



DETECCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LAS HOJAS DE (*Trichanthera gigantea*) ACANTHACEAE Y SU ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ANTIMICÓTICA

Detection of secondary metabolites presents in the leaves of (*Trichanthera gigantea*) Acanthaceae and their antimicrobial and antimycotic activity

Astrid Daniela Carvajal Quiceno¹ *

¹: Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías, Universidad del Quindío, Carrera 15 No. 12N, Armenia, Colombia.

* For correspondence: adcarvajalq@uqvirtual.edu.co

Received: 02nd August 2020. Returned for revision: 02nd February 2021. Accepted: 1st March 2022

Associated Editor: Enrique Martinez Bustamante

Citation/ citar este artículo como: Carvajal, A. D. (2023). Detección de metabolitos secundarios presentes en las hojas de (*Trichanthera gigantea*) Acanthaceae y su actividad antimicrobiana y antimicótica. *Acta Biol Colomb.*, 28(1), 118-127. <https://doi.org/10.15446/abc.v28n1.89656>

RESUMEN

La implementación de las plantas como mecanismo de tratamiento para diferentes patologías, no es algo nuevo de la sociedad actual, sin embargo, en los últimos años los tratamientos a base de estos compuestos orgánicos denominados como principios bioactivos o metabolitos secundarios se ha impulsado. Para el caso de Colombia, las investigaciones sobre las propiedades de las plantas son muy bajas, razón por la cual el presente trabajo permite contribuir al conocimiento de plantas como *Trichanthera gigantea* o nacedero (Sarria, 1994; Sarwatt *et al.*, 2003). El objetivo general de este proyecto fue identificar los grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *T. gigantea* y su actividad antimicrobiana y antimicótica. Para la identificación de los metabolitos secundarios, se empleó a largos rasgos los métodos de extracción por percolación, cromatografía de columna líquida, tamizaje fitoquímico y revelado cromatográfico. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana y antimicótica, se utilizó el método de concentración mínima inhibitoria (CIM), en la que se sometió a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* a diferentes concentraciones del extracto de la planta. Entre los resultados más importantes, se destaca que *T. gigantea* posee un número significativo de compuestos de interés farmacológico (alcaloides, flavonoides entre otros), en cuanto a la actividad biológica, se obtuvo que la planta posee actividad inhibitoria frente a las cepas bacterianas y micótica nombradas anteriormente; resultados que pueden indicar que *T. gigantea* cuenta con propiedades de gran interés farmacológico.

Palabras clave: CIM, cromatografía, nacedero, percolación, metabolitos secundarios.

ABSTRACT

The implementation of plants as a mechanism of treatment for different diseases is not something new at present, however, in recent years treatments based on these organic compounds known as bioactive or secondary metabolites have been promoted. In Colombia, research on the properties of plants is still few, but the present work contributes to the knowledge of plants such as *Trichanthera gigantea* or the nacedero. The overall objective of this project was to identify groups of secondary metabolites present in the extracted ethanol from leaves of *T. gigantea* and its antimicrobial activity and antifungal. For the identification of secondary metabolites, it was used to long feature extraction methods by percolation, liquid column chromatography, screening phytochemical, and chromatographic revealed. The method of minimum inhibitory concentration (MIC) was used to evaluate antimicrobial activity and antifungal, which was subjected to strains of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans* to different concentrations of the extract of the plant. Among the most important results, stands that *T. gigantea* has a significant number of compounds of pharmacologic interest (alkaloids, flavonoids among others), in terms of biological activity, was obtained that the plant has inhibitory activity, by which one could conclude that *T. gigantea* has properties of pharmacological interest.

Keywords: Chromatography, MIC, percolation, Nacedero, secondary metabolites.



INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia la botánica y la antropología se han visto inmersos en una estrecha relación, en la que el hombre se ha beneficiado de todo lo que se encuentra en su entorno, no solo a nivel alimenticio, sino también medicinal (Barquero, 2007). Dichos beneficios, se atribuyen a que las plantas tienen la facultad de llevar a cabo un segundo proceso metabólico encargado de la conformación de moléculas que cumplen diversas funciones a escala ecológica, entre las que se encuentra la facultad de atraer o repeler a ciertos animales y la generación de pigmentación vistosa en sus flores y frutos (Ávalos y Pérez, 2009).

En la actualidad, se estima que solo se conocen cerca de 100 000 productos derivados de metabolismos secundarios o principios activos (Berdonces, 2015), dicha cifra se fundamenta en el número de estudios que tiene como finalidad documentar la actividad biológica de las plantas, los cuales solo representan el 6 % de estas determinadas taxonómicamente (Mendoza, 2008). Lo anterior muestra un panorama inquietante en el tema.

Conocer los principios activos de las plantas no solo permite comprender el funcionamiento bioquímico y fisiológico del individuo, sino que también permite tener un aprovechamiento social al ser utilizado con fines farmacológicos (Barquero, 2007), motivo por el cual, el estudio sobre plantas medicinales ha aumentado en los últimos años, puesto que el conocimiento sobre las ventajas que tiene el consumir productos de origen natural se ha generalizado.

La riqueza de los compuestos bioactivos que pueden ofrecer las plantas al ser humano tiene un valor terapéutico inigualable, sin embargo, aún se desconoce bastante sobre este aspecto (Fonnegra y Villa, 2008). En lo referente a la industria farmacológica, su interés primordial es generar productos “biofarmacos” originarios de plantas que no tengan riesgos de extinción, y que la extracción de sus principios activos no genere mayor dificultad para su obtención, además de que sean funcionales para diversos aspectos médicos (Ávalos y Pére 2009).

Los principios activos presentes en las plantas suelen encontrarse en determinadas familias, géneros y especies, incluso se puede decir que ciertos grupos de metabolitos se ubican en una parte específica del individuo, ya sea en hojas, tallo, raíz, corteza, semillas, frutos o flores (Berdonces, 2015). Entre las familias botánicas que poseen principios activos se encuentra la familia Acanthaceae que posee alrededor de 4000 especies con distribución principalmente en los trópicos y subtrópicos (Cruz y García, 2012). Esta familia se encuentra en África, América del sur y América central, cuenta con estudios previos que han relevado los altos porcentajes de compuestos bioactivos, además se le atribuye la facultad de tener propiedades en la inhibición bacteriana, como es el caso de *Justicia adhatoda*, fuente importante de diversos fármacos, debido sus compuestos

bioactivos y a su propiedad antibacteriana (Sharma y Kumar, 2016). Dentro de esta familia se encuentra la especie *Trichanthera gigantea* (Humboldt y Bonpland), planta comúnmente conocida como quiebrabarriga, nacedero, madre de agua o yatago, la cual se distribuye a lo largo de la cordillera de los Andes, pasando por los países de Ecuador, Venezuela y Colombia, sin embargo de acuerdo con Gómez (1993) y citado por López y Zeledón (2016) Colombia presenta un alto grado de endemismo de esta especie según estudios genotípicos, por lo cual se podría hipotetizar que es allí su centro de origen. *T. gigantea* se adapta a diferentes altitudes entre los 1200 y 2500 m.s.n.m, no obstante, los climas más favorecedores son los trópicos húmedos y subhúmedos (Arronis, s.f).

La especie de *T. gigantea* ha sido investigada en gran medida con fines agropecuarios en Venezuela y Colombia, ya que parece servir como sustituto parcial de la soya, la cual es importante para las cerdas en periodos de gestación o lactancia, además de poseer un alto contenido proteico que sirve como suplemento nutricional en los conejos y facilita su adecuado desarrollo (Sarria, 1994; Sarwatt *et al.*, 2003).

Hasta el día de hoy se han reportado 77 usos diferentes de *T. gigantea* agrupados de la siguiente manera: protección de fuentes de agua, cercas vivas, medicina tanto para humanos como para animales, recuperación y conservación de suelo, construcción, forraje, entre otros. Para el caso de Colombia, el principal uso de esta planta se basa en ser complemento alimenticio para la ganadería y porcicultura. En el ámbito medicinal para los animales (vacas y cerdas), se emplea para bajar la fiebre y tratar el timpanismo, en cuanto a las cerdas se emplea para la mastitis, estreñimiento, fiebre y obstrucciones intestinales (López y Zeledón, 2016). En seres humanos se implementa para tratar hernias, bajar de peso, controlar la fiebre, combatir los parásitos, desinflamar los riñones entre otras patologías. Durante el siglo XIX se le atribuyeron a dicho árbol aplicaciones útiles contra la viruela en poblaciones invadidas por el virus (López y Zeledón, 2016). Ahora bien, según lo señalado por Rosales (1997).

El presente estudio que tiene por objetivo principal identificar los grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *T. gigantea* y su actividad antimicrobiana y antimicótica con el propósito de contribuir en el conocimiento de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta y procesamiento del material vegetal

El material vegetal fue colectado el día 15 de febrero del 2018 en la vereda Boquía, zona rural del municipio de Salento, en la propiedad titulada “El Placer”, ubicada en las coordenadas 4°38'N y 75°35' W y a una altitud de 1817 m.s.n.m. Las actividades de colecta se iniciaron

a partir de las 7:00 am. Para la selección de las hojas se tuvieron en cuenta que los ejemplares arbustos mayores de 4 metros, las hojas debían estar en un estado de madurez intermedio, así como estar en buenas condiciones, de modo que no presentaran ningún tipo de parasitismo, herbivoría, afectación por el sol o daños de cualquier otro tipo. Una vez colectado el material, se llevó una muestra al herbario de la Universidad del Quindío de acuerdo a los parámetros requeridos para su registro.

Las hojas colectadas fueron pesadas antes de desinfectarlas con alcohol al 70 %, para luego ser depositadas en sobres hechos con papel periódico, las hojas se ubicaron de manera tal que no quedaran conglomeradas. Seguidamente, se llevaron al horno a una temperatura de 45 °C por un total de tres días, después se realizó la molienda del material seco y se pasó por un tamiz (N°10), para disminuir el tamaño de las partículas y con ello facilitar el proceso de extracción.

Procedimiento en el laboratorio

Extracción en percolador

La técnica de percolación consiste en obtener sustancias de interés que son arrastradas por diferentes solventes que tienen distintas polaridades. La percolación se realiza utilizando un recipiente de cristal con forma cilíndrica o ligeramente cónica y en su extremo inferior se encuentra una llave por donde sale el líquido, previamente filtrado (Jover *et al.*, s.f).

El material vegetal fue hidratado con alcohol etílico al 90 % en un recipiente de vidrio, posteriormente se depositó en el percolador y se procedió a empezar la extracción con un flujo continuo de alcohol etílico rectificado, hasta observar que el extracto etanólico obtenido estuviese totalmente incoloro. Para corroborar que no hubiese más compuestos en la extracción, se realizó una verificación mediante cromatografía en capa fina.

Concentración del extracto etanólico

El extracto etanólico producto de la percolación fue concentrado a presión reducida en un rotaevaporador, consecutivamente se depositó el extracto concentrado en una capsula de porcelana y se llevó al baño maría para eliminar los restos de solvente.

Determinación de metabolitos secundarios en el extracto

Para la detección de los metabolitos secundarios, se realizó un análisis fitoquímico preliminar, para lo cual se empleó el extracto etanólico concentrado y se siguió las metodologías propuestas por Sanabria (1983) (Anexo 1 y 2) y Gómez (2012). Los resultados del análisis fitoquímico fueron considerados como positivos de acuerdo a los

cambios en coloración, precipitación, turbidez y demás, con base en dichas variaciones los resultados se simbolizaron así: (+++), (++) , (+) o (-).

- **Análisis preliminar de alcaloides y esteroides**

Para la detección de los alcaloides y esteroides se empleó la metodología propuesta por Sabrina (1983).

- **Análisis preliminar de flavonoides**

Reacción Cianidina o Shinoda: En un tubo de ensayo se agregó aproximadamente 0,5 g de magnesio en polvo, se adicionó un mililitro de la “solución F” y gota a gota de ácido clorhídrico concentrado hasta que terminara el desprendimiento de hidrogeno; se observó la reacción por 10 minutos y se anotaron los cambios de color. Se tuvo en cuenta que las variaciones de color como: rosada, roja, violeta o roja anaranjada se consideró como prueba positiva para sustancias que en su estructura tengan un el núcleo de la γ -Benzopirona (flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas y xantonas).

Reacción HCl: Se transfirió 1 mL de la solución a un tubo de ensayo y se adicionaron 0,5 mL de HCl concentrado, se calentó el tubo a baño maría hirviendo durante 10- 15 min. Si en estas condiciones se obtenía una coloración roja, la prueba se consideraba positiva para leucoantocianidinas.

- **Análisis preliminar de naftoquinonas y antroquinonas**

Reacción Borntrager: En un tubo de ensayo con cinco mililitros de “solución F” se añadió un mililitro de peróxido de hidrogeno al 20 %, un mililitro de ácido sulfúrico al 50 % y se calentó a baño de maría hirviendo durante 10-15 minutos, se dejó enfriar y se extrajo en un embudo de decantación con cinco mililitros de benceno. La muestra fue tratada con un mililitro de una solución de hidróxido de sodio al 5 % que contenía 2 % de hidróxido de amonio. De acuerdo con la literatura, cuando las naftoquinonas y/o antroquinonas están presentes, la capa alcalina toma un color que va desde rosado a rojo intenso, todo dependiendo de la concentración de dichos compuestos en la planta.

- **Análisis preliminar de taninos y saponinas**

Para la detección de los alcaloides se llevaron a cabo una serie de pasos (Fig. 2):

Para realizar el fraccionamiento se utilizó una columna para cromatografía líquida. La columna se midió y se dividió en ocho partes iguales, posteriormente se adicionó sílice gel hasta la sexta parte y luego se sacó en un beaker pesado previamente y se observó el peso neto de la sílice. Después de ello el peso se dividió en seis, a dicho resultado se dividió en dos con el propósito de saber el gramaje que se necesitaría de extracto de la planta y de sílice para placa. La sílice gel fue humedecida con cloroformo y se depositó en la columna. Una vez obtenido el gramaje necesario del extracto y la sílice para placa, se mezclaron y se humedeció con cloroformo, luego se dejó secar hasta obtener un polvo fino y homogéneo. La columna se empezó a correr utilizando cloroformo como primer solvente, siguiendo con acetato de etilo y finalizando con metanol, el orden de los solventes

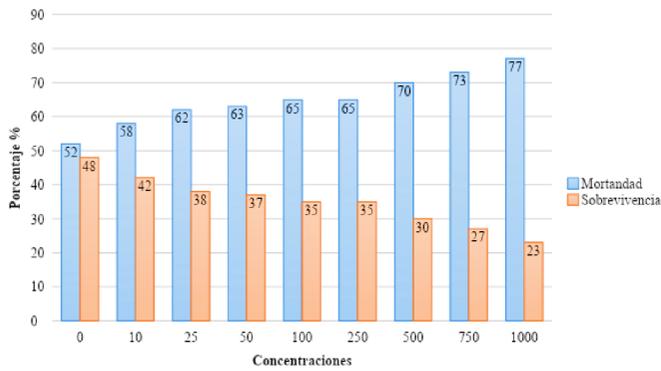


Figura 1. Grafica porcentual de la concentración letal media en el bioensayo con *Artemia salina*.

fue de acuerdo al grado de polaridad de los mismos. Cabe resaltar que antes de cambiar de solvente, se realizó una cromatografía de placa para saber el momento adecuado para el cambio de solvente.

Las fracciones obtenidas con cada solvente fueron perfiladas mediante cromatografía de capa fina y se agruparon aquellas que tuviesen un perfil cromatográfico y/o elución similar. Las fracciones de mayor interés fueron seleccionadas para realizar un segundo fraccionamiento, con el fin de una mejor separación de los componentes, para el segundo fraccionamiento se realizaron placas preparativas de cada fracción de interés y se observaron a luz UV y se señalaron los perfiles observados en ambas ondas de luz. Los perfiles señalados se conservaron en viales para su posterior montaje en nuevas columnas cromatográficas. Todas las fracciones obtenidas fueron sometidas a pruebas

de revelado cromatográfico con los diferentes reactivos de identificación.

Una vez obtenidas y perfiladas las fracciones cromatográficas de baja, media y alta polaridad, se asperjaron con los reactivos de identificación descritos por Gómez (2012).

Para la determinación de CL50 del extracto etanólico de las hojas de *T. gigantea* se empleó un bioensayo en el que se utilizó como organismo indicador a *Artemia salina*. Para esto se utilizaron los huevecillos deshidratados de dicho invertebrado, los cuales fueron activados en una solución salina 3,5 %, compuesta por sal marina, levadura y agua destilada. La incubación de los nauplios se realizó a temperatura ambiente y en un lugar con suficiente iluminación. La eclosión de los nauplios se llevó a cabo a las 24 horas de incubación. Las concentraciones de extracto a evaluar fueron: 1000, 750, 500, 250, 100, 50, 25 y 10 µg/mL. La evaluación se realizó por triplicado y se utilizó como control una muestra sin ninguna concentración, es decir los crustáceos desarrollándose de manera natural en el agua salina. En cada vial se introdujeron 20 nauplios de *A. salina*, después de ello se realizaron observaciones de mortalidad a las 24, 48 y 72 horas.

Para el desarrollo de la evaluación de la actividad antimicrobiana y antimicótica se utilizaron las cepas de las bacterias *Escherichia coli* (Gram negativo) (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (Gram positivo) (ATCC 25923) y como representante micótico a *Candida albicans* (levaduriforme) (ATCC 10231), a quienes se les evaluó la concentración mínima inhibitoria (CIM), cabe resaltar, que la densidad de microorganismos aproximados en la muestra era de 30X108,

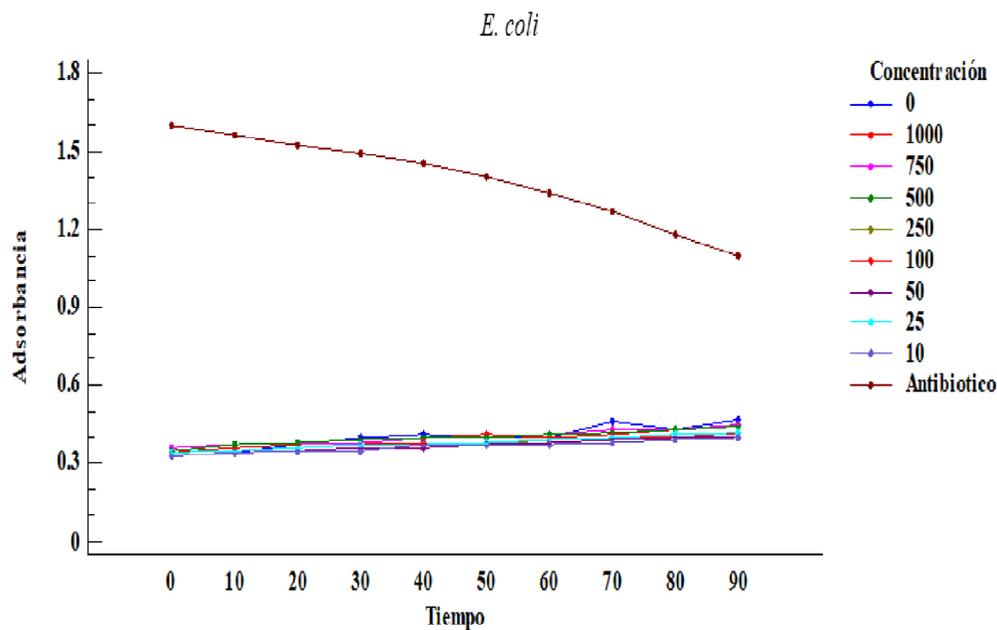


Figura 2a. Actividad microbiana para *E. coli* con los diferentes extractos.

esto de acuerdo con la escala de Mc Farland, en donde la densidad 10 equivale a el valor nombrado anteriormente (Medicina y laboratorio, 2009).

Los microorganismos empleados en este estudio fueron seleccionados debido a su amplia utilidad en los estudios enfatizados en evaluar la actividad biológica de un compuesto de interés. Lo anterior se atribuye a que se cuenta con dos grupos de bacterias que responden de maneras distintas a los compuestos y por ello las hace sensibles a distintas sustancias, de igual manera sucede con el hongo. Ahora bien, para que un microorganismo pueda ser considerado como “organismo modelo” debe de cumplir con características tales como: fácil obtención y manipulación en el laboratorio, ciclos de vida cortos, gran número de descendencia, entre otros aspectos (Matzner, 2012).

Las pruebas microbiológicas se llevaron a cabo en el centro de investigación de Ciencias Biomédicas en la Universidad del Quindío, en donde las cepas bacterianas y micótica fueron cultivadas en un caldo nutritivo estéril, las cepas se desarrollaron por un tiempo aproximado de 48 horas en una incubadora a 37 °C (Miller *et al.*, 2005), transcurrido ese tiempo se realizaron las preparaciones de las concentraciones de los extractos a evaluar. A partir de una solución stock de 1000 µg/mL, se prepararon las distintas soluciones: 750 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL y 10 µg/mL. Al tener listas las ocho concentraciones a evaluar, se usó una microplaca de ELISA de 96 pocillos. La placa fue distribuida de tal manera que se pudiesen evaluar los microorganismos por duplicado. El primer paso a seguir fue distribuir el medio de cultivo Luria Bertani LB en los pocillos de la placa (100 µl por cada pocillo), continuando con la inoculación de los microorganismos (50 µl por cada pocillo), posteriormente se agregaron los extractos de la planta (50 µl por cada pocillo), exceptuando para cada microorganismo un control negativo y uno positivo, en el primero se utilizó uno de los pocillos con la siembra y se aplicó el antibiótico (50 µl) que contrarresta el crecimiento (*E. coli* = ampicilina, *S. aureus* = oxacilina, *C. albicans* = fluconazol). En el control positivo, la bacteria y hongo no se expusieron a ningún compuesto. La microplaca fue llevada a analizar en el espectrofotómetro para microplacas Epoch e interpretado con el software Gen 5 en una densidad óptica de 600 nm, , luego del análisis se llevó la microplaca a incubación por 10 minutos, trascurrido ese tiempo se volvió a analizar; este procedimiento se realizó 10 veces.

Análisis estadísticos

Se realizó un análisis de variancia de dos factores relacionados con el que se buscó observar gráficamente el efecto del extracto frente a las cepas bacterianas y micótica ya mencionadas. Los datos recopilados fueron organizados

en Excel y analizados en el programa Statgraphics Centurion XVI, en donde fueron graficados y posteriormente interpretados.

Para la identificación de la concentración letal media (CL50) se realizaron cálculos matemáticos para conocer el porcentaje de sobrevivencia y de mortalidad de *A. salina* para cada uno de los extractos. Los valores resultantes de los cálculos fueron graficados en el programa Excel y posteriormente interpretados. Las fórmulas empleadas fueron las siguientes:

Para hallar el % de sobrevivencia

$$S = ((s^{\wedge} - r)) / s' \times 100$$

Donde:

S = supervivencia

s' = nauplios vivos en el blanco

r = nauplios muertos en el extracto

Para hallar el % de mortalidad:

$$\% M = ((Me - Mb)) / ((60 - Mb)) \times 100$$

Donde:

Me = mortalidad en el extracto

Mb = mortalidad en el blanco

60 = # de individuos iniciales

RESULTADOS

Colecta y procesamiento del material vegetal

El material vegetal colectado fresco tuvo un peso de 3100 g, y después del secado en el horno, la molienda y el tamizaje, el peso obtenido fue de 495 g.

PROCEDIMIENTO EN EL LABORATORIO

Extracción en el percolador y concentración del extracto etanólico

Una vez finalizado el proceso de extracción con el etanol rectificado, seguido por la concentración del extracto tanto en el rotaevaporador como en el baño maría, se obtuvo una cantidad aproximada de 30,05 g.

Determinación de metabolitos secundarios en el extracto.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, los resultados del análisis fitoquímico fueron considerados como positivos de acuerdo a los cambios en coloración, precipitación, turbidez y demás, con base en dichas variaciones los resultados se simbolizaron así: (+++), (++) , (+) o (-).

- Análisis de alcaloides

Para la detección de alcaloides se emplearon los reactivos de precipitación: Dragendorff, Mayer, Valsler y Reineckato de Amonio. En la prueba inicial se tuvieron resultados positivos para todos los reactivos, dado que hubo cambio de color evidente, turbidez y precipitación. Después de alcalinizar la solución y habiendo realizado las extracciones indicadas con cloroformo, se obtuvieron dos capas; una clorofórmica y otra acuosa, en la clorofórmica se las pruebas realizadas dieron positivo para alcaloides de baja polaridad. En cuanto a la capa acuosa, esta fue usada para detectar alcaloides tanto de polaridad relativamente alta como alcaloides de amonio cuaternario y fenólicos, quienes después de realizar las pruebas con los reactivos dieron positivo para todos.

- Análisis de esteroides y/o triterpenoides

Se realizó la extracción con éter de petróleo y se filtró, de ello se obtuvo una solución etérea de color verde claro, consecutivamente se realizó una cromatografía de capa delgada bidimensional para separar los componentes de la solución; la placa fue eluida con dos mezclas de solventes y se asperjó con el reactivo Liebermann-Burchard, observándose la aparición de manchas de color violeta y azul lo que indica que la prueba fue positiva para esteroides o triterpenoides.

- Análisis de flavonoides

Para la reacción de Shinoda (Cianidina), los resultados fueron positivos, obteniéndose una coloración rosada claro. En cuanto a la reacción con el ácido clorhídrico (HCl), la coloración fue más acentuada, teniendo una tonalidad roja al formarse un halo en la parte superior de la muestra, lo que corrobora la presencia de flavonoides.

- Análisis de naftoquinonas y antraquinonas

La detección de naftoquinonas y antraquinonas se empleó el indicador hidróxido de potasio (reactivo Borntrager), en esta prueba los resultados fueron positivos, al observarse coloración rosada.

- Análisis de taninos y saponinas

En la prueba para taninos no se generó precipitación al momento en el que se le adiciono el reactivo Gelatina-sal, por lo cual se procedió a realizar la prueba de espuma y hemólisis directa de la "solución F". En la prueba de espuma, el resultado fue negativo (-), puesto que la espuma no fue persistente, en cuanto al análisis de hemólisis la prueba también fue negativa.

Fraccionamiento cromatográfico del extracto etanólico de las hojas de *T. gigantea* por cromatografía en columna

Como ya se describió anteriormente, el extracto de la planta se ubicó en una columna cromatográfica de vidrio. La cual fue corrida con solventes de baja (cloroformo), media (acetato de etilo) y alta (metanol) polaridad. Las fracciones

obtenidas con cada solvente fueron unidas de acuerdo con el perfil cromatográfico que mostraron al momento del revelado con la técnica de cromatografía de capa delgada.

Para el caso del solvente de cloroformo se obtuvieron 50 fracciones iniciales, que se unificaron en 11. En cuanto al acetato de etilo, las fracciones iniciales eran 22 y se agruparon en cinco, por último, para el caso del metanol fueron 33 fracciones iniciales y se agruparon en 19 unidades.

Detección de metabolitos secundarios mediante el revelado cromatográfico utilizando reactivos de aspersion

En la siguiente tabla se presentan los resultados correspondientes al revelado cromatográfico de las fracciones obtenidas.

Determinación de la concentración letal media (CL50)

Los resultados obtenidos para la determinación de la concentración letal media se dan a conocer (Fig. 1), en la cual se pudo apreciar el porcentaje citotóxico del extracto de la planta sobre *A. salina*, de acuerdo con lo observado, se definió que el valor de toxicidad fue de 500 µg/mL. En la figura 1 se observó de manera porcentual la sobrevivencia y mortalidad de los crustáceos en relación a las concentraciones; en el grafico se pudo apreciar que a partir de la concentración de 500 µg/mL se incrementó la mortalidad, resultado que de acuerdo con los parámetros de toxicidad expuestos por Sánchez y Neira (2005), se determinó que la toxicidad de la planta se encuentra en el nivel "Ligeramente toxico", lo que indica que *T. gigantea* puede ser una especie de interés farmacológico.

Prueba de actividad antimicrobiana y antimicótica

Con base en los análisis estadísticos realizados y lo que se pudo observar en las gráficas

(Fig. 2a - 2b), *T. gigantea* posee actividad inhibitoria para las dos cepas bacterianas, debido a que la incidencia de luz transmitida para todas las concentraciones es menor que la incidencia de luz dada por el antibiótico empleado, es decir, los extractos inhibieron en mayor proporción el desarrollo de las bacterias, mientras que el antibiótico potencializo el desarrollo de estas. No obstante, es de señalar, que, en lo referente a las cepas bacterianas, es dispendioso indicar un valor puntual de inhibición, debido a que como se muestran en las figuras, las líneas de todas las concentraciones se solaparon.

Por su parte, para el caso de *C. albicans*, la actividad inhibitoria fue mucho mayor para la concentración 25 µg/mL, tratamiento que supero al antibiótico, ya que como se puede apreciar en (Fig. 2c), la acción que tuvo dicha concentración insidioso de manera importante en la inhibición del desarrollo micótico.

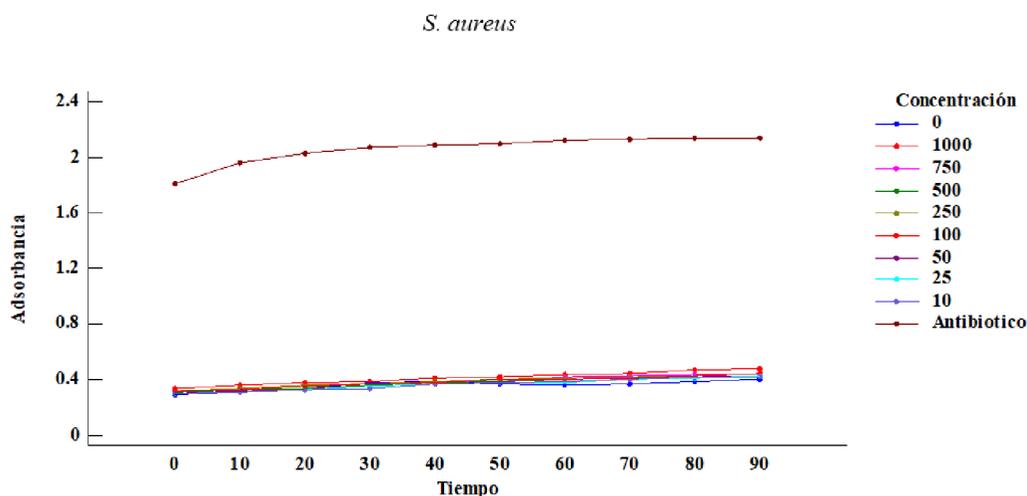


Figura 2b. Actividad microbiana para *S. aureus* con los diferentes extractos.

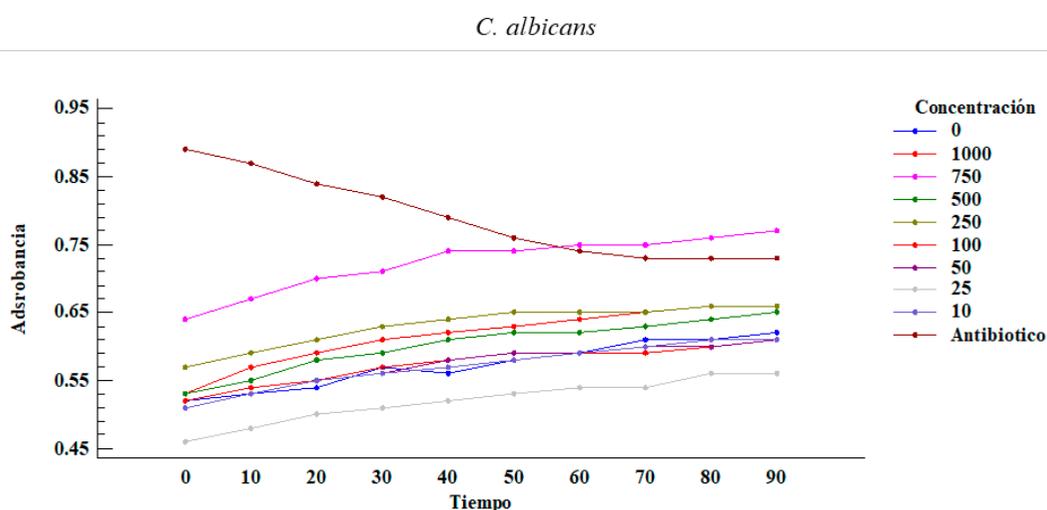


Figura 2c. Actividad micótica para *C. albicans* con los diferentes extractos.

DISCUSIÓN

Los metabolitos secundarios encontrados en las hojas de *T. gigantea*, pueden llegar a ser de interés farmacológico, debido a que como se ha expuesto en la (Tabla 1), la cantidad de compuestos bioactivos son muy significativos, ya que se observan compuestos como los alcaloides, aceites esenciales, flavonoides, glicosidos cardiotónicos y de más, que son de gran utilidad en la industria farmacológica. Previas investigaciones sobre principios activos muestran que la presencia de compuestos como son los alcaloides, tiene gran utilidad a escala ecológica y medicinal. De acuerdo con Arango (2008), estos compuestos cumplen diferentes funciones en las plantas, como ser útiles en la protección frente a insectos y posibles depredadores, gracias a su sabor amargo característico; también son útiles en la filtración de nitrógeno, lo que contribuye al estado óptimo

de los suelos; a escala terapéutica, sus usos van desde la estimulación del sistema nervioso, hasta la generación de drogas como lo es la morfina y heroína. A los alcaloides, también se les atribuye propiedades antimicrobianas y antimicóticas, al ser los compuestos que interactúan con la pared celular y desestabilizar sus mecanismos de defensa (Lizcano y Vergara, 2008).

De igual forma, la presencia de aceites esenciales, flavonoides y cumarinas sugiere que esta planta posiblemente posee propiedades antimicrobianas y antimicóticas, estudios realizados por Vélez *et al.* (2014) y Pinzón (2010), muestran que dichos principios activos son claves en la inhibición micótica y bacteriana. Para el caso de los aceites esenciales, su efecto sobre los microorganismos puede atribuirse a su naturaleza lipófila, la cual tienen gran afinidad con las membranas celulares de los microorganismos. Su mecanismo de interacción empieza

Tabla 1. Resultados de presencia o ausencia de metabolitos secundarios a través del revelado cromatográfico en los diferentes solventes empleados.

Metabolito secundario	Reactivo revelador	Cloroformo	Acetato de etilo	Metanol
Alcaloides	Reactivo de Marquis	+++	-	+
	Reactivo de Mayer	+++	-	++
	Yodo-yoduro de potasio	+++	++	+
	Sulfato de amonio y hierro III	-	++	-
Esteroles, esteroides y diterpenos	Cloruro de antimonio III /Ác. Acetico	+++	+++	++
	Liberman Burchard	++	++	+
	Vainillina/Ác fosfórico	++	+++	++
	Vainillina/Ác. sulfúrico	++	+++	+
Fenoles y alcoholes superiores, flavonoides	Acetato de plomo básico	+++	++	+++
	Bencidina	++	-	++
	Cloruro de hierro III	+++	++	++
	Cloruro de aluminio	++	++	++
	Vainillina/Ác. sulfúrico	++	+	++
Glucósidos cardiotónicos	Ácido 3,5 dinitrobenzoico (Reactivo Kedde)	+++	++	-
	Ácido 2,4,6 trinitrobenzoico	++	++	-
Aceites esenciales	Ácido fosfomolibdico	+++	+++	++
Cumarinas, antronas y antraquinonas	Hidróxido de potasio (Reacción Borntrager)	+++	+++	++
Sapogeninas esteroidales	Cloruro de zinc	+++	+++	++

cuando los compuestos lípidos de los aceites interactúan con los lípidos de la membrana celular y mitocondrial, donde alteran el transporte de iones, reacciones enzimáticas translocación entre otros, conllevando a la muerte celular del microorganismo.

Según Reyes *et al.* (2014), el mecanismo de acción de los aceites esenciales se debe a un conjunto completo de sus componentes entre los que se encuentran los monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos entre otros, que interactúan con diferentes partes de la célula microbiana. De acuerdo con Vélez y colaboradores (2014), los aceites esenciales cuentan con una fuerte actividad antimicrobiana, afectando en gran medida a las bacterias Gram positivas y en menor cantidad en las Gram negativas.

Por su parte, las cumarinas expresan con un mecanismo de inhibición microbiana, basado en la interacción con el ADN eucariota, ya que su relación se fundamenta evitar la replicación del mismo y posteriormente desintegrarlo. Los esteroides y triterpenoides cuentan con propiedades importantes a escala microbiológica; a los esteroides, se les atribuye ser vitales en los procesos de desestabilidad de las células bacterianas, mientras que los triterpenoides dependiendo de su naturaleza química, pueden alterar la selectividad de la membrana citoplasmática y el intercambio de sustancias (triterpenoides hidrocarbúricos) o perturbar la naturaleza coloidal del protoplasma de la célula, generando su muerte (triterpenoides alcohólicos). Lo

nombrado anteriormente podría explicar a grandes rasgos la actividad inhibitoria mostrada en los datos recopilados, al ser los alcaloides, aceites esenciales, flavonoides y demás compuestos importantes para inhabilitar el crecimiento bacteriano y micótico.

La elección de los antibióticos utilizados como el fluconazol para el caso de *C. albicans*, se fundamenta en que de acuerdo a estudios previos realizados (Gómez, 2010), hasta el día de hoy el fluconazol ha sido el antibiótico más manejado para el tratamiento de infecciones a causa de dicho microorganismo, sin embargo, con reportes generados por los análisis clínicos, se estima que un 10 % de los casos de infecciones ya cuentan con algún grado de resistencia a los componentes del fluconazol, argumento que podría ajustarse a los resultados obtenidos y abre la posibilidad de inferir que la cepa de *C. albicans* pudo haber generado resistencia al antibiótico y en lugar de inhibir su crecimiento, por el contrario lo potencializo.

En lo referente a la implementación de los antibióticos para las cepas bacterianas, se basó en diferentes reportes como los hechos por Mensa *et al.* (2013), quien documenta la utilidad de antibióticos para *S. aureus* y la posible explicación a la resistencia que puede tener dicha bacteria a determinados fármacos, es así como la implementación de la oxacilina, es el antibiótico más efectivo para el tratamiento, sin embargo, la acción más eficiente para combatir a *S. aureus* incluye una mezcla de componentes (oxacilina, cloxacilina,

dicloxacilina y flucloxacilina), lo que podría explicar los resultados obtenidos, es decir, la implementación exclusiva de oxacilina no fue efectiva para la cepa y por ello estimulo su crecimiento. En cuanto a *E. coli* al igual que *S. aureus*, el manejo de antibióticos incluye una mezcla de componentes para incrementar su acción bactericida ya sea con antibióticos como amoxicilina-clavulánico o ampicilina-sulbactam (Bustamante, 2015), puesto que la ampicilina de manera individual como se empleó en este proyecto no es la herramienta más efectiva. Finalmente, el bioensayo realizado con *Artemia salina* indica que el extracto de *T. gigantea* cuenta con la propiedad de ser ligeramente toxico, por lo cual puede ser considerado en tratamientos farmacológicos, ya que podría ser útil para posiblemente matar de células cancerígenas en cultivo de tejidos, matar insectos (Sánchez y Neira, 2005; Pino y Lazo, 2010).

CONCLUSIONES

El tamizaje fitoquímico realizado a las hojas de *T. gigantea* revelaron la posible presencia de metabolitos secundarios como: alcaloides, flavonoides, taninos, esteroides y triterpenoides. El extracto de la planta presento actividad antimicrobiana para las cepas de *E. coli* y *S. aureus*, de igual manera, los compuestos presentes en esta especie son funcionales en la inhibición de *C. albicans*. El bioensayo de citotoxicidad con *A. salina*, mostró que la concentración letal media del extracto es de 500 µg/mL, valor que de acuerdo con lo expuesto por otros autores, se considera como una sustancia ligeramente toxica.

REFERENCIAS

- Ávalos A. y Pérez E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, Serie Fisiología Vegetal, 2009; 2 (3): p.119-145.
- Arango G. Alcaloides y compuestos nitrogenados. Universidad de Antioquia. Medellín - Colombia, 2008: p.3-6
- Arronis V. *Trichanthera gigantea* como opción sostenible para la producción de carne y leche. Instituto nacional de innovación y transferencia en tecnología agropecuaria. Corporación Ganadera - CORFOGA, (s.f).
- Berdonces J. *Plantas Medicinales: Guía de remedios naturales*. Editorial Anaya Multimedia (Madrid, España), 2015: p.30-45.
- Barquero A. *Plantas sanadoras: Pasado, presente y futuro, Quimicaviva* (Buenosaires, Argentina), 2007; 2(6): p.18-25.
- Bustamante S. Protocolo para la evaluación/comparación de la actividad antimicrobiana antibióticos genéricos y antibióticos innovadores, frente a patógenos clínicos. Universidad Javeriana, 2015: p.20-22.
- Cruz R, García M. Presencia de *Ruellia jaliscana* standl. (Acanthaceae. sect. chiropterophila) en la flora del estado de Guerrero, México. Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. *Revista. Botanical Sciences*, 2012: p.9-15.
- Fuentes M. Estudio de susceptibilidad y mecanismos de resistencia a antifúngicos en *Candida albicans* de aislados clínicos chilenos, 2014: p.22-25.
- Fonnegra R, Villa J. Plantas medicinales usadas en algunas veredas de municipios del altiplano del Oriente Antioqueño, Colombia. *Actual Biol*, 2011; (95): p.219-250.
- Gómez M. De la planta a la droga. Armenia, 2012: p.73-114.
- Gómez C. Resistencia de levaduras del género *Candida* al fluconazol. *Asociación colombiana de infectología, Rev. Infectio*, 2010: p.173-175.
- Matzner C. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de florfenicol y oxitetraciclina en aislados chilenos de *Piscirickettsia salmonis*. Universidad Austral de Chile Facultad de Ciencias Escuela de Química y Farmacia, 2012: p.42-46.
- Miller R, Walker R, Carson J. Standardization of a broth 91 microdilution susceptibility testing method to determine minimum inhibitory concentrations of aquatic bacteria. *Dis. Aquat*, 2005; Org 64: p.211 - 222.
- Mensa J *et al.*, Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Rev Esp Quimioter* 2013; 26 (Suppl. 1): p.1-84.
- Mendoza N. *Farmacología Médica*. Editorial Médica Panamericana. UNAM, Facultad de Medicina. México, 2008: p. 928.
- Medicina y laboratorio. Medios, reactivos y control de calidad. Manual para la identificación y prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos. Universidad de Antioquia, 2009;(15): p.22-23.
- Jover A y García MJ. *Manual del auxiliar de Farmacia*. MAD, 2004, DOI: 84-665-2949-7.
- López E y Zeledón V. Efectos de Fertilización Orgánica y Sintética en el Desarrollo de Forraje Nacedero (*Trichanthera gigantea*) en la Finca Buena Vista, San Ramón atagalpa, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua. Facultad Regional Multidisciplinaria Matagalpa. 2016: p. 10-15.
- Lizcano A y Vergara J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Universidad Javeriana, 2008: p.32- 36.
- Pinzón J. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de Anís estrellado (*Illicium verum*) contra *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. Universidad Javeriana, 2010: p.13-18.
- Pino O, y Lazo R. ensayo de Artemia: útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Revista Protección vegetal*, 2010; (25): p.2-4.

- Rosales M. *Trichanthera gigantea*. A review. *Livestock Research for Rural Development*, 1997;9 (4): p.10-18
- Reyes F *et al.*, Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales, 2014; 8 (1): p.68-78.
- Sharma A. y Kumar A. *Achantaceae: Taxonomy and uses in traditional medicinal system*. *World Journal of Pharmaceutical Research*; 2016; Vol.5 (7): 403-412. DOI: 10.20959/wjpr20167-6522.
- Sarria P. Efecto del nacedero (*Trichanthera gigantea*) como reemplazo parcial de la soya en cerdas en gestación y lactancia recibiendo una dieta básica de jugo de caña. *Livestock Research for Rural Development*, 1994; 6 (1): p.5-9.
- Sarwatt S, Laswai G y Ubwe R. Evaluation of the potential of *Trichanthera gigantea* as a source of nutrients for rabbit diets under small-holder production system in Tanzania. *Livestock Research for Rural Development*, 2003; 15 (11): p.26-38.
- Sanabria A. Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. Bogotá: Departamento de Farmacia. Universidad Nacional de Colombia, 1983: p.63-90.
- Sánchez L y Neira A 2005. Bioensayo general de letalidad en *Artemia salina*, a las fracciones del extracto etanólico de *Psidium guajava* y *Psidium guineense*. Fundación universitaria Juan de Castellanos, 2005.
- Vélez M, Campos R y Sánchez H. Use of plant secondary metabolites to reduce ruminal methanogenesis. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 2014; (17): p.4-8.