus pyramidalis* y *Alnus acuminata* a través de la determinación de la composición química del aceite esencial de sus hojas y la evaluación de la capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana de sus extractos y fracciones.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la composición química del aceite esencial de hojas de las especies *Smallanthus pyramidalis* y *Alnus acuminata* por la técnica de CG-EM.

- Evaluar la capacidad antioxidante de extractos y fracciones extraídos de hojas de *Smallanthus pyramidalis* y *Alnus acuminata* mediante los métodos de $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$.

- Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos y fracciones de las dos especies vegetales frente a dos cepas Gram positivas; cuatro cepas Gram negativas y dos hongos.

1. ESTADO ACTUAL DEL TEMA

1.1 Generalidades de la especie *Alnus acuminata*

Alnus acuminata (**Figura 1**) es un árbol monoico, mediano de 10 a 15 m de altura, su copa es amplia, ramificada y con follaje esparcido. Su Corteza es de 0,8 a 1 cm de espesor, externa lisa, de color blanco grisáceo, la corteza interna es rosada, fácilmente desprendible de la albura (Buenaño, 2014). En términos generales la copa es angosta, irregular y abierta. El color de las hojas es verde intenso en el lado superior, algo más claro en el lado inferior. Su limbo es peciolado y aovado, hasta 20 cm de largo, con pecíolos de 2 cm. Sus hojas son caducas alternas estipuladas, simples ovaladas, el pecíolo es pubescente; además, son aserradas en el margen, lisas y brillantes, color verde oscuro y nítidas en el haz, nervaduras prominentes y pilosas en el envés. Los frutos tienen forma de conos o piñas pequeñas, aparentemente se encuentran durante todo el año, aunque en algunos lugares son más frecuentes de enero a junio (Tapia, Portilla, 2012). Comúnmente es conocido en México como Aile, abedul, olmo del país y aliso; en Guatemala se conoce como palo de lama y en Colombia es conocido como aliso o cerezo (Martínez, 2003). En la **Tabla 1** se presenta la clasificación taxonómica de la especie vegetal (Sanchez, Amado, Criollo., 2010).

Tabla 1. Clasificación taxonómica *A. acuminata*.

Clasificación científica	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fagales
Familia:	Betulaceae
Género:	*Alnus*
Especie:	*acuminata*

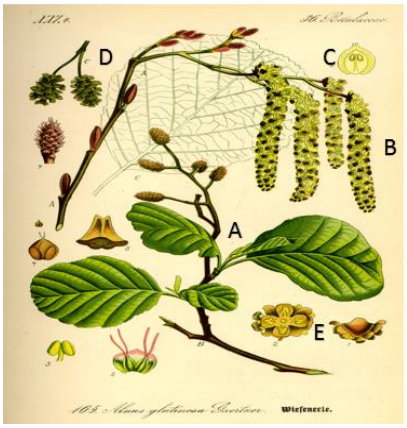


Figura 1. Especie vegetal *A. acuminata* (Artunduaga, 2015).

(A) rama, (B) inflorescencias masculinas, (C) núcula, (D) inflorescencia femenina, (E) bráctea tectriz

1.1.2 Origen y distribución

Las especies del genero *Alnus* son un grupo de árboles típicos del hemisferio norte, con unas 30 especies que viven en los bosques y otras zonas arboladas de Norteamérica, Europa y Asia. En la actualidad, la distribución natural de *A. acuminata* va desde México hasta Panamá y continúa bajando por los Andes hasta el norte de Argentina (**Figura 2**). En Colombia esta especie se distribuye en los departamentos de Caldas, Quindío, Risaralda Antioquia, Nariño, Cauca, Huila, Cundinamarca y Boyacá como se observa en la **Figura 3**.



Figura 2. Distribución la especie vegetal *A. acuminata.* (Global Biodiversity Information, s.f.)

*Los puntos amarillos indican los países en los cuales se encuentra distribuida la especie.

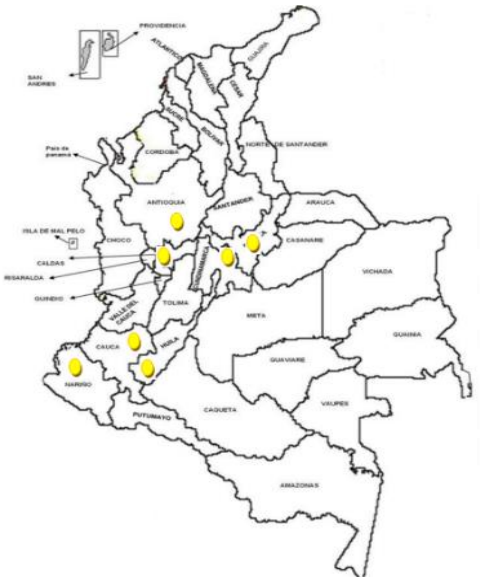


Figura 3. Distribución de *A. acuminata* en Colombia **(**Ospina**, 2005)**.
*Los puntos amarillos representan la distribución de la especie.

1.1.3 Usos tradicionales y Propiedades terapéuticas

Los principales usos de esta especie vegetal van desde su madera empleada en ebanistería, para la elaboración de tableros de virutas, cajas de empaque, lápices, palillos y fósforos. La madera es apropiada para utilizarla como leña y en la fabricación de artesanías talladas, su corteza es utilizada ya que producen taninos usados para curtir el cuero. Esta especie es un árbol pionero de rápido crecimiento, apropiado para establecer cercas vivas y para iniciar la restauración de bosques nativos, además de ser un fijador de nitrógeno lo cual ayuda a mejorar la fertilidad del suelo, por lo que es una especie, adecuada para plantar en sitios húmedos y a la orilla de cuerpos de agua (Plantarum, 1995).

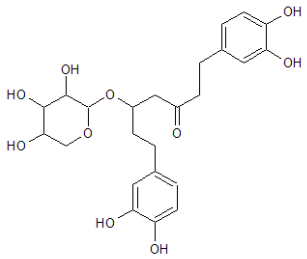
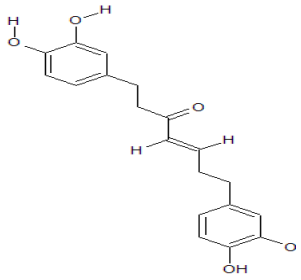
Como usos medicinales se emplean las hojas maceradas y en cataplasma para aliviar inflamaciones y golpes y para combatir el reumatismo. Con las hojas secas del vegetal se preparan infusiones que se administra a la gente para la gripe, fiebre y dolores de garganta. También es utilizada como antiséptico para eliminar los piojos, cuando se hace hervir la corteza del vegetal con vinagre (Prada, 2008).

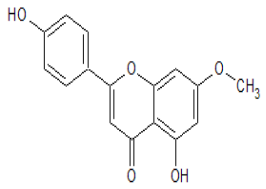
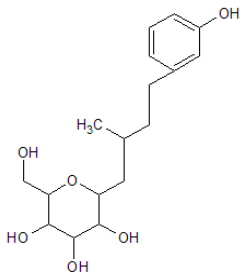
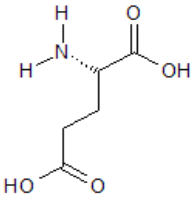
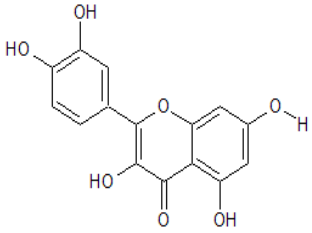
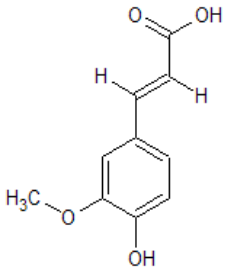
Las especies del genero *Alnus* son utilizadas para tratar diversas enfermedades como el cáncer, la hepatitis, inflamación del útero, cáncer de útero, el reumatismo, la disentería, dolor de estómago, diarrea, fiebre, además de ser empleado como cicatrizante (Buenaño, 2014).

1.1.4 Estudios químicos de *Alnus acuminata*

Diversos estudios han reportado la presencia de variados compuestos fenólicos dentro de los que se resaltan flavonoides y derivados del ácido cinámico (Calderón, 2007). Los flavonoides que han sido aislados e identificados de diferentes órganos de esta especie vegetal corresponden a flavonas, isoflavonas y flavanonas. También se ha reportado la presencia de diarilheptanoides y algunos flavonoides glucosilados (Prada, 2008), Cabe destacar que para la especie no se han reportado estudios de metabolitos secundarios volátiles. En la **Tabla 2** se presentan algunos de los compuestos reportados para la especie *A. acuminata.*

Tabla 2. Estudios químicos de *A. acuminata.*

Órgano	Extracto	Nombre	Estructura	Referencia
Hojas	Extracto de acetato de etilo y Etanol	OREGONINA (5S) -1,7-bis (3,4-dihidroxifenil) -5 -[(2S, 3R, 4S, 5R) 3,4,5-trihidroxi Oxan-2-il] oxi heptan-3-ona		(Prada, 2008)
Hojas	Extracto de acetato de etilo y Etanol	HIRSUTENONA (E) -1,7-bis (3,4-dihidroxifenil) hept-4-en-3-ona		(Prada, 2008)

Hojas	Extracto metanólico	GENKWANINA 5-hidroxi-2- (4-hidroxifenil) -7-metoxi cromen-4-ona		(Santi, 2011)
Hojas	Extracto metanólico	RHODODENDRINA (2R, 3S, 4S, 5R, 6R) -2- (hidroximetil) -6 -[(2R) -4- (4-hidroxifenil) butan-2-il] oxi hexano-3,4,5-triol		(Santi, 2011)
Hojas	Extracto metanólico	ACIDO GLUTÁMICO (2S) -2-aminopentanedioic ácido		(Santi, 2011)
Hojas	Extracto de acetato de etilo	2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one		(Buenaño, 2014)
Hojas	Extracto de acetato de etilo y Etanol	Ácido ferúlico (E) -3- (4-hidroxi-3-metoxifenil) prop-2-enoico		(Buenaño, 2014)

1.1.5 Actividad Biológica de *Alnus acuminata*

Los estudios biológicos que se han realizado a esta especie son diversos, en la **Tabla 3** se registra la revisión de las actividades biológicas a los diferentes órganos de la planta.

Tabla 3: Actividades biológicas de la especie *A. acuminata.*

Órgano de la especie o extracto	Actividad biológica	Resultados	Referencia
Nódulos	Actividad Antifúngica	Inhibió el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Pythum sp.*	(Gonzalez, Suarez, Granoa., 1988)
Extracto etanólico	Actividad Abortiva	Efecto abortivo del 60 % para extracto acuoso 73% para extracto etanólico.	(Salama, Gallego, Barrera, 1989)
Extracto metanólico de hojas	Actividad antimicrobiana	El extracto de MeOH presento actividad frente a *Citrobacter freundii y Lactobacillus plantarum.*	(Middeleton, 2005)
Extracto metanólico de hojas	Actividad citotóxica	Bajos niveles de toxicidad hacia los camarones de salmuera	(Middeleton, 2005)
Extracto metanólico de hojas	Efecto citopático	Inhibición contra el efecto citopático inducido por VIH-1 (CPE) en células MT-4	(Yu, 2005)

Extracto de acetato de etilo	Actividad fotoprotectora	Presenta actividad fotoprotectora frente a la radiación UVB	(Buenaño, 2014)

1.2. Generalidades de la especie *Smallanthus pyramidalis*

El *Smallanthus pyramidalis* (Arboloco) es un árbol propio de la zona andina de Colombia, Ecuador y Perú mide entre 8 a 10 m de altura, es bastante ramificado; sus tallos son numerosos, sus grandes hojas son de posición opuesta y sus flores son amarillas como se muestra en la **Figura 4** (McNish, 2010).

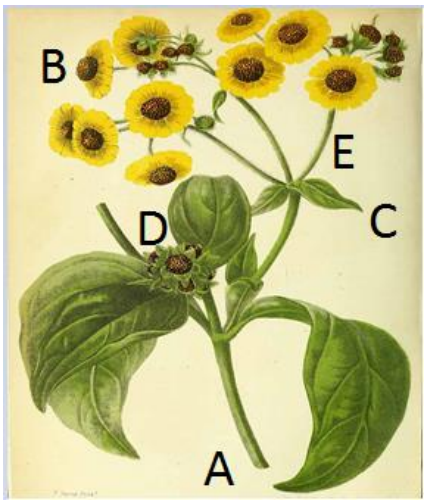


Figura 4. Especie *S. Pyramidalis* (Nissen, 2014).
(A) rama, (B) Flores, (C) Hojas, (D) Inflorescencia y (E) Pedúnculo

El Arboloco a nivel nacional, es una planta con su centro de origen y distribución natural en la zona andina colombiana, donde naturalmente se encuentra de 1400 a 3000 m.s.n.m. debido a su relativamente fácil disponibilidad, se ha involucrado en la cultura de la población, ya sea haciendo parte de la construcción urbana aportando madera de alta resistencia tanto para las viviendas y otras edificaciones como para cercas, tutores de cultivos e incluso para el tendido de redes de electrificación y telefonía, o mediante los productos artesanales que de él se

obtienen, o como xilocombustible en forma de carbón o leña (Tamayo, Escobar., 2010). Comúnmente es conocido en Colombia como Arboloco, pauche, Camargo, colla, escorzonera, jiquimillo y anime (Escobar, 2013).

1.2.1 Origen y distribución

Smallanthus pyramidalis o Arboloco es un árbol que se encuentra solamente distribuido en América del sur en los países de Colombia, Ecuador y Perú (**Figura 5**). En Colombia esta especie se distribuye en los departamentos de Antioquia, Boyacá, Cundinamarca, Tolima, Huila y Nariño como se observa en la **Figura 6** (Opepa, 2016).



Figura 5. Distribución la especie vegetal *S. pyramidalis* (Global Biodiversity Information, s.f.)*los puntos amarillos indican los países en los cuales se encuentra distribuida la especie.



Figura 6. Distribución de *S. pyramidalis* en Colombia.
*Los puntos amarillos representan la distribución de la especie.

1.2.2 Usos tradicionales y Propiedades terapéuticas

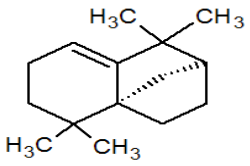
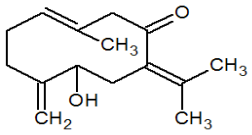
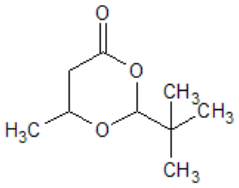
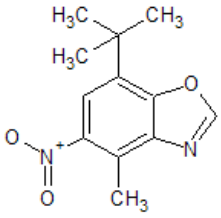
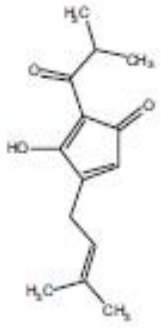
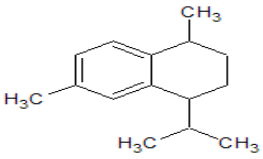
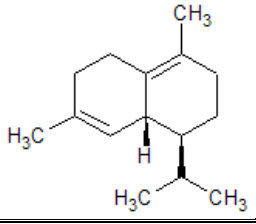
Esta especie cumple una importante función como formador del ecosistema. El hombre se sirve de esta especie de distintas maneras como el aprovechamiento de la madera de su tronco, la cual contribuye al manejo de zonas erosionadas, protección de zonas productoras de agua, reforestación y asocio con cultivos agrícolas, el néctar de sus flores y en medicina popular (Álvarez, 1999).

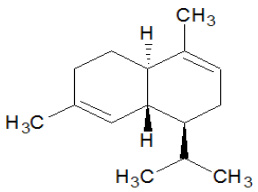
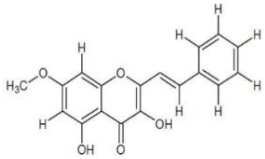
Los tallos jóvenes tienen una medula o corazón corchoso y muy liviano que se utiliza para la elaboración de artesanías, como material sonoaislante y para la construcción de guacales para artículos delicados. Cuando los tallos tienen más de 20 cm de grueso, desarrollan una madera de extrema dureza y alta durabilidad natural como material de construcción (Catálogo de la biodiversidad de Colombia , 2014).

1.2.3 Estudios químicos de *Smallanthus pyramidalis*

De acuerdo a los estudios realizados sobre la especie *S. pyramidalis*, se han encontrado algunos metabolitos como terpenos, lactonas, alcaloides y flavonoides (flavonol) (Guzmán, Barrera., 2010) como se observa en la **Tabla 4**. Sin embargo, para esta especie no se ha reportado estudios en cuanto a metabolitos volátiles.

Tabla 4. Estudios químicos de *S. pyramidalis.*

Órgano	Extracto	Nombre	Estructura	Referencia
Hojas	Fracción etérea	*1,3,4,5,6,7-hexahidro-1,1,5,5-tetrametil Isolongifoleno*		(Guzmán, Barrera., 2010)
Hojas	Fracción etérea	7, 11-Epoxigermacrona		(Guzmán, Barrera., 2010)
Hojas	Fracción etérea	2-(1,1-dimetiletil)-6metil-1,3-dioxan-4-ona		(Guzmán, Barrera., 2010)
Hojas	Fracción diclorometano	7-terbutil-4-metil-5nitrobenzoxasola		(Guzmán, Barrera., 2010)
Hojas	Fracción diclorometano	ácido dehidro-cohumulínico		(Guzmán, Barrera., 2010)
Hojas	Extracto en diclorometano	1,2,3,4-tetrahidro-1,6 dimetil-4-(1-metiletil) -(1scis)-naftaleno		(Guzmán, Barrera., 2010)
Hojas	Extracto en diclorometano	1,2, 4a, 5,6, 8a-hexahidro naftaleno		(Guzmán, Barrera., 2010)

Hojas	extracto en diclorometano	(1S,4aR,8aR)-7-metil-4-metildieno-1-(propan-2-il)-1,2,3,4, 4a,5,6, 8a-octahidronaftaleno		(Guzmán, Barrera., 2010)
Hojas	extracto en diclorometano	5-hidroxi-7-metoxi-flavonol Izalpinina		(Guzmán, Barrera., 2010)

1.2.4 Estudios biológicos de *Smallanthus pyramidalis.*

Teniendo en cuenta la búsqueda bibliográfica realizada se pudo establecer que actualmente para esta especie no se han reportado estudios que den cuenta de su potencial biológico.

1.3 Capacidad antioxidante

A partir del oxígeno molecular (O_2), forman moléculas más reactivas conocidas como Especies Reactivas de Oxígeno (EROs), como el superóxido (O^{-2}), el hidroxilo (OH) y el peróxido de hidrógeno, así como los oxiradicales (O_2 singlete y doblete). Debido a su función primordial de producción de energía química, la mitocondria es considerada la mayor productora de EROs (Macedo, 2012).

Las EROs regulan varios procesos celulares, en el caso de mamíferos son la secreción y acción de la insulina, la producción de hormonas de crecimiento, citocinas (comunicación entre células), la unión de las proteínas G a sus receptores, factores de transcripción, regulación de los transportadores y canales de iones, por citar algunos. Sin embargo, las EROs también resultan nocivas para los organismos cuando se producen en grandes cantidades dañando los constituyentes celulares e induciendo la muerte celular. Así, el estrés oxidativo generado por la sobreproducción de EROs está asociado al envejecimiento y patologías como la obesidad y la diabetes tipo 2, entre otras. La molécula de oxígeno es un birradical

libre, es decir, posee dos electrones no apareados, cada uno localizado en un orbital π de antiunión (π*) (Macedo, 2012).

Un antioxidante es aquella sustancia que presenta bajas concentraciones con respecto a la de un sustrato oxidable (biomolécula) que retarda o previene su oxidación. Los antioxidantes que se encuentran naturalmente en el organismo y en ciertos alimentos pueden bloquear parte de este daño debido a que estabilizan los radicales libres. Son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la oxidación causada por los radicales libres, actuando algunos a nivel intracelular y otros en la membrana de las células, siempre en conjunto para proteger a los diferentes órganos y sistemas (Federacioncafe, 2012). Existen diferentes tipos de oxidantes:

- **Antioxidantes endógenos:** mecanismos enzimáticos del organismo (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión y la coenzima Q-). Algunas enzimas necesitan cofactores metálicos como selenio, cobre, zinc y magnesio para poder realizar el mecanismo de protección celular.
- **Antioxidantes exógenos:** son introducidos por la dieta y se depositan en las membranas celulares impidiendo la lipoperoxidación (vitaminas E y C y el caroteno).

Los radicales libres son moléculas inestables y muy reactivas. Para conseguir la estabilidad modifican a moléculas de su alrededor provocando la aparición de nuevos radicales, por lo que se crea una reacción en cadena que puede afectar a muchas células y puede ser indefinida si los antioxidantes no intervienen. Los radicales libres producen daño a diferentes niveles en la célula dentro de los cuales se pueden destacar:

- Atacan a los lípidos y proteínas de la membrana celular por lo que la célula no puede realizar sus funciones vitales (transporte de nutrientes, eliminación de deshechos, división celular, entre otros). El radical superóxido, O_2, que se encuentra normalmente en el metabolismo provoca una reacción en cadena

de la lipoperoxidación de los ácidos grasos de los fosfolípidos de la membrana celular.

- Atacan al ADN impidiendo que tenga lugar la replicación celular y contribuyendo al envejecimiento celular) (Gonzales, 2014).

La capacidad antioxidante no puede ser medida directamente, pero puede determinarse por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado. La gran mayoría de los ensayos para determinar de capacidad antioxidante pueden ser divididos en dos categorías, como se observa en la **Figura 7.**

- Ensayos basados en la reacción por transferencia de átomos de hidrógeno (HAT).
- Ensayos basados en la reacción por transferencia de electrones (ET) (Orjuela, 2015).

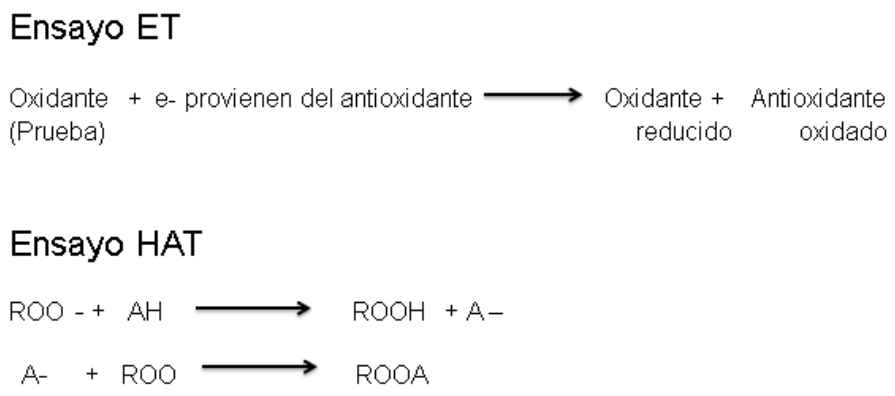


Figura 7. Mecanismos de reacción por transferencia de electrones y transferencia de átomos de hidrógeno (Orjuela, 2015).

Para determinar los efectos antioxidantes de las fracciones de las especies obtenidas a partir del extracto etanólico se usan diferentes métodos dentro de los que se destacan dos métodos espectrofotométricos los cuales son, $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$.

1.3.1 Ensayo del DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo)

La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH•) es un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula, por esto la molécula no se dimeriza. La deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe a 517 nm. Cuando la solución de DPPH• reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece como se observa en la **Figura 8**. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes (Tovar del Rio, 2013).

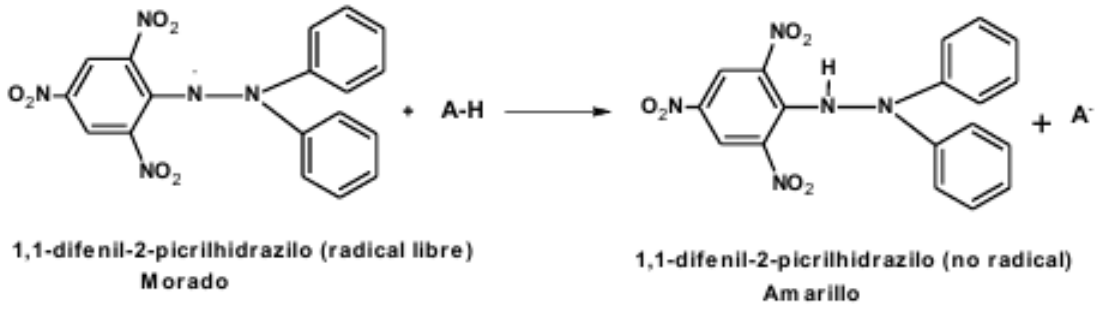


Figura 8. Estructura del DPPH· antes y después de la reacción con el antioxidante (Tovar del Rio, 2013).

1.3.2 Ensayo ABTS•+ (ácido 2,2′-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfonico)

El radical ABTS•+ se obtiene tras la reacción de ABTS•+ (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente (±25ºC) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS•+ se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 (±0,1) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Las muestras filtradas se diluyen con etanol hasta que se produce una inhibición del 20 al 80%, en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir 20 µL de la muestra. A 980 µL de dilución del radical ABTS•+ así generado se le determina la A_{754} a 30ºC, se añade 20 µL de la muestra y se mide de nuevo la A_{754} pasado 1 minuto. La absorbancia se mide de

forma continua transcurridos 7 minutos. El antioxidante sintético de referencia, Trolox, se ensaya a una concentración de 0-15 µM (concentración final) en etanol, en las mismas condiciones, lo que se hace también con ácido ascórbico (0-20 mg/100 mL). Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox. La **Figura 9** muestra la estructura del $ABTS^{\bullet+}$ antes y después de la reacción con el antioxidante.

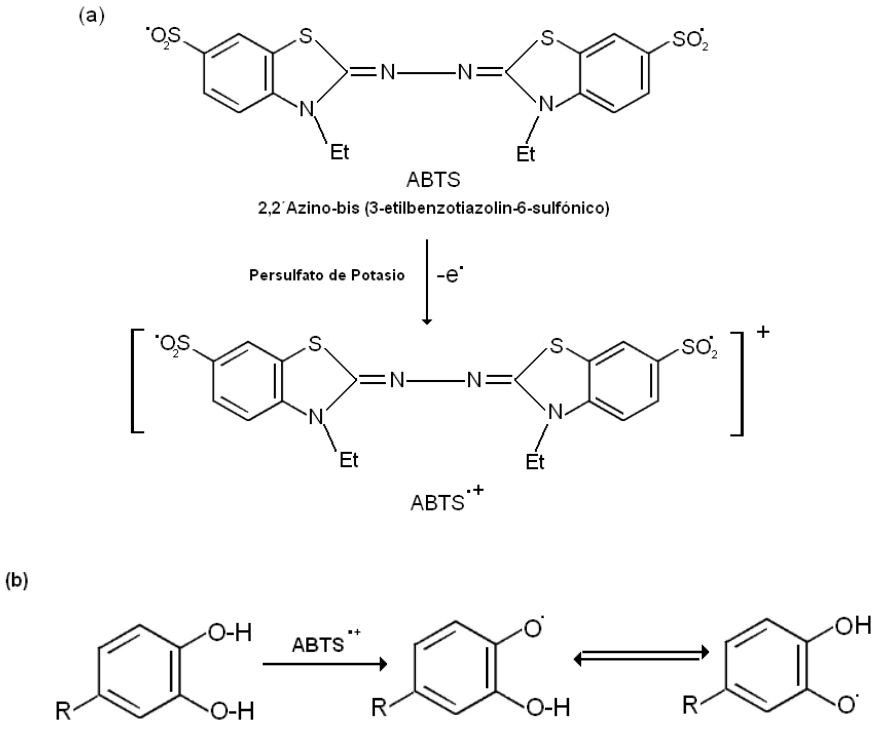


Figura 9. (a) Formación del radical $ABTS^{\bullet+}$ (b) reacción del catión radical $ABTS^{\bullet+}$ con compuestos fenólicos (Re R. -Pellegrini, 1999).

1.4 Actividad antimicrobiana

No existe una reglamentación y/o estandarización de la metodología para la evaluación de la capacidad inhibitoria ante microbios de extractos de plantas (EP), la mayoría de los métodos están basados en los métodos utilizados para evaluar la resistencia y/o susceptibilidad a antibióticos (Taroco, Seija, Vignoli, 2008).

Los métodos más comúnmente utilizados en laboratorio por su sencillez y rapidez, son: La técnica de difusión por discos en agar, la cual es utilizada para generar datos cualitativos principalmente, y los métodos de dilución en medio líquido de cultivo y en agar, ambos métodos permiten conocer datos cuantitativos.

1.4.1 Métodos en Agar

Entre estos métodos el más utilizados por su sencillez y rapidez en la lectura de resultados es el método de difusión por discos, basados en la metodología utilizada por Bauer *et al* (método de Kirby-Bauer, 2009).El principio del método involucra la aplicación de una cantidad determinada de un antimicrobiano u otra sustancia en un sustrato, en la superficie del agar sobre el cual se ha distribuido un inóculo del microorganismo en estudio; se formará así, por difusión un gradiente de concentración del producto alrededor del disco y la sensibilidad del microorganismo estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano.

El diámetro obtenido dependerá no sólo de la sensibilidad del microorganismo y la carga del disco, sino también del espesor de la capa de agar, del pH y de la composición del medio de cultivo, de la capacidad de difusión del producto en ese medio, de la temperatura y de la atmósfera de incubación, de la velocidad de duplicación bacteriana, y del tamaño del inóculo y fase de crecimiento de la bacteria o microorganismos en estudio (Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M, 1966).

1.4.2 Cepas

***Staphylococcus aureus*:** es una bacteria Gram positiva, que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo. Puede producir varias enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de mucosas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia

física de *S. aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria (Gil de M, 2000).

***Bacillus subtilis*:** es una bacteria Gram, bacteria en forma de bastón positivo, se encuentran comúnmente en el suelo y le permite soportar temperaturas extremas, así como ambientes secos. Dado que esta bacteria es resistente a temperaturas extremas, puede soportar altas temperaturas de cocción. Esta bacteria puede causar una consistencia fibrosa en la masa de pan en mal estado, si la masa está expuesta (Instituto Europeo de Bioinformática, 2009).

Pseudomonas aeruginosa: es un patógeno oportunista. Esta bacteria se aprovecha del debilitamiento del sistema inmunitario de un individuo para crear una infección y este organismo también produce toxinas que dañan los tejidos. La *P. aeruginosa* causa infecciones del tracto urinario, infecciones del sistema respiratorio, dermatitis, infecciones de tejidos blandos, bacteriemia, infecciones óseas y articulares, infecciones gastrointestinales y una variedad de infecciones sistémicas, particularmente en pacientes con quemaduras graves y en el cáncer y pacientes con SIDA que están inmunosuprimidos (Kunkel, 2004).

Escherichia coli: Es el nombre de un germen o bacteria, que vive en el tracto digestivo de los seres humanos y los animales. Hay muchos tipos de *E. coli*, y la mayoría de ellos son inofensivos. Sin embargo, algunos pueden causar diarrea con sangre. Algunas cepas de la bacteria *E. coli* (como una cepa llamada O157: H7) también pueden causar anemia severa o insuficiencia renal, lo que puede conducir a la muerte.Otras cepas de *E. coli* puede causar infecciones del tracto urinario u otras infecciones (WebMD, 1995).

Salmonella typhimurium: Hasta hace poco, la causa más común de intoxicación alimentaria por la especie *Salmonella* se debió a *S. typhimurium*. Como su nombre lo indica, se produce una enfermedad tifoidea en los ratones. En los seres humanos la *S. typhimurium* no causa la enfermedad tan grave como *S. typhi*, y normalmente no es fatal. La enfermedad se caracteriza por diarrea, calambres abdominales, náuseas y vómitos, y por lo general dura hasta 7 días. Por desgracia, en las

personas inmunodeprimidas, es decir, los ancianos, los jóvenes, o personas con sistemas inmunes deprimidos, las infecciones por *Salmonella* son a menudo fatales si no se tratan con antibióticos (Salmonella.org, 2016).

Klebsiella pneumonia: Es un tipo de bacterias Gram-negativas que pueden causar diferentes tipos de infecciones asociadas a la salud, incluyendo la neumonía, infecciones del torrente sanguíneo, herida o infección del sitio quirúrgico, y la meningitis. Cada vez más, las bacterias *Klebsiella* han desarrollado resistencia a los antimicrobianos, más recientemente a la clase de antibióticos conocidos como carbapenems. Las bacterias *Klebsiella* se encuentran normalmente en los intestinos humanos (en las que no causan la enfermedad). También se encuentran en las heces humanas (heces). En establecimientos de salud, infecciones por *Klebsiella* ocurren comúnmente en los pacientes enfermos que reciben tratamiento para otras enfermedades. Los pacientes cuya atención requiere dispositivos como ventiladores (máquinas de respiración) o catéteres intravenosos (vena), y los pacientes que están tomando cursos largos de ciertos antibióticos están en mayor riesgo de contraer infecciones por *Klebsiella*. Las personas sanas no suelen tener infecciones por *Klebsiella* (Centers for Disease Control and Prevention, 2006).

Proteus mirabillis: Es una bacteria Gram-negativa altamente flagelado, se encuentra en el suelo, el agua, y el tracto intestinal humano. Sus factores de virus son en algunos casos distintos de los descritos por la bacteria *E. coli*; en otros casos, sin embargo, los factores de virus son compartidos entre las dos especies uropatógenos. La bacteria *P. mirabilis* no es una causa frecuente de infección urinaria en el huésped normal. Las encuestas de cistitis o pielonefritis aguda muestran que la *P. mirabilis* comprende sólo un pequeño porcentaje de los casos. Incluso en pacientes con IU recurrente, la incidencia de infecciones por este microorganismo es sólo unos pocos puntos porcentuales más (Department of Microbiology and Immunology, 2015).

Candida albicans: Es un hongo oportunista (o forma de levadura) que es la causa de muchos de los síntomas indeseables que van desde la fatiga y el aumento de peso, a dolor en las articulaciones y el gas. La levadura *C. albicans* es una parte de

la flora intestinal, un grupo de microorganismos que viven en la boca y el intestino. Cuando la población de *C. albicans* empieza a llegar fuera de control se debilita la pared intestinal, que penetra a través en la circulación sanguínea y la liberación de sus subproductos tóxicos en todo el cuerpo. A medida que se propagan, estos subproductos tóxicos causan daño a los tejidos y órganos del cuerpo, causando estragos en su sistema inmunológico.

El producto de desecho importante de actividad de las células de levadura es acetaldehído, una toxina venenosa que promueve la actividad de radicales libres en el cuerpo. El acetaldehído se suele dividir en ácido acético dentro del hígado. Sin embargo, si este proceso no está funcionando de manera eficiente, entonces se puede circular a través de su cuerpo y causar síntomas desagradables como dolores de cabeza y náuseas (Richards, 2013).

Aspergillus brasiliensis: Es un miembro de la *aspergilli* negro, así como el *A. niger* ya secuenciado*, A. carbonarius, y A. aculeatus*. También se utiliza en la industria, en particular para la producción de enzimas. La razón por la que sentimos que secuenciar más de este grupo es relevante es que recientemente se obtuvieron datos que destacan las diferencias entre estas especies. El *A. brasiliensis* se encuentran en el suelo y otra materia orgánica. También se han aislado en sistemas de aire acondicionado. Por lo general, la inhalación de las esporas del hongo permite la entrada del patógeno en el cuerpo y el organismo tiene una predilección por el tracto respiratorio. Sin embargo, la infección cutánea primaria con *A. brasiliensis*. También puede ocurrir, así como onicomicosis (infección micótica de la uña). Otomicosis, o infección por hongos en el conducto auditivo externo, también pueden estar implicados en la infección en los senos (Wright, 2016).

Trichophyton rubrum*:* Es un hongo antropofílico que se ha convertido al dermatofito más amplio en la distribución de los seres humanos. Con frecuencia causa infecciones crónicas de la piel, las uñas y rara vez el cuero cabelludo. A veces se pueden producir lesiones granulomatosas. Los pelos infectados no presentan fluorescencia bajo luz ultravioleta de Wood, y microscópicamente pueden mostrar endothrix o ectothrix tipo de invasión (Rebell, 1970).

2. METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó, en convenio con el grupo de Investigación de Farmacología Vegetal y Terapéuticas Alternativas de la Fundación Universitaria Juan N. Corpas y el grupo de investigación de productos naturales vegetales de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Este trabajo se desarrolló teniendo en cuenta dos componentes a estudiar: Uno químico y uno biológico. El aspecto químico involucró la caracterización fitoquímica preliminar a través de reacciones de coloración y precipitación, cromatografía en capa delgada y la posterior determinación de la composición química del Aceite Esencial; El estudio biológico se orientó a la evaluación de la capacidad antioxidante y la actividad antimicrobiana del extracto y fracciones obtenidos para las hojas de cada especie.

2.1 Recolección y selección del material vegetal

Las hojas de las especies *Smallanthus pyramidalis (*Arboloco) y *Alnus acuminata* (Aliso) fueron recolectados en el Jardín Botánico Jorge Piñeros Corpas de la Fundación Universitaria Juan N. Corpas (Altitud 2554m, 4°, 45,722´N, 74° 5,644'O) en la localidad de Suba; una muestra testigo de cada especie fue enviada al Herbario Nacional Colombiano para su clasificación taxonómica, *S. pyramidalis* registrada con el número de registro COL000080061 y *A. acuminata* con el número COL000582579. Las hojas fueron secadas en horno a 30°C durante 48 horas y posteriormente, fueron reducidas de tamaño y dispuestas para la preparación de los extractos.

2.2 Preparación de extractos y fracciones

Para la obtención del extracto etanólico, se recolectó 1000 g de muestra fresca, esta muestra fue separada en cada uno de sus órganos (hojas, flores, tallos), se llevaron al proceso de secado en un horno con convección forzada a una temperatura de 30 ºC por dos días. Posteriormente, el material fue pulverizado en un molino de bolas, obteniéndose 600 g aproximadamente de hojas secas y molidas.

Posteriormente se realizó una extracción tipo Soxhlet con etanol al 96 % a 40 °C durante 3 días, el extracto se concentró a presión reducida usando un rotaevaporador IKA RV 10 Control - Biovera. Se floculó con una mezcla de agua y etanol en proporciones de 1:1 por 24 horas en frío y posteriormente se filtraron por gravedad y llevados a sequedad por medio de un baño maría eléctrico. Obteniendo un porcentaje de rendimiento del 9,82 % para la especie *S. pyramidalis* y un 9.86 % para *A. acuminata* de extracto etanólico.

Para el fraccionamiento del extracto (**EtOH**) se empleó el método de fraccionamiento líquido – líquido continuo con solventes de polaridad creciente obteniéndose las fracciones de Hexano (**Hex**), cloroformo (**$CHCl_3$**), acetato de etilo (**AcOEt**) y el residuo hidroalcohólico (**RHEt**) de cada especie como se muestra en las **Figuras 10A** y **10B**.

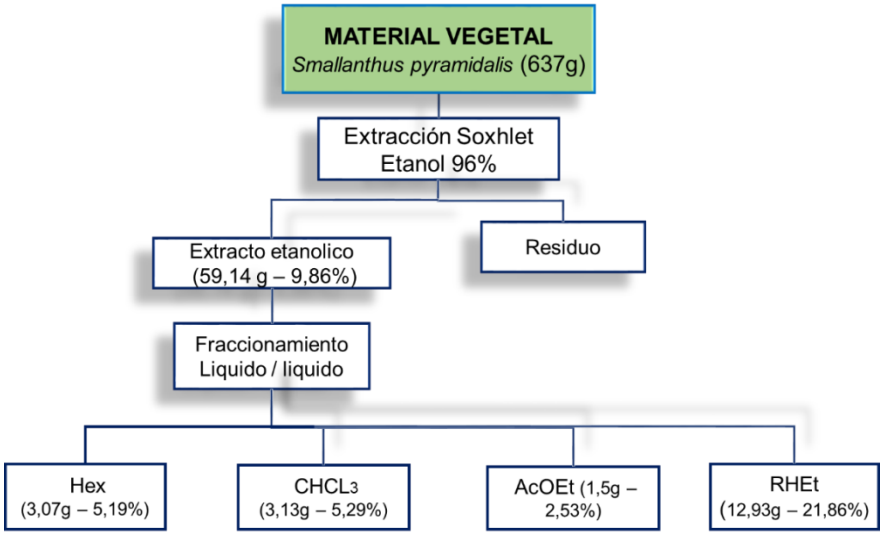


Figura 10A. Diagrama del fraccionamiento líquido-líquido para la especie S. pyramidalis.

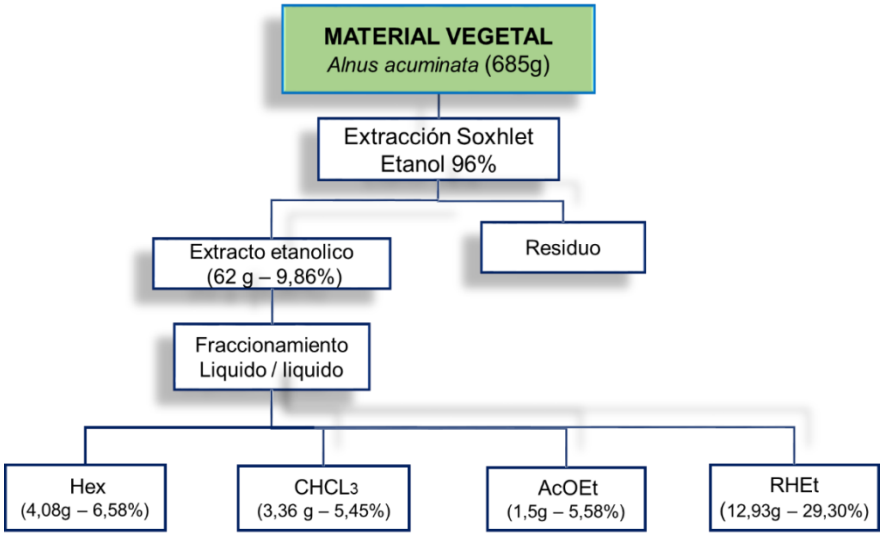


Figura 10B. Diagrama del fraccionamiento líquido-líquido para la especie *A. acuminata.*

2.3 Marcha Fitoquímica Preliminar (MFP)

La caracterización fitoquímica se llevó a cabo a partir de una alícuota de 50 mL de extracto etanólico (**EtOH**) tomando cantidades de extracto equivalentes a los pesos del material seco indicado en la **Figura 11**:

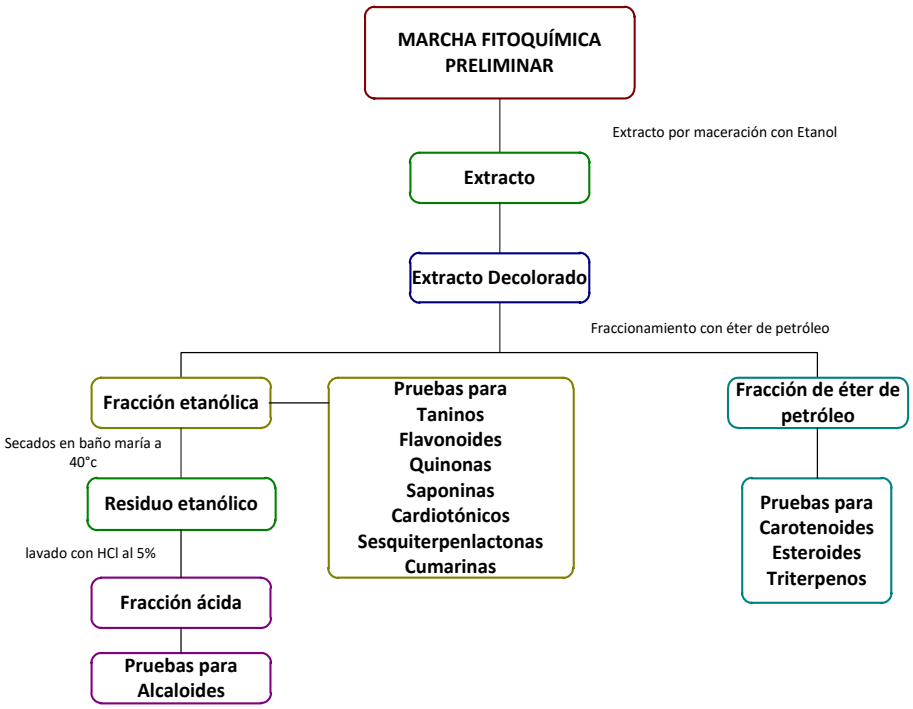


Figura 11. Marcha fitoquímica preliminar para el extracto etanólico (Sanabria, 1983).

Cromatografía en Capa Delgada (CCD)

El monitoreo de los metabolitos secundarios se realizó por medio de cromatografía en capa delgada utilizando como fases estacionarias Silica Gel 60G F_{254} (con indicador de fluorescencia) y RP-18 F_{254s}. Las sustancias a monitorear se aplicaron con una micropipeta a una distancia de 1 cm del borde inferior de la placa. Las placas fueron visualizadas en la cámara de luz UV a las longitudes de onda de 254 nm y 366 nm. En la **Tabla 5** se presentan los sistemas de elución empleados para cada metabolito secundario:

Tabla 5. Sistema de solventes para cromatografía en capa fina (Borrego, 2010).

Grupo de metabolito secundario	Fase móvil
Carotenoides	tolueno: $CHCl_3$: etanol (40:40:10)
Esteroides y triterpenos	tolueno: $CHCl_3$: etanol (40:40:10)
Taninos	$CHCl_3$: AcOEt: ácido fórmico (50:50:1)
Flavonoides	n-butanol: ácido acético glacial: agua (40:10:20)
Quinonas	AcOEt: metanol: agua (100:13,5:10)
Saponinas	butanol: ácido acético glacial: agua (4:1:15)
Sapogeninas	$CHCl_3$: acetona (9:1)
Cardiotónicos	AcOEt: metanol: agua (100:13,5:10)
Sesquiterpenlactonas	$CHCl_3$: metanol (9:1)
Cumarinas	Tolueno: éter (1:1)
Alcaloides	tolueno: AcOEt: dietilamina (70:20:10)

2.4 Extracción y caracterización química de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales fueron obtenidos a partir de hojas frescas por el método de hidrodestilación empleando un equipo Clevenger modificado durante 3 horas; la determinación de la composición química de los aceites esenciales de las especies

S. pyramidalis y *A. acuminata,* se realizó mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas a través del cálculo de los índices de retención (IR) y comparación con los espectros de masas almacenados en la librería NIST 08.

2.4.1 Identificación de metabolitos volátiles en el aceite esencial

La determinación de la composición química relativa del AE se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) empleando una columna capilar de sílice fundida, HP-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm, con fase estacionaria 5%fenilpolimetilsiloxano. La programación de temperatura del horno fue de 45 ºC (5 min) después, tuvo un incremento de 5 ºC/min, hasta 60 ºC (1 min) posteriormente se incrementó a 30 ºC/min, hasta 130°C (0 min), seguido de 4 ºC/min, hasta 190°C (2 min) y por último, tuvo un incremento de 40 ºC/min, hasta 285°C (0 min). Los espectros de masas se obtuvieron por ionización electrónica (IE) de energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 230 y 325 ºC, respectivamente. El gas de arrastre utilizado fue helio (grado 5.0), con flujo constante de 1,2 mL/min (Matulevich, 2013).

Los análisis fueron realizados en un equipo SHIMADZU CG-EM QP2010 Plus ubicado en el Laboratorio de Química de la Universidad Distrital Francisco José de Caldas dotado con analizador de masas cuadrupolar. Los IR se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención de una serie homologa de patrones de hidrocarburos desde C_7 hasta C_{24}, analizados por CG-EM bajo las mismas condiciones que los aceites esenciales. Los valores fueron calculados aplicando la Ecuación 1:

$$IR = 100_n + 100\left[\frac{t_{RX} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}}\right]$$

Ecuación 1. Cálculo de IR

(Goodner L., 2008)

Dónde:
IR: Índice de retención del compuesto de interés X.
n: Número de átomos de carbono del n-alcano que eluye antes del compuesto de interés X.
N: Número de átomos de carbono del n-alcano que eluye después del compuesto de interés X.
t_{RX}: Tiempo de retención del compuesto de interés X.
t_{RN}: Tiempo de retención del n-alcano que eluye después del compuesto de interés.
t_{Rn}: Tiempo de retención del n-alcano que eluye antes del compuesto de interés X.

2.5 Evaluación de la capacidad antioxidante

La capacidad de captura de radicales libres se determinó mediante los métodos espectrofotométricos de DPPH$^{\bullet}$ y ABTS$^{\bullet+}$. Para las especies vegetales *S. pyramidalis* y *A. acuminata,* se evaluó en un intervalo de concentraciones de 23 µg/mL, 46µg/mL, 92µg/mL y 184µg/mL. Las mediciones del cambio de absorbancia que se producen en la reacción se hicieron en un espectrofotómetro de lector de placas de Elisa Accu Reader VIS ubicado en el laboratorio del grupo de Investigación en Farmacología Vegetal y Terapias alternativas de la Fundación Universitaria Juan N. Corpas. La longitud de onda empleada fue de 520 nm. Todas las mediciones se realizaron por triplicado (Grupo de investigación Bioorgánica UMNG, 2015).

2.5.1. Ensayo de DPPH$^{\bullet}$

Se preparó la solución de 2,2- difenil -1-1 picrilhidracilo (DPPH$^{\bullet}$) con una concentración de 30 mM. Se tomaron alícuotas de 2,5; 5; 10 y 20 µL de cada una de las concentraciones de las fracciones de cada especie vegetal y se adicionaron 50 µL de metanol y por último 170 µL de la solución de DPPH$^{\bullet}$. La medición de la absorbancia se hizo a los 30 minutos por triplicado. El porcentaje de captación se calculó con base en la siguiente ecuación:

$$\%\ \text{de captación de DPPH:} \frac{A\ inicial - A\ final}{A\ inicial} * 100$$

Ecuación 2: Porcentaje de captación de DPPH$^{\bullet}$.

2.5.2 Preparación de la curva de referencia

Para realizar la curva de referencia se procedió a realizar una serie de diluciones a partir de una solución stock de 500 ppm de ácido gálico, para obtener concentraciones de 10, 20, 40, 80 y 160 ppm, respectivamente. Para ello se colocó en distintos pozos protegidos de la luz 1, 2, 4, 6 y 8 µL de la solución patrón antes descrita. A cada pozo se le adicionó 190 µL del reactivo de DPPH• 30 mM, y se llevó a volumen final de 220 µL usando metanol y se dejó incubar a temperatura ambiente por 1 hora en ausencia de luz. Finalmente, se tomó la lectura en el espectrofotómetro de lector de placas de Elisa Accu Reader VIS. Las mediciones se realizaron a una longitud de onda de 520 nm. El blanco tuvo los mismos componentes excepto el ácido gálico. En la **Figura 12** se observa la Placa CorningStar del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata* y en la **Figura 13** la placa CornigStar de la especie *S. pyramidalis* por el método DPPH•.



Figura 12. Placa CornigStar con las fracciones y extracto de la especie *A. acuminata* para la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH•.

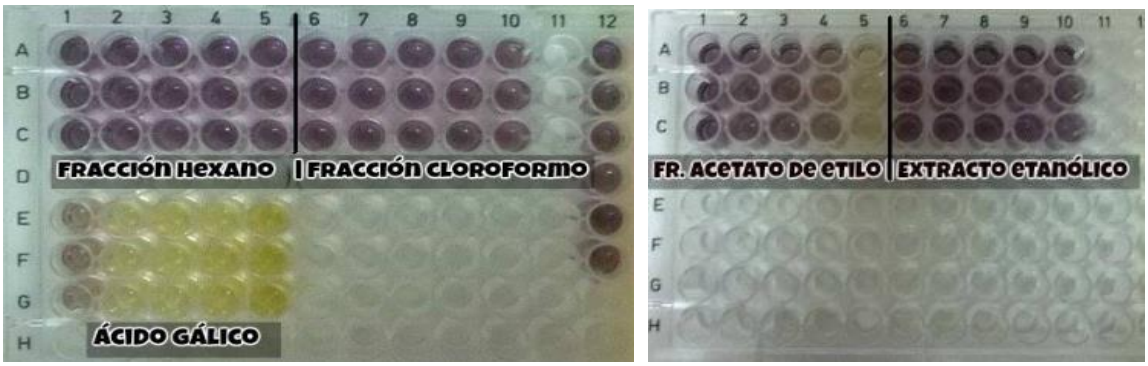


Figura 13. Placa CornigStar con las fracciones y extracto de la especie *S. pyramidalis* para la determinación de la capacidad antioxidante por el método DPPH$^{\bullet}$.

2.5.3 Ensayo de ABTS$^{\bullet+}$

En un beacker se mezclaron la solución de ABTS$^{\bullet+}$ (2,2'- azinobis-3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico) 77,6 mg y persulfato de potasio 2,45 mm en proporciones 1:1(v/v). La mezcla se le adicionó etanol grado analítico hasta alcanzar absorbancia 0,700+/-0,050 en una longitud de onda de 734 nm.

La solución fue almacenada en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12-16 horas antes de su uso. La capacidad antioxidante se calculó tomando la curva de patrón de ácido gálico.

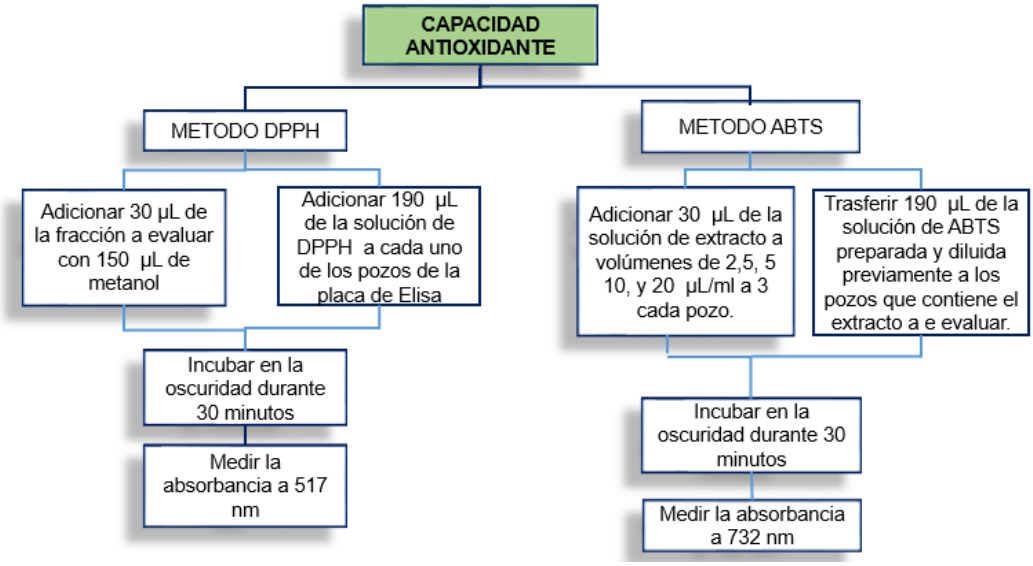


Figura 14. Evaluación de la capacidad antioxidante.

2.6 Cuantificación de fenoles

Se tomó la metodología descrita por Mangalhães L. et al (2010) con modificaciones realizadas por Tovar del Rio (2013). Solo se evaluaron los extractos o fracciones que presentaron mejor capacidad antioxidante por el método del $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$.

Este ensayo se realizó en un lector de microplacas Elisa Accu Reader M965, utilizando una técnica espectrofotométrica y una placa de Elisa con 96 pozos; el reactivo Folin–Ciocaulteu se diluyó 1:50 (v/v) en agua.

La curva de calibración de ácido gálico se realizó tomando las siguientes concentraciones: 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 y 400 ppm (µg/mL). La concentración de los extractos y fracciones fue de 100, 200 y 400 µg/mL, concentraciones a las cuales las fracciones presentaron mayor capacidad antioxidante. El sistema de dilución se tomó como el control negativo (Acontrol (-)), 100 µL de los extractos y fracciones a las diferentes concentraciones se midieron espectrofotométricamente para descartar la absorbancia de los mismos (A blanco). Todas soluciones fueron medidas a una longitud de onda de 750nm.

2.7 Análisis estadístico

Mediante el programa GraphPad Prism 6,0, se construyeron las curvas concentración-respuesta y mediante una regresión no lineal, se calcularon las concentraciones inhibitorias 50 (IC_{50}) en µg/mL.

2.8 Actividad antimicrobiana

En el presente trabajo se utilizó una dosis de (2 mg/mL), que al compararla con la dosis del extracto etanólico y fracciones de distinta polaridad de las especies vegetales (10 mg/mL), determinó que la concentración del extracto es cinco (5) veces mayor que la del antibiótico, lo cual mostró efectividad presentando una no correlación con la dosis empleada para el antibiótico sintético, lo que nos permitió inferir que la concentración del extracto debe ser más elevada, por ser una mezcla compleja de sustancias, mientras que la de los controles positivos son una molécula sintética, la cuales contienen sus parámetros ya estandarizados (Torres, 2007).

Se utilizó la técnica de difusión de disco en Agar de Kirby-Bauer, prueba que permite medir la susceptibilidad ***in vitro*** de microorganismos patógenos frente a cada una de las fracciones obtenidas, para determinar su potencial antimicrobiano (Taroco, 2001). En la **Figura 15** se muestra el diagrama del procedimiento para la determinación de la actividad antimicrobiana. Este se determinó frente a las siguientes cepas:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Estreptococcus faecalis* ATCC 29212
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Salmonella typhimurium* ATCC 4028
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031
- *Proteus mirabilis* ATCC 43071
- *Candida albicans* ATCC 10231.

Para determinar la actividad antimicrobiana se realizó a partir de las fracciones obtenidas se prepararon las fracciones de cada una de las plantas a una concentración de 10 mg/mL (100 mg de extracto seco en 10 mL de solvente).

La actividad antimicrobiana de cada uno de los extractos se realizó según el procedimiento descrito en la USP, de la siguiente manera: se inocularon cada uno de los microorganismos (cepa ATCC), por siembra, masiva, en una caja de Petri con Agar Tripticasa de Soya, a partir de las perlas del sistema de preservación Cryobank, posteriormente se Incubaron a 35°C ± 2ºC por 24 horas, condiciones para Bacterias y a 25ºC ± 2ºC por 72 horas para hongos y levaduras y transcurrido el tiempo de incubación se realizó la tinción de cada uno de los microorganismos para verificar la pureza del cultivo.

Una vez verificada la pureza se realizó la preparación del inoculo, esta se llevó a cabo a través de la transferencia del microorganismo por medio de una asa, a un tubo de ensayo con 9 mL de solución salina estéril hasta conseguir una turbidez

correspondiente al estándar 1 de la escala de Mc Farland (3,0 x 10^8 UFC/mL), y posteriormente se adicionó 20 mL de Agar Mueller- Hinton mantenido a una temperatura de 45ºC a las placas de Petri de vidrio de 150 x 25 mm, para simular un piso, y se dejó solidificar.

Simultáneamente, en un vaso de precipitado estéril, se adicionó 1 mL del inóculo y 25 mL del medio de cultivo agar Mueller-Hinton mantenido a una temperatura de 45°C, se homogenizó rápidamente antes de su solidificación y se adicionó en la caja de Petri encima del piso de agar servido previamente. Se dejó solidificar. Una vez realizado este proceso con unas pinzas estériles se tomó 4 sensidiscos para cada caja de petri y se impregnó cada uno con 25uL con micropipeta y puntas estériles, del extracto a evaluar. Cada sensidisco se colocó a una distancia equidistante, y se llevaron a las cajas de Petri a incubación a 35°C ± 2 ºC por 24 a 48 horas y a 25ºC ± 2ºC por 72 horas para hongos y levaduras. Realizando lecturas cada 24 horas.
Transcurrido el tiempo de incubación se observó si se forman halos de inhibición y con un pie de rey, se midió el diámetro de cada uno de ellos. Para cada experimento se empleó un control positivo (antibiótico y microorganismo), control negativo (Disolvente y microorganismo). En todos los ensayos la lectura de los halos de inhibición (mm) de la actividad antimicrobiana se determinó de la siguiente manera:

C=A-B

C = Tamaño del halo de inhibición (mm)
A = Tamaño del halo + disco de papel filtro
B = Tamaño del disco de papel filtro (6 mm)

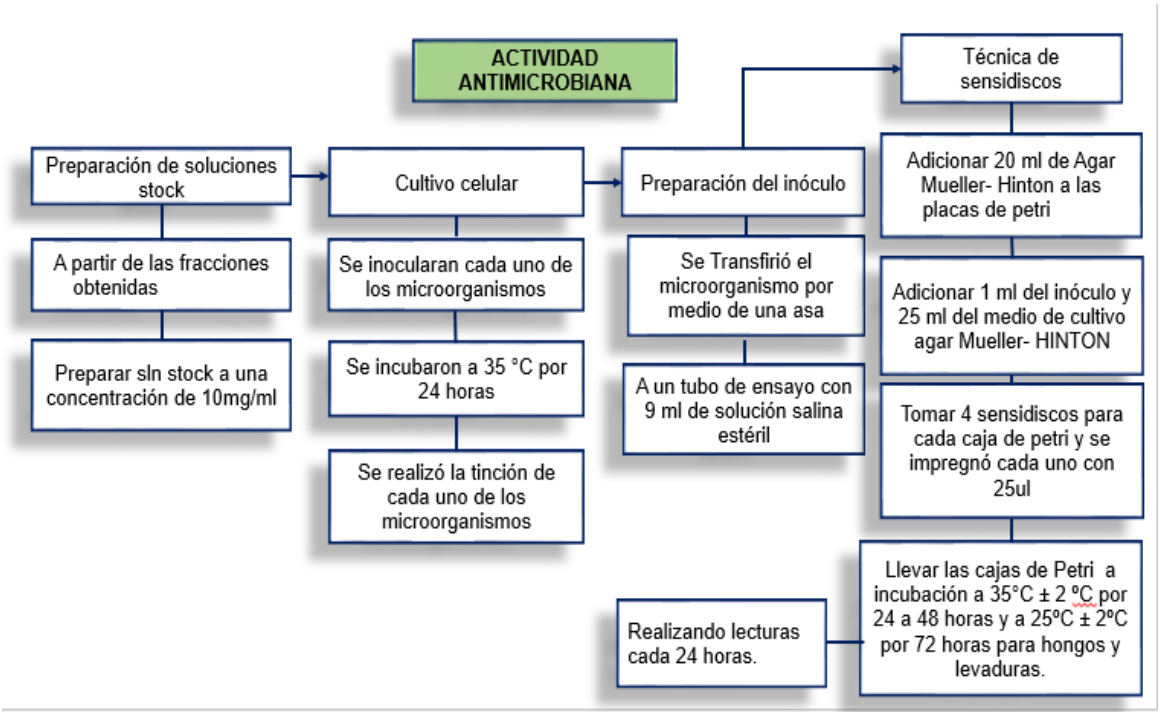


Figura 15. Diagrama del procedimiento de la actividad antimicrobiana.

En este experimento, la actividad antimicrobiana es medida a través del diámetro del halo de inhibición, el cual es afectado por dos factores: El microorganismo y el extracto vegetal, en donde la actividad antimicrobiana de varios extractos vegetales es evaluada sobre los diferentes microorganismos seleccionados. A partir de la **Ecuación 3** se determinó el porcentaje de inhibición de los extractos y fracciones evaluadas.

$$\%\ de\ Inhibición: \frac{(\text{halo extracto} - \text{halo blanco})}{(\text{halo control positivo} - \text{blanco})} * 100$$

Ecuación 3: Determinación de % de inhibición (Ramírez, 2007).

Diámetro del blanco = 6 mm

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en el desarrollo del proyecto, en cuanto a la caracterización fitoquímica preliminar de los extractos etanólicos, la composición química del aceite esencial, la evaluación de la capacidad antioxidante y su actividad antimicrobiana.

Análisis fitoquímico preliminar

Según (Sanabria, 1983), con el fin de tener una idea muy aproximada de la concentración en que se encuentran en la planta las sustancias analizadas, los resultados se tabularon de la siguiente manera: (+++) precipitación abundante o coloración intensa; (++) precipitación regular o coloración claramente observable; (+) precipitación escasa o coloración débil (-) ausencia de precipitado o cambio de coloración. Para cada prueba fue necesario utilizar un patrón de cada tipo de metabolito secundario a analizar, como guía para comprobar y corroborar la presencia de estos.

Cabe mencionar, que los resultados de este análisis, deben ser tomados con precaución, pues están hechos de un crudo que contiene gran variedad de compuestos, muchas veces altamente coloreados. Todo ello interfiere en los resultados de las reacciones indicadas, porque un mismo reactivo puede responder a más de un grupo de sustancias y además se debe considerar que, generalmente se trata de compuestos polifuncionales y por otra parte, la coloración del crudo puede enmascarar las reacciones de color.

Los resultados de los ensayos químicos preliminares realizados a los extractos etanólicos de hojas de las especies *A. acuminata* y de *S. pyramidalis* se encuentran en la **Tabla 6** y **Tabla 8**.

3.1 Estudios químicos.

3.1.1 Estudios químicos de la especie *A. acuminata* (MFP y CCD).

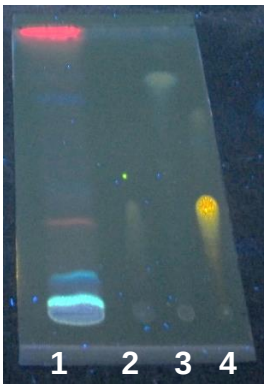
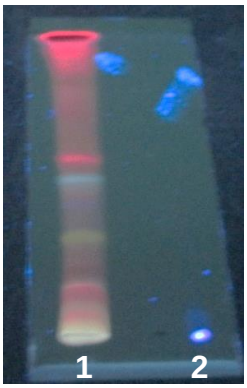
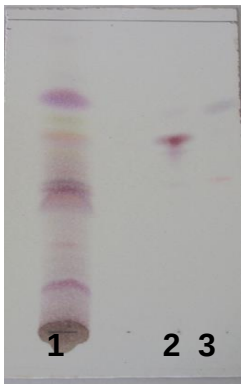
Tabla 6. Resultados de la marcha fitoquímica preliminar de hojas de la especie vegetal *A. acuminata.*

GRUPO DE METABOLITOS SECUNDARIOS	PRUEBA QUIMICA	RESULTADOS	
		Alnus acuminata	
		Marcha fitoquímica	Perfil CCD
Carotenoides	Salkowski	+	-
Esteroides y Triterpenos	Liebermann-Burchard	+	+
Taninos	Cloruro férrico	++	+
	Acetato de plomo	+	
	Gelatina y sal	+	
Flavonoides	Shinoda	+	+
	Rosenhein	+	
	Leucoantocianidinas	-	
Quinonas	Borntrager- Kraus	+	+
	Comportamiento ante ácido y donador de electrones	++	
	Rodamina y amoniaco	+++	
Saponinas	Espuma	++	-
	Rosenthaler	-	
Cardiotónicos	Baljet	++	-
	Tollens	+	
	Antrona	+	
	Molish	+	
Sesquiterpenlactonas	Hidroxamato férrico	+	-
Cumarinas	Erlich	+	+
	Fluorescencia	+	
	Valser	-	

Alcaloides	Mayer	-	-
	Dragendorff	-	
	Schleiber	+	
	Wagner	-	

La especie *A. acuminata* mostró resultados positivos frente a las pruebas para cumarinas, quinonas, esteroides y triterpenos, taninos, y flavonoides. Las cuales se corroboraron por medio de CCD, como se evidencia en la **Tabla 7**:

Tabla 7. Perfiles cromatográficos de la especie *A. acuminata*.

FLAVONOIDES	**CAROTENOIDES**	**ESTEROIDES Y TRITERPENOS**	**TANINOS**
 **Puntos de siembra:** **1. ExtOH Aa** 2. Naringenina 3. Flavona 4. Quercetina	 **Puntos de siembra:** **1. ExtOH Aa** 2. β-caroteno	 **Puntos de siembra:** **1. ExtOH Aa** 2. ácido ursólico 3. ácido oleanólico	 **Puntos de siembra:** **1. ExtOH Aa** 2. ácido gálico
➢ Fase móvil n-butanol: AcOEt: agua (40:10:20)	➢ Fase móvil AcOEt: metanol: agua (100:13:10)	➢ Fase móvil Tolueno: $CHCl_3$: etanol (40:40:10)	➢ Fase móvil $CHCl_3$: AcOEt: ácido fórmico (50:50:1)

En la **Tabla 7** se presentan algunos de los resultados obtenidos por CCD; para la placa de esteroides y triterpenos revelada con vainillina en ácido sulfúrico, se observaron manchas de color amarillo, café y violetas, las cuales sugieren la posible presencia de alcoholes, fenoles, monoterpenos y sesquiterpenos, esteroides o fenil propanoides (Granados, 2000, Pedrozo, 2001), mientras que para los flavonoides la cual fue revelada con NP/PEG, se detectaron coloraciones verdes, amarillas que podrían corresponder a compuestos de tipo flavonol y flavona. Por otro lado, esta misma placa se evidencia la presencia de cumarinas debido a las coloraciones azules intensas y azules verdosas, que puede indicar la presencia de cumarinas simples, furano o piranocumarinas, finalmente por este método se descarta la presencia de alcaloides, saponinas, cardiotonicos y sesquiterpenlactonas.

Los resultados obtenidos en este estudio están de acuerdo con otros reportados para plantas del género *Alnus* donde se ha evidenciado que contienen diversos tipos de metabolitos secundarios como terpenoides, flavonoides, diarilheptanoides, fenoles, esteroides, taninos, entre otros. Algunos de los compuestos hallados para especies de este género son el hirsutanonol, oregonina, ácido cinámico, quercetina, catequina, betulina, ácido beta-fenilpropiónico y ácido benzoico (Santi, 2011). Otros estudios realizados en especies del genero *Alnus* se ha determinado la presencia de Kaempferol 3, 7-dimetil éter, cinamato de β-feniletil, 4',5 - Dihidroxi - 7 - metoxiflavona; rhododendrin {3-(4-hidroxi fenil)-metilpropil-β-D- glucopiranósido} y acido glutámico (2,3-ácido pentadiendioico) (Hashimoto, 1995).

De acuerdo con la revisión bibliográfica se ha determinado por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas la presencia de ciertos compuestos para la especie *A. acuminata* como son: compuestos fenólicos y derivados del ácido cinámico (Benoit, Berry, 2006). Los flavonoides que se encuentran en la especie son: flavonas, isoflavonas y flavanonas. Además, se ha reportado la presencia de diarilheptanoides, glucósidos (oregonin), quercetina, ácido ferúlico, acido p-cumárico y sesquiterpenoides (Buenaño, 2014).

3.1.2 Composición química del aceite esencial para la especie *Alnus acuminata*.

A partir de las hojas frescas (1000 g) de la especie vegetal *A. acuminata* no se obtuvo aceite esencial por este motivo se trabajó con el hidrosol, el cual se le hizo 3 lavados y un fraccionamiento discontinuo con cloroformo donde se obtuvo 0,8 mL de hidrosol a este se deshidrato con sulfato de sodio anhidro y por último se pasó a CG-EM, el cual no evidenció en la corriente iónica total (TIC), ningún tipo de metabolito volátil probablemente por el periodo geoestacionario en el cual la planta fue colectada la especie o debido al método de extracción empleado. Sin embargo en la familia *Betulaceae* se ha reportado la presencia de Sesquiterpenos como 14-hidroxi- β–cariofileno, betulina, salicilato de metilo y betulenol (25%) como el compuesto mayoritario (Zaragozá, 2008). Otro estudio para las especie *Betula pendula*, presenta compuestos metilbetulenolresinas y betulenol el cual llega a obtener hasta un 25% (Silva, 2010) y *Betula alleghaniensis* la cual tiene como compuestos volátiles monoterpenos como anetol (50-90%), fenchona (1-33%), estragol (2-10%), anisaldehído, α y β-pineno, canfeno, p-cimeno, mirceno, limoneno, sabineno, α y β felandreno, gama-terpenos, terpinoles, cis-ocimeno, como estas, son varias las especies vegetales de esta familia, y específicamente de este género (*Betulea*) quienes poseen metabolitos volátiles que son empleados en la medicina alternativa (Martínez, 2003).

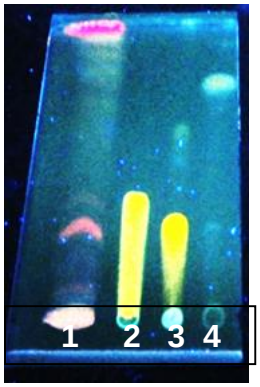
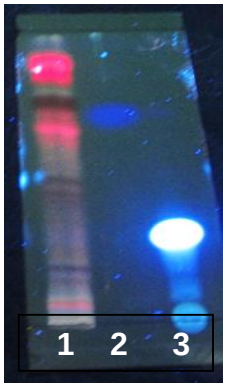
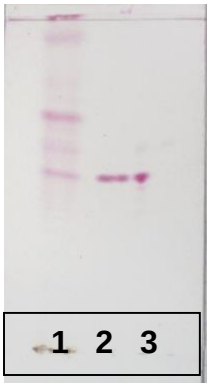
3.1.3 Estudios químicos de la especie *S. pyramidalis* (MFP y CCD).

En la **Tabla 8** se observan los resultados del análisis cualitativo (marcha fitoquímico preliminar) de la especie *S. pyramidalis* el cual indica la posible presencia de diferentes tipos de metabolitos secundarios, pero que al ser corroborada por el método de CCD, indica que posiblemente esta contiene, esteroides y Triterpenos, flavonoides, taninos, cumarinas, glucósidos cardiotónicos y saponinas, mientras descarta la presencia de alcaloides, sesquiterpenlactonas y carotenoides.

Tabla 8. Resultados de la marcha fitoquímica preliminar de hojas de la especie vegetal de *S. pyramidalis.*

GRUPO DE METABOLITOS SECUNDARIOS	PRUEBA QUIMICA	RESULTADOS	
		Smallanthus pyramidalis	
		Marcha fitoquímica	**Perfil CCD**
Carotenoides	Salkowski	+	-
Esteroides y Triterpenos	Liebermann-Burchard	++	+
Taninos	Cloruro férrico	++	+
	Acetato de plomo	+	
	Gelatina y sal	+	
Flavonoides	Shinoda	++	++
	Rosenhein	+	
	Leucoantocianidinas	-	
Quinonas	Borntrager- Kraus	-	+
	Comportamiento ante ácido y donador de electrones	+	
	Rodamina y amoniaco	++	
Saponinas	Espuma	+	+
	Rosenthaler	+	
Cardiotónicos	Baljet	+++	+
	Tollens	++	
	Antrona	-	
	Molish	++	
Sesquiterpenlactonas	Hidroxamato férrico	-	-
Coumarinas	Erlich	+	+
	Fluorescencia	-	
Alcaloides	Valser	+	-
	Mayer	+	
	Dragendorff	-	
	Schleiber	+	
	Wagner	-	

Tabla 9. Perfiles cromatográficos de la especie *S. pyramidalis.*

FLAVONOIDES	CUMARINAS	ESTEROIDES Y TRITERPENOS	TANINOS CONDENSADOS
 **Puntos de siembra:** **1. ExtOH Sp** 2. quercetina 3. naringenina 4. flavona	 **Puntos de siembra:** **1. ExtOH Sp** 2. cumarina 3. umbeliferona	 **Puntos de siembra:** **1. ExtOH Sp** 2. ácido ursólico 3. ácido oleanólico	 **Puntos de siembra:** **1. ExtOH Sp** 2. Rutina 3. Flavona 4. Naringenina
➢ Fase móvil n-butanol: AcOEt: agua (40:10:20)	➢ Fase móvil Tolueno: éter (1:1)	➢ Fase móvil Tolueno: $CHCl_3$: etanol (40:40:10)	➢ Fase móvil $CHCl_3$ AcOEt: ácido fórmico (50:50:1)

De acuerdo con los resultados obtenidos en la marcha fitoquímica preliminar, y el perfil cromatográfico en CCD de la especie vegetal *S. pyramidalis* **(**

Tabla 9**)**, se observa la presencia de algunos tipos de metabolitos, como flavonoides los cuales se evidencian debido a presencia de fluorescencias de color amarillo al ser revelados con UV y NP/PEG; Estos resultados concuerdan con estudios realizados para la especie en donde se aisló y purificó el compuesto 5-hidroxi-7-metoxi-flavonol, y se reportó la presencia principalmente de los grupos de metabolitos de tipo carotenoide, triterpenos, tanino, sesquiterpenlactonas, y cumarinas; (Guzmán, Barrera, 2010).

Otros estudios del género *Smallanthus* concuerdan con los resultados obtenidos en esta investigación; como es el caso de la especie vegetal *Smallanthus sonchifolius,* donde se ha encontrado la presencia de esteroides, triterpenos, taninos, cardiotónicos y alcaloides (Barajas, Herreño, Mejía, Borrego, Pombo, 2014). Para *Smallanthus fruticosuss se han reportado* dos tipos de flavonoides, la centaureidina y sakuranetina (Beutler, Cardellina II, 1993).

3.1.4 Composición química del aceite esencial para la especie *S. pyramidalis*.

El aceite esencial de las hojas de *S. pyramidalis* fue obtenido a partir de hojas frescas (1000 g) por hidrodestilación, obteniéndose 0,5 mL de aceite durante 3 horas. La identificación de los componentes presentes en el aceite esencial se realizó comparando los índices de retención y los espectros de masas con los datos reportados en la literatura. El perfil cromatográfico obtenido se muestra en la **Figura 16**.

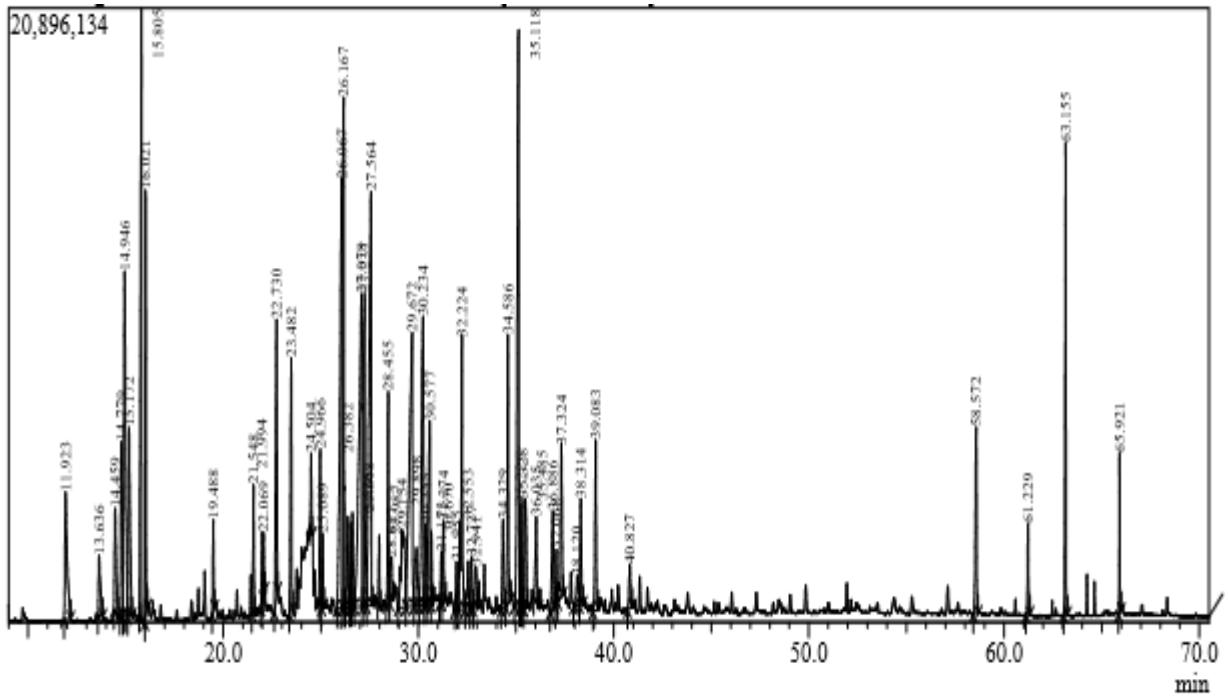


Figura 16. TIC del aceite esencial de la especie *S. pyramidalis* analizado por CG-EM.

En la **Tabla 10** se presentan los compuestos identificados por comparación con índices de retención y con la librería NIST 08. En el aceite esencial fueron identificados 29 compuestos que por comparación presentaron más del 85% de

coincidencia con el espectro de la librería, entre ellos monoterpenos, sesquiterpenos e hidrocarburos alifáticos.

Tabla 10. Composición química relativa del aceite esencial de la especie *S. pyramidalis*.

Señal	Nombre	*	Identificación	%	tR (min)	% área	IR teórico	IR Cal
1	α-pineno	M	a, b	3,6	11,92	1,81	931	946
2	(+) - Sabineno	M	a, b	1,7	13,63	0,71	964	968
3	β-mirceno	M	a, b	2,2	14,45	1,1	979	972
4	(+)-4-Careno	M	a	3,6	14,77	1,82	948	966
5	α - Felandreno	M	a	7,6	14,94	3,85	969	948
6	3-Careno	M	a	4,0	15,17	2,02	948	926
7	o- Cimeno	M	a	8,2	15,80	4,14	1042	1075
8	(+)-m-Mentha-1(6),8-dieno	M	a, b	4,3	16,02	2,16	1018	1006
9	nitrilo nerilo	HA	a	1,0	19,48	0,51	1231	1263
10	1,3- Dimetil ciclohexeno	M	a	1,6	21,54	0,81	852	882
11	Acetato de savinilo	M	a	4,5	22,73	2,27	1301	1347
12	α - limoneno diepoxido	M	a	1,9	24,96	0,97	1294	1279
13	Acetato (+) - Trans-Crisantenilo	M	a	0,9	25,08	0,45	1237	1211
14	6 -Camfenol	M	a	8,5	26,16	4,27	1080	1032
15	Carvacrol	M	a, b	1,7	26,38	0,85	1278	1260
16	3-tetradecen-1-ol	HA	a, b	0,7	27,98	0,42	1473	1447
17	4-hidroxi-3-metil-6- (1-metiletil) -, trans- 2 ciclohexen-1-ona	C	a	4,4	30,57	2,19	1346	1370
18	α-bergamoteno	S	a, b	0,8	30,67	0,41	1430	1416
19	(+)-Valenceno	S	a, b	0,8	31,95	0,41	1474	1472
20	(-)-β-sesquifelandreno	S	a, b	4,9	32,22	2,49	1446	1445
21	(+)-Valenceno	S	a, b	1,1	32,55	0,54	1474	1465
22	(±)-trans-Nerolidol	S	a	3,9	34,58	1,94	1564	1533
23	Espatulenol	S	a	11,3	35,11	5,66	1536	1574

24	óxido de cariofileno	S	a	1,5	35,22	0,75	1507	1549
25	(-)-Cedreanol	S	a, b	2,1	36,88	1,03	1580	1582
26	6-isopropenil-4, 8a-dimetil-1,2,3,5,6,7,8, 8a-tetrahidro-naftalen-2-ol	S	a	1,7	38,31	0,82	1690	1657
27	Cis- Lanceol	S	a	0,9	40,82	0,44	1737	1709
28	Eicosano	HA	a	3,1	58,57	1,56	2009	2087
29	Hexatriacontano	HA	a, b	7,7	61,22	3,86	3600	3596

* Monoterpenos (M), Sesquiterpenos (S), Hidrocarburos Alifáticos (HA) Cetona (C).

Identificación: a: constituyente identificado por índice de retención, b: constituyente identificado por la comparación del espectro de masas.

El aceite esencial de hojas de *S. pyramidalis* se obtuvo con un rendimiento del 0,45%. La identificación de los componentes presentes en el aceite esencial se realizó comparando los índices de retención y los espectros de masas con los datos reportados en la literatura (Adams, 1995; Goodner, 2007).

Fueron identificados 29 compuestos los cuales constituyen el 50,26 % de la composición química relativa total del aceite; al determinar los componentes de AE se encuentran que estos se distribuyen en 14 monoterpenos (27,23%), 9 sesquiterpenos (14,49%), 4 hidrocarburos alifáticos (6,35 %) y una cetona que representa tan solo el 2,19 %. Dentro de los sesquiterpenos identificados se encuentran como compuestos mayoritarios el espatulenol con un 11,3%, β-sesquifelandreno (4,95%) y (±)-trans-nerolidol (3,9 %). Para los monoterpenos, los componentes mayoritarios corresponden a o-cimeno (8,2%), α-felandreno (7,66%) y 6-camfenol (8,5%); en cuanto a los hidrocarburos alifáticos se encuentra el hexatriacontano en una proporción del 7,7% y el eicosano en un 3,1%.

Otros estudios reportados sobre el género *Smallanthus*, como el *Smallanthus sonchifolius* H. Robinson (Mendoza, Parra, Loza, 2014) y *Smallanthus quichensis* (Chaverri, Cicció, 2015), muestran similitudes en los componentes identificados como: $\alpha-$ pineno (2,45%; 64,5% y 3,6% respectivamente), (+)-m-menta-1(6) (0,2%;

0,2% y 4,3 respectivamente), espatulenol (0,2%; 0,9% y 11,3 respectivamente), carvacrol (0,1%; 0,2% y 1,7% respectivamente), cimeno (0,5%; 11,5% y 8,2% respectivamente), sabineno (40,75%; 3,4% y 1,7% respectivamente) y β-mirceno (1,5%;1,2% y 2,2 respectivamente).

En cuanto a los componentes mayoritarios en las tres especies hay diferencias considerables, ya que en este estudio para la especie *S. pyramidalis* el compuesto mayoritario fue el espatulenol con un 11,3%, para el caso de la especie *S. quichensis* su compuesto mayoritario fue el α– pineno en un 64,5% y en la especie *S. sonchifolius* fue el sabineno del 40,7%, a pesar de que estas especies pertenecen al mismo género (*Smallanthus*) sus diferencias porcentuales tan elevadas entre una y la otra en su compuesto mayoritario las hace químicamente diferentes.

3.2 Capacidad Antioxidante

Se determinó la capacidad antioxidante del extracto etanólico y las fracciones, de *S. pyramidalis* y *A. acuminata* por dos métodos espectrofotométricos el método de $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$. Donde se consideraron como extractos activos, aquellos que presentaron un porcentaje de capacidad antioxidante superior al 25% (Tovar del Rio, 2013).

Se consideró tres clasificaciones para el método de $DPPH^{\bullet}$ para los extractos y fracciones de las dos especies vegetales:

- IC_{50} de alto potencial antioxidante aquellos con valores menores a 30 µg/mL,
- IC_{50} de moderado potencial en un rango entre 30 µg/mL y 100 µg/mL
- IC_{50} de bajo potencial antioxidante aquellos con un IC_{50} por encima de 100 µg/mL (Tovar del Rio, 2013).

3.2.1 Capacidad antioxidante de la especie *A. acuminata*

3.2.1.1 Capacidad antioxidante del extracto y fracciones para la especie *A. acuminata* por el método de DPPH•.

Para la especie *A. acuminata* se muestran los porcentajes de captación por el método de DPPH• del extracto y fracciones en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Porcentaje de Captación de DPPH· del extracto y fracciones para la especie *A. acuminata*.

Volumen µL	Concentración µL/mL	Hex. Aa	$CHCl_3$ Aa	AcOEt Aa	EtOH Aa	RHEt Aa
2,5	23	10,09	47,38	46,10	3,70	44,44
5	46	28,74	66,54	58,62	21,33	66,03
10	92	58,88	74,71	77,52	37,80	77,78
20	184	68,45	90,80	93,10	53,51	89,27

Las fracciones **$CHCl_3$ Aa**, **AcOEt Aa** y **RHEt Aa** de las hojas *A. acuminata* fueron las que presentaron mayor capacidad antioxidante con porcentajes de 90%, 93,10 % y 89,27% respectivamente, a la concentración de 184 µg/mL (**Figura 17**), a diferencia de **Hex Aa** y **EtOH Aa**, las cuales presentaron porcentajes de 68,45 y 53,51%.

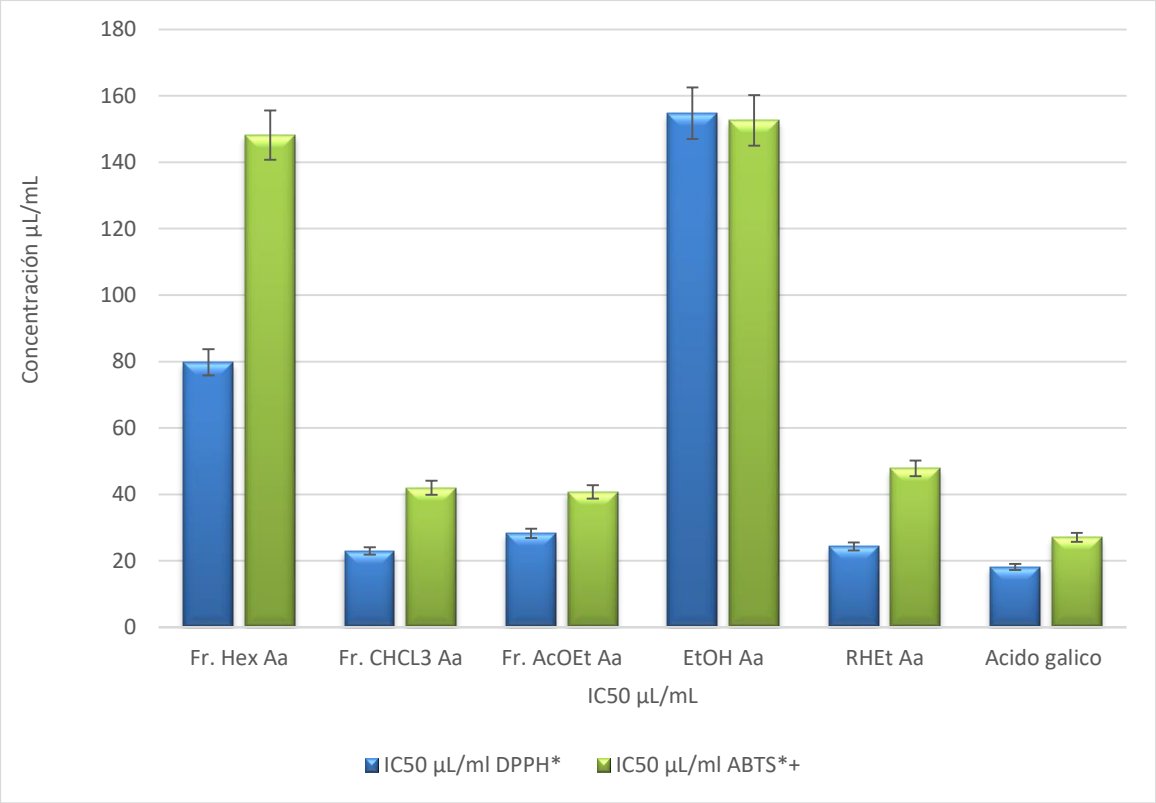


Figura 17. Comparación del % de captación del radical DPPH• del extracto y fracciones para la especie *A. acuminata*.

Para éste método observamos que hay tendencia de mayor capacidad antioxidante a medida que aumenta la concentración en las soluciones de los extractos y fracciones obtenidos para cada especie vegetal.

Dando como mejor resultado de captación de radicales libres en el **EtOH Aa** y la **Hex Aa** por el método de DPPH•.

3.2.1.2 Comparación de IC_{50} del extracto y fracciones para la especie *A. acuminata,* por el ensayo DPPH•

En la **Figura 18** se observa que **$CHCl_3$ Aa, RHEt Aa** y **AcOEt Aa** fueron los tratamientos más activos debido a que presentaron valores de IC_{50} de 22,95 µg/mL, 24,31 µg/mL y 28,85 µg/mL, respectivamente. En contraste, **Hex Aa** mostró un valor moderado de potencial antioxidante con IC_{50} de 79,75 µg/mL y **EtOH Aa** con un

bajo potencial antioxidante de 154,8 µg/mL. El extracto y las fracciones de la especie se comparó con el valor del IC_{50} del ácido gálico (18,15 µg/mL).

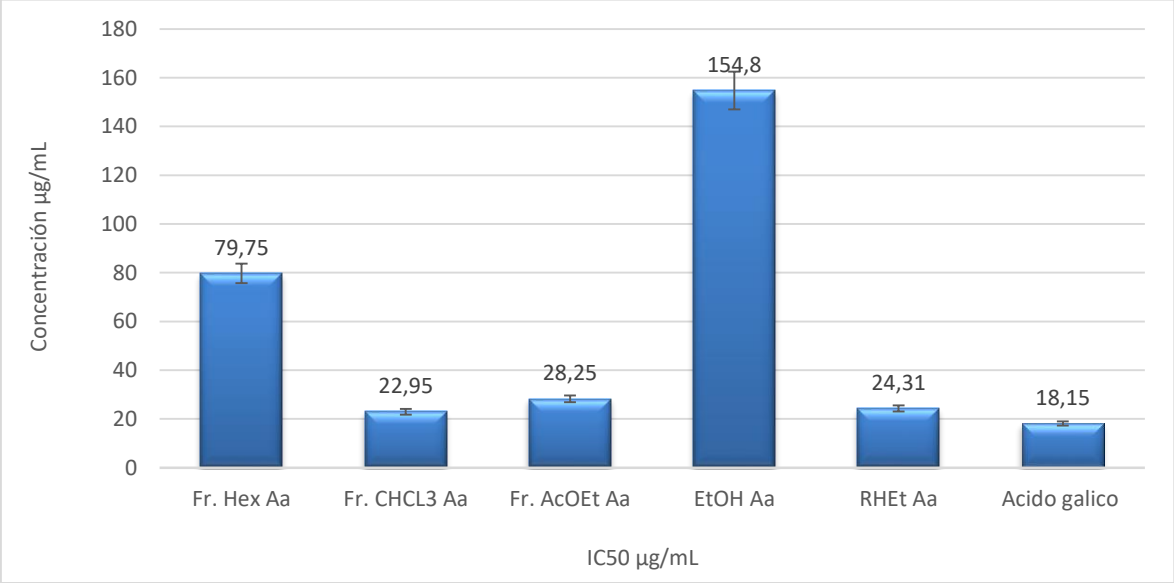


Figura 18. Comparación IC_{50} del extracto y fracciones para la especie *A. acuminata*, calculados por el método de decoloración del radical DPPH•.

Estudios realizados para especies vegetales del género *Alnus,* han reportado la capacidad antioxidante por medio del método (DPPH•), tal es el caso de la especie *Alnus glutinosa,* la cual presentó un porcentaje superior al 50% de eliminación de radicales libres, de una fracción agua y etanol de proporciones 7:3, esta fracción también mostró que fue activa en la especie *Alnus incana,* con valores entre 41,28% al 41,67% (Mushkina, 2013), los cuales se ratifican con los estudios de Dahija y Hindija, 2014, quienes reportaron la evaluación de la capacidad antioxidante para tres especies de mismo género (*Alnus*), incluyendo las dos anteriormente mencionadas y la especie *Alnus viridis*, las cuales arrojaron valores de IC_{50} de 0,43 mg/mL para la especie *A. glutinosa*, 0,21 mg/mL y para *A. incana* de 0,40 mg/mL para la especie *A. viridis*, en fracciones de metanol.

Estudios previos sobre el género *Alnus* (Santi, 2011), mostraron que en las fracciones de alta polaridad existen compuestos mayoritarios como los diarilheptanoides los cuales presentando un alto potencial antioxidante. Por lo anterior, podemos decir que la especie *A. acuminata* la cual reportó el menor valor

de IC_{50} de 28,85 µg /mL para la fracción de **AcOEt Aa,** posiblemente**,** pueda tener este tipo de compuestos.

3.2.1.3 Capacidad antioxidante del extracto y fracciones para la especie *A. acuminata* por el método $ABTS^{\bullet+}$.

Las fracciones de **$CHCl_3$ Aa** y **AcOEt Aa** presentaron la mayor capacidad de captación de radicales libres, teniendo en cuenta que estos extractos sobrepasaron el 90% de captación del radical $ABTS^{\bullet+}$ a una concentración de 184 µg /mL.

La fracción de **Hex Aa** y el **EtOH Aa** mostraron un comportamiento moderado, presentando una disminución de la absorbancia, que se ve reflejada en el porcentaje de captación de radicales libres de 68,45 % y 53,51 %, respectivamente **(Figura 19),** porcentajes obtenidos a una concentración de 184 µg /mL.

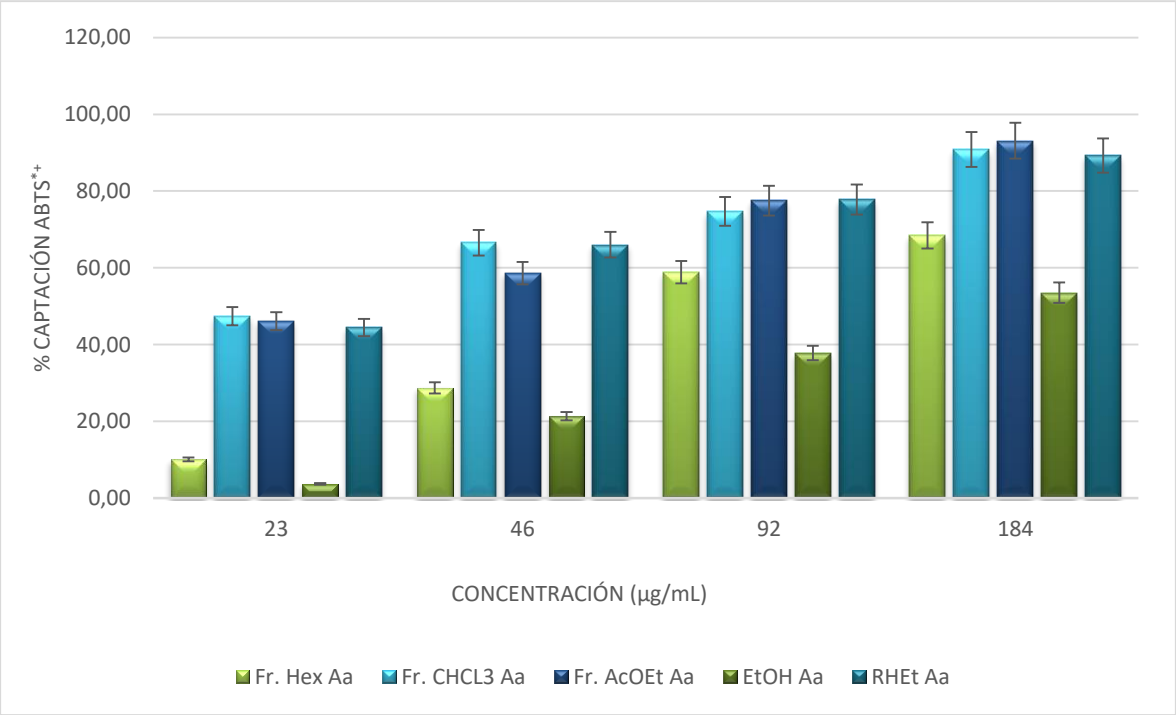


Figura 19. Comparación del % de captación del extracto y fracciones de hojas de *A. acuminata*, por el método decoloración del radical $ABTS^{\bullet+}$.

3.2.1.4 Comparación de IC_{50} para la especie *A. acuminata*, por el método $ABTS^{\bullet+}$.

La **Tabla 12** muestra la comparación de las IC_{50} de las fracciones y el extracto frente al patrón usado para el método de decoloración del radical $ABTS^{\bullet+}$, el ácido gálico (26,80 µg /mL), en donde se evidencia que la capacidad antioxidante de la fracción de **AcOEt Aa** (40,7 µg /mL) fue la que presentó el mejor resultado entre las fracciones de la especie aunque es muy alta en comparación con el valor del patrón.

Tabla 12. IC_{50} del extracto y fracciones para la especie *A. acuminata*, calculados por el método de decoloración del radical del radical $ABTS^{\bullet+}$.

EXTRACTO O FRACCIÓN	IC_{50} µg/mL
Hex Aa	148,2
$CHCl_3$ Aa	41,98
AcOEt Aa	40,7
EtOH Aa	152,6
RHEt Aa	47,8

De acuerdo con lo anterior, el extracto y las fracciones evaluadas presentan una capacidad antioxidante mayor con respecto al ácido gálico, las fracciones de **AcOEt Aa, $CHCl_3$ Aa** y **RHEt Aa** fueron las que presentaron menores valores de IC_{50}, de 40,7 µg /mL, 41,98 µg /mL y 47,8 µg /mL, respectivamente, la fracción de **Hex Aa** y el **EtOH Aa** mostraron valores altos de IC_{50}, 148,2 y 152,6 µg/mL. Teniendo en cuenta éstos resultados, esas fracciones muestran una baja captación de radicales libres.

Para las especies *Alnus glutinosa*, y *Alnus orientalis* se evaluaron los extractos acuosos y en metanol por el método de $ABTS^{\bullet+}$, reportando un IC_{50} de 69,54 µg/mL para el extracto metanólico de la especie *A. orientalis* y de 85,12 µg/mL de este mismo extracto para la especie A. *glutinosa,* las cuales fueron comparadas frente al patrón de referencia de ácido ascórbico (IC_{50}=7,12 µg/mL). Se observó que estas especies contienen flavonoides, derivados de estilbenos, amidas de ácido hidroxil-cinámico-espermidina, taninos, esteroides, ácidos triterpénicos, saponinas,

triterpenos de tipo secodammarano, heptanoides de diarilo y derivados de xantona, sin embargo, para la especie *A. glutinosa,* se aisló el ácido shikímico el cual presentó una IC_{50} de 33,58 µg/mL, este resultado confirma que el compuesto principal responsable de este efecto es el ácido shikímico. (Çiğdem Altınyay, Ipek Süntar, 2016).

3.2.1.5 Comparación de la capacidad antioxidante del extracto y fracciones para la especie *A. acuminata*, por los métodos de DPPH$^{\bullet}$ y de ABTS$^{\bullet+}$.

Se determinó la concentración media inhibitoria por los métodos del DPPH$^{\bullet}$ y el ABTS$^{\bullet+}$ **(Tabla 13)** del extracto y fracciones de hojas de *A. acuminata*, **AcOEt Aa;** se encontró un valor de IC_{50}, en DPPH$^{\bullet}$ de 28,85 µg/mL, y ABTS$^{\bullet+}$ de 40,7 µg/mL, la fracción de **$CHCl_3$ Aa**, por el método ABTS$^{\bullet+}$ de 41,98 µg/mL y DPPH$^{\bullet}$ de 22,95 µg/mL, la fracción **Hex Aa**, por el método ABTS$^{\bullet+}$ en 148,2 µg/mL y DPPH$^{\bullet}$ de 79,75 µg/mL, el **EtOH Aa** por el método ABTS$^{\bullet+}$ de 152,6 µg/mL y DPPH$^{\bullet}$ de 154,8µg/mL y **RHEt Aa** por el método ABTS$^{\bullet+}$ de 47,8 µg/mL y DPPH$^{\bullet}$ de 24,31 µg/mL.

Tabla 13. Comparación de la capacidad antioxidante del extracto y fracciones para la especie *A. acuminata,* calculados por los ensayos de DPPH$^{\bullet}$ y ABTS$^{\bullet+}$.

EXTRACTO O FRACCIÓN	IC_{50} µL/mL DPPH$^{\bullet}$	IC_{50} µg /mL ABTS$^{\bullet+}$
Hex Aa	79,75	148,2
$CHCl_3$ Aa	22,95	41,98
AcOEt Aa	28,85	40,7
EtOH Aa	154,8	152,6
RHEt Aa	24,31	47,8

En la **Figura 20,** se observa que los IC_{50} calculados por el método de DPPH$^{\bullet}$ son menores en casi todos los casos que los calculados por el método del radical ABTS$^{\bullet+}$. Esto se debe a la longitud de onda a la cual se realizaron las medidas para cada ensayo. En el ensayo de ABTS$^{\bullet+}$ se tomó una longitud de onda de 734 nm, mientras que, para el ensayo DPPH$^{\bullet}$ se midió a 520 nm. Desde la región del visible hay interferencias en la medición de compuestos coloreados como antocianinas y carotenoides que estén presentes en los extractos evaluados a 520 nm (Tovar del

Rio, 2013). Se evidencia que las fracciones de **$CHCl_3$ Aa** y **AcOEt Aa** por el ensayo $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$ tienen el IC_{50} más bajo, concluyendo que estas presentan la mejor capacidad antioxidante por ambos métodos.

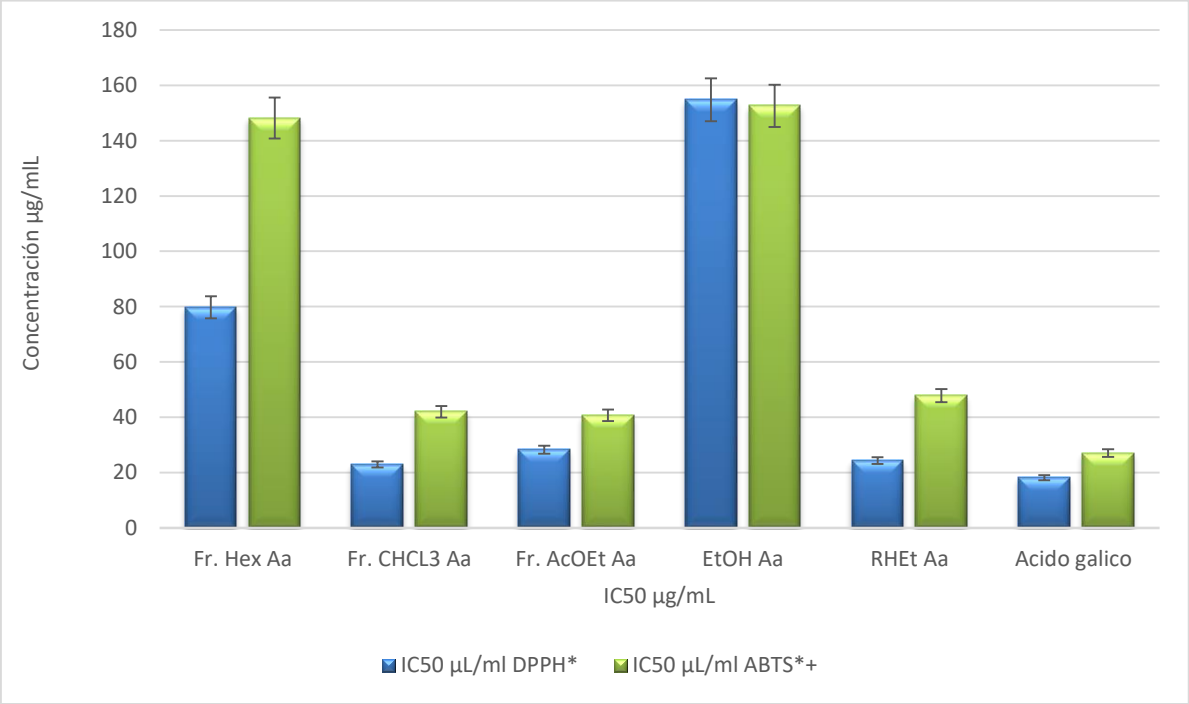


Figura 20. Comparación de la capacidad antioxidante del extracto y fracciones de *A. acuminata,* calculados por los ensayos $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$

3.2.2 Capacidad antioxidante de la especie *S. pyramidalis*.

3.2.2.1 Captura del radical libre $DPPH^{\bullet}$ para la especie *S. pyramidalis*.

En la **Tabla 14**, se observa que **AcOEt Sp** obtuvo el mayor porcentaje de inhibición de radicales libres con un valor de 88,98%, mientras que **EtOH Sp** presenta un valor intermedio de 50,31%, por el contrario, las fracciones de **Hex Sp, $CHCl_3$ Sp** y el **RHEt Sp** tiene porcentajes bajos de 15,82 %; 14,79% y 18,8% respectivamente.

Tabla 14. Porcentaje de Captación de $DPPH^{\bullet}$ del extracto y fracciones para la especie *S. pyramidalis*.

Volumen µL	Concentración µg/mL	Hex. Sp	$CHCl_3$ Sp	AcOEt Sp	EtOH Sp	RHEt Sp
2,5	23	9,90	7,86	40,71	22,45	5,71
5	46	11,84	9,69	62,86	30,00	10,61
10	92	13,06	11,73	79,80	38,67	13,37
20	184	15,82	14,80	88,98	50,31	18,88

3.2.2.2 Comparación de los valores de IC_{50} del extracto y fracciones para la especie *S. pyramidalis*, por el método ($DPPH^{\bullet}$)

En la **Tabla 15** se compararon los valores de IC_{50} del extracto y las fracciones frente al ácido gálico (26,80 µg/mL), en donde se evidencia que la capacidad antioxidante de **AcOEt Sp** y **EtOH Sp** fueron las que presentaron el mejor resultado en relación a la del patrón con un porcentaje mayor al 50%, por el contrario las demás fracciones presentaron valores de IC_{50} > a 184 µg/mL.

Tabla 15. IC_{50} del extracto y fracciones para la especie *S. pyramidalis*, calculados por el método del $DPPH^{\bullet}$.

EXTRACTO O FRACCIÓN	IC_{50} µg/mL $DPPH^{\bullet}$
EtOH Sp	183,70
AcOEt Sp	30,69
$CHCl_3$ Sp	< 184
Hex. Sp	< 184
RHEt Sp	< 184

En un estudio sobre la capacidad antioxidante por el método del $DPPH^{\bullet}$ para la especie *Smallanthus sonchifolius* (yacón) (Sugahara, Ueda, Fukuhara, Kamamuta, Matsuda, Murata, Kuroda, 2015), se evidenció que el extracto etanólico, la fracción metanólica y la fracción de acetato de etilo a una concentración de 500 µg/mL, presentan porcentajes de captación de radicales libres del 81,0%, 52,0% y 72,6% respectivamente. Los valores de IC_{50} del extracto etanólico, la fracción metanólica y la fracción de acetato de etilo fueron de 480 µg/mL, 292 µg/mL y 324 µg/mL respectivamente. Por lo tanto, los potentes constituyentes hidrófilos presentes en las hojas del *S. sonchifolius* y *S. pyramidalis* presentan polifenoles altamente solubles en agua, lo cual pueden contribuir a la capacidad de barrido del radical del $DPPH^{\bullet}$ más que los componentes hidrófobos.

En la literatura el género *Smallanthus* (Castañeda, 2008), se ha caracterizado por tener metabolitos como terpenos, flavonoides, lactonas y fenoles; por lo que su capacidad antioxidante podría atribuirse a estos metabolitos secundarios.

3.2.2.3 Método de decoloración con el radical catiónico ($ABTS^{\bullet+}$) para la especie *S. pyramidalis*.

En la **Tabla 16** se observa que las fracciones **AcOEt Sp** y **EtOH Sp** presentaron los mayores porcentajes con valores de 82,38 % y 50,06 %, mientras que las fracciones de **Hex Sp, $CHCl_3$ Sp** y **RHEt Sp** representaron menor porcentaje en todas las concentraciones evaluadas con valores menores al 20%, por lo que se necesita una mayor concentración para inhibir el 50% de los radicales libres.

Tabla 16. IC_{50} del extracto y fracciones para la especie *S. pyramidalis*, calculados por el método de decoloración del radical del radical $ABTS^{\bullet+}$.

Volumen µL	Concentración µg/mL	Hex. Sp	$CHCl_3$Sp	AcOEt Sp	EtOH Sp	RHEt
2,5	23	2,17	2,30	34,23	16,35	3,45
5	46	6,13	4,47	55,68	24,78	5,87
10	92	8,94	9,07	70,50	38,06	11,24
20	184	14,69	12,01	82,38	50,06	15,58

El $ABTS^{\bullet+}$, es un radical catiónico estable, se ha utilizado ampliamente para detectar la capacidad de eliminación de radicales de los antioxidantes lipófilos e hidrófobos responsables de las capacidades donadoras de electrones e hidrógeno (Pellegrini, 1999). Como se muestra en la tabla anterior, un aumento dependiente de la concentración de la actividad de eliminación de radicales de cationes $ABTS^{\bullet+}$ se demostró de manera similar con respecto al método de $DPPH^{\bullet}$ en la fracción **AcOEt Sp**.

3.2.2.4 Capacidad antioxidante del extracto y fracciones para la especie *S. pyramidalis,* por el método de $ABTS^{\bullet+}$

Los resultados obtenidos de la evaluación de la capacidad antioxidante con el radical $ABTS^{\bullet+}$ (**Tabla 17**). La fracción de **AcOEt Sp** fue el tratamiento más activo, el cual presentó un valor de IC_{50} de 40,12 µg/mL. Las demás fracciones tienen valores de IC_{50} muy altos, que sobrepasan los 184 µg/mL y por ende clasifican como extractos de bajo potencial antioxidante.

Tabla 17. IC_{50} del extracto y fracciones para la especie *S. pyramidalis*, calculados por el método de decoloración del radical $ABTS^{\bullet+}$.

EXTRACTO O FRACCIÓN	IC_{50} µg/mL $ABTS^{\bullet+}$
AcOEt Sp	40,12
EtOH Sp	< 184
$CHCl_3$ Sp	< 184
Hex. Sp	< 184
RHEt Sp	< 184

Estos valores de IC_{50} obtenidos podrían deberse al comportamiento cinético de las fracciones durante la reacción y su relación con la manera en la cual se calcula el IC_{50}. Muchas estudios han demostrado que hay una relación no-lineal entre la concentración del antioxidante y la concentración del radical $DPPH^{\bullet}$ (Zheng, Wang, Chen, Lin, 2011) y como consecuencia de esto, la determinación del IC_{50} se hace más compleja, puesto que en la regresión no-lineal deben tenerse en cuenta factores como el modelo de regresión que se va utilizar y las opciones de ponderación. Si en la reacción del antioxidante con el radical catión $ABTS^{\bullet+}$ el porcentaje de capacidad antioxidante incrementa proporcionalmente al aumento de la concentración y no consigue un estado estacionario, se puede inferir que, el valor IC_{50} va a ser muy alto en el momento de hacer la regresión no-lineal lo cual podría explicar los valores obtenido para los extractos vegetales por medio del ensayo $ABTS^{\bullet+}$ (Tovar del Rio, 2013).

En estudios sobre capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial y el extracto etanólico de *Smallanthus sonchifolius* (Mendoza, Parra, Loza, 2014) se identificaron 35 componentes, de los cuales presentó similitudes en algunos terpenos reportados en el aceite esencial de la especie *Smallanthus pyramidalis*, como el espatulenol, α-Pineno, o-cimeno, β-mirceno entre otros, estos terpenos demostraron que el aceite esencial de hojas de yacón presenta actividad captadora de radicales libres tanto con el método de $DPPH^{\bullet}$ como por el método del $ABTS^{\bullet+}$, se obtuvo a una concentración de IC_{50} del aceite esencial de 17,5 mg/mL, además se evidenció la presencia de compuestos fenólicos en forma de glucósidos y agliconas, en las fracciones y el extracto etanólico de hojas de yacón eluidas de la columna de HPLC, los cuales pueden ser los causantes de que tengan una capacidad antioxidante importante. En el estudio de (Guzmán, Barrera, 2010) sobre la especie *S. pyramidalis* se encontró también compuestos fenólicos como el flavonoide Izalpinina en hojas.

3.2.2.5 Comparación de los valores de IC_{50} del extracto y fracciones para la especie *S. pyramidalis*, por los métodos $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$.

En la **Tabla 18**, se observa que la fracción **AcOEt Sp** presentó un valor de IC_{50} para $DPPH^{\bullet}$ de 30,69 µg/mL y para $ABTS^{\bullet+}$ de 40,12 µg/mL.

Tabla 18. Comparación de la capacidad antioxidante de la fracción **AcE Sp** para la especie *S. pyramidalis,* calculados por los ensayos $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$.

EXTRACTO O FRACCIÓN	IC_{50} µg/mL $ABTS^{\bullet+}$	IC_{50} µg/mL $DDPH^{\bullet}$
AcOEt Sp	40,12	30,69

La actividad antioxidante de los polifenoles se atribuye generalmente a sus grupos hidroxilo. Los compuestos fenólicos como los flavonoides, actúan como antioxidantes, capturando especies reactivas de oxigeno previniendo así la oxidación celular; en estudios anteriores sobre la especie *S. pyramidalis* fue aislado y determinado por técnicas espectroscópicas un flavonoide denominado: 5-hidroxi-7-metoxi-flavonol (Izalpinina) (Guzmán, Barrera, 2010). Debido a la presencia de estos compuestos, los cuales fueron identificados por MFP y en comparación por

CCD con patrones de referencia, podría explicar que la fracción de **AcOEt Sp** presenta capacidad antioxidante importante.

La actividad antioxidante de algunas especies del género *Smallanthus* han sido evaluadas por (Veioglu, Mazza, Gao, Oomah, 1998), donde indican que existe una cierta correlación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante, en muchos casos también hubo capacidad antioxidante en las hojas de esta especie lo cual puede ser atribuible a otras sustancias no identificadas o a interacciones sinérgicas (Valentova, Cvak, Muck, 2002).

3.3 CUANTIFICACION DE FENOLES

La determinación de los fenoles totales presentes en las fracciones y el extracto de *A. acuminata* y *S. pyramidalis* se realizó por el método de Folin-Ciocalteu (Magalhães, Santos, Segundo, Reis, y Lima, 2010), para aquellas fracciones que presentaron la mejor capacidad de capturar radicales libres por los métodos del $DPPH^{\bullet}$ y el $ABTS^{\bullet+}$.

Se realizó la curva de calibración del ácido gálico, presentando un coeficiente de correlación de 0,9962 **(Figura 21)**; la cual permitió establecer el contenido de fenoles totales para las fracciones de **$CHCl_3$ Aa**, **AcOEt Aa** y el **RHEt Aa** en el caso de la especie *A. acuminata* mientras que para la especie *S. pyramidalis* fue la fracción de **AcOEt Sp**.

Tabla 19. Curva de calibración del ácido gálico

Concentración (ppm)	Abs
100	0,055
200	0,289
300	0,478
400	0,699
500	0,856

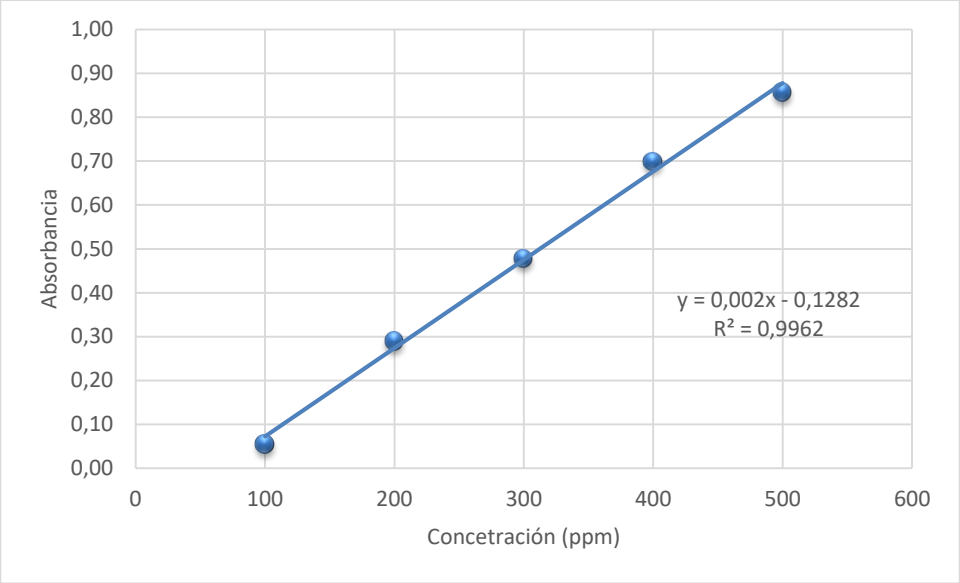


Figura 21. Curva de calibración del ácido gálico

3.3.1 Cuantificación de fenoles para la especie *Alnus Acuminata*.

En la **Tabla 20** se presenta el contenido total de fenoles (CTF) en equivalente de ácido gálico (EAG) (μg de ácido gálico / mg de fracción (Fr)) para **$CHCL_3$ Aa, AcOEt Aa** y **RHEt Aa.**

Tabla 20. Contenido total de fenoles para las fracciones de **$CHCl_3$ Aa, AcOEt Aa** y **RHEt Aa** para la especie *A. acuminata*.

Fracción o extracto	Concentración (μg /mL)	EAG (μg /ml)
$CHCl_3$ Aa	400	252
	200	240
	100	204
AcOEt Aa	400	292
	200	236
	100	224
RHEt Aa	400	224
	200	208
	100	204

En muchos estudios se ha demostrado la relación que existe entre el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante, sin embargo, no se podría considerar que la capacidad que tienen las fracciones de capturar radicales libres sea solo por la presencia de compuestos fenólicos, debido a que en su composición química pueden existir otros metabolitos secundarios que puedan contribuir a su eficiencia antioxidante (Tovar del Rio, 2013).

Al comparar la cantidad de equivalentes de ácido gálico entre las fracciones de la especie vegetal se evidencia que la suma total de los fenoles presentes en las fracciones de hojas de la especie *A. acuminata*, presenta una concentración similar en donde la fracción **AcOEt Aa** fue la que presentó el mejor resultado con un equivalente de ácido gálico de 292 µg/mL mientras que la más baja fue el **RHEt Aa** con 224 µg/mL EAC, cabe destacar que a pesar de tener un valor bajo corresponde a una concentración alta de equivalentes de ácido gálico.

3.3.2 Cuantificación de fenoles para la especie *Smallanthus pyramidalis*.

En la **Tabla 21** se presenta el contenido total de fenoles (CTF) en equivalente de ácido gálico (EAG) (µg de ácido gálico /mg de fracción (Fr)) para la fracción de **AcOEt Sp**.

Tabla 21 Contenido total de fenoles para la fracción **AcOEt Sp** para la especie *S. pyramidalis*.

Fracción o extracto	Concentración (µg/mL)	EAG (µg /mL)
AcOEt Sp	400	280
	200	232
	100	206

Con respecto a la especie *S. pyramidalis,* presenta en su fracción **AcOEt Sp** en la concentración de 400 µg/mL un valor de equivalente de ácido gálico de 280 µg /mL, este resultado muestra que, contiene compuestos fenólicos en una cantidad significativa, esto se debe a que en solventes polares, mejora significativamente la concentración de fenoles totales, lo anterior se debe principalmente al número de

grupos -OH presentes en los compuestos fenólicos que favorecen su solubilidad (Al-Farsi, Lee, 2008). Por lo tanto, la concentración de compuestos fenólicos, a su vez relacionada con la actividad antioxidante de la fracción **AcOEt Sp** puede evitar daños causados por radicales libres y retrasar la aparición de enfermedades neurodegenerativas y accidentes cerebrovasculares (Al-Farsi, Lee, 2008).

Cabe señalar que la capacidad antioxidante no está simplemente relacionada con los compuestos fenólicos totales determinados en los extractos. Los siguientes hechos deben ser tomados en cuenta: La existencia de agliconas libres como flavonoides, además del hecho de que pueden ocurrir interacciones entre los componentes del extracto o fracción (Gracia, 2007).

3.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Con el objetivo de evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico y las fracciones de las especies vegetales *S. pyramidalis* y *A. acuminata* frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli*, *Bacillus subtillis, Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium, klebsiella pneumoniae, Pseudonoma aeruginosa y Proteus mirabilis,* se realizó un estudio en el que se compara la capacidad de los extractos y fracciones vegetales para inhibir el crecimiento de los microorganismos a través del método de Kirby-Bauer usando como controles positivos el ciprofloxacino, ampicilina y gentamicina, teniendo en cuenta que son antibióticos de amplio espectro activo en técnicas *in vitro* contra un gran número de bacterias, ya que previene la formación de enlaces peptídicos y la síntesis proteica en gran variedad de organismos Gram positivos y Gram negativos, mientras que para los hongos y levaduras como *Candida albicans, Aspergillus brasiliensis* y *Triphophytum rubrum* se utilizó como control positivo el fluconazol y el voriconazol.

3.4.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de las fracciones y el extracto etanólico de la especie *A. acuminata*.

3.4.1.1 Bacterias Gram positivas

En la **Tabla 22** se muestran los resultados frente a las bacterias *Bacillus subtilis* con respecto al control positivo Ciprofloxacino y en la **Tabla 23** frente a la bacteria S*taphylococcus aureus* con respecto al control positivo Ciprofloxacino del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata.*

Tabla 22. Porcentaje de inhibición frente a *Bacillus subtilis* del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata*.

Extracto o fracción	*Bacillus subtilis*			$\bar{x}$	% de inhibición
Halos de inhibición	1	2	3		
Hex. Aa	10,5	9,5	9,9	9,9	10,81
$CHCl_3$ Aa	11,7	8,3	9,5	9,5	9,55
AcOEt Aa	8,3	9,1	8,1	8,5	6,55
EtOH Aa	9,9	9,4	9,6	9,9	10,60
RHEt Aa	8,7	8,3	--	8,5	6,51
Control positivo (Ciprofloxacino)	40,1	38,1	39,0	39,1	--

Tabla 23. Porcentaje de inhibición frente a S*taphylococcus aureus* del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata*.

Extracto o fracción	*Staphylococcus aureus*				$\bar{x}$	% de inhibición
Halos de inhibición	1	2	3	4		
Hex. Aa	10,8	10,3	14,3	12,9	12,1	22,42
$CHCl_3$ Aa	11,6	10,9	11,6	12,9	11,8	21,22
AcOEt Aa	11,1	11,0	11,4	13,2	11,7	20,78
EtOH Aa	10,3	9,7	9,3	9,4	9,7	12,88
RHEt Aa	8,3	9,7	9,4	9,0	9,1	10,58
Control positivo (Ciprofloxacino)	28,5	31,6	38,3	28,5	31,7	--

Se puede apreciar que el porcentaje de inhibición de los extractos y fracciones de la especie vegetal *A. acuminata* fue moderado frente al microorganismo *Staphylococcus aureus* **(Figura 22)**, en donde la fracción de **Hex Aa** fue la que reportó el mejor porcentaje de inhibición de 22,42% seguidas de las fracciones de

$CHCl_3$ Aa y **AcOEt Aa** con valores de 21,22 % y 20,78 % respectivamente, mientras que para **EtOH Aa** y **RHEt Aa** mostraron un porcentaje de inhibición mínimo de 12,88% y 10,58 %. Por otro lado, la gráfica nos permite apreciar que dicho porcentaje de inhibición fue menor para las fracciones y extracto vegetal de la especie en presencia del microorganismo *Bacillus subtilis* en donde su porcentaje de inhibición varía entre un rango de 6,51 % a 10,81 %, siendo la fracción de **Hex Aa** la que mejor reporta actividad, para **RHEt Aa** es la que presenta el valor más bajo.

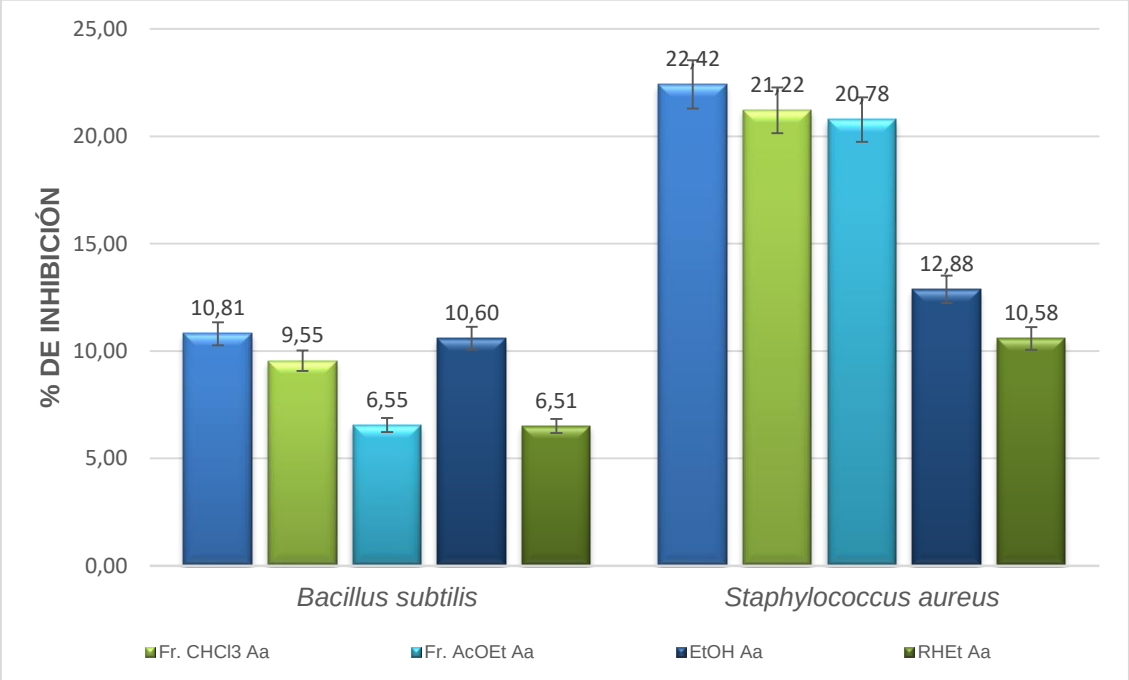


Figura 22. Porcentaje de inhibición del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata* frente a bacterias de tipo Gram positivas.

De acuerdo con lo anterior, el poder inhibidor del crecimiento microbiano de las fracciones y del extracto vegetal frente a microorganismo de tipo Gram positivo es mínimo. Siendo la fracción de **Hex Aa** la que mejor reportó valores de inhibición frente a este tipo de patógenos en la **Figura 23** se muestra los halos de inhibición frente a los dos microorganismos.

a. b.

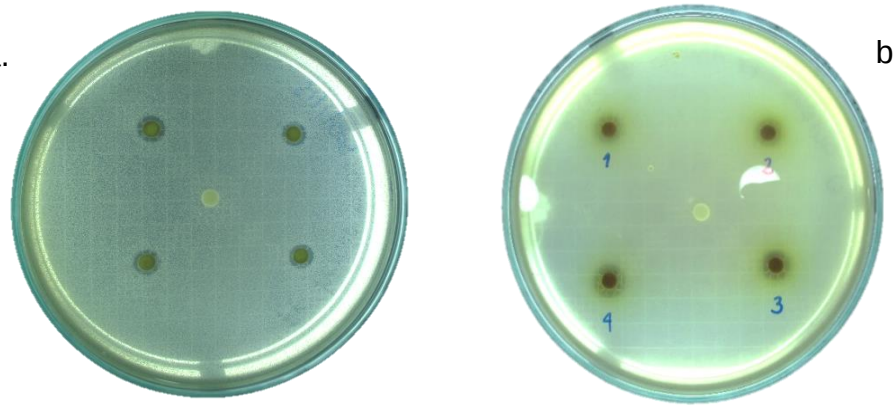


Figura 23. Halos de inhibición de la fracción de **Hex Aa** frente a los microorganismos *Bacillus subtilis (a)* y *Staphylococcus aureus* (b).

Las posibles razones para que el crecimiento del microorganismo se viera poco afectado es la existencia de mecanismos de resistencia por parte de *Staphylococcus aureus y Bacillus subtilis,* la cual está relacionada con la activación de una síntesis de la pared celular, con hiperproducción de proteínas ligadoras de penicilinas, engrosamiento de la pared y el encarcelamiento de fármacos por hiperproducción de los componentes de pared (Tavares, 2000). El principal mecanismo de resistencia de estos microorganismos es que envuelve la introducción de mutaciones en los genes que codifican las proteínas además cabe mencionar que la presión selectiva juega un papel importante y el uso de antibióticos β-lactámicos se cita como un factor de riego para la infección y colonización.

Particularmente el microorganismo *B. subtilis* no es considerado como un patógeno humano (Madigan, 2006); sin embargo, puede contaminar los alimentos, pero raramente causa intoxicación alimenticia, además que diversos autores llegaron a la conclusión que este microorganismo es capaz de coordinar la liberación de ADN al medio y su captación por otros individuos de la población, lo cual para los autores es fundamental desde un punto de vista evolutivo (Zafra, 2012).

Por su parte la bacteria *S. aureus* utiliza como mecanismo de defensa la producción de la enzima coagulasa que hace que se deposite el material de fibrina sobre los cocos protegiéndoles del ataque por las células del hospedador, producción de

proteasas, nucleasas y lipasas que sirven para despolimerizar las proteínas del hospedador, los ácidos nucleicos y las grasas, el desarrollo de una vía bioquímica resistente la cual puede tener lugar por intercambio genético bloqueando el agente antimicrobiano y por eflujo donde el microorganismo es capaz de bombear hacia afuera el antimicrobiano que va entrando en la célula (Lizcano, 2008).

En un estudio (Dahija, 2012), se reporta para tres especies del género *Alnus, Alnus glutinosa, Alnus incana* y *Alnus viridis* los halos de inhibición frente a los dos microorganismos estudiados, la mejor actividad fue frente al micoorganismo *Staphylococcus aureus* ya que las tres especies vegetales reportan halos de inhibición entre 22 y 25 mm, mientras para la especie *A. acuminata* el halo de mayor tamaño de inhibición fue de 14,3 mm de la fracción **Hex Aa**, lo que nos indica que la actividad antimicrobiana de esta especie es baja con respecto de las otras especies de este mismo género.

Por otra parte, para el microorganismo Gram positivo *Bacillus subtilis*, el estudio reporta halos de inhibición de 9 mm para la especie *Alnus glutinosa,* 19 mm para *Alnus incana* y 22 mm para *Alnus viridis* (Dahija, 2012), por su lado la especie *A.acuminata* reportó un halo de inhibición de 10,5 mm, el cual podemos decir que tiene un potencial antimicrobiano frente a este microorganismo bajo.

3.4.1.2 Bacterias Gram negativas

Se muestran los resultados del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata* frente a las bacterias *Escherichia coli* **(Tabla 24)** con respecto al control positivo ampicilina*, Pseudomonas aeruginosa* **(Tabla 25)** con respecto al control positivo Gentamicina*, Klebsiella pneumoniae* **(Tabla 26)** con respecto al control positivo ampicilina, *Proteus mirabilis* **(Tabla 27)** con respecto al control positivo ampicilina y *Salmonella typhimurium* **(Tabla 28)** con respecto al control positivo ampicilina.

Tabla 24. Porcentaje de inhibición frente a *Escherichia coli* del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata*.

Extracto o fracción	*Escherichia coli*				$\bar{x}$	% de inhibición
Halos de inhibición	**1**	**2**	**3**	**4**		
Hex. Aa	--	--	--	--	--	--
$CHCl_3$ Aa	--	--	--	--	--	--
AcOEt Aa	--	--	--	--	--	--
EtOH Aa	7,8	7,2	7,9	7,2	7,5	6,91
RHEt Aa	6,8	6,9	6,5	6,9	6,7	3,22
Control positivo (ampicilina)	27,1	28,3	26,7	28,9	27,7	--

Tabla 25. Porcentaje de inhibición frente a *Pseudomonas aeruginosa* del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata*.

Extracto o fracción	*Pseudomonas aeruginosa*				$\bar{x}$	% de inhibición
Halos de inhibición	**1**	**2**	**3**	**4**		
Hex. Aa	7,3	7,3	7,2	7,1	7,2	23,07
$CHCl_3$ Aa	--	--	--	--	--	--
AcOEt Aa	--	--	--	--	--	--
EtOH Aa	9,3	8,9	9,3	9,6	9,3	59,57
RHEt Aa	--	--	--	--	--	--
Control positivo (Gentamicina)	10.2	12.8	11.6	10.3	11.2	--

Tabla 26. Porcentaje de inhibición frente a *Klebsiella pneumoniae* del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata*.

Extracto o fracción	*Klebsiella pneumoniae*				$\bar{x}$	% de inhibición
Halos de inhibición	**1**	**2**	**3**	**4**		
Hex. Aa	--	--	--	--	--	--
$CHCl_3$ Aa	7,69	7,61	7,84	7,83	7,7	7,23
AcOEt Aa	--	--	--	--	--	--
EtOH Aa	8,67	9,69	10,10	9,73	9,5	16,95
RHEt Aa	8,72	8,76	9,37	9,65	9,1	14,67
Control positivo (ampicilina)	23,80	25,60	25,01	25,45	25,0	--

Tabla 27. Porcentaje de inhibición frente a *Proteus mirabilis* del extracto y fracciones de la especie *A.acuminata*.

Extracto o fracción	***Proteus mirabilis***				**x̄**	**% de inhibición**
Halos de inhibición	**1**	**2**	**3**	**4**		
Hex. Aa	9,30	9,62	10,25	9,95	9,8	9,88
$CHCl_3$ Aa	9,23	*8,73*	11,02	9,26	9,6	9,23
AcOEt Aa	10,87	11,68	11,71	11,52	11,4	14,75
EtOH Aa	9,12	9,17	9,19	9,78	9,3	14,78
RHEt Aa	11,76	11,93	11,80	12,09	11,9	16,06
Control positivo (ampicilina)	40,65	40,42	40,45	40,89	40,6	--

Tabla 28. Porcentaje de inhibición frente a *Salmonella typhimurium* del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata*.

Extracto o fracción	***Salmonella typhimurium***				**x̄**	**% de inhibición**
Halos de inhibición	**1**	**2**	**3**	**4**		
Hex. Aa	7,65	7,43	9,66	8,95	8,4	6,03
$CHCl_3$ Aa	8,87	*9,30*	10,03	9,47	9,4	10,02
AcOEt Aa	7,67	8,73	7,58	7,69	7,9	4,52
EtOH Aa	--	--	--	--	--	--
RHEt Aa	9,65	8,24	8,57	9,57	9,0	7,77
Control positivo (ampicilina)	40,12	40,99	39,58	39,02	39,9	--

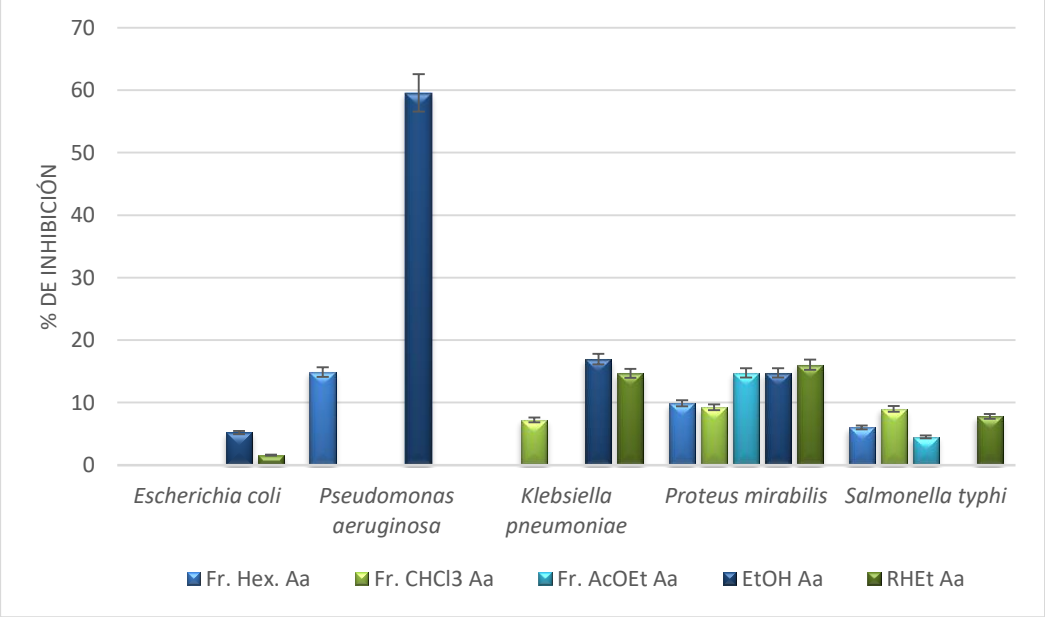


Figura 24. Porcentaje de inhibición del extracto y fracciones frente a bacterias de tipo Gram negativos.

En el caso de los microrganismos Gram negativos se evidencia que el poder inhibidor de las fracciones y el extracto de la especie *A. acuminata* fue similar con respecto a los organismos de tipo Gram positivo, es decir fue bajo. Las fracciones más polares, el **EtOH Aa** y **RHEt Aa** reportan los mejores valores como se evidencia en la **Figura 24**, en ella se destacan valores para el microorganismo *Klebsiella pneumoniae* de 16,95% y 14,67%, mientras que en el caso de la bacteria *Proteus mirabilis* se presentan valores de 14,78% y 16,06%, en la **Figura 25** se muestran los halos de inhibición. En el caso de las fracciones menos polares presentaron, resultados inferiores frente a estos dos tipos de microorganismos, sin embargo, en el caso del microorganismo de *Salmonella typhimurium* estas fracciones de **Hex Aa, $CHCl_3$ Aa** y **AcOEt Aa** fueron las que presentaron actividad antimicrobiana con valores de 6,03 %, 9,0% y 4,52 % respectivamente.

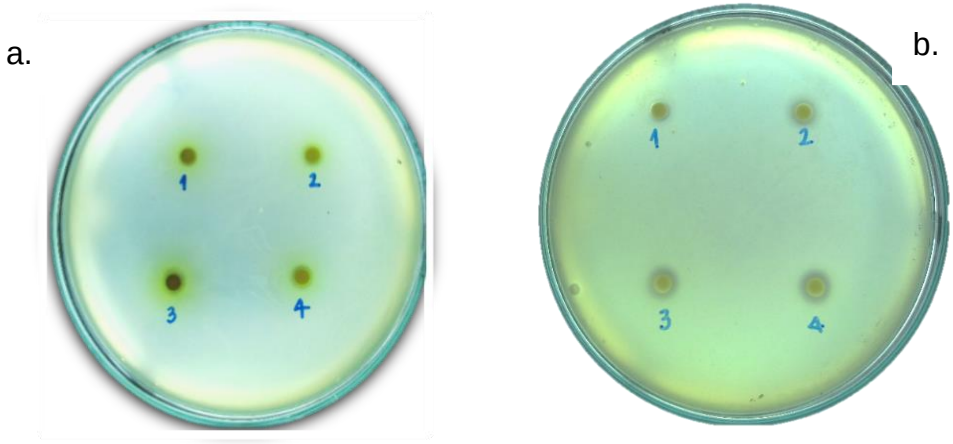


Figura 25. Halos de inhibición del **ExEtOH Aa** (a) frente al microrganismo *Klebsiella pneumoniae* y **RHEt Aa** (b) frente a *Proteus mirabilis*.

Para el caso de la bacteria *E. coli* el **EtOH Aa** y **RHEt Aa** son las fracciones que presentan mejor actividad por encima de las demás fracciones siendo los únicos que dan resultados positivos, aunque con muy bajos porcentajes (5,21 y 1,5 %). Finalmente, ninguna de las fracciones presentó actividad antimicrobiana frente al microorganismo *P. aeruginosa*. Este tipo de bacterias poseen una capa adicional en su pared que está compuesta de lipopolisacáridos. Los mecanismos de

resistencia de estas bacterias pueden presentarse como alteración del sitio blanco o diana de antimicrobianos, disminución de la permeabilidad de la pared por poseer una pequeña capa de peptidoglicano, la cual es más sensible, adquisición de mecanismo de flujo y cambio de vía metabólica.

Para el género *Alnus* se han reportado varios estudios en donde se evidencia la actividad antimicrobiana. El estudio de (Middeleton, 2005), comprobó la actividad antibacteriana de la especie *A. glutinosa,* mostrando que el extracto de metanol presentó actividad frente a ocho microorganismos: *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y *Staphylococcus aureus*, la más potente actividad se encontró frente al *E. coli*. En otro estudio (Saxena, 1995) evidenció la actividad antimicrobiana del extracto de metanol de la *A. rubra* contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, comprobando que los compuestos diarilheptanoides y su glucósido (oregonin) eran los dos constituyentes responsables de esta actividad (Santi, 2011).

Por otra parte, (Dahija, 2012), el género *Alnus* presenta actividad antimicrobiana como por ejemplo, las especies *Alnus glutinosa, Alnus incana* y *Alnus viridis* presentan actividad frente a tres microorganismos Gram negativas, en donde la especie *A. viridis* se destaca ya que muestra un halo de inhibición superior a 20 mm para los microrganismos *E. coli* para el cual obtuvo un halo de 21 mm**,** *P. aeruginosa* de 24 mm y *S. typhimurium* de 22 mm, mientras que la especie *Alnus glutinosa* tuvo valores de 12 mm, 14 mm, y 19 mm respectivamente para el microorganismo ya mencionado, y la especie *Alnus incana* solo presentó un halo de inhibición de 19 mm frente al microorgansmo *E. coli*. Al observar estos resultados se evidencia que la especie *A. acuminata* presenta halos de inhibición bajos, con respecto a especies de este mismo género, lo cual coincide en el estudio realizado por (Bussmann, 2011)en el que se evalúa la actividad antimicrobiana para la especie *A. acuminata* frente a los microorganismos *E. coli, S. aureus, S*. entérica y *P. aeuroginosa* donde solo presenta un halo de inhibición de 14 mm frente a la bacteria *E. coli.*

3.4.1.3 Hongos y levaduras

En la **Tabla 29** se puede apreciar que, para la levadura *Candida albicans*, las fracciones de **$CHCl_3$ Aa, AcOEt Aa** y el **RHEt Aa** mostraron una alta actividad llegando a superar los valores de porcentaje de inhibición del control positivo (fluconazol), siendo la fracción de **AcOEt Aa** la que mostró valores superiores de 206,73% con respecto a las demás fracciones. En estudios biológicos se ha reportado para la especie *A. acuminata* una actividad antimicrobiana en las fracciones de alta polaridad como la fracción n-butanol, en la que se aislaron metabolitos secundarios de naturaleza diarilheptanoide, estas estructuras se identificaron por métodos espectroscópicos y espectrofométricos, los compuestos aislados fueron la oregonina, hirsutenona, hirsutanonol, platifilenona y centrolobol (Avila, 2011). En la **Figura 26** se observan los halos de inhibición de las fracciones de **Hex Aa** y **RHEt Aa** frente al microorganismo *Candida albicans* con respecto al control positivo fluconazol.

Tabla 29. Porcentaje de inhibición frente a *Candida albicans* del extracto y fracciones de la especie *A. acuminata*.

Extracto o fracción	***Candida albicans***				$\bar{x}$	**% de inhibición**
Halos de inhibición	1	2	3	4		
Hex. Aa	--	--	--	--	--	--
$CHCl_3$ Aa	10,8	10,8	10,8	10,8	10,8	104,38
AcOEt Aa	15,9	14,8	16,0	15,1	15,4	206,73
EtOH Aa	--	--	--	--	--	--
RHEt Aa	11,1	12,0	12,0	13,5	12,2	134,83
Control positivo (fluconazol)	10,9	11,6	9,7	10,1	10,6	--

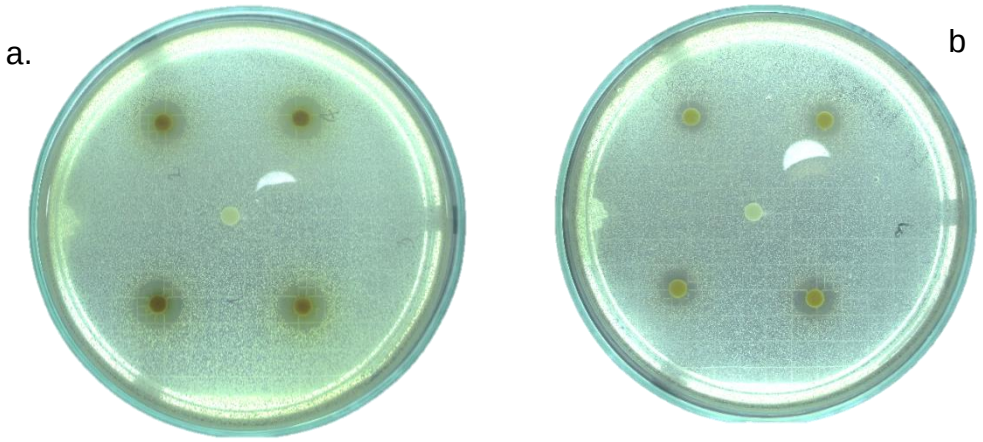


Figura 26. Halos de inhibición de las fracciones **Hex Aa** (a) y **RHEt Aa** (b) frente al microorganismo *Candida albicans.*

Sin embargo, se aclara que la actividad de estos metabolitos es de tipo inhibitorio y no fungicida, pues en los ensayos se observó una disminución de la tasa de crecimiento radial y no una inhibición total del crecimiento. Este hecho nos sugiere probar concentraciones más altas de los extractos y determinar posible actividad fungicida o concentraciones más bajas con el fin de establecer concentraciones mínimas inhibitorias (Parada, Sandoval, 2013).

Para los hongos *Aspergillus brasiliensis* y *Trichophyton rubrum* no se evidenció halos de inhibición en ninguna de las fracciones y extractos de la especie *A. acuminata* como se aprecia en la **Figura 27**. Lo anterior indica que los extractos y fracciones vegetales no presentaron una eficiente actividad antimicrobiana frente a este tipo de microorganismos, por ser complejos y adicionalmente, poseer diversos mecanismos de resistencia dentro de los que se encuentra la pared celular compuesta de polisacáridos (Quitina), proteínas, lípidos, iones inorgánicos y glucanos no celulósicos (Lizcano, 2008).

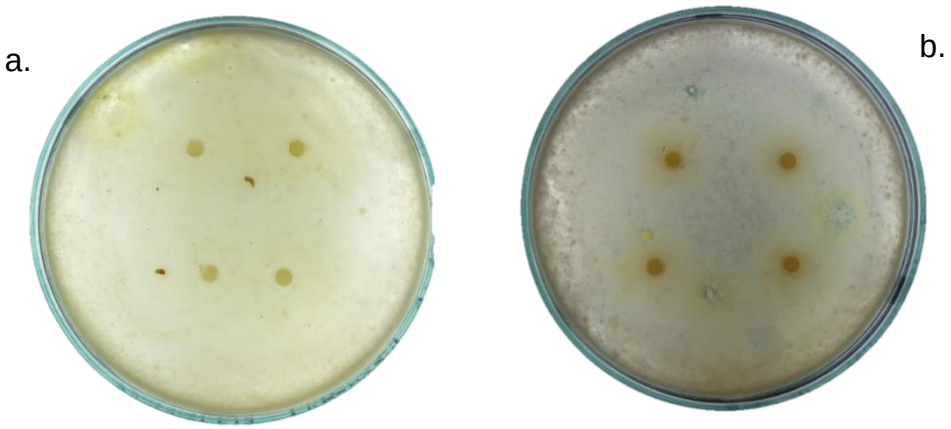


Figura 27. Halos de inhibición de las fracciones **Hex Aa** (a) y **AcOEt Aa** (b) frente al microorganismo *Aspergillus brasiliensis*.

Para las especies del género *Alnus*, se han publicado estudios que demuestran la actividad antimicrobiana, (Rashed, 2013) presentó que para la especie *Alnus rugosa* la mejor actividad se encontró en la fracción de acetato de etilo frente al organismo *A. brasiliensis*. Por otro lado, (Dahija, 2012), reportó que la especie *Alnus glutinosa* frente a la levadura *C.albicans* tuvo un halo de inhibición de 15 mm, 16 mm para *Alnus viridis* y ninguna actividad para la especie *Alnus incana*. La fracción de **AcOEt Aa** de la especie *A. acuminata* presenta un halo de inhibición promedio de 15.4 mm, lo cual indica que las especies de este género presentan una buena actividad antimicrobiana frente a este microorganismo, en donde la fracción de acetato de etilo se destaca debido a que estudios sugieren que en esta se encuentra la mayor concentración de metabolitos secundarios que influyen en el potencial anti fúngico como los terpenos, flavonoides y diarilheptanoides (Rashed, 2013).

Para el microorganismo *Aspergillus brasiliensis* (Dahija, 2012), reporta que solo la especie *A. viridis,* presentó un halo de inhibición de 19 mm, para las especies *A. incana* y *A.glutinosa* no se evidenció algún tipo de potencial antimicrobiana, al igual que para la especie estudiada *A. acuminata.*

3.4.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto y fracciones para la especie *Smallanthus pyramidalis*.

3.4.2.1 Bacterias Gram positivas

En la **Tabla 30** se muestran los resultados frente a las bacterias *Bacillus subtilis* con respecto al control positivo ciprofloxacino y en la

Tabla 31 frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* con respecto al control positivo ciprofloxacino, del extracto y fracciones de la especie *S. pyramidalis.*

Tabla 30. Porcentaje de inhibición frente a *Bacillus subtilis* del extracto y fracciones de la especie *S. pyramidalis*.

Extracto o fracción	*Bacillus subtilis*				$\bar{x}$	% de inhibición
Halos de inhibición	1	2	3	4		
Hex. Sp	12,7	11,7	13,7	11,9	12,5	18,60
$CHCl_3$ Sp	9,8	8,9	9,7	9,2	9,4	9,12
AcOEt Sp	6,6	7,1	6,8	7,4	7,0	1,78
EtOH Sp	10,4	11,0	11,0	12,1	11,1	14,41
RHEt Sp	9,1	8,6	6,8	6,2	7,7	4,06
Control positivo (ciprofloxacino)	40,1	39,1	38,1	39,0	39,1	--

Tabla 31. Porcentaje de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* del extracto y fracciones de la especie *S. pyramidalis*.

Extracto o fracción	*Staphylococcus aureus*				$\bar{x}$	% de inhibición
Halos de inhibición	1	2	3	4		
Hex. Sp	9,3	10,9	9,4	9,9	9,9	15,17
$CHCl_3$ Sp	9,6	8,9	9,6	10,4	9,6	12,8
AcOEt Sp	--	--	--	--	--	--
EtOH Sp	9,7	10,8	9,4	9,6	9,9	13,7
RHEt Sp	--	--	--	--	--	--
Control positivo (Ciprofloxacino)	28,5	31,6	38,3	28,5	31,7	--

Para las bacterias de tipo Gram positivas, las fracciones y el extracto de hojas *S. pyramidalis*, muestran unos porcentajes de inhibición relativamente bajos tanto para el microorganismo *Bacillus subtilis* como para *Staphylococcus aureus* **(Figura 28)**.

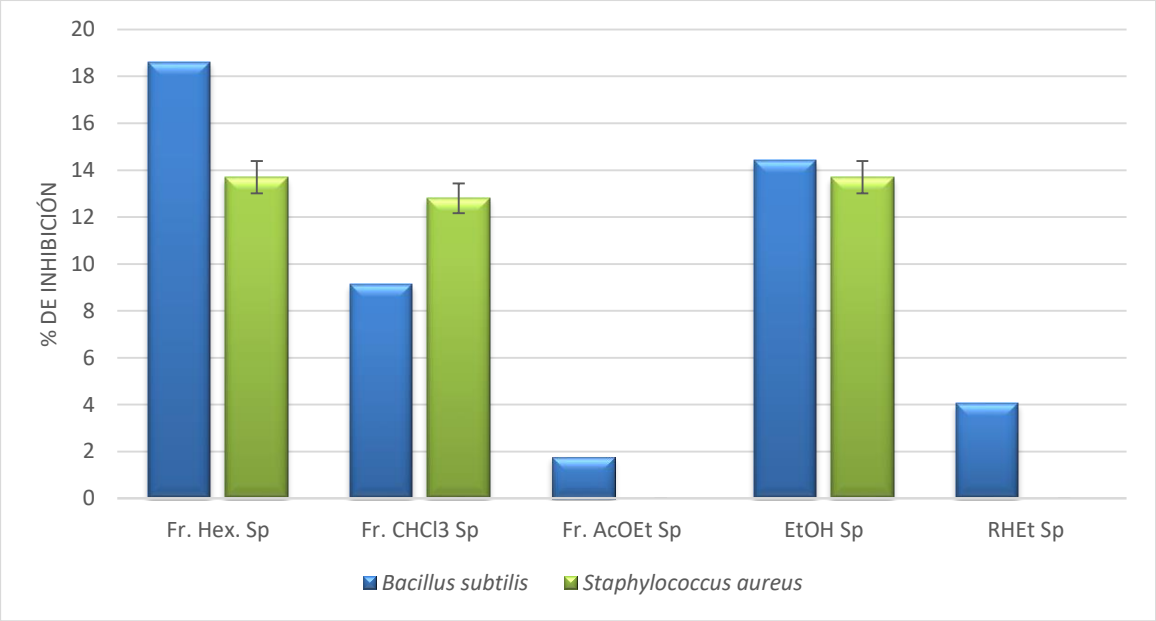


Figura 28. Porcentaje de inhibición del extracto y fracciones frente a bacterias de tipo Gram positivas de la especie *S. pyramidalis*.

Para la bacteria Gram positiva *B. subtilis,* la fracción de **Hex Sp** muestra el mayor porcentaje de inhibición promedio de 18,6%; seguido del **EtOH Sp** con un porcentaje de inhibición de 14,42%; y por último porcentajes de inhibición bajos de las fracciones de **$CHCl_3$ Sp** de 9,12%, fracción de **AcOEt Sp** de 1,8% y el **RHEt Sp** de 4,0%.

Un estudio sobre el *Smallanthus sonchifolius* (Ramos, Pereira, Braun, Hollander, Pupo, Tallarico, Said, Suraia, 2010), los extractos de acetato de etilo y n-butanol mostraron mayores actividades antimicrobianas contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas que los extractos de agua y etanol. La especie *S. sonchifolius*, mostró que para la bacteria Gram positiva de *Staphylococcus aureus* obtuvo el mejor resultado a partir de la fracción de acetato de etilo.

Varios estudios reconocen la actividad antimicrobiana a los compuestos como flavonoides y terpenos. Para este último tipo de metabolitos, estudios han demostrado propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales y han generado interés en cuanto a la determinación de la relación de su composición química y actividad. Estudios encaminados en dilucidar esta correlación han concluido que los

terpenos oxigenados son los principales contribuyentes a esta actividad (Chalcat, 1997). Varios estudios han logrado demostrar que los terpenos oxigenados son los responsables de la actividad inhibitoria contra bacterias, levaduras, hongos e incluso parásitos; en tanto los terpenos hidrocarbonados no demuestran actividad inhibitoria alguna, o si la muestran es muy leve (Prada, 2008). En este sentido, se podría pensar que los metabolitos secundarios tipo terpenoide, producidos por las hojas de *S. pyramidalis*, evaluados en este trabajo, son de carácter oxigenado. En el estudio de (Guzmán, Barrera, 2010) se presentan algunos de los terpenos oxigenados que posiblemente sean los que expliquen la actividad antifúngica.

3.4.2.2 Bacterias Gram negativas

Se muestran los resultados del extracto y fracciones de la especie *S. pyramidalis* frente a las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* **(Tabla 32)** con respecto al control positivo gentamicina*, Klebsiella pneumoniae* **(**

Tabla 33) con respecto al control positivo ampicilina, *Salmonella typhimurium* **(Tabla 34)** con respecto al control positivo ampicilina y *Proteus mirabilis* **(Tabla 35)** con respecto al control positivo ampicilina.

Tabla 32. Porcentaje de inhibición frente a *Pseudomonas aeruginosa* del extracto y fracciones de la especie *S. pyramidalis*.

Extracto o fracción	***Pseudomonas aeruginosa***				$\bar{x}$	**% de inhibición**
Halos de inhibición	**1**	**2**	**3**	**4**		
Hex. Sp	10,16	11,19	8,68	8,38	9,60	45,97
$CHCl_3$ Sp	--	--	--	--	--	--
AcOEt Sp	--	--	--	--	--	--
EtOH Sp	8,88	8,77	9,55	8,45	8,91	51,27
RHEt Sp	7,75	7,07	6,61	6,64	7,02	19,61
Control positivo (Gentamicina)	10,2	12,8	11,6	10,3	11,2	--

Tabla 33. Porcentaje de inhibición frente a *Klebsiella pneumoniae* del extracto y fracciones de la especie *S. pyramidalis*.

Extracto o fracción	*Klebsiella pneumoniae*				$\bar{x}$	% de inhibición
Halos de inhibición	**1**	**2**	**3**	**4**		
Hex. Sp	7,46	9,79	8,80	10,46	9,13	14,66
$CHCl_3$ Sp	7,99	9,00	8,07	6,98	8,01	8,65
AcOEt Sp	8,53	8,13	8,28	8,47	8,35	10,49
EtOH Sp	--	--	--	--	--	--
RHEt Sp	8,04	9,29	7,98	8,70	8,50	11,30
Control positivo (ampicilina)	23,8	25,6	25	25,5	25	--

En la **Figura 29** se observan que los halos de inhibición de las fracciones de **$CHCl_3$ Sp** y **Hex Sp** frente al microorganismo *Klebsiella pneumoniae* son bajos con porcentajes promedio de 10,49% y 14,66%.

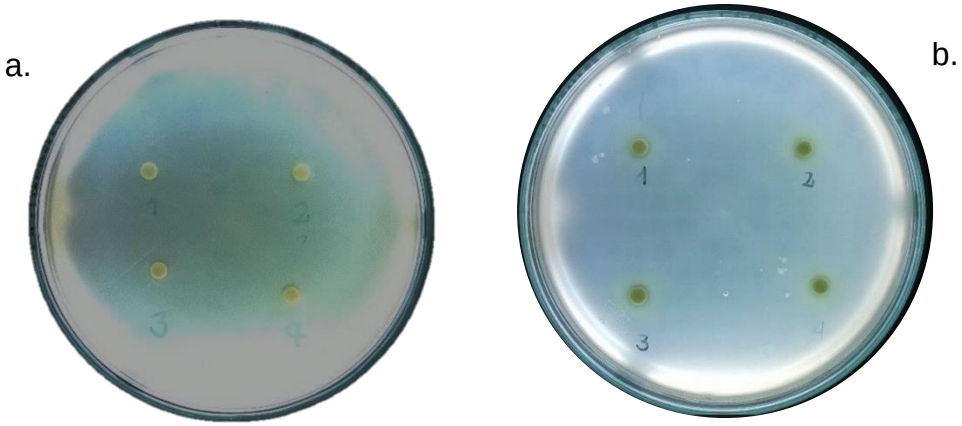


Figura 29. Halos de inhibición de las fracciones **$CHCl_3$ Sp** (a) y **Hex Sp** (b) frente a *Klebsiella pneumoniae*

Tabla 34. Porcentaje de inhibición frente a *Salmonella typhimurium* del extracto y fracciones de la especie *S. pyramidalis*.

Extracto o fracción	*Salmonella typhimurium*				$\bar{x}$	% de inhibición
Halos de inhibición	**1**	**2**	**3**	**4**		
Hex. Sp	--	--	--	--	--	--
$CHCl_3$ Sp	--	--	--	--	--	--
AcOEt Sp	7,29	7,27	8,51	8,83	7,98	4,70
EtOH Sp	--	--	--	--	--	--
RHEt Sp	8,04	9,29	7,98	8,70	8,50	6,27
Control positivo (ampicilina)	40,12	41	39,6	39	39,9	--

En la **Figura 30** se observan los halos de inhibición de las fracciones de **AcOEt Sp** para el microorganismo *Salmonella typhimurium,* con una actividad antimicrobiana baja de 4,70%.

a

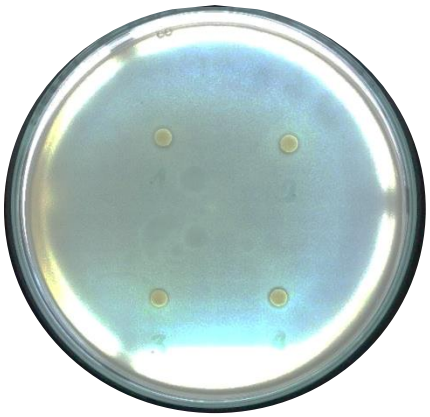


Figura 30. Halos de inhibición de la fracción de **AcOEt Sp** (a) frente a la bacteria *Salmonella typhimurium.*

Tabla 35. Porcentaje de inhibición frente a *Proteus mirabilis* del extracto y fracciones de la especie *S. pyramidalis*.

Extracto o fracción	***Proteus mirabilis***				**$\bar{x}$**	**% de inhibición**
Halos de inhibición	**1**	**2**	**3**	**4**		
Hex. Sp	7,21	8,12	7,64	7,68	7,66	3,69
$CHCl_3$ Sp	--	--	--	--	--	--
AcOEt Sp	7,45	7,53	7,89	8,95	7,96	4,54
EtOH Sp	--	--	--	--	--	--
RHEt Sp	--	--	--	--	--	--
Control positivo (ampicilina)	40,65	40,4	40,5	40,9	40,6	--

En la **Figura 31** se observan los halos de inhibición de las fracciones de **Hex Sp** y **AcOEt Sp** frente al microorganismo *Proteus mirabilis;* presentan una actividad baja con porcentajes de inhibición de 3,69% y 4,54%, respectivamente.

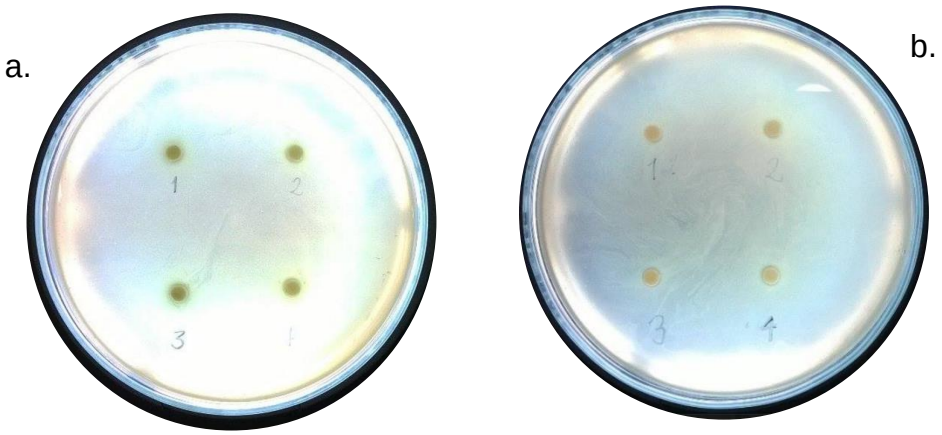


Figura 31. Halos de inhibición de las fracciones **Hex Sp** (a) y **AcOEt Sp** (b) frente a *P. mirabilis.*

Tabla 36 Porcentaje de inhibición del extracto y fracciones frente a bacterias de tipo Gram positivas de la especie *S. pyramidalis*.

	% de inhibición					
Halos de inhibición	***E.coli***	***P. aeruginosa***	***K.pneumoniae***	***P. mirabilis***	***S. typhi***	***Pseudomonas aeruginosa***
Hex. Sp	--	9,6	9,13	7,66	--	65,97
CHCl3 Sp	--	--	8,01	--	--	
AcOEt Sp	--	--	8,35	7,96	7,98	
EtOH Sp	--	8,91	--	--	--	51,27
RHEt Sp	--	7,02	8,5	--	8,5	11,06

Al observar los resultados de la **Figura 32**, se concluye que para esta especie es baja la actividad antimicrobiana frente a estos microorganismos Gram negativos, puesto que ninguna fracción supera el 50 % de inhibición, en el caso del microorganismo *E. coli* no registró ningún tipo de actividad. Teniendo en cuenta los resultados se inició una revisión bibliográfica, El estudio de (Barajas, Herreño, Mejía, Borrego, Pombo, 2014) sobre la especie *Smallanthus sonchifolius* (yacón) mostraron que a una concentración de 4mg/mL mostró actividad antimicrobiana contra las siguientes bacterias Gram negativas con sus respectivos halos de inhibición más altos *P. aeruginosa* (11,48mm), *S. tiphymurium* (10,49 mm), *K. pneumoniae* (9,42 mm)*, A. brasiliensis* (17,38 mm) y *E. coli* (9,72 mm).

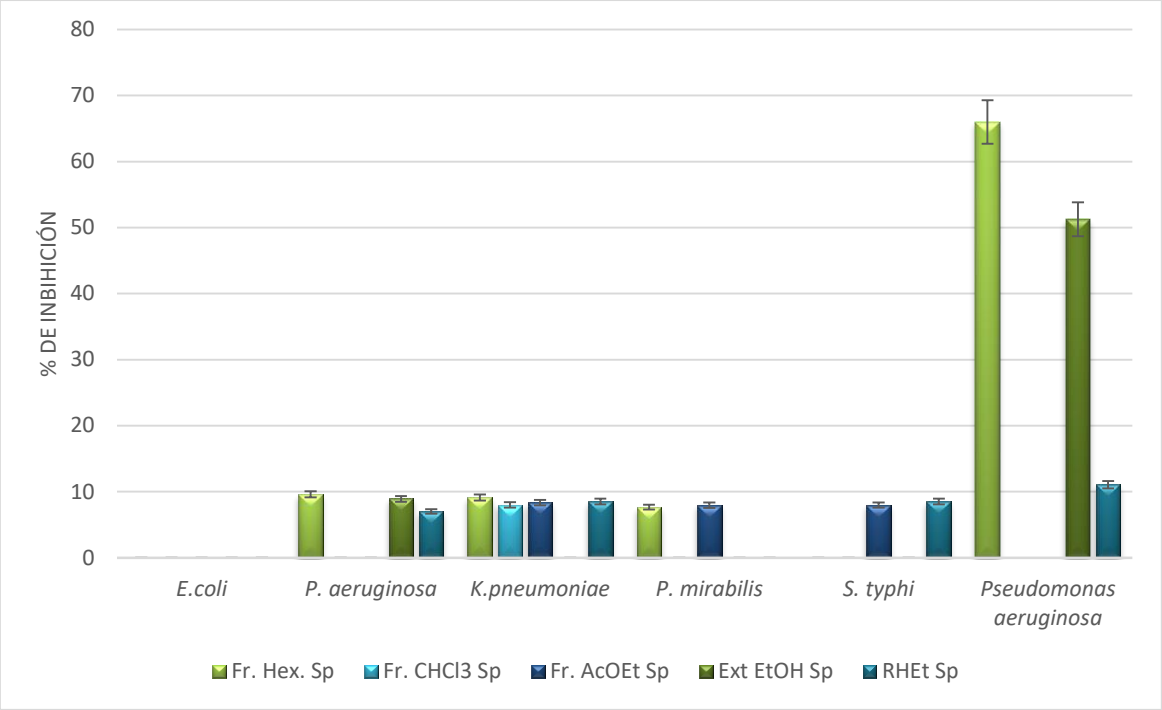


Figura 32. Porcentaje de inhibición del extracto y fracciones frente a bacterias de tipo Gram positivas *de la especie S. pyramidalis*.

Otro estudio sobre el *S. sonchifolius* (Ramos, Pereira, Braun, Hollander, Pupo, Tallarico, Said, Suraia, 2010) contra las bacterias *P. aeruginosa* y *E. coli* con los extractos de acetato de etilo y n-Butanol mostraron mayores actividades antimicrobianas. El *S. sonchifolius* presentó frente a la bacteria *P. aeruginosa* actividad antimicrobiana con el extracto y las fracciones.

Los principales compuestos antimicrobianos y antifúngicos de plantas incluyen terpenos y terpenoides (geraniol, mirceno, ρ-cimeno, α-pineno), han demostrado que las hojas del género *Smallanthus* exhiben potentes propiedades antibacterianas y antifúngicas (Padla, Solis, Ragasa, 2012).

Varios estudios han demostrado que algunos terpenos irrumpen en la membrana celular en bacterias, alterando su fluidez al aumentar la permeabilidad, causando así un efecto bactericida. En adición a su capacidad de desintegrar la membrana, algunos terpenos como el ß-pireno afectan la mitocondria en levaduras, causando

una disminución en la tasa de respiración, lo que conlleva a una menor producción de energía, que resulta finalmente en una disminución en su crecimiento. Este efecto en la respiración, fue atribuido a una afección en la región del citocromo B de la 131 cadena transportadora de electrones. De la misma forma, existen evidencias de que el limoneno y el ß-pireno poseen la misma capacidad de afectar el sistema respiratorio productor de energía en la membrana de levaduras (Griffin, 1971).

Por lo anterior, se puede concluir que, la especie *S. pyramidalis* presenta actividad antimicrobiana importante ya que en un estudio de (Guzmán, Barrera, 2010) se realizó un análisis por CG-EM para identificar en hojas algunos terpenos en su fracción etérea como Isolongifoleno, 7, 11-Epoxigermacrona y sesquiterpenos como 1,2,3,4-tetrahidro-1,6 dimetil-4-(1-metiletil)-(1*cis*)-naftaleno, α-muroleno y δ-cadineno en su extracto en diclorometano.

3.4.2.3 Hongos y levaduras

Se muestran los resultados del extracto y fracciones de la especie *S. pyramidalis* frente a la levadura *Candida albicans* **(Tabla 37)** con respecto al control positivo fluconazol.

Tabla 37. Porcentaje de inhibición frente a *Candida albicans* del extracto y fracciones de la especie *S. pyramidalis*.

Extracto o fracción	***Candida albicans***				**x̄**	**% de inhibición**
Halos de inhibición	**1**	**2**	**3**	**4**		
Hex. Sp	8,54	8,87	7,70	7,55	8,17	43,39
$CHCl_3$ Sp	7,07	--	--	--	7,07	23,93
AcOEt Sp	--	--	--	--	--	--
EtOH Sp	--	--	--	--	--	--
RHEt Sp	--	--	--	--	--	--
Control positivo (fluconazol)	10,90	11,61	9,29	10,06	10,47	--

El porcentaje de inhibición de las fracciones y extracto de la especie *S. pyramidalis* frente a la levadura *Candida albicans,* reporta un porcentaje de 43,39 % para la fracción **Hex Sp** y 23,93 % para la fracción **$CHCl_3$ Sp**. Mientras que para las demás fracciones no se mostró ningún tipo de inhibición.

En estudios sobre otra especie *Smallanthus*, la especie *S. sonchifolius* (Barajas, Herreño, Mejía, Borrego, Pombo, 2014) no presentó actividad antimicrobiana frente a la cepa *C. albicans* con halos de inhibición de 0 mm y porcentajes de inhibición de 0%.

Con el método de difusión en disco, se encontró que la especie *S. sonchifolius* era activa contra todos los microorganismos Gram positivos (*S. aureus, S. epidermidis, B. subtilis*), y también frente al hongo *T. rubrum*. No se observó actividad antimicrobiana contra el hongo *C. albicans, Epidermophyton floccosum* y todas las cepas de prueba Gram-negativas. Los índices de actividad (AI) de la especie *S. Sonchifolius* (Yacón) fueron más altos contra *S. aureus* y más bajos contra *T. rubrum*. Este estudio aisló y purificó el compuesto ácido entkaurenoico el que permitió que la especie tuviera una actividad moderada contra *S. aureus y S. epidermidis* (Padla, Solis, Ragasa, 2012).

4. CONCLUSIONES

Se determinó por medio de la MFP, en las hojas de *Smallanthus pyramidalis,* la posible presencia de metabolitos secundarios como: esteroides y triterpenos, flavonoides, taninos, cumarinas, glucósidos cardiotónicos y saponinas, lo cual está de acuerdo con otras especies del mismo género como *S. sonchifolius* donde han reportado la presencia de triterpenos, taninos condensados, flavonoide, sesquiterpenlactona, glicósidos y cumarinas.

En las hojas de *Alnus acuminata* se determinó la posible presencia de metabolitos secundarios de tipo cumarinas, quinonas, esteroides y triterpenos, taninos, y flavonoides.

En el aceite esencial de *S. pyramidalis* se logró identificar la presencia de 29 compuestos los cuales constiruyen el 50,26 % de la composición química total del aceite siendo el espatulenol el compusteo mayoritario. Para la especie *A. acuminata* no se obtuvo aceite esencial esto quiere decir que, en la corriente iónica total (TIC) no se observó ningún metabolito volátil.

Las fracciones **AcOEt Sp, $CHCl_3$ Aa** y **AcOEt Aa**, presentaron mayor capacidad antioxidante con valores de IC_{50} de 40,12 µg/mL, 41,98 µg/mL y 40,7 µg/mL por el método de $ABTS^{\bullet+}$. En cuanto al método de $DPPH^{\bullet}$, se observó que el IC_{50} de las fracciones **$CHCl_3$ Aa** y **AcOEt Sp** tienen valores de 22,95 µg/mL y 30,69 µg/mL. Actividad que se puede explicar por la presencia de compuestos de tipo fenólicos, esteroides y triterpenos y flavonoides.

El extracto y fracciones de *S. pyramidalis*, presentaron una actividad antimicrobiana baja frente a todos los microrganismos evaluados ya que presentan porcentajes de inhibición menores al 50%.

En cuanto a la actividad antimicrobiana, de *A. acuminata* frente a las cepas Gram positivas y Gram negativas se evidenció una baja actividad antimicrobiana con porcentajes menores al 50%. En cuanto al hongo, las fracciones y el extracto analizado presenta actividad frente a *C. Albicans,* con porcentajes mayores al control positivo (fluconazol). De acuerdo a los antecedentes reportados en la

literatura para especies de este mismo género, los metabolitos secundarios de naturaleza diarilheptanoide son los responsables de esta actividad, de los cuales los posibles compuestos de este tipo son, oregonina, hirsutenona y platifilenona.

5. RECOMENDACIONES

Continuar con el estudio para la obtención del Aceite Esencial de las especies vegetales estudiadas como arrastre con vapor, fluidos súper críticos, entre otros; y determinar si su porcentaje de rendimiento varía de acuerdo al método.

Iniciar el fraccionamiento y aislamiento de los metabolitos secundarios responsables de la alta capacidad antioxidante obtenida para **AcOEt Sp** de la especie *S. pyramidalis* y **AcOEt Aa, $CHCl_3$ Aa** y **RHEt Aa** de la especie *A. acuminata* mediante los ensayos $DPPH^{\bullet}$ y $ABTS^{\bullet+}$.

Evaluar otro tipo de actividades para cada una de las especies, de acuerdo a lo reportado en la literatura.

6. BIBLIOGRAFÍA

Al-Farsi M.A., Lee C.Y. (2008). O*ptimization of phenolics and dietary fibre extraction* from date seeds. *Food Chemistry*, 108:977-985.

Álvarez, L. (1999). *Guía para el cultivo y aprovechamiento del arboloco.* Manizales.Colombia.

Arnao, I; Suárez, S; Cisneros, R. y Trabucco, J. (2012). *Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos acuosos de la raíz y las hojas de Smallanthus sonchifolius (yacón).* Perú.

Artunduaga, C. (2015). *emaze*. Obtenido de Aliso *(Alnus acuminata*) como alternativa en la implementación de sistemas silvopastoriles en trópico de altura.: https://www.emaze.com/@ALZRFZOT/aliso-caracterizacion-SSP.pptx

Avila, L. (2011). *Caracterización de la composición química y ensayo de actividad antimicrobiana del extracto antinflamatorio de la corteza medicinal de Alnus acuminata ssp arguata.* Ciudad de Mexico D.F.

Barajas L., Herreño N., Mejía A.L., Borrego P., Pombo L.M. (2014). *Yacon (Perú), Jímaca (Colombia).* Bogotá : Jusn.

Borrego, P. (2010). *Fitoquímica de extractos y fracciones de la especie vegetal Petiveria alliacea l. y evaluación del efecto citotóxico sobre las líneas celulares tumorales k562, mcf-7, 4t.1 y a375.* Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

Buenaño, Y. (2014). *Estudio de la actividad fotoprotectora invitro de extractos de aliso (Alnus acuminata) con distinta polaridad.* Rimboba.Ecuador.

Bussmann, Gleen, Sharon. (2011). *Proving that Traditional Knowledge Works: The antibacterial activity of Northern Peruvian medicinal plants.*

Calderón, M. (2007). *Extracción y caracterización fisicoquímica del extracto colorante de la corteza de aliso común (Alnus jorullensishumboldt, bonpland & kunth), proveniente de san Lucas Sacatepéquez, Guatemala.* Guatemala.

Castañeda, C. (2008). Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Scielo*.

Catálogo de la biodiversidad de Colombia . (2014). Recuperado el 25 de Abril de 2015, de http://www.biodiversidad.co/fichas/3513

Centers for Disease Control and Prevention. (2006). *Klebsiella pneumoniae in Healthcare Settings.* Atlanta : CDC Home.

Chalcat, J. (1997). Correlation between chemical composition an antimicrobial activity. *Journal of essential oils research*.

Chaverri C., Cicció J. (2015). *Composición química del aceite esencial de las hojas de Smallanthus quichensis (Asteraceae) de Costa Rica.* Costa Rica: Blacpma.

Çiğdem Altınyay, Ipek Süntar. (2016). *Phytochemical and biological studies on Alnus glutinosa subsp. glutinosa, A. orientalis var. orientalis and A. orientalis var. pubescens leaves.* Ankara, Turkey.

Dahija, S. (2012). *Total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and antimicrobial activities of Alnus glutinosa (L.) Gaertn., A. incana (L.) Moench and A. viridis (Chaix) DC. extracts.* Bosnia y Herzegovina .

Department of Microbiology and Immunology. (2015). *Proteus mirabillis.* Michigan: UM Medical School.

Escobar, C. (2013). *La estructura de la planta en la estabilidad del suelo y el ecosistema.* Manizales.

Federacioncafe. (2012). Obtenido de Radicales libre y antioxidantes: http://www.federacioncafe.com/Documentos/CafeYSalud/CafeYAntioxidantes/Radicales%20libres.pdf

Garcia, H. (1998). Arboles de la sabana de Bogotá.

Global Biodiversity Information. (s.f.). Recuperado el 17 de abril de 2015, de http://www.gbif.org

Gonzales, J. (2014). *Radicales libres en el deporte*. Obtenido de http://med.se-todo.com/biolog/18980/index.html

Gonzalez J, Suarez M, Granoa E. (1988). Constituyentes Antifungicos en Nódulos Radicales de *Alnus acuminata*. *Agronomía Colombiana*.

Gracia. (2007). Cuantificación de fenoles y flavonoides totales en extractos naturales. *Universidad Autónoma de Querétaro..*, 56.

Griffin, T. (1971). Sesquiterpene lactones: Acid-catalyzed.

Guzmán A., Barrera D. (2010). *Estudio fitoquímico de hojas y flores de Smallanthus pyramidalis (Triana) H. Rob. (arboloco) y su uso en la recuperación de los humedales de Bogotá.* Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Facultad del Medio Ambiente y Recursos Naturales, Bogota.Colombia.

Hashimoto, T. (1995). *diarilheptanoides, flavonoides, estilbenoides, sesquiterpenoids y fenantreno de Alnus maximowiczii.* Japon.

Health, U. D. (2014). *Enfoques complementarios,alternativos o integrativos para la salud: ¿qué son?* Obtenido de NCCIH: https://nccih.nih.gov/sites/nccam.nih.gov/files/CAM_Basics_What_Are_CAIHA_SPANISH_02-18-2015.pdf

In Guk Hwang, H. Y. (2013). Effect of Heat Treatment on the Antioxidant Properties of Yacon (Smallanthus sonchifolius). *THE KOREAN JOURNAL OF FOOD AND NUTRITION*, 857-867.

Kunkel, D. (2004). *What is Pseudomonas aeruginosa?* Estados Unidos.

Lizcano, A. (2008). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales.* Bogota D.C.

Llanga. (2014). *Determinación de la actividad antioxidante de los extractos de quishuar (buddleja incana), aliso (Alnus acuminata) y romerillo (Hypericum laricifolium) localizados en 3 zonas geográficas diferentes.* Robamba.

Macedo Márquez, A. (2012). *La producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en las mitocondrias de Saccharomyces cerevisiae.* Coyoacán: Scielo.

Madigan, M. (2006). *Brock Biology of Microorganisms.* Pearson Prentice Hall.

Martínez, A. (2003). *Aceites esenciales.* Medellin.

Martinez, M. (2014). *Abedul - Alnus acuminata*. Obtenido de ethno-botanik: http://www.ethno-botanik.org/Heilpflanzen/Alnus-acuminata/Abedul-Alnus-acuminata-en.html

Matulevich, J. (2013). *Estudio Fitoquímico de Hojas, Flores Y frutos de Bejaria resinosa.* BOGOTÁ D.C.

McNish, T. (2010). *La recuperación y rehabilitación ecológica de humedales.* Bogota D.C.

Mendoza D., Parra L., Loza S. (2014). Capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial y extractos etanólicos de yacón (*Smallanthus sonchifolius* poepp. & endl) H. Robinson, cultivado en Colombia . *Scielo*, 9-23.

Mendoza D.L., Parra L., Loza S. (2014). *Capacidad captadora de radicales libres del aceite esencial y extractos etanólicos de yacón (Smallanthus sonchifolius poepp. & endl) h. robinson, cultivado en colombia.* Barranquilla: Scielo.

Middeleton, T. (2005). *Antioxidant, antibacterialactivities and general toxicity of Alnus acuminata.* Iran .

Mushkina, O. (2013). *Activity and toal phenolic content of Alnus glutinosa and Alnus incana leaves.* Poznan: Vitebsk State Medical University.

Navarra, U. P. (2002). *unavarra*. Obtenido de http://www.unavarra.es/genmic/microclinica/tema08.pdf

Nissen, C. (2014). *plantillustrations*. Recuperado el 25 de Abril de 2015, de *Smallanthus pyramidalis* (Triana) H.Rob.: http://plantillustrations.org/species.php?id_species=953343&lay_out=1&hd=0

Olga Zafra. (2012). Extracellular DNA Release by Undomesticated Bacillus subtilis Is Regulated by Early Competence. *Plos one*.

Opepa. (2016). *Arboloco - Smallanthus pyramidalis*. Recuperado el 25 de Abril de 2015, de Opepa: http://www.opepa.org/index.php?option=com_content&task=view&id=369&Itemid=30

Orjuela, A. (2015). *Determinación de actividad antioxidante de extractos y fracciones de hojas de Chromolaena perglabra (b. l. robinson) R.M. King & h. Robinson.* BOGOTÁ D. C.

Ospina, C. (2005). *El Aliso o Cerezo. Alnus acuminata H.B.K. ssp. acuminata.* Colombia: BLANECOLOR.

Padla E., Solis L., Ragasa c. (2012). Antibacterial and antifungal properties of ent-kaurenoic acid from *Smallanthus sonchifolius* . *Chinese journal of natural medicines*, 408-414.

Parada N., Sandoval C. (2013). *Evaluación in vitro del efecto de diferentes fungicidas sobre el crecimiento de fusarium oxysporum aislado de frejol y fusarium.* Talca. Chile.

Plantarum, N. G. (1995). *Alnus acuminata*. Recuperado el Junio de 2015, de Conabio: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/9-betul1m.pdf

Prada, L. (2008). *Caracterización y evaluación de actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de hongos de la familia Tricholomataceae frente a agentes causales de dermatomicosis en animales.* Bogota D.C.

Ramirez, L. (2007). Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo. *Scientia Et Technica*.

Ramos, Pereira H., Braun, Hollander G., Pupo, Tallarico M., Said, Suraia. (2010). Antimicrobial activity from endophytic fungi Arthrinium state of Apiospora montagnei Sacc. and Papulaspora immersa. *SCielo*, 4.

Rashed, K. (2013). *Antimicrobial and cytotoxic activities of Alnus rugosa L. aerial parts and identification of the bioactive components.* Giza. Egipto.

Rebell, G. (1970). *The dermatophytes.* Miami: University of Miami Press.

Richards, L. (2013). *The Ultimate Candida Diet Program.* eBOOKS.

Rodríguez, M. (2010). *La biodiversidad en Colombia.*

Salama A, Gallego M, Barrera C. (1989). Composión quimica y actividad abortivas de las hojas de Almus acuminata.

salmonella.org. (2016). *What are Salmonella?* National Reptile and Amphibian Advisory Council.

Sanchez L., Amado G., Criollo P. (2010). *El aliso (Alnus acuminata) como alternativa silvopastoril en el manejo de praderas en el trópico alto colombiano.* Colombia: Pridumedios.

Santi, S. (2011). *Bioactiveconsstituents and medicinal importance of genus Alnus.* Estados Unidos.

Shetty, P. (2010). La medicina tradicional y la moderna: Hechos y cifras. *Scidevnet*.

Silva, J. (2010). *Verificación de la calidad de un Fitoterápico en capsulas comercializado en los.* León, Nicaragua.

Sugahara S., Ueda Y., Fukuhara k., Kamamuta Y., Matsuda Y., Murata T., Kuroda Y. (2015). Antioxidant Effects of Herbal Tea Leaves from Yacon (Smallanthus sonchifolius) on Multiple Free Radical and Reducing Power Assays, Especially on Different Superoxide Anion Radical Generation Systems. *Journal of Food Science*, Vol. 80, Nr. 11.

Tafur J., Torres J., Villegas M. (2008). Mechanisms of antibiotic resistance in Gram negative bacteria. *Scielo*.

Tamayo M., Escobar W. (2010). *Estudio de la propagación sexual del arboloco Montanoa quadrangularis Schultz Bipontianus Asteraceae.* Estudio de la propagación sexual del arboloco Montanoa quadrangularis Schultz Bipontianus Asteraceae. Bogotá, D.C. Colombia: 2010.

Tapia, D. P. (2012). *Propagación vegetativa del aliso (Alnus acuminata H.B.K.) utilizando dos tipos de sustrato en la parroquia La Esperanza.* Ibarra – Ecuador.

Taroco R., Seija V., Vignoli R. (2008). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *CEFA*, 663-673.

Taroco, R. (2001). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica.

Tovar del Rio, J. (2013). *Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera.* PEREIRA.

Valentova K, Cvak L., Muck A. (2002). Antioxidant activity of extracts from the leaves of Smallanthus sonchifolius. *Institute of Medical Chemistry and Biochemistry*, 61-66.

Veioglu ZS,Mazza G,Gao L,Oomah BD. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables and grain products. *J Agric Food Chem*, 46:4113–4117.

Vila. (2007). efflux pumps and multidrug resistance in Acinetobacter baumannii. J Antimicrob Chemother. *Scielo*.

WebMD. (1995). *E. Coli Infection From Food or Water - Topic Overview.* Healthwise.

Wright, M. (2016). Aspergillosis.

Yu, Y. (2005). *Effects of triterpenoides and flavonoidsisolatedfrom Alnus on HIV-1 viral enzymes.* Korea.

Zaragozá, F. (2008). *ABEDUL.*

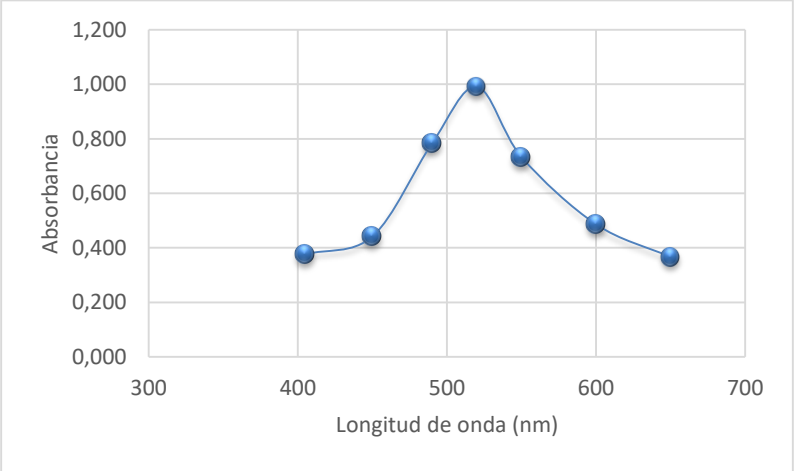
Zheng N, Wang Z, Chen F, Lin J. (2011). Evaluation to the antioxidant activity of total flavonoids extract from Syzygium jambos seeds and optimization by response surface methodology. *Afr J Pharm Pharmac*, 5(21): 2411–2419.

Zuluaga, G. (1994). *Plantas medicinales: Ecologia y economía.* Bogota D.C.

7. ANEXOS

7.1 Ensayo de decoloración del radical DPPH•.

La capacidad antioxidante de decoloración del radical DPPH• se determinó de acuerdo a los parámetros establecidos en el numeral 2.4.1. De acuerdo con Anexo 1 la longitud de absorción máxima del reactivo DPPH• es de 520 nm.



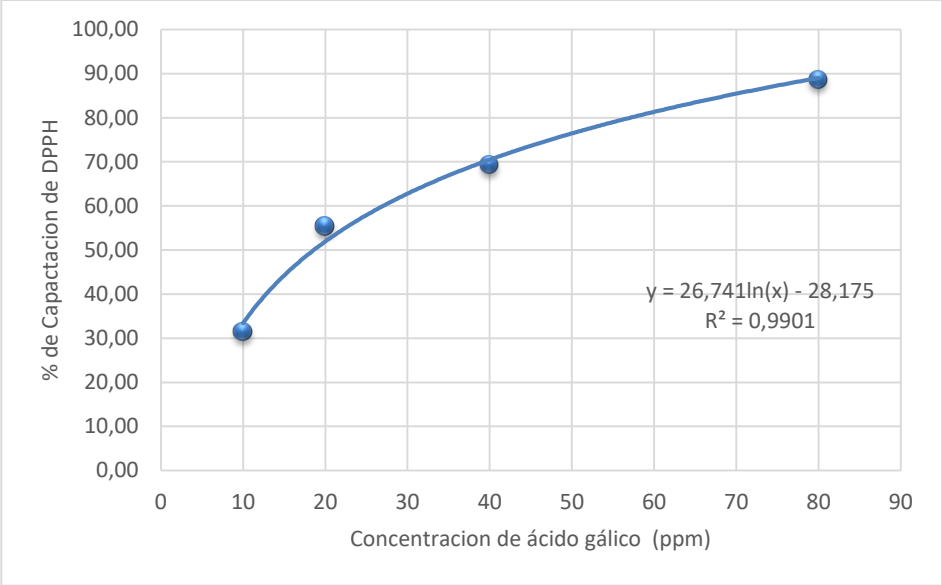
Anexo 1. Barrido espectral del DPPH•.

Se realizó la medición del porcentaje de captación de DPPH• empleando la **ecuación 2**. Los resultados de la medición del porcentaje de captación de DPPH• se encuentran en el **Anexo 2.**

Anexo 2. Porcentaje de Captación del radical DPPH• empleando Ácido Gálico.

Concentración ppm	% Inhibición	Abs
10	31,47	0,652
20	55,40	0,437
40	69,33	0,281
80	88,61	0,092
160	93,41	0,045

Abs Blanco: 0,98



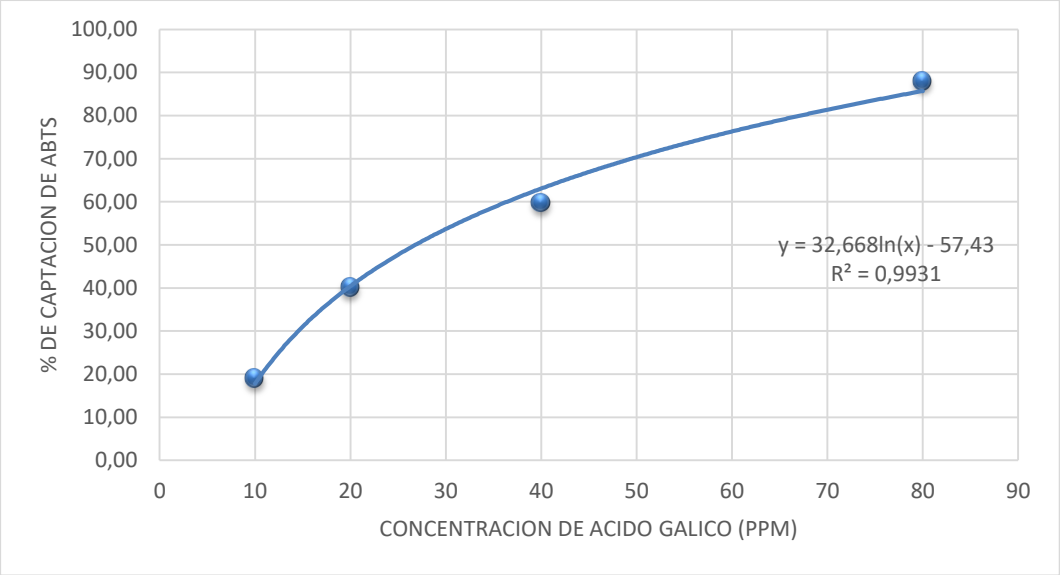
Anexo 3. Curva de referencia del porcentaje de captación de DPPH· v/s concentración de ácido gálico.

$e^{(\frac{50+28.175}{26.741})}$. Debido a que la curva se basa en el logaritmo de la concentración, el resultado del IC_{50} obtenido para el ácido ascórbico es de 18,15 µg/mL.

7.2 Ensayo de decoloración con el radical catiónico $ABTS^{\bullet+}$.

Para realizar las curvas de referencia se preparó una solución de ácido gálico, en concentraciones de 10 a 160 miligramos por litro de metanol y se realizó la medición del porcentaje de captación.

Partiendo de los datos obtenidos del porcentaje de captación del radical catiónico Acido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico ($ABTS^{\bullet+}$), se construyó una curva de referencia que permite verificar la dependencia lineal del % de captación del radical $ABTS^{\bullet+}$ Vs la concentración de ácido gálico, obteniéndose un R^2 de 0,9931, el cual nos permite calcular el porcentaje de concentración efectiva 50 (IC_{50})**.** La curva de referencia de ácido gálico da una ecuación de recta y = 32,668 ln(x) – 57,43.



Anexo 4. Curva de referencia del porcentaje de captación del radical $ABTS^{\bullet+}$ v/s concentración de ácido gálico.

En la gráfica anterior se observa el comportamiento del ácido gálico $e^{\frac{50+57.43}{32.668}}$.Debido a que la curva se basa en el logaritmo de la concentración, el resultado obtenido de la concentración de ácido gálico es de 26,80 µg/mL.