



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRIA EN CIENCIAS MENCIÓN QUÍMICA

ESPECIALIDAD PRODUCTOS NATURALES

TESIS

EFFECTO ANTIBACTERIANO DE LAS FRACCIONES OBTENIDAS

DE SAPONINAS A PARTIR DE LA RAÍZ DE *Colignonia parviflora*

var. Biumbellata Rafinesque* SACH'A PARACCAY EN *Escherichia coli

ATCC 51813

PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN

CIENCIAS MENCIÓN QUÍMICA ESPECIALIDAD PRODUCTOS NATURALES

AUTOR:

Br. ALICIA CLAVERI JARANDILLA

ASESOR:

Dr. CARLOS ALBERTO SERRANO FLORES

ORCID DEL ASESOR:

0000-0003-0462-709X

CUSCO – PERU

2023

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro. CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, asesor del trabajo de investigación/tesis titulado: Efecto antibacteriano de las fracciones obtenidas de Soponinas a partir de la raíz de Coligonia poriflora var. Biumbellata Rafinesque SACHA PARACCAY en E. Coli ATCC 51813 presentado por: ALICIA CLAVERI JARANDILLA

con Nro. de DNI: 23864994, para optar el título profesional/grado académico de MAESTRO CIENCIAS MENCIÓN QUÍMICA ESPECIALIDAD PRODUCTOS NATURALES

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 2 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del *Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC* y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 7%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y adjunto la primera hoja del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 05 de Junio de 2023.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

Carlos Alberto Serrano Flores
Carlos Alberto Serrano Flores PhD
DIRECTOR DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE QUÍMICA

Firma
Post firma Carlos Alberto Serrano Flores

Nro. de DNI 23864994

ORCID del Asesor 0000-0003-0462-709X

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: unsaac.turnitin.com/viewer/submissions/oid:27259:234103702?locale=es-PE

NOMBRE DEL TRABAJO

ALICIA CLAVERI 17 de mayo.docx

AUTOR

Alicia Claverí

RECUENTO DE PALABRAS

14306 Words

RECUENTO DE CARACTERES

80669 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

86 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

3.3MB

FECHA DE ENTREGA

May 17, 2023 8:47 PM GMT-5

FECHA DEL INFORME

May 17, 2023 8:49 PM GMT-5**● 7% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos

- 7% Base de datos de Internet
- 0% Base de datos de publicaciones

● Excluir del Reporte de Similitud

- Base de datos de Crossref
- Base de datos de trabajos entregados
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 25 palabras)
- Base de datos de contenido publicado de Crossref
- Material bibliográfico
- Material citado
- Fuentes excluidas manualmente

DEDICATORIA

*En memoria de mi padre Aniceto,
gracias por todo lo que pudiste darme.*

*A Cristina mi madre, por ser mi
ejemplo a seguir, gracias por todo tu apoyo,
paciencia y amor incondicional, porque tú
me enseñaste a seguir siempre adelante a
pesar de las circunstancias, dificultades,
vicisitudes..., por no rendirte y continuar
siempre adelante.*

*A Rómulo, Raúl, mis hermanos
y sobrinos por todo su apoyo, cariño y
amor.*

*A Diego Alberto y Paolo Gabriel
mis hijos por todo su amor en todo
momento, apoyo y comprensión, tenerlos
siempre me da mucha fortaleza, orgullo
y me motiva a seguir adelante....*

LOS AMO.

AGRADECIMIENTOS

A Dios quien es mi guía porque siempre ha estado y estará conmigo.

Al Dr. Carlos Alberto Serrano Flores docente e investigador de la facultad de Ciencias de nuestra Universidad, mi asesor, por todo su apoyo, tiempo y colaboración en este trabajo de investigación.

A todos los docentes que contribuyeron al término del presente trabajo.

Al Quim. Jorge Choquenaira Pari por todo su apoyo y tiempo en la elaboración del presente trabajo.

ÍNDICE

INTRODUCCION.....	1
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
1.1 Situación problemática	2
1.2 Formulación del problema	3
1.2.1 Problema general	3
1.3 Justificación de la investigación	3
1.4 Objetivos de la investigación.....	4
a. Objetivo general.....	4
b. Objetivos específicos	4
II. MARCO TEORICO CONCEPTUAL	5
2.1. Bases Teóricas	5
2.1.1. Posición Taxonómica	5
2.1.2. Aspecto Botánico	5
2.1.3. Distribución Geográfica	6
2.1.4. Posición Taxonómica de la <i>Escherichia Coli</i>	7
2.1.4.1. Características Generales de la <i>Escherichia coli</i>	8
2.1.5. Saponinas	9
2.1.6. Extracción de Saponinas.....	18
2.1.7. Análisis por cromatografía en capa fina y/o Análisis por Cromatografía en Capa delgada	18
2.1.8. Extracción en Fase Sólida (SPE).....	20
2.1.9. Análisis por cromatografía líquida HPLC	20
2.1.10. Efecto antibacteriano.....	23
2.1.11. Concentración mínima inhibitoria (MIC)	23
2.1.12. Mecanismo de acción	24
2.2. Antecedentes empíricos de la investigación.....	25
III. HIPÓTESIS Y VARIABLES	28
3.1. Hipótesis.....	28

3.1.1.	Hipótesis general.....	28
3.2.	Identificación de Variables e Indicadores.....	28
3.2.1.	Variable Independiente.....	28
3.2.2.	Variable Dependiente.....	28
3.3.	Operacionalización de la Investigación.....	29
IV.	METODOLOGÍA.....	30
4.1.	Ámbito de estudio.....	30
4.2.	Tipo y nivel de investigación.....	30
4.3.	Unidad de análisis.....	31
4.4.	Población de estudio.....	31
4.5.	Tamaño de muestra.....	31
4.6.	Técnicas de selección de muestra.....	31
4.7.	Técnicas de recolección de información.....	31
4.7.1.	Materiales De Investigación.....	31
4.7.2.	Materiales, Instrumentos y Equipos.....	31
4.7.3.	Parte Experimental.....	34
4.7.3.1.	Extracción y aislamiento de Saponinas.....	34
4.7.3.2.	Cromatografía en capa fina TLC.....	3
4.7.3.3.	Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).....	35
4.7.3.4.	Cromatografía Flash.....	38
4.7.3.5.	Determinación del efecto antibacteriano de las fracciones obtenidas por Cromatografía Flash.....	38
4.7.3.6.	Medición de los halos de inhibición.....	38
4.8.	Técnicas de análisis e interpretación de la información.....	39
4.9.	Técnicas para demostrar la verdad o falsedad de las hipótesis planteadas.....	39
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
5.1.	Resultados.....	40
5.1.1.	De la Identificación de Compuestos Fitoquímicos - Análisis Fitoquímico Obtenido del Extracto.....	40

5.1.2. De la Cromatografía en capa fina del extracto rico en saponinas	40
5.1.3. Del análisis por HPLC y obtención de los cromatogramas del extracto rico de saponinas	42
5.1.4. Del fraccionamiento del extracto rico en saponinas por cromatografía flash	46
5.1.5. De la Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas por cromatografía flash	46
DISCUSION DE RESULTADOS	56
CONCLUSIONES	58
SUGERENCIAS	59
BIBLIOGRAFIA	60
ANEXOS	69

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Análisis fitoquímico de compuestos Fitoquímicos	40
Tabla 2: Posición de zonas reveladas en TLC y Rf	41
Tabla 3: Concentración de las diferentes fracciones	48
Tabla 4: Actividad antimicrobiana 1	49
Tabla 5: Actividad antimicrobiana 2	50
Tabla 6: Actividad antimicrobiana 3	51
Tabla 7: Concentración y volúmenes aplicados a las placas	52
Tabla 8: Resumen de los resultados de inhibición	53
Tabla 9: Clasificación de la actividad antibacteriana de las fracciones de las saponinas de acuerdo con los criterios de Toda y col.	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Figura de las partes de la planta de Colignonia parviflora	6
Figura 2: Distribución de la especie Colignonia	7
Figura 3: Escherichia coli	8
Figura 4: Estructura general de una saponina	11
Figura 5: β – Amirina	11
Figura 6: Estructura de Triterpenos y saponinas esteroidales	12
Figura 7: Estructura general de una saponina Terpenoide	15
Figura 8: Saponina monoglicosilada	15
Figura 9: Saponina Dicoglicosilada	15
Figura 10: Saponina Tricoglicosilada	16
Figura 11: Estructuras de Saponina Triterpénicas	17
Figura 12: Actividades Biológicas y Farmacológicas de saponinas sintéticas	17
Figura 13: Esquema de un cromatógrafo de HPLC	22
Figura 14: Estructura de la pared de una bacteria gram negativa	24
Figura 15: Estructura de la pared de una bacteria gram positiva	25
Figura 16: Operacionalización de variables	29
Figura 17: Ubicación del lugar de la colecta de la planta	30
Figura 18: Enlaces débiles que se forman durante la extracción de las saponinas	35
Figura 19: Interacción hidrofóbica entre el ligando C-18 y el Compuesto	36
Figura 20: Interacciones que ocurren en el HPLC	37
Figura 21: Metodología experimental desarrollada	38

Figura 22: Cromatografía del extracto rico en saponinas	41
Figura 23: Cromatografía HPLC del extracto rico en saponinas	42
Figura 24: Cromatografía HPLC del extracto rico en saponinas a 200 nm	44
Figura 25: Superposición de los espectros U del extracto rico en saponinas con el ácido oleanólico	45
Figura 26: Fraccionamiento del extracto rico en saponinas por cromatografía Flash	46
Figura 27: Cromatografía en capa fina de la cromatografía de las fracciones obtenidas de la cromatografía flash	47
Figura 28: HPLC de carbohidrato	47
Figura 29: Planta de Colignonia parviflora var. biumbellata Rafinesque	69
Figura 30: Raíz de la planta	68
Figura 31: Molienda	68
Figura 32: Concentrado	68
Figura 33: Filtrado	68
Figura 34: Cromatografía flash	69
Figura 35: Esquema de la cromatografía flash	69
Figura 36: Cromatografía en TLC de la cromatografía flash	69
Figura 37: Inoculación y sembrado de muestras	70
Figura 38: Resultados y obtención de los halos de inhibición	70

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1: Posición Taxonómica de la planta realizada por el Herbario Vargas - Cusco	69
ANEXO 2: Secuencia de tratamiento de la muestra objeto de análisis	70
ANEXO 3: Criterios de actividad antimicrobiana frente al halo de Inhibición por Toda M, Kubo Y.	72
ANEXO 4: Reactivos utilizados	73

LISTA DE GRAFICOS

GRAFICO 1: Concentración vs tamaño del halo (1)	49
GRAFICO 2: Concentración vs tamaño del halo (2)	50
GRAFICO 3: Concentración vs tamaño del halo (3)	51
GRAFICO 4: Cuadro resumen de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la raíz de Colignonia parviflora	54

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como propósito la extracción, fraccionamiento y pruebas de inhibición de las fracciones obtenidas a partir de la raíz de *Colignonia parviflora var. biumbellata raf.* sach'a paraccay.

Para lo cual luego de su colecta, secado, molienda y pruebas fitoquímicas correspondientes se realizó el fraccionamiento del extracto etanólico al 70% de la muestra, mediante cromatografía flash con un sistema de polaridad (Ácido fórmico al 0.1%:Acetonitrilo 80: 20); de dicho tratamiento se obtuvo un total de 35 fracciones, las cuales se sometieron a pruebas de cromatografía en capa fina evaluándose 6 fracciones agrupadas de las 35 colectadas. Con estas fracciones se realizó las pruebas de inhibición frente al *Escherichia coli* siendo un número de 2 fracciones las que presentaron mayor inhibición a 50µL/mg dicha actividad inhibitoria se evaluó mediante el método de difusión en pozos utilizando agar de Mueller-Hinton.

Así mismo de dichas fracciones se realizó el HPLC confirmándose por los resultados que los cromatogramas y el espectro UV que eran similares a los del núcleo oleanólico y por la cromatografía en TLC. Dichos resultados obtenidos evidencian la inhibición que presentan las fracciones.

Palabras clave: *Colignonia*, saponinas, antimicrobiano, Cromatograma, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

The purpose of this research work was the extraction, fractionation and inhibition tests of the fractions obtained from the root of *Colignonia parviflora* var. *biumbellata* raf. sach'a paraccay.

For which, after its collection, drying, grinding and corresponding phytochemical tests, the fractionation of the ethanolic at 70% of the sample was carried out, by means of flash chromatography with a polarity system (0.1% formic acid: Acetonitrile 80: 20); A total of 35 fractions were obtained from said treatment, which were subjected to thin-layer chromatography tests, evaluating 6 grouped fractions of the 35 collected.

Inhibition tests against *Escherichia coli* were performed with these fractions, with 2 fractions showing the greatest inhibition at 50µL/mg. Said inhibitory activity was evaluated by the well diffusion method using Mueller-Hinton agar.

Likewise, HPLC was carried out on said fractions, confirming by the results that the chromatograms and the UV were obtained, which were similar to those of the oleanolic nucleus and by the color tests. These results obtained show the inhibition that they present at fractions.

Keywords: *Colignonia*, saponins, antimicrobial, Chromatogram, *Escherichia coli*.

INTRODUCCION

En nuestro país muchas plantas son utilizadas para aliviar diferentes dolencias o combatir presencia de plagas como es el caso de la muña en la papa, o el caso del uso de saponinas (sustancias que generan espuma al contacto con el agua) componentes que las plantas producen para su protección frente a ataque de plagas, bacterias u hongos.

Las plantas elaboran estos metabolitos secundarios (principios activos) que constituye una fuente de productos biológicos farmacológicamente activos que pueden ser muy útiles, es el caso de las saponinas como protectores naturales químicos que se encuentran en diferentes partes de algunas plantas tal es el caso de raíces, las cuales dan protección frente a agentes externos y que también son nutrientes no esenciales (Augustin, 2011)

Así mismo las saponinas como metabolito también presentan propiedades fungicidas, bactericidas, antiinflamatorias, surfactantes entre otras podría ser que su extracción y aprovechamiento pudiera darse a niveles industriales y pueda como otras especies lograr productos sostenibles reemplazando de manera parcial o total a los productos sintéticos (Usiña, 2017).

La especie *Colignonia* se encuentra distribuida en América, especialmente en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador y Perú, en nuestro país está distribuida en Cajamarca, Huánuco, Lima y Cusco (Bohlin, 1988). *Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Rafinesque; una raíz tuberosa que pertenece a la familia Nyctaginacea, que comúnmente es llamada por los antiguos cusqueños como "Sach'a paraccay o saqta"; ya que ésta se utilizaba para hacer espuma y lavar el cabello sobre todo de las mujeres (Plowman et al., 1990).

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Situación problemática

Las diferentes regiones y pisos ecológicos proveen al poblador andino productos naturales que antes y hasta hoy en día utilizan plantas enteras o parte de ellas por sus propiedades farmacológicas para combatir diferentes dolencias, así como para su aseo personal por la presencia de espuma que estas producen, dentro de estas se encuentran las saponinas que tienen el efecto de disminuir la tensión superficial o romper membrana (Araujo, 2019 y Lacaille, 2016).

La flora continúa siendo una fuente valiosa de sustancias bioactivas con propiedades farmacológicas, antibacterianas, antifúngicas, así como también el de los surfactantes y/o tensoactivos que presentan las saponinas (Pradhan, 2017), dentro de las cuales están las antibacterianas esto debido a que al presentar metabolitos secundarios estas puedan utilizarse para tal fin y considerarla como una fuente para obtener una variedad de medicamentos y agentes de biorremediación (Schneider, 2011).

Los productos naturales, tanto de forma directa como ya en forma de extractos o preparados son una fuente ilimitada de muchos principios activos de aplicación terapéutica por su alta diversidad química constituyendo así la base para el desarrollo de nuevos fármacos (Cortez, 2004).

El uso de la raíz de *Colignonia parviflora var. biumbellata Rafinesque* sach'a paraccay, estuvo limitado a usar la raíz como agente tensoactivo por los antiguos pobladores y por sus características de inhibición a algunos tipos de bacterias que presentan las saponinas, se vio por conveniente comprobar dicha acción, pero de una manera más purificada para poder diferenciar y corroborar su acción antibacteriana en las fracciones que se obtendrían frente al *E. coli* a través de su capacidad de inhibición.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Presentarán las fracciones de las saponinas presentes en la raíz ***Colignonia parviflora var. biumbellata Rafinesque*** sach'a paraccay efecto antibacteriano frente a *E. coli* ATCC 51813?

1.3 Justificación de la investigación

Las plantas al estar conformadas por muchos metabolitos secundarios y siendo estos los responsables por intermedio de sus principios activos su acción biológica y/o farmacológica como es el de presentar un comportamiento surfactante en el caso de las saponinas, por lo cual se vio la necesidad de verificar alguna de estas propiedades; para lo cual se trabajó con el de la especie vegetal ***Colignonia parviflora var. biumbellata Rafinesque***, el cual está distribuido en nuestra región, siendo la raíz la que es más usada para mantener cierto nivel de limpieza (detergente doméstico) por la espuma que genera, así como para el aseo personal por las saponinas que están presentes, además estas se utilizan en la industria de los medicamentos debido a sus propiedades farmacéuticas, además de presentar efectos biológicos; de la ***Colignonia parviflora var. biumbellata Rafinesque*** acerca de esta planta existe poca información referente al efecto antibacteriano de las fracciones de saponinas.

Actualmente existe una creciente demanda de productos naturales como terapia alternativa para diferentes enfermedades, lo que ha fomentado la investigación sobre la importancia de los compuestos bioactivos de las plantas.

La finalidad de este trabajo de investigación será el de contribuir al conocimiento científico de la especie ***Colignonia parviflora var. biumbellata Rafinesque***. para demostrar experimentalmente las propiedades antibacterianas frente a ***Escherichia coli*** que poseen las fracciones obtenidas de saponinas.

1.4 Objetivos de la investigación

a. Objetivo general

Determinar el efecto antibacteriano de las fracciones de saponinas obtenidas a partir de la raíz de *Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Rafinesque “Sach’a paraccay” frente a *Escherichia coli* ATCC 51813.

b. Objetivos específicos

1. Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en el extracto de la especie *Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Rafinesque “Sach’a paraccay”.
2. Realizar el fraccionamiento y purificación del extracto bruto de Saponinas de la especie *Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Rafinesque “Sach’a paraccay” por Cromatografía Flash.
3. Determinar y evaluar la estructura del núcleo de la saponina por cromatografía de capa fina, fraccionamiento de HPLC y los espectros UV obtenidos de las saponinas aisladas.
4. Determinar el efecto antibacteriano de las fracciones obtenidas frente a *Escherichia coli* ATCC 51813.

II. MARCO TEORICO CONCEPTUAL

2.1. Bases Teóricas

2.1.1. Posición Taxonómica

La posición taxonómica de la especie vegetal según el sistema de clasificación para las Angiospermas de Cronquist, 1981, que compatibiliza con el grupo del sistema Filogenético de las Angiospermas de Cronquist Angiosper Phylogeny Group, APG III – 2009, es la siguiente:

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Caryophyllidae

Orden: Caryophyllales

Familia: Nyctaginaceae

Género: *Colignonia*

Especie: *Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Rafinesque

Nombres comunes: Sacta sacta, Yurac rapi, Sach'a paraccay.

Anexo1: Constancia Herbario Vargas

2.1.2. Aspecto Botánico

“SACH'A PARACCAY”, *Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Rafinesque.

La familia Nyctaginaceae presenta arbustos trepadores, rastreras, perennes con hojas simples, enteras, alternas, opuestas, pecioladas con raíz napiforme, sus flores unisexuales o bisexuales muy raras veces dioicas dispuestas en racimos o solitarias protegidas por brácteas vistosas o reemplazando el cáliz con estambres libres (figura 1). En el gineceo (figura 1) con ovario supero estigma simple y las semillas erectas con tegumento hialino de embrión recto con perisperma y endosperma. (Sandoval-Ortega, 2020).

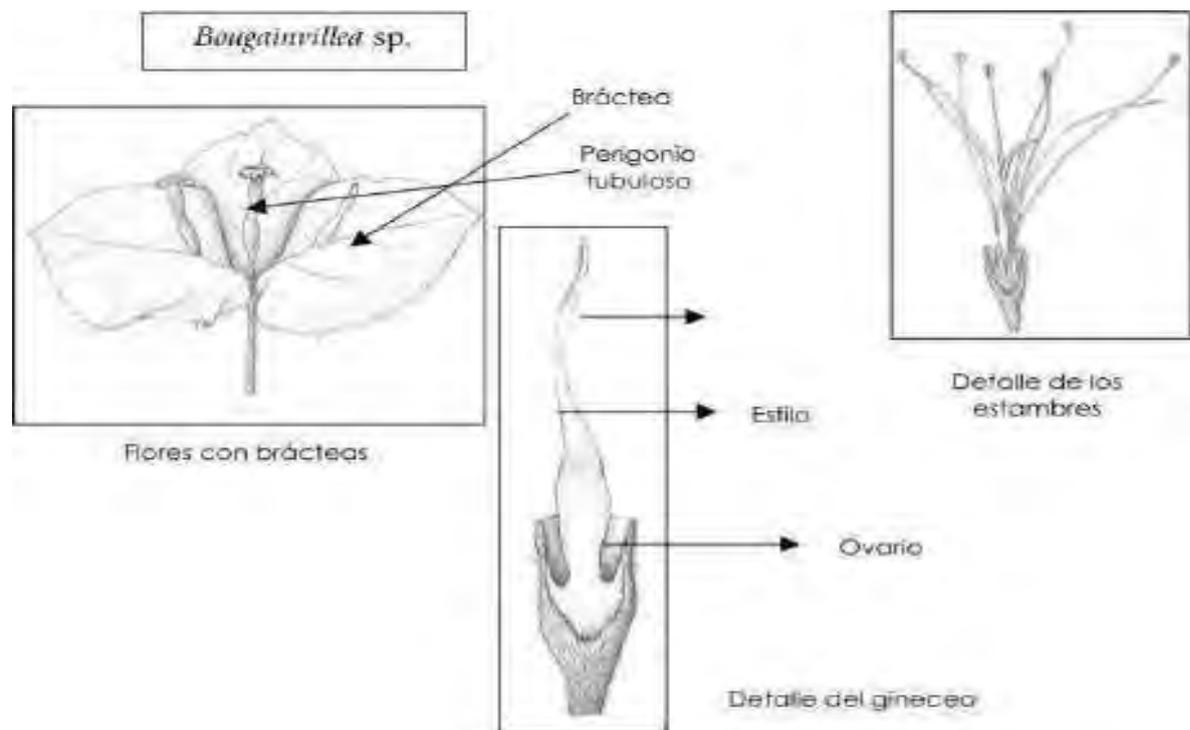


Figura 1: Partes de la planta *Colignonia parviflora*

2.1.3. Distribución Geográfica.

La especie *Colignonia* se encuentra distribuido en Perú, Ecuador, Colombia, Argentina, Brasil y Bolivia (Figura 2) así como también en Cajamarca, Huánuco, Lima y Cusco (Bohlin, 1988)

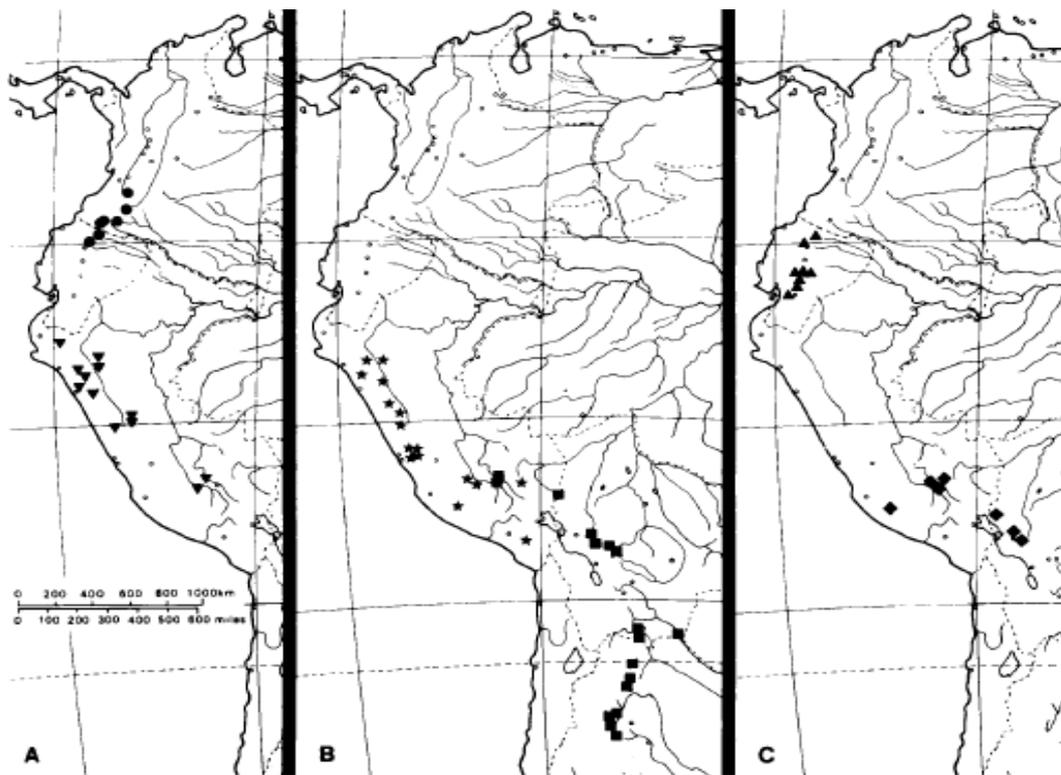


Figura 2: Distribución de la especie Colignonia

A: *C. parviflora ssp. parviflora* (●) y *C. parviflora ssp. biumbellata var. acutifolia* (▼). B: *C. parviflora ssp. biumbellata var. biumbellata* (*) y *C. glomerata var. glomerata* (■). C: *C. pentoptera* (▲) y *C. glomerata var. boliviana* (◆). (Bohlin, 1988)

2.1.4. Posición Taxonómica de la *Escherichia Coli*

La ubicación taxonómica de *Escherichia coli*, según el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey's 1994 es la siguiente.

DOMINIO: Bacteria

CLASE: Gammaproteobacteria

PHYLUM: Enterobacteria

ORDEN XII: Enterobacteriales

FAMILIA: Enterobacteriaceae

GENERO: *Escherichia*

ESPECIE: *Escherichia coli*

2.1.4.1. Características Generales de la *Escherichia coli*

La *Escherichia coli* es un bacilo gram negativo, es el principal organismo anaerobio facultativo presente en los intestinos de los organismos de sangre caliente, medio ambiente y, a veces en los alimentos y el agua sin tratar. La mayor parte de los tipos de *E. coli* son inoocuos e inofensivos, pero algunos podrían causar intoxicaciones alimentarias como la productora de la toxina Shiga (Jay, 2002).

La *Escherichia coli* (Figura 3) es una bacteria gram negativa, de la tribu *Escherichia* anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Es considerado un microorganismo de flora normal. Puede desarrollarse en temperaturas 2.5 a 45°C y pH de 4.4 – 9.0 y sobrevivir a temperaturas de refrigeración y congelación (Konem et al., 2003).

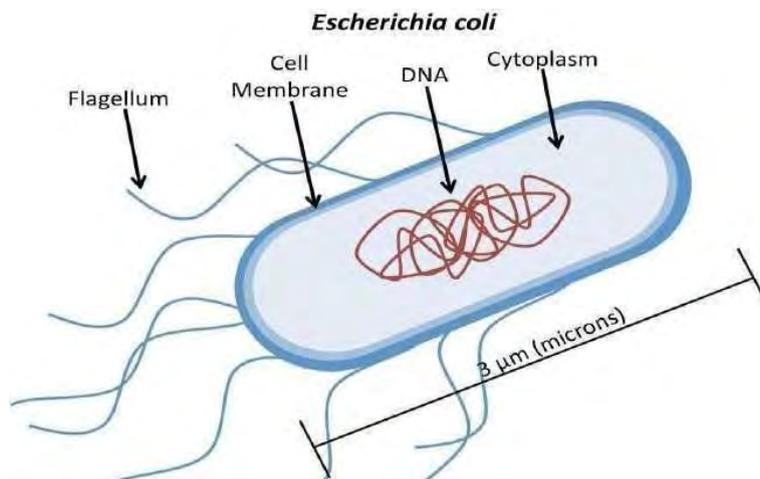


Figura 3: Figura de *Escherichia coli*

La *E. coli* bacteria mesófila que consta de membrana citoplasmática, membrana externa y un espacio constituido por péptido que le confiere rigidez que resiste a presiones osmóticas altas. Se desarrolla óptimamente a 35-43°C en animales de sangre caliente (Morejón, 2008).

La *E. coli* está clasificada como una bacteria gramnegativa en forma de bastón de la familia de las enterobacterias. La presencia de *E. coli* en aguas ambientales se ha considerado durante mucho tiempo como un indicador de contaminación fecal

(Jang et al., 2017).

Esta bacteria es la más recuperada en laboratorios clínicos y la que está más incriminada en enfermedades infecciosas que afectan al organismo humano sobre todo las vías urinarias, la neumonía de los pacientes hospitalizados inmunosuprimidos (Velasco, 2008).

2.1.5. Saponinas

Las saponinas son compuestos bioactivos que generalmente se consideran producidos por las plantas para contrarrestar patógenos y herbívoros como un sistema de mecanismo de defensa de las plantas, las saponinas son de creciente interés para la investigación como los fármacos, ya que al ser componentes activos en las plantas medicinales proporcionan valiosas propiedades farmacológicas (Augustin et al., 2011), como adyuvantes que ayudan a los candidatos a vacunas a inducir una fuerte respuesta inmune resultando ser inmunogénicas (Vitoriano-Souza et al., 2019), aisladas de varias plantas tienen un efecto citotóxico sobre las células cancerosas que inducen la apoptosis y la autofagia a más de presentar también propiedades antioxidantes y protectores durante el tratamiento contra el cáncer (Juszczak Michal et al., 2021) in vitro e in vivo presenta actividad anticancerígena (Bailly Christian, 2020), fracciones de saponina derivadas de las semillas de *Chenopodium quinoa* y *Bupleurum chinense* mejoraron las actividades adyuvantes inmunes humorales y celulares en las respuestas de ratones inmunizados con ovoalbúmina (Verza et al., 2012) y (Sun, 2006) presentaron actividad antiinflamatoria in vitro saponinas triterpénicas ya que actúan como potentes inhibidores (Grabowska Karolina, 2020) Saponinas triterpénicas presentaron actividad antiinflamatoria (Qiang Fu, 2010) saponinas triterpénicas presentaron actividad inhibidora significativa sobre la ciclooxigenasa (Shepo Shi, 2006).

Las saponinas pertenecen a una gran familia de compuestos que están relacionados estructuralmente con un esteroide o aglicona triterpenoide (sapogenina) que están unidas a una o varias unidades de azúcares. Que se caracterizan por la acción hemolítica y producir espuma siendo los responsables del sabor amargo y astringente que imparten a los vegetales que tienen una alta concentración de saponinas (Mohan, et al., 2016), también se encuentran en algunos organismos marinos (You Yang, 2014).

Las saponinas podrían definirse como aquellos compuestos que no son volátiles con actividad surfactante, formados por el metabolismo secundario de una gran parte de plantas, estas presentan propiedades tensoactivas, generando espuma en soluciones acuosas. Las saponinas están formadas por agliconas no polares unidos a monosacáridos, donde esta combinación explica esa capacidad tensoactiva de este tipo de compuestos (Vincken y col., 2007).

Químicamente las saponinas están formadas por dos tipos de esqueletos de agliconas no azucaradas (sapogeninas): esteroides o triterpenos (Figura 4). Para el grupo de las saponinas, también se clasifican los glicoalcaloides esteroides de la clase solanidans y espirosolan. Las agliconas pueden ser sustituidas por diferentes grupos funcionales (R-H, R-OH, R-COOH, R-CH₃), lo que hace que exista una gran diversidad de posibles estructuras presentes en las plantas. Esta diversidad se puede multiplicar aún más por el número de cadenas de azúcar, que pueden unirse como (monodesmósidos), (bidesmósidos) o tridesmósidos (en griego desmos = cadena). Donde la cadena puede ser pentosas, hexosas, desoxihexosas y ácidos urónicos en su forma lineal o ramificada aumentando así su diversidad estructural. Algunas saponinas pueden estar aciladas o acetiladas con diferentes grupos químicos.

Por tanto, el número de posibles estructuras de estos compuestos y su diversidad en las plantas es enorme. Rara vez se pueden encontrar en el material vegetal como un solo componente, sino que ocurren en mezclas multicomponente, difiriendo incluso entre los órganos de la planta (raíces, partes aéreas y flores). En las plantas de avena, por ejemplo, se pueden encontrar estructuras tanto esteroides como triterpénicas dependiendo de la parte de la planta. Por tanto, el aislamiento de saponinas a partir de una mezcla de este tipo en compuestos individuales para la aclaración de la estructura y las mediciones de la actividad biológica sigue siendo un desafío (Marston, Wolfender, & Hostettmann, 2000).

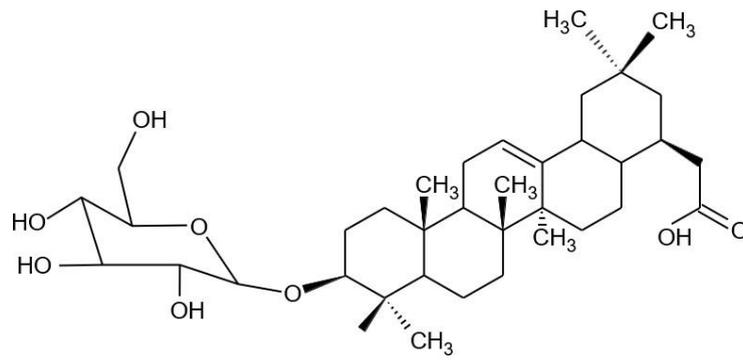


Figura 4: Estructura general de una saponina

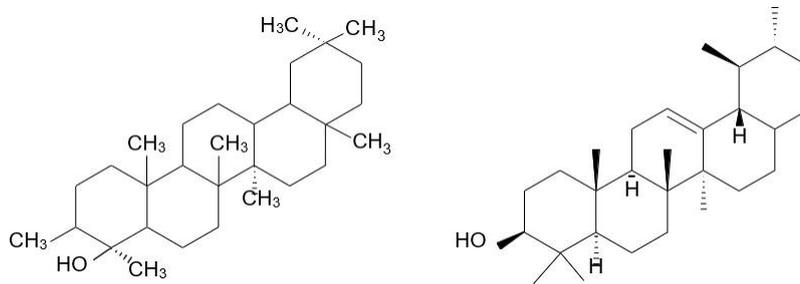
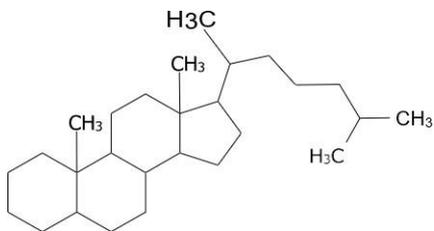
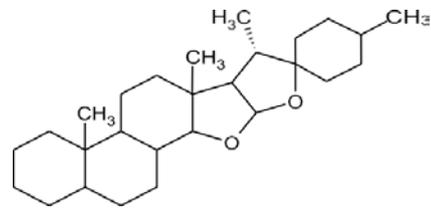


Figura 5: β - Amirina (tipo oleanano)



Colestano



Espirostano

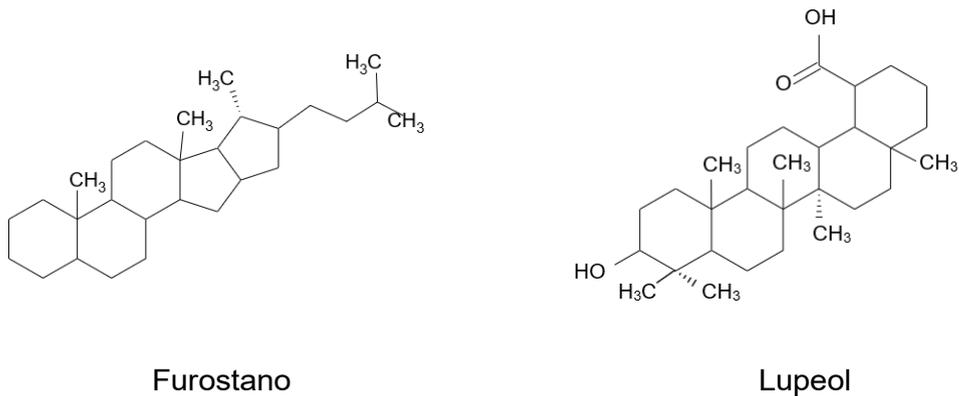


Figura 6: Estructura de Triterpenos y saponinas esteroidales

Las saponinas son moléculas anfifílicas que constan de carbohidratos y restos de agliconas triterpenoides o esteroides y destacan por sus actividades biológicas. Se han observado efectos antiinflamatorios, anticancerígenos, antioxidantes, inmunomoduladores, fungicidas, antimicrobianos y antivirales (Yu-Pu Juang, 2020).

Se denomina saponinas a un grupo de glucósidos que pueden disolverse en agua y disminuir la tensión superficial; cuando al sacudir sus soluciones forman espuma abundante y relativamente estable. Por hidrólisis de estas saponinas se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada genéricamente sapogenina, la cual puede tener un esqueleto esteroideal o triterpénico. (Domínguez, 1979).

Las saponinas presentan un grupo de características generales que sirven de base para su identificación rápida:

1. Producción de espuma al ser agitadas sus soluciones acuosas, lo cuales la base de la reacción empleada en el tamizaje fitoquímico;
2. Producción de hemólisis de los glóbulos rojos, propiedad que se aprovecha en las técnicas en que se cuantifica la potencia de estas sustancias;
3. Toxicidad en animales poiquilotérmicos, en especial los peces (sapotoxinas), a los cuales provocan parálisis de las agallas;
4. Reacción positiva en la prueba de Liebermann-Burchard. Por lo general, las sustancias esteroidales en esta prueba manifiestan colores que van desde el azul hasta el verde y las triterpénicas, rosado, rojo o violeta.

La mayoría de las saponinas presentan solubilidad en diferente grado en soluciones de etanol al 80%, propiedad que se emplea en diversas técnicas para su

extracción y purificación (Hernández, 1997).

Las saponinas presentan diversas actividades biológicas y farmacológicas: como la actividad hemolítica, antibacterial, antitumoral entre otras. Las saponinas son afectadas por factores como el tipo de núcleo, el número de cadenas azucaradas y el tipo de grupo funcional. (Hassan, 2010).

La actividad que presentan las saponinas lo realizan sobre organismos procariontes así como eucariotas. Además, se han encontrado saponinas que tienen propiedades farmacéuticas, agentes hemolíticos, antiinflamatorios, antibacterianos, antiparasitarios, antitumorales y antivirales (Sparg et al., 2004).

La síntesis de las saponinas esteroidales o terpénicas se realiza a partir de la vía de los isoprenoides.

Las saponinas esteroidales se encuentran principalmente en las monocotiledóneas, mientras que las saponinas terpénicas se encuentran especialmente en dicotiledóneas.

Las defensas de las plantas son muy complejas las cuales van a responder de forma sincrónica frente a un estrés biótico o abiótico. Las plantas tienen como defensas físicas la pared celular y como defensas químicas las saponinas y fitoalexinas (Díaz Puentes, 2009)

Las saponinas se dividen en dos clases principales que son glicósidos de triterpenos y esteroides donde su caracterización va a variar según el número de azúcares que se encuentran en diferentes posiciones en la estructura de la saponina (Hostettmann y Marston, 1995).

El descubrimiento de las actividades biológicas de las saponinas no se limita solamente a los usos tradicionales (como jabones, veneno para peces y molusquicidas) o industriales (tensioactivos y espumantes), sino también a las aplicaciones farmacéuticas (Güçlü-Üntündağ & Mazza, 2007 y Sparg et al., 2004).

Las saponinas triterpenoides son metabolitos secundarios con estructura muy diversa. Tiene una amplia gama de efectos farmacológicos y siendo el principal ingrediente activo de muchas plantas medicinales. La producción tradicional de saponinas triterpenoides, extraídas directamente de plantas cultivadas, no puede satisfacer la creciente demanda de la industria farmacéutica. Los microorganismos con capacidad de producción de estas saponinas (especialmente del género *Agrobacterium*) y capacidad de biotransformación, las especies bacterianas de

Bacillus y la microflora intestinal, representan una valiosa fuente de metabolitos activos (Lu Yao, 2021).

La combinación estructural que presentan las saponinas al tener un grupo polar (azúcar) y uno no polar (esteroide o triterpeno) es una propiedad que le permite la acción como detergente natural, agente estabilizante y emulsificador en cosméticos y productos de limpieza (Yang et al., 2010).

Además de los anticancerígenos, se han descubierto científicamente saponinas que tienen propiedades farmacéuticas antioxidantes (Chan y Khong, 2013), y actividades hemolíticas (Hassan et al., 2010 y Sun et al., 2011).

Los cambios muy bruscos de pH en las saponinas generan la ruptura de los enlaces O- glucosídicos (Figura 4) es decir no toleran, lo cual es muy útil y empleada en los procesos de cuantificación y elucidación estructural, por ello es utilizada para dichas metodologías (Yasser, 2012).

Las saponinas con una cadena de azúcares unida al carbono-3 presentan gran actividad microbicida, donde esta actividad depende de la ramificación de los azúcares (Hostettmann et al., 1995).

La actividad antimicrobiana de los extractos acuosos de frutos, hojas y tallos de *Solanum incanum* L. contra los gram negativos (*Escherichia coli* y *Salmonella typhi*) produjeron zonas de inhibición del crecimiento bacteriano de hasta 16,06 mm (Desta Berhe Sbhatu, 2020).

Las saponinas pueden ser mono, di o tridesmosídicas de acuerdo con el número de sustituciones (Figuras 07, 08 y 09). Las monodesmosídicas tienen un oligosacárido unido al C-3; las bidesmosídicas tienen dos cadenas de carbohidratos, uno de ellos unido mediante un enlace éter al C-3, y el otro unido a través de un enlace éster al C-28, en el caso de las saponinas triterpénicas; y las tridesmosídicas contienen tres cadenas de azúcares. Los oligosacáridos enlazados principalmente son pentosas, hexosas o ácidos urónicos.

Las saponinas se pueden encontrar en órganos vegetales muy diversos. Los de carácter monodesmosídico se dan con preferencia en raíces, cortezas y semillas, mientras que los bidesmosídicos, más hidrosolubles, muestran preferencia por los tejidos de asimilación como las hojas y las ramas tiernas (López, 2001)

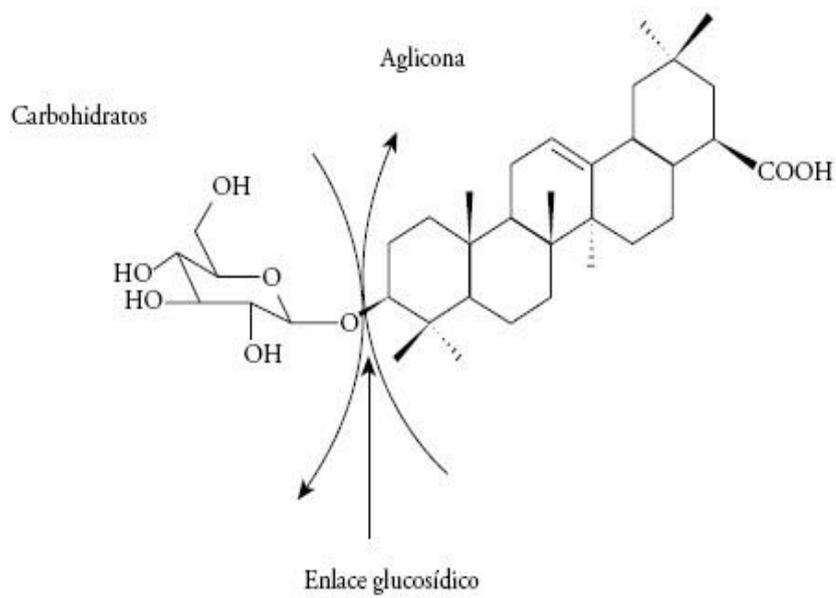


Figura 7: Estructura general de saponina terpenoide

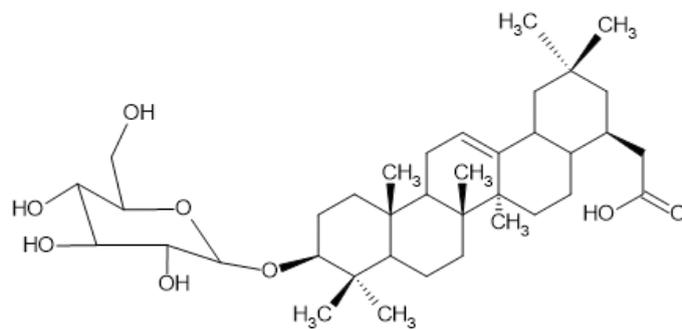


Figura 8: Saponina monoglicosilada: 3-O-β-Glucopiranosil oleanólico

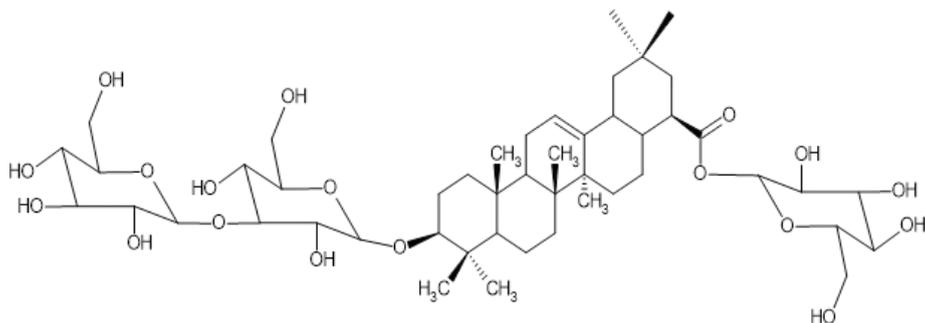


Figura 9: Saponina diglicosilada: 3-O-Glucopiranosil-(1→3)-α-L-galactopiranosil-hederagenina 28-O-β-D-glucopiranosil

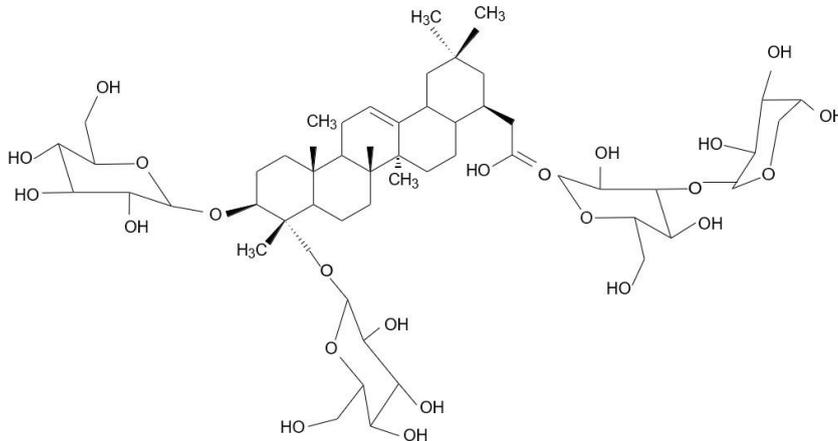


Figura 10: Saponina triglicosilada: Acido 3,23-bis[(O-β- glucopiranosil) oxil] olean-12-en-28-oico-28-O-α-L-arabinopiranosil- (1→3)-β- D-glucopiranosil éster ester

Las saponinas son uno de los grupos de productos naturales vegetales más numerosos y diversos que poseen funciones ecológicas y agronómicas los cuales contribuyen a la resistencia a plagas, patógenos y la calidad de los alimentos en las plantas de cultivo. Las saponinas son producidas también por otros organismos, como las estrellas de mar y los pepinos de mar (Osbourn Anne, 2011).

La mayoría de las saponinas, los glicósidos cianogénicos y los ácidos hidroxámicos cíclicos son defensas constitutivas de las plantas, mientras las fitoalexinas se consideran defensas inducidas (Diaz Puentes, luz Nelly - Morrissey et al., 2009).

Las sapogeninas triterpénicas (Figura 5) están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y se presentan en 3 estructuras químicas diferentes (30-45 carbonos): acíclicas como el escualeno, considerado como el precursor natural de esta familia: tetracíclicas como el panaxadiol y pentacíclicas como la estallogenina. Estas sustancias pueden presentarse en sus fuentes naturales: en forma libre, formando ésteres, o como parte de un glicósido (saponina). Las sapogeninas pentacíclicas se subdividen a su vez en 3 grupos: tipo lupano; tipo ursano (derivado de la α amirina), ambos no están presentes en los forrajes y los de tipo oleanano (derivados de la β amirina) figura 10 presentes en estos últimos (Hernández, 1997).

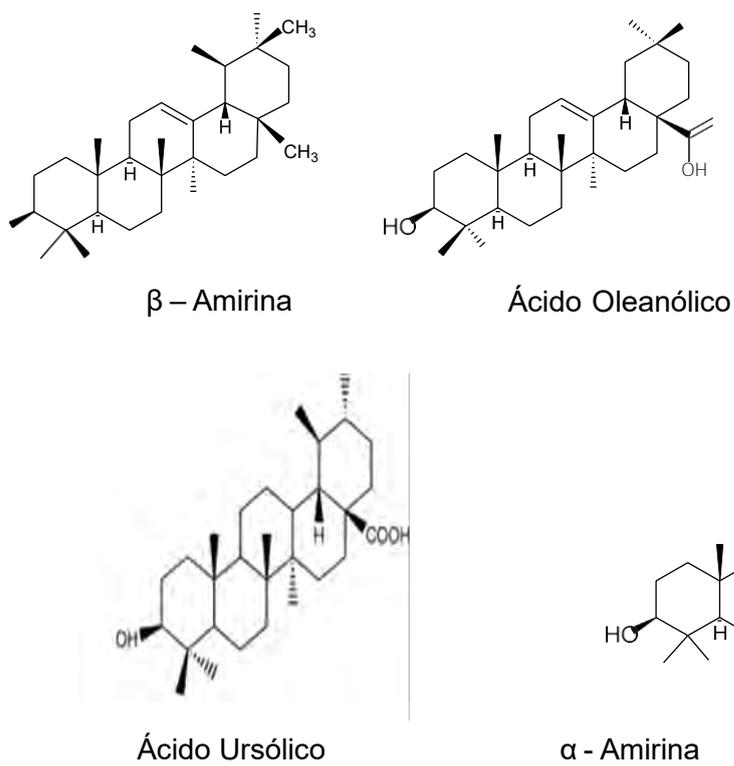


Figura 11: Estructuras de sapogeninas triterpénicas

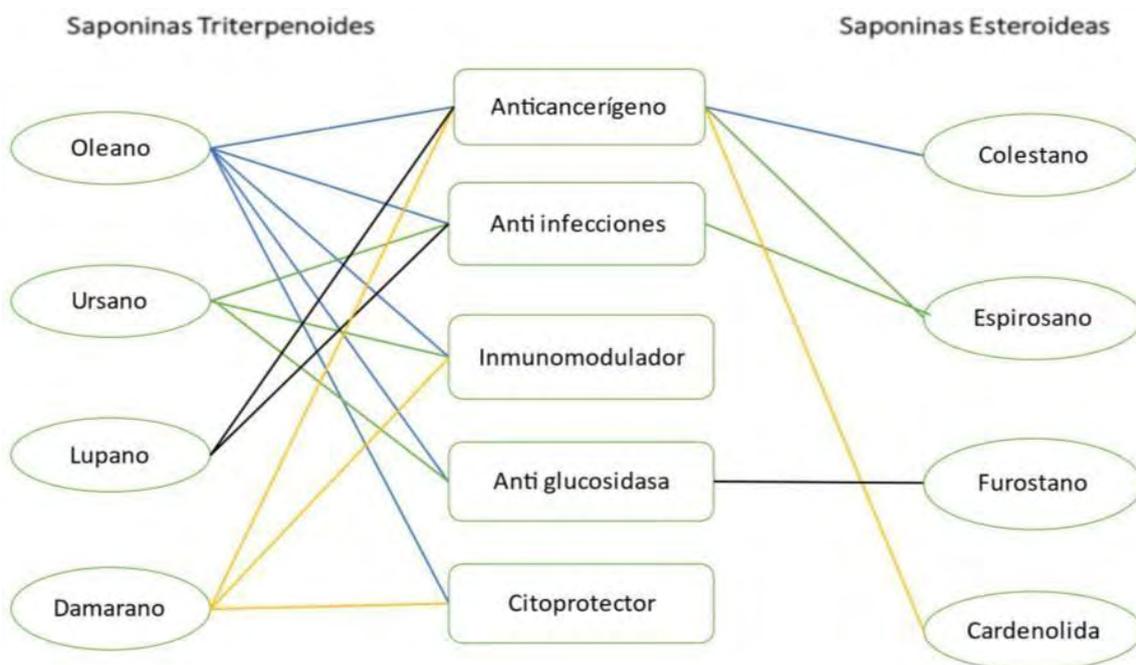


Figura 12: Actividades Biológicas y Farmacológicas de las saponinas sintéticas

2.1.6. Extracción de Saponinas

La selección del solvente es crucial para la extracción por solvente, se debe considerar la selectividad, solubilidad, costo y seguridad en la selección de solventes. Para la extracción de saponinas se pueden emplear diferentes métodos, como la extracción convencional por maceración con solventes orgánicos como el etanol al 70% (Hakim, 2021) metanol, agua y butanol (Le, 2018), dependiendo del material vegetal usado en la extracción cuanto más fino es el tamaño de partícula, mejor resultado se logrará en la extracción (Zhang, 2018), para enriquecer el extracto de las saponinas se puede utilizar el sistema basado en la extracción en fase sólida (Khakimov, 2016) y para la purificación se puede usar la cromatografía ultra rápida Flash (Lacaille-Dubois, 2016).

Para la detección preliminar de saponinas se realiza una prueba de formación de espuma o la técnica de hemólisis de eritrocitos, donde al extracto acuoso se añade agua destilada y se agita vigorosamente la formación de abundante espuma, nos confirman su presencia (Lock de Ugaz, 1994), o al extracto etanólico al 70% se añade unas gotas de sangre al residuo y provocará la hemólisis confirmando la presencia de saponinas (Wagner Blatt, 1996)

2.1.7. Análisis por cromatografía en capa fina y/o Análisis por Cromatografía en Capa delgada

El término cromatografía deriva de las palabras griegas “chroma” (color) y “graphein” (escribir), denominada así, a principios del siglo XX por el Botánico Ruso Mikhail Tswett, empleando la técnica para separar varios pigmentos vegetales, como clorofilas y xantófilas. Es una técnica que se ha convertido en un método de separación que tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia y permite a los investigadores utilizar esta técnica de separación de componentes de mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios (Skoog, 1992).

La Cromatografía de capa fina (TLC) nos permite detectar la presencia de saponinas de manera cualitativa para ello se hace uso de un soporte plano como una lámina de aluminio que está recubierta con una capa delgada de gel de sílice o alúmina, esto viene a constituir la fase estacionaria donde se aplica el extracto. La muestra se disuelve en un solvente apropiado y se aplica, luego para lograr la

separación se hace uso de una fase móvil, un solvente que asciende a lo largo de la fase estacionaria por capilaridad al entrar este en contacto, consiguiendo de esta manera la separación. Luego para detectar la presencia de los metabolitos separados se utiliza reactivos de localización que permiten su detección visual por la formación de color.

Se puede usar la cromatografía en capa delgada para la detección de las saponinas, para ello se utiliza el extracto etanólico, en un cromatoplasca preparada comercialmente en base a sílica gel, se corta un pequeño tamaño de placa y se aplica entre 20 a 40 μ L del extracto, la fase móvil está constituida por cloroformo, ácido acético glacial, metanol y agua (64:32:12:8), también se puede usar cloroformo, metanol y agua (70:30:4) o acetato de etilo, etanol, agua y amoníaco (65:25:9:1), para la detección de saponinas se pueden usar el reactivo vainillina y ácido sulfúrico, las saponinas forman zonas coloreadas de azules, azul-violetas y, a veces rojas o amarillo-marrón a la luz visible, anisaldehído y ácido sulfúrico, se visualiza en luz ultravioleta a 365 nm zonas fluorescentes de azules, violetas y verdes (Wagner Bladt, 1996).

Las saponinas tienen un elevado peso molecular y su aislamiento en estado puro es bastante difícil. Estas al ser hidrolizadas por ácidos, dan una genina (sapogenina) y diversos azúcares. Hoy en día se sabe que las saponinas son sustancias muy polares, y esto hace posible que pueda extraerse en caliente o en frío con agua o alcoholes de bajo peso molecular. Al concentrar la solución alcohólica se pueden separar las saponinas y después cristalizarlas en mezclas de alcohol-agua. Para obtener sapogenina se puede también hidrolizar las saponinas con sus enzimas naturales de origen microbiológico o hidrolizarlas con ácidos, después se extraen con benceno, éter de petróleo o acetona y se cristalizan (Medilina, 1993 y Santa Cruz, 1987).

Para la identificación de saponinas triterpénicas de raíces de *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae) utilizaron cromatografía en capa fina (TLC) y en capa fina preparativa (CCDP) con gel de sílice 60 G y 60 GF254 (Merck). La visualización de los compuestos en CCD se realiza mediante irradiación con luz ultravioleta a 254 y 366 nm y/o rociando con una solución de H₂SO₄/MeOH (1:1), H₂SO₄/anisaldehído/ácido acético (1:0.5:50) mL seguido de calentamiento (Neves de Oliveira, 2008).

2.1.8. Extracción en Fase Sólida (SPE).

La microextracción en fase sólida (SPE) es una técnica de adsorción y desorción muy eficaz y simple, que inclusive elimina la necesidad de disolventes o equipos sofisticados para concentrar compuestos volátiles o no volátiles en las muestras de estudio. La SPE es compatible con la separación y detección de analitos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento y proporciona resultados cuantificables para muestras de baja concentración (Alpendurada, 2000).

Para poder purificar las saponinas se utilizan un adsorbente de sílica modificada denominada C18, este aparte de purificar permite la limpieza de las saponinas retenidas. (Oleszek, 1987 y Simpson, 2000).

La técnica de microextracción en fase sólida (SPE) es utilizada para purificar muestras y someter a las distintas pruebas, ya que está considerada como una técnica ampliamente utilizada en el tratamiento y concentración de muestras antes del análisis por HPLC (Wagner Bladt, 2001).

La extracción en fase sólida SPE es una técnica que permite concentrar y poder separar la muestra (analito) catiónico o aniónico de una matriz compleja, mediante una fase sólida estacionaria. Como resultado, se elimina la matriz interferente, no retenida y, el analito se puede analizar con la mejor sensibilidad posible. Un método de extracción fase sólida consta de cuatro etapas:

Etapa 1: **Acondicionamiento** preparación del adsorbente para procesar la muestra.

Etapa 2: **Retención** filtrar los analitos deseados o los componentes no deseados.

Etapa 3: **Aclarado** arrastre por lavado de cualquier elemento no deseado que haya sido retenido simultáneamente.

Etapa 4: **Elución** desorción selectiva y recogida del analito de interés.

2.1.9. Análisis por cromatografía líquida HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica cromatográfica muy potente y versátil para la preparación de productos naturales en matrices complejas, como extractos crudos para la detección y cuantificación selectiva o perfil general (Wolfender, 2009)., para la identificación y determinación de saponinas el método más común empleado es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Marston, 2000). La columna de fase inversa C18 parece más adecuada para

separar las saponinas triterpenoides que la columna de fase normal. La fase móvil está formada por agua que contiene ácidos, como ácido fosfórico, fosfato, ácido acético, ácido fórmico y ácido perclórico y metanol o acetonitrilo. A veces, se añade tetrahidrofurano en la fase móvil para mejorar la resolución cromatográfica para la fase reversa. El gradiente de elución se utiliza a menudo para la determinación simultánea de múltiples compuestos de saponinas triterpénicas en la muestra (Zhang & Qu, 2013)., para la separación de las saponinas se puede realizar en una columna C18 de tamaño de partícula de 5 μ m 250 mm 4,6 mm, con un flujo de 0.5 mL/min con una fase móvil conformada por 90% para la separación de las saponinas se puede realizar en una columna C18 de tamaño de partícula de 5 μ m 250mm 4,6 mm, con un flujo de 0.5 mL/min con una fase móvil conformada por 90% A (H₂O 0.1% ácido fórmico) y 10% B (acetonitrilo 0.1% ácido fórmico) con un gradiente lineal a 70% A en 60 min, seguido de otro gradiente lineal hasta el 10% de A a los 80min (Khakimov, 2016), con diferentes tipos de detectores se utiliza a menudo para determinar cuantitativamente o perfilar las saponinas triterpenoides que carecen de cromóforos, su absorbancia ultravioleta depende del grado de instauración que está cerca del rango de 200-250 nm con intensidad débil (Zhang, & Qu, 2013), se puede utilizar un detector por arreglo de diodos a una longitud de onda de 203nm y mantener la temperatura a 30°C (Chen, 2007). (Qian, 2009). También es común usar detectores por evaporación de luz dispersiva (ELSD) o por espectrometría de masas (Cheng, 2011). La cromatografía HPLC preparativa (prep-HPLC) se ha convertido en un pilar de aislamiento en la purificación de productos naturales (Latif, 2012). se puede utilizar para la purificación y aislamientos de los extractos ricos en saponinas (Liu, 2019).

La cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC es uno de los métodos más usados para el análisis y la separación de los componentes químicos de una mezcla de sustancias. En este método participan la fase móvil y estacionaria o soporte (inmiscibles entre sí) como cualquier otra cromatografía y la muestra de interés. Las distintas fuerzas físicas y químicas que actúan entre la mezcla (muestra problema) a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla (Fallon, Booth Bell, 1987).

Para la determinación de saponinas utilizan la combinación de diferentes técnicas cromatográficas por ejemplo la separación de la mezcla en subfracciones más simples en la fase inversa C 18 debe ir seguida de una purificación en una

columna de gel de sílice de fase normal ya que es difícil su determinación en materiales vegetales ya que estos compuestos no poseen cromóforos y sus perfiles no pueden registrarse en UV (Oleszek, Bial 2006).

Los triterpenos pentacíclicos ácido Oleanólico (OA) y ácido ursólico (UA) en *Salvia trilobason* aditamentos para formulaciones cosméticas y farmacéuticas; que son isómeros de constitución solo difieren en la posición de un grupo metilo en sus estructuras químicas. Es difícil lograr una separación de línea base mediante sistemas estándar de RP-HPLC. Las condiciones cromatográficas óptimas para sustancias puras, así como para extractos que contienen surfactante crudo se lograron separar en una columna Nucleodur C18 ISIS mediante elución isocrática con metanol / agua / ácido acético / trietanolamina (90: 10: 0.04: 0.02 v / v) como la fase móvil y una temperatura de columna de 10 °C. El caudal fue de 0,6 ml / min y la longitud de onda de detección fue de 210 nm (Schneider, 2011).

DIAGRAMA DE UN CROMATÓGRAFO LIQUIDO DE ALTO RENDIMIENTO

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se desplaza con la fase móvil, que es un líquido de la fase estacionaria que es inmisible con la fase móvil (Wagner, & Blatt, 2001)

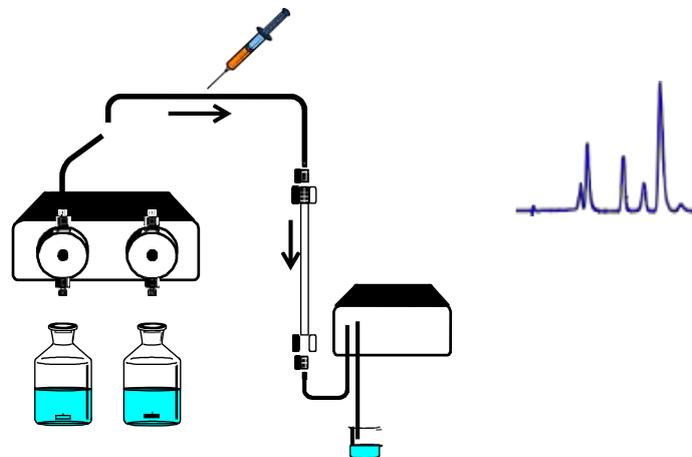


Figura 13: Esquema de un cromatógrafo líquido HPLC

Fuente Agilent Technologies

<http://www.chem.agilent.com/>

La información obtenida por el HPLC se utiliza para realizar el fraccionamiento por cromatografía flash.

2.1.10. Efecto antibacteriano

El efecto antibacteriano está definido como la capacidad de producir la muerte a una bacteria por alguna sustancia; en otras palabras, provocan lisis en las mismas. (Fernández García 2009).

El término antibacteriano esta referido a aquella sustancia cuyas propiedades son capaces de eliminar agentes bacterianos o generan la inhibición de su crecimiento o proliferación sin incurrir en el daño del objeto, ambiente u organismo que las porta.

Son considerados como agentes químicos capaces de combatir estos cuerpos (Morejon, 2008).

Las sustancias que poseen propiedades antibacterianas se pueden clasificar en dos tipos según la acción que ejerce sobre las bacterias, estos son, **bactericidas** y **bacteriostáticos**. Los bactericidas son aquellos que eliminan a las bacterias, mientras que los antibacterianos bacteriostáticos impiden el crecimiento de estas (Werth 2022).

Los antibacterianos pueden actuar de varias formas en las **bacterias**, en la pared celular para evitar su crecimiento, sobre la membrana celular para que sea permeable y que el principio tenga acceso al interior, en el ADN de la bacteria para dañar su estructura o sobre los ribosomas para que no sea capaz de sintetizar las proteínas que la mantienen con vida (Calvo, 2008).

Muchos antibacterianos son plantas que corresponden así a un importante grupo de estas sustancias, las cuales pueden actuar como un tipo de medicina natural en el organismo (Rodriguez Saucedo, 2011).

Las saponinas con una cadena de azúcares unida al carbono-3 tienen gran actividad microbicida. Esta actividad depende de la ramificación de los azúcares (Fig. 7) (Hostettmann et al., 1995).

2.1.11. Concentración mínima inhibitoria (MIC)

La concentración mínima inhibitoria (MIC) se define como la concentración más baja a la cual un antimicrobiano inhibirá el crecimiento que pueda ser visible de un microorganismo después del proceso de someterlo a una incubación durante un periodo pertinente. Los laboratorios utilizan las CIM para confirmar la resistencia, como una herramienta de investigación para determinar la actividad in vitro de nuevos antimicrobianos (Andrews, 2001).

2.1.12. Mecanismo de acción

Los mecanismos por los cuales los principios activos que poseen o están presentes en las plantas pueden causar la destrucción o inhibición de los microorganismos. Los metabolitos antimicrobianos actuarían en los siguientes puntos:

- Degradación de la pared celular,
- Daño a la membrana citoplasmática,
- Daño a las proteínas de membrana,
- Filtración del contenido celular,
- Coagulación del citoplasma y
- Agotamiento de la fuerza motriz de protones (Ultee et al., 2002)

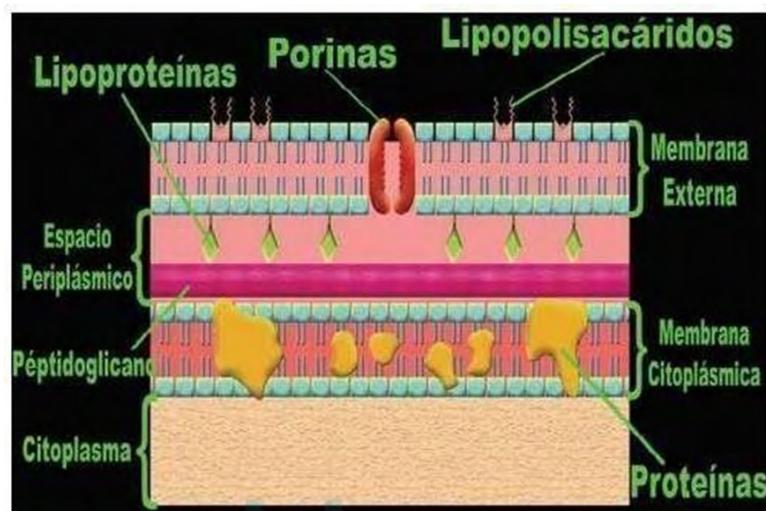


Figura 14: Estructura de la pared de una bacteria gram-negativa

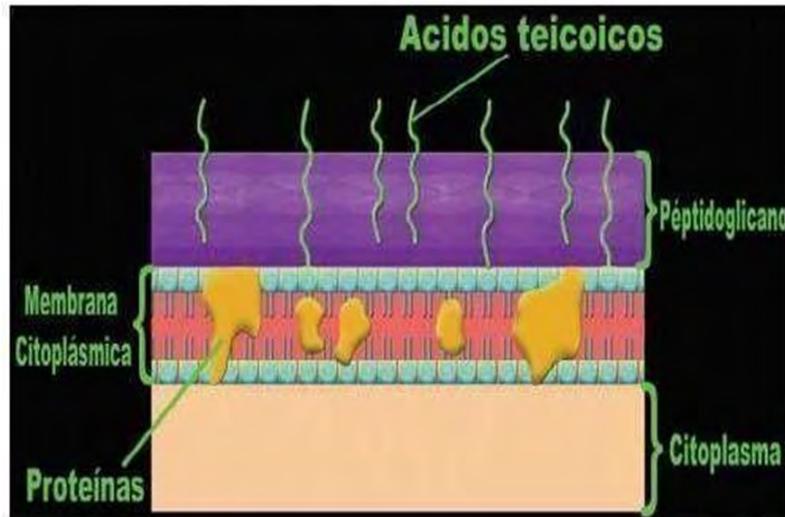


Figura 15: Estructura de la pared de una bacteria gram-positiva.

2.2. Antecedentes empíricos de la investigación

1. Amaya C. & Gutiérrez N. (2004) evaluaron la actividad antimicrobiana y antifúngica del extracto etanólico del fruto de *Sapindus saponaria*, compararon los extractos etanólicos de la cáscara seca y no seca verificando que el extracto de la cáscara del fruto seco inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Trichophyton mentagrophytes* a una concentración de 45.0% y 50% respectivamente. En dicha investigación también se realizó un análisis fitoquímico, identificaron la presencia de: saponinas, taninos y sesquiterpenlactonas.
2. Lavaud C. y colaboradores (2015). Aislaron cinco saponinas triterpenoides nuevas y una conocida del extracto metanólico de la corteza de la raíz de *Zanha golungensis Hiern* extrajeron por reflujo con metanol al 80%, purificaron en silicagel con gradiente, purificaron 5 fracciones, las cuales elucidaron por análisis espectroscópicos UV-Vis, RMN H, C. Estos contienen ácido zánico como aglicona, un triterpenoide de tipo oleanano. Los nuevos compuestos los denominaron *zahasaponinas* D-H.
3. Cruz-Carrillo, Anastasia (2010) investigaron cuatro especies vegetales con extractos etanólicos de hojas de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*, los cuales fueron sometidos a un análisis microbiológico in vitro, para establecer su actividad antibacteriana y sus

concentraciones mínimas inhibitoria y bactericida, en respuesta a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Dichos extractos mostraron actividad contra *S. aureus*; donde la que mostro la mejor actividad fue *B. pilosa* y *L. camara*, *S. molle* y *S. marianum* mostraron capacidad moderada para inhibir el crecimiento de *S. aureus* verificándose que las plantas seleccionadas presentan actividad antibacteriana frente a *S. aureus*.

4. Soto Vásquez, (2015), Evaluaron la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus L.* el cual fue preparado mediante la técnica de extracción de reflujo con etanol al 70%. Y su tamizaje fitoquímico evidenció la presencia de catequinas, lactonas, saponinas, compuestos fenólicos, taninos, quinonas, flavonoides y leucoantocianidinas. Para realizar el ensayo antimicrobiano se empleó el método de difusión en pozos según Kirby- Bauer. El extracto etanólico mostró actividad antimicrobiana frente *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a todas las concentraciones ensayadas (5, 15 y 30%). Las concentraciones inhibitorias mínimas fueron de 1,0 y 2,5 mg/mL para *S. aureus* y *E. coli* respectivamente.
5. Calle Álvarez Jairo, (1998) Utilizaron la corteza de *Inga marginata willde* y probaron la actividad biológica de las saponinas, taninos, fitosteroles y triterpenoides, encontrándose cinco saponinas por cromatografía de capa delgada. Con el extracto etanólico y las saponinas crudas se realizaron ensayos para determinar su actividad antibacteriana, antifúngica y farmacológica con ratas Wistar y ratones OF-1, e ictiotóxica sobre el pez Guppy (*Poedlia reticulata*) Peters. Las saponinas de la corteza poseen actividad depresora sobre el SNC en ratas y ratones. La actividad contra bacterias es baja, mientras que contra hongos se manifiesta. Las saponinas presentes inhiben el crecimiento de tumores en los discos de zanahoria en un 99%. Son toxicas para el pez Guppy (*Poedlia reticulata*), CL50 a 96 h: 5,5 mg/L.
6. Oleszek. W (1988) extrajeron en fase sólida la fracción de saponinas de alfalfa, desarrollaron un método sencillo para aislar saponinas de alfalfa y fraccionar en ácido medicagénico, hederagenina y glicósidos de soyasapogenol. Este método se basa en la extracción selectiva de saponinas

en una fase sólida C18 con soluciones de metanol-agua. Selectividad del sorbente C para retener las saponinas depende fuertemente del pH de la muestra cargada. La característica fue la base de un nuevo método de cromatografía en columna para aislamiento de saponinas individuales.

7. Silver, L. L, K. A. Bostian, (1993) "Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance", En esta revisión están algunas metodologías utilizadas para la evaluación de la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal.
8. Rodríguez Pava Cristian Nicolás, (2017) Antimicrobial activity of four varieties of plants against pathogens clinical significance in Colombia. Evalúan la actividad antimicrobiana de los extractos de las plantas *Bauhinia sp.*, *Sambucus nigra*, *Eichhornia crassipes* y *Taraxacum officinale* frente a patógenos de importancia clínica. Los extractos crudos someten a análisis fitoquímico comprobando la presencia de flavonoides, terpenos, saponinas, fenoles, quinonas y alcaloides que actividad antimicrobiana en diferentes concentraciones y separan las fracciones por cromatografía en capa fina, de los cuales el que presenta mejor inhibición fue el más eficaz los tallos de *T. officinale*.
9. Jiang Liu et al. (2013). Aislaron tres saponinas de tipo 18-oleano, lupino y 12-oleano junto a cuatro saponinas triterpenoides de las yemas de *Lonicera macranthoides* evaluándose actividades citotóxicas contra células HSC-2.
10. Carolina Isabel Ulloa Heras (2018) Evaluación *in vitro* de la capacidad inhibitoria de saponinas presentes en el penco (*Agave americano*) frente a *Fusarium sp.* Cuenca – Ecuador. Evaluaron *in vitro* la capacidad inhibitoria de las saponinas presentes en el penco (*Agave americano*) frente a *Fusarium sp.* Y comprobar su poder biofungicida.

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1. Hipótesis

3.1.1. Hipótesis general

Las fracciones obtenidas de la raíz de *Colignonia parviflora var. biumbellata Raf.* presentan efecto antibacteriano frente al *Escherichia coli ATCC 51813*.

3.2. Identificación de Variables e Indicadores

3.2.1. Variable Independiente

Las Fracciones de saponinas aisladas de la raíz de *Colignonia parviflora var. biumbellata Raf.*

3.2.2. Variable Dependiente

Efecto antibacteriano de las fracciones de saponinas aisladas de la raíz de *Colignonia parviflora var. biumbellata Raf. sobre Escherichia coli.*

3.3. Operacionalización de la Investigación

Variables	Indicadores	Definición	Naturaleza	Medición	Metodología	Instrumento de medición	Resultados
Independiente Las Fracciones de saponinas aisladas de la raíz de <i>Colignonia parviflora</i> var. <i>biumbellata</i> Raf	Evidenciade saponinas	Saponinas metabolito presente en extracto	Cualitativo	Directa	Se obtuvo el extracto con saponinas, se confirmó su presencia por métodos cualitativos se obtuvo su HPLC y se sometió a acción antimicrobiana con E. coli	Cromatoplaça HPLC Cromatógrafo Flash	Rf Espectros UV Fracciones
Dependiente Efecto antibacteriano de las fracciones saponinas aisladas de la raíz de <i>Colignonia parviflora</i> var. <i>biumbellata</i> Raf. frente a <i>Escherichia coli</i>	Inhibición de las fracciones extraídas (halos en mm)	Efecto antibacteriano de las fracciones obtenidas	Cuantitativo	Directa	Se verifico el efecto antimicrobiano de las fracciones aisladas de la raíz de <i>Colignonia parviflora</i> var. <i>Biumbellata</i> Raf. presentando mayor inhibición el de mayor concentración.	Análisis en Agar Mueller-Hinton por el método de disco e inhibición de las fracciones de saponinas	Halos de Inhibición de las fracciones de saponinas

Figura 16: Operacionalización de variables

IV. METODOLOGÍA

4.1. Ámbito de estudio

El lugar geográfico que se escogió fue la región del Cusco. El muestreo de la especie vegetal en estudio se realizó en forma aleatoria (Anexo 02), tomando en consideración únicamente las plantas que tengan tamaño de un metro y medio aproximadamente los cuales tendrán el tamaño de la raíz considerable y una muestra para el herbario, el lugar de muestreo fue el sector de Tankarchayoc, localidad de Pumamarca, distrito de San Sebastián, provincia del Cusco a una elevación de 3 420 m, en mes de marzo. La época de muestreo correspondió a época de lluvias.



Figura 17: Ubicación del lugar de la colecta de la planta objeto de la investigación

Para la identificación de la especie vegetal se siguieron las técnicas de campo utilizadas por el Jardín Botánico de Missouri, EE. UU. La especie colectada fue identificada en el Herbario Vargas de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco y también se dejó un ejemplar para el herbario Vargas Cuzco, la cual se presenta en el Anexo 01.

4.2. Tipo y nivel de investigación

Investigación cuantitativa, se observó los fenómenos por medio de los análisis experimentales reportando los resultados. (Hernández Sampieri, 2014)

4.3. Unidad de análisis

La unidad de análisis son las fracciones del extracto de raíz de *Colignonia parviflora var. biumbellata* sacha paraccay.

4.4. Población de estudio

Raíces de la especie de *Colignonia parviflora var. biumbellata* del sector de Tankarchayoc, localidad de Pumamarca, distrito de San Sebastián, provincia del Cusco a una elevación de 3 420 m de altitud.

4.5. Tamaño de muestra

Se colectó plantas de un metro y medio de tamaño aproximadamente los cuales tenían una raíz considerable obteniéndose aproximadamente 3 Kg de muestra de raíz.

4.6. Técnicas de selección de muestra

En forma aleatoria, tomando en consideración únicamente las plantas que tengan tamaño de un metro y medio aproximadamente y en época de lluvias. Luego llevado al laboratorio para su secado.

4.7. Técnicas de recolección de información

Fichas de recolección de datos

4.7.1. Materiales De Investigación

Muestra Vegetal

Raíces de la especie *Colignonia parviflora var. biumbellata* Raf. Sacha paraccay.

Muestra microbiológica

Cepas de *Escherichia coli* ATCC 51813

4.7.2. Materiales, Instrumentos y Equipos

Material de muestreo de Campo

- Prensa botánica
- Libreta de campo
- Lapiceros marcadores
- Tijera de podar
- Cámara fotográfica
- Pico

- Papel periódico

Material de Laboratorio

- Algodón
- Asas de siembra
- Bagueta
- Botellas de vidrio de color oscuro de 100, 200, 500 y 1000mL.
- Embudos
- Matraz aforado de 100 y 200 mL
- Frascos de vidrio
- Goteros
- Gradilla
- Hisopos
- Jeringas descartables de 10 y 20 mL
- Lámpara ultravioleta
- Matraz de 100 y 250 mL.
- Mechero Bunsen
- Micropipetas calibradas con sus puntas correspondientes.
- Molino
- Mortero
- Papel Craf
- Papel filtro Whatman 42
- Pinzas
- Pipetas de 1,5,10 y 25 mL.
- Placas Petri
- Probeta 10, 50,100 y 500 mL
- Tubos de ensayo
- Tubos Falcon de 15mL
- Vasos precipitados de 50, 100, 250 mL
- Viales de 10 y 20 mL y sus aplicadores para TLC

Equipos de Laboratorio

- AccuBond SPE ODS-C18 Cartridges
- Autoclave Vertical AV Phoenix.
- Balanza analítica H.W. Kessel S.A.
- Balanza analítica OHAUS explorer Pro

- Baño de ultrasonido BRANSON
- Baño María Fisher Cientific
- Baño de ultrasonido (sonicador) Branson
- Cámara climatizada Binder
- Cámara Cromatográfica de Vidrio
- Cámara de extracción en fase solida Agilent Technologies
- Campana de extracción Fisher
- Centrifuga GreedMed
- Cocina eléctrica
- Cromatofolio Silica gel 60 F – 254 Merck
- Cromatoplaque de silicagel C18 soportadas en aluminio de 3.5 x 4.6 cm
- Equipo de Cromatografía Flash Isolera One Biotage
- Equipo de Cromatografía HPLC DAD Agilent 1200
- Equipo de filtración al vacío Vacuum Manifold
- Estufa 120 VAC Fisher Scientific.
- Horno Pasteur Memmert.
- Microscopio estereoscópico
- Refrigeradora Coldex
- Rota vapor IKA RV10 Digital
- SPE adaptador para cartuchos
- SPE Sistema colector para vacío

Solventes y Reactivos

- Acetona HPLC Baker J.T
- Acetonitrilo
- Ácido clorhídrico
- Acido fórmico
- Agua destilada
- Agua ultrapura Barnsted
- Cloroformo
- Cloruro férrico
- Etanol a 70°
- Magnesio metálico
- Metanol
- Reactivo Dragendorf
- Silica gel en fase Normal Merck
- Silica gel en fase reversa C 18 Merck

- Vainillina

Medios de Cultivo

- Agar Mueller-Hinton

4.7.3. Parte Experimental

4.7.3.1. Extracción y aislamiento de Saponinas

La raíz que es de tamaño grande anexo 02 se procedió a trozar en pequeñas porciones para poder secarlas a temperatura ambiente, luego del secado de la muestra de raíz de *Colignonia parviflora var. Biumbellata Raf s'acha paraccay* se redujo su tamaño en un molino y mortero, para la extracción se pesó 10.00 g de muestra el cual se desarrolló por maceración con etanol al 70% (Hakim, 2021) durante 24, 48 y 72 horas, el cual fue sometido a un proceso de extracción alcohólica hasta agotamiento y se filtró, se obtuvo 355 mL del extracto luego se concentró a presión reducida junto con 6g silicagel, el extracto bruto se concentró en el rotavapor, después se sometió a filtración en fase inversa obteniéndose el extracto de saponinas y se pasó al SPE para purificar de mejor manera (Wagner & Bladt, 2001), luego se obtuvo el porcentaje de rendimiento el cual fue del 5.14%, del cual con parte del extracto obtenido se realizó las pruebas fitoquímicas preliminares a través de reacciones a la gota y la identificación del tipo de núcleo de la saponina previo a una hidrólisis, HPLC y microextracción en fase sólida (SPE) para purificar la muestra y someterla a las distintas pruebas. (Wagner & Bladt, 2001).

Para poder verificar la presencia de saponinas en la muestra se procedió a realizar el análisis preliminar o tamizaje fitoquímico en el que se utilizó 0.5 a 1 mL del extracto y 1 mL de los reactivos correspondientes.

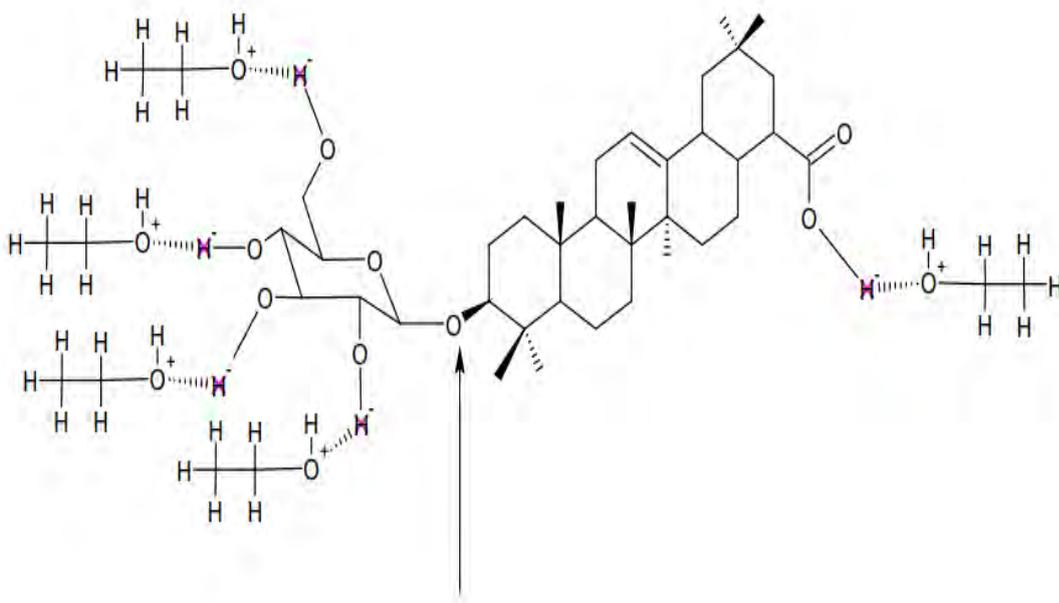


Figura 18: Enlaces débiles que se forman durante la extracción de las saponinas

4.7.3.2. Cromatografía en capa fina TLC

Para evidenciar la presencia de saponinas en el extracto se utilizó la técnica de análisis por cromatografía en capa fina TLC Silica-gel comparado con un ácido triterpénico y colesterol con anillo esteroidal para poder identificar el tipo de núcleo de la saponina.

4.7.3.3. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

Para la separación por HPLC se pesa 100 mg de del extracto de saponinas y se agrega 100 μ L (3v metanol:1 agua acidulada) para activar; se usó el método de elución en gradiente, donde la composición de la fase móvil que se usó fue ácido fórmico al 0.1% y acetonitrilo se inició con 20% de B hasta 100% de B en 25 minutos los cuales se eligió para lograr una buena forma y resolución de los picos y un tiempo de análisis relativamente corto a una longitud de onda de 200 nm ya que es la longitud a la cual presenta mayor absorción, mostrándose 17 picos donde los tiempos de retención varían desde 2 a 25 minutos para cada uno de los picos obtenidos. (Figura 20)

Se utilizó la técnica de cromatografía HPLC para verificar la presencia de saponinas en el extracto crudo, se compararon con los espectros UV estándar que se encuentran en la librería del equipo (Chen 2007) y (Fallon 1987).

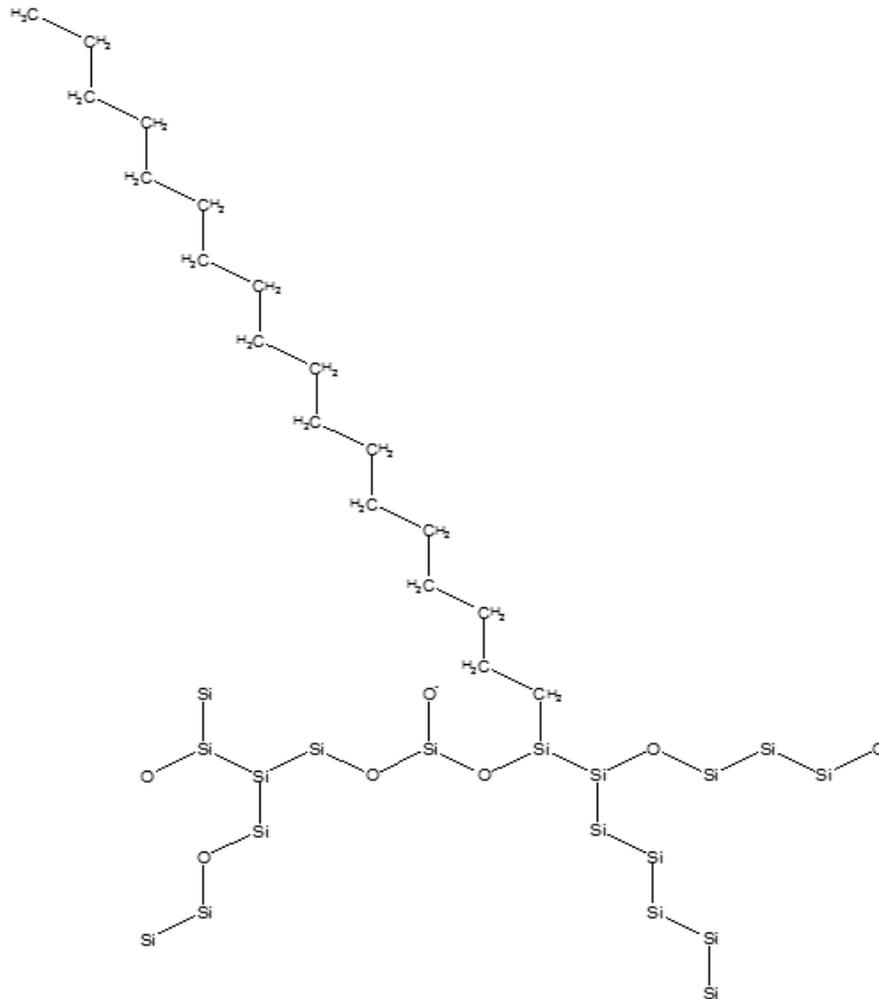


Figura 19. La interacción hidrofóbica entre el ligando C 18 y el compuesto

Interacciones polares

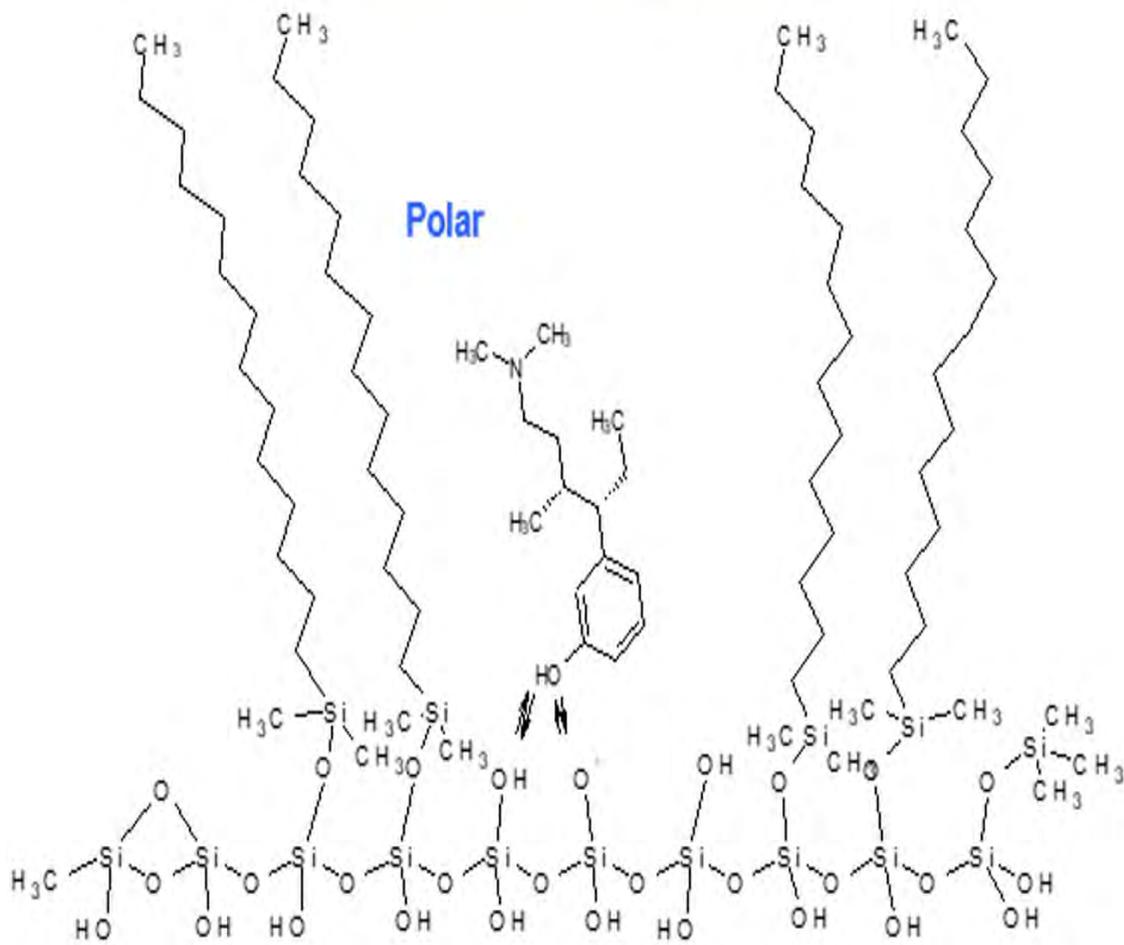


Figura 20. Interacciones que ocurren en el HPLC

4.7.3.4. Cromatografía Flash

El análisis realizado al cromatograma del extracto rico en saponinas, cuya detección fue a 200 nm, se cargó la muestra en una columna SNAC C18, para lo cual se disolvió 200 mg del extracto de saponinas con etanol al 70%, se mezcló con 2 g silicagel en fase reversa C18, utilizándose para su fraccionamiento acetonitrilo y ácido fórmico al 0.1%, la detección se realizó a 200 nm; se colectaron 35 fracciones de 5 mL cada uno y se sometieron a cromatografía TLC cada una de ellas, agrupándose aquellas que tenían Rf iguales para su posterior análisis, así mismo se visualizó diferentes colores los cuales cambian a longitudes de onda (señales) UV diferentes.

4.7.3.5. Determinación del efecto antibacteriano de las fracciones obtenidas por Cromatografía Flash

Luego de la colecta de las fracciones por cromatografía flash se verificó por TLC cada una de las fracciones concentrándose en 06 fracciones ya que tuvieron los mismos Rf y con ellos se procedió a verificar el efecto de la actividad antibacteriana de las fracciones de saponinas extraídas de *Colignonia parviflora* var. *biumbellata*, por el método de discos, midiéndose los halos de inhibición de la bacteria *Escherichia coli*. (Yadava y Jharbade, 2008).

4.7.3.6. Medición de los halos de inhibición

Se preparó las placas Petri con el agar Mueller-Hilton (con un espesor de 4mm aproximadamente), se extendió sobre las placas de agar colonias de *E. coli* utilizando hisopos de algodón esterilizados y posteriormente se procedió a colocar los discos (los que previamente se pusieron soluciones de concentraciones de 5, 10 y 50 $\mu\text{L}/\text{mg}$ de cada fracción aislada) estos se inocularon sobre la superficie del agar presionando suavemente cada disco con la punta de la pinza, para asegurar el contacto firme con la superficie del agar, y asegurar de esta manera la difusión de los extractos, colocándose de 4 a 5 discos por placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan, el tiempo en que se colocó estos discos no excedió los 15 minutos, (tiempo óptimo para la colocación de los mismos), al término del cual se procedió a incubar las placas a 37°C por un lapso de 24, 48 y 72 horas respectivamente para su lectura y medición de los halos

correspondientes.

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a medir los diámetros de los halos de inhibición utilizando una regla milimétrica. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

4.8. Técnicas de análisis e interpretación de la información

Se utilizó diferentes técnicas de aislamiento, identificación y verificación, como son aislamiento utilizando un solvente, la identificación con TLC, HPLC, espectros UV.

4.9. Técnicas para demostrar la verdad o falsedad de las hipótesis planteadas

Se realizaron diferentes técnicas cromatográficas como TLC, HPLC, espectros y el análisis antibacteriano.

- Cromatografía en placa fina TLC
- Cromatografía HPLC
- Espectros UV
- Análisis antibacteriano de inhibición por el método de discos



Figura 21: Metodología experimental desarrollada

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Resultados

5.1.1. De la Identificación de Compuestos Fitoquímicos - Análisis Fitoquímico Obtenido del Extracto

Tabla 1

Análisis fitoquímico preliminar o tamizaje fitoquímico

Muestra	Saponinas	Rosenthaler	Compuestos Fenólicos	Alcaloides	Esteroides y triterpenos	Taninos	Flavonoides
Extracto	+++	+++	+	-	+++	++-	-

Dónde:

Abundante : +++

Poco : ++

Muy poco : +

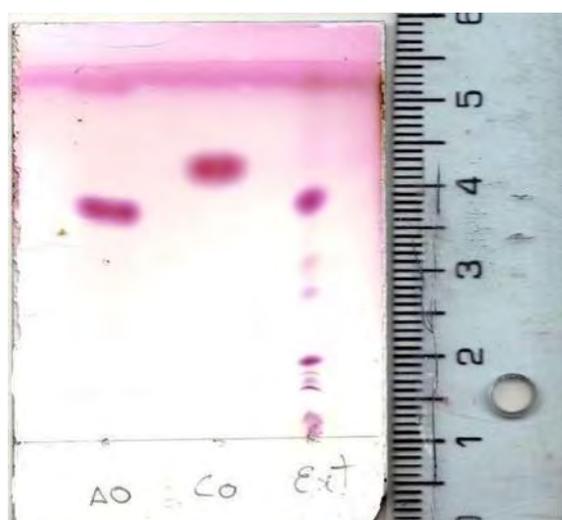
Ausente : -

- Del análisis fitoquímico en el cuadro 01 se puede evidenciar la presencia de saponinas en cantidad abundante por la formación de espuma así mismo en la prueba de rosenthaler que dio un color violeta confirmarían la presencia de saponinas triterpénicas en la muestra objeto de estudio (Anexo 4)

5.1.2. De la Cromatografía en capa fina del extracto rico en saponinas

Se realiza la cromatografía en capa fina utilizando como estándar un ácido triterpénico como es el ácido oleanólico, colesterol y el extracto rico en saponinas los cuales muestran colores lilas mostrados en la figura 18, siendo los valores de Rf Acido Oleanólico 0.66, Colesterol 0.77 y el extracto rico en saponinas 0.66 cuadro 02 respectivamente, coincidiendo el valor de Rf entre el ácido oleanólico (proporcionado por el asesor) y uno de los Rf del extracto a pesar de haber muchos componentes del cual desconocemos en el extracto; así como sus coloraciones que se forma teniéndose

una estimación o aproximación que podría tratarse de una saponina triterpénica dado de que el ácido oleanólico es un ácido triterpénico y para este análisis se hizo una hidrólisis con HCl 3 M (Fase móvil CHCl₃: MeOH/48:2) y se reveló con H₂SO₄ al 10% y vainillina en calor (Wagner H, S. Bladt 1996).



- AO = Acido Oleanólico (ácido triterpénico)
- CO = Colesterol
- Ext = Extracto rico en saponinas

Figura 22: Cromatografía en capa fina del extracto rico en saponinas

Tabla 2
Posición de las zonas reveladas en TLC y Rf

	Zonas	Distancia	Rf	Color
Solvente		4.4	1	
Ácido oleanólico	AO	2.9	0.66	Fucsia
Colesterol	Co	3.4	0.77	Fucsia anaranjada
Extracto de saponina	Ext	2.9	0.66	Fucsia

- Del análisis se podría confirmar la presencia de anillo triterpénico en el extracto por el Rf similar al ácido Oleanólico.

5.1.3. Del análisis por HPLC y obtención de los cromatogramas del extracto rico de saponinas

El extracto de saponinas se analizó por HPLC – DAD Agilent 1200 controlado por computadora con software Chemstation Rev. B.03.01 SR1 utilizándose para su fraccionamiento acetonitrilo y ácido fórmico al 0.1%, utilizándose los resultados para comparar con los espectros ultravioleta patrones para el fraccionamiento por HPLC.

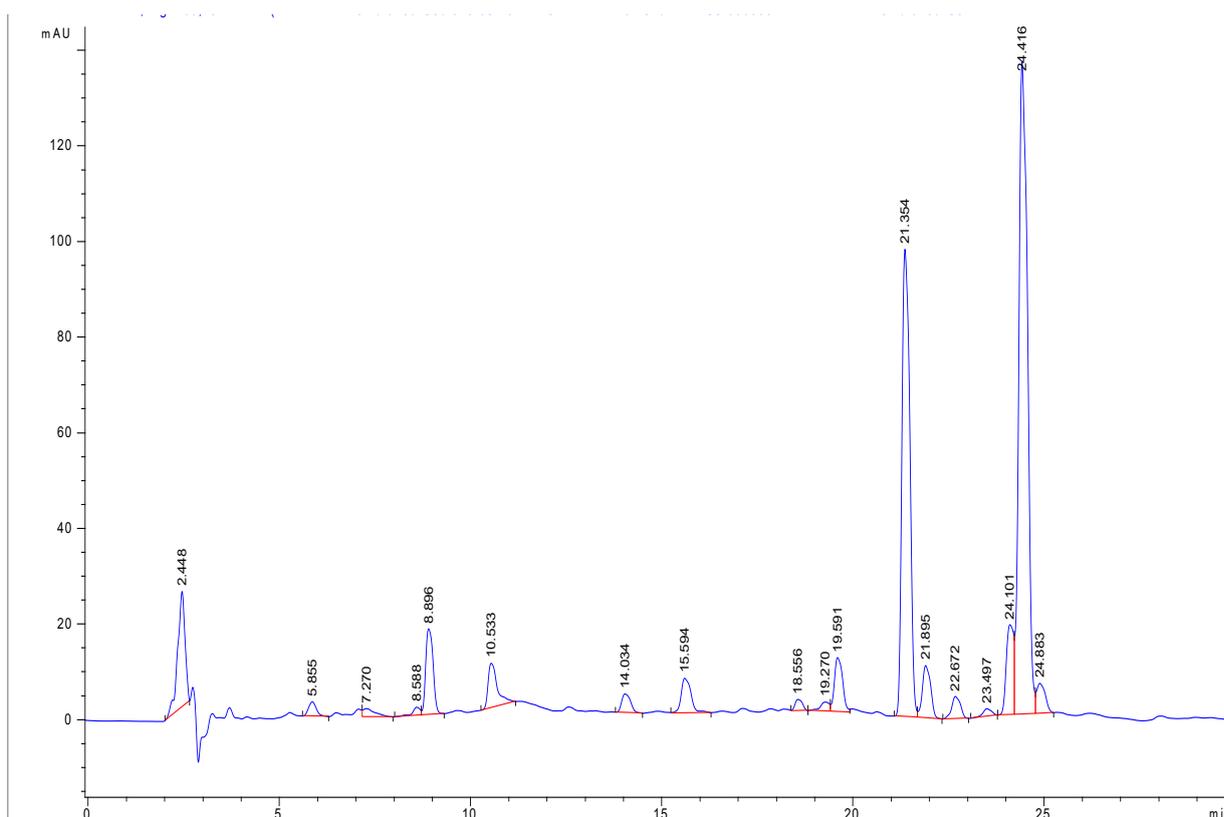


Figura 23: Cromatograma HPLC del extracto rico de saponinas

El análisis por HPLC confirmó los resultados de la cromatografía TLC realizado figura 18, donde podría estar presente el anillo triterpénico del oleanano de las saponinas triterpénicas, el cromatograma nos mostró 17 compuestos separados.

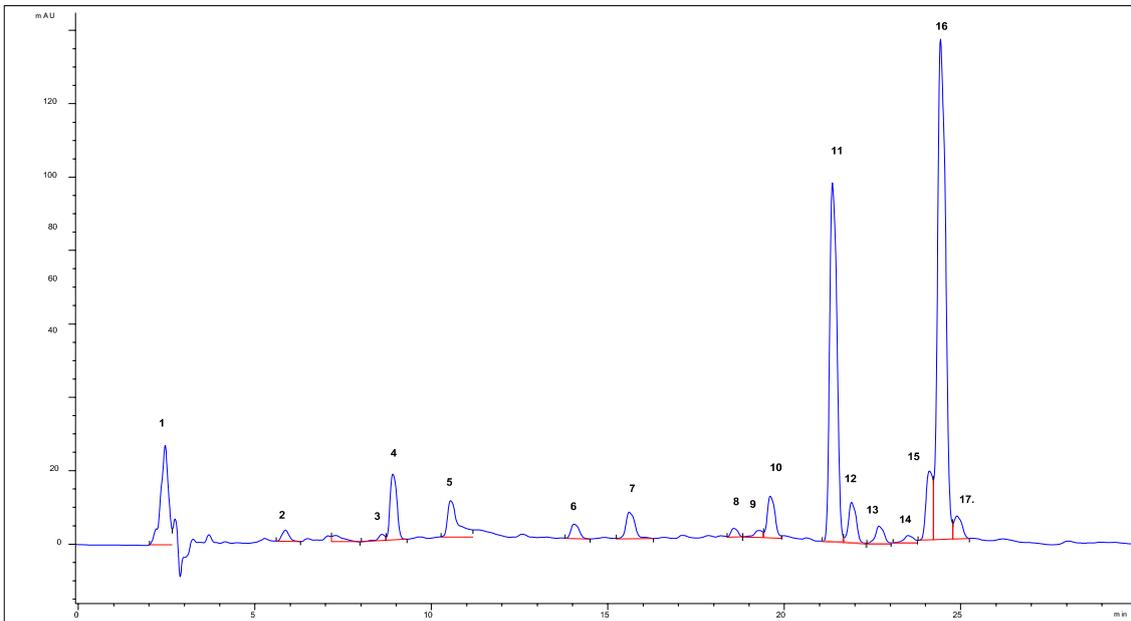


Figura 24: Cromatograma HPLC del extracto rico de saponinas monitorizado a 200nm *parviflora*

En el cromatograma del extracto con números de 1 al 17 y sus respectivos picos que presentan con máximo de absorbancia menores a 200 nm.

El pico 1 cuyo tiempo de retención es 2.448

El pico 2 cuyo tiempo de retención es 5.855

El pico 3 cuyo tiempo de retención es 8.588

El pico 4 cuyo tiempo de retención es 8.896

El pico 5 cuyo tiempo de retención es 10.533

El pico 6 cuyo tiempo de retención es 10.034

El pico 7 cuyo tiempo de retención es 15.594

El pico 8 cuyo tiempo de retención es 18.556

El pico 9 cuyo tiempo de retención es 19.270

El pico 10 cuyo tiempo de retención es 19.591

El pico 11 cuyo tiempo de retención es 21.354

El pico 12 cuyo tiempo de retención es 21.885

El pico 13 cuyo tiempo de retención es 22.672

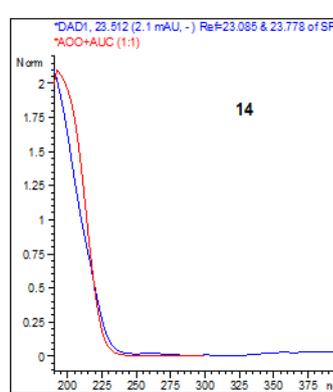
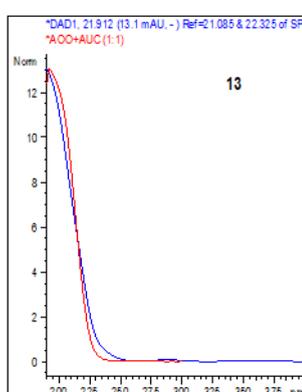
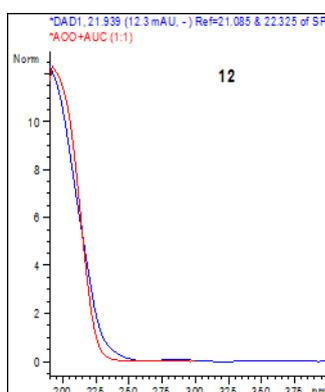
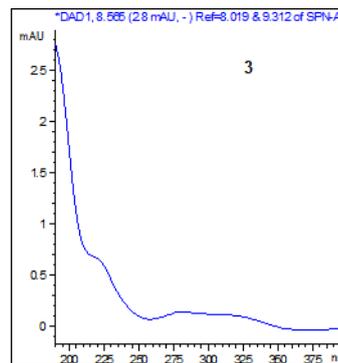
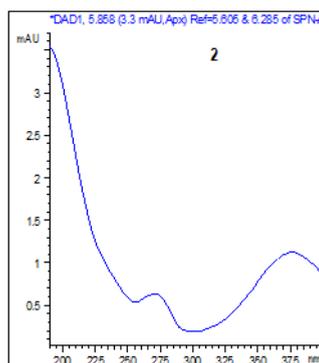
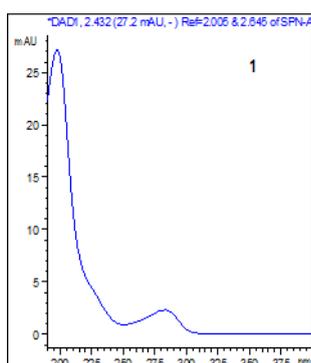
El pico 14 cuyo tiempo de retención es 23.497

El pico 15 cuyo tiempo de retención es 24.101

El pico 16 cuyo tiempo de retención es 24.416

El pico 17 cuyo tiempo de retención es 24.883

Las diferencias en los tiempos de retención podrían deberse a los diferentes grupos glucosídicos en el entorno del núcleo triterpénico, que se comparó con los espectros UV.



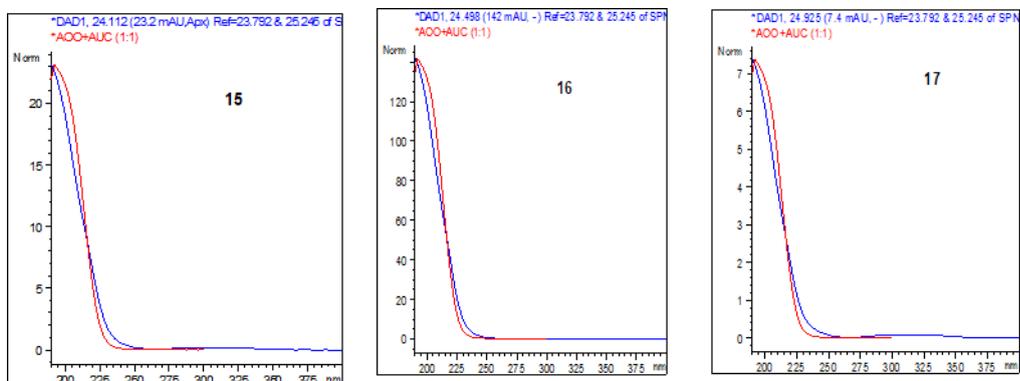


Figura 25: Superposición de espectros UV de los extractos muestra (Azul) y AcidoOleanólico (rojo).

Cromatograma HPLC del extracto de Saponina y la superposición de espectros UV de los extractos, donde picos 12 al 17 tienen espectros UV que coinciden con el espectro UV del ácido triterpénico del ácido Oleanólico.

Los compuestos 1,2,3 por ejemplo corresponden a otros compuestos desconocidos, ya que estos no coinciden con los espectros UV de la biblioteca del software del sistema cromatográfico Chemstation B03.

5.1.4. Del fraccionamiento del extracto rico en saponinas por cromatografía flash

Se colectaron 35 fracciones, visualizándose diferentes colores los cuales cambian a longitudes de onda (señales) UV diferentes.

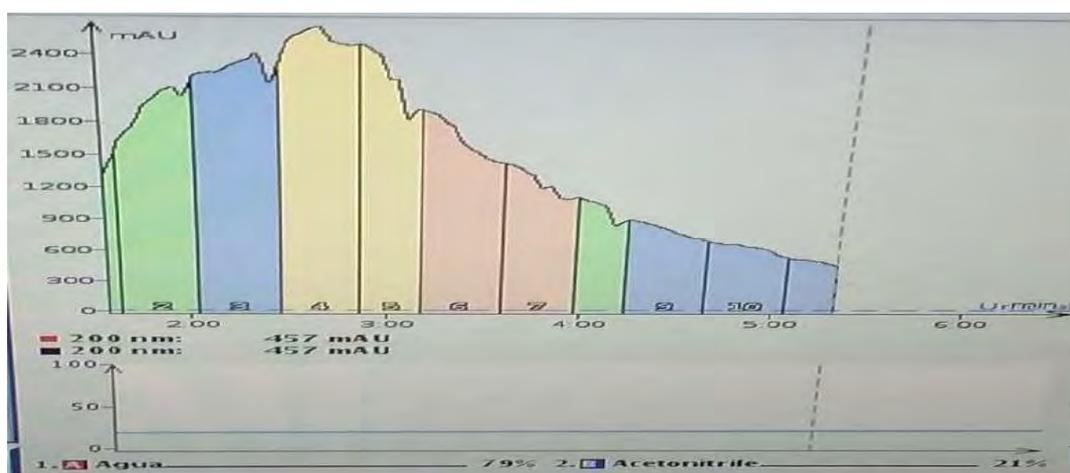


Figura 26: Fraccionamiento del extracto rico en saponinas por cromatografía flash

El análisis realizado al cromatograma del extracto rico en saponinas, cuya detección fue a 200 nm, se cargó la muestra en una columna SNAC C18, donde se colectó 35 fracciones de un volumen de 5 mL cada uno donde la diferencia de colores que se visualiza es debido a una señal diferente.

5.1.5. De la Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas por cromatografía flash

Se procedió a realizar la cromatografía TLC para cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía flash, juntándose aquellas que tenían igual R_f, color y forma llegando a obtener 6 fracciones con las cuales se realizaron las pruebas de inhibición, con sistema móvil cloroformo, ácido acético glacial, metanol y agua (64:32:12:8) y para la detección reactivo vainillina y ácido sulfúrico.



Figura 27: Cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas por cromatografía flash

La cromatografía muestra las manchas obtenidas de las diferentes fracciones los cuales muestran coloración parecida, así como sus Rf.

HPLC para CARBOHIDRATOS

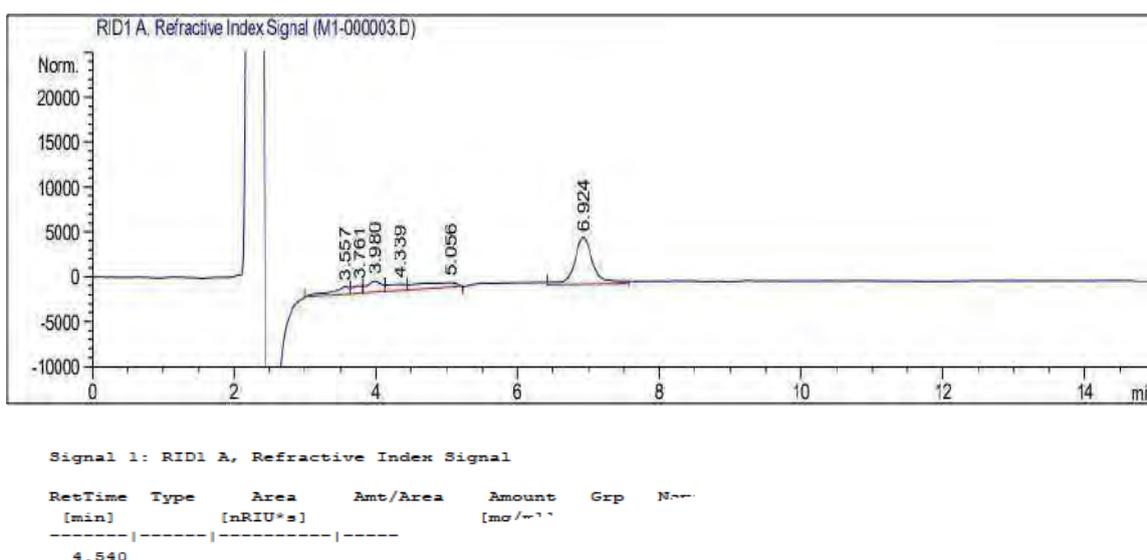


Figura 28: HPLC del carbohidrato presente en la muestra de sachapaccay

Se realiza el HPLC y de acuerdo al análisis en el tiempo de 6.924 se detecta la presencia de glucosa como el carbohidrato que se encuentra en mayor cantidad y así poder identificar el tipo de azúcar que está unido a la estructura del anillo de la saponina.

Tabla 3
Concentraciones de las diferentes fracciones

Fracciones Agrupadas	Código de la fracción	Código en placas	Peso fracción(mg)	Disuelto EtOH (uL)	Conc de la frac. mg/uL	Conc de fracción mg/100uL	Concentración 1 mg/5uL	Concentración 2 mg/10uL	Concentración 3 mg/50uL
1-3	A	F1	7.2	400	7.2/400	1.8	0.090	0.180	0.900
4-10	B	F2	97.7	400	97.7/400	24.4	1.221	2.443	12.210
11-16	C	F3	1.1	400	1.1/400	0.3	0.015	0.030	0.150
17-21	D	F4	39.1	800	39.1/800	4.9	0.245	0.490	2.450
20-29	E	F5	23.3	500	23.3/500	4.7	0.235	0.470	2.350
30-35	F	F6	2.1	400	2.1/400	0.5	0.025	0.050	0.250

Nota. Los resultados muestran los pesos y las concentraciones con las que se realizó efecto antibacteriano

Tabla 4

1ra Actividad antibacteriana del extracto etanólico de la raíz de Colignonia parviflora var. Biumbellata

Sach'a Paraccay frente a E. coli (ATCC 51813)

Código en placas	Concentración 1mg/5uL	Concentración 2 mg/10uL	Concentración 3 mg/50uL	Tamaño de Halo Concentración mg/5uL	Tamaño de Halo Concentración mg/10uL	Tamaño de Halo Concentración mg/50uL
F1	0.090	0.180	0.900	10	11	14
F2	1.221	2.443	12.210	7	10	11
F3	0.015	0.030	0.150	0	0	9
F4	0.245	0.490	2.450	0	0	0
F5	0.235	0.470	2.350	0	0	5
F6	0.025	0.050	0.250	6	0	10

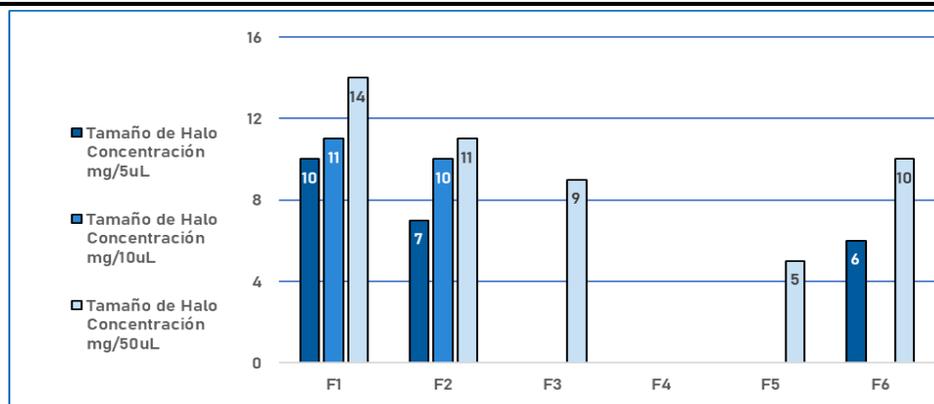


Gráfico 49: Concentración vs tamaño de

Tabla 5

2da Actividad antibacteriana del extracto etanólico de la raíz de Colignonia parviflora var. Biumbellata
Sach'a Paraccay frente a E. coli (ATCC 51813)

Código en placas	Concentración 1 mg/5uL	Concentración 2 mg/10uL	Concentración 3 mg/50uL	Tamaño de Halo Concentración mg/5uL	Tamaño de Halo Concentración mg/10uL	Tamaño de Halo Concentración mg/50uL
F1	0.090	0.180	0.900	9	10	14
F2	1.221	2.443	12.213	9	9	10
F3	0.015	0.030	0.150	0	0	9,5
F4	0.245	0.490	2.450	0	0	0
F5	0.235	0.470	2.350	0	0	4,5
F6	0.025	0.050	0.250	2	3	9

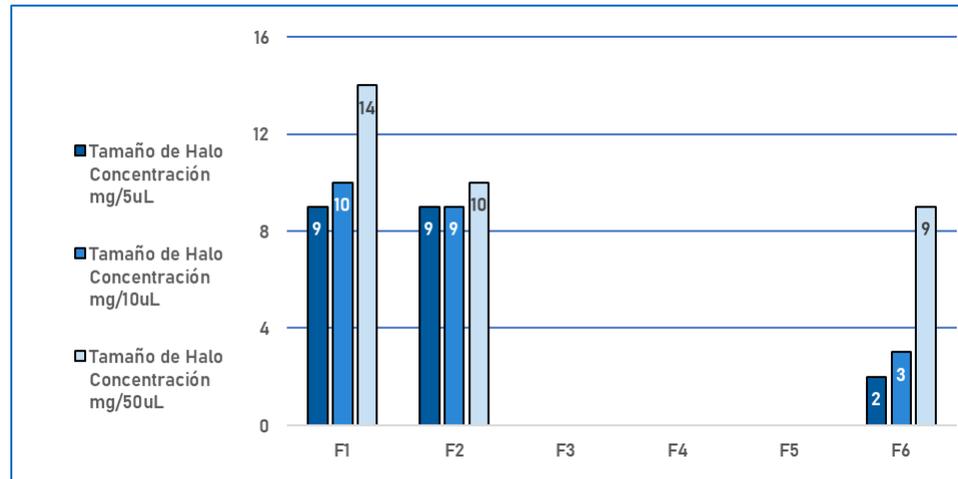


Gráfico 2: Concentración vs tamaño de halo

Tabla 6

3ra Actividad antibacteriana del extracto etanólico de la raíz de Colignonia parviflora var. Biumbellata
Sach'a Paraccay frente a E. coli (ATCC 51813)

Código en placas	Concentración 1 mg/5uL	Concentración 2 mg/10uL	Concentración 3 mg/50uL	Tamaño de Halo Concentración mg/5uL	Tamaño de Halo Concentración mg/10uL	Tamaño de Halo Concentración mg/50uL
F1	0.090	0.180	0.900	9	10	12
F2	1.221	2.443	12.213	6	10	10
F3	0.015	0.030	0.150	0	0	8
F4	0.245	0.490	2.450	0	0	0
F5	0.235	0.470	2.350	0	0	4
F6	0.025	0.050	0.250	2	0	9

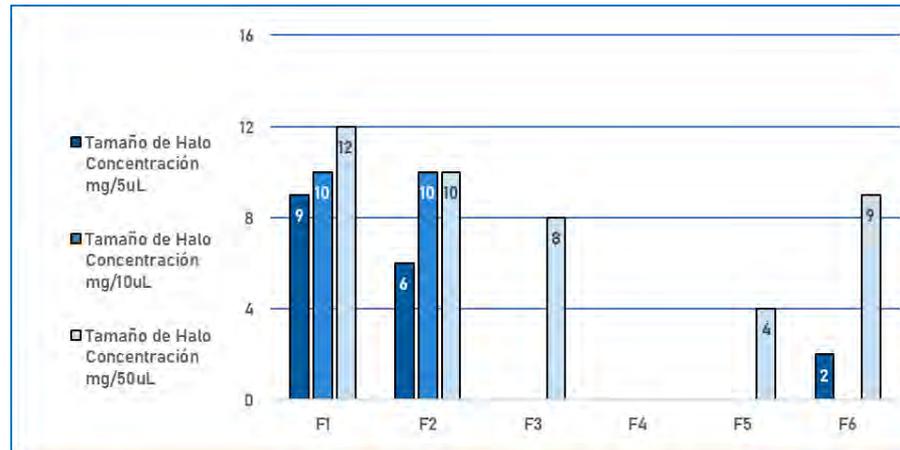


Gráfico 3: Concentración vs tamaño de halo (3)

Tabla 7

Concentraciones y volúmenes aplicados a las placas

Fracciones agrupadas	Código de la fracción	Código en placas	Concentración de la fracción de saponinas mg/400uL	Disuelto EtOH (uL)	Volumen tomado (uL)	Concentración aplicada al disco ug	Disco código asignado en la placa
1-3	A	F1	7.2	400	5	90	F1/5
					10	180	F1/10
					50	900	F1/50
4-10	B	F2	97.7	400	5	1221	F2/5
					10	2443	F2/10
					50	12213	F2/50
11-16	C	F3	1.1	400	5	14	F3/5
					10	28	F3/10
					50	14 138	F3/50
17-21	D	F4	39.1	800	5	244	F4/5
					10	489	F4/10
					50	2444	F4/50
20-29	E	F5	23.3	500	5	233	F5/5
					10	466	F5/10
					50	2330	F5/50
30-35	F	F6	2.1	400	5	26	F6/5
					10	53	F6/10
					50	263	F6/50

Tabla 8

Cuadro resumen de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la raíz de Colignonia parviflora var. Biumbellata Sach'a Paraccay frente a E. coli (ATCC 51813)

Disco código asignado en la placa	Concentración ug	Tamaño del halo inhibitorio (mm)1ra corrida	Tamaño del halo inhibitorio (mm)2da corrida	Tamaño del halo inhibitorio (mm)3ra corrida
F1/5	90	10	9	9
F1/10	180	11	10	10
F1/50	900	14	14	12
F2/5	1221	7	9	6
F2/10	2443	10	9	10
F2/50	12213	11	10	10
F3/5	14	ND	ND	ND
F3/10	28	ND	ND	ND
F3/50	138	9	9.5	8
F4/5	244	ND	ND	ND
F4/10	489	ND	ND	ND
F4/50	2444	ND	ND	ND
F5/5	233	ND	ND	ND
F5/10	466	ND	ND	ND
F5/50	2330	5	4.5	4
F6/5	26	6	2	2
F6/10	53	ND	3	ND
F6/50	263	10	9	9

ND: No detectado

Cuadro resumen de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la raíz de *Colignonia parviflora* var. *Biumbellata* Sach'a Paraccay frente a *E. coli* (ATCC 51813).

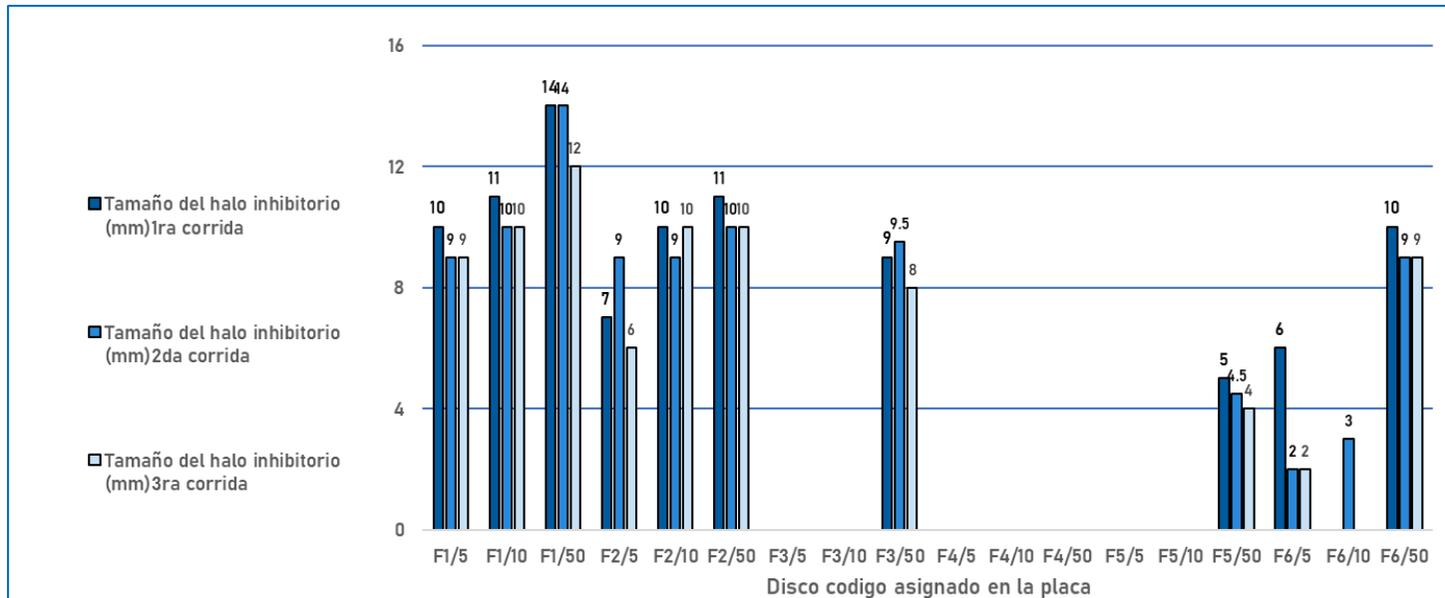


Gráfico 4: El cuadro resumen muestra la concentración y sus halos de inhibición en cada una de las concentraciones aplicadas y sus distancias correspondientes los cuales se hicieron por triplicado, donde se visualiza las fracciones 01 y 02 son las que presentan mayor inhibición por el mayor halo que presentan. Así mismo podemos indicar que a medida que aumenta la concentración del extracto aumenta la inhibición.

Tabla 9

Clasificación de la actividad antibacteriana de las fracciones de las saponinas de acuerdo con los criterios de Toda y col. de los halos de inhibición del extracto etanólico de la raíz de Colignonia parviflora var.

Biumbellata Sach'a Paraccay frente a E. coli (ATCC 51813)

Fracciones	Actividad Antimicrobiana
F1	Moderada
F2	Moderada
F3	Ligera
F4	No actividad
F5	Ligera
F6	Ligera

DISCUSION DE RESULTADOS

- De acuerdo al tamizaje fitoquímico ensayado al extracto de la raíz de la planta sach'a paraccay el cual presenta varios metabolitos secundarios los cuales coinciden con los reportados en otros trabajos de investigación de esta especie o género como el reportado por Amaya C. & Gutiérrez N. (2004).
- Según Soto Vasquez (2015) muestran actividad antibacteriana del extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus* L frente al *Escherichia coli* y que estas también presentan saponinas con un halo de inhibición de 12,8 mm y el extracto de sach'a paraccay demostró ser efectivo a una concentración de 90ug frente al *Escherichia coli* con un halo de inhibición de 12 mm, donde dichos resultados evidencian la actividad antibacteriana.
- Igualmente, según Rodríguez Pava en la actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas los extractos a partir de solventes orgánicos de *Bauhinia* a concentraciones de 20 mg/mL, lograron inhibir *P. aeruginosa* y *E. coli* reportando un halo de inhibición de 10 mm
- El tamaño de halos obtenidos cuando los extractos son sometidos a la actividad antimicrobiana con *E. coli* son similares a los reportados con *Solanum incanum* L que también tiene saponinas según Desta Berhe Sbhatu (2020).
- No existen trabajos previos de índole antibacteriano con respecto a la raíz de la especie en estudio
- En referencia a la actividad antimicrobiana el que mejor actividad presenta es la F1 con respecto a la F2 que son las presentan una sola mancha (figura 23), que podrían ser los de los picos 12 al 17; la fracción F3, F5 y F6 presentan actividad muy baja, la F4 no presenta actividad.
- La fracción 1 a pesar que la cantidad que se utiliza en peso es mucho mayor no presenta mayor halo de inhibición que la fracción 2, por ello podríamos indicar que la mejor fracción que inhibe es la fracción número 1 y que podría quizás corresponder a los picos que se visualiza en el cromatograma del HPLC de la figura 19 y 20.

- Las saponinas presentes en la raíz de *Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Raf. poseen un glucósido que es la glucosa en mayor cantidad (figura 25) y presenta inhibición tal como refiere la bibliografía de la raíz de *Rumex crispus* L. (Soto Vásquez, 2015).
- Dentro de los posibles mecanismos de acción antibacteriana de los componentes de las fracciones de saponinas estaría la disrupción de la membrana celular aumentando su permeabilidad, inhibición de enzimas bacterianas y alteración de la síntesis de la pared celular.

CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de la raíz de *Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Raf. presenta metabolitos secundarios como saponinas, esteroides y triterpenos, compuestos fenólicos y taninos según el dosaje fitoquímico.
2. Se realiza el fraccionamiento por cromatografía flash a 200 nm, se purifica por microextracción en fase sólida, obteniéndose seis fracciones de las cuales el que presenta mayor actividad antimicrobiana es en la fracción 1 por tener mayor halo de inhibición 14 mm a una concentración de mg/50µl frente al *E.coli* ATCC 51813 y con 9 mm el de menor concentración mg/5ul lo que hace de esta especie sea una fuente muy importante de compuestos con actividad antimicrobiana, así mismo con respecto al anexo 3, la fracción 1 es la que presenta mayor actividad estaría considerada como actividad antimicrobiana MODERADA.
3. Se ha determinado el núcleo de la saponina lo cual verifica la presencia de la saponina triterpénica por los resultados obtenidos en la reacción de Rosenthaler, cromatografía en capa fina, espectros UV del HPLC en los cuales se obtienen 17 picos los cuales sus espectros UV de los picos 12 al 17 se superponen con los del ácido oleanólico un ácido triterpénico.
4. Se determina el efecto antibacteriano siendo el que presenta mejor actividad antimicrobiana la fracción 1 siendo esta la que presenta mayor halo de inhibición.

SUGERENCIAS

1. Realizar otras pruebas y/o análisis como NMR, espectrometría de masas para determinar la estructura química de las saponinas presentes de esta especie.
2. Se sugiere realizar estudios antibacterianos con otras especies de bacterias y poder lograr mayor aplicación de las saponinas.
3. Trabajar con concentraciones menores y mayores a las reportadas.
4. Trabajar los extractos fraccionados con diferentes antibióticos para realizar las pruebas de resistencia o susceptibilidad.
5. Analizar los resultados con otros métodos de extracción y otros solventes

BIBLIOGRAFIA

1. Alonso Jorge, (2019). Fitofármacos en la Clínica Diaria
2. Augustin, J. M., Kuzina, V., Anderson, S. B., & Bak, S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, 72, 435– 457
3. Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 48 (Suppl. 1):5-16, PMID11420333.
4. Amaya C. & Gutiérrez N. (2004). Evaluación de la actividad antimicrobiana y antifúngica del extracto etanólico del fruto de *Sapindus saponaria* (Pacún) El salvador.
5. Alpendurada M F, (2000) Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Affiliations expand*. PMID: 10985530. DOI: 10.1016/s0021-9673(00)00453-2
6. Bohlin, E. (1988). A monograph of the genus *Colignonia* (Nyctaginaceae). - *Nord. J. Bot.* 8: 231-252. Copenhagen. <https://doi.org/10.1111/j.1756-1051.1988.tb01716.x>
7. Calle Álvarez, J., Pinzón Serrano, R., Ospina, L. F. y Avellaneda López, L. A. (1998). Actividad biológica de las saponinas de la corteza de *Inga marginata* Willd. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 27(1),17-19. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/56438>.
8. Calvo Jorge, Luis Martínez-Martínez. Mecanismos de acción de los antimicrobianos, *Microbiología*, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España. DOI: 10.1016/j.eimc.2008.11.001
9. Chan, K. W., Khong, N. M. H., Iqbal, S., & Ismail, M. (2013). Isolation and antioxidative properties of phenolics-saponins rich fraction from defatted rice bran. *Journal of Cereal Science*, 57, 480–485.

10. Chen, J., Li, W., Yang, B., Guo, X., Lee, F. S.-C., & Wang, X. (2007). Determination of four major saponins in the seeds of *Aesculus chinensis* Bunge using accelerated solvent extraction followed by high-performance liquid chromatography and electrospray-time of flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 596(2), 273-280. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.011>
11. Cheng, T.-C., Lu, J.-F., Wang, J.-S., Lin, L.-J., Kuo, H.-I., & Chen, B.-H. (2011). Antiproliferation Effect and Apoptosis Mechanism of Prostate Cancer Cell PC- by Flavonoids and Saponins Prepared from *Gynostemma pentaphyllum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20), 11319-11329. <https://doi.org/10.1021/jf2018758>.
12. Cruz Carrillo, A., Rodríguez, N., y Rodríguez, C. E. (2010). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 13(2), 117–124. <https://doi.org/10.31910/rudca.v13.n2.2010.73>
13. Desta Berhe Sbhatu, Haftom Baraki Abraha (2020) Preliminary Antimicrobial Profile of *Solanum incanum* L.: A Common Medicinal Plant PMID: 32063983 PMCID: PMC6996673 DOI: 10.1155/2020/3647065
14. Diaz Puentes, Luz Nelly (2009). Molecular interactions between plants and microorganisms: saponins as plant chemical defences and their microbial tolerance—a review. *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios* Vol. 1. Nº 2. pp. 32-55
15. Dominguez, Xorge Alejandro (1979) *Métodos de investigación fitoquímica*. México: LIMUSA. 1a .ed 1979.
16. Fallon, Booth y Bell, (1987). *Basic principles of high-performance liquid chromatography for the separation and analysis of mixtures*
17. Fernández K, García C. (2009). Efectividad antibacteriana in vitro de una Solución a base de *Camelia sinensis* y *Minthostachys mollis* frente a flora Salival mixta en pacientes ortodónticos [tesis de bachiller]. Lima: Universidad Inca Garcilasode la Vega.
18. Grabowska Karolina, Dagmara Wróbel, Paweł Żmudzki, Irma Podolak (2020). Anti- inflammatory activity of saponins from roots of *Impatiens parviflora* DC *Nat*

19. Güçlü-Üntündağ, Ö. & Mazza, G. (2007). Saponins: Properties, applications and processing *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 231–258.
20. Hassan, S. M., Haq, A. U., Byrd, J. A., Berhow, M. A., Cartwright, A. L., & Bailey, C. A. (2010). Haemolytic and antimicrobial activities of saponin-rich extracts from guar meal. *Food Chemistry*, 119, 600–605.
21. Hakim, E. M., Sivak, K. V., & Kaukhova, I. E. (2021). Evaluation of the diuretic effect of crude ethanol and saponin-rich extracts of *Herniaria glabra* L. in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 273, 113942. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113942>
22. Hernández, R. L. (2005). Extracción y Cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave Lechuguilla* Torrey. *e-Gnosis*, 3(11).
23. Hernández, R. (1997). Obtención de crudos de saponinas hipocolesteromizantes del *Chenopodium*
26. Hernández Sampieri, Roberto. Metodología de la investigación sexta edición. (2014), McGRAW-HILL / Interamericana Editores.
27. Hui Xiong, Yanan Zheng, Guangzhong Yang, Huixia Wang, Zhinan Mei (2015). Triterpene saponins with anti-inflammatory activity from the stems of *Entada phaseoloides*, *Fitoterapia*, 103, 33-45.
28. Hostettmann, K., & Marston, A. (1995). Chemistry and pharmacology of natural products Saponins. Cambridge: Cambridge University Press UK.
29. J Jang, H-G Hur, M J Sadowsky, M N Byappanahalli, T Yan, S Ishii (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review *J Appl Microbiol* PMID: 28383815 DOI: 10.1111/jam.13468.
30. Jiang Liu et al (2013) Isolation and characterization of new minor triterpenoid saponins from the buds of *Lonicera macranthoides*. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.01.019>
31. Juszczak, M et al (2021) Multidirectional effects of saponin fraction isolated from the leaves of sea buckthorn *Elaeagnus rhamnoides* (L.) Volume 137, May 2021, 111395 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111395>.

32. Nelson, A *Biomedicine & Pharmacotherapy*, (2021) Volume 137, 111395, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111395>
33. Khakimov, B., Tseng, L. H., Godejohann, M., Bak, S., & Engelsen, S. B. (2016). Screening for Triterpenoid Saponins in Plants Using Hyphenated Analytical Platforms. *Molecules*, 21(12), 1614. <https://doi.org/10.3390/molecules21121614>
34. Lavoie, S., Pierra, J., Legault, J., Raminoson, D., Lion, Q., Mshvildadze, V., & Pichette, A. (2021). Isolation and characterization of triterpenoid saponins from leaves of *Aralia nudicaulis* L. *Phytochemistry Letters*, 43, 184-189. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2021.04.004>
35. Lacaille-Dubois, M.-A. (2016). Newest Strategies in the Search for Bioactive Saponins from the Tropical Plant Biodiversity. *Current Drug Delivery*, 13(3), 389-399. <https://doi.org/10.2174/1567201812666151102094430>.
36. Latif, Z., & Sarker, S. D. (2012). Isolation of Natural Products by Preparative High Performance Liquid Chromatography (Prep-HPLC). En S. D. Sarker & L. Nahar (Eds.), *Natural Products Isolation* (pp. 255-274). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_10
37. Lavaud C., Sayagh C. Humbert F. Pouny I. Delaude C. (2015) Triterpenoid saponins from root bark of *Zanha golungensis* (Sapindaceae) *J. Carbohydrate Research* Vol. 402, 30 January 2015, Pages 225–231.
38. Lázaro Morejón Autor Dr. Enrique Pardo Coba. *TEXTO DE MICROBIOLOGIA I*. Managua, Nicaragua Junio, 2008.
39. Le, V A., E. Parks, S., H. Nguyen, M., & D. Roach, P. (2018). Effect of Solvents and Extraction Methods on Recovery of Bioactive Compounds from Defatted Gac (*Momordica cochinchinensis* Spreng.) Seeds. *Separations*, 5(3), 39. <https://doi.org/10.3390/separations5030039>
40. Liu, F., Ma, N., Xia, F.-B., Li, P., He, C., Wu, Z., & Wan, J.-B. (2019). Preparative separation of minor saponins from *Panax notoginseng* leaves using biotransformation, macroporous resins, and preparative high-performance liquid chromatography. *Journal of Ginseng Research*, 43(1), 105- 115. <https://doi.org/10.1016/j.jgr.2017.09.003>

41. Lock de Ugaz O. (1994). "Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio en los productos naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima pag 120- 121.
42. Lopez T. Corbin C. Falguieres A. Doussot J. Montguillon J. Hagège D. Hano C. Lainé E. (2016) Secondary metabolite accumulation, antibacterial and antioxidant properties of in vitro propagated *Clidemia hirta* L. extracts are influenced by the basal culture medium J. Comptes Rendus Chimie al.1071-1076.
- 43, López, M.T. (2001). Saponósidos. *Ámbito Farmacéutico, Fitoterapia. OFFARM*, 20 (06), 124-128
- 43, Lu Yao, Juan Wang, Junping He, Luqi Huang, Wenyuan Gao (2021) Endophytes, biotransforming microorganisms, and engineering microbial factories for triterpenoid saponins production. PMID: 33472430 DOI: 10.1080/07388551.2020.1869691
44. Marston, A., Wolfender, J.-L., & Hostettmann, K. (2000). Analysis and Isolation of Saponins from Plant Material. En W. Oleszek & A. Marston (Eds.), *Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants* (pp. 1-12). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-015-9339-7_1.
45. Milgate, J., & Roberts, D. C. K. (1995). The nutritional and biological significance of saponins. *Nutrition Research*, 15, 1223–1249.
46. Mohan, V. R., Tresina, P. S., & Daffodil, E. D. (2016). Antinutritional Factors in Legume Seeds: Characteristics and Determination. En B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 211-220). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00036-2>.
47. Morejon Aldama, Lázaro and Pardo Cobas, Enrique (2008) *Texto de microbiología I*. Universidad Nacional Agraria, Managua, NI.
48. Neves de Oliveira, Paulo Roberto Gláucio Testa Simone Bortolotti de Sena Willian Ferreira da Costa Maria Helena Sarragiotto Silvana Maria de Oliveira Santin Maria Conceição de Souza. (2008). Saponinas triterpénicas das raízes de *Guettarda pohliana* müll. Arg. (Rubiaceae). Chemical constituents of the roots of *Guettarda pohliana* Müll. Arg. (Rubiaceae). <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000400008>.
49. Osbourn Anne, Rebecca J M Goss, Robert A Field. (2011) *The saponins: polar*

- isoprenoids with important and diverse biological activities :1261-8. doi: 10.1039/c1np00015b. Epub. PMID: 21584304. DOI: 10.1039/c1np00015b.
50. Osbourn AE Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack (1996) Oct ;8(10):1821-1831. doi: 10.1105/tpc.8.10.1821.
 51. Oleszek, W. (1988) Solid-Phase Extraction-Fractionation of Alfalfa Saponins J.Sci. Food Agric., Poland. 1987.
 52. Oleszek, W. Z Bialy (2006). Chromatographic determination of plant saponins--an update (2002-2005). PMID: 16451803 DOI: 10.1016/j.chroma.2006.01.037.
 53. Parthraj R. Kshirsagar, Sandeep R. Pai, Mansingraj S. Nimbalkar Y Nikhil B. Gaikwad (2015). Análisis RP-HPLC del glucósido seco-iridoide swertiamarin de diferentes especies de Swertia 865-868.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1071366>
 54. Pradhan, A.; Bhattacharyya, A. (2017) Búsqueda de un surfactante alternativo ecológico: características de la superficie y la espuma de los surfactantes naturales. J. Limpio. Pinchar. 150, 127–134.
 55. Qiang Fu, Ke Zan, Mingbo Zhao, Sixiang Zhou, Shepo Shi, Yong Jiang, Pengfei Tu (2010) Triterpene saponins from Clematis chinensis and their potential anti-inflammatory activity J Nat Prod 73(7):1234-9. doi: 10.1021/np100057y
 56. Redo, M. C. Rios, J. L. A. Villar, (1989) A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978- 1988, Phytotherapy Research, 3(4), pp. 117.
 57. Rodríguez Pava Cristian Nicolás, Zarate Sanabria Andrés Gabriel, Sánchez Leal Ligia Consuelo (2017) Antimicrobial activity of four varieties of plants against pathogens clinical significance in Colombia.
 58. Rodríguez Saucedo, Elvia Nereyda (2011) Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas RaXimhai, vol. 7, núm. 1, pp. 153-170 Universidad Autónoma Indígena de México El Fuerte, México.
 59. Schneider P, SS Hosseiny, F. Bischoff, U. Müller, HJ Bart, K. Schlitter (2011). Extracción de triterpenos mediada por tensioactivos y su análisis de HPLC directo del sistema micelar. Páginas 407-418.
<https://doi.org/10.1080/10739149.2011.60216>

60. Sheng, H., & Sun, H. (2011). Synthesis, biology and clinical significance of pentacyclic triterpenes: A multi-target approach to prevention and treatment of metabolic and vascular diseases. *Natural Product Reports*, 28, 543–593.
61. Skoog Holler, Nieman Principios de Análisis Instrumental 5ta Edición Editorial McGraw Hill España 1992 Pag 730.
62. Soto Vásquez Marilú Roxana, Soto Vásquez Karina, Santos Mendoza Amado Agustín Moncayo Vargas, Nadya Katherine, (2015) Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus* L. *Química viva*.
63. Silver, L.L. & Bostian, K.A. Discovery and development of new antibiotics: the problem of antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 377-383
64. Sparg S. G., Light, M. E., & van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94, 219–243.
65. Shepo Shi, Dan Jiang, Caixia Dong, and Pengfei Tu, (2006) Triterpene Saponins from *Clematis mandshurica* *J. Nat. Prod.*, 69, 11, 1591–1595 <https://doi.org/10.1021/np060287z>
66. Suhaib A. Hussien, and Zainab J. Awad (2014) Isolation and Characterization of Triterpenoid Saponin Hederacoside C. Present in the Leaves of *Hedera helix* L. Cultivated in Iraq Iraqi *J Pharm Sci*, 23(2)
67. Sun, S. -H. (2006). Haemolytic activities and adjuvant effect of *Bupleurum chinense* saponins on the immune responses to ovalbumin in mice. *Vaccine*, 24, 1324– 1331
68. Takahashi N. Li W, Koike K. (2016) Oleanane-type triterpenoid saponins from *Silene armeria* *J. Phytochemistry* Volume 129, September 2016, 77– 85.
69. Usiña, K. (2017). Análisis de las propiedades surfactantes de saponinas obtenidas de los frutos de *Sapindus saponaria* L. Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador, Ciencias Química, Quito.
70. Velasco et al., (2008) Manual práctico de bacteriología clínica Primera edición, Universidad de Los Andes Vicerrectorado Académico, CODEPRE.
71. Soto Vásquez, Marilú Roxana, Karina Soto Vásquez2, Amado Agustín Santos Mendoza1, Nadya Katherine Moncayo Vargas1 (2015) *Revista Química Viva* - Número

- 3, año 14, diciembre 2015 - quimicaviva@qb.fcen.uba.ar 63 Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus* L. Área de Farmacognosia, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo 2 Área de Microbiología, Hospital Belén de Trujillo. Trujillo, Perú.
72. Verza Simone (2012) See discussions, stats, and author profiles for this publication at: <https://www.researchgate.net/publication/221681388> Immunoadjuvant Activity, Toxicity Assays, and Determination by UPLC/QTOF-MS of Triterpenic Saponins from *Chenopodium quinoa* Seeds Article in *Journal of Agricultural and Food Chemistry* · March 2012 DOI: 10.1021/jf205010c · Source: PubMed
73. Vincken Jean-Paul, Lynn Heng, Aede de Groot, Harry Gruppen (2007) Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom doi: 10.1016/j.phytochem.2006.10.008. Epub 2006 Dec 4. PMID: 17141815 DOI: 10.1016/j.phytochem.2006.10.008
74. Vitoriano-Souza et al., (2019) Nanoformulations with *Leishmania braziliensis* Antigens Triggered Controlled Parasite Burden in Vaccinated Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*) against Visceral Leishmaniasis; <https://doi.org/10.3390/vaccines10111848>
75. Wina, E., Muetzel, S., & Becker, K. (2005). The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production—A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 8093–8105.
76. Wagner H, S. Blatt (2001) *Plant Drug Analysis: A Thin-Layer Chromatography Atlas* 2Ed Springer USA Pag. 306
77. Werth Brian, (2022) Generalidades sobre los fármacos antibacterianos. PharmD, University of Washington School of Pharmacy. Wolfender, J.-L. 2009. HPLC in natural product analysis: The detection issue. *Planta Medica*, 75(7), 719-734. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1088393>.
78. Wolfender, Jean-Luc (2009). HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue
Planta Medica 75(7):719-34 DOI:10.1055/s-0028-1088393
79. Yadava R, Jharbade J. (2008) New antibacterial triterpenoid saponin from *Lactuca scariola* j. *Fitoterapia* 79 (2008) 245–249.
80. Yang, Y.C. Huang, Y.F. Chen, M.H. Chang, (2010). Foam properties, detergent

abilities and long-term preservative efficacy of the saponins from *Camellia oleifera*, *Journal of Food and Drug Analysis*, 18, 4417

81. Yasser Diab, Efstathia Ioannou, Ahmed Emam, Constantinos Vagias, Vassilios Roussis. (2012) Desmettianosides A and B, bisdesmosidic furostanol saponins with molluscicidal activity from *Yucca desmettiana*. PMID: 22406421. DOI: 10.1016/j.steroids.2012.02.014.
82. You Yang, Stephane Laval, Biao Yu, (2014) Chapter 2 - Chemical Synthesis of Saponins, Editor(s): Derek Horton, *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, Academic Press, Volume 71, Pages 137-226.
83. Yu-Pu Juang, Pi-Hui Liang (2020). Biological and Pharmacological Effects of Synthetic Saponins. doi: 10.3390/molecules25214974.
84. Zhang, J., & Qu, F. (2013). Methods for Analysis of Triterpenoid Saponins. En K. G. Ramawat & J.-M. Mérillon (Eds.), *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes* (pp. 3311-3323). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_180
85. Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*, 13, 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

ANEXOS

Anexo 1

Posición Taxonómica de la Planta Realizada por el Herbario Vargas – Cusco

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- APARTADO POSTAL:
N° 021 - Cusco - Perú
- FAX: 238156 - 238175 - 222512
- RECTORADO:
Calle Tigré N° 127
Teléfonos: 222271 - 234891 - 234115 - 254398
- CIUDAD UNIVERSITARIA:
Av. De la Cultura N° 735 - Teléfono: 228061 -
222512 - 232370 - 232475 - 232226
- CENTRAL TELEFÓNICA: 232398 - 152210
243875 - 243876 - 243877 - 243838
- LOCAL CENTRAL:
Plaza de Armas s/n
Teléfonos: 227571 - 228721 - 234115
- MUSEO INKA:
Cuesta del Almirante N° 05 - Teléfono: 237880
- CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA:
San Jerónimo s/n Cusco - Teléfono: 277445 - 277249
- COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA":
Av. De la Cultura N° 721
"Escuela Universitaria" Teléfono: 227192

CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA N° 006-2018-HVC-FCB-UNSAAC

La directora del Herbario Vargas (CUZ) -Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), deja constancia que: la Br **Alicia Claveri Jarandilla** con código de matrícula N° 052734 de la Maestría en Ciencias Mención Química, especialidad Productos Naturales, de la unidad de postgrado de la facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, ha presentado a la Dirección del Herbario Vargas (CUZ) una muestra vegetal herborizada para su determinación taxonómica (expediente N001140), para el proyecto de tesis intitulado "Efecto antibacteriano de las fracciones obtenidas de saponinas a partir de la raíz de *Colignonia parviflora* var. *biumbellata* Raf. Sach'a paracay en *Escherichia coli*". La que al ser diagnosticada por la M. Sc. Gloria Calatayud Hernoza, utilizando claves dicotómicas, consulta con bibliografía especializada, y comparación con muestras del Herbario, concuerdan con la clasificación del grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group-APG IV, 2016).

N°	FAMILIA	ESPECIES
1	Nyctaginaceae	<i>Colignonia parviflora</i> var. <i>biumbellata</i> Raf.

Se le expide la presente certificación a petición formal de la interesada para los fines que vieran por conveniente.

Cusco, 20 de Marzo de 2018.


Blga. María Luisa Ochoa Cámara
Directora del Herbario Vargas (CUZ)



Anexo 2
Secuencia de Tratamiento de la Muestra



Figura 28: PLANTA DE COLIGNONIA
PARVIFLORA BIUMBELLATA VAR. SACH'A
PARACAY



Figura 29: RAIZ DE SACHA PARACCAY



Figura 30: MOLIENDA



Figura 31: CONCENTRADO EN ROTAVAPOR



Figura 32: CROMATOGRAFIA FLASH



Figura 33: CROMATOGRAFIA FLASH

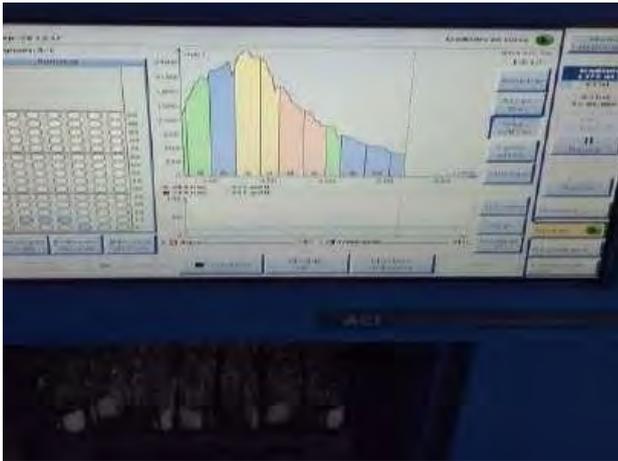


Figura 34: CROMATOGRAFIA FLASH

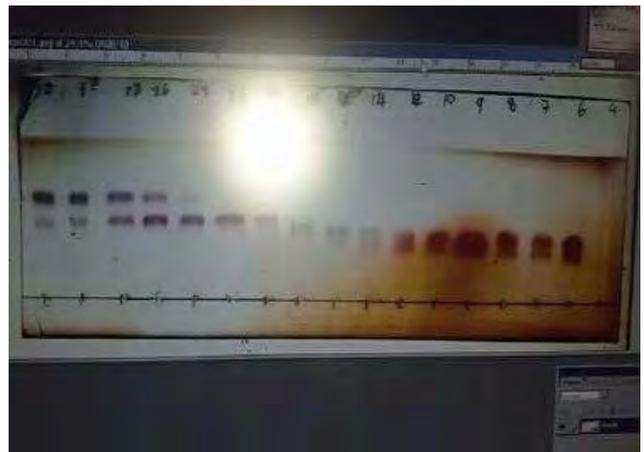


Figura 35: CROMATOGRAFIA EN TLC



Figura 36: INOCULACION DE MUESTRAS



Figura 37: RESULTADOS DE EFECTO ANTIBACTERIANO

Anexo 3

Criterios de actividad antimicrobiana frente al halo de Inhibición

Para definir el tipo de actividad antimicrobiana, se utilizaron los criterios establecidos por Toda M, Kubo Y.

Actividad	Halo de Inhibición (mm)
Marcada	≥ 16
Moderada	$16 < \text{halo} < 12$
Ligera	$12 < \text{halo} < 8$
No actividad	< 8

Donde:

Halo de Inhibición ≥ 16 : significa una actividad antimicrobiana marcada

Halo de Inhibición $16 < \text{halo} < 12$: significa una actividad antimicrobiana moderada.

Halo de Inhibición $12 < \text{halo} < 8$: significa una actividad antimicrobiana ligera.

Halo de Inhibición < 8 : significa ausencia de actividad antimicrobiana.

Fuente: Toda M, Kubo Y. Antibacterial and bactericide activity of tea extracts and catechins against methicillin resistant *Saphylococcus aureus*, J. Bacteriol, 1994; 46 (5): 845-49

ANEXO 4

Reactivos utilizados

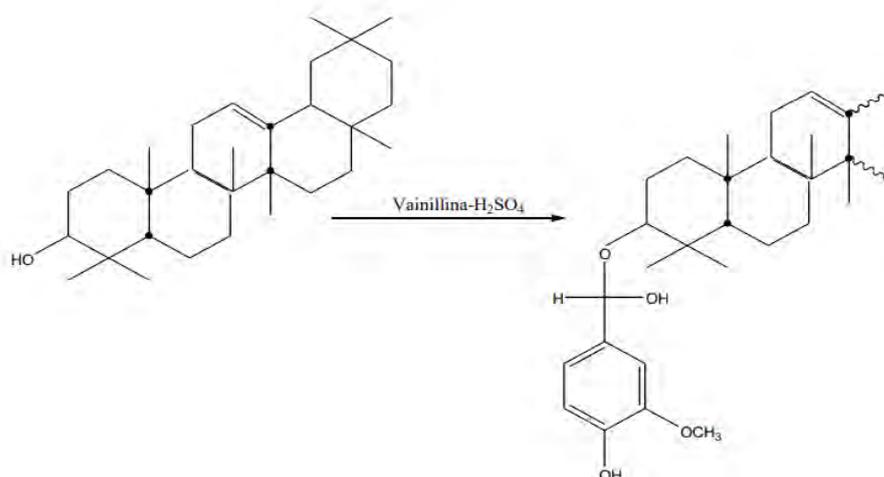
1. Saponinas

Ensayo de la Espuma Se coloca una pequeña cantidad en mL de extracto vegetal en un tubo de ensayo con agua, en una proporción de 1:1, se agita vigorosamente por unos minutos y se observa la altura de la espuma formada, este proceso dependerá del contenido de saponinas del material vegetal.

Al agitar una solución acuosa de una muestra que sea o contenga saponinas, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar la solución acuosa de un jabón. Puesto que existen otras sustancias que pueden formar espuma, se debe asumir este ensayo como una prueba presuntiva de la presencia de saponinas.

2. **Reacción de Rosenthaler:** Diluir 1 g de vainillina en 100 ml de etanol.

Ensayo de Rosenthaler. Las sapogeninas triterpénicas pentacíclicas dan color violeta (la reacción ocurre en el hidróxilo del C-3) y las esteroidales no reaccionan o dan color verdoso.



Reacción de Vainillina con Sapogeninas Pentacíclicas

3. Compuestos Fenólicos

Se utiliza FeCl₃ el cual forma un complejo.

El ion cloruro del FeCl₃ protona al fenol formando un fenóxido, el cual reacciona con el hierro para formar un complejo.

La reacción sirve para identificar fenoles, puesto que el complejo tiene una coloración violeta

Ferric (III) Chloride test (violet colour):

Ferric (III) chloride test (violet colour):



4. Esteroides y triterpenos

Reacción de Rosenthaler para triterpenos

Reacción de Lieberman – Bouchard para esteroides

Ácido sulfúrico más anhídrido acético sobre una disolución del esteroide en cloroformo da colores desde púrpura rojizo a azul verdoso

5. Taninos

- A la solución de extracto añadir cloruro férrico al 1%. Color negrozco tanino gálico, marrón o verde tanino condensado
- A 1 mL de extracto añadir 1 mL de K₂Cr₂O₇ al 5%. Observar formación color pardo amarillento.
- A 2 ml del extracto añadir 2 ml de solución de gelatina al 5% observar formación de precipitado