

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS
EXTRACTOS ACUO – ALCOHÓLICO, CLOROFÓRMICO Y ETÉREO
DE *Tagetes caracasana* SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS
BACTERIAS *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.**

LORENA ANDREA ERAZO BENITEZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA
EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2002**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS
EXTRACTOS ACUO – ALCOHÓLICO, CLOROFÓRMICO Y ETÉREO
DE *Tagetes caracasana* SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS
BACTERIAS *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.**

LORENA ANDREA ERAZO BENITEZ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA
EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2002**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS
EXTRACTOS ACUO – ALCOHÓLICO, CLOROFÓRMICO Y ETÉREO
DE *Tagetes caracasana* SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS
BACTERIAS *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.**

LORENA ANDREA ERAZO BENITEZ

Trabajo de grado presentado como
requisito parcial para optar al título
de Químico

Director: Mg. Medardo Vanegas Torres

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA
EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2002**

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	2
1. MARCO REFERENCIAL	3
1.1 JUSTIFICACION	3
1.2 Objetivos	6
1.2.1 Objetivo General	6
1.2.2 Objetivos Específicos	6
1.3 Problema	7
1.4 Hipótesis	7
1.5 Marco teórico	8
1.6 ANTECEDENTES	11
1.6.1 METABOLITOS SECUNDARIOS	11
1.6.2 DESCRIPCION BOTANICA	13
1.6.3 BACTERIA <i>Staphylococcus aureus</i> Y <i>Escherichia coli</i>	14
2. METODOLOGIA	17
2.1 RECOLECCIÓN, SECADO y tratamiento DEL MATERIAL VEGETAL	17
2.2 Obtención de los extractos de la planta	17
2.3 ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR	19
2.3.1 Análisis de Alcaloides	19
2.3.2 Análisis para Esteroides y Triterpenoides	19
2.3.3 Análisis para Flavonoides	20
2.3.4 Análisis de Nafto y/o Antraquinonas	20
2.3.5 Análisis de Taninos y Saponinas	20
2.3.6 Análisis de Cardiotónicos	21

2.4 FRACIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS	21
2.5 PRUEBAS DE TOXICIDAD PARA <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	23
2.5.1 Determinación de la MIC	23
2.5.2 Determinación de la capacidad antibacteriana de el <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> con los extractos acuo-alcohólico, clorofórmico y etéreo	24
2.6 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	26
3. RESULTADOS	27
3.1 Análisis fitoquímico preliminar	28
3.2 Ensayos de bioactividad	30
3.3 Análisis estadístico	43
3.4 Análisis Espectroscópico	56
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	64
4.1 ANALISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR	64
4.1.1 Alcaloides	64
4.1.2 Flavonoides	65
4.1.3 Taninos	65
4.1.4 Saponinas	66
4.1.5 Nafto y/o antraquinonas	66
4.1.6 Cumarinas	66
4.1.7 Cardiotónicos	66
4.2 Ensayos de bioactividad	67
4.3 Análisis estadístico	68

4.4 Análisis espectroscópico	74
5. CONCLUSIONES	84
6. BIBLIOGRAFIA	86
ANEXO 1	93
ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR	93
REACTIVOS UTILIZADOS	103
Reactivo de Dragendorff	103
Reactivo de Meyer	103
Reactivo de Valser	104
Reactivo de Liebermann - Burchard	104
Reactivo de gelatina – sal	104
ANEXO 2	105
CARACTERÍSTICAS DE LOS FLAVONOIDES	105
Clasificación y Nomenclatura	106
Propiedades Físicas	107
ANEXO 3	108
PRESUPUESTO	108
Tabla 1. Presupuesto total del proyecto	108
Tabla 4. Solventes requeridos	111
Tabla 5. Material de vidrio	112

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Plantas que poseen actividad biológica.	5
Tabla 2. Análisis de metabolitos secundarios presentes en Tallo – Hojas	28
Tabla 3 Análisis de metabolitos secundarios presentes en las flores	29
Tabla 4. MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS <i>DE Tagetes caracasana</i> en <i>Staphylococcus aureus</i>	30
Tabla 5. MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS DE <i>Tagetes caracasana</i> en <i>Escherichia coli</i>	30
Tabla 6. Prueba de Difusión en disco en <i>E. coli</i>	31
Tabla 7. Prueba de Difusión en disco en <i>S. aureus</i>	36
Tabla 8. Estadística descriptiva para diferentes concentraciones y tratamientos en la prueba de difusión en disco sobre <i>S. Aureus</i>	43
Tabla 9. Estadística descriptiva para diferentes concentraciones y tratamientos en la prueba de difusión en disco sobre <i>E. coli</i>	44
Tabla 10. Comparación múltiple de Scheffe para la prueba de difusión en disco sobre <i>S. aureus</i>	46
Tabla 11. Prueba de Rango Múltiple de Duncan para la prueba de difusión en disco sobre <i>S. aureus</i>	47
Tabla 12. Análisis de Varianza de dos vías para la prueba de difusión en disco sobre <i>S. Aureus</i>	47
Tabla 14. Prueba de Duncan teniendo en cuenta la interacción tratamiento – concentración	49
Tabla 15. Comparación múltiple de Scheffe para la prueba de difusión en disco sobre <i>E. coli</i>	51
Tabla 16. Prueba de Rango Múltiple de Duncan para la prueba de difusión en disco sobre <i>E. coli</i>	52
Tabla 17. Análisis de Varianza de dos vías para la prueba de difusión en disco sobre <i>E. coli</i>	52

Tabla 18. Estadística Descriptiva teniendo en cuenta la interacción tratamiento – concentración para la prueba de difusión en disco sobre <i>E. coli</i>	54
Tabla 19. Prueba de Duncan teniendo en cuenta la interacción tratamiento – concentración para la prueba de difusión en disco sobre <i>E. coli</i>	55
Tabla 20. Datos del espectro I.R. del compuesto aislado	61
Tabla 21 Datos del pectro U.V del compuesto aislado. del extracto metanólico	61
Tabla 22. Datos del espectro RMN ¹³ C del compuesto aislado	63
Tabla 23 Datos de los espectros UV de las estructuras 1- 6 y los del compuesto aislado	77
Tabla24 Desplazamientos químicos de RMN ¹ H de las estructuras 1–6 y del compuesto aislado de tallos-hojas de <i>Tagetes carcasana</i>	81
Tabla 25 Desplazamientos químicos de RMN ¹³ C de las estructuras 1–6 y del compuesto aislado de tallos-hojas de <i>Tagetes carcasana</i>	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Flujograma de Actividades	18
figura 2 Prueba de susceptibilidad por dilución en caldo Muller Hinton	24
figura 3 Placa de Susceptibilidad por dilución en agar.	25
figura 4. Prueba de difusión en disco para el extracto acuo – alcohólico	41
figura 5 Prueba de difusión en disco para el extracto acuo – alcohólico.	41
figura 6. Prueba de difusión en disco para el extracto clorofórmico.	42
figura 7. Prueba de difusión en disco para el extracto etéreo.	42
figura 8. Comparación de las medidas de inhibición del crecimiento <i>de S. aureus</i> teniendo en cuenta el tratamiento y la concentración.	45
Figura 9. Comparación de las medidas de inhibición del crecimiento <i>de E. coli</i> teniendo en cuenta el tratamiento y la concentración	45
Figura 10. Influencia de los tratamientos sobre el diámetro de inhibición en <i>S. aureus</i>	48
figura 11. Comparación de las medias de inhibición teniendo en cuenta la interacción tratamiento – concentración para la prueba de difusión en disco sobre <i>S. Aureus</i>	50
figura 12. Comparación de las medias de inhibición teniendo en cuenta la interacción tratamiento – concentración para la prueba de difusión en disco sobre <i>E. Coli</i>	50
figura 13. Influencia de los tratamientos sobre el diámetro de inhibición en <i>E. coli</i>	53
figura 14. Comparación de las medias de inhibición del crecimiento de las bacterias <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .	53
figura 15 Espectro U.V tomado en metanol del compuesto aislado del extracto Metanólico	56
Figura 16. Espectro U.V en $AlCl_3$ del compuesto aislado del extracto Metanólico	56

Figura 17. Espectro U.V en $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ del compuesto aislado del extracto Metanólico	57
Figura 18. Espectro U.V en NaOAc del compuesto aislado del extracto Metanólico	57
Figura 19. Espectro Infrarrojo del metabolito aislado del extracto metanólico	58
figura 20 Espectro RMN ^1H del compuesto aislado del extracto metanólico	59
figura 21 Espectro RMN ^{13}C del compuesto aislado del extracto metanólico	60
Figura 22. Estructura básica de un flavonoide	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
CG/SM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CON	Concentración
DL ₅₀	Dosis letal media
h	horas
IR	Infrarrojo
M ⁺	Ión molecular
Min	minutos
MIC	Minima concentración inhibitoria
ppm	partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
Sig	Significancia
TTO	tratamiento
UV	Ultravioleta

RESUMEN

A través de este trabajo se presentan los resultados del Análisis Fitoquímico Preliminar realizados a la especie *Tagetes caracasana* (matapulga), que es importante en comunidades rurales del Departamento del Cauca por sus propiedades medicamentosas. También se presentaran los resultados de la determinación de la Mínima Concentración Inhibitoria MIC en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, para los extractos acuo – alcohólico, clorofórmico y etéreo de esta especie así como pruebas de suceptibilidad por dilución en agar. Además, se lleva a cabo la elucidación estructural de un flavonoide presente en el extracto acuo – alcohólico de tallos – hojas de esta planta.

INTRODUCCION

El hombre está íntimamente ligado a su medio ambiente; esto se puede ver reflejado en la amplia tradición etnobotánica, etnofarmacológica y en los conocimientos empíricos heredados de los antepasados.

En la población rural del Departamento del Cauca, el acceso a los servicios de salud presenta dificultades de orden geográfico, cultural y económico, razones por las cuales el sector campesino emplea como recurso curativo, plantas silvestres o cultivadas en huertas a las que atribuye por tradición oral, propiedades medicinales.

Las plantas pueden contener principios activos responsables del efecto fisiológico deseado o no deseado, sin embargo en muchos casos las plantas pueden actuar como placebo esta situación sugiere que el efecto provocado por el consumo de especies vegetales como medicamentos, requiere la validación de sus principios curativos.

Esta validación se inicia con un análisis fitoquímico preliminar, enfocándolo hacia la búsqueda de los metabolitos secundarios, posibles principios activos y con ensayos de bioactividad para determinar la actividad biosida en el vegetal. Con los resultados de estos análisis se obtiene la información inicial que permite seleccionar el solvente para preparar el extracto y la parte de la planta más adecuada para el aislamiento de uno de los principios activos.

1. MARCO REFERENCIAL

1.1 JUSTIFICACION

El estudio de las plantas y de sus extractos para determinar sus principios activos es una rama de la química (Fitoquímica) que avanza cada vez más en la búsqueda de nuevas alternativas para el control de enfermedades infectocontagiosas y en el reconocimiento de nuevos compuestos con actividad biológica. El carácter medicinal de una planta se debe a la presencia, en el tejido vegetal, de una o varias sustancias químicas llamadas principios activos, responsables del efecto fisiológico. Estas sustancias químicas generalmente son el resultado del metabolismo secundario de los vegetales y se producen, como respuesta del estrés del vegetal hacia el medio que lo rodea.

Existe una relación marcada entre la estructura del principio activo y su acción fisiológica. Por ejemplo, el carácter astringente y antiséptico de los taninos, las propiedades laxantes de las antraquinonas y la acción sobre el músculo cardíaco de los cardiotónicos.

La riqueza en plantas medicinales de la región caucana y los conocimientos sobre la medicina tradicional, nos lleva a pensar en la necesidad de hacer uso del estudio fitoquímico para caracterizar los núcleos activos de estos productos naturales y aportar fundamentos científicos a los conocimientos empíricos que así lo ameriten.

Este estudio constituye un aporte al conocimiento sobre el control de enfermedades bacterianas, debido a la ya conocida resistencia de gérmenes patógenos a algunos antibióticos convencionales. Por otro lado, los productos naturales son materias primas conocidas, ofreciendo nuevas opciones viables y factibles a las comunidades que las requieren, teniendo en cuenta que en la mayoría de los casos los medicamentos convencionales no son accesibles para un gran número de personas. Debido al actual alto costo de los medicamentos, el monto de los recursos invertidos por las personas en la adquisición de ellos, la automedicación, la falsificación y el uso empírico de productos medicinales derivados de recursos naturales carentes de calidad es imprescindible estudiar, los metabolitos secundarios potencialmente activos presentes en plantas, como las presentadas en la tabla 1.1 junto con sus actividades biológicas.

Tabla 1. Plantas que poseen actividad biológica. (63)

ESPECIE	FAMILIA	PARTE BIOACTIVA	AGENTE BIOTICO
<i>Allium sativum</i>	Liliaceae	Bulbos, tallos, hojas	Bacterias, hongos
<i>Citrus medica</i> (Cidra)	Rutaceae	Aceite esencial de hojas y frutos	Bacterias, hongos
<i>Ricinus communis</i> (Higuerilla)	Euphorbiaceae	Toda la planta	Bacterias
<i>Tagetes erecta</i> (Ruda de Caballo)	Asteraceae	Raíces, hojas y flores	Hongos, bacterias, nemátodos
<i>Atractilis ovata</i>	Asteraceae	Toda la planta	Hongos
<i>Clinopodium vulgare</i>	Labiatae	Toda la planta	Hongos
<i>Salix purpurea</i>	Silicacea	Hojas	Hongos
<i>Aloe barbadensis</i>	Liliaceae	Hojas	Nemátodos
<i>Angelica pubescens</i>	Apiaceae	Toda la planta	Nemátodos
<i>Carica papaya</i> (Lechosa – Papayo)	Cariaceae	Raíz, hojas y frutos	Nemátodos, insectos
<i>Datura metel</i> (Borrallero)	Solanaceae	Toda la planta	Nemátodos
<i>Solanum sucrence</i>	Solanaceae	Raíz	Nemátodos
<i>Solanum ballsii</i>	Solanaceae	Toda la planta	Insectos
<i>Bidens pilosa</i> (Cadillo de huerta)	Asteraceae	Toda la planta	Insectos
<i>Jacaranda obtusifolia</i> (Gualanday)	Bignoniaceae	Toda la planta	Insectos
<i>Derris trifoliata</i>	Fabaceae	Raíces, corteza	Insectos
<i>Hura polyandra</i> (Acuapar – Arenillo)	Euphorbiaceae	Látex, semillas	Insectos

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo General

Evaluar la acción antibacteriana de los extractos acuo – alcohólico, clorofórmico y etéreo de *Tagetes caracasana* sobre el crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

1.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar los núcleos metabólicos secundarios presentes en los extractos acuo – alcohólicos, clorofórmicos y etéreos de tallos-hojas y flores *de Tagetes caracasana*, mediante el Análisis Fitoquímico Preliminar.
- Evaluar el efecto de los extractos acuo – alcohólico, clorofórmico y etéreo de *Tagetes caracasana*, determinar su capacidad antibacterial. A través de bioensayos *in vitro*.

1.3 PROBLEMA

Como se puede promover el fortalecimiento de una cultura conservacionista de la flora medicinal en nuestro Departamento, la cual se ha ido perdiendo con la excesiva oferta de productos sintéticos como insecticidas y antibióticos que ofrecen soluciones a los problemas que la comunidad afronta, pero trayendo consigo otros, muchas veces de mayor magnitud, por tal razón se enfoca este estudio en la búsqueda de los principios activos presentes en los extractos acuoso – alcohólico, clorofórmico y etéreo de la planta *Tagetes caracasana* con el fin de verificar, comparar y validar la actividad bactericida de esta especie sobre el crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

La investigación que se plantea, determina parámetros científicos que pueden contribuir al control natural de las bacterias que vienen afectando permanentemente a la comunidad y plantea alternativas para el mantenimiento de la salud, que sean eficientes, económicas y ecológicamente viables.

1.4 HIPÓTESIS

Se asume que alguna de las concentraciones de los extractos acuoso – alcohólico, clorofórmico o etéreo de *Tagetes caracasana*, tienen actividad biológica sobre alguna de las etapas de desarrollo o crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

1.5 MARCO TEÓRICO

Las plantas, además de elaborar carbohidratos, proteínas, grasas, ácidos nucleicos, aminoácidos, vitaminas, reguladores del crecimiento y compuestos que intervienen en la fotosíntesis, sustancias que son comunes a todas las plantas y a las cuales se les denomina Metabolitos Primarios, también sintetizan productos como alcaloides, flavonoides, esteroides, cumarinas, taninos y aceites esenciales. Además producen muchas otras sustancias que no son comunes a todas las plantas y, por el contrario, contribuyen una expresión de su individualidad química conocidas como Metabolitos Secundarios (42).

La familia *Asteraceae* acumula compuestos nitrogenados, selenio, molibdeno y otros elementos con niveles perjudiciales para animales. Principalmente tienen agentes como sesquiterpenos, lactonas, flavonoides y alcaloides de pirrolizidina (Tarpo y Cuco 1961). Algunas especies de *Asteraceas* poseen propiedades como insecticidas (*Tagetes zipaquirensis*, actúa sobre pulgas; *Tagetes patula* y *erecta*, sobre larvas y ciertos insectos).(12) Otras poseen actividad fungicida como *Tagetes erecta*, bactericida como *Tagetes erecta* y *Tagetes lúcida* contra *E. coli*. Y actividad nematocida como *Tagetes pátula*, *erecta* y *lenvifolia* (6).

A esta familia pertenece la especie *Tagetes caracasana*, conocida como Ruda de arao (Boyacá) o matapulga (Cauca). La comunidad indígena Páez utiliza esta planta contra piojos de equinos y vacunos, cuando es combinada con otras plantas como la salvia. También es usada por los paeces para combatir los piojos de perro y pulgas; la mariposa blanca que ataca el repollo la polilla y como medicamento en la cura de algunas infecciones comunes en esta comunidad (4).

Las enfermedades infecciosas constituyen unos de los flagelos que afectan con mayor frecuencia al hombre. Estas son causadas por diferentes agentes, siendo uno de los más comunes las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, causantes de diversas infecciones en el ser humano. Las infecciones bacterianas normalmente complican la recuperación de enfermedades virales, ocasionando la pérdida de millones de pesos al año por incapacidades, al verse disminuida la capacidad laboral (45).

La bacteria *Staphylococcus aureus* es la más patógena de las especies de *Staphylococcus*, capaz de causar infección en cualquier sitio del organismo. Las infecciones en la piel pueden ser desde leves hasta muy graves e incluyen abscesos, impétigo, forúnculos e infecciones sistémicas graves que pueden asociarse con exfoliación superficial de la epidermis. La *S. aureus* puede complicar la recuperación de infecciones virales, tales como la influenza, y llegar a ser causa de infecciones serias en huéspedes inmunosuprimidos (32).

Esta bacteria es un patógeno extremadamente importante en la etiología de enfermedades como la neumonía severa. La infección puede ocurrir después de Influenza o secundario a diseminación hematógena en pacientes que han utilizado antibióticos previamente o citostáticos. La incidencia es de 7 – 10% con una mortalidad alrededor de 30%, la que ocurre habitualmente en las primeras 48 horas de ingreso al hospital. El paciente se presenta intoxicado, febril con taquipnea e hipoxemia, son comunes además los abscesos metastásicos en meninges, articulaciones, válvulas cardíacas, con un patrón radiológico de consolidación densa (64).

La *E. coli* es la especie más comúnmente utilizada en laboratorios de microbiología y se ha considerado causante de enfermedades infecciosas en casi todos los tejidos y órganos humanos. Ciertas cepas de *E. Coli* pueden causar enteritis o gastroenteritis, sepsis por gramnegativos y shock inducido por endotoxinas. Las

infecciones urinarias y de heridas, la neumonía en pacientes inmunosuprimidos y la meningitis en neonatos son otras infecciones comunes causadas por *E. Coli* (32).

En América Latina, la *E. coli* es uno de los agentes microbianos más importantes productores de enfermedades diarreicas agudas. Los agentes más frecuentes de la diarrea infantil en los países en desarrollo son : *Escherichia coli* entero patógena *Rotavirus* y *Campylobacter jejuni*, con la misma frecuencia y a través de las vías respiratorias o de la ingesta del agua. Estas enfermedades transmitidas por el consumo agua contaminada representan una gran amenaza para la salud pública, mientras los riesgos para la salud que pueden asociarse con el consumo prolongado de agua tratada con cloro son sumamente pequeños e inciertos. En América Latina, las epidemias de cólera, fiebre tifoidea, hepatitis A, gastroenteritis, etc., son atribuidos a la ausencia o insuficiencia de la desinfección del agua.

Los principales agentes patógenos que pueden ser transmitidos por el agua, son los siguientes:

BACTERIAS /VIRUS

Campylobacter jejuni (3 tipos)

Escherichia coli (71 tipos)

Hepatitis A

Salmonella (1700 especies) Agente de Norwalk

Shigella (4 especies)

Vibrio cholerae

Yersinia enterocolítica

PROTOZOARIOS/ HELMINTOS

Balantidium coli *Ancilostoma duodenale*

Entoameba histolytica *Ascaris lumbricoide*

Fasciolopsis buski

Strongyloides stercolaris

Taenia solium

Estos microorganismos patógenos pasan a las aguas por desechos procedentes de heces fecales humanas o de animales (corrales de engorde en granjas bovinas, de cerdos o de aves, en los que la disposición final de sus desechos no es la adecuada y pueden contaminar los cursos acuíferos) (65).

Con el fin de combatir estos agentes patógenos se ha optado por la formación de profesionales sanitarios, la publicación de información destinada a la población, así como la implantación de programas nacionales de vigilancia de microorganismos resistentes a antibióticos, mediante el reemplazarlos o la disminución de su utilización con el uso de extractos vegetales como parte del control bacteriano. Ciertas plantas se han utilizado desde la antigüedad por sus propiedades antimicrobianas y actualmente se ha comprobado científicamente (41).

Actualmente se han encontrado aproximadamente 10.000 metabolitos secundarios entre las plantas superiores e inferiores y a medida que se investiga aparecen más. Se sospecha que el número de metabolitos vegetales con actividad biológica es superior al número de especies de plantas conocidas, a muchos de estos metabolitos estudiados ya se les ha comprobado su capacidad biocida (41).

1.6 ANTECEDENTES

1.6.1 METABOLITOS SECUNDARIOS

Se estima que el mercado de esteroides derivados de plantas cuesta 22.000 millones de dólares, el mercado de los antineoplásicos, vincristina y vinblastina tiene un valor de 100 millones de dólares anuales y el de escopolamina y nicotina suman un millón anualmente (46).

Gupta M.P. (26), plantea que el mercado mundial de medicamentos basados en plantas se estima en 50.000 millones de dólares, el consumo mundial de fitoterapéuticos en Europa es de 6.000 millones de dólares, Estados Unidos importa productos botánicos crudos por 750 millones de dólares y China produjo en un año medicamentos con base en plantas por 1.400 millones de dólares.

Las plantas pertenecientes a la familia *Asteraceae* han contribuido ampliamente al desarrollo de investigaciones, debido al gran número de especies y la variedad de productos naturales utilizados en el tratamiento de las enfermedades, según los estudios realizados por Heinrich M. *Et al* (28), estos productos naturales contienen sesquiterpenos, lactonas, poliacetilenos, alcaloides, monoterpenos y compuestos fenólicos con propiedades antiinflamatorias y relajantes del músculo liso, por lo que son utilizados especialmente en caso de espasmos gastrointestinales.

En la región caribeña realizan una infusión de las partes aéreas de la *Neurolaena lobata* para el tratamiento de varios tipos de dolor. Al respecto, Gracioso JS. *Et al* (25), han estudiado la toxicidad oral aguda de los extractos hidroalcohólico, hexanólico y clorofórmico de la planta, sus resultados sugieren que el extracto hidroalcohólico de la *N. Lobata* tiene propiedades analgésicas y antiinflamatorias importantes.

Horváth Z. *Et al*, aislaron polisacáridos de *Echinops sphaerocephalus*, *Echinops ruthenicus*, *Echinops exaltatus*, *Echinops commutatus* y *Echinops orientalis* encontrando efectos antiinflamatorios y antitumorales relacionados con el contenido de ácido urónico de estas plantas (29).

Estudios hechos por Hidalgo Báez *et al* (27), muestran que los extractos acuoso y en diclorometano de las hojas, de la *Chromolaena moritzina*, así como el extracto de acetato de etilo de las flores presentan actividad antibacteriana contra el

Staphylococcus aureus. Estos resultados justifican los usos de la etnomedicina en caso de infecciones locales. La *Mikania glomerata*, conocida como "el guaco", es otra especie utilizada en la medicina tradicional. El extracto etanólico de esta planta es un agente antialérgico y antiinflamatorio. Para analizar estas propiedades, Fierro. *Et al* (22), evaluaron este extracto en pleuritis alérgica y en inflamaciones locales. Los resultados de estos estudios sugieren que el extracto etanólico de la *Mikania g*. Es eficaz en la inhibición de inflamaciones de origen inmunológico no agudo.

Sangwan RS. *Et al* (47), estudiaron la planta herbácea *Artemisia annual*, que pertenece a la familia de *Asteraceae* y es la fuente natural del potente compuesto antimalárico que actúa como principio activo del medicamento Artemisinin, además de contener un valioso aceite esencial. Esta planta en la actualidad es la única fuente comercial para la producción de Artemisinin, dado que hasta ahora todas las síntesis químicas ensayadas no han sido viables.

1.6.2 DESCRIPCION BOTANICA

Reino: Vegetal

División: Angiospermae

Clase: Dicotiledoneae

Subclase: Sympetale

Orden: Campanulaes

Familia: Compositae (Asteraceae)

Género: *Tagetes*

Especie: *caracasana*

1.6.3 BACTERIA *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli*

En Francia, se está realizando la vigilancia a microorganismos que presentan resistencia a antibióticos, se lleva a cargo del ONPCM (Observatorio Nacional de Recetas y Consumo de Medicamentos; *Observatoire National des Prescriptions et des Consommations des Médicaments*) en representación del organismo público AFSSAPS (Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de Productos para la Salud; *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé*). Cada 10 años se publica una tabla del consumo de distintos antibióticos. Además, gracias a los 10 estudios anuales realizados por el Instituto Nacional de Estadística y de Estudios Económicos (*Institut National des Statistiques et des Etudes Economiques; INSEE*) se obtienen datos sobre la sanidad, la atención médica, enfermedades más frecuentes en pacientes generalmente infecciones por *staphylococcus aureus* y *Echerichiia coli* y tipo de tratamiento adecuado (11). Por otra parte, en noviembre de 1999 se puso en marcha un estudio en todos los hospitales franceses con el fin de obtener una perspectiva global de las distintas formas de recetar antibióticos. Además, se están desarrollando unas herramientas de análisis para evaluar el número de días de tratamiento y de enfermos tratados a partir de los datos de ventas de antibióticos, encontrando que la mayor parte de sepas de la bacteria *Staphylococcus aureus* son resistentes a la vancomicina y otros antibióticos utilizados tradicionalmente (2).

En 1999-2000 Irlanda publicó unas pautas elaboradas en base a tratamientos que actualmente se utilizan en pacientes externos afectados por las seis infecciones más habituales (otitis media, sinusitis, bronquitis aguda, faringitis, infecciones de la piel e infecciones del tracto urinario). Causadas entre otras bacterias por la *Staphylococcus aureus* (3).

Desde 1997, el Instituto Nacional de Sanidad de Noruega publica un boletín mensual para el profesional sanitario, centrado en la resistencia a los antibióticos

En 1999 se creó el grupo de trabajo oficial del Ministerio de Asuntos Sociales y Sanidad para el control de resistencias a antibióticos y el desarrollo de una normativa de antibióticos (49).

Seis países (Bélgica, Dinamarca, Inglaterra y Gales, Finlandia, Grecia y Noruega) cuentan con planes de acción oficiales para la prevención de resistencias a antibióticos en hospitales y la comunidad, que se llevaron a la práctica en 1999, 3 y 2000, respectivamente (30).

Cuatro países (Francia, Irlanda, Países Bajos y Suecia) han dado un primer paso hacia la promulgación de una ley nacional. Grupos de trabajo coordinados por el InVS de Francia presentaron al Ministerio de Sanidad de este país, en enero de 1999, una propuesta de plan de acción nacional para el control de resistencias a los agentes antimicrobianos (2).

La implantación de una vigilancia de microorganismos resistentes y la recogida de datos sobre el consumo de antibióticos está hoy ampliamente extendida. En el campo específico de las infecciones nosocomiales, varios países cuentan con comités dedicados específicamente a esta vigilancia, algunos de ellos desde 1998, la mayoría de los países europeos declararon utilizar varias unidades de medición del consumo de antibióticos, como el coste, la dosis diaria definida (DDD), el peso, etc., aunque una unidad, la DDD, es compartida por casi todos ellos. Esta unidad ha sido recomendada por la Organización Mundial de la Salud (36), lo que significa que probablemente se convierta en la unidad a utilizar en las comparaciones internacionales.

El número creciente de países que han adoptado o en los que se ha propuesto la adopción de planes nacionales de prevención de resistencias a los agentes antimicrobianos, así como los numerosos cambios de organización nacional experimentados en los últimos años y las múltiples recomendaciones en materia de

uso adecuado de los antibióticos de reciente publicación, reflejan la evolución de la situación desde la publicación de las Recomendaciones de Copenhague (30).

Científicos japoneses han logrado descifrar la estructura genética de una de las bacterias más patógenas del mundo. Es el «*Staphylococcus aureus*», responsable de cerca del ochenta por ciento de las infecciones hospitalarias y resistente a los medicamentos más efectivos. A partir de este descubrimiento los investigadores iniciarán nuevos estudios para poder fabricar fármacos y vacunas que combatan las infecciones que produce la bacteria. Lo más preocupantes es que, con los años, esta bacteria se ha hecho resistente a la meticilina, uno de los antibióticos con los que tradicionalmente se ha combatido. Otra de las cepas del *Staphylococcus aureus* es resistente al antibiótico considerado como «el último recurso», la vancomicina (67).

2. METODOLOGIA

2.1 RECOLECCIÓN, SECADO Y TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

La recolección del material vegetal se realiza en el resguardo de Tacuelló, en el municipio de Toribío, departamento del Cauca, una vez recolectado el material, se seca a temperatura ambiente hasta alcanzar un peso constante. luego se toman las partes aéreas (tallo y hojas), se cortan en trozos pequeños de 1 cm y se almacenan en recipientes de vidrio ámbar, a temperatura ambiente y en la oscuridad.

En recipientes diferentes y siguiendo el mismo tratamiento, se almacenan las flores.

2.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE LA PLANTA

En la obtención de los extractos, se siguen dos procedimientos diferentes

Reactivos

Eter de petróleo (Merck), cloroformo (Merck), etanol (Merck), agua destilada.

Procedimiento para la obtención de extractos para el análisis fitoquímico

Para la obtención del extracto se toman 50g. De material vegetal previamente seco a temperatura ambiente, se adiciona una mezcla de dos solventes etanol y agua,

en proporción 1:1, se somete a reflujo por 48 horas y se deja en reposo 24 horas, posteriormente se filtra y lava con el mismo solvente, se destila el etanol y parte del agua, luego se realizan las particiones correspondientes con éter de petróleo y cloroformo.

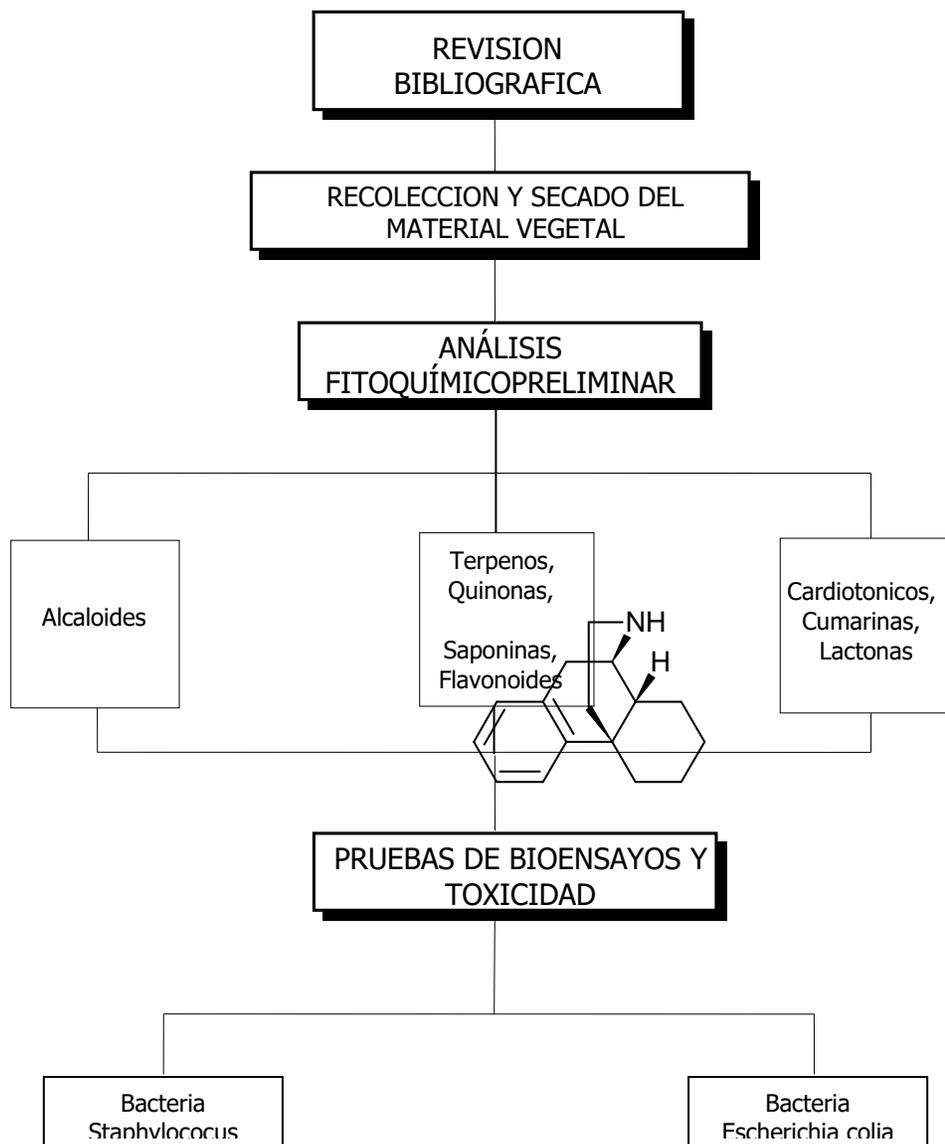


Figura 1 Flujograma de Actividades

Procedimiento para la obtención de extracto para los Bioensayos.

El material seco se deja en maceración durante 48 horas a temperatura ambiente, posteriormente se refluja durante una hora a 40°C, se filtra y lava con el mismo solvente, se destila el etanol y parte del agua, luego se realizan las particiones correspondientes con éter de petróleo y cloroformo

2.3 ANALISIS FITOQUIMICO PRELIMINAR

El análisis fitoquímico preliminar se realiza en los extractos etanólico, clorofórmico y etéreo de las flores, tallos y- hojas. El procedimiento se realiza siguiendo el protocolo descrito por el doctor Sanabria (17) (45) (Ver Anexo 1)

2.3.1 Análisis de Alcaloides**Reactivos**

Ácido clorhídrico, reactivo de Dragendorff, reactivo de Mayer, reactivo de Valser y reactivo de Reineckato (45). (Ver Anexo 1)

Procedimiento

La determinación preliminar de alcaloides se realiza mediante las pruebas de precipitación de Dragendorff, Mayer, Valser y Reineckato (45). (Ver Anexo 1)

2.3.2 Análisis para Esteroides y Triterpenoides**Reactivos**

Ácido Sulfúrico, cloroformo, anhídrido acético.

Procedimiento

Se realiza la prueba cromogénica de Lieberman Burchard (15)(45). (Ver Anexo 1)

2.3.3 Análisis para Flavonoides

Reactivos

Limaduras de magnesio, granallas de Zinc, acetato de sodio, anhídrido acético, ácido clorhídrico (45). (Ver Anexo 1)

Procedimiento

Se realizan las pruebas calorimétricas de:

Prueba de Cianidina, ensayo con Zn/HCl, reacción con ácido clorhídrico al 10%, Ensayo de Pacheco, Reacción con los álcalis (40). (Ver Anexo 1)

2.3.4 Análisis de Nafto y/o Antraquinonas

Reactivos

Ácido Sulfúrico, peróxido de hidrógeno, benceno, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio

Procedimiento

Se realiza la prueba de Borntrager Kraus. La cual debe dar una coloración rojiza (45) (17). (Ver Anexo 1)

2.3.5 Análisis de Taninos y Saponinas

Reactivos

Reactivo de gelatina – sal (45) , urea, cloruro férrico, óxido de magnesio, etanol, digitonina. (Ver Anexo 1)

Procedimiento

Se realizan las pruebas de gelatina – sal, hemólisis y de espuma. (45) (17). (Ver Anexo 1)

2.3.6 Análisis de Cardiotónicos**Reactivos**

Cloroformo, acetona, etanol, vainillina, ácido *o*- fosfórico, hidroxamato férrico, lorhidrato de hidroxilamina, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, cloruro férrico, digitoxina, ácido 1 – 3 diinitrobenzoico, hidróxido de potasio, hidróxido de sodio, nitrato de plata, hidróxido de amonio.

Procedimiento

Se realizan las pruebas de Kedde, Tollens, Killiani y de Raymond (45) (17). (Ver Anexo 1)

2.4 FRACIONAMIENTO DE LOS EXTRACTOS**Reactivos**

Benceno (Merck), cloroformo(Merck), ácido acético (Merck), agua destilada, acetona (Aldrich), hexano (Merck), acetato de etilo (Merck), n - hexano (Merck), sílica gel (Merck),éter de petróleo (Merck),metanol (Merck), etanol(Merck).

Procedimiento

Todos los extractos se sometieron a cromatografía en capa fina con soporte de sílica gel. (0.2 mm de espesor de capa).

- ◆ Extracto acuoso – alcohólico (hoja – tallo) Eluyente usado: n – hexano : acetato de etilo (1:9), acetato de etilo : cloroformo (3:7)
- ◆ Extracto acuoso – alcohólico (flores) Eluyente usado: n – hexano : acetato de etilo (1:9), acetato de etilo : cloroformo (7:3)
- ◆ Extracto etéreo (hoja – tallo) Eluyente usado: Benceno : Acetona (9:1)
- ◆ Extracto etéreo (flores) Eluyente usado: acetato de etilo : cloroformo (3:1)
- ◆ Extracto clorofórmico(hoja – tallo) Eluyente usado: Benceno : acetato de etilo : cloroformo (6:2:2)
- ◆ Extracto clorofórmico(flores) Eluyente usado: Benceno : Benceno : acetona (2:1)

Con las cromatografías realizadas, se tiene una noción acerca del número de compuestos presentes en cada extracto.

Debido a que con las cromatografías realizadas al extracto acuoso – alcohólico se obtuvieron mejores resultados y que al realizar las pruebas fitoquímicas preliminares este da prueba positiva para esteroides, flavonoides, taninos, saponinas los cuales tienen una reconocida actividad biológica, se escogió este extracto para realizar las diferentes pruebas.

A el extracto acuoso – alcohólico obtenido según el procedimiento descrito por el Doctor Sanabria (45) (Ver Anexo 1), se desengrasa inicialmente con éter de petróleo, posteriormente se extrae la fase acuosa con etanol puro, se evapora el extracto obtenido con calentamiento lento no superior a 50 °C. Se realiza una cromatografía en capa fina utilizando como eluyente la mezcla n – hexano : acetato de etilo en diferentes proporciones, siendo las más apropiadas las cromatografías en capa fina n – hexano : acetato de etilo 1:9 y cloroformo acetato de etilo 7 : 3.

El extracto se concentra hasta sequedad en baño maría y se agregan 2g de sílica gel, el extracto seco se procede a fraccionar a través de una columna cromatográfica empacada con gel de sílice (25 x 1.5 cm, 0.05 – 0.2mm), usando como agente de elusión la mezcla n – hexano : acetato de etilo 1:9, obteniéndose dos fracciones, la primera de color naranja y la segunda de color amarillo verdoso (claro).

De la primera fracción se obtiene un precipitado amarillo claro, el cual es soluble en etanol y metanol y parcialmente soluble en agua, cloroformo y acetato de etilo. Su punto de fusión es de (165 – 168) °C, al realizar pruebas para metabolitos secundarios, da positiva la de flavonoides, se realiza el ensayo de HCl/Zn (ANEXO 1), produciéndose una coloración rojiza, al realizar la prueba con HCl/Mg, se produce una coloración rosada. Ha estos cristales se le realizaron diferentes espectros de ultra violeta el cual mostró dos bandas uno en 272 nm, el segundo en 344 nm (figura 15), un espectro I.R (KBr) (Figura 19), un RMN ¹H (figura 20) y ¹³ C (Figura 21).

2.5 PRUEBAS DE TOXICIDAD PARA *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

Pruebas Biológicas

Las pruebas biológicas realizadas son las siguientes

2.5.1 Determinación de la MIC

2.5.1.1 Prueba de susceptibilidad por dilución en caldo

Se agregan 10 mL del caldo Mueller – Hinton a 10 tubos de ensayo rotulados con los valores de las diluciones preparadas; las cuales corresponden a los valores de 100, 50, 12.5, 6.25, 3.12, 1.6, 0.8, 0.4 ppm de los extractos de *Tagetes caracasana*.

Se agregan 5 mL de cada dilución en el correspondiente tubo de ensayo, posteriormente se siembra una suspensión bacteriana en cada tubo.

El tubo # 10 no contiene extracto, el cual sirvió como control de crecimiento. Los tubos se incuban a 37°C durante 18 horas. Al final del periodo de incubación, se examinan visualmente, controlando la turbidez. (28) En la figura 2 se observa el diseño experimental utilizado.

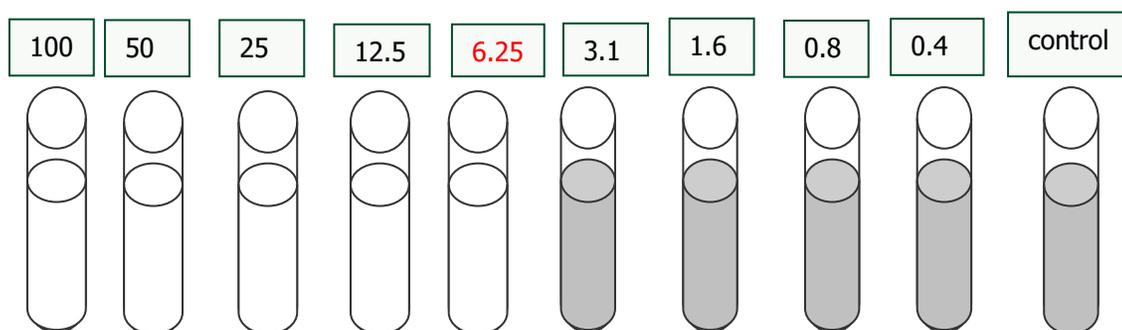


figura 2 Prueba de susceptibilidad por dilución en caldo Muller Hinton. La concentración inhibitoria mínima para la prueba mostrada aquí es 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$

2.5.2 Determinación de la capacidad antibacteriana de el *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* con los extractos acuoso-alcohólico, clorofórmico y etéreo

Prueba de dilución en agar

Para realizar esta prueba, primero se preparan las soluciones con concentraciones de, 4.5, 5.25, 6.0, 6.75 ppm, establecidas en el protocolo y teniendo en cuenta la MIC(6.25) de los extractos de *Tagetes caracasana* mencionados.

Este procedimiento se lleva a cabo en condiciones estrictas de apepsia para evitar la contaminación del cultivo en las cajas de Petri.

En las cuales se agregan 15 mL del agar Mueller – Hinton, en el cual se sembró la bacteria deseada ubicando posteriormente tres discos uno de los cuales contenía la concentración del extracto en estudio, otro disco fue, el del antibiótico, y el tercero se determinó como blanco. Se incubaron a 37°C observando el crecimiento bacteriano a las 8, 12 y 24 horas. (32). En la figura 3, se observa el montaje de esta prueba.

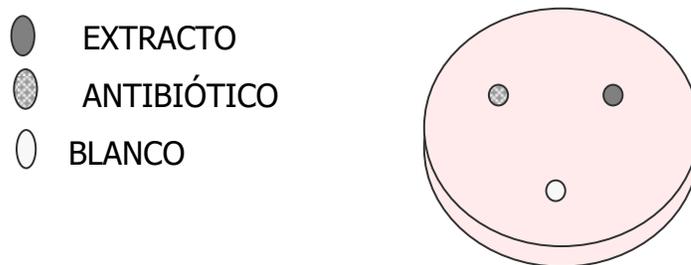


figura 3 Placa de Susceptibilidad por dilución en agar.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Diseño experimental para *Staphylococcus aureus*

Unidad Experimental: una caja de Petri.

Tamaño de la unidad experimental: 10cm.de diámetro

Forma: Circular.

Número de repeticiones: 3 por tratamiento

Número de tratamientos: 4(4.5, 5.25, 6.0, 6.75)ppm

Distribución de los tratamientos : Completamente al azar.

Variables:

Independiente: Concentraciones del extracto a probar(acuo-alcohólico, Etéreo, clorofórmico) y del metabolito aislado.

Dependiente: Crecimiento de las bacterias.

Diseño experimental para *Escherichia coli*

Unidad Experimental: una caja de Petri.

Tamaño de la unidad experimental: 10cm.de diámetro

Forma: Circular.

Número de repeticiones: 3 por tratamiento

Número de tratamientos: 4(4.5, 5.25, 6.0, 6.75) ppm

Distribución de los tratamientos : Completamente al azar.

Variables:

Independiente: Concentraciones del extracto a probar(acuo-alcohólico ,Etéreo-Clorofórmico de *Tagetes caracasana*) y del metabolito aislado

Dependiente: Crecimiento bacterial.

2.6 TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

El tratamiento estadístico aplicado, para este diseño experimental es Análisis de varianza (ANOVA) para un diseño completamente al azar, y la prueba de comparación múltiple de Duncan y Scheffe para los Bioensayos.

3. RESULTADOS

Los resultados obtenidos en esta investigación se van a presentar teniendo en cuenta el estudio realizado. Por lo cual se presentaran los cuadros, gráficas, tablas y espectros de la siguiente manera:

3.1 análisis fitoquímico preliminar

3.2 Ensayos de Bioactividad

3.3 análisis estadístico

3.4 análisis Espectroscópico

3.1 ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Tabla 2. Análisis de metabolitos secundarios presentes en Tallo – Hojas de <i>Tagetes caracasana</i>				
IDENTIFICACIÓN		OBSERVACIONES/EXTRACTOS		
METABOLITO	PRUEBA	CLOROFÓRMICO	ACUO-ALCOHÓLICO	ETÉREO
ALCALOIDES	Draguendorff	-	+++	+
	Mayer	-	-	-
	Valser	-	-	-
	Reinekato	+	++	+
FLAVONOIDES	Cianidina/ Shinoda	Rosado tenue	Coloración rojiza	Rosado tenue
	HCl/Zn	-	Rosada tenue	-
	Pacheco	-	-	-
TANINOS	Gelatina – Sal	-	+++	-
	FeCl ₃	-	+++	-
SAPONINAS	Hemólisis	-	+++	-
	Espuma	-	+++	-
ESTEROIDES Y/O TRITERPENOIDES	Libermann-Burschard	-	++	++
CUMARIINAS	CCD	+	+	-

Tabla 3 Análisis de metabolitos secundarios presentes en las flores de *Tagetes caracasana*

IDENTIFICACIÓN		OBSERVACIONES/EXTRACTOS		
METABOLITO	PRUEBA	CLOROFÓRMICO	ACUO-ALCOHÓLICO	ETÉREO
ALCALOIDES	Draguendorff	-	++	+
	Mayer	-	+	-
	Valser	-	+	-
	Reinekato	+	-	-
FLAVONOIDES	Cianidina	-	Coloración rojo claro	-
	HCl/Zn pacheco	Rosado tenue	Rosado tenue	-
		-	-	-
TANINOS	Gelatina – Sal	-	+	+
	FeCl ₃	-	-	-
SAPONINAS	Hemólisis	-	-	-
	Espuma	-	-	-
ESTEROIDES Y/O TRITERPENOIDES	Libermann-Burschard	-	+	+
CUMARINAS	CCD	-	-	-

3.2 ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD

3.2.1 DETERMINACIÓN DE LA MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA (MIC) DE LOS EXTRACTOS DE *tagetes caracasana* en *staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

Tabla 4. MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS DE *Tagetes caracasana* en *Staphylococcus aureus*

PARTE	<i>Staphylococcus aureus</i> (MIC ppm)				
DE LA	Extractos			Antibiotico	
PLANTA	Etéreo	clorofórmico	Acuo-alcoholico	Gentamicina	Vancomicina
Tallo-Hoja	12.5	12.5	6.25	6.25	12.5
Flores	12.5	12.5	6.25	6.25	12.5

Tabla 5. MÍNIMA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS DE *Tagetes caracasana* en *Escherichia coli*

PARTE	<i>Escherichia coli</i> (MIC ppm)				
DE LA	Extractos			Antibiotico	
PLANTA	Etéreo	clorofórmico	Acuo-alcoholico	Gentamicina	Vancomicina
Tallo-Hoja	12.5	6.5	3.12	3.12	12.5
Flores	12.5	12.5	6.25	6.25	12.5

3.2.2 PRUEBAS DE SUCEPTIBILIDAD POR DIFUSIÓN EN DISCO DE LOS EXTRACTOS DE *Tagetes caracasana* en *E. coli*

Tabla 6. Prueba de Difusión en disco en *E. coli*

EXPERIMENTO	TRATAMIENTO	ALO (mm)	CONCENTRACIÓN (ppm)	INTERACCIÓN
1	1	10	4,5	1
1	2	0,9	4,5	2
1	3	0,9	4,5	3
1	4	20	4,5	4
1	5	30	4,5	5
1	6	15	4,5	6
1	1	10	4,5	1
1	2	10	4,5	2
1	3	10	4,5	3
1	4	20	4,5	4
1	5	30	4,5	5
1	6	12	4,5	6
1	1	12	4,5	1
1	2	0,9	4,5	2
1	3	10	4,5	3
1	4	20	4,5	4
1	5	30	4,5	5
1	6	12	4,5	6
2	1	10	4,5	1
2	2	0,9	4,5	2
2	3	10	4,5	3
2	4	20	4,5	4
2	5	30	4,5	5
2	6	12	4,5	6
2	1	10	4,5	1
2	2	10	4,5	2
2	3	10	4,5	3
2	4	20	4,5	4
2	5	30	4,5	5
2	6	15	4,5	6
2	1	12	4,5	1
2	2	10	4,5	2
2	3	10	4,5	3
2	4	20	4,5	4
2	5	30	4,5	5
2	6	12	4,5	6
3	1	0,9	4,5	1
3	2	10	4,5	2
3	3	10	4,5	3
3	4	20	4,5	4

EXPERIMENTO	TRATAMIENTO	ALO (mm)	CONCENTRACIÓN (ppm)	INTERACCIÓN
3	5	30	4,5	5
3	6	12	4,5	6
3	1	10	4,5	1
3	2	10	4,5	2
3	3	0,7	4,5	3
3	4	20	4,5	4
3	5	30	4,5	5
3	6	15	4,5	6
3	1	0,9	4,5	1
3	2	0,9	4,5	2
3	3	0,9	4,5	3
3	4	20	4,5	4
3	5	30	4,5	5
3	6	12	4,5	6
1	1	15	5,25	8
1	2	12	5,25	9
1	3	10	5,25	10
1	4	20	5,25	11
1	5	30	5,25	12
1	6	17	5,25	13
1	1	15	5,25	8
1	2	12	5,25	9
1	3	10	5,25	10
1	4	20	5,25	11
1	5	30	5,25	12
1	6	18	5,25	13
1	1	12	5,25	8
1	2	12	5,25	9
1	3	12	5,25	10
1	4	20	5,25	11
1	5	35	5,25	12
1	6	17	5,25	13
2	1	12	5,25	8
2	2	10	5,25	9
2	3	12	5,25	10
2	4	20	5,25	11
2	5	30	5,25	12
2	6	17	5,25	13
2	1	15	5,25	8
2	2	12	5,25	9
2	3	12	5,25	10
2	4	25	5,25	11
2	5	30	5,25	12
2	6	18	5,25	13
2	1	15	5,25	8
2	2	12	5,25	9
2	3	12	5,25	10
2	4	20	5,25	11
2	5	30	5,25	12

EXPERIMENTO	TRATAMIENTO	ALO (mm)	CONCENTRACIÓN (ppm)	INTERACCIÓN
2	6	18	5,25	13
3	1	12	5,25	8
3	2	15	5,25	9
3	3	12	5,25	10
3	4	25	5,25	11
3	5	30	5,25	12
3	6	18	5,25	13
3	1	12	5,25	8
3	2	12	5,25	9
3	3	10	5,25	10
3	4	25	5,25	11
3	5	35	5,25	12
3	6	17	5,25	13
3	1	12	5,25	8
3	2	10	5,25	9
3	3	12	5,25	10
3	4	20	5,25	11
3	5	30	5,25	12
3	6	17	5,25	13
1	1	15	6	15
1	2	12	6	16
1	3	12	6	17
1	4	25	6	18
1	5	35	6	19
1	6	12	6	20
1	1	17	6	15
1	2	15	6	16
1	3	15	6	17
1	4	25	6	18
1	5	35	6	19
1	6	15	6	20
1	1	15	6	15
1	2	17	6	16
1	3	15	6	17
1	4	25	6	18
1	5	38	6	19
1	6	15	6	20
2	1	15	6	15
2	2	15	6	16
2	3	17	6	17
2	4	20	6	18
2	5	35	6	19
2	6	17	6	20
2	1	17	6	15
2	2	15	6	16
2	3	15	6	17
2	4	25	6	18
2	5	35	6	19
2	6	15	6	20

EXPERIMENTO	TRATAMIENTO	ALO (mm)	CONCENTRACIÓN (ppm)	INTERACCIÓN
2	1	17	6	15
2	2	15	6	16
2	3	15	6	17
2	4	28	6	18
2	5	35	6	19
2	6	15	6	20
3	1	17	6	15
3	2	15	6	16
3	3	15	6	17
3	4	25	6	18
3	5	35	6	19
3	6	15	6	20
3	1	15	6	15
3	2	17	6	16
3	3	15	6	17
3	4	28	6	18
3	5	35	6	19
3	6	15	6	20
3	1	17	6	15
3	2	15	6	16
3	3	12	6	17
3	4	25	6	18
3	5	35	6	19
3	6	15	6	20
1	1	12	6,75	22
1	2	10	6,75	23
1	3	10	6,75	24
1	4	20	6,75	25
1	5	35	6,75	26
1	6	15	6,75	27
1	1	12	6,75	22
1	2	10	6,75	23
1	3	12	6,75	24
1	4	25	6,75	25
1	5	35	6,75	26
1	6	12	6,75	27
1	1	12	6,75	22
1	2	12	6,75	23
1	3	12	6,75	24
1	4	28	6,75	25
1	5	38	6,75	26
1	6	15	6,75	27
2	1	15	6,75	22
2	2	12	6,75	23
2	3	12	6,75	24
2	4	25	6,75	25
2	5	35	6,75	26
2	6	12	6,75	27
2	1	12	6,75	22

EXPERIMENTO	TRATAMIENTO	ALO (mm)	CONCENTRACIÓN (ppm)	INTERACCIÓN
2	2	15	6,75	23
2	3	12	6,75	24
2	4	25	6,75	25
2	5	38	6,75	26
2	6	15	6,75	27
2	1	12	6,75	22
2	2	12	6,75	23
2	3	12	6,75	24
2	4	28	6,75	25
2	5	35	6,75	26
2	6	12	6,75	27
3	1	12	6,75	22
3	2	10	6,75	23
3	3	12	6,75	24
3	4	28	6,75	25
3	5	35	6,75	26
3	6	15	6,75	27
3	1	12	6,75	22
3	2	10	6,75	23
3	3	12	6,75	24
3	4	28	6,75	25
3	5	38	6,75	26
3	6	15	6,75	27
3	1	12	6,75	22
3	2	12	6,75	23
3	3	12	6,75	24
3	4	28	6,75	25
3	5	35	6,75	26
3	6	10	6,75	27

1 → Extracto acuo – alcohólico

2 → Extracto etéreo

3 → Extracto clorofórmico

4 → Vancomicina

5 → Gentamicina

6 → * Flavonoide aislado

3.2.3 PRUEBAS DE SUCEPTIBILIDAD POR DIFUSIÓN EN DISCO DE LOS EXTRACTOS DE *Tagetes caracasana* en *S. aureus*

Tabla 7. Prueba de Difusión en disco en *S. aureus*

EXPERIMENTO	TRATAMIENTO	ALO (mm)	CONCENTRACIÓN (ppm)	INTERACCIÓN
1	1	10	4,5	1
1	2	0,9	4,5	2
1	3	10	4,5	3
1	4	20	4,5	4
1	5	30	4,5	5
1	6	12	4,5	6
1	1	10	4,5	1
1	2	10	4,5	2
1	3	10	4,5	3
1	4	20	4,5	4
1	5	30	4,5	5
1	6	12	4,5	6
1	1	12	4,5	1
1	2	0,9	4,5	2
1	3	10	4,5	3
1	4	20	4,5	4
1	5	35	4,5	5
1	6	12	4,5	6
2	1	10	4,5	1
2	2	0,9	4,5	2
2	3	10	4,5	3
2	4	20	4,5	4
2	5	30	4,5	5
2	6	12	4,5	6
2	1	10	4,5	1
2	2	10	4,5	2
2	3	10	4,5	3
2	4	20	4,5	4
2	5	30	4,5	5
2	6	12	4,5	6
2	1	12	4,5	1
2	2	10	4,5	2
2	3	10	4,5	3
2	4	20	4,5	4
2	5	30	4,5	5
2	6	12	4,5	6
3	1	10	4,5	1
3	2	10	4,5	2

EXPERIMENTO	TRATAMIENTO	ALO (mm)	CONCENTRACIÓN (ppm)	INTERACCIÓN
3	3	0,9	4,5	3
3	4	20	4,5	4
3	5	30	4,5	5
3	6	12	4,5	6
3	1	12	4,5	1
3	2	10	4,5	2
3	3	10	4,5	3
3	4	20	4,5	4
3	5	30	4,5	5
3	6	12	4,5	6
3	1	10	4,5	1
3	2	10	4,5	2
3	3	12	4,5	3
3	4	20	4,5	4
3	5	30	4,5	5
3	6	12	4,5	6
1	1	12	5,25	7
1	2	12	5,25	8
1	3	12	5,25	9
1	4	20	5,25	10
1	5	30	5,25	11
1	6	17	5,25	12
1	1	12	5,25	7
1	2	10	5,25	8
1	3	10	5,25	9
1	4	20	5,25	10
1	5	30	5,25	11
1	6	15	5,25	12
1	1	12	5,25	7
1	2	12	5,25	8
1	3	12	5,25	9
1	4	20	5,25	10
1	5	30	5,25	11
1	6	15	5,25	12
2	1	12	5,25	7
2	2	10	5,25	8
2	3	12	5,25	9
2	4	20	5,25	10
2	5	30	5,25	11
2	6	17	5,25	12
2	1	12	5,25	7
2	2	10	5,25	8
2	3	12	5,25	9
2	4	20	5,25	10
2	5	35	5,25	11
2	6	15	5,25	12
2	1	12	5,25	7
2	2	12	5,25	8
2	3	12	5,25	9

EXPERIMENTO	TRATAMIENTO	ALO (mm)	CONCENTRACIÓN (ppm)	INTERACCIÓN
2	4	25	5,25	10
2	5	30	5,25	11
2	6	15	5,25	12
3	1	12	5,25	7
3	2	15	5,25	8
3	3	12	5,25	9
3	4	25	5,25	10
3	5	30	5,25	11
3	6	15	5,25	12
3	1	15	5,25	7
3	2	12	5,25	8
3	3	12	5,25	9
3	4	20	5,25	10
3	5	30	5,25	11
3	6	15	5,25	12
3	1	12	5,25	7
3	2	12	5,25	8
3	3	12	5,25	9
3	4	25	5,25	10
3	5	30	5,25	11
3	6	15	5,25	12
1	1	17	6	13
1	2	15	6	14
1	3	12	6	15
1	4	25	6	16
1	5	35	6	17
1	6	15	6	18
1	1	15	6	13
1	2	12	6	14
1	3	15	6	15
1	4	25	6	16
1	5	38	6	17
1	6	12	6	18
1	1	15	6	13
1	2	12	6	14
1	3	15	6	15
1	4	25	6	16
1	5	35	6	17
1	6	12	6	18
2	1	15	6	13
2	2	15	6	14
2	3	12	6	15
2	4	25	6	16
2	5	30	6	17
2	6	12	6	18
2	1	15	6	13
2	2	15	6	14
2	3	12	6	15
2	4	25	6	16

EXPERIMENTO	TRATAMIENTO	ALO (mm)	CONCENTRACIÓN (ppm)	INTERACCIÓN
2	5	35	6	17
2	6	15	6	18
2	1	15	6	13
2	2	15	6	14
2	3	12	6	15
2	4	25	6	16
2	5	35	6	17
2	6	15	6	18
3	1	15	6	13
3	2	12	6	14
3	3	15	6	15
3	4	20	6	16
3	5	38	6	17
3	6	15	6	18
3	1	15	6	13
3	2	15	6	14
3	3	15	6	15
3	4	25	6	16
3	5	38	6	17
3	6	12	6	18
3	1	15	6	13
3	2	15	6	14
3	3	12	6	15
3	4	25	6	16
3	5	35	6	17
3	6	15	6	18
1	1	12	6,75	19
1	2	10	6,75	20
1	3	10	6,75	21
1	4	25	6,75	22
1	5	30	6,75	23
1	6	15	6,75	24
1	1	12	6,75	19
1	2	12	6,75	20
1	3	12	6,75	21
1	4	25	6,75	22
1	5	35	6,75	23
1	6	12	6,75	24
1	1	10	6,75	19
1	2	12	6,75	20
1	3	12	6,75	21
1	4	25	6,75	22
1	5	35	6,75	23
1	6	12	6,75	24
2	1	10	6,75	19
2	2	12	6,75	20
2	3	10	6,75	21
2	4	25	6,75	22
2	5	35	6,75	23

EXPERIMENTO	TRATAMIENTO	ALO (mm)	CONCENTRACIÓN (ppm)	INTERACCIÓN
2	6	12	6,75	24
2	1	12	6,75	19
2	2	12	6,75	20
2	3	10	6,75	21
2	4	25	6,75	22
2	5	35	6,75	23
2	6	15	6,75	24
2	1	12	6,75	19
2	2	10	6,75	20
2	3	12	6,75	21
2	4	25	6,75	22
2	5	35	6,75	23
2	6	12	6,75	24
3	1	12	6,75	19
3	2	12	6,75	20
3	3	10	6,75	21
3	4	25	6,75	22
3	5	35	6,75	23
3	6	12	6,75	24
3	1	12	6,75	19
3	2	10	6,75	20
3	3	12	6,75	21
3	4	25	6,75	22
3	5	35	6,75	23
3	6	15	6,75	24
3	1	12	6,75	19
3	2	12	6,75	20
3	3	10	6,75	21
3	4	25	6,75	22
3	5	35	6,75	23
3	6	12	6,75	24

1 → Extracto acuo – alcohólico

4 → Vancomicina

2 → Extracto etéreo

5 → Gentamicina

3 → Extracto clorofórmico

6 → * Flavonoide aislado

En las figuras 3 - 6 se observan algunos de los datos obtenidos en la prueba de difusión en disco sobre *S. aureus* y *E. Coli*.

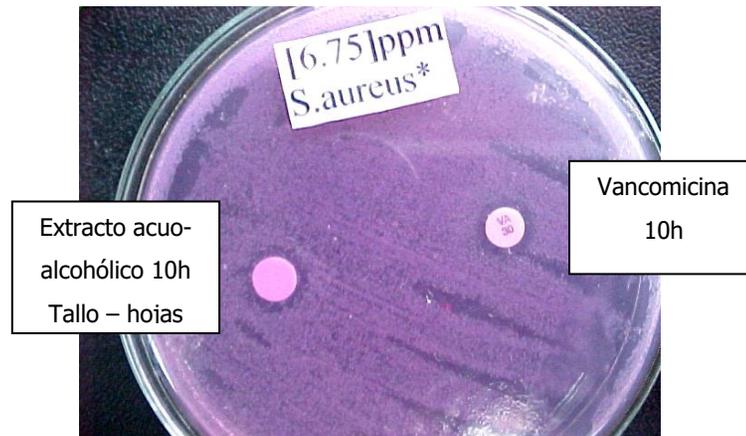


figura 4. Prueba de difusión en disco para el extracto acuo – alcohólico. 10h de haberse realizado la prueba. El halo del antibiótico (Vancomicina) (0.6 mm) es casi similar al del extracto(0.5 mm).

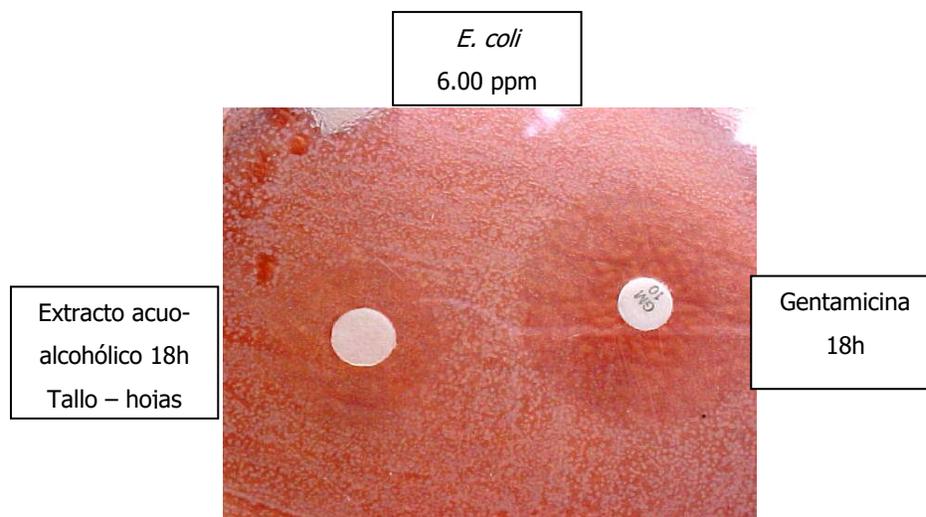


figura 5 Prueba de difusión en disco para el extracto acuo – alcohólico; se observa el crecimiento del alo a una concentración de 6.00 ppp, , después de 18 horas de haberse realizado la prueba. El halo del antibiótico (vancomicina) (32 mm) es mayor al del extracto (14 mm).

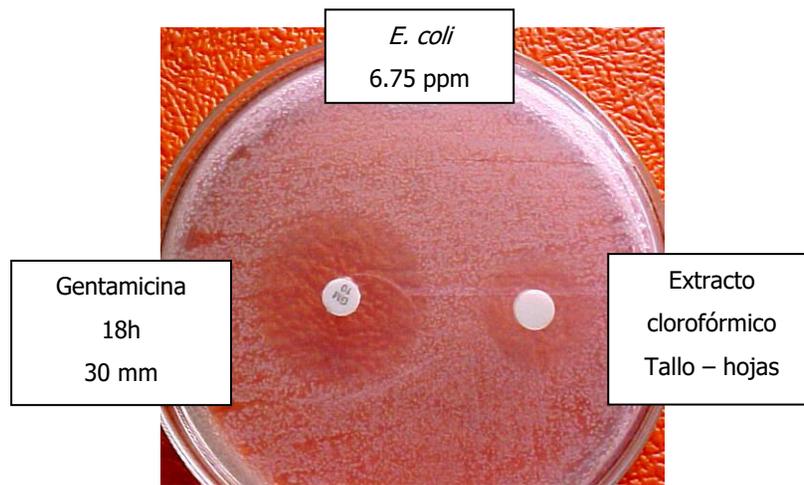


figura 6. Prueba de difusión en disco para el extracto clorofórmico.

Se observa el crecimiento del halo a una concentración de 6.75 ppm, después de 18h de haberse realizado la prueba. El halo del antibiótico (gentamicina) (30 mm) es mayor al del extracto (12 mm).

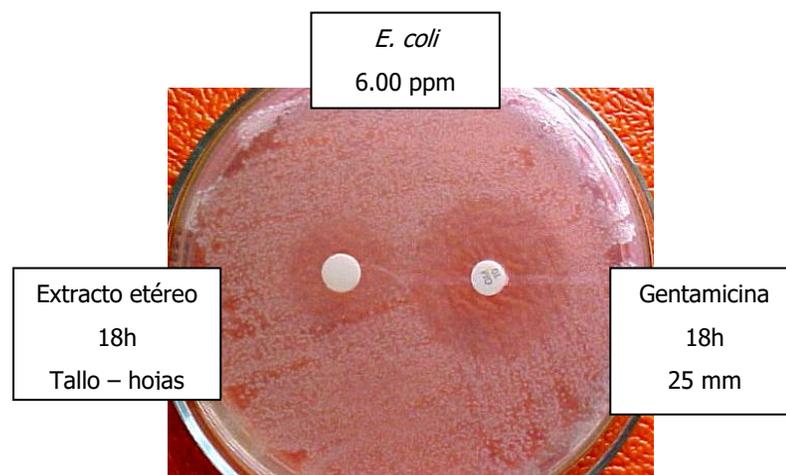


figura 7. Prueba de difusión en disco para el extracto etéreo; se observa el crecimiento del halo a una concentración de 6.00 ppm, , después de 18h de haberse realizado la prueba. El halo del antibiótico (Gentamicina) (25 mm) es mayor al del extracto (10 mm).

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Tabla 8. Estadística descriptiva para diferentes concentraciones y tratamientos en la prueba de difusión en disco sobre *S. Aureus*

		E		s	
	CON	TTO	Media	Desviación Std.	N
DIAMETRO	4.50	1	10.6667	1.0000	9
		2	Medias	4.5500	9
		3	9.2111	3.1861	9
		4	20.0000	.0000	9
		5	30.5556	1.6667	9
		6	12.0000	.0000	9
		Total	14.9000	8.4805	54
	5.25	1	12.3333	1.0000	9
		2	11.6667	1.5811	9
		3	11.7778	.6667	9
		4	21.6667	2.5000	9
		5	30.5556	1.6667	9
		6	15.4444	.8819	9
		Total	17.2407	7.1055	54
	6.00	1	15.2222	.6667	9
		2	14.0000	1.5000	9
		3	13.3333	1.5811	9
		4	24.4444	1.6667	9
		5	35.4444	2.5055	9
		6	13.6667	1.5811	9
		Total	19.3519	8.3850	54
6.75	1	11.5556	.8819	9	
	2	11.3333	1.0000	9	
	3	10.8889	1.0541	9	
	4	25.0000	.0000	9	
	5	34.4444	1.6667	9	
	6	13.0000	1.5000	9	
	Total	17.7037	9.0983	54	
Total	1	12.4444	1.9338	36	
	2	10.9917	3.5618	36	
	3	11.3028	2.3526	36	
	4	22.7778	2.5198	36	
	5	32.7500	2.9020	36	
	6	13.5278	1.6985	36	
	Total	17.2991	8.3939	216	

Tabla 9. Estadística descriptiva para diferentes concentraciones y tratamientos en la prueba de difusión en disco sobre E. coli

	TT	CO	Medias	Desviación Std.	N
DIA	1	4.5	8.422	4.347	9
		5.2	13.33	1.581	9
		6.0	16.11	1.054	9
		6.7	12.33	1.000	9
		Tot	12.55	3.631	36
	2	4.5	5.955	4.796	9
		5.2	11.88	1.453	9
		6.0	15.11	1.453	9
		6.7	11.44	1.666	9
		Tot	11.10	4.241	36
	3	4.5	6.966	4.550	9
		5.2	11.55	.881	9
		6.0	14.55	1.589	9
		6.7	11.77	.666	9
		Tot	11.21	3.634	36
	4	4.5	20.00	.000	9
		5.2	21.66	2.500	9
		6.0	25.11	2.315	9
		6.7	26.11	2.713	9
		Tot	23.22	3.269	36
	5	4.5	30.00	.000	9
5.2		31.11	2.204	9	
6.0		35.33	1.000	9	
6.7		36.00	1.500	9	
Tot		33.11	2.964	36	
6	4.5	13.00	1.500	9	
	5.2	17.44	.527	9	
	6.0	14.88	1.269	9	
	6.7	13.44	1.943	9	
	Tot	14.69	2.214	36	
Tot	4.5	14.05	9.176	54	
	5.2	17.83	7.150	54	
	6.0	20.18	7.905	54	
	6.7	18.51	9.561	54	
	Tot	17.64	8.738	21	

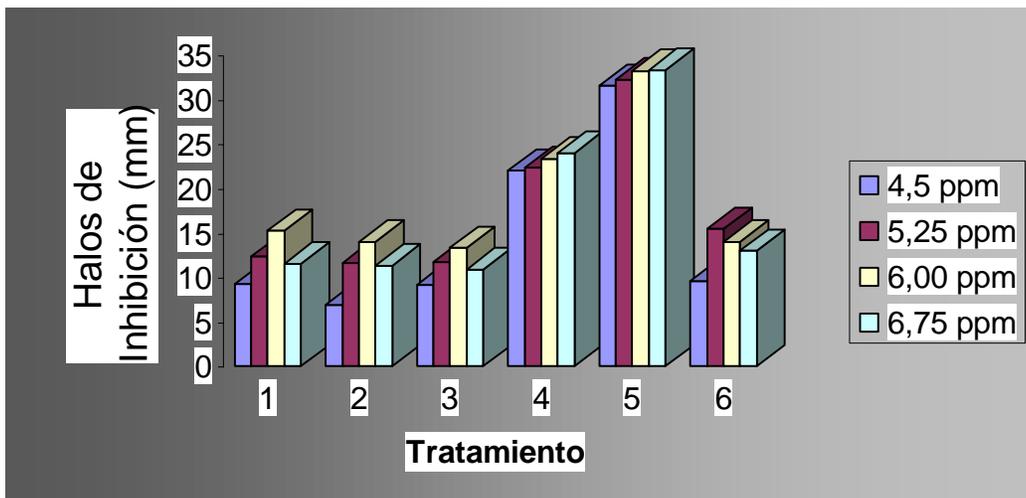


figura 8. Comparación de las medidas de inhibición del crecimiento *de S. aureus* teniendo en cuenta el tratamiento y la concentración.

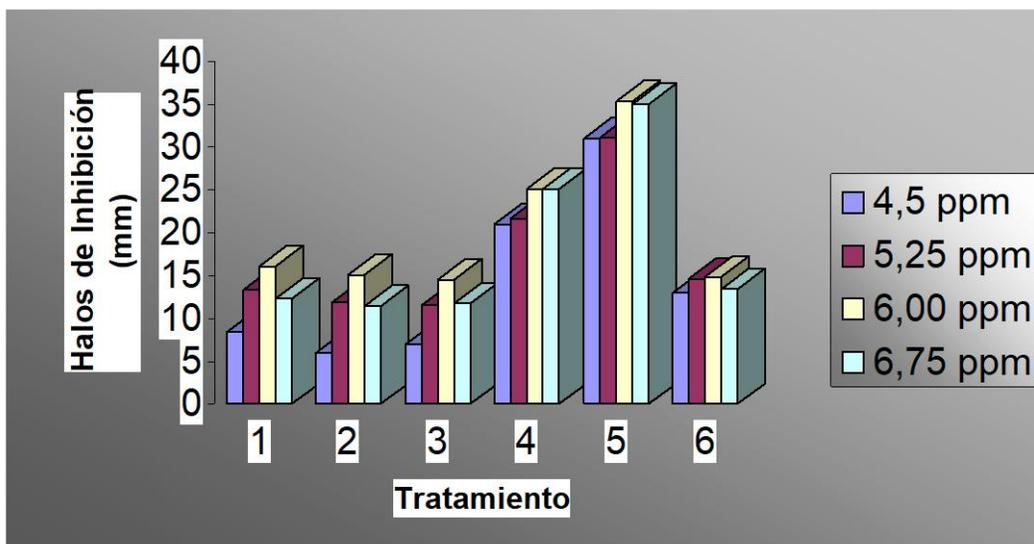


Figura 9. Comparación de las medidas de inhibición del crecimiento *de E. coli* teniendo en cuenta el tratamiento y la concentración

Tabla 10. Comparación múltiple de Scheffe para la prueba de difusión en disco sobre *S. aureus*

Variable Dependiente: Diámetro

	(I) TTO	(J) TTO	Diferencia de medias (I-J)	Error Estandar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Limite Inferior	Limite Superior
Scheffe	1	2	1.4528*	.411	.032	7.013E-02	2.8354
		3	1.1417	.411	.179	-.2410	2.5243
		4	-10.3333*	.411	.000	-11.7160	-8.9507
		5	-20.3056*	.411	.000	-21.6882	-18.9229
		6	-1.0833	.411	.230	-2.4660	.2993
	2	1	-1.4528*	.411	.032	-2.8354	-7.01E-02
		3	-.3111	.411	.989	-1.6938	1.0715
		4	-11.7861*	.411	.000	-13.1688	-10.4035
		5	-21.7583*	.411	.000	-23.1410	-20.3757
		6	-2.5361*	.411	.000	-3.9188	-1.1535
	3	1	-1.1417	.411	.179	-2.5243	.2410
		2	.3111	.411	.989	-1.0715	1.6938
		4	-11.4750*	.411	.000	-12.8576	-10.0924
		5	-21.4472*	.411	.000	-22.8299	-20.0646
		6	-2.2250*	.411	.000	-3.6076	-.8424
	4	1	10.3333*	.411	.000	8.9507	11.7160
		2	11.7861*	.411	.000	10.4035	13.1688
		3	11.4750*	.411	.000	10.0924	12.8576
		5	-9.9722*	.411	.000	-11.3549	-8.5896
		6	9.2500*	.411	.000	7.8674	10.6326
	5	1	20.3056*	.411	.000	18.9229	21.6882
		2	21.7583*	.411	.000	20.3757	23.1410
		3	21.4472*	.411	.000	20.0646	22.8299
		4	9.9722*	.411	.000	8.5896	11.3549
		6	19.2222*	.411	.000	17.8396	20.6049
	6	1	1.0833	.411	.230	-.2993	2.4660
		2	2.5361*	.411	.000	1.1535	3.9188
		3	2.2250*	.411	.000	.8424	3.6076
		4	-9.2500*	.411	.000	-10.6326	-7.8674
		5	-19.2222*	.411	.000	-20.6049	-17.8396

Tabla 11. Prueba de Rango Múltiple de Duncan para la prueba de difusión en disco sobre *S. aureus*

TRATAMIENTO	N	DIAMETROS SIGNIFICANTES					
		1	2	3	4	5	
Duncan ^{a,b}	2	36	10.9917				
	3	36	11.3028				
	1	36		12.4444			
	6	36			13.5278		
	4	36				22.7778	
	5	36					32.7500
Sig			0.989	0.179	1.000	1.000	1.000

Tabla 12. Análisis de Varianza de dos vías para la prueba de difusión en disco sobre *S. Aureus*

Variable Dependiente:DIAM

fuelle	Suma de cuadrados	df	Media	F	Sig.	Parametro
modelo corregido	14564.135 ^b	23	633.223	208.046	.000	4785.059
Intercept	64639.720	1	64639.720	21237.434	.000	21237.434
CON	547.375	3	182.458	59.947	.000	179.841
TTO	13761.949	5	2752.390	904.300	.000	4521.500
CON * TTO	254.811	15	16.987	5.581	.000	83.718
Error	584.384	192	3.044			
Total	79788.240	216				
Total	15148.520	215				

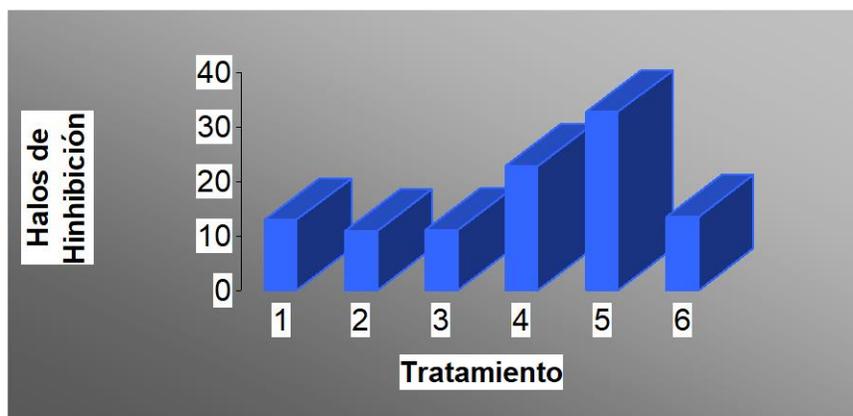


Figura 10. Influencia de los tratamientos sobre el diámetro de inhibición en *S. aureus*

INTER		Media	Desviación Std.	N
DIAM	1	10.666	1.000	9
	2	6.966	4.550	9
	3	9.211	3.186	9
	4	21.000	.0000	9
	5	31.555	1.666	9
	6	12.000	.0000	9
	7	12.333	1.000	9
	8	11.666	1.581	9
	9	11.777	.6667	9
	10	22.666	2.500	9
	11	31.555	1.666	9
	12	15.444	.8819	9
	13	15.222	.6667	9
	14	14.000	1.500	9
	15	13.333	1.581	9
	16	23.444	1.666	9
	17	34.444	2.505	9
	18	13.666	1.581	9
	19	11.555	.8819	9
	20	11.333	1.000	9
	21	10.888	1.054	9
	22	24.000	.0000	9
	23	33.444	1.666	9
	24	13.000	1.500	9
	Total	17.299	8.393	216

Tabla 13. Estadística Descriptiva teniendo en cuenta la interacción tratamiento – concentración para la prueba de difusión en disco sobre *S. aureus*

Tabla 14. Prueba de Duncan teniendo en cuenta la interacción tratamiento – concentración para la prueba de difusión en disco sobre *S. aureus*

TTO	N	HALOS SIGNIFICANTES																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14				
2	9	6,9667																	
3	9		9,2111																
1	9		10,667	10,667															
21	9		10,889	10,889															
20	9			11,333	11,333														
19	9			11,556	11,556	11,556													
8	9			11,667	11,667	11,667													
9	9			11,778	11,778	11,778													
6	9			12	12	12	12												
7	9			12,3333	12,3333	12,3333	12,3333	12,3333											
24	9				13	13	13	13	13										
15	9					13,33333	13,33333	13,33333											
18	9						13,66667	13,66667	13,66667										
14	9							14	14	14									
13	9							15,22222	15,22222										
12	9								15,44444										
4	9									21									
10	9										22,66667								
16	9											23,44444							
22	9												24						
5	9																31,5555		
11	9																31,5555		
23	9																		33,44444
7	9																		34,44444
Sig.		1	0,0527	0,08516	0,08101	0,061481	0,070376	0,070376	0,07324	0,096956	1	1	0,499348	1	0,22401				

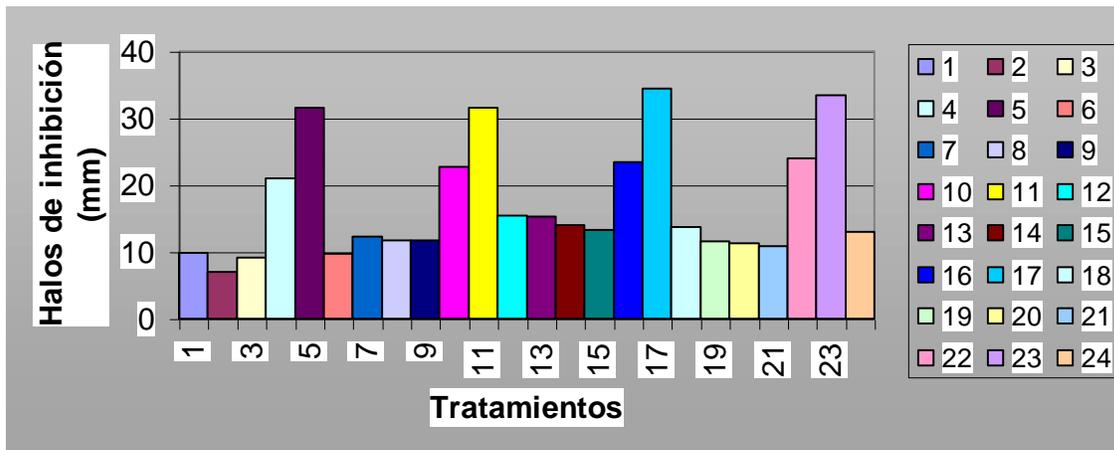


figura 11. Comparación de las medias de inhibición teniendo en cuenta la interacción tratamiento – concentración para la prueba de difusión en disco sobre *S. Aureus*

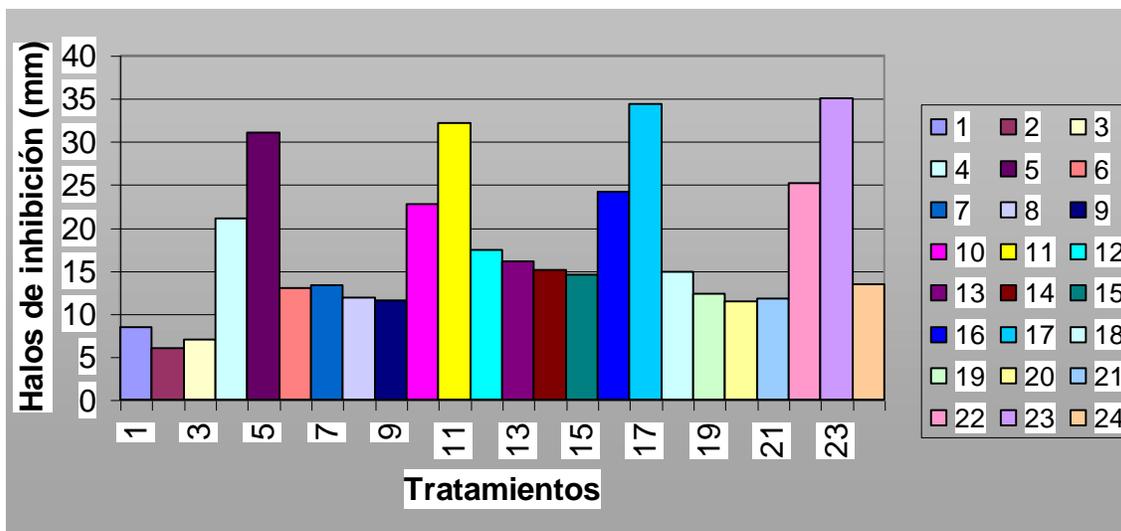


figura 12. Comparación de las medias de inhibición teniendo en cuenta la interacción tratamiento – concentración para la prueba de difusión en disco sobre *E. Coli*

Tabla 15. Comparación múltiple de Scheffe para la prueba de difusión en disco sobre *E. coli*

Variable Dependiente: Diámetro

	(I) TTO	(J) TTO	Diferencia de medias (I-J)	Error Estandar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Limite Inferior	Limite Superior
Scheffe	1	2	1.4500	.511	.160	-.2694	3.1694
		3	1.3361	.511	.239	-.3833	3.0555
		4	-10.6722*	.511	.000	-12.3917	-8.9528
		5	-20.5611*	.511	.000	-22.2805	-18.8417
		6	-2.1444*	.511	.005	-3.8639	-.4250
	2	1	-1.4500	.511	.160	-3.1694	.2694
		3	-.1139	.511	1.000	-1.8333	1.6055
		4	-12.1222*	.511	.000	-13.8417	-10.4028
		5	-22.0111*	.511	.000	-23.7305	-20.2917
		6	-3.5944*	.511	.000	-5.3139	-1.8750
	3	1	-1.3361	.511	.239	-3.0555	.3833
		2	.1139	.511	1.000	-1.6055	1.8333
		4	-12.0083*	.511	.000	-13.7278	-10.2889
		5	-21.8972*	.511	.000	-23.6167	-20.1778
		6	-3.4806*	.511	.000	-5.2000	-1.7611
	4	1	10.6722*	.511	.000	8.9528	12.3917
		2	12.1222*	.511	.000	10.4028	13.8417
		3	12.0083*	.511	.000	10.2889	13.7278
5		-9.8889*	.511	.000	-11.6083	-8.1695	
6		8.5278*	.511	.000	6.8083	10.2472	
5	1	20.5611*	.511	.000	18.8417	22.2805	
	2	22.0111*	.511	.000	20.2917	23.7305	
	3	21.8972*	.511	.000	20.1778	23.6167	
	4	9.8889*	.511	.000	8.1695	11.6083	
	6	18.4167*	.511	.000	16.6972	20.1361	
6	1	2.1444*	.511	.005	.4250	3.8639	
	2	3.5944*	.511	.000	1.8750	5.3139	
	3	3.4806*	.511	.000	1.7611	5.2000	
	4	-8.5278*	.511	.000	-10.2472	-6.8083	
	5	-18.4167*	.511	.000	-20.1361	-16.6972	

Tabla 16. Prueba de Rango Múltiple de Duncan para la prueba de difusión en disco sobre *E. coli*

TRATAMIENTO	N	DIAMETROS SIGNIFICANTES					
		1	2	3	4	5	
Duncan ^{a,b}	2	36	10.9917				
	3	36	11.3028				
	1	36		12.4444			
	6	36			13.5278		
	4	36				22.7778	
	5	36					32.7500
Sig			0.989	0.179	1.000	1.000	1.000

Tabla 17. Análisis de Varianza de dos vías para la prueba de difusión en disco sobre *E. coli*

Variable Dependiente:DIAM

f fuente	Suma de cuadrados	df	Media	F	Sig.	Parametro
Corrected Model	15513.273 ^b	23	674.490	143.295	.000	3295.778
Intercept	67278.270	1	67278.270	14293.196	.000	14293.196
TTO	14010.010	5	2802.002	595.282	.000	2976.411
CON	1086.578	3	362.193	76.947	.000	230.842
TTO * CON	416.685	15	27.779	5.902	.000	88.524
Error	903.747	192	4.707			
Total	83695.290	216				
Corrected Total	16417.020	215				

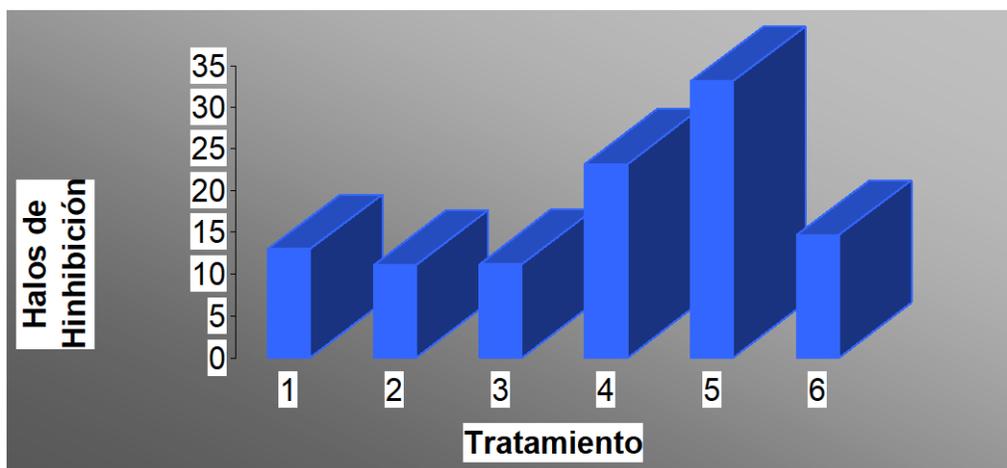


figura 13. Influencia de los tratamientos sobre el diámetro de inhibición en *E. coli*

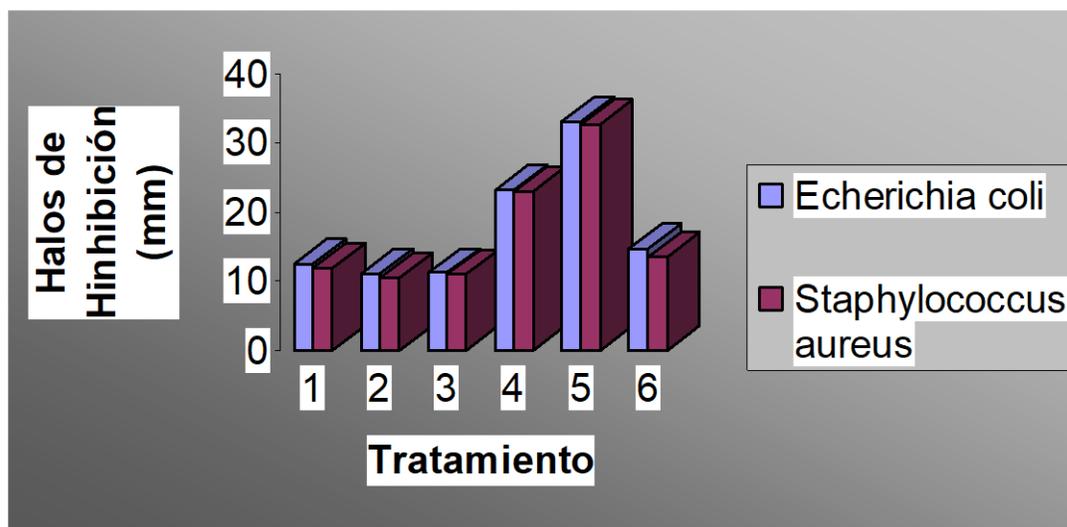


figura 14. Comparación de las medias de inhibición del crecimiento de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Tabla 18. Estadística Descriptiva teniendo en cuenta la interacción tratamiento – concentración para la prueba de difusión en disco sobre *E. coli*

INTER		Media	Desviación Std.	N
DIAM	1	8.422	4.347	9
	2	5.955	4.796	9
	3	6.966	4.550	9
	4	21.000	.000	9
	5	31.000	.000	9
	6	13.000	1.500	9
	7	13.333	1.581	9
	8	11.888	1.453	9
	9	11.555	.881	9
	10	22.666	2.500	9
	11	32.111	2.204	9
	12	17.444	.527	9
	13	16.111	1.054	9
	14	15.111	1.453	9
	15	14.555	1.589	9
	16	24.111	2.315	9
	17	34.333	1.000	9
	18	14.888	1.269	9
	19	12.333	1.000	9
	20	11.444	1.666	9
	21	11.777	.666	9
	22	25.111	2.713	9
	23	35.000	1.500	9
	24	13.444	1.943	9
Total		17.648	8.738	216

3.4 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO

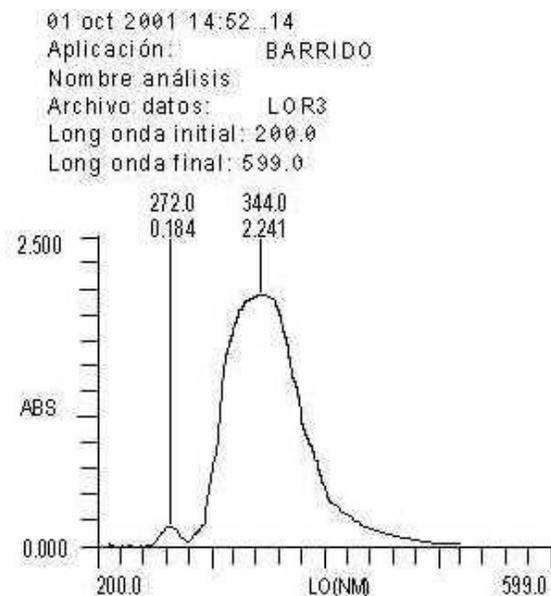


figura 15 Espectro U.V tomado en metanol del compuesto aislado del extracto Metanólico

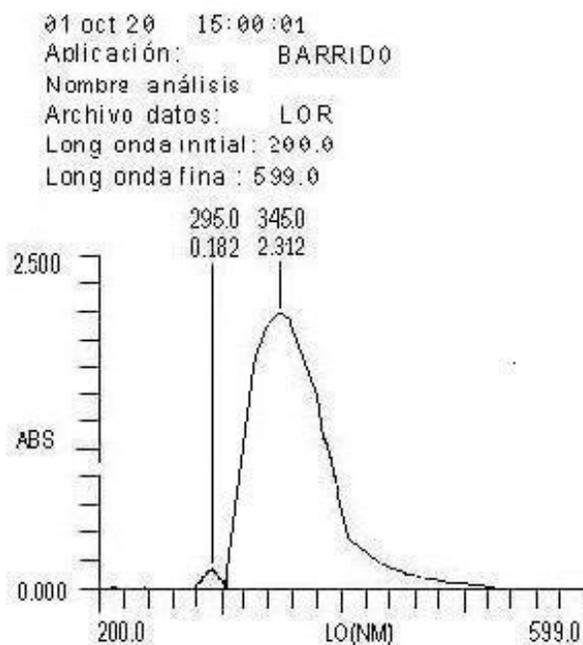


Figura 16. Espectro U.V en AlCl_3 del compuesto aislado del extracto Metanólico

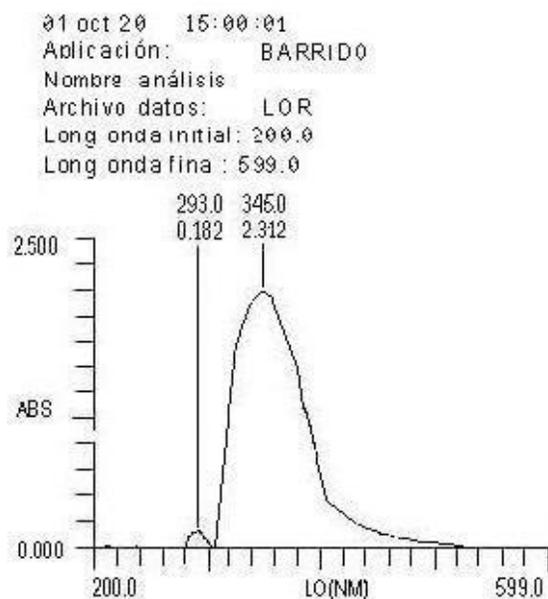


Figura 17. Espectro U.V en $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ del compuesto aislado del extracto Metanólico

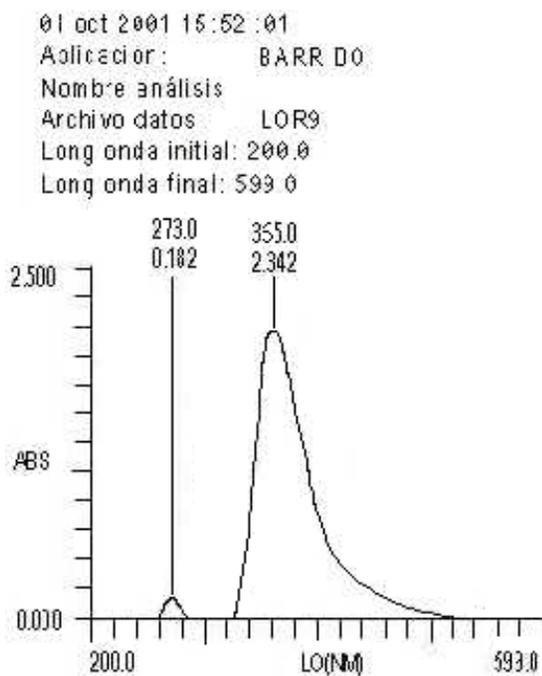


Figura 18. Espectro U.V en NaOAc del compuesto aislado del extracto Metanólico

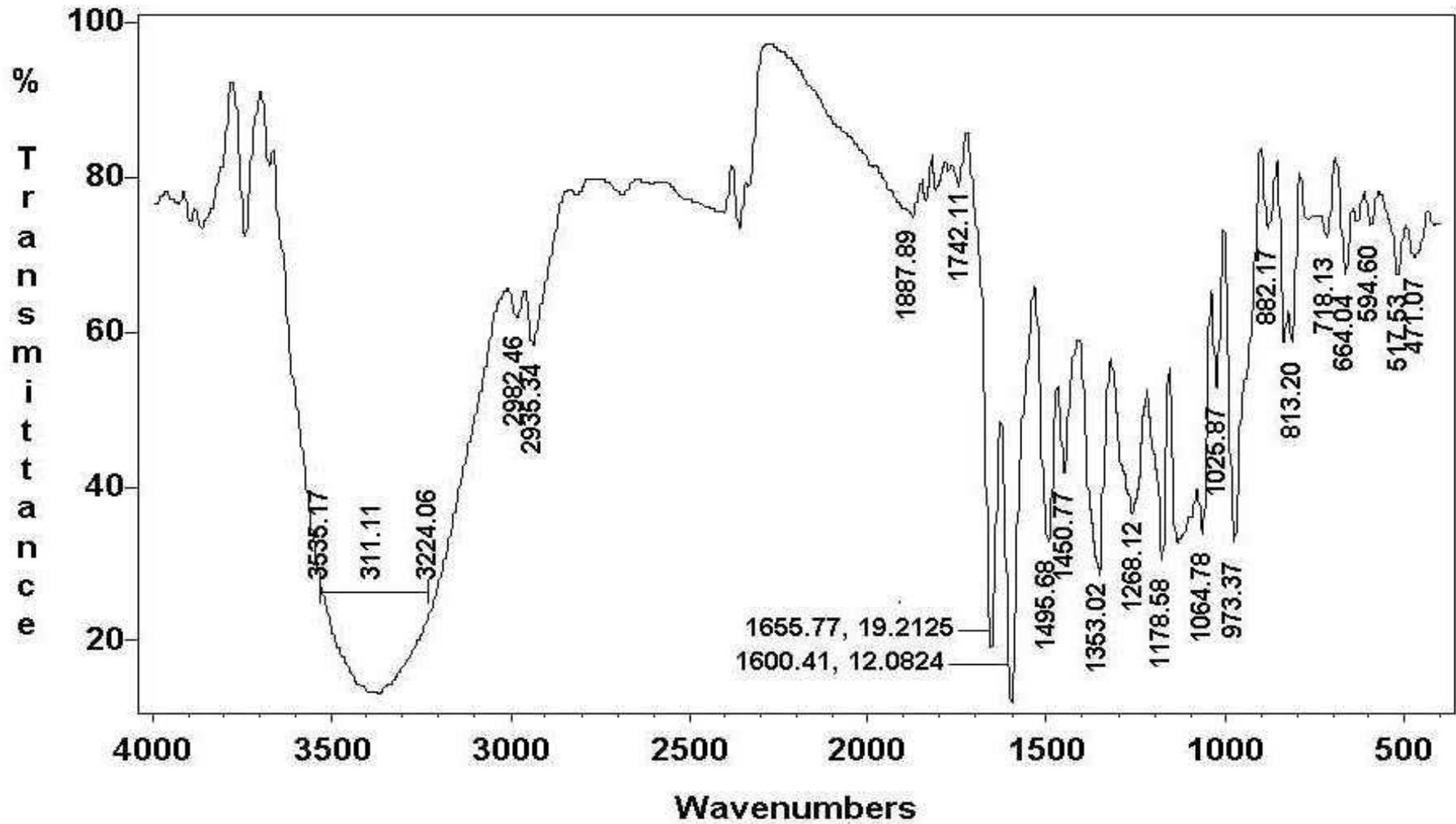


Figura 19. Espectro Infrarrojo del metabolito aislado del extracto metanólico

fi



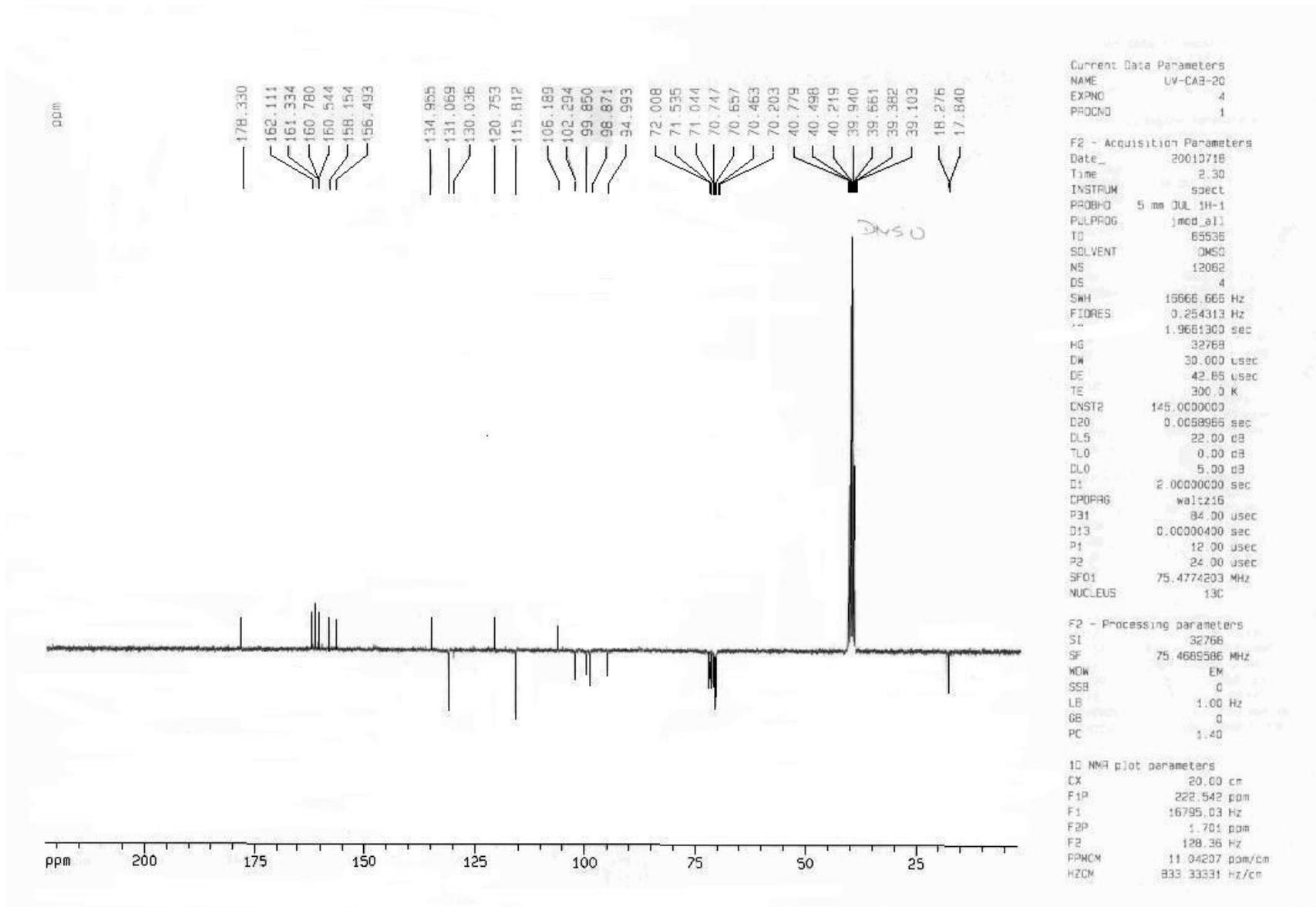


figura 21 Espectro RMN ^{13}C del compuesto aislado del extracto metanólico

A continuación se muestran los datos espectrales de IR, U.V, RMN ^1H y ^{13}C , obtenidos del compuesto aislado del extracto metanólico

Tabla 20. Datos del espectro I.R. del compuesto aislado (Figura 19)

FUNCION	GRUPO	BANDA TEORICA cm^{-1}	APARECE A cm^{-1}
Hidroxilo	-OH	3200-3600	3224.06-3535.17
Alcanos	CH	2960-2850	9935.34-9282.46
Aromáticos	ARMONICOS	2000-1700	1887.89-1742.11
	C=C	1600 - 1650	1600.41
ArH deformación en el plano	Ar-H	1225-950	1232.51 – 973.37
ArH deformación en el plano	Ar-H	900-735	882.17-718.13
Carbonilo	-C= O	1700-1645	1655.77

Tabla 21 Datos del pectro U.V del compuesto aislado. del extracto metanólico (figura 15, , Figura 17, Figura 18)

REACTIVO	BANDA II (nm)	BANDA I (nm)	DESPLAZAMIENTO TEORICO DE LAS BANDAS COMPARADO CON EL UV METANÓLICO (nm)		
			BANDA I	BANDA II	PRESENCIA DE
Metanol	272	344	300 - 390	250 - 280	
AlCl_3	295	345		15 – 20 25-40	OH libre C-5 OH libre C-3 con o sin C-5
AlCl_3/HCl	293	345		Regenera el UV MeOH	OH en C-3' y C-4'
NaOAc	273	365	15-25	96	OH en C-3 y C4' OH en C - 7

Tabla 22. Datos del espectro RMN ¹H del compuesto aislado (Figura 20)

TIPO DE PROTON	BANDA (ppm)	BANDA Teórica(ppm)	# de protones
2' y 6'	7,8	6,8 – 8 protones anillo B	2 triplete
3' y 5'	6,9	6,8 – 8 protones anillo B	3 multiplete
6	6,7	6 – 6,8 protones 3,6 y 8	1 singulete
8	6,4	6 – 6,8 protones 3,6 y 8	1 singulete
C – anomérico	5,5	4,2 – 6 protón 1 azúcares	1 singulete
C - anomérico	5,3	4,2 – 6 protón 1 azúcares	1 singulete
H - azucares	4	3 – 4,8 protones de azucares	1 singulete
H – azucares	3,85	3 – 4,8 protones de azucares	1 singulete
H – azucares	3,65	3 – 4,8 protones de azucares	1 singulete
H – azucares	3,5	3 – 4,8 protones de azucares	1 singulete
H - azucares	3,15	3 – 4,8 protones de azucares	1 singulete
Metilo ramnosa	1.1	1 – 1.2 metilo de la ramnosa	4 doblete
Metilo ramnosa	0,8	1 – 1.2 metilo de la ramnosa	4 doblete

Tabla 22.Datos del espectro RMN ¹³C del compuesto aislado (Figura 21)

TIPO DE CARBONO	BANDA (ppm)	BANDA TEÓRICA (ppm)
C – 4	178	175 – 178 C – 4 flavonoles
C – 3	162.124	
C – 9	161.346	150 – 165 C – 9 flavonas, flavonoles
C – 5	160.780	
C – 7	158.167	
C – 10	134.967	
C – 6' y C - 2'	131.081	115 – 130 Aromáticos con H
C – 2	120.765	
C – 3' y C – 5'	115.823	115 – 130 Aromáticos con H
C – 1'	106.201	
C – 6	102.304	
C – 8	99.857	
C - Anomérico	98.8883	
C – Anomérico	94.993	
C – Anillos de azúcares	72.02 – 64	
Metilo – azúcar	20	18 C – 6 ramnosa
Metilo - azúcar	19	18 C – 6 ramnosa

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 ANALISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

4.1.1 Alcaloides

Para el reconocimiento de este metabolito se utilizan reactivos de precipitación (Dragendor, Meyer, Valser y Reineckato). (Ver Anexo 1)

El extracto acuo-alcohólico de tallos – hojas da prueba positiva con el reactivo de Dragendor y hubo presencia de precipitado en mediana cantidad, al igual que con el reactivo de Reineckato de amonio. Se descarta la presencia de alcaloides en este extracto, ya que al seguir el procedimiento mostrado en el protocolo (45), no se obtienen pruebas positivas para ninguno de los reactivos. Lo que indica que los primeros resultados se debieron a falsos positivos, al igual que en el extracto etéreo.

En el extracto acuo-alcohólico de flores se obtiene precipitado con los reactivos de Reineckato y Valser, y mayor precipitado con los reactivos de Dragendor y Mayer, pero al igual que en el extracto de tallos – hojas al seguir el procedimiento adecuado en la determinación del tipo de alcaloide, el resultado de las diferentes pruebas fue negativo. Esto es debido a que los reactivos utilizados aunque guardan un buen equilibrio entre sensibilidad y especificidad ante los alcaloides, tienen capacidad de reaccionar con muchas otras sustancias no alcaloideas, que tienen una alta densidad electrónica; como carbonilos, éteres, ésteres, ácidos α - β insaturados, cuya insaturación puede aumentar sustancialmente la densidad electrónica de la función oxigenada y dar en las pruebas falsos positivos con dichos reactivos. (Tabla 3)

4.1.2 Flavonoides

Se observan resultados positivos en el extracto acuo – alcohólico de tallos – hojas con una coloración rojiza y una coloración rosada tenue en el extracto etéreo en la prueba de la Cianidina, en esta prueba de HCl/Mg, se observa una coloración roja en extracto acuo – alcohólico de las flores, aunque muy tenue.

El resultado positivo se debe a la presencia de flavonas, flavononas, flavonoles, ya que en este tipo de flavonoides se encuentra el núcleo de benzopirona.

La presencia de la coloración rosada intensa en la prueba de HCl/Zn indica la presencia de flavonoles o flavanonas en el extracto acuo – alcohólico, dando una idea del tipo de Flavonoide presente, los flavonoles producen coloraciones rojo – violeta por tanto no hay evidencia de este tipo de flavonoides ya que esta coloración no se presento, esto se aclara al realizar la prueba de pacheco en la que los dihidroflavonoles producen una coloración rojiza característica y las flavononas, chalconas, auronas y flavonoles dan una respuesta negativa. (Tabla 2) También se realiza una prueba de reconocimiento para antocianinas, pero no se observa cambio en la coloración, por ello se concluye que estas no se encuentran en los extractos de la planta. Para el extracto acuo – alcohólico de las flores la prueba de la Cianidina es positiva con una coloración rojo claro. (Tabla 3)

4.1.3 Taninos

Se observa la presencia de taninos en los extractos acuo – alcohólico de tallos – hojas y flores de la planta con el reactivo de gelatina – sal. El extracto acuo – alcohólico de tallos. Forma un precipitado que es soluble en urea 10M y forma un precipitado de color verde con el cloruro férrico; lo mismo para el extracto de las hojas. Para el de flores se observa un cambio en la coloración de pardo a verde del extracto de las flores al adicionarles cloruro férrico. Para los demás extractos la prueba es negativa. (Tabla 3) (ver ANEXO 1).

4.1.4 Saponinas

Esta prueba da positiva solo para el extracto acuo – alcohólico de tallos – hojas. Aunque una de las propiedades características de las saponinas es la formación de espuma, como consecuencia de la disminución de la tensión superficial cuando están disueltos en agua, hay que tener en cuenta que algunas proteínas también dan positiva esta prueba y que algunas saponinas no tienen la capacidad de producir espuma. Por lo cual, sea negativa o positiva la prueba, se realiza hemólisis, debido a que si hay presencia de saponinas en los extractos, estas tienen la capacidad de hemolizar los glóbulos rojos.

Al destanizar el extracto acuo – alcohólico de tallos – hojas este dio también un resultado positivo para la prueba de hemólisis. (Tabla 3)

4.1.5 Nafto y/o antraquinonas

Todos los extractos de tallos – hojas y flores reportaron un resultado negativo en la prueba utilizada para determinar este metabolito. (Tabla 3)

4.1.6 Cumarinas

No se observa su presencia en la planta, ya que todos los extractos dieron prueba negativa para este caso. (Tabla 3)

4.1.7 Cardiotónicos

Se realiza una CCD (45) revelada con yodo y reactivo de Raymond, se observan algunas manchas de color violeta en tallos – hojas, y un resultado negativo en los extractos de las flores.(Tabla 3)

4.2 ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD

Como se observa en la figura 2, el punto de ruptura de la inhibición del crecimiento está entre dos tubos (6.25 – 3.1) El último tubo claro o sin turbidez y el primero de los tubos que se observa turbio, indicando que el crecimiento bacteriano no fue inhibido por la concentración del extracto que se encuentra entre estos tubos. Este punto de ruptura representa la MIC, que para el caso del extracto acuo – alcohólico con la bacteria *S. aureus*, esta entre los tubos 5 y 6, así para este extracto, la MIC se encuentra entre 6.25 y 3.12 ppm, pero por convención, la MIC es 6.25 ppm

La mínima concentración inhibitoria de los extractos etéreo y clorofórmico es comparable con la inhibición que ocasiona el antibiótico Vancomicina, (Tabla 4 y Tabla 5) es decir que éstos extractos requieren aproximadamente iguales concentraciones para inhibir el desarrollo del organismo. El efecto antimicrobiano a concentraciones de 6.25 ppm es comparable con el comportamiento de la gentamicina.

La bacteria *Escherichia coli* es inhibida a concentraciones ligeramente menores que la *Staphylococcus aureus*. (Tabla 4 y Tabla 5) en algunos casos como en el extracto clorofórmico. Acuo-alcohólico y la Gentamicina, aunque los cambios no son muy drásticos, se puede decir que la *Escherichia coli* se puede inhibir más fácilmente con los extractos en estudio y el antibiótico Gentamicina.

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En las figura 8 y figura 9 se observa que los tratamientos 1, 2, 3 y 6 tienen un comportamiento similar respecto a la inhibición del microorganismo, mientras que los antibióticos se caracterizan por poseer un valor mayor.

La Tabla 10. Comparación múltiple de Scheffe para la prueba de difusión en disco sobre *S. aureus* muestra la diferencia entre las medias de cada uno de los tratamientos y un tratamiento a comparar, este cuadro permite determinar si hay diferencia entre los tratamientos y si esta es significativa.(es significativa cuando es menor o igual a 0.05)

Con el tratamiento 1 se observa que existe diferencia significativa con los tratamientos(cuál es el argumento numérico para esa significancia 2, 4 y 5 ya que sus significancias son 0.32, 0.0, y 0.0 respectivamente. Según los valores de las diferencias entre medias, el tratamiento 1 (12.44 mm) tiene un mayor efecto que el tratamiento 2 (10.99 mm), pero menor al compararlo con los tratamientos 4 y 5, ya que estos tratamientos corresponden a los antibióticos Vancomicina y Gentamicina, los cuales mostraron un halo de inhibición mayor con respecto a los demás tratamientos, (22.77 mm y 31.75 mm respectivamente)

Con el tratamiento 2 se observa que todos los tratamientos tienen un efecto mayor sobre el crecimiento de las bacterias al compararlo con este. Al compararlo con el tratamiento 3 (11.30 mm) la diferencia entre estos dos tratamientos no es grande (-0.3111) y su significancia es 0.989 (mayor de 0.05) por lo cual estos tratamientos son estadísticamente equivalentes.

Al observar las significancias entre los TTOs 4 y 5 y los TTOS 1 , 2, 3 y 6, se observa que tienen un mayor efecto con respecto a estos tratamientos ya que todas las significancias son de 0.0. pero al realizar la comparación entre los TTOS 5 – 4, la significancia es de 9.97, por lo que se puede decir que la Gentamicina (TTO 5) tiene un mayor efecto de inhibición hacia el *S.a*, que la Vancomicina (TTO4).

Con respecto al tratamiento 6, se observa que este tiene un mayor efecto de inhibición al compararlo con los tratamientos 12 y 3 ya que las significancias son de 0.0. La diferencia con el tratamiento 1 es de 1.083, aunque se puede observar diferencia entre estos dos tratamientos esta no es muy grande siendo su significancia de 0.230 (mayor de 0.05) por lo que estadísticamente son iguales o equivalentes

La Tabla 11 nos muestra la prueba de rango múltiple de Duncan para *Staphylococcus aureus*, este realiza comparaciones entre los tratamientos, ordenando sus medias de forma ascendente, ubicando los valores iguales o no significativos en una sola columna .

Teniendo en cuenta la prueba de Duncan se puede decir que:

1. Dado que la diferencia entre medias del los TTO5–TTO2 es 21.7583 >>> (mucho mayor) que la Sig 5 = 1, se concluye que el TTO 5 es significativamente más grande que TTO2.
2. Al comparar la diferencia entre medias del TTO5–TTO3 y TTO4–TTO2 con la Sig4 = 1, se tiene para el primer caso que 21.4472 >>> 1 y para el segundo 112.7891 >>1. Se concluye entonces que el TTO5 es significativamente más grande que TTO3 y que el TTO4 es significativamente más grande que TTO2.
3. Al comparar TTO5–TTO1, TTO4–TTO3 y TTO6–TTO2 con la sig 3 = 1 se tiene que 20.3056>>>1 para la primera diferencia, 11.7861>>1 para el segundo caso y 2.5361>1 para la tercera comparación.
Con estas comparaciones se encuentra que las diferencias entre TTO5–TTO1 y TTO4–TTO3 son grandes y que la diferencia entre TTO6–TTO2 es significativa
4. Al realizar las siguientes comparaciones entre las diferencias de los TTO5–TTO6, TTO4–TTO1, TTO6–TTO3 y TTO1–TTO2 con la sig 2 = 1, se tiene que:
19.22>>>1, 10.333>>1, 2.2250>1 y 1.4528> 1 respectivamente.

Se concluye que los tratamientos 5 y 4 son significativamente más grandes que los tratamientos 6 y 1 y que la diferencia entre TTO6–TTO3 y TTO1–TTO2 son significantes.

5. Al comparar TTO6–TTO1, TTO1–TTO3 y TTO3–TTO2 con $\alpha = 0.05$ $1.0833 > 0.05$, $1.1417 > 0.05$ y $0.311 < 0.05$. respectivamente.

Se encuentran significantes las diferencias entre TTO6–TTO1 y TTO1–TTO3, aunque esta diferencia no es muy grande. Se observa también que el TTO3 y el TTO2 no son significativamente diferentes.

Con esta prueba se puede determinar una diferencia entre los tratamientos 1 y 3, aunque no es muy grande esta diferencia no se realiza con la prueba de comparaciones múltiples. De esta forma, según la prueba de Duncan los tratamientos 1 y 3 no son estadísticamente iguales o equivalentes, sino que poseen una diferencia significativa entre si, El mejor resultado lo reporta el tratamiento 5 (32.75 mm) y el menor, el 2 (10.9917 mm).

Al realizar el análisis de varianza de dos vías (Ver Tabla 17), que compara la interacción entre las dos variables independientes (concentración y tratamientos) con respecto al desarrollo de la variable dependiente (diámetro del halo de inhibición), observamos que existe dependencia o asociación entre las dos variables independientes, ya que la interacción entre estas fue significativa, al ser menor que 0.05 (0.0), por lo tanto debe realizarse un análisis teniendo en cuenta la interacción de las dos variables además del análisis independiente de cada variable que ya se analizó.

Por lo anterior y teniendo en cuenta que la interacción de las dos variables independientes es significativa, se realiza la prueba de Duncan para la asociación de estas dos variables, la cual se muestra en la Tabla 19 y en la que se observa interacción entre los tratamientos 19, 8, 9, 6 y 7. No hay ningún tipo de interacción entre los cuatro primeros tratamientos y los cinco últimos tratamientos. El tratamiento que tiene un menor halo de inhibición es el 2 que corresponde al extracto etéreo a una concentración de 4.5 ppm y el que tiene

un mayor halo de inhibición es el tratamiento 23, que corresponde al antibiótico Gentamicina a una concentración de 6.75 ppm.

En la Tabla 15 de comparaciones múltiples de Scheffe para la bacteria *Escherichia coli* se observa que en el tratamiento 1 existe diferencia significativa con los tratamientos 6, 4 y 5, ya que sus significancias son menores que 0.05. Según los valores de diferencias entre medias, entre el tratamiento 1 y los tratamientos 2 y 3 se observa que éste tiene un mayor efecto que los tratamientos 2 y 3 aunque éstas diferencias no son significantes (1.45 y 0.33 respectivamente). Al compararlo con los tratamientos 4 y 5, su diferencia es grande y negativa (-10.67 y -20.56 respectivamente) por tanto estos tratamientos tienen un halo de inhibición mayor que el TTO 1.

Con respecto a los tratamientos 2 y 3 se observa en la tabla 16 que tienen diferencia significativa con respecto a los tratamientos 4, 5, y 6 y que la diferencia con el tratamiento 1 no es significativa por lo cual estos tratamientos (1,2 y 3) son estadísticamente equivalentes.

Para los tratamientos 4 y 5, se observa que tienen un mayor efecto con respecto a los tratamientos 1, 2, 3 y 6. Pero al comparar estos dos tratamientos entre sí la diferencia entre 5 - 4 es de 9.88, por lo que se puede decir que la Gentamicina tiene un mayor efecto de inhibición hacia el *E.c*, que la Vancomicina.

Con el tratamiento 6, se observa que tiene una diferencia significativa al compararlo con los tratamientos 1, 2 y 3 y que tiene un mejor efecto inhibitorio con respecto a estos tratamientos, pero mucho menor al compararlo con los tratamientos 4 y 5.

En la **Tabla 16** de la prueba de rango múltiple de Duncan para *Escherichia coli*, se observa que existe diferencia significativa con respecto a todos los tratamientos, menos entre el tratamiento 2 y 3. Esto se puede ver realizando las siguientes comparaciones:

1. Comparando las diferencias entre medias del $TTO5-TTO2 = 21.7583 >>>$ Sig 5 = 1, se concluye que el $TTO 5$ es significativamente más grande que $TTO2$.)
2. Al comparar $TTO5-TTO3$ y $TTO4-TTO2$ con Sig4 = 1, tenemos para la primera comparación $21.8972 >>> 1$ y $12.12222 >>$ para la siguiente. Se concluye que $TTO5$ y $TTO4$ son significativamente más grandes que los $TTO3$ y $TTO2$ respectivamente.
3. Al comparar $TTO5-TTO1$, $TTO4-TTO3$ Y $TTO6-TTO2$ con la sig3 = 1 se tienen las siguientes comparaciones:
 $20.5611 >> 1$, $12.0083 > 1$ y $3.5944 > 1$ respectivamente.
 Se encuentra que las diferencias entre las dos primeras comparaciones son grandes y que la diferencia entre $TTO6-TTO2$ es significativa.
4. Al comparar $TTO5-TTO6$, $TTO4-TTO1$, $TTO6-TTO3$ y $TTO1-TTO2$ con sig2 = 1 se tiene:
 $18.4167 >>> 1$, $10.6722 >> 1$, $2.2250 > 1$ y $3.4806 > 1$
 Se encuentra que la diferencia entre las dos primeras comparaciones es grande, las siguientes comparaciones son significativas y sus diferencias no muy grandes
5. Al comparar $TTO6-TTO1$, $TTO1-TTO3$ y $TTO3-TTO2$ con sig1 = 0.824, se tienen que:
 $2.1444 > 0.824$, $1.3361 > 0.824$ y $0.1139 < 0.824$, respectivamente

Según este método se encuentran significantes las diferencias entre $TTO6-TTO1$ y $TTO1-TTO3$, aunque esta diferencia no es muy grande. Al comparar el $TTO3$ y el $TTO2$ se observa que no son significantes sus diferencias por lo tanto estadísticamente son iguales o equivalentes (figura 13)

Al realizar el análisis de varianza de dos vías (ver Tabla 17), que compara la interacción entre las dos variables independientes (concentración y tratamientos) con respecto al desarrollo de la variable dependiente (diámetro del halo de inhibición), observamos en Tabla 17 que existe dependencia o

asociación entre las dos variables independientes ya que la interacción entre estas fue significativa al ser menor que 0.05 (0.0), por lo tanto debe realizarse un análisis teniendo en cuenta la interacción de las dos variables además del análisis independiente de cada variable que ya se analizó.

Teniendo en cuenta que la interacción de las dos variables independientes son significativas, se realiza la prueba de Duncan para la asociación de estas dos variables, la cual se muestra en la Tabla 19, en la que se observa interacción entre los tratamientos 19, 8, 24,15, 6 y 7, (ver tabla 6). No hay ningún tipo de interacción entre los cuatro primeros tratamientos y los cinco últimos, el que tiene un menor halo de inhibición es el 2 que corresponde al extracto etéreo a una concentración de 4.5 ppm y es significativo con el tratamiento 3 que corresponde al extracto clorofórmico a la misma concentración. Los tratamientos que tiene mayor halo de inhibición son el tratamiento 23, que corresponde al antibiótico Gentamicina a una concentración de 6.75 ppm y el tratamiento 17 que corresponde al mismo antibiótico a una concentración de 6.0 ppm.

Como se observa en la figura 14 la bacteria *Escherichia coli* presenta valores ligeramente superiores a los tratamientos realizados con *Staphylococcus aureus*, lo que nos indica que esta bacteria se inhibe un poco mejor con los extractos de la planta en estudio que el *Staphylococcus aureus*.

Lo cual se reportado de manera similar en estudios realizados en Francia, a microorganismos que presentan resistencia a antibióticos, llevados a cabo en el ONPCM (Observatorio Nacional de Recetas y Consumo de Medicamentos; *Observatoire National des Prescriptions et des Consommations des Médicaments*) en representación del organismo público AFSSAPS (Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de Productos para la Salud; *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé*). Los cuales reportan que la bacteria *Staphylococcus aureus* es de las más difíciles de controlar, detectando

que la mayor parte de cepas de la bacteria *Staphylococcus aureus* son resistentes a la vancomicina y otros antibióticos utilizados tradicionalmente (2). Por otra parte científicos japoneses han logrado descifrar la estructura genética de una de las bacterias más patógenas del mundo. Es el «*Staphylococcus aureus*», responsable de cerca del ochenta por ciento de las infecciones hospitalarias y resistente a los medicamentos más efectivos. A partir de este descubrimiento los investigadores inician nuevos estudios para poder fabricar fármacos y vacunas que combatan las infecciones que produce la bacteria. Lo más preocupante es que, con los años algunas cepas del *Staphylococcus aureus* se han vuelto resistentes al antibiótico considerado como «el último recurso», la vancomicina (67), teniendo en cuenta estos resultados y la continua resistencia que presentan las bacterias ante los antibióticos, se justifica el uso de la etnomedicina en caso de infecciones locales, no sólo de la planta en estudio en la cual el extracto metanólico inhibió el crecimiento de la bacteria por 18 horas antes de que se iniciara el crecimiento de esta alrededor del halo del extracto, sino en gran número de plantas que han sido estudiadas y con las cuales se han reportado resultados positivos como los estudios hechos por Hidalgo Báez *et al* (27), sobre los extractos acuoso y en diclorometano de las hojas, de la *Chromolaena moritziana*, (perteneciente a la misma familia de *Casipoupea caracasana*) así como el extracto de acetato de etilo de las flores, los cuales presentan actividad antibacteriana contra el *Staphylococcus aureus*.

4.4 ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO

El compuesto aislado, es un compuesto cristalino (25 mg), de color amarillo, de *mp* (165-168) °C que da prueba positiva para Shinoda. Esta prueba es utilizada para reconocer flavonoides con el núcleo benzopirona como las Flavonas, flavonoles y flavononas. (Ver Anexo 2)

El espectro I.R. de Figura 19,(Tabla 20) muestra una banda ancha de 3224.06 a 3535.17 cm^{-1} correspondiente a hidroxilos asociados intermolecularmente y la banda 1655.77 cm^{-1} para el grupo carbonilo, la cual aparece desplazada a campo bajo debido a la conjugación con el doble enlace C=C del anillo aromático (9); las bandas del anillo aromático aparecen a 1742.11-1887.89 cm^{-1} (armónicos). También se observan las bandas de tensión C-H alifático a 2935.34 y 2982.46 cm^{-1} . En 1600.41 cm^{-1} se encuentra la banda correspondiente al C=C conjugado, el espectro muestra también las bandas características de las deformaciones fuera del plano del anillo aromático en la región de 882.17-718.13 cm^{-1} y las deformaciones en el plano de 1232.51-973.37 cm^{-1} . (9)

El espectro U.V. de la figura 15, el cual fue determinado en metanol, presenta dos bandas de absorción características de flavonoides. Una banda (I) de mayor longitud de onda a 344 nm y una banda (II) de menor longitud a 272 nm debida al anillo aromático A (funcionalidad benzoilo), en la siguiente figura se muestra la estructura básica de un flavonoide y su numeración. (Ver anexo 2)

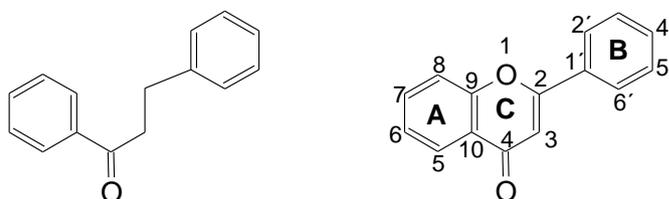


Figura 22. Estructura básica de un flavonoide

La presencia de hidroxilos fenólicos en diferentes posiciones de la molécula se establecieron estudiando el comportamiento del espectro UV metanólico al agregarle los denominados reactivos de desplazamiento como el acetato de sodio (NaOAc) y el tricloruro de aluminio (AlCl_3) con y sin ácido clorhídrico.

El acetato de sodio (NaOAc) es una base más debil que el metoxilato de sodio y ioniza solo los hidroxilos fenólicos más ácidos (3, 4' y 7). La ionización del hidroxilo 7 afecta la banda II del espectro UV metanólico y por lo tanto el acetato de sodio es un reactivo útil para determinar la presencia de dicho

hidroxilo; si al agregar este reactivo se observa un desplazamiento batocrómico de 15 – 35 nm en la banda II se trata de una flavona o flavonol 7-hidroxilado.

Los flavonoides hidroxilados en los carbonos 3 y 4' presentan desplazamiento en la banda I alrededor de los 20 nm.

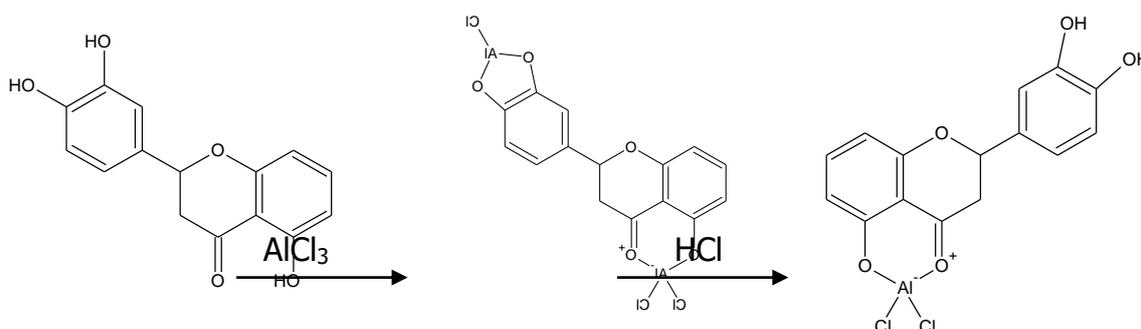
Al analizar los datos de la Tabla 23 se observa que los compuestos 4-6 presentan desplazamiento batocrómico en las bandas I y II, indicando la presencia de los hidroxilos en C-7 y C-4', los compuestos 1-3 y el compuesto en estudio, no presentan el desplazamiento batocrómico característico de la banda II, por lo cual no hay evidencia de grupo hidroxilo libre en el carbono 7, pero se observa desplazamiento en la banda I en las estructuras 2 y 3 confirmándose la presencia del hidroxilo del carbono 4' y 3 observado en las respectivas estructuras.

En la Figura 18, espectro UV en NaOAc del compuesto aislado, se observa un desplazamiento batocrómico de 21 nm en la banda (I) mostrando que el carbono 4' se encuentra hidroxilado y se descarta la presencia de un grupo hidroxilo en el carbono siete, ya que no se produce el desplazamiento batocrómico de la banda II. (37)

El AlCl_3 forma quelatos con flavonoides *orto* – hidroxilados, 3-hidroxilados y 5-hidroxilados.

En el caso de los *orto*-hidroxilados el quelato es inestable a pH ácido, mientras que los formados con 3- y/o 5-hidroxilados son estables.

Lo anterior se observa en la siguiente reacción:



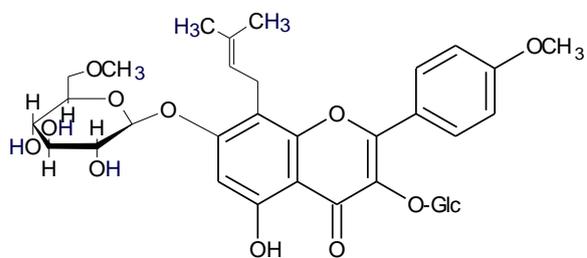
Al determinar el espectro con AlCl_3 y HCl se mantiene un desplazamiento batocrómico de 17-25 nm en la banda II (Comparado con el espectro metanólico), se trata de una flavona o flavonol (ver anexo 3) hidroxilado en el carbono 5. Si el desplazamiento es de 10 – 15 nm se trata de una flavona o flavonol 5-hidroxilado y 6 oxigenado, si el desplazamiento es de 25 – 40 nm se trata de una flavona o flavonol hidroxilado en el carbono 3 (con o sin OH en el carbono 5). Los flavonoides *orto*-hidroxilados en el anillo A (sin OH en los carbonos 3 y 5) muestran un desplazamiento de la misma banda alrededor de los 25 nm, el cual se pierde o regenera el espectro metanólico al agregar ácido clorhídrico. Al observar los espectros UV de las figuras 15, 16 y 17 tomados en metanol, AlCl_3 y $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ respectivamente se observa el desplazamiento batocrómico de la banda II de 23nm en el espectro con AlCl_3 al compararlo con el espectro metanólico, pero no se observa cambio en dicha banda al agregar el ácido, por lo cual no hay presencia de *o*-hidroxilos en el anillo A,

En el caso de flavonoides (flavonas o flavonoles) *orto* hidroxilados en el anillo B (C- 3' y C- 4') al agregar el tricloruro de aluminio se obtiene un desplazamiento batocromico de la banda I de 30 – 40 nm el cual se pierde al agregar HCl ; este desplazamiento no se observa para los espectros UV del compuesto en estudio, lo que si ocurre con la estructura del compuesto 4, al observar la tabla 23 se puede ver que la banda I es regenerada al agregar el ácido, ya que esta estructura se encuentra *o*- hidroxilada en dicho anillo.

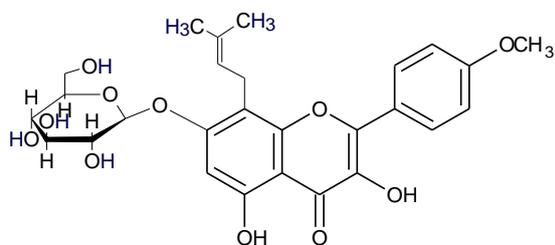
Reactivo	Desplazamiento de las bandas I y II (nm)						Compuesto aislado
	1 II/I	2 II/I	3 II/II	4 II/I	5 II/I	6 II/I	
MeOH	263/314	262/357	269/352	258/333	266/357	259/353	272/344
AlCl_3	282/316	281/359	280/352	271/352	269/369	269/363	295/345
AlCl_3/HCl		283/354	280/349	279/335		269/358	293/345
NaOAc	270/316	273/375	269/367	272/355	289/371	279/364	273/365

Tabla 23 Datos de los espectros UV de las estructuras 1- 6 y los del compuesto aislado

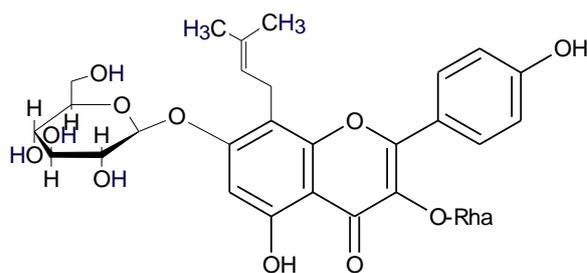
A continuación se muestran diferentes estructuras semejantes a las del compuesto en estudio, los datos espectroscópicos de estas estructuras son comparables con las del metabolito aislado. (ver tablas 24 y 25)



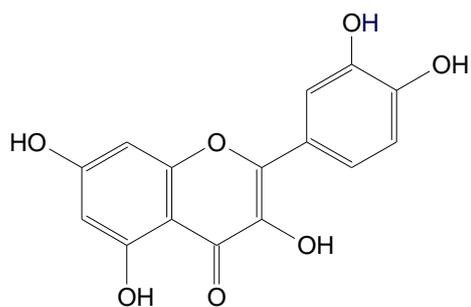
1 (Icariin)



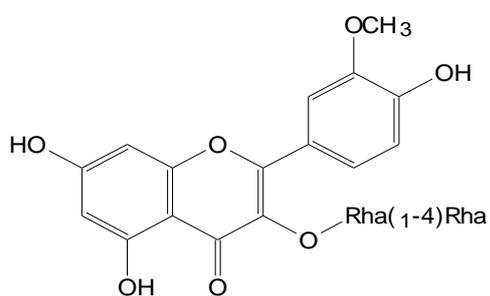
2 (Icarisid I)



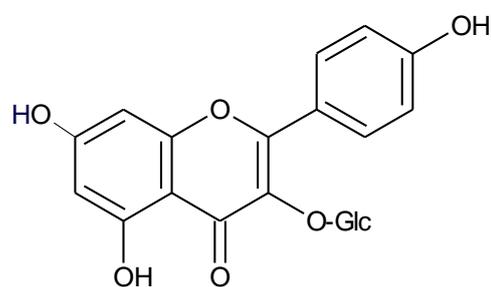
3 (Epimedoside A)



4



5



6

En el espectro de RMN ^1H de la figura 20, se observan 13 señales y las cuales se discriminan así:

Un doblete a 7.79 ppm que integra para dos protones, se asigna a los protones 2' y 6' los cuales se encuentran bajo la misma influencia del anillo C, en el que se encuentra el grupo carbonilo.(17 y 45)

Los protones 3' y 5' dan un doblete con desplazamiento químico promedio de 6,93 ppm e integran para 2 protones.

Los dos dobletes que siguen están a 6.78 y 6,43 ppm, integran para un protón y corresponden a los protones 6 y 8 respectivamente.

Dos singuletes a 5,55 y 5,30 ppm que integran para un protón, corresponden a los dos carbonos anoméricos correspondientes a las azúcares, esto se reafirma con la presencia de cinco multipletes los cuales resuenan entre 3.99 y 3.15 ppm, protones característicos de monosacaridos.

Los dos dobletes a 1,13 y 0,84 ppm que integran para 3 protones corresponden a los grupos metilos de las ramnosas. (17 y 45)

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 21), la señal a 178.33 ppm corresponde al grupo carbonilo α - β insaturado, se asignaron cinco señales entre 156.50 y 162.12 ppm correspondientes a cinco carbonos cuaternarios oxigenados, a 162.24 ppm (C-2), 161.34 (C-9), 160.78 ppm (C-5), desplazados a campo bajo por la influencia del grupo éter. Un carbono olefinico cuaternario a 158.16 (C-7); al carbono hidroxilado en el anillo B se le asigno la señal a 156.50 ppm (C-4'), Los otros carbonos cuaternarios dan señales a 134.96 (C-3), 120.75 (C-1') y 106.20 ppm (C-10). Las señales para el anillo aromático B, se asignaron así: 131.08 ppm (C-2' y C- 6') y 115.82 ppm (3' y 5'), estas señales son típicas de carbonos aromáticos. Estas señales coinciden con el número de carbonos

aromáticos de la estructura propuesta, teniendo en cuenta que las señales de los carbonos 2' y 3' son equivalentes a las señales de 6' y 5' respectivamente.

La señal a 98.88 ppm y 94.99 ppm. corresponden a los carbonos 6 y 8 respectivamente. Los carbonos anoméricos muestran dos señales a 102.29 ppm y a 99.85 ppm.

Las señales comprendidas entre 72.02 y 71.6 ppm corresponden a los carbonos de los azúcares.

Las señales a 18.2 y 17.8 ppm corresponden a los grupos metilos del disacárido.

En las estructuras 1 – 67 encontradas en diferentes artículos de la revista phytochemistry (88, 89, 89, 90, 91 y 92) se reportan los datos de los espectros UV, ^1H y ^{13}C , los cuales son comparables con los datos obtenidos en los espectros realizados al compuesto aislado del extracto alcohólico de tallo-hojas de la planta en estudio. Estos datos se encuentran reportados en las tablas 23, 24 y 25.

Al comparar las señales de los diferentes espectros ^1H y teniendo en cuenta las estructuras correspondientes se observa en el espectro ^1H del compuesto aislado las señales características de los anillos del flavonoide, como son los protones de los anillos A y B, las señales características de los protones de azúcares, las señales de los metilos de las ramnosas y los carbonos anoméricos presentan desplazamientos químicos comparables a las señales de los espectros de flavonoides con estructuras semejantes a la del compuesto aislado.

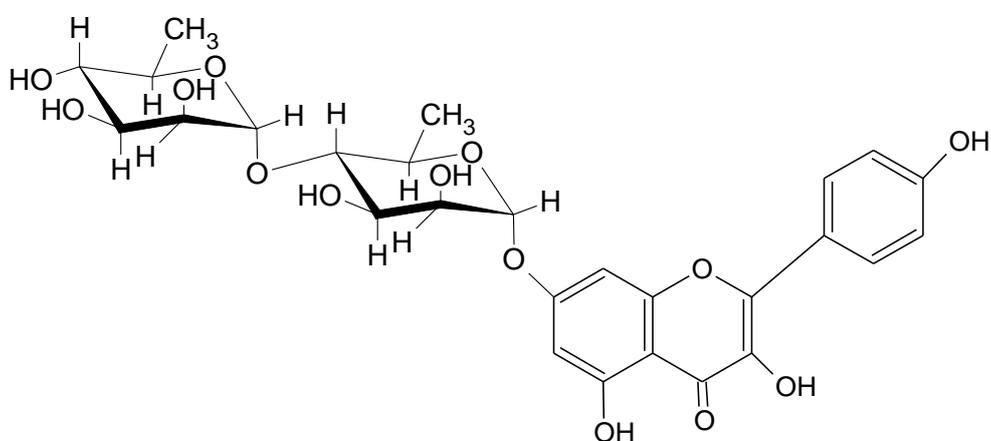
Posición	Señales (ppm) y multiplicidad de cada estructura						
	1	2	3	4	5	6	Compuesto aislado
3		9.54(s)	9.46(s)	3.86(s)		3.85(s)	
4							
5		12.25(s)	12.41(s)	12.65(s)			
6	6.33(s)	6.58(s)			6.16(d)	6.39(d)	6.78(s)
7				3.91(s)		3.89(s)	
8	6.46(d)		6.24(s)	6.78(d)	6.35(d)	6.81(d)	6.43(s)
9							
10							
1'							
2'	7.86(d)	7.79(d)	7.78(d)	7.84(d)	7.93(d)	7.84(d)	7.79(d)
3'	7.09(d)						6.93(d)
4'			9.48(s)				
5'		6.97(d)	6.98(d)	7.06(d)	6.90(d)	7.02(d)	6.93(d)
6'	7.60(d)	7.75(dd)	7.76(d)	7.74(dd)	7.56(dd)		7.79(d)
Rha							
1''	5.72 (d)		5.24(d)		5.72(d)	5.11(d)	5.30(d)
2''	3.57(m)		3.78(m)			3.63(d)	3.87(m)
3''							3.65(m)
4''	3.25(t)						3.44(m)
5''	3.53(m)		3.91(dq)				3.14(m)
6''	1.17(d)				0.91(d)	3.74(dd)	0.84(d)
Rha							
1'''					5.18(d)		5.55(d)
2'''							3.99(m)
3'''							3.63(m)
4'''							3.47(m)
5'''							3.16(m)
6'''					1.07(d)		1.13(d)

Tabla24 Desplazamientos químicos de RMN ¹H de las estructuras 1–6 y del compuesto aislado de tallos-hojas de *Tagetes carcasana*

Carbono No.	Señales (ppm) y multiplicidad de cada estructura						
	1	2	3	4	5	6	Compuesto aislado
2	158.8	157.8	160.8	156.4	158.4	155.6	162.1
3	137.5	134.8	134.8	133.3	134.2	137.9	134.8
4	180.8	178.5	178.8	177.5	179.1	178.0	178.0
5	161.9	160.6	160.2	161.3	163.0	160.9	160.8
6	100.4	98.5	98.1	98.6	100.2	97.7	98.8
7	160.7	161.3	160.5	164.2	166.7	165.1	158.2
8	108.4	105.2	108.3	93.7	94.9	92.4	94.9
9	160.2	153.7	152.0	156.4	158.5	156.3	161.3
10	110.5	105.7	105.6	104.2	105.6	105.2	106.2
1'	124.7	122.3	122.3	121.3	123.4	120.5	120.3
2'	132.7	130.2	130.7	113.9	114.5	116.7	131.0
3'	116.0	114.3	115.5	149.5	150.6	145.0	115.8
4'	164.39	158.7	159.1	147.1	148.3	150.7	156.1
5'	116.0	114.4	115.5	115.3	116.1	116.2	115.8
6'	132.7	130.2	130.7	122.1	123.7	123.7	131.0
OCH ₃ -3'					56.9	59.7	
OCH ₃ -7						56.0	
Rha							
1''	103.4		101.9		102.4	100.5	102.2
2''	83.2		70.4		72.3	70.5	70.7
3''	72.7		70.8		72.3	70.6	70.5
4''	74.3		71.2		80.1	72.1	71.6
5''	72.6		70.1		64.8	68.5	70.2
6''	18.4		17.9		17.8	17.9	18.2
Rha							
1'''					100.5		99.9
2'''					72.1		70.8
3'''					72.4		70.7
4'''					73.8		72.0
5'''					69.9		
6'''					17.5		17.8
Gluc							
1''''	99.4	100.2	100.6			100.5	
2''''	77.0	73.5	73.4			70.6	
3''''	77.0	75.6	76.6			70.2	
4''''	69.9	69.8	69.7			71.0	
5''''	72.2	75.0	77.0			69.2	
6''''	60.7	62.5	60.7			61.3	

Tabla 25 Desplazamientos químicos de RMN ¹³C de las estructuras 1–6 y del compuesto aislado de tallos-hojas de *Tagetes carcasana*

Teniendo en cuenta las pruebas químicas y las pruebas de caracterización que se realizaron, nos permiten inferir que la posible estructura del compuesto aislado del extracto alcohólico de tallos-hojas de *Tagetes caracasana*, es un núcleo flavonoideo hidroxilado en las posiciones 5, 3 y 4', con dos unidades glucosídicas en la posición 7:



5. CONCLUSIONES

- Teniendo en cuenta el análisis del estudio espectroscópico del I.R, que muestra bandas características para los grupos hidroxilo (3224.06 – 3535.17 nm), aromáticos (1887.89 – 1742.11 y 1600.41 nm) y carbonilo (1655.77 nm), el análisis del U.V que muestra las bandas propias de flavonoides (Banda I a 344 nm, banda II a 272 nm), el RMN ¹³C que presenta picos típicos de flavonoles, aromáticos y ramnosas según lo reportado en la literatura y el RMN ¹H en el cual se evidencian tanto los protones de los tres anillos del flavonoide como los característicos de las ramnosas, se propone un núcleo flavonoideo glucosilado para el compuesto aislado del extracto acuo-alcohólico de tallos-hojas de *Tagetes caracasana*, especificando su estructura como una flavona hidroxilada, la cual muestra una favorable actividad biológica frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- Teniendo en cuenta la estadística aplicada a las pruebas de difusión en disco, realizada a los diferentes extractos de *Tagetes caracasna*, se observa al analizar la significancia de cada tratamiento y comparándolos entre si que la mejor prueba de inhibición en las dos bacterias (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), se muestra a una concentración de 6 ppm para el extracto acuo-alcohólico de tallo – hojas de *Tagetes caracasana* y de 5 ppm para el extracto acuo-alcohólico del compuesto aislado.

- En el análisis fitoquímico preliminar, realizado en las hojas-tallo de *Tagetes caracasana* se observa que el extracto acuo-alcohólico es el que más presenta reacciones positivas y mayor actividad biocida sobre las bacterias en estudio. Los núcleos metabólicos detectados en este extracto son flavonoides, taninos, saponinas y terpenos, por lo que se recomienda aislar estos metabolitos, y continua el estudio biológico de estos núcleos.

6. BIBLIOGRAFIA

1. ASOCIACIÓN AMIGOS DE LAS PLANTAS MEDICINALES, Revista Medicina Folklórica, Boletín No. 3, San José de Costa Rica.
2. Aubry-Damon H, Carlet J, Courvalin P, Desenclos JC, Drucker J, Guillemot D. *et al.* La résistance bactérienne aux antibiotiques en France: une priorité en santé publique, *Eurosurveillance* 2000; **5**: 135-8.
3. *Antimicrobial resistance in Ireland – a strategy for prevention* (in draft April 2000).
4. BARRIGA, GARCÍA, Hernando. Flora Medicinal de Colombia, Botánica Médica Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Talleres Editoriales de la Imprenta Nacional. Bogotá, 1975.
5. BECK M.; Haberlein H. *Phytochemistry*. 1999 50 329 – 332.
6. BERNART Henry, *et al.* Especies Vegetales Promisorias. Tomo 6 Santa Fé de Bogotá 1991 p. 117-118
7. BRATISTEN, L B. "Molecular Aspects of Insects - Plants Associations" Plenum Publishing Corporation, New York, 1986.
8. BRUNETON, J., Elementos de Fitoquímica y Farmaconogía, editorial Acribia S. A. España, 1986.

9. CALDERON, G.,C. Manual para la interpretación de Espectros Infrarrojos, editora Guadalupe Ltda. Bogotá 1985. Pág. 58 – 61
10. CASTAÑEDA R. Pedro, Bioestadística Aplicada, Editorial Trillas, México 1980.
11. CHIANG M.T, SILVS M. Anticancer Agents from Pluchea Chingoyo D.C. Laboratorio de Química de productos Naturales. Universidad de Concepción. Chile
12. CORREA Jaime, *et al.* Especies Vegetales Promisorias. Editorial Guadalupe Ltda. Tomo 5 Santa Fé de Bogotá 1991 p. 265
13. CORREDOR, H., Gabriel. Sanidad Vegetal, Universidad Santo Tomás. Centro de Enseñanza Descentralizada, Santa Fe de Bogotá, 1986.
14. CORTES, Diego, Prácticas de Farmacología, Departamento Farmacología de la Universidad de Valencia, España 1995.
15. XXI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología, Memorias, Medellín Colombia 1994.
16. Comité Technique National des Infections Nosocomiales. *100 Recommendations pour la surveillance et la prévention des infections nosocomiales. Surveillance de la résistance et Prévention de la diffusion des bactéries multirésistantes.* Paris: Ministère de l'Emploi et de la Solidarité. Imprimerie Nationale, 1999.
17. DOMINGUEZ, X. A., Métodos de Investigación Fitoquímica, editorial Limusa, México 1977.
18. ENCICLOPEDIA: PLANTAS MEDICINALES "El Dioscorides Renovado" Editorial Labor, Barcelona, 1993.

19. ECHEVERRY, Luis Fernando. Productos Naturales Biológicamente Activos, Universidad de Antioquia. Centro de Investigación (FAC). 2a. Edición, Medellín. 1988.
20. IV Congreso Nacional de Fitoquímica "Biodiversidad: Patrimonio Nacional", Bucaramanga, 1996, p 11-14
21. ELLIOT, M. Chemistry of Natural Pyrethrins in Pyrethrum the Natural Insecticide, Casida, London y New York 1973.
22. FIERRO; da Silva AC; López C da S; e Moura RS; Barja Fidalgo C. J Etnopharmacol. 1999. Jul, 66: 1, 19 – 24.
23. FUTUYAMA, D. J. Coevolución. Sinauer Associates Publishers, Sunderland, New York 1983
24. GILLES B.; Marie D.; Bruno D.; Anne M. Phytochemistry. 1999. 50 167-169
25. GRACIOSO J.S.; Paulo M.Q.; Hiruma C.A.; Souza A.R.; J Pharm Pharmacol. 1998. Dec, 50: 12, 1425 - 9.
26. GUPTA, Mahabir P. En Echeverry F y Quiñones W. Tópicos en productos vegetales. 1986.
27. HIDALGO Báez; de los Ríos C; Crescente O; Caserta A. J Etnopharmacol. 1998. Jan, 59: 3, 203 – 6.
28. HEINRICH M; Robles M; Rodríguez E. Annu Rev Pharmacol Tóxico. 1998. 38: 539 – 65.

29. HORVÁTH Z; Gyémánt G; Danos B; Nánasi P. Acta Pharm Hung. 1998. Jul, 68: 4, 214 – 9.
30. http://nice.univ-lyon1.fr/nice/report/helics_report.htm
31. ISHIDA, M. *et al*/Biochemistry, Ints. De. Washington D. C 1992.
32. KONEMAN, *Et al*. Diagnostico Microbiológico, Ed. Médica Panamericana; 3ª edición. Argentina 1992. pág. 126
33. KEIICHI, S; SAGARA, K. Three flavonol glycosides from *Epimedium Koreanum*. Phytochemistry, vol. 27, N. 3 pp. 911 – 913, 1988.
34. LOPEZ PLANES REINALDO, Diseño Estadístico de Experimentos, Ed Científico - Técnica, La Habana 1984
35. LUCAS, J. A., Shattock, R. C., Phytophthora. Mycol Society Cambridge University. Press. Cambridge 1991.
36. Measures to combat antibiotic resistance (2000-2004), Oslo: Sosial og helsedepartementet, 2000.
37. MABRY, T.J., J. KAGAN,. Phytochemistry 177, 487. Texas 1965.
38. NAHRSTEDT, A. Planta Médica 1989 55, 333 –338
39. NASIM S.; Thomas G.; Peter W. Phytochemistry. 1999 50, 1249 - 1253
40. NORMAN & STREIMER. Bioestadística, Mosby/Doyma libros, Barcelona 1996.

41. OYAMA K. ESPINOZA. La Importancia de la coevolución. Revistas de difusión. UNACT. 1986.
42. PEREZ, E. A., Plantas Útiles de Colombia. Editorial Victor Hugo 3a. edición Medellín 1990.
43. RODDICK, J. G., Phytochemistry 1974 13: 9-25.
44. *Resistance to antibiotics as a threat to public health*. Economic and Social Committee of the European Communities, 1998
45. SANABRIA GALINDO, Antonio. Análisis Fitoquímico Preliminar, Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, Bogotá 1983
46. SANABRIA GALINDO, Antonio. De la especie vegetal al medicamento: mito y realidad en Colombia. 1997
47. SANGWAN N.S.; Sangwan R.S.; Jain D.C.; Kumar S.; Ranade S.A. Biochem Mol Biol Int. 1999. Jun, 47: 6, 935 – 44.
48. SARASOLA, Abel A. *et al.* Fitopatología, Curso moderno Tomo II, primera edición, Ediciones Hemisferio sur Colombia 1996.
49. Standing Medical Advisory Committee. *The path of least resistance*. London: Department of Health, September 1998.
50. II Seminario. Agricultura Biológica. Memorias, Popayán 1994. I Simposio sobre plantas medicinales y/o tóxicas, Memorias, Universidad de Antioquía, Medellín 1994.

51. Simposio sobre plantas medicinales y/o tóxicas, Memorias, Universidad de Ibagué 1996.
52. SINZ, A.; Matusch R.; Chaichana S. *Phytochemistry* 1998 47, 1393 – 1396.
53. SWAIN, T., *ANN, Review Plants Physiologic.*, 1977, 28, 479- 501
54. TAMAYO, Mario. El proceso de la investigación científica. 3ª edición. Editorial Limusa, México D.F. 1998.
55. VALENCIA, Ciri. Fundmentos de Tитоquímico, Ed. Trils S.A., Mxico 1995
56. VANEGAS, Medardo *et al* Fitoquímica Aplicada al Control Biológico, Uso de Extractos Vegetales como Biorreguladores del Ataque de Insectos y Hongos, Facultad de Ciencias Naturales. Universidad del Cauca. Popayán 1991.
57. Vanegas M. T. *et al*, Evaluación de la efectividad insecticida y estudio de los metabolitos secundarios presentes en *Heterocondylos vitalbae*, *Tagetes caracasana*, *Tagetes graveolens* y *Poligonum punctatum*. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad del Cauca. Popayán 1997.
58. Venegas M. T. *et al* Uso del extracto vegetal de *Chamaesena reticulata* como biorregulador del hongo *Cercospora asparagi* patógeno del cultivo de *Asparagus officinalis*. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad del Cauca. Popayán 1998.
59. VILLACRES, O. V., Bioactividad de Plantas Medicinales Amazónicas, Universidad, Central del Ecuador, Quito 1995.
60. WREN. R.C. Enciclopedia de Medicina Moderna y Preparados Botánicos. Editorial Grijalba , Argentina 1989.

61. WAVERLEY, Root, Hierbas y Especies, Biblioteca de la Naturaleza, Editorial Blume, Barcelona 1983.
62. WOLBIS, María; Krolikowska, M. Flavonol Glycosides from *Sedum acre*. *Phytochemistry*, vol 27 N. 12. pp. 3941-3943, 1988.
63. XXI Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, 1994, Medellín.
64. www.folkehelsa.no/nyhetsbrev/resistens
65. <http://www.fq.oc.uh.cu/>
66. http://www.tragua.com/Ponencia_Beldarrain.htm
67. <http://www.lavozdegalicia.com/hemeroteca/noticia.html>

ANEXO 1

ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

A continuación se describe la marcha fitoquímica que permite poner en evidencia la presencia de compuestos que comúnmente presentan actividad biológica y que por consiguiente son importantes en la investigación de las especies vegetales que posean acción medicinal.

DETERMINACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

1. Análisis de Alcaloides

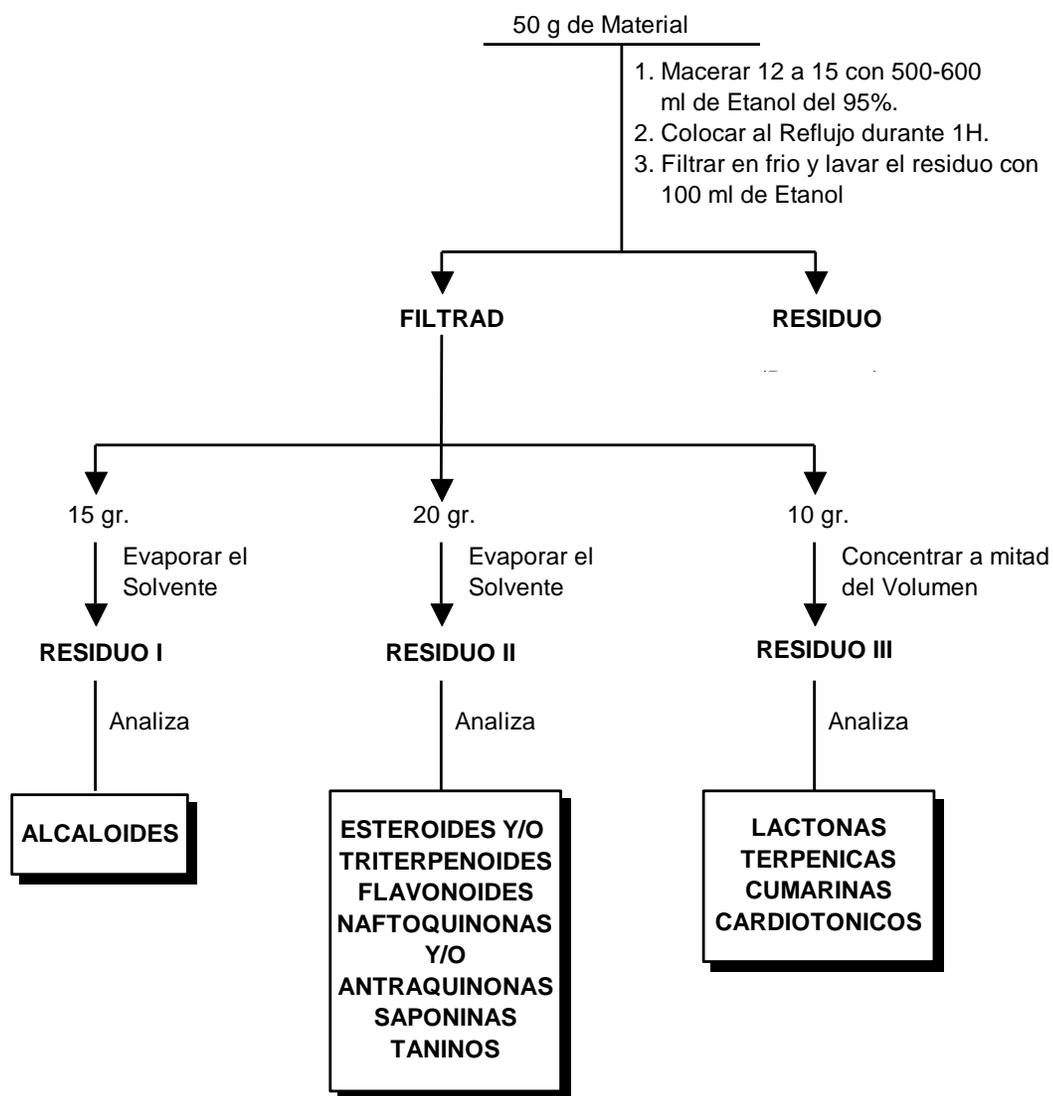
La determinación preliminar de alcaloides se realiza mediante reacciones de precipitación, utilizando los reactivos de: Dragendorff, Mayer, Valser y Reinekato, siguiendo el procedimiento general los alcaloides se determinan en el residuo I (Figura 3)

Luego, para la determinación cualitativa de alcaloides, se extrae el residuo I con HCL al 5%, se calienta por 15 minutos a 60 °C y se filtra, del filtrado se coloca un mililitro de la solución en 4 tubos de ensayo a los cuales le adiciona 3 gotas de los reactivos de precipitación mencionados, de acuerdo a la intensidad del precipitado se ha determinado la siguiente escala subjetiva de valores.

- +++ Alta concentración
- ++ concentración Media
- + Baja concentración
- No hay presencia de alcaloides

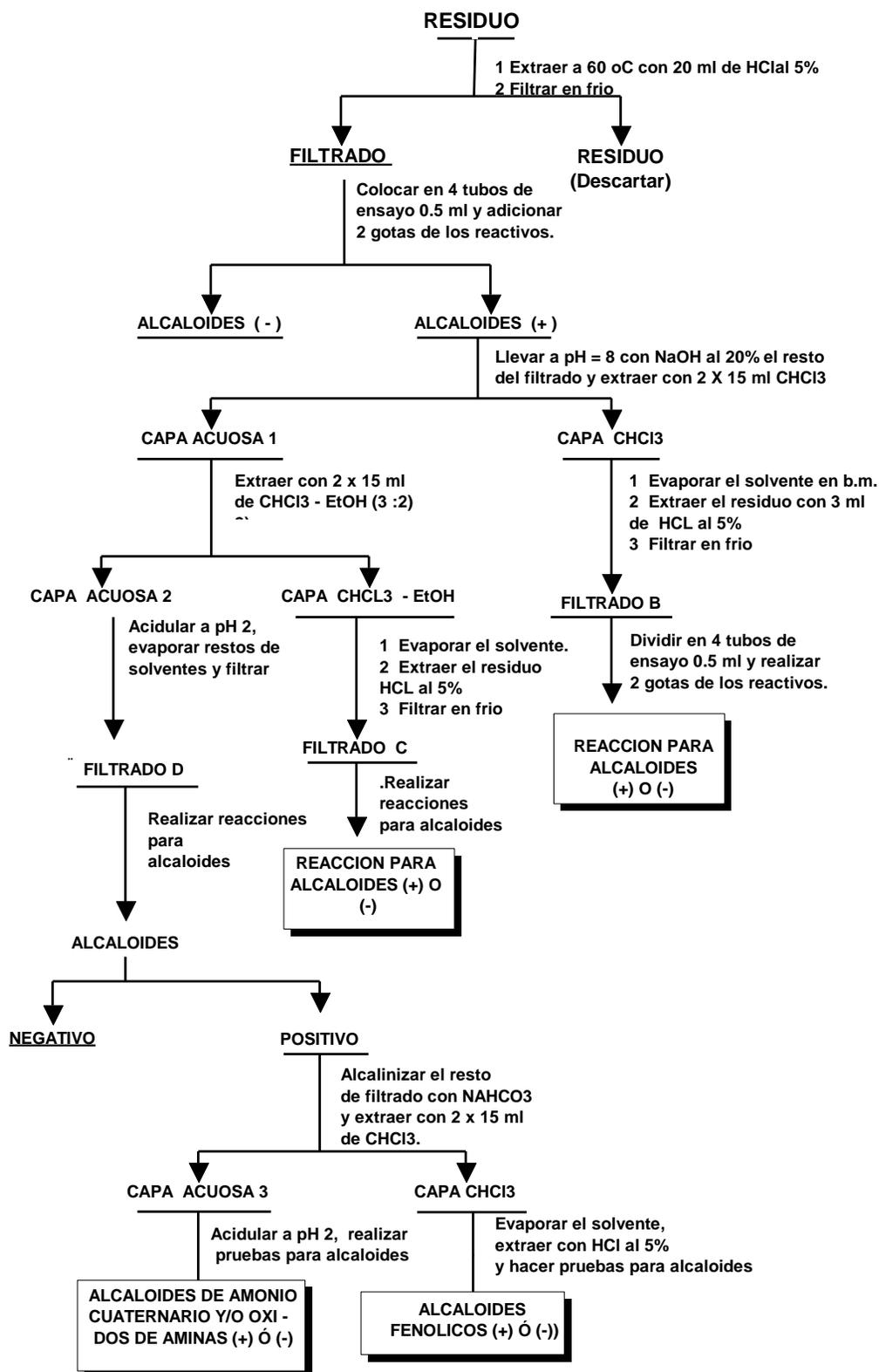
Si se presentan reacciones de precipitación, se continúa el procedimiento para la determinación de alcaloides solubles en cloroformo y en cloroformo - etanol y por último se determina la presencia o ausencia de alcaloides fenólicos y amonio cuaternario y/o óxidos de aminas.

Figura 1. Obtención del extracto total de *Staphylococcus aureus* y *Escherinchia coli* para realizar análisis fitoquímico preliminar



Fuente: Sanabria G Antonio. Análisis Fitoquímico Preliminar 1988

Figura 3. Análisis de Alcaloides



2. Análisis para Esteroides y Triterpenoides

Los esteroides y/o triterpenoides se analizan en el residuo II, el cual se extrae con éter de petróleo (Figura 4), se concentra y se realiza una cromatografía de capa fina en doble sentido, en el primer recorrido se utilizan como eluentes: ciclohexano, acetato de etilo en proporción de 95:5, luego se gira, 90 grados a la izquierda y se desarrolla con la mezcla: éter etílico, éter de petróleo, ácido acético, en una proporción de 20:80:10, luego, se revela con el reactivo Lieberman Buchardt y se calienta por 10 minutos a una temperatura de 110 a °C, deben aparecer manchas rojas, azules. o verdes

Esta prueba se realiza también por colorimetría, se coloca un ml del extracto etéreo en un tubo de ensayo, se adicionan dos mililitros de Cloroformo, gotas de anhídrido acético y ácido sulfúrico, si aparece un anillo o coloración verde, azul, café. En la interfase el resultado es positivo.

3. Análisis para Flavonoides

La determinación de flavonoides se realiza por reacciones coloridas como la de la Cianidina, Álcalis, Pacheco y HCl, como lo describe el procedimiento el residuo que resulta de la extracción con éter de petróleo en la prueba anterior, se extrae nuevamente con una mezcla etano - agua (1:7), así se obtiene la solución "F", en la cual se determinan además taninos, nafto y/o antraquinonas y saponinas, como lo muestra la figura 4.

Ensayo de Pacheco El sólido flavonoide se calienta sobre una llama con unos pocos cristales de AcONa y 0.1 mL de anhídrido acético. Luego con 0.1 mL de ácido clorhídrico concentrado. Los dihidroflavonoles producen un color rojo característico. Las flavonas, chalconas, flavones y flavanonas dan una respuesta negativa.

Prueba de cianidina: Se toman 5 ml de la solución "F" se le adicionan 0.5 gr magnesio en limaduras y unas gotas de HCl concentrado, en la reacción deben

aparecer coloraciones rosadas, rojizas, naranja, que indican la presencia de flavonas, isoflavonas y flavonoides, en medio ácido.

Ensayo con Zn/HCl: Al remplazar el magnesio por el zinc en el procedimiento del ensayo de Shinoda o cianidina, solamente los dihidroflavonoles (o flavononoles) producen coloraciones rojo violeta. Las flavanonas y flavanoles no producen color o producen coloraciones rosadas débiles.

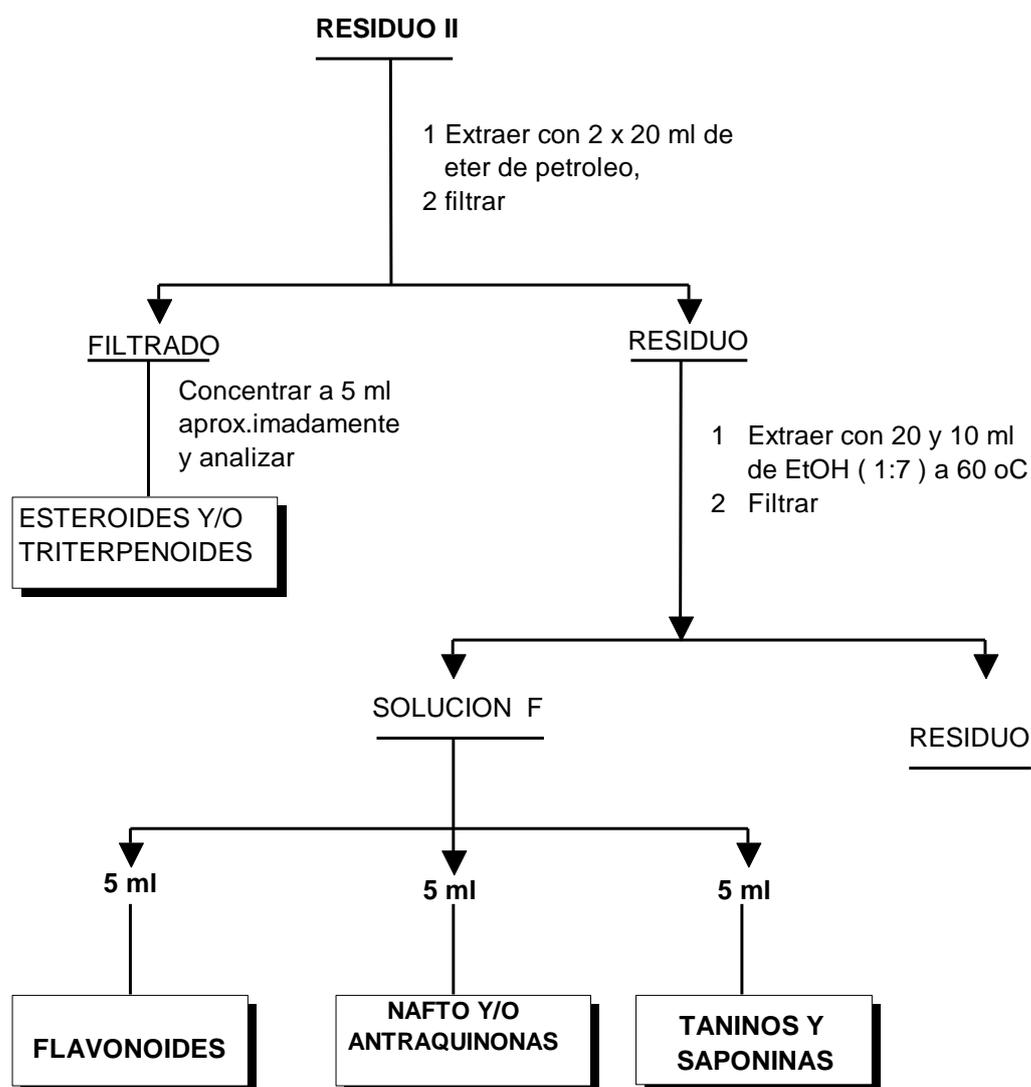
Reacción con HCl al 10% se toma 5 ml de la solución "F" se le añade gotas de HCl al 10% y se calienta en un baño María por 10 minutos, debe presentar coloración roja que indica la presencia de leucoantocianidinas.

Reacción con los álcalis: Se toma un ml de la solución "F" se le agrega gotas de KOH 5%, si se produce coloración amarillas. la prueba se considera positiva

4. Análisis de Nafto y/o Antraquinonas

Este metabolito secundario se determina también con la solución "F", de la cual se toman 5 ml y se le agrega 1 ml de agua oxigenada de 20 volúmenes, 1 ml de H₂SO₄ al 50%, se calienta por 15 minutos en baño María hirviendo; se extrae con 3 ml de benceno y 1 ml de NaOH al 10%. Cuando se presentan coloraciones entre rosado y rojo la, esta prueba es positiva.

Figura 4. Análisis preliminar de Esteroides y/o triterpenos libres, Nafto y/o Antraquinonas, Taninos, Saponinas, Flavonoides.



Fuente: Sanabria G Antonio. Análisis Fitoquímico Preliminar 1988

5. Análisis de Taninos y saponinas

Para identificar los taninos, se toma un mililitro de la solución "F" se le adiciona un ml del reactivo de gelatina sal y se centrifuga a 2000 revoluciones por minuto, si se forma precipitado, se decanta el líquido el sobrenadante, adicionar un ml del reactivo de urea 10 M y tres gotas de cloruro férrico al 5%. La prueba es positiva si se presentan precipitados negros, azul intenso, verdes o morados.

La prueba para saponinas se realiza en la solución F, para ello se deben eliminar los taninos con oxido de magnesio y se lava con etanol hirviendo, una vez eliminados los de taninos se la prueba de la espuma y la de hemólisis, prueba de la espuma consiste en agitar durante tres minutos un ml de esta solución, si hay formación de espuma y esta permanece por treinta minutos la prueba es considerada positiva.

La prueba de hemólisis se realiza para determinar la capacidad que tienen las saponinas de romper los glóbulos rojos, por la misma razón se lleva a cabo en presencia glóbulos rojos; se prepara una solución normalizada de glóbulos rojos, se toman 5ml se le adiciona un ml de la solución destaninizada, se observa si hay hemólisis y se mide la velocidad de rompimiento de los glóbulos rojos, como patrón comparativo se utiliza 5 ml de la solución de glóbulos rojos, más 0,5 ml de una solución de digitonina 0.01%; y como blanco se utiliza 5 ml de la solución de glóbulos rojos más un ml de agua destilada (Figura 5)

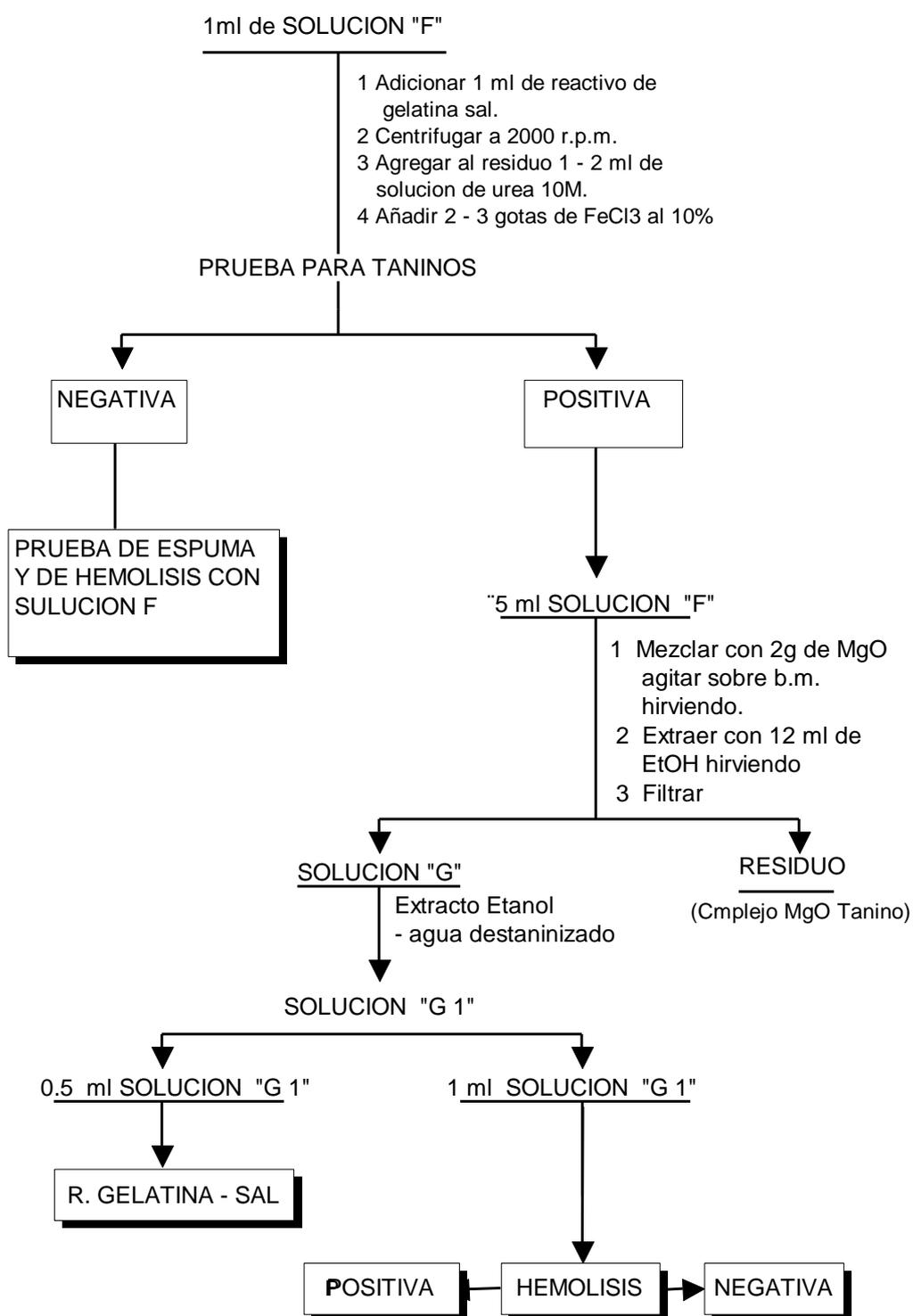
Suspensión normalizada de glóbulos rojos

10 a 20 mL de sangre humana son suspendidas en 100 mL de una solución de cloruro de sodio al 0.85 %, la suspensión es centrifugada a 1.500 – 2000 r.p.m., se decanta el sobrenadante, se resuspenden los glóbulos rojos en solución salina y el proceso de centrifugación es realizado dos veces más. Los glóbulos rojos se suspenden en 400 mL de solución de cloruro de sodio al 0.85% y se prueba si 0.5 mL de una solución de digitonina (10 mg de

digitonina en 100 mL de etanol de 80 %) hemolizan en menos de 10 minutos a 5 mL de la suspensión de glóbulos rojos.

Si ocurre hemólisis total, la suspensión de glóbulos rojos está lista para la prueba de hemólisis. En caso de que no se presente la hemólisis total en las anteriores condiciones, se diluye la suspensión de glóbulos rojos con solución salina hasta que 0.5 mL de la solución de digitonina hemolice en menos de 10 minutos a 5 mL de la suspensión de glóbulos rojos.

Figura 5. Análisis de Taninos y Saponinas



Fuente: Sanabria G Antonio. Análisis Fitoquímico Preliminar 1988.

6. Análisis de Cardiotónicos

Los cardiotónicos se determinan presencia de diclorometano, para ello se toma el residuo III y se extrae primero con etanol al 50% v/v, se calienta hasta ebullición, después se extrae con diclorometano y se realizan las reacciones de Keller, Killiani y Raymond.

Reacción de Keller Killiani. Se evaporan 2 ml de la capa orgánica (diclorometano) hasta sequedad y el residuo se extrae con 3 ml de ácido acético glacial que contiene 2 gotas cloruro férrico al 5%, se añade cuidadosamente ácido sulfúrico concentrado, se debe formar un anillo pardo rojizo en la zona de contacto y aparecer color, si la respuesta es positiva.

Reacción de Raymond. Se evapora 2 ml de la capa orgánica, el residuo se extrae de nuevo con 1 ml de etanol al 50%, luego se adicionan gotas de NaOH al 20% y 1 ml de m-dinitrobenzoico, coloraciones que van del violeta al morado intenso se consideran respuestas positivas.

REACTIVOS UTILIZADOS

Reactivo de Dragendorff

Disolver en la menor cantidad de agua y por separado 8g de nitrato de bismuto y 27.2 g de yoduro de potasio; mezclar las dos soluciones y agregar 12 mL de ácido nítrico al 30% p/v, ajustar a un volumen de 100 mL. Filtrar, si es necesario.

Reactivo de Meyer

Disolver por separado 1.5 g de cloruro mercuríco y 5 g de yoduro de potasio en la mínima cantidad de agua, mezclar las dos soluciones y completar con agua destilada a un volumen de 100 mL.

Reactivo de Valsler

Disolver 10 g de yoduro de potasio en agua destilada de manera que resulte un volumen final de 100 mL, agregar agitando yoduro de mercurio sólido hasta que no se disuelva, aproximadamente 14 g. Filtrar el exceso si es necesario.

Reactivo de Liebermann - Burchard

En un recipiente seco, dentro de un baño de hielo, mezclar 5 mL de anhídrido acético y 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (98 %) y adicionar 50 mL de etanol absoluto.

Reactivo de gelatina – sal

Hidratar 1 g de gelatina en 100 mL de una solución de cloruro de sodio al 10 %; calentar sobre un baño de maría, si es necesario.

ANEXO 2

CARACTERÍSTICAS DE LOS FLAVONOIDES

Se conocen aproximadamente 750 de estos compuestos, de los que el más simple es la flavona, que se encuentra en la superficie de hojas y tallos de muchas especies.

Se forman en las plantas a partir de una unidad de ácido cinámico y tres unidades de acetato (Sanabria 1983), estos metabolitos secundarios están ampliamente distribuidos en los vegetales, son responsables de muchas coloraciones de las plantas y también poseen actividades biológicas muy importantes: la principal función de las flavones que se encuentran como pigmentos en las hojas y frutos, como se ha establecido desde la época de Darwin, es la de atraer insectos y animales con propósitos de polinización y dispersión de semillas¹, por lo cual son sustancias que facilitan la polinización (Harbone 1977), regulan el crecimiento (Carpena 1979), protegen a la planta de ataque de microorganismos, y también poseen actividad anticancer (Sarín 1976), producen sabor amargo que inhibe la alimentación (Espinosa 1986).

Se denominan como flavonoides a varias clases de sustancias naturales que contienen dos anillos aromáticos unidos mediante una cadena de tres átomos de carbono (compuestos C₆C₃C₆).

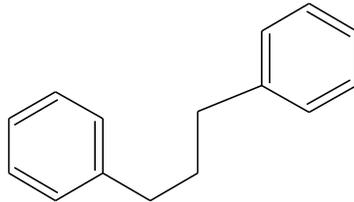
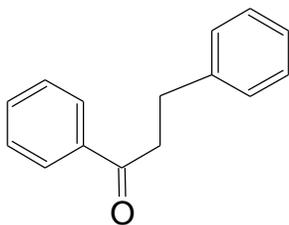


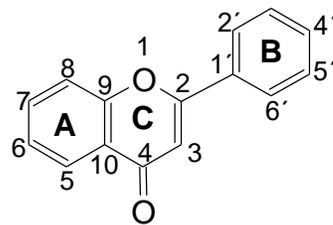
Ilustración 1 Estructura básica de los flavonoides

Clasificación y Nomenclatura

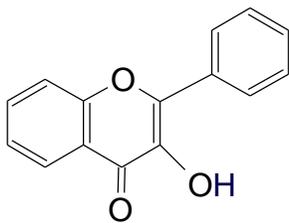
Se clasifican en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central C₃:



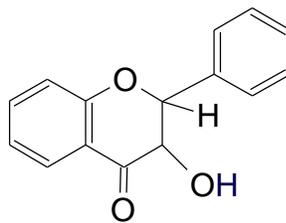
CHALCONAS



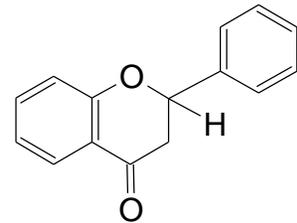
FLAVONAS



FLAVONOLES



FLAVANONOLES



FLAVANONAS

Ilustración 2 Clases de Flavonoides.

Propiedades Físicas

Estas dependen de la clase de flavonoide. Por ejemplo las flavonas y flavonoles, debido al sistema conjugado son sólidos con colores que comprenden desde el amarillo muy tenue hasta el rojo. Las antocianidinas son de colores rojo intenso, morado, violeta y azul. Las flavanonas y flavononoles debido al carbono quiral C2 presentan rotación óptica.

La solubilidad depende de la forma en que se encuentra y el número y clase de grupos sustituyentes. Los flavonoides altamente hidroxilados son solubles en alcohol (etanol, metanol y n- butanol), mientras que los no hidroxilados lo son en solventes como éter etílico, acetato de etilo y acetona, los altamente metoxilados son solubles en solventes menos polares como el éter de petróleo y el cloroformo.

ANEXO 3

PRESUPUESTO

Tabla 1. Presupuesto total del proyecto

FUENTES	UNIVERSIDAD DEL CAUCA		TOTAL
RUBROS	Solicitado a Vicerrectoria	Contrapartida	
Equipo	2.980.500	15.150.000	18.130.500
Material de laboratorio	930.000		930.000
Solventes	3.497.000		3.497.000
Reactivos	1.990.800		1.990.800
Viajes técnicos nacionales	300.000		2.000.000
TOTAL	9.698.300	15.150.000	24.848.300
%	55.6	60.97	100

Tabla 2. Equipo requerido en la investigación

EQUIPO	CANTIDAD	PROPOSITO FUNDAMENTAL DEL EQUIPO	COSTO EN MILES DE PESOS		VOLOR TOTAL
			Contrapartida	Solicitado	
Centrífuga Hermie z200A	1	Procesos de Separación y purificación	2.900.00		2.900.000
Estufa Container 300°	1	Secado de material	2.500.000		2.500.000
Mufla	1	Calcinaciones	2.500.000		2.500.000
Esterilizador NO. 25X	1	Esterilizar material	900.000		900.000
Balanza analítica	1	Todo uso en el laboratorio	1.200.000		1.200.000
Planchas de calentamiento con agitador magnético	1	Trabajo rutinario de laboratorio		1.780.000	1.780.000
Mantas de calentamiento	1	Obtención de extractos	150.000		150.000
Termómetro 1 – 600° C	2	Control de temperatura bioensayos y extractos		300.500	300.500
Camara de Reflujo laminar FLH - 48	1	Realizar cultivo de bacterias y seguimiento	5.000.000		5.000.000
Refrigerador 11 pie	1	Guardar material vegetal y medios de cultivo		900.000	900.000
VALOR TOTAL			15.150.000	2.980.500	18.305.000

Tabla 3. Reactivos solicitados

REACTIVOS	CANTIDAD	VALOR UNITARIO \$	TOTAL (MILES \$)
Agar – agar	1000 g	150.000	150.000
Caldo Mueller – Hinton	1000 g	140.000	140.000
Agar Mueller – Hinton	1001 g	150.000	150.000
Agar Sangre	500 g	170.000	170.000
Acido sulfúrico	3 l	30.000	150.000
Acido clorhídrico	4 l	25.000	100.000
Yoduro de potasio	200 g	110.000	110.000
Cromatoplacas	25 unidades	15.000	180.000
Silica gel para cromatografía en columna	1000 g	220.000	220.000
Yoduro de mercurio	50 g	105.800	105.800
Cloruro de plata	250 g	290.000	290.000
Nitrato de Bismuto	125 g	225.000	225.000
SUBTOTAL			1.990.800

Tabla 4. Solventes requeridos

NOMBRE	CANTIDAD L	VALOR UNITARIO \$	TOTAL (MILES \$)
Anhídrido acético	1	180.000	180.000
Alcohol metílico	15	15.000	225.000
Alcohol etílico	26	12.000	312.000
Cloroformo	8	80.000	640.000
Acetato de etilo	8	40.000	320.000
Exano	8	25.000	200.000
Cloruro de metileno	4	25.000	100.000
Eter de petróleo	12	60.000	720.000
Dimetil sulfoxido	1	800.000	800.000
SUBTOTAL			3.497.000

Tabla 5. Material de vidrio

NOMBRE	CANTIDAD	VALOR UNITARIO \$	TOTAL (MILES \$)
Beaker de 10 ml	10	10.000	100.000
Beaker de 25 ml	10	10.000	100.000
Beaker de 50 ml	15	8.000	120.000
Beaker de 100 ml	15	10.000	150.000
Erlemeyer 10 ml	15	10.000	150.000
Erlemeyer 50 ml	10	10.000	100.000
Cajas de petri	20	5.000	100.000
Balones para reflujo 5000 ml	3	70.000	210.000
SUBTOTAL			930.000