

QUIMICA PRELIMINAR Y EVALUACION DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIAL DEL EXTRACTO ETANOLICO DEL TALLO DE *Matelea*
maritima (Asclepidiaceae).

EDWARD ENRIQUE AGUAS MENDEZ
XAVIER ROLANDO MORALES GONZALEZ

UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
DICIEMBRE de 2006

**QUIMICA PRELIMINAR Y EVALUACION DE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIAL DEL EXTRACTO ETANOLICO DEL TALLO DE *Matelea*
maritima (Asclepadiaceae).**

**EDWARD ENRIQUE AGUAS MENDEZ
XAVIER ROLANDO MORALES GONZALEZ**

Trabajo presentado como requisito para optar al Título de
Biólogo con Énfasis en Biotecnología

RITA LUZ MÁRQUEZ VÍZCAINO M.Sc,
Director de Tesis
CATALINO DE LA ROSA TORRES.
Codirector

**UNIVERSIDAD DE SUCRE
FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
SINCELEJO
DICIEMBRE de 2006**

Nota de Aceptación

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Director de Tesis
Fac. Educación y Ciencias

Decano

Director de Dpto. de Biología

Sincelejo, diciembre de 2006

Dedicatoria

A Dios todo Poderoso,

a mis Padres,

a mi familia

y a mis amigos.

Xavier.

Dedicatoria

A Dios, por haberme dado esta vida tan maravillosa.

A mis padres, Efraín y Carmen, por su crianza y apoyo en todo momento.

A mis hermanos, Efraín, Miladis y Maye, por sus consejos.

A mis sobrinos queridos, Yina, Pauli, Andrea, Laura, Sergio y Robert.

*A mis profesores, por su enseñanza, y especialmente a la profesora Rita Luz
Márquez,*

por haberla puesto Dios en mi camino.

A mi amigo Jahir y Xavier, por su incondicionalidad.

A todos ellos, ¡Muchas gracias!

Edward E. Águas M.

AGRADECIMIENTOS

A Dios,

La Universidad de Sucre,

Dra. Rita Luz Márquez Vizcaíno, M. Sc. docente del programa de Biología, Universidad de Sucre, Directora del Grupo de Investigación Fitoquímica GIFUS, y de este trabajo de grado.

Al Profesor Catalino de la Rosa, Codirector de este trabajo de grado y profesor de la Universidad del Atlántico.

A los profesores: Santiago Ruiz, Adolfo Consuegra.

A Arturo Doncell, jefe de laboratorio de microbiología.

A la institución educativa LICAPEVE y a su cabeza el rector Jorge Luis Argel Soto, y Cristóbal Díaz, auxiliar de laboratorio.

A Giovanni Montes, Jahír Márquez, Aidée Muñoz y Danys Mendoza. .

A nuestros compañeros: Liceth, Claudia, Angelina, Libardo, Alveiro, Dairo, y todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron a la elaboración de este trabajo.

¡Muchas gracias!

***“Únicamente los Autores son responsables
de las Ideas expuestas en el presente Trabajo”
(Art. 12 Res. 02 – 2003.)***

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
2. ESTADO DEL ARTE	3
2.1. UTILIZACIÓN DE LAS PLANTAS EN EL CAMPO MEDICINAL	3
2.2. FAMILIA ASCLEPIADACEAE	5
2.3. FITOQUÍMICA DE LA FAMILIA ASCLEPIADACEAE	7
2.4. <i>CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA</i>	9
2.5. GENERALIDADES DE <i>Matelea maritima</i>	9
2.5.1. Botánica	9
2.5.2. Propiedades Medicinales Atribuidas	11
2.5.3. Química del Género <i>Matelea</i>	13
2.6. METODOS FITOQUIMICOS	13
2.6.1. Métodos de Extracción	14
2.6.1.1. Infusión	14
2.6.1.2. Decocción	14
2.6.1.3. Maceración	14
2.6.1.4. Percolación	14
2.6.1.5. Extracción Continua	14
2.6.1.6. Precipitación Disolvente-Disolvente	15
2.7. FRACCIONAMIENTO POR COLUMNA FLASH	17

2.8. BACTERIAS	18
2.8.1. Estructura de la Pared Bacteriana	19
2.8.2. Especies Bacterianas	21
2.8.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.8.2.2. <i>Escherichia coli</i>	22
2.8.2.3. Método de difusión en placa	23
2.9. ANTIMICROBIANOS	24
2.9.1. Desinfectantes	25
2.9.2. Sanitizantes	25
2.9.3. Antisépticos	25
2.9.4. Antimicrobianos de Uso Sistémico	25
2.9.5. Origen	25
2.9.5.1. Naturales	25
2.9.5.2. Sintéticos	25
2.9.5.3. Semisintéticos	25
2.9.6. Efecto	25
2.9.6.1. Bacteriostáticos	25
2.9.6.2. Bactericidas	25
2.9.7. Espectro De Actividad	26
2.9.7.1. Amplio	26
2.9.7.2. Intermedio	26
2.9.7.3. Reducido	26

2.9.8.	Mecanismos de Acción	26
2.9.9.	Vancomicina	26
2.9.9.1.	Presentación	26
2.9.9.2.	Dosis	27
3.	METODOLOGIA	28
3.1.	TIPO DE METODOLOGIA	29
3.2.	RECOLECCION Y TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL	29
3.3.	EXTRACCION POR SOXHLET	30
3.4	COLUMNA FLASH	30
3.5.	EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	31
3.5.1.	PREPARACION DEL EXTRACTO	31
3.5.2.	PRUEBA DE SENSIBILIDAD	33
3.6.	CONTROLES	34
3.7.	ESPECIES BACTERIANAS	35
3.8.	MEDIOS DE CULTIVO	35
3.9.	PREPARACION DE LAS CAJAS PETRI PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD	36
4.	RESULTADOS Y DISCUSION	38
4.1.	RENDIMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL	38
4.2.	IDENTIFICACION CUALITATIVA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	38
4.3.	EVALUACION DE LA PRUEBA ANTIBACTERIAL	40
5.	CONCLUSIONES	45

6.	RECOMENDACIONES	47
7.	REFERENCIAS	48
	ANEXOS	52

LISTA DE ABREBIATURAS

AA	Aminoácidos
AL	Alcaloides
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EtOH	Etanol
FL	Flavonoides
g	Gramos
H	Hora
HCl	Acido clorhídrico
I.V.	Intravenoso
Kg	Kilogramo
Lat	Latitud
Lb	Libra
Long	Longitud
MetOH	Metanol
Mg	Magnesio
mg	Miligramo
mg/mL	Miligramos sobre mililitro
mL	Mililitro
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
N	Norte
NaOH	Hidróxido de Sodio
Qui	Quinonas
SA	Saponinas
TA	Taninos
U.F.C.	Unidades formadoras de colonias
%	Porcentaje

INDICE DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Preparación de Extractos y Controles	33
TABLA 2. Concentración de los Extractos	33
TABLA 3. Rendimiento del Material Vegetal	38
TABLA 4. Identificación Cualitativa de Metabolitos Secundarios	39
TABLA 5. Prueba de Alcaloides	40
TABLA 6. Resultados Prueba de Sensibilidad	41
TABLA 7. Resultados Prueba de Sensibilidad Alterna	42

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1a. Fruto de <i>Matelea maritima</i>	10
FIGURA 1b. Tallo de <i>Matelea maritima</i>	10
FIGURA 2. Extractor Soxhlet	15
FIGURA 3. Columna Flash	17
FIGURA 4. Morfología de Algunas Bacterias	18
FIGURA 5. Estructura Simple de las Bacterias	19
FIGURA 6. Estructura de Pared Bacteriana	20
FIGURA 7. Fotografía de <i>Staphylococcus aureus</i>	21
FIGURA 8. Fotografía de <i>E. coli</i>	23
FIGURA 9. Esquema General de la Metodología	28
FIGURA 10. Cultivo Madre de Bacterias <i>E. coli</i>	35
FIGURA 11. Resultados Prueba Sensibilidad Contra <i>E.coli</i>	41
FIGURA 12. Resultados Prueba Sensibilidad Contra <i>S.aureus</i>	41
FIGURA 13. Resultados Prueba Sensibilidad Alterna Contra <i>S.aureus</i>	43

INDICE DE ANEXOS

ANEXO No 1. Esquema Metodológico De Tamizaje Fitoquímico

ANEXO No 2. Escala Nefelométrica De Mc farland

ANEXO No 3. Soluciones De Los Extractos

ANEXO No 4. Ficha Técnica De E.coli

ANEXO No 5. Ficha Técnica De S. aureus

RESUMEN

Mateíea maritima, planta perteneciente a la familia *Asciēpiādāceae*, y que se encuentra en el departamento de Sucre, mostró tener metabolitos secundarios tipo alcaloides, terpenos, leucoantocianinas y saponinas en el extracto total etanolico de su tallo seco. Además, pruebas de sensibilidad de los extractos vegetales de *M. maritima*, no tuvieron actividad antibacterial contra *S. aureus* cepa ATCC 25923 y *E. coli* cepa ATCC 25922. Estos datos pueden servir como base a estudios posteriores debido a que son los primeros reportes de estudios realizados a esta especie.

SUMMARY

Mateíea maritima, plant belonging to the family *Asclepiadaceae* and found at the departament of Sucre, showed to have secondary metabolites like alkaloids, terpens, leucoantocianins, and saponines, in the total ethanolic extract of its dried stem. In addition, proofs of sensibility of the plant extracts of *M. maritima*, had not antibacterial activity against *S. aureus* strain ATCC25923 and *E. coli* strain ATCC25922.

These data can to serve like basis for subsecuent studies due to they are first reports of realized studies to this specie.

INTRODUCCIÓN

Colombia posee una gran diversidad de especies de flora, existen pocas investigaciones fitoquímicas y farmacognósticas que se han adelantado comparadas con la de otros países, que sin contar con tanta diversidad, son protagonistas en el área de investigación en productos naturales herramienta para el desarrollo y crecimiento económico social y ambiental de una región.

El efecto de algunas sustancias en el control, crecimiento y tratamiento de infecciones bacterianas han sido ampliamente estudiadas. Un gran número de sustancias de origen vegetal han sido utilizadas como posibles alternativas por el efecto que estas ejercen sobre organismos Grampositivos y Gramnegativos, sin la subsiguiente acción de resistencia presentada en comparación a los antibióticos convencionales utilizados en tratamientos preventivos

Debido a lo anterior, y por los inexistentes reportes que puedan dilucidar sobre el uso potencial de ***Matelea maritima***, se ha decidido incursionar en las primeras investigaciones referentes a su composición química y actividad antibacterial, con el ánimo de contribuir al conocimiento químico, botánico y biológico de la flora de nuestra región.

Matelea maritima también se conoce como ***Ibatia maritima***, especie de la familia *Asclepiadaceae* de la cual no se encuentra reporte de estudios fitoquímicos; la química del género ***Asclepias*** reporta glicósidos cardiotónicos, terpenos y alcaloides, entre otros, sustancias con amplio potencial en el tratamiento de patologías de tipo infeccioso, ansiolíticas y relajantes.(Cáceres,1996; García, 1992).

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 UTILIZACIÓN DE LAS PLANTAS EN EL CAMPO MEDICINAL.

Los organismos vegetales son, por excelencia, fuente de producción de medicamentos usados a nivel global para combatir un multiples afecciones (Curtis y Barnes 1995; Hexaing 2002). Este hecho no ha pasado desapercibido por innumerables investigadores que dedican sus esfuerzos a explorar la utilidad de sustancias de origen vegetal en el área de la salud (Chereonthiphakorn et al 2002; Hexaing 2002; Kobaysy et al. 2002; Senado de la Republica de Colombia 1989; Wittsuwaanakul et al. 2002)

Los productos naturales son una fuente importante de sustancias químicas con propiedades curativas, por lo tanto, el estudio fitoquímico y la actividad biológica de especies vegetales constituye un aporte valioso en la búsqueda de nuevos principios activos, y también representa un avance importante en el desarrollo del país, puesto que a nivel mundial, Colombia es uno de los países más ricos en cuanto a recursos naturales se refiere (Rincón et al. 2002).

De las plantas que se encuentran ampliamente distribuidas en el planeta, 30 mil especies de las mismas se consideran medicinales, y se estima que

menos del 10% han sido estudiadas exhaustivamente (<http://www.plantasmedicinales.org/etno6.htm>,2004; López et al. 1997). Colombia es el segundo país megadiverso del mundo y además cuenta con profundas tradiciones etnomédicas, específicamente en lo relacionado con el uso de plantas para curar enfermedades (Cardona et al. 2005).

Hoy día el uso de plantas medicinales se ha extendido por todas las culturas alrededor del mundo y es frecuente observar como en pueblos y ciudades se ha reemplazado el uso de drogas sintéticas por aquellas preparadas a base de extractos vegetales, los cuales demuestran ser efectivos, tanto o más que las primeras (Cardona et al. 2005).

Esta biodiversidad representa una alternativa farmacológica, pero también es fuente de materiales valiosos para la industria farmoquímica, alimenticia y cosmética; por razones políticas y sociales, en las dos últimas décadas, estas industrias han estado alejadas de estas fuentes de sustancias bioactivas, pero recientemente se ha renovado el interés en ellas (Cardona et al. 2005).

La mayoría de los compuestos vegetales con actividad biológica, provienen de los denominados metabolitos secundarios, y más correctamente, productos del metabolismo especial de las plantas, estas sustancias actúan como respuestas defensivas a patógenos y predadores, a través de

mecanismos cuyos detalles en muchos casos todavía se desconocen. Son muchas las familias de plantas que poseen especies con diversas actividades biológicas (purgativas, repelentes, insecticidas, antifúngicas, hemostáticas, entre otras) (García, 1992).

2.2 FAMILIA ASCLEPIADACEAE.

Las *Asclepiadaceae* son un grupo de hierbas perennes, arbustos, lianas, ocasionalmente árboles y algunas de las cuales son suculentas parecidas a cactus con hojas reducidas tienen savia blanca; comprendiendo cerca de 250 géneros y 2900 especies. (<http://www.arbolesornamentales.com/asclepiadaceae.htm>, 2006).

El género *Asclepias* se ubica principalmente en áreas tropicales y subtropicales, especialmente en Suramérica. Hay algunos representantes de esta familia dentro de la flora macaronésica de las islas canarias (Valente, 1996).

En Colombia, la familia *Asclepiadaceae* se encuentra en la región del Choco de la que se han reportado los siguientes géneros. *Asclepias*, *Blenpharodon*, *Crystostegia*, *Cynanchum*, *Gonolobus*, *Macroscepis*, *Marsdenia*, *Sarcostemma*, *Stenomeria* y *Tassaí.*, *Asclepias curassavica* en la región de Urabá, *Blenpharodon mucronatum*, *Cynanchum montevidense*,

Gonolobus dentioculatus, *Macroscepis trianae*, *Marsdeni rotheana*, *Stenomeria pentalepis*, *Gonolobus Albomarginatus*, en la Selva Pluvial Central, *Crystostegia madagascariensis* y Selva Húmeda del Norte, *Gonolobus Albomarginatus*, *Stenomeria pentalepis* en la Región de San José del Palmar y en la Región de la Costa del Pacífico, *Gonolobus ericladon*, *Sarcostemma clausum* (Forero y Gentry, 1989; Valente, 1996; <http://www.arbolesornamentales.com/asclepiadaceae.htm>, 2006; <http://www.hortiplex.com/>, 2004)

Las hojas son simples y casi siempre actinomorfas y normalmente incluye una elaborada corona de apéndices nectarios entre la corona y las partes sexuales. El cáliz consta de cinco sépalos distintos que nacen de la misma base. El periantio inferior es una corona dialipétala de cinco lobulados. El androceo y gineceo están casi siempre adosados dentro de una genoteca, con cinco estambres muy modificados y un gran estigma con cinco lóbulos. Las anteras normalmente producen un par de sacos de polen llamados Polinia que son transferidos como una unidad durante la polinización (<http://www.hortiplex.com/>, 2004).

El gineceo consiste en un solo pistilo compuesto de dos carpelos casi distintos que están separados a nivel de los ovarios, y estilos que están unidos solamente por un gran y único estigma. Los ovarios son distintos casi siempre súpero y cada uno tiene un solo lóbulo con numerosos óvulos

marginales. El fruto es un folículo. Las semillas tienen un penacho de pelos en un extremo que les sirve para su diseminación. El látex de muchas especies de la familia *Asclepiadaceae*, es venenoso (<http://www.hortiplex.com/>,2004).

Algunos géneros de esta familia son: *Cynanchum*, *Asclepias*, *Gonolobus*, *Matelea*, *Hoya*, *Jacaima*, *Frerea*, *Microsoma*, *Metastelma*, *Duvalia* (<http://www.hortiplex.com/>, 2004).

2.3 FITOQUÍMICA DE LA FAMILIA ASCLEPIADACEAE

Son muchas las especies del género *Asclepias* utilizadas en Colombia con fines medicinales pero del género *Matelea* no se encuentra reportada ninguna hasta el momento; no se han realizado investigaciones químicas ni farmacológicas de esta importante especie.

Un tipo de compuesto que contiene esta familia son los cardenólidos o glucósidos cardíacos que son un grupo de triterpenoides. A éstos, pertenece el glucósido cardíaco oleandrina, que se encuentra en muchas *Asclepias*. Se caracterizan por que son tóxicos y muchos de ellos tienen actividad farmacológica de tipo cardiaca (Cáceres, 1996).

En las especies *Asclepias curassavica* se ha reportado el glucósido asclepiadina, descubierto por Harnack (Caceres, 1996) Este producto detiene la respiración y produce una verdadera disnea. Cuando se le hace hervir con los ácidos o se abandona el contacto con el aire se descompone en azúcar y sustancias insolubles en agua (Cáceres, 1996).

También se ha reportado en esta especie β -sitoesterol, saponinas (asclepina, curassavina), glicósidos (3.75%), cardenólidos y esteroides (calotropina); las hojas contienen glucósidos (asclepiadina), quercetina, campferol y ácido caféico. La raíz contiene agliconas cardenólidas y vincetoxinas. Las hojas, flores y tallo contienen alcaloides. Según Belle (Caceres, 1996) contiene un glicósido, la asclepiadina, asclepina, glicósido amorfo, esclepoina, aceite volátil de composición desconocida y pepsina (Cáceres, 1996; García, 1992).

En la especie *Gonolobus cundurango* Soler y Batlle (1951) dicen que la corteza del tallo tiene como principio activo: Condurangina α y Condurangina β (glucósido), ácido tánico y resina.

Anderson Hery dice que Marlon (Caceres, 1996) encontró el alcaloide nicotina en *Asclepias sirica*. En la *Asclepias gigantea*, Soler y Batlle (1951) indican que la corteza de las raíces contienen la mudarían, el látex llamado gutapercha; según Wehmer, posee ácido isovaleriánico, fitosterina y ukundarina (Caceres, 1996)

2.4 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino: Vegetal

División: Angiosperma

Clase: Dicotiledónea

Subclase: Asteridae – simpétala

Orden: Gentianales

Familia: Asclepiadaceae

Género: *Matelea*

Especie: *Matelea marítima* (Jacq.) Woods.

Voucher No. : COL 479027

Reidentificada por: Sistemático botánico Edgar Linares Herbario Nacional Colombiano. En septiembre del 2002.

Sinonimia: *Ibatia marítima*, *Asclepias marítima*, *Cynanchus marítima*, *Gonolobus suberosus*.

2.5 GENERALIDADES DE *Matelea marítima*.

2.5.1 Botánica

Bejuco trepador, perteneciente a la familia *Asclepiadaceae*. En la sabana de Sucre se le conoce como bejuco de sapo o bejuco de leche. Estos nombres son dados por los campesinos de la zona por la cantidad de látex que brota

de él al henderse un trozo de tallo de la planta. Otros nombres comunes o vernáculos con que se le conoce son:

Guanahanita, hierba escasa, lengua de vaca. Su nombre francés corresponde a apocin á fruit herisse, y en inglés obedece al nombre de beach milk vine (<http://www.hortiplex.com/>, 2004).

El bejuco de *Mateíea* tiene un tallo leñoso y acanalado en estado adulto y con pelos y de textura suave cuando aún es joven. Posee hojas caducifólias de forma acorazonada, con pelos, carnosas, de unos 10cm de longitud aproximadamente. El fruto tiene una forma bastante irregular, presenta perturbaciones que terminan en punta roma, tiene un color marrón oscuro en estado adulto y presenta semillas anemófilas.



Figura 1A. Fruto *Mateíea maritima* 1B. Tallo de *Mateíea maritima*

2.5.2 PROPIEDADES MEDICINALES ATRIBUIDAS

Al igual que muchas familias de plantas, las Asclepiadáceas, a la cual pertenece nuestra planta de interés, contiene sustancias que de alguna manera ayudan a combatir dolencias y afecciones que se presentan en los humanos.

Aún no se ha reportado un estudio de ningún tipo, el cual brinde información sobre los usos medicinales que pueda tener esta especie. No obstante, a especies de este mismo género, como es *Asclepias curassavica*, se le atribuyen propiedades antihelmínticas y analgésicas. Además es usada en enfermedades de la piel y de transmisión sexual. La infusión o decocción de la planta se usa generalmente para tratar cefalea, estreñimiento, fiebre, infección intestinal, gonorrea, leucorrea, parásitos y cáncer (Cáceres, 1996; García, 1992).

La decocción de raíz y tallo se usa para tratar asma y enfermedades de transmisión sexual (leucocorrea, gonorrea y sífilis). El jugo de hoja se usa contra disentería, hemorragias y parásitos, el polvo de la raíz se usa para tratar úlceras crónicas, el látex se utiliza como antimalárico, el tallo en asma y nervios, la decocción de hojas secas o el jugo de hojas frescas se aplica en verrugas, cáncer y afecciones dérmicas, la cataplasma se usa para tinia (Cáceres, 1996; García, 1992). Además se ha reportado por Cáceres (1996) que el extracto etanólico del fruto seco de esta planta, presenta actividad

antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*; y que el látex demostró tener propiedades bactericidas y contra *C. albicans*; lo que nos mueve enormemente a incursionar los primeros estudios sobre *Matelea maritima* con este tipo de actividad biológica, pues, es un género perteneciente a la misma familia.

El látex se aplica para desintegrar los dientes cariados; en las fosas nasales para provocar estornudos y aliviar la congestión, en la piel en heridas, mordeduras de perro y callosidades. La planta completa en polvo se usa para tumores abdominales, la cataplasma de flores para el dolor de cabeza, se inhalan los vapores de hojas para la sinusitis (Cáceres, 1996; García, 1992).

A la raíz se le atribuye propiedades, anodina, astringente, eméticas, febrífuga, hemostática, purgante, tónica y vermífuga. La raíz es depurativa y astringente, el látex es vermífugo (Cáceres, 1996).

Asclepias gigantea, es usada como hemético, purgante, expectorante, tónico y diaforético, *Asclepias procera*, se le atribuyen efectos hemetocatárticos; el látex de esta planta es usada como queratolítico (García, 1992).

La especie *Matelea maritima* en las zonas de la sabanas de Sucre - Colombia es utilizada tradicionalmente para eliminar verrugas y combatir otras lesiones de la piel mediante la cocción de las hojas y el tallo.

2.5.3 Química del género *Matelea*

La química de este género era desconocida hasta iniciar esta investigación siendo esta una de la razones que nos motivo a llevar a cabo este estudio, ya que todo lo reportado será un valioso aporte para el inicio de la quimiotaxonomía de este género.

2.6 METODOS FITOQUIMICOS

La Fitoquímica es la disciplina que permite abordar el estudio de las sustancias de origen vegetal con acierto, empleando técnicas de aislamiento, purificación e identificación de metabolitos para cumplir su objetivo (Valencia, 1995; Wilson 2000). Con ésto, es posible iniciar la investigación de ciertas especies con interés particular.

En los estudios fitoquímicos, se hace generalmente necesario realizarle al material vegetal, procesos consecutivos de extracción y separación con solventes orgánicos de diferentes polaridades, a fin de obtener las fracciones de metabolitos secundarios estructuralmente semejantes y poder caracterizarlos por sus comportamientos químicos frente a diferentes reacciones características para cada núcleo básico.

2.6.1 Métodos de Extracción

La extracción de los principios activos de las plantas medicinales se obtienen por la penetración del disolvente en los tejidos vegetales e hinchazón, disolución y difusión de sustancias extraíbles disueltas fuera de la célula vegetal. (Mercado y Vargas 2003).

Son diferentes los métodos utilizados para la extracción de sustancias de interés fitoquímico, entre los cuales tenemos:

2.6.1.1 Infusión. Consiste en dejar la droga en contacto con agua fría o caliente por poco tiempo (Valencia, 1995).

2.6.1.2 Decocción. Cuando la droga se hierve con agua (Valencia, 1995).

2.6.1.3 Maceración. Es una infusión prolongada, a menudo, en alcohol acuoso (Valencia, 1995).

2.6.1.4 Percolación. Es una maceración seguida por la adición de disolvente fresco para reemplazar el disolvente que se ha dejado pasar a través de la droga en polvo (Valencia, 1995).

2.6.1.5 Extracción continua. Es una infusión repetida con disolvente caliente.

Este método usado tanto en el laboratorio como en la industria se lleva a cabo con un extractor Soxhlet, en el que el disolvente que está en un matraz, se calienta hasta su temperatura de ebullición, los vapores condensados en

el refrigerante, caen sobre la muestra que está en un dedal; cuando el líquido de la cámara de extracción alcanza la parte superior del sifón, fluye hacia el matraz que contiene el disolvente; en esta forma, la muestra vegetal se extrae repetidamente, y los compuestos solubles en el disolvente quedan en el matraz (Valencia, 1995).



Figura 2. Extractor Soxhlet.

2.6.1.6 Precipitación disolvente - disolvente. En este procedimiento, el extracto se disuelve en un disolvente adecuado y se mezcla con un disolvente miscible menos polar con lo que se produce la precipitación selectiva de los constituyentes menos solubles de la planta ((Valencia, 1995).

2.6.1.7 Extracción líquido-líquido. Aquí se utilizan disolventes no miscibles, y consiste en la separación de las moléculas de soluto entre las fases producidas. La cantidad de disolvente en cada fase dependerá, sobre todo, de la solubilidad relativa en cada disolvente, la que a su vez está relacionada con la polaridad (Valencia, 1995).

Coeficiente de distribución o de reparto.

Aquellas sustancias que tengan solubilidad parcial en dos solventes no miscibles, tendrán concentraciones en ambos cuando ocurra la agitación. La relación entre las concentraciones C_o y C_a (C_o : Concentración en el solvente orgánico; C_a : Concentración en el agua) es directamente proporcional a las solubilidades respectivas, S_o y S_a , y cuando se alcanza el estado de equilibrio, a una determinada temperatura se conoce como coeficiente de distribución o de reparto K_d .

$$K_d = C_o/C_a = S_o/S_a$$

Es lógico que el solvente extractor debe disolver en mayor proporción las sustancias que se desean extraer, de otra manera, el rendimiento no justificará el proceso.(Aubad y López 2002).

Para aumentar o disminuir la solubilidad de una sustancia en una fase, se pueden añadir distintos productos. La solubilidad de un producto en una fase puede aumentarse con la adición de un reactivo que sea capaz de formar un complejo. Estos complejos pueden ser posteriormente degradados y el producto deseado, recuperado.

La solubilidad puede disminuirse en especial en fases acuosas por la adición de sales neutras que reducen la solubilidad de las sustancias. Siendo el cloruro sódico, la sustancia más usada. (Pasto y Johnson 1981).

2.7 FRACCIONAMIENTO POR COLUMNA FLASH.

En este sistema, en una columna de vidrio, empaquetada con sílica-gel, una muestra es sembrada por vía seca, la cual se trata con disolventes de polaridad creciente (cloroformo, metil-etil cetona, metanol y etanol) para obtener las respectivas fracciones (Arrieta y Villalba. 2005)



Figura 3. Columna Flash.

2.8 BACTERIAS



Figura 4. Morfología de Algunas Bacterias.

Las bacterias son seres generalmente unicelulares que pertenecen al grupo de los protistos inferiores. Son células de tamaño variable cuyo límite inferior está en los $0.2\ \mu\text{m}$ y el superior en los $50\ \mu\text{m}$; sus dimensiones promedio oscilan entre los 0.5 y $1\ \mu\text{m}$. Las bacterias tienen una estructura menos compleja que la de las células de los organismos superiores. Igualmente, son muy diferentes a los virus, que no pueden desarrollarse más dentro de las células y que solo contienen un ácido nucleico. (<http://www.plantasmedicinales.org/etno6.htm>, 2004).

Las células bacterianas son un sistema químico complejo, capaz de llevar a cabo funciones tales como: autoalimentación, autoduplicación, diferenciación, señalamiento químico y evolución. Estas células son capaces de vivir aisladamente en la naturaleza, tanto en células de la misma especie o de especie diferente, también se pueden agrupar en conglomerados formando colonias (Pumarola, 1992).

Muchas bacterias suelen ser inocuas, pero otra cantidad llegan a ser patógenas para el hombre, llegando a tener una fuerte capacidad de infección, dañando así los tejidos hospedadores.

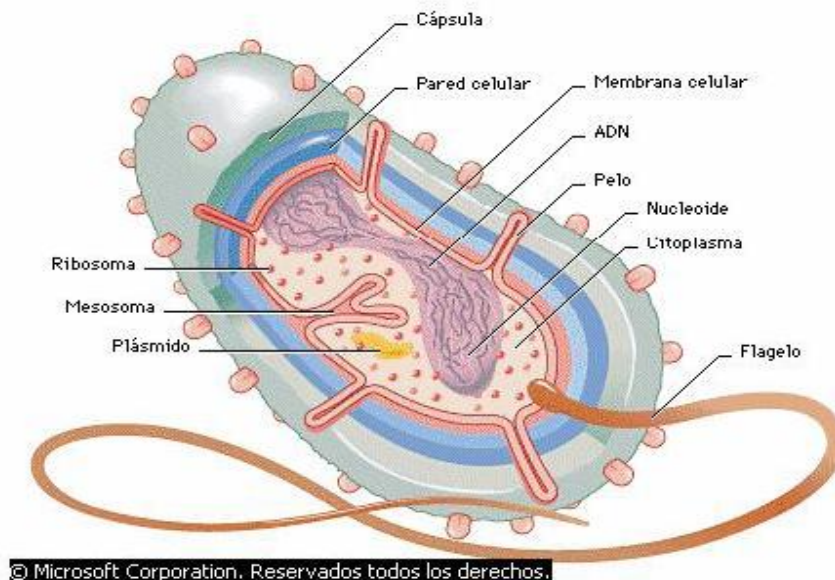


Figura 5. Estructura de una Bacteria Simple.

2.8.1 Estructura De La Pared Bacteriana

La pared que poseen la mayoría de las bacterias explica la constancia de su forma. En efecto, es rígida, dúctil y elástica. Estas propiedades se deben a la naturaleza química de su componente principal, el peptidoglicano, el cual consta a su vez de cadenas de acetilglucosamina y ácido murámico, sobre las que se fijan tetrapéptidos de composición variable. Dichas cadenas se unen a través de puentes peptídicos. Además existen constituyentes propios de las diferentes especies (Pumarola, 1992; <http://www.lafacu.com/apuntes/biologia/bacterias/default.htm>, 2005; <http://www.microbiología.com.ar/antimicrobiano/general.php>, 2006).

Debido a la cantidad de peptidoglicanos constituyentes de la pared celular de las bacterias, se clasifican en dos grupos: Grampositivas y Gramnegativas. Las primeras presentan una membrana interna rodeada por una gruesa capa de peptidoglicano. La pared celular contiene otras sustancias como ácidos teicoicos y ácidos lipoteicoicos de función estructural. Esa gran dimensión del grosor de la pared celular hace que este grupo bacteriano pueda retener el complejo yodo - cristal violeta usado para la tinción de Gram, el cual es de color púrpura, utilizado para identificar al tipo bacteriano debido a la gran cantidad de entrecruzamientos peptídicos. (<http://www.lafacu.com/apuntes/biologia/bacterias/default.htm>, 2005; Pumarola, 1992).

Las bacterias Gramnegativas, poseen, a diferencia de las anteriores una pared celular muy delgada, la cual no retiene la tinción de Gram al ser lavadas con etanol, por lo que adquieren un color rosado. Estas diferencias se observan en la figura 6.

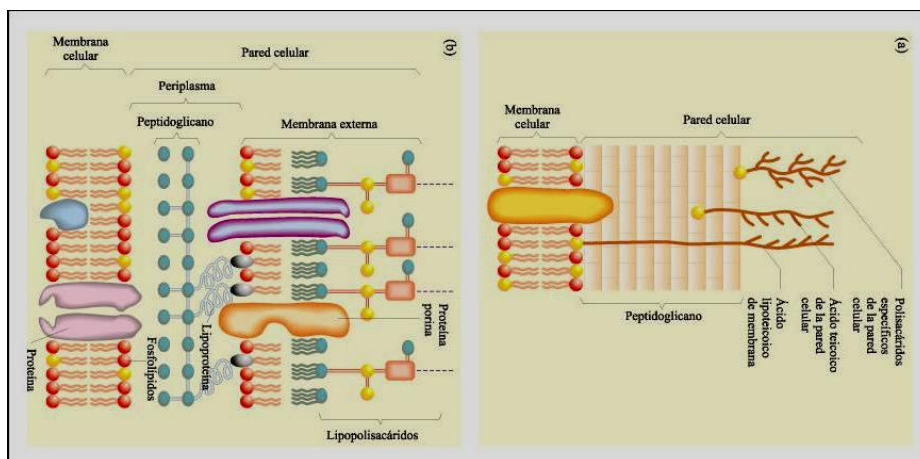


Figura 6. Estructura de la Pared Bacteriana.

2.8.2 Especies Bacterianas

2.8.2.1 *Staphylococcus aureus*: (*S.aureus*) figura 7. Es una bacteria esférica (coco), de 1 μm de diámetro que al ser examinada al microscopio aparece agrupada en conjuntos de dos (pares), en cadenas cortas o en grupos en forma de racimos de uva. Estos organismos Grampositivos crecen generalmente a 37 °C y son capaces de producir una toxina proteica muy estable al calor que causa enfermedades en los humanos.

Los estafilococos existen en el aire, polvo, alcantarillas, agua, alimentos, leche y los equipos para su procesamiento, las superficies, los humanos y los animales. Estos dos últimos son los principales reservorios de estos microorganismos, además se encuentran presentes en las fosas nasales, la garganta, cabello y la piel de más del 50% de los individuos saludables. Esta incidencia es aún mayor en quienes están relacionados o entran en contacto con los individuos enfermos y con ambientes hospitalarios (<http://www.cfsan.fda.gov/co/~mow/intro.htm>, 2004).

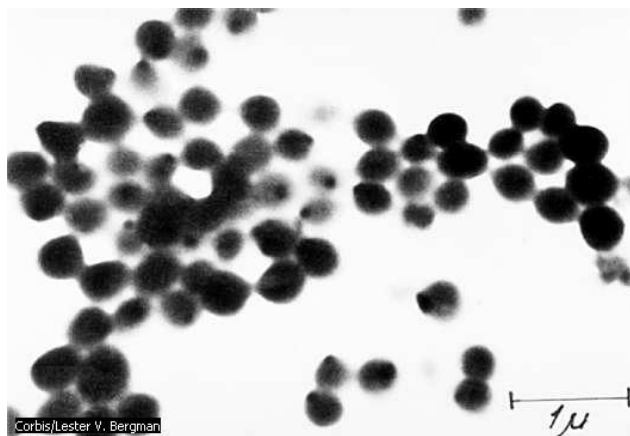


Figura 7. Fotografía de *S. Aureus*

2.8.2.2 *Escherichia coli*. (*E.coli*) figura 8. Bacilo Gramnegativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*, no es formador de esporas, está presente en el ambiente, así como en el intestino de los animales y el hombre (Encarta ®, 2006).

Se considera un miembro fundamental de la flora facultativa normal del intestino y juega un papel importante en el mantenimiento de su fisiología, sin embargo existen cepas patógenas capaces de producir infecciones intestinales; está considerada como el material biológico más utilizado en experimentación (Mercado y Vargas 2003).

La especie comprende varios grupos que se establecen según su actividad. Las *E. coli* oportunistas producen infecciones sólo si abandonan el colon. Otros grupos producen hasta el 90% de las diarreas infantiles y la denominada diarrea del viajero. Esta última no es grave, pero la gastroenteritis aguda en los niños puede provocar la inflamación de la mucosa intestinal, dando lugar a deshidratación grave y heces purulentas (<http://www.lafacu.com/apuntes/biologia/bacterias/default.htm>, 2005).

La *E.coli* es un organismo adecuado para la investigación por su crecimiento rápido y porque su cultivo es sencillo. Ha facilitado descubrimientos muy

importantes sobre metabolismo, reproducción celular e ingeniería genética (Encarta ®, 2006).



Figura 8. *Escherichia coli*.

2.8.2.3 Método de Difusión en Placa.

Se basa en la difusión de una solución a ensayar a través de una capa de agar que ha sido inoculada con un microorganismo sensible a la muestra. Se colocan cantidades medidas de la sustancia a ensayar en placas con medios de cultivo sólido inoculado, las placas se incuban para permitir el desarrollo del microorganismo. La respuesta obtenida es una zona clara (halo) de inhibición del crecimiento del microorganismo. La base cuantitativa del ensayo, es la relación entre el diámetro de la zona de inhibición y el diámetro del control estándar. Este procedimiento se ha establecido principalmente para probar patógenos bacterianos de crecimiento rápido y previsibles si se prueba en condiciones de estandarización (Márquez et al. 1990).

2.9 ANTIBACTERIANOS.

Pueden definirse como sustancias químicas de origen natural o por síntesis que a bajas concentraciones pueden inhibir el crecimiento de las bacterias (Mercado y Vargas, 2003). Los antibióticos naturales se diferencian de los antibióticos sintéticos, en las siguientes características: (<http://www.plantasmedicinales.org/etno6.htm>, 2005).

- No tienen efectos secundarios: en general, por ejemplo no producen reacciones alérgicas o sensibilidad en el estómago.
- Son capaces de respetar los microorganismos beneficiosos para el organismo, por ejemplo, aquellos que son necesarios en la flora intestinal.
- No resultan peligrosos por acumulación.
- Son económicos y fáciles de conseguir.

Desde el punto de vista práctico existen distintos tipos de antimicrobianos:

2.9.1 Desinfectantes: solo se aplican a sistemas inanimados y eliminan la carga microbiana total.

2.9.2 Sanitizantes: solo se aplican a sistemas inanimados y disminuyen la carga microbiana total.

2.9.3 Antisépticos: reducen y controlan la presencia de microorganismos potencialmente patógenos, solo se pueden aplicar externamente en seres vivos (piel y/o mucosas).

2.9.4 Antimicrobianos De Uso Sistémico: reducen y controlan la presencia de microorganismos que han invadido los tejidos. Actúan en el organismo, pudiendo ser ingeridos, absorbidos por piel y/o inyectados.

Los agentes antimicrobianos de uso sistémico se pueden clasificar según su origen, efecto antimicrobiano, espectro de actividad y mecanismo de acción.

2.9.5 Origen

2.9.5.1 Naturales: se obtienen a partir de microorganismos (hongos, bacterias, plantas y otros).

2.9.5.2 Sintéticos: se obtienen totalmente por síntesis química.

2.9.5.3 Semisintéticos: se obtienen por modificaciones químicas de antimicrobianos naturales, con el fin de mejorarlos.

2.9.6 Efecto

2.9.6.1 Bacteriostáticos: la máxima concentración no tóxica que se alcanza en suero y tejidos impide el desarrollo y multiplicación de los microorganismos, sin destruirlos, pudiendo, éstos multiplicarse nuevamente al desaparecer el agente antimicrobiano. Sirven para complementar los mecanismos defensivos del huésped.

2.9.6.2 Bactericidas: su acción es letal sobre los microorganismos, por lo que éstos pierden irreversiblemente su viabilidad o son lisados.

2.9.7 Espectro de actividad

2.9.7.1 Amplio: actúan sobre un gran número de especies microbianas, (ejemplo tetraciclina).

2.9.7.2 Intermedio: actúan sobre un número limitado de microorganismos (ejemplo los macrólidos).

2.9.7.3 Reducido: actúan sobre un número pequeño de especies microbianas (ejemplo polimixinas).

2.9.8 Mecanismos de Acción:

Inhibición de la síntesis de la pared celular.

Alteración de la permeabilidad celular.

Inhibición de la síntesis proteica.

Inhibición de la síntesis de ARN y ADN.

(<http://www.microbiología.com.ar/antimicrobiano/general.php>7, 2006)

2.9.9 Vancomicina: Es activa contra bacterias Gram positivas, está indicada en la infección por *S. aureus* meticilino-resistente y contra *Staphylococcus epidermidis*, algunos enterococcus. Inhibe la síntesis del mucopéptido de la pared celular (Todas las Medicinas, 2001). Este antibiótico, al igual que los betalactámicos, deben penetrar la membrana citoplasmática y desde ahí impide que se de el primer paso de la síntesis de la pared celular que consiste en la formación de los precursores de peptidoglucano; evitando de esta manera la constitución de la pared celular bacteriana (Pumarola 1992).

2.9.9.1 Presentación: vancomicina HCl: en frasco vial 500 mg y de 1 g, polvo liofilizado. Vancomicina CP; vial de 500 mg, polvo liofilizado (Todas las Medicinas, 2001).

2.9.9.2 Dosis: adultos, 1 g cada 12 horas I.V.; niños, menores de un mes, 15 mg/Kg/I.V. cada 8 horas; niños mayores de un mes 40 mg/Kg/día divididos cada 6 horas (González et al. 2002; Todas las Medicinas, 2001).

3. METODOLOGIA

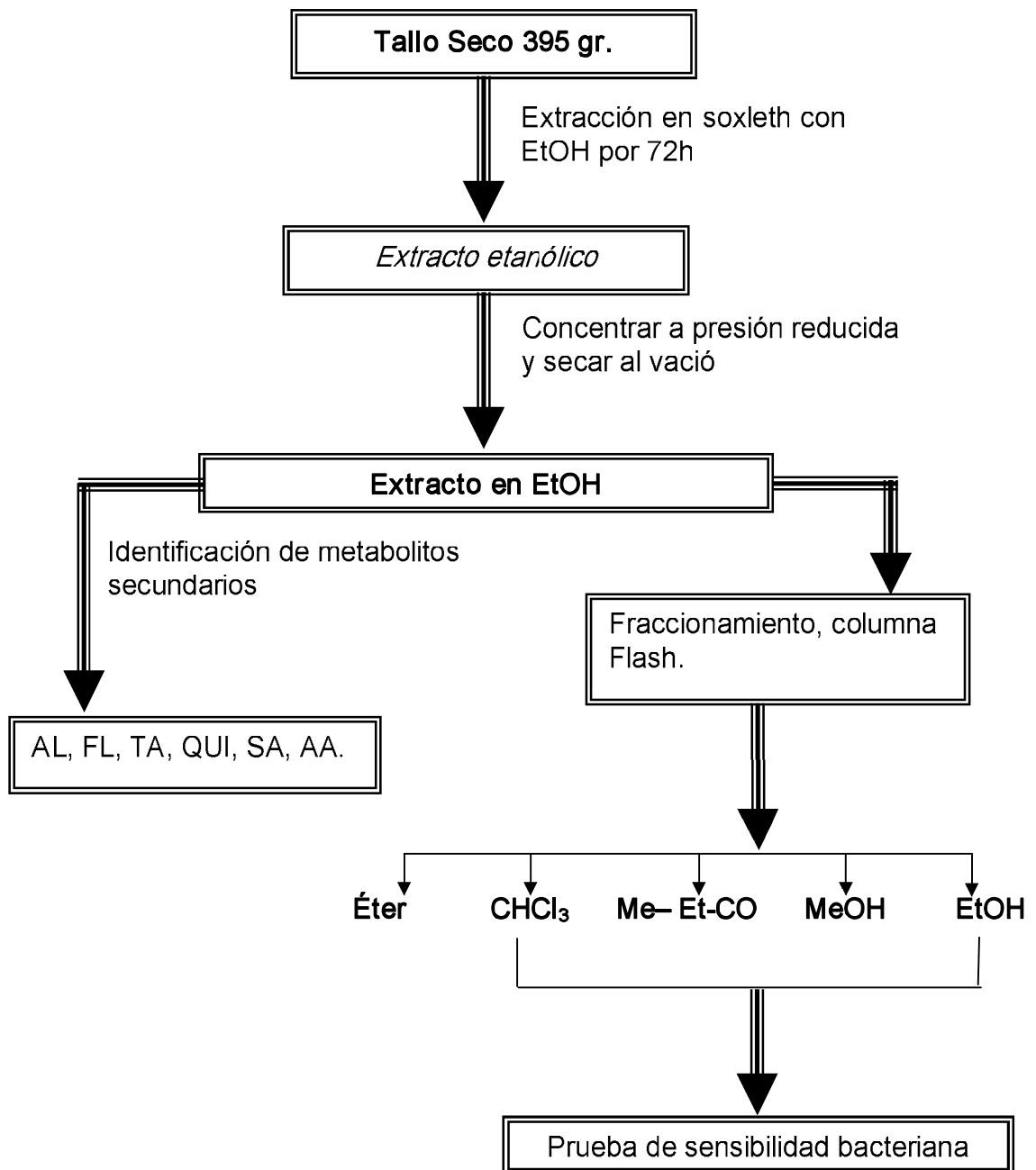


Figura 9. Metodología General

3.1 TIPO DE METODOLOGIA.

Esta investigación, es de tipo experimental y tiene como meta, determinar la actividad antibacteriana que podría tener el extracto total en etanol y fracciones en cloroformo, metiletilcetona y metanol del tallo seco de *Mateleia maritima* frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922, mediante los métodos de análisis de difusión en placa y dilución en los cuales se evidencia la presencia de halos de inhibición y/o turbidez por crecimiento. Utilizando como control positivo el antibiótico de amplio espectro vancomicina.

3.2 RECOLECCION Y TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

La recolección del material vegetal se realizó en el mes de mayo del año 2004 en la zona rural del municipio de Sincelejo (Sucre), Lat N. 8° 56'; Long. 0.75° 2', a 25 m.s.n.m. (Senado de la Republica de Colombia, 1989). Se recolectó tallos frescos de *Mateleia maritima* en óptimas condiciones, secado a temperatura ambiente durante 15 días. El material vegetal seco fue sometido a molienda en un molino industrial.

Tres ejemplares completos y fértiles de *Mateleia maritima* fueron enviados en Septiembre del 2002 al Herbario Nacional Colombiano para su

reidentificación, la cual fue realizada por el Sistemático Botánico Edgar Linares. El ejemplar se encuentra con el Voucher COL No. 479027.

3.3 EXTRACCION POR SOXHLET.

El material vegetal (395 gramos) tallo seco a temperatura ambiente y molido de *Matelea maritima* se sometió a extracción en un extractor tipo soxleth con etanol al 98% durante 72 horas. El extracto obtenido se filtró y concentro a presión reducida en un rotavapor, obteniéndose 66,1 gramos de extracto seco. Del extracto total seco se tomaron 15 gramos para ser fraccionados por columna flash en fase normal.

3.4 COLUMNA FLASH.

Se utilizó una columna de vidrio con diámetro interno 6.0 cm y 90 cm de longitud, empaqueta por vía seca con 200 g de sílica-gel (60-200 Mesh) BAKER ANALYZED^R Reagent.

15 gramos del extracto total seco se re-disolvieron en 6 mL de etanol al 98%, a los que se adicionaron 26 gramos de sílica gel (60-200 Mesh) BAKER ANALYZED^R Reagent. Se homogenizó la sílica con el extracto líquido hasta saturar la mezcla. Esta se sembró en la columna previamente empaquetada y se procedió a fraccionar con solventes de polaridad creciente obteniéndose

cuatro fracciones designadas como 1*MmT* con éter de petróleo, 2*MmT* con cloroformo, 3*MmT* con metiletilcetona y 4*MmT* con metanol.

3.5 EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

3.5.1 PREPARACION DEL EXTRACTO.

Se trabajo con los extractos, clorofórmico, metiletilcetónico, metanólico y etanólico. Se preparo una solución stock de cada uno de los extractos con dimetilsulfoxido como vehículo y posteriores diluciones para obtener las concentraciones a aplicar (Sánchez et al. 1995).

Solución Stock:

Se pesó 1g de extracto más 20 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), obteniéndose 20mL de una dilución de concentración igual a 50 mg/mL.

Dilución (1) de 40mg/mL

Se tomaron 4mL de la solución stock más 1mL de DMSO, obteniéndose 5mL de una dilución de concentración igual a 40mg/mL.

Dilución (2) de 30mg/mL

Se tomaron 3mL de la solución stock más 2mL de DMSO, obteniéndose 5mL de una dilución de 30mg/mL

Dilución (3) de 20 mg/mL

Se tomaron 2mL de la solución stock más 3 mL de DMSO, obteniéndose 5mL de una dilución de 20mg/mL.

Dilución (4) de 10 mg/mL

Se tomaron 1mL de la solución stock más 4mL de DMSO, obteniéndose una dilución de 10mg/mL

Solución Stock vancomicina

Se pesaron 0,5 g del antibiótico más 10 mL de agua destilada estéril, obteniéndose 10mL de una dilución de concentración igual a 50 mg/mL.

Dilución vancomicina de 4 mg/mL

Se tomaron 0.4 mL de la solución stock más 4.6 mL de H₂O destilada estéril, obteniéndose 5mL de una dilución de 4mg/mL

Modo de aplicar

Se aplicaron 1mL (1000 µL) de la solución de 40mg/mL en un pozo de 6mm de diámetro actuando sobre las bacterias una concentración de 1,89 mg/caja.

Del control positivo se aplicaron 1000 µL de la dilución de 4mg/mL en un pozo de 6mm de diámetro actuando sobre la bacteria una concentración de 0.189 mg/caja.

Tabla 1. Preparación de Extracto y Controles

Extracto	Miligramos	mL DMSO	Concentración
Cloroformo	1000	20	50 mg/mL
Metil etil cetona	1000	20	50 mg/mL
Metanol	1000	20	50 mg/mL
Etanol	1000	20	50 mg/mL
Vancomicina	500	10*	50mg/mL

*

mL de H₂O destilada estéril

Tabla 2. Concentraciones de las diluciones de los Extractos

Diluciones	mg/mL	mg/mL	mg/mL	mg/mL
Cloroformo	40	30	20	10
Metil etil cetona	40	30	20	10
Metanol	40	30	20	10
Etanol	40	30	20	10
Vancomicina	4 mg/mL			

3.5.2 PRUEBA DE SENSIBILIDAD

Previamente a la realización de una actividad antibacterial de los extractos vegetales contra bacterias *S. aureus* y *E. coli*, se llevó a cabo la prueba de sensibilidad, en la cual las bacterias se ponen en contacto con las sustancias

a ensayar para determinar si son sensibles o no a estas, con el propósito de continuar con el antibiograma. Los extractos a ensayar se aplicaron a una concentración de 40mg/mL para determinar la sensibilidad de *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922 frente a éstos (Sanchez et al. 1995).

Preparación del Inóculo.

Este procedimiento se llevó a cabo por el método del cultivo líquido en tubo, (diluciones seriadas) usando para ello 5 mL de agar nutritivo tomados de las cajas nodriza de las bacterias. Se tomaron cinco colonias con un asa bacteriológica previamente esterilizada introduciéndola en tubos de ensayo diferentes para cada cepa, dejándolas durante seis horas a 35°C en incubadora. Tiempo después del cual se ajustó la turbidez del cultivo al tubo 0.5 de la escala nefelométrica de Mc Farland que equivale a 1×10^8 U.F.C./mL (Sanchez et al. 1995).

3.6 CONTROLES.

Se utilizó como control negativo el Dimetil Sulfóxido (DMSO) y como control positivo Vancomicina, a una concentración de 4 mg/mL. 10 veces menor a la utilizada en los extractos probados (Márquez, 1990).

3.7 ESPECIES BACTERIANAS

Las especies bacterianas utilizadas en la prueba de actividad antibacteriana se adquirieron en el centro de servicios de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana de Santafé de Bogotá D.C.

Staphylococcus aureus, ATCC 25923. *Escherichia coli*, ATCC 25922.

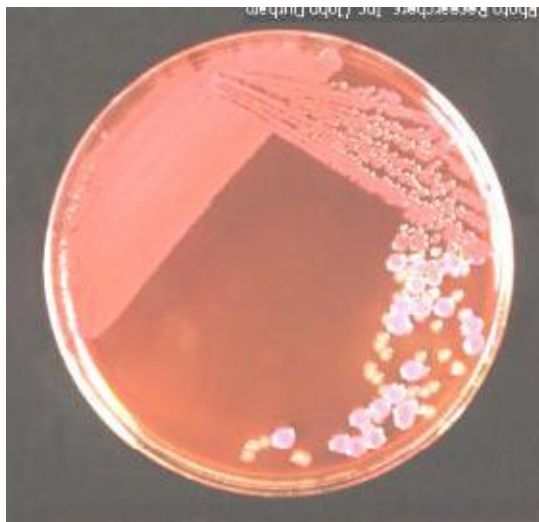


Figura 10. Cultivo Madre de Bacterias *E.coli*.

3.8 MEDIOS DE CULTIVO.

El medio de cultivo ideal para el crecimiento de bacterias patógenas es el Agar Müeller Hinton y se preparó disolviendo 17 g de Agar Müeller Hinton en un litro de agua destilada, Seguidamente se lleva aun autoclave para esterilizar a 15 Lb de presión y una temperatura de 121°C durante 20 minutos.

3.9 PREPARACION DE LAS CAJAS PETRI PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD

Se prepararon 18 cajas Petri con 20 mL de agar Müller Hinton cada una, se dejó enfriar en una plataforma nivelada, a 36°C, buscando uniformidad del gel y la no inactivación de las bacterias. Obteniendo falsos positivos.

Seguidamente, a nueve cajas se adiciona, 0.133 mL de suspensión bacteriana de *S.aureus* que equivale a 1×10^8 UFC/Caja y a las 9 restantes *E. coli* ATCC 25922; de igual manera se agrega 1 mL (equivalentes a 1.89 mg/caja) o 3 mL (equivalentes a 5.87 mg/caja) del extracto a ensayar a las respectivas cajas (un extracto en cada caja), de manera individual. En otra caja se adicionan 1 mL de Vancomicina (control positivo), y en otra caja se agrega 1 mL de DMS (control negativo). Las cajas se incubaron a 37°C por 24 horas observándose periódicamente cada cuatro horas.

Todos los tratamientos se realizaron por duplicado y los ensayos fueron realizados tres veces para obtener resultados de mayor confiabilidad (Márquez et al. 1990)

En la determinación de la sensibilidad de los microorganismos a los tratamientos se llevó a cabo el método de dilución directa. El que se describe a continuación :

Se utilizaron 12 cajas Petri en las cuales se adicionaron, por caja, 20 mL de agar Mueller-Hinton y 0.133 mL de suspensión bacteriana de *S. aureus* **ATCC 25923**. Se dejó solidificar y con ayuda de un sacabocado de 6 mm de diámetro se hace un orificio en el centro de la caja Petri, el cual fue sellado a nivel del fondo con una gota de agar. Seguidamente, con una pipeta, se adiciona 1 mL (1.9 mg/caja) ó 3 mL (5.187 mg/mL) de extracto vegetal de *M. maritima* en cada uno de los orificio de las cajas Petri de manera separada. De igual manera se realiza el control negativo DMSO (Márquez, 1990 ; Mercado y Vargas 2003).

En otra caja, se adiciona en el orificio 1 mL de vancomicina a una concentración de 4 mg/mL. Las cajas se incuban a 37 °C por 24 horas haciendo monitoreos cada cinco horas (García et al. 1986; Mercado y Vargas 2003).

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 RENDIMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

A partir del material vegetal de *Matelelea maritima* procesado (395 g), se obtuvo 66.1 g de extracto total en etanol que representa el 16.7% de rendimiento.

Se obtuvieron cuatro fracciones, (cloroformo, etanol, metiletil cetona y metanol), las cuales se utilizaron en las pruebas biológicas. (tabla 3).

Tabla 3. Rendimiento Del Material Vegetal

EXTRACTOS	GRAMOS OBTENIDOS	% RENDIMIENTO
Cloroformo	1.23	8.22
Etanol	6.11	40.73
Metil-etil cetona	0.48	3.20
Metanol	5.30	35.33

4.2 IDENTIFICACION CUALITATIVA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS.

Los ensayos de caracterización cualitativa realizados al extracto en etanol del tallo seco de *Matelelea maritima* mostraron metabolitos secundarios tipo alcaloides, leucoantocianinas, terpenos, compuestos fenólicos y aminoácidos, siendo éste el primer reporte de estudios realizados en *Matelelea*

marítima. La presencia de estos metabolitos confirma la quimiotaxonomía de la familia *Asclepiadaceae* (Cáceres, 1996). (tabla 4).

Tabla 4. Identificación Cualitativa De Metabolitos Secundarios.

Metabolitos Secundarios	Reactivos/ Pruebas	Características Reacción positiva	Resultado Final
Flavonoides	Limaduras Mg – HCl concentrado	Coloraciones rojo, naranja, rosado o violeta	-
Leucoantocianinas	HCl	Coloración roja	+
Saponinas	Agitación vigorosa	Formación de espuma abundante	-
Taninos	Gelatina-sal, Cloruro férrico 10%	Precipitado azul, verde o negro	-
Terpenos	Anhídrido acético, ácido sulfúrico	Coloración azul, violeta, roja o verde	+
Quinonas	NaOH(5%)-Amoniaco(2%)	Coloración capa acuosa de rosada a rojo intenso.	-
Alcaloides	Wagner	Turbidez o precipitado, por lo menos en 3 tubos	+
	Dragendorff		+
	Meyer		+
	Ac. Fosfotungs.		+
	Hager		-
Aminoácidos	Ninhidrina	Color violeta	+
Compuestos Fenólicos	FeCl ₃ al 1%	Color verde oscuro	+

Tabla 5. Prueba de Alcaloides

Pruebas realizadas	Extracción por Soxleht
Wagner	+++
Hager	-
Dragendorf	+
Mayer	+++
Ácido fosfotungstico	+++

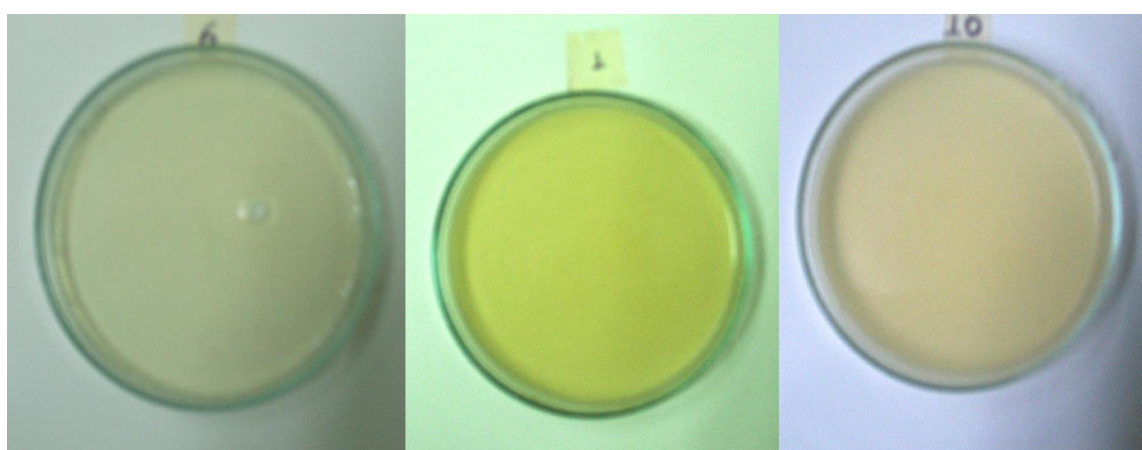
Resultados. (+++) Abundante, (++) menos abundante, (+) poco abundante (-) sin precipitado (Martínez ,1991)

4.3 EVALUACION DE LA PRUEBA ANTIBACTERIAL.

Los resultados de la prueba de sensibilidad realizada a los extractos clorofórmico, etanólico, metiletil cetónico y metanólico del tallo seco de *Matelea maritima* se observan en la tabla 6, según los cuales ninguna de las fracciones ensayadas en las concentraciones determinadas mostraron inhibición bacteriana contra *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 y *Escherichia coli* cepa ATCC 25922 en las condiciones utilizadas. No se presentaron halos de inhibición en los cultivos al compararlos con el control positivo vancomicina, donde se observó un halo de inhibición bien diferenciado.

Tabla 6. Resultados Prueba de sensibilidad.

Bacterias	Extracto en EtOH	Extracto en MeEt-cetona	CHCl ₃	MeOH	Control (+)	DMSO
<i>S.aureus</i> . ATCC 25923	-	-	-	-	+	-
<i>E.coli</i> .ATCC 25923	-	-	-	-	+	-



Vancomicina 0,189 mg/caja Acetona 1.89 mg/caja Acetona 5.187 mg/caja

Figura 11. Resultados Prueba Sensibilidad Contra *E. coli* ATCC 5922.



Vancomicina 0,189 mg/caja Cloroformo 5.187 mg/caja Cloroformo 1.89 mg/caja

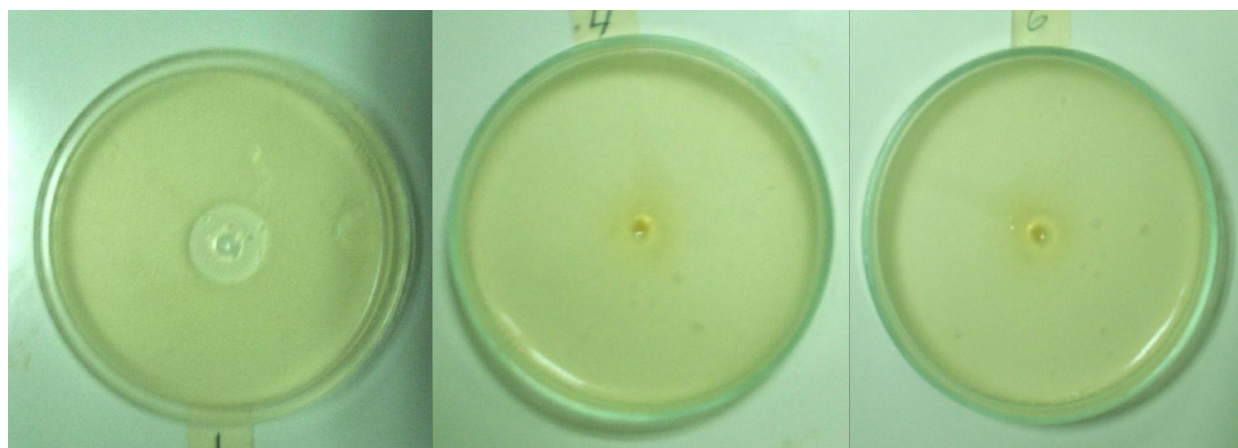
Figura 12. Resultados Prueba Sensibilidad Contra *S. aureus* ATCC 25923.

La prueba de sensibilidad alterna mostró el crecimiento de la cepa bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en las cajas Petri que contenían los extractos vegetales de *Matelea maritima* (cloroformo, metil-etil cetona, metanol y etanol) en las concentraciones 1.9 mg/caja ó 5.187 mg/caja se evidenció crecimiento bacteriano, lo que indica ausencia de inhibición, por lo cual los extractos vegetales utilizados no mostraron inhibición antibacterial en las condiciones ensayadas contra las cepas bacterianas mencionadas.

Lo anterior también se observó en las cajas que contenían el control negativo, las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 crecían normalmente. Lo que contrasta con las cajas que contenían el control positivo vancomicina a 4mg/mL, en la que sí era notable una transparencia en el medio de cultivo, lo que indica señal de inhibición de crecimiento de la bacteria *S. aureus* ATCC 25923.

Tabla No 7. Resultados Prueba De Sensibilidad Alterna.

Bacterias	Extracto en EtOH	Extracto en MeEt-cetona	CHCl ₃	MeOH	Control (+)	DMSO
<i>S. aureus</i> . ATCC 25923	-	-	-	-	+	-



Vancomicina 4 mg/caja

Metanol 5.187 mg/caja

Metanol 1.9 mg/caja

Figura 13. Resultados Prueba Sensibilidad Contra *S. aureus* ATCC 25923.

Los metabolitos secundarios tipo flavonoides, saponinas, quinonas, son importantes en el efecto antibacteriano de los extractos de plantas. Estos actúan penetrando la membrana plasmática combinándola y precipitando las proteínas protoplasmáticas y desnaturalizándolas (Fuertes César et al 2002). Estos compuestos no se hallaron en los extractos (cloroformo, etanol, metil-etilcetona y metanol), de *Matelea maritima*, lo que podría brindar una explicación a los resultados obtenidos.

También es probable que los terpenos y compuestos fenólicos que hacen parte de los extractos (cloroformo, etanol, metil-etilcetona y metanol), de *Matelea maritima* requieran de los compuestos antes mencionados para tener sinergismo y brindar una respuesta antibacteriana eficaz contra *S. aureus* ATCC 25923 y *E. Coli* ATCC 25922. Además, con respecto a los

terpenos, los cuales poseen un alto grado de actividad antibacterial, es probable, que en este ensayo su actividad resultara negativa, tal vez, porque el tipo de terpenos tales como los triterpenos, tetraterpenos y compuestos amargos, involucrados en el efecto antibacteriano no se halle presente en los extractos ensayados. De igual manera pudo suceder con los alcaloides.

Por otra parte, estos últimos pudieron, debido al calentamiento continuo al que fue sometida la muestra vegetal durante su extracción, sufrir algún tipo de degradación, lo que los inhibiría de generar una respuesta antibacteriana contra *S. aureus* ATCC 25923 y *E. Coli* ATCC 25922.

5. CONCLUSIONES

El extracto etanólico total del tallo de *Matelea maritima* presenta metabolitos secundarios tipo alcaloides , leucoantocianinas, terpenos y aminoácidos. Los que predominan en algunas especies de la familia *asclepiadaceae*. En contraste con aquellos tipo Flavonoides, saponinas y taninos, los cuales no se determinaron en el screen fitoquímico y que a su vez no hay reporte de ellos, en la literatura, para *Matelea maritima*.

El extracto etanólico, y las fracciones de cloroformo, metil-etil-cetona, metanol, no presentaron actividad antibacterial contra las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 en las condiciones trabajadas en el laboratorio.

El control negativo DMSO no mostró inhibición del crecimiento bacteriano contra ninguna de las cepas ensayadas, lo que concuerda con las observaciones realizadas de los distintos extractos.

El control positivo vancomicina a una concentración de 4mg/ml actúa de manera efectiva contra las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Aún, cuando se trabajaron en condiciones de laboratorio controladas, dos metodologías distintas para la realización de la prueba de sensibilidad, ninguna de éstas presentó, en las diferentes concentraciones de extractos ensayados, actividad antibacterial contra *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 y *Escherichia coli* cepa ATCC 25922.

6. RECOMENDACIONES

Realizar estudios fitoquímicos más amplios de la especie *Matelea maritima* donde se utilicen extractos derivados de hojas, fruto y raíz.

Ensayar el extracto etanólico del tallo de *Matelea maritima* como antifúngico, debido a que durante el tiempo en que se mantuvo guardado nunca presentó contaminación, aun cuando se encontraba a la intemperie.

Hacer una determinación más específica sobre los diferentes metabolitos que se encontraron en el tallo y extender ese estudio a las hojas, fruto y raíz, debido a que el látex extraído del fruto seco de otros géneros presentan actividad bactericida contra *S. aureus*.

Realizar pruebas antibacteriales con los extractos que se obtengan de hojas, fruto y raíz contra las bacterias *E. coli* cepa ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923.

7. REFERENCIAS

1. **AUBAD, A. Y LOPEZ, J.** Texto Guía de Laboratorio de Química Orgánica. Medellín. 2002.
2. "Bacteriología" *Microsoft® Student* 2006 [DVD]. **Microsoft ® Encarta ® 2006. © 1993-2005 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.**
3. **CACERES, A** Plantas de Uso Medicinal en Guatemala 1ª edición. Vol 1. Universitaria Guatemala. 1996.
4. **CARDONA, D. QUIÑONES, W. TORRES, F.** Estructura y Actividad Lehismanicida de Larnoxolida. A y B. Nuevos Withanólicos de *Larnax clabra*- actual biol 27 (suplemento 1) 2005.
5. **CHEREONTHIPHAKORN et al (2002):** Purification and Characterization of NAD (P) H Quinone Reductase from the latex of *Hevea braselensis*. Mul .
1. Arg (Euphorbiaceae). J. Els. Sci. Ltda, 61: 123 – 128.
6. **CURTIS Y BARNES.** Principios de Biología. Editorial Panamericana. México. 1995. p. 761 – 764.
7. **FORERO E. Y GENTRY ALWIN.** Lista anotada de las plantas del departamento del Chocó, Colombia. Instituto de Ciencias Naturales –

Museo de la Historia Natural. Universidad Nacional de Colombia.
Bogotá, D.E. 1989. p. 66. Biblioteca José Jerónimo Triana – N° 10.

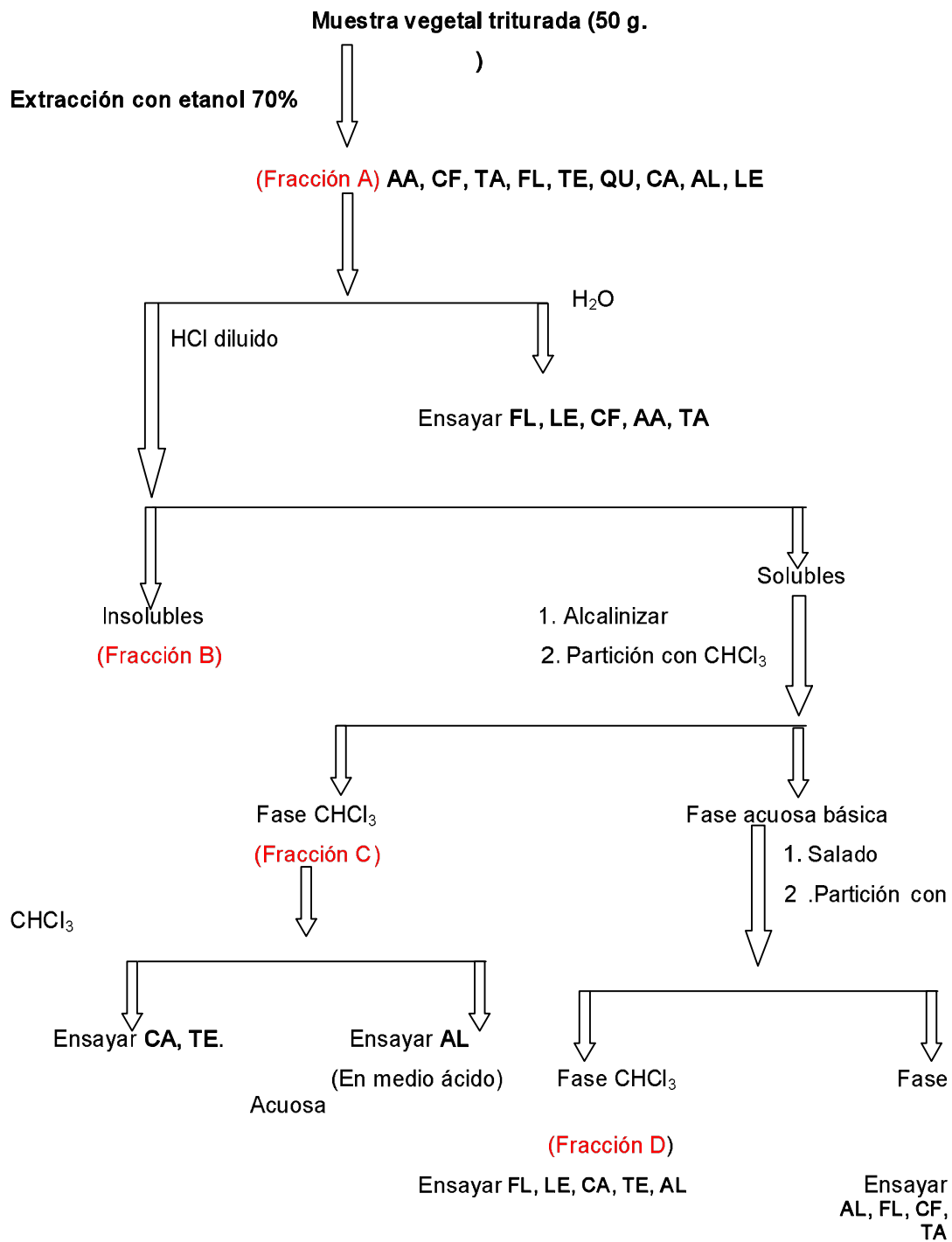
8. **GARCIA G; VELASQUEZ L; GOMEZ G; PINEDA F; SALDARRIAGA Y;** Manual de Laboratorio de Microbiología General. Universidad de Antioquia. Medellín.1986.
9. **GARCÍA, H.** Flora Medicinal de Colombia 2ª edición. Tomo I y II. Tercer Mundo Editores. Colombia. 1992. p 463 a 468.
10. **GARCIA J; CANTON R; GARCIA J. E.** Métodos Básicos para el estudio de la Sensibilidad a los Antimicrobianos. Procedimientos en Microbiología Clínica. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas en Microbiología.
11. **GONZALEZ M; LOPERA W; ARANGO A.** fundamentos de Medicina. Manual de Terapéutica. Corporación Para Investigaciones Biológicas. Medellín 2002.
12. **HEXAING, W.** AND B. TZI (2002): Isolation of an Anfifugal Thaumatococcus - like protein from kiwi fruits, J. Els, Sci. Ltda. 61: 1–6.
13. <http://www.cfsan.fda.gov.co/~mow/intro.html>
14. <http://www.microbiología.com.ar/antimicrobiano/general.php>
15. <http://www.hortiplex.com/>
16. <http://www.arbolesornamentales.com/asclepiadaceae.htm>
17. <http://www.lafacu.com/apuntes/biologia/bacterias/default.htm>
18. <http://www.plantasmedicinales.org/etno6.htm>

19. **KOBAYSY, M. et al (2002):** Phytotoxicity and Volatile Constituents From Leaves of *Callicarpa japonica*. J. Els. Ltda, 61: 37-40.
20. **LOPEZ M; ALVAREZ M; LOPEZ T; GONZALEZ J.** Actividad antifúngica in Vitro de *Pinus caribaeae*. Revista Cubana de Plantas Medicinales. Vol 2. pág 25-29. 1997.
21. **MARTINEZ, A.** Farmacognosia y Fitoquímica Experimental Uniantioquia met 1991.
22. **MARQUEZ et al.** Estudio Fotoquímico Y Evaluación de la actividad Antibacterial De La Inflorescencia De *Sphilantes urens*. 1990. pág 64.
23. **MERCADO A; VARGAS C.** Evaluación de la actividad Antifúngica y Antibacteriana del Extracto Etanólico Total de la Hoja de *Pedilantus tithymaloides* L. poit (ultimorrial). 2003.
24. **PASTO, D. Y JONSON, C.** Determinación de Estructuras Orgánicas. Barcelona. 1981
25. **PUMAROLA A; RODRIGUEZ A; GARCIA J; PEDROZA P.** Microbiología y Parasitología Médica. 2ª edición. España 1992.
26. **RINCON et al.** Contribución al Estudio Fitoquímico de la Actividad Inmunomoduladora del Extracto Etanólico de la Corteza de . Memorias Séptimo Congreso Fitoquímico 2002. pág 30
27. **SÁNCHEZ, C. PINZÓN, R. GUPTA, M.** Manual de Técnicas de Investigación. CYTED Santafé de Bogotá. 1995.

28. **Senado de la Republica de Colombia.** Municipios Colombianos; Indice Monográfico de los Municipios del País. Pama Ltda.. 1ª edición. Bogotá 1989. p. 95.
29. **Todas las Medicinas.** Circulo de lectores. Enciclopedia practica familiar. Editorial Pinter Latinoamericana Ltda. 1ª edición, Bogotá, 2001. p. 320 – 321.
30. **VALENCIA ORTIZ** Ciria. Fundamentos de Fitoquímica. 1ª edición. México, 1995. p 192.
31. **VALENTE, M. C** 1996. Ref. arq. Jard. Bot. Río de Janeiro. 34: 145 – 176.
32. **WILSON K. Y WAIKER J.** Practical Biochemystry Principies and Techniques. Ed. Cambridge University Press. 5th edition. Cambridge, 2000. p. 508 – 623.
33. **WITTSUWAANAKUL, D. et al (2002):** Polyphenol Oxidase from Latex of *Hevea Brasilensis* Purification and Characterization. J. Els, Sci. Ltda. 61: 115-121.

ANEXOS

ANEXO 1. Esquema metodológico del tamizaje fitoquímico



ANEXO No 2



Escala Nefelométrica De Mc Farland

ANEXO No 3



Soluciones De Los Extractos

ANEXO No 4

Ficha Técnica De *E. coli*

COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA – PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA			
Responsable: Alba Alicia Trespalacios Rancel			
Número	CMDM - PUJ	060	
Microorganismo		Escherichia coli ATCC 25922	
Fuente	ANNAR DIAGNÓSTICA	Origen	ATCC MARCA REMEL
Almacenamiento	Glicerol 40%	Historial PUJ	Diciembre 2002
Nivel de seguridad	2	Conservación	Criopreservación -70°
Condiciones de Crecimiento		Anaerobio Facultativo. Temperatura 37°	
Pruebas Bioquímicas: TSI: A/A SIM: Gas/H ₂ S: +/- MOV: - Indol: - Urea: - RM: + VP: - Fenilalanina: - Citrato: - LIA: K/K		Azúcares: Manosa: + Maltosa: - Glucosa: Lactosa: + Arabinosa: - Sorbito: + Trealosa: + Rafinosa: - Manitol: Sacarosa: - Salicilina: + Xilosa: +	
Reacciones Atípicas			
Observaciones			

ANEXO No 5

Ficha Técnica De S. aureus

COLECCIÓN DE MICROORGANISMOS DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA – PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA			
Responsable: Alba Alicia Trespalacios Rancel			
Número	CMDM - PUJ		
Microorganismo		Staphylococcus aureus 25923	
Fuente	ANNAR DIAGNÓSTICA	Origen	ATCC MARCA REMEL
Almacenamiento	Glicerol 40%	Historial PUJ	Diciembre 2002
Nivel de seguridad	2	Conservación	Criopreservación -70°
Condiciones de Crecimiento		Anaerobio Facultativo. Temperatura 37°	
Pruebas Bioquímicas	Catalasa: Positiva Hemólisis beta en agar sangre Manitol: Positivo DNAsa: Positiva Crecimiento en Blaird Parker: Positivo Crecimiento en agar manitol salado: positivo Coagulasa: Positiva		Morfología Macroscópica: Cocos Grampositivos
Reacciones Atípicas			
Observaciones		Cepas productoras de beta lisina. Cepa de referencia para realizar pruebas de CAMP para <i>Streptococcus</i> beta hemolíticos grupo B	