

Neiva, 26 de mayo del 2022

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Juan Camilo Escobar Poveda, con C.C. No. 1075229327

Autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado o proyecto de semillero

titulado **Evaluación antimicrobiana del crudo alcaloidal de la especie vegetal *Ipomoea carnea* sobre enterobacterias**

presentado y aprobado en el año 2022 como requisito para optar al título de

Licenciado en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

Juan Camilo Escobar Poveda

Firma: _____





CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 3

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Evaluación antimicrobiana del crudo alcaloidal de la especie vegetal *Ipomoea carnea* sobre enterobacterias

AUTOR O AUTORES: Juan Camilo Escobar Poveda

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Escobar Poveda	Juan Camilo

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Castañeda Gómez	Jhon Fredy

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Licenciado en Ciencias Naturales: Física Química y Biología

FACULTAD: Educación

PROGRAMA O POSGRADO: Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

CIUDAD: Neiva

AÑO DE PRESENTACIÓN: 2022 **NÚMERO DE PÁGINAS:** 83

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una X):

Diagramas___ Fotografías X Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general X
Grabados___ Láminas___ Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___ Retratos___
Sin ilustraciones___ Tablas o Cuadros X



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

2 de 3

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:

Lector de PDF y lector de DOCX

MATERIAL ANEXO:

Ninguno

PREMIO O DISTINCIÓN (En caso de ser LAUREADAS o Meritoria):

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

	Español	Inglés	Español	Inglés	
1.	<i>Ipomoea</i>		<i>Ipomoea</i>		
2.	Alcaloides		Alkaloids		
3.	Carnea	Carnea	8. Enterobacterias	Enterobacterial	
4.	Swainsonina		Swainsonine	9. Actividad	Activity
5.	Antimicrobiana	antimicrobial	10. Cromatografía	Chromatography	
6.			Calisteginas	Calistegines	
7.			Extracto	Extract	

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

Los alcaloides son metabolitos secundarios que presenta uno o más nitrógeno y son sintetizados principalmente de aminoácidos. La *Ipomoea carnea* es un arbusto conocido por presenta actividad citotóxica comprobado en tejidos renales, pancreales, hepáticos y nerviosos de mamíferos, y no tiene estudios en bacterias, por ende, este trabajo tiene como finalidad determinar el potencial antimicrobiano del extracto crudo alcaloidal de la especie vegetal *Ipomoea carnea*. Para ellos, el material vegetal (hojas y tallo) fue colectado, secado, pulverizado y desengrasado con hexano, seguido de una extracción acida (HClO₄) y neutralizada con NaOH; y extracción alcalina con NaOH. Luego, se aplicó una separación liquido-liquido con cloroformo, formando dos fases, una acuosa y otra orgánica (están los alcaloides), y rotavaporada. Se comprobó la presencia de alcaloides con los reactivos de Tanred, Mayer, Marquis, Valser y Dragendorff, después se realizó la cromatografía en capa fina con cloroformo y cloroformo-metanol (9:1). Por último, se usó la técnica de difusión con antibiograma disco-placa con agar Müller Hilton, y concentraciones del extracto a 1000 ppm, 2000 ppm, 5000 ppm, y 10000 ppm, y como prueba control cefuroxima. Se obtuvieron cuatro extractos, y el extracto alcalino en tallos dio positivo para la presencia de alcaloides. En la cromatografía, se identificaron los alcaloides por debajo de 0.5 (R_f), y las bacterias presentaron una enorme resistencia al extracto crudo alcaloidal por no evidenciar halos de inhibición, incluido la prueba control. Entonces, se aconseja aplicar concentraciones superiores a 10000 ppm y otras técnicas de evaluación como la dilución en caldo.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

Alkaloids are secondary metabolites that have one or more nitrogen and are synthesized mainly from amino acids. *Ipomoea carnea* is a shrub known for its proven cytotoxic activity in renal, pancreatic, hepatic and nervous



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-07

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

3 de 3

tissues of mammals, and it has not been studied in bacteria, therefore, this work aims to determine the antimicrobial potential of the raw alkaloidal extract of the species. . vegetable Ipomoea carnea. For them, the plant material (leaves and stems) was collected, dried, powdered and degreased with hexane, followed by acid extraction (HClO₄) and neutralized with NaOH; and alkaline extraction with NaOH. Then, a liquid-liquid separation with chloroform was applied, forming two phases, one aqueous and one organic (the alkaloids are found), and rotavaporated. The presence of alkaloids was checked with Tanred, Mayer, Marquis, Valser and Dragendorff reagents, then thin-layer chromatography was performed with chloroform and chloroform-methanol (9:1). Finally, the disc-plate antibiogram diffusion technique was used with Müller Hilton agar, and extract concentrations at 1,000 ppm, 2,000 ppm, 5,000 ppm, and 10,000 ppm, as cefuroxime control test. Four extracts were obtained, and the alkaline stem extract was positive for the presence of alkaloids. In the chromatography, the alkaloids below 0.5 are identified, and the bacteria showed enormous resistance to the raw alkaloidal extract as they did not show inhibition halos, including the control test. Therefore, it is advisable to apply concentrations above 1000 ppm and other evaluation techniques such as broth dilution and microdilution.

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: Jhon Fredy Castañeda Gómez

Firma:

Jurado: Alcides Polania Patiño

Firma:



UNIVERSIDAD
SURCOLOMBIANA

Proyecto de Semillero

**Evaluación antimicrobiana del crudo alcaloidal de la especie vegetal *Ipomoea carnea*
sobre enterobacterias**

Presentado por:

Juan Camilo Escobar Poveda 20171156344

Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

Facultad de Educación

Semillero de Investigación en Química de la Universidad Surcolombiana (SIQUS)

Neiva-Huila, Colombia 12 de mayo de 2022



UNIVERSIDAD
SURCOLOMBIANA

Proyecto de Semillero

**Evaluación antimicrobiana del crudo alcaloidal de la especie vegetal *Ipomoea carnea*
sobre enterobacterias**

Presentado por:

Juan Camilo Escobar Poveda 20171156344

Asesores del Proyecto de Semillero

Ph.D. Jhon Fredy Castañeda Gómez

Neiva-Huila, Colombia 12 de mayo de2022

Dedicatoria

“Primero que todo, dedico este trabajo a mis padres por todo el apoyo moral recibido, no solo durante el desarrollo de este trabajo, sino, durante el transcurso de la carrera. También a mis hermanas y sobrina por impulsarme a termina este trabajo”

Juan Camilo Escobar Poveda

Agradecimientos

Al asesor de tesis, Jhon Fredy Castañeda Gómez, docente de la universidad Surcolombiana, por su gran apoyo incondicional y compartir sus conocimientos antes, durante y después del desarrollo de este trabajo.

También, a la profesora Yeimis Montealegre, Mayra Garzón, Lina Segura, Angela Patricia Ochoa por los espacios, instrumentos, materiales y reactivos proporcionados, así como también su indiscutible apoyo y guía.

Por último, un enorme agradecimiento a la coordinadora del laboratorio de microbiología Bibian Katherine Argüello por su asesoramiento, acompañamiento y ayuda en las pruebas biológicas, incluso después de haberlas terminado, siguió apoyando este proyecto.

Tabla de contenido

1.	Introducción	17
2.	Planteamiento del problema	18
3.	Antecedentes	20
4.	Justificación.....	27
5.	Objetivos	29
5.1	Objetivo general	29
5.2	Objetivos específicos	29
6.	Marco teórico	30
6.1	Clasificación botánica y distribución de la especie <i>Ipomoea carnea</i>	30
6.2	Toxicidad de <i>Ipomoea carnea</i>	31
6.3	Alcaloides y su importancia en <i>Ipomoea carnea</i>	31
6.4	Alcaloides	31
6.4.1	Definición	31
6.4.2	Clasificación de los alcaloides	32
6.4.3	Función de los alcaloides.....	34
6.4.4	Propiedades fisicoquímicas de los alcaloides	34
6.5	Swainsonina.....	35
6.6	Calisteginas.....	37

6.7	Extracción y aislamiento de los alcaloides	39
6.7.1	Preparación del material vegetal.....	40
6.7.2	Extracción por medio ácido	40
6.7.3	Extracción en medio básico o alcalino	41
6.8	Identificación de los alcaloides.....	41
6.8.1	Formación de precipitados.....	41
6.8.2	Cromatografía en capa fina.....	42
6.9	Actividad antimicrobiana	44
7.	Metodología	46
7.1	Enfoque metodológico.....	46
7.2	Muestreo	46
7.3	Secado y pulverizado.....	46
7.4	Extracción de alcaloides	46
7.4.1	Desengrase del material vegetal	46
7.4.2	Extracción de los alcaloides en medio ácido	47
7.4.3	Extracción de los alcaloides en medio básico.....	50
7.5	Determinación de alcaloides por medio de precipitados	53
7.6	Identificación de los alcaloides mediante Cromatografía en capa fina	54
7.6.1	Cromatografía en capa fina.....	54
7.7	Evaluación antimicrobiana de los extractos alcaloidales	55

8.	Resultados y análisis de resultados	61
8.1	Pruebas cualitativas para la identificación de alcaloides.....	62
8.2	Identificación de los alcaloides por cromatografía en capa fina	67
8.3	Evaluación de la actividad bacteriana	71
9.	Conclusiones y recomendaciones.....	77
10.	Referencias	78

Índice de Figuras

Figura 1. Ipomoea carnea en el norte de la ciudad de Neiva-Huila. Tomada el 4 de septiembre del 2021	30
Figura 2. Aspectos biogénéticos para la clasificación de los alcaloides. Tomada y modificada de (Arango, 2008)	33
Figura 3. Estructura de la swainsonina. Tomada y modificada de (Dorling, Huxtable, & Colegate, 1980)	35
Figura 4. Biosíntesis de la swainsonina de la Slafractonina leguminicola. Tomada de (Ren et al., 2017)	36
Figura 5. Rutas para la vía l-lisina - ácido piperídico. La primera ruta demarcada con flechas negras, la segunda con flechas rojas y la tercera con flecha de color verde. Tomada y modificada de (Tan, Chen, Wu, Zhang, & Ding, 2018) utilizando el programa de ADC Lab.	37
Figura 6. Algunos ejemplos de la familia Calistegina, donde se resalta con morado su núcleo nor-tropano. Tomado y modificado de (Rodríguez, 2016) utilizando el programa de ADC Lab.....	38
Figura 7. Biosíntesis de la Calistegina. Tomada y modificada de (Molyneux, Nash, & Asano) utilizando el programa de ADC Lab.....	39
Figura 8. Desplazamiento de los alcaloides según el pH en el que se encuentra. Tomada de (Arango, 2008)	40
Figura 9. Ejemplo de cromatografía en capa fina. (Fuente Propia)	42
Figura 10. Diagrama estructural de compuestos apolares en una lámina de Sílica gel. tomada de (Nichols, 2022)	43

Figura 11. Diagrama estructural de compuestos polares en una lámina de Sílica gel. tomada de (Nichols, 2022)	44
Figura 12. Desengrase del material vegetal con hexano. (Fuente propia)	47
Figura 13. Filtrado del material vegetal en una solución de ácido perclórico al 5%. (Fuente Propia).....	48
Figura 14. Neutralización del pH. (Fuente propia)	48
Figura 15. Extracción liquido-líquido para la separación de los alcaloides. (Fuente Propia)	49
Figura 16. Eliminación del extracto por medio de rotaevaporación. (Fuente Propia)	50
Figura 17. Material vegetal en solución de hidróxido de sodio al 5% en el shaker. (Fuente propia)	50
Figura 18. Filtrado del material vegetal en solución alcalina. (Fuente propia).....	51
Figura 19. Montaje para la separación liquido-liquido con cloroformo. La fase acuosa es de color oscuro(arriba) y la orgánica es translúcida (abajo). (Fuente propia).....	52
Figura 20. Obtención la fase acuosa en la primera foto y de los alcaloides en la fase orgánica de hojas (derecha) y tallos (izquierda) en la segunda foto. (Fuente propia).....	52
Figura 21. Placa cromatográfica con las muestras del crudo alcaloidal de hojas (izquierda) y tallos (derecha). (Fuente propia).....	55
Figura 22. Montaje de la placa cromatográfica en capa fina. Tomada el 21 de febrero del 2022.....	55
Figura 23. Sembrado de las cepas bacterianas E. coli sp., Serratia sp. y Salmonella sp. en agar nutritivo. tomada por Juan Camilo el día 18 de abril del 2022.....	56
Figura 24. Antibiótico que contiene cefalosporina de tercera generación. Tomada por Juan Camilo Escobar el 11 de mayo del 2022	57

Figura 25. Siembra superficial de las cepas bacterianas en tubo de ensayo inclinado en agar nutritivo. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 18 y 25 de abril del 2022	57
Figura 26. Estandarización a 0.5 en la escala de McFarland de los inóculos, usando la tarjeta de Wickerham. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 19 de abril del 2022	58
Figura 27. Disoluciones de los crudos alcaloidales alcalinos en Tween 80 al 20% a concentraciones de 1000 ppm y 2000 ppm. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 19 de abril del 2022.	58
Figura 28. Siembra de los sensidiscos en la cámara esterilizada previamente con luz ultravioleta. (Fuente propia)	59
Figura 29. Crudo de la extracción alcalina de las hojas. (Fuente propia)	61
Figura 30. Crudo de la extracción alcalina de los tallos. (Fuente propia).....	61
Figura 31. Crudo de la extracción acida de los tallos. Tomada el 23 de febrero del 2022	62
Figura 32. Crudo de la extracción acida de los tallos. Tomada el 23 de febrero del 2022	62
Figura 33. Reacción del alcaloide con el reactivo de Mayer. Tomada y modificada de (Huamaní, 2020) utilizando el programa de ADC Lab.	65
Figura 34. Reacción de precipitación con el reactivo de Dragendorff. Tomado y modificado de (Ochoa & Sarmineto, 2018) utilizando el programa de ADC Lab.....	66
Figura 35. Placas cromatográficas del extracto alcaloidal alcalino en lámina de Sílica gel con fase móvil de cloroformo, revelado en luz ultravioleta a 302 nm (izquierda), 362 nm (mitad) y con el reactivo de Dragendorff. Tomadas por Juan Camilo Escobar el día 19 de noviembre del 2021.....	68

Figura 36. Localización de las manchas con luz ultravioleta a 302 nm (izquierda) y 362 nm (derecha) coincidiendo con el revelado realizado con el reactivo de Dragendorff. Realizado con el programa de ImageJ.....68

Figura 37. Placas cromatográficas del extracto alcaloidal alcalino en lamina con Sílica gel con fase móvil de cloroformo-metanol (9:1), revelado en luz ultravioleta a 302 nm (izquierda), 362nm (mitad) y con el reactivo de Dragendorff. Tomadas por Juan Camilo Escobar el día 19 del 202169

Figura 38. Localización de las manchas con luz ultravioleta a 302 nm (izquierda) y 362 nm (derecha) coincidiendo con el revelado realizado con el reactivo de Dragendorff. Realizado con el programa de ImageJ.....70

Figura 39. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *Serratia* sp. a una concentración de 2000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 21 de abril de 2022.....71

Figura 40. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *Serratia* sp. a una concentración de 1000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 21 de abril de 2022.....72

Figura 41. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *Serratia* sp. a concentraciones de 5000 ppm y 10000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 29 de abril de 202272

Figura 42. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *Salmonella* sp. a una concentración de 1000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 21 de abril de 2022.....72

Figura 43. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *Salmonella* sp. a una concentración de 2000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 21 de abril de 2022.....73

Figura 44. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *Salmonella* sp. a concentraciones de 5000 ppm y 10000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 29 de abril de 202273

Figura 45. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *E. coli* sp. a una concentración de 1000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 21 de abril de 2022.....74

Figura 46. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *E. coli* sp. a una concentración de 2000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 21 de abril de 2022.....74

Figura 47. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *E. coli* sp. a concentraciones de 5000 ppm y 10000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 29 de abril de 2022.74

Figura 48. Prueba control de la *salmonella* sp. con Cefalosporina de tercera generación. Tomada por Juan Camilo Escobar el 11 de mayo del 202275

Figura 49. Prueba control de la *E. coli* sp. con Cefalosporina de tercera generación. Tomada por Juan Camilo Escobar el 11 de mayo del 202275

Figura 50. Prueba control de la *Serratia* sp. con Cefalosporina de tercera generación. Tomada por Juan Camilo Escobar el 11 de mayo del 202276

Índice de Tablas

Tabla 1. Estudios realizados a nivel internacional	20
Tabla 2. Preparación de los estándares del patrón de McFarland. Tomado de (Vanegas, 2015).....	59
Tabla 3. Pruebas cualitativas para la identificación de alcaloides presentes en el medio ácido. Las imágenes fueron tomadas y modificadas el 17 de diciembre del 2021 por Juan Camilo Escobar	63
Tabla 4. Pruebas cualitativas para la identificación de alcaloides presente en el medio básico. Las imágenes fueron tomadas y modificadas el 17 de diciembre del 2021 por Juan Camilo Escobar	64
Tabla 5. Rf de la cromatografía en capa fina con fase móvil de cloroformo (100%) y cloroformo-metanol (9:1).....	70

Resumen

Los alcaloides son metabolitos secundarios biosintetizados mayoritariamente por las plantas, caracterizados por presentar un nitrógeno en su estructura. Estos compuestos se encuentran generalmente en forma de sales en las especies vegetales, haciendo que estos sean extraídos de la planta mediante tratamiento con una solución alcalina. De la especie *Ipomoea carnea*, se han identificado siete alcaloides, entre los cuales se encuentra, la Swainsonina y las calisteginas B₁, B₂, B₃ y C₁, como los responsables de la intoxicación en el ganado, comprobado por medio de tejidos hepáticos, pancreáticos, renales y neuronales. Sin embargo, no se registran estudios en la literatura científica sobre el efecto de esta especie vegetal en células procariontas. Por lo tanto, este trabajo tuvo el propósito de llevar a cabo el estudio fitoquímico y la evaluación antimicrobiana del crudo alcaloidal de la especie vegetal *Ipomoea carnea* para adquirir conocimiento sobre este tipo de investigaciones en un estudiante del Semillero de Química de la Universidad Surcolombiana. Para lograrlo, las partes aéreas de la planta (hojas y tallos) se colectaron, secaron, pulverizaron y se desengrasaron con hexano. Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de los alcaloides mediante tratamiento con una solución ácida y alcalina. Luego, los extractos fueron sometidos a pruebas cualitativas con cinco reactivos diferentes (Tanred, Mayer, Valser, Marquis y Dragendorff). Los resultados permitieron identificar la presencia de alcaloides en el extracto alcaloidal básico, el cual fue cromatografiado por TLC, observándose 3 manchas con valores R_f de 0.169, 0.247 y 0.322 en las placas cromatográficas.

Para las pruebas antimicrobianas, se usaron tres bacterias Gram negativas (*E. coli sp.*, *Serratia sp.* y *Salmonella sp.*), aplicando el método de difusión en agar con antibiograma disco-placa a concentraciones de 1000 ppm, 2000 ppm, 5000 ppm y 10000 ppm, por triplicado y utilizándose como control el antibiótico Cefalosporina de tercera generación. Las cepas fueron

estandarizadas a la menor turbidez y sembradas masivamente en agar de Müller Hilton. Los resultados indicaron la alta resistencia de las cepas bacterianas a los extractos alcaloidales.

Palabras claves: Alcaloides, extracción ácida, extracción básica, pruebas cualitativas, actividad antimicrobiana

Abstract

Alkaloids are secondary metabolites biosynthesized mainly by plants, characterized by presenting a nitrogen in their structure, differentiated from other nitrogenous compounds by their high molecular weight, it is generally found in the form of salts when they are protonated and they are soluble in water, when they are treated with an alkaline solution, they lose the extra proton, returning to their base form, becoming soluble in organic compounds. *From Ipomoea carnea*, seven alkaloids have been identified, among which swainsonine and callistegins B₁, B₂, B₃ and C₁ stand out, causing reports of intoxication in cattle and verified through hepatic, pancreatic, renal and neuronal tissues. In such a way that, by not presenting studies in prokaryotic cells, this work has the purpose of acquiring knowledge about research through the phytochemical study and the antimicrobial potential of the alkaloidal crude of the plant species *Ipomoea carnea*. To achieve this, the aerial parts of the plant (leaves and stems) are collected, dried, powdered and degreased with hexane ready for acid and alkaline extraction. One part is treated with 5% $HClO_4$ for three days, then filtered and neutralized with $NaOH$, the other part is treated with 5% $NaOH$ for three days, proceeding to filtering. Then, all the filtrates are mixed (separately) with chloroform in a decantation flask, obtaining the alkaloids in the organic phase where the chloroform is found, ready to be rotated at 40°C, obtaining four extracts that are subjected to qualitative tests by precipitate medium with five different reagents (Tanred, Mayer, Valser, Marquis and Dragendorff), where the acid extract did not present precipitates and in the

alkaline medium with Dragendorff's reagent the leaves were positive with very little precipitate but in stems all were positive with abundant formation of precipitates, with the exception of the Marquis test (identifies opium alkaloids and derivatives). Due to the fact that only alkaloids were evidenced in the alkaline extract, two thin layer chromatographies were performed, the first with chloroform, and the second with chloroform-methanol (9:1), to be revealed in ultraviolet light and with the reagent of Dragendorff. Three stains with Rf of 0.169, 0.247 and 0.322 are obtained from chloroform on leaves and one stain with Rf 0.158 on stem, and in chloroform-methanol one for leaves and another on stem with Rf of 0.732 and 0.704 respectively.

The antimicrobial test used three Gram-negative bacteria (*E. coli sp.*, *Serratia sp.* and *Salmonella sp.*), applying the agar diffusion method with disk-plate antibiogram at concentrations of 1000 ppm, 2000 ppm, 5000 ppm and 10,000 ppm in triplicate with a control test using 3rd generation cephalosporin. The strains were standardized to the lowest turbidity and seeded massively on Müller Hilton agar. In this test there was no inhibition in any of the concentrations, including the antibiotic, thus presuming the high resistance of the strains used. It is concluded that the alkaloids in the plant are in the form of salts and do not inhibit bacteria at low concentrations, recommending future studies at higher concentrations and by dilution.

Key words: Alkaloids, acid extraction, basic extraction, qualitative tests, antimicrobial activity

1. Introducción

Los alcaloides son un grupo de metabolitos secundarios extraídos principalmente de las partes aéreas de las plantas y se pueden encontrar en forma de sales (solubles en sustancias polares) o bases (solubles en solventes orgánicos de mediana polaridad). Estos son compuestos básicos que presentan uno o más átomos de nitrógeno formando parte de un sistema cíclico (intra o extracíclico) proveniente principalmente de aminoácidos, generalmente sólidos incoloros a temperatura ambiente. Estos se pueden clasificar como alcaloides verdaderos, pseudoalcaloides, protoalcaloides y alcaloides imperfectos. Las funciones de los alcaloides en las plantas no están aún bien definidas, pero se ha comprobado que algunos de ellos actúan como defensa generando un mal sabor en los herbívoros, así como también de reservas para nutrientes (Arango, 2008)

Las plantas del orden *Solanaceae* son conocidas por ser excelentes productores de alcaloides y dentro de este orden se encuentra la especie *Ipomoea carnea*, a quien se le ha identificado el alcaloide swainsonina como la causante principal de intoxicación en animales vacunos, caprinos y ratones. Se carece de estudios en la literatura científica sobre el efecto antimicrobiano de esta especie vegetal en bacterias. Por lo tanto, este trabajo tiene como finalidad adquirir conocimiento sobre la investigación fitoquímica a través del estudio químico y el potencial antimicrobiano del crudo alcaloidal de la especie vegetal *Ipomoea carnea*.

2. Planteamiento del problema

La resistencia de las bacterias frente a los antibióticos, es uno de los grandes retos que tiene el hombre para combatirlos, la búsqueda de nuevos compuestos se ha convertido hoy en día en una carrera para lograr dicha finalidad. Debido a que varios de estos organismos procarióticos son los causantes de varias enfermedades, como la especie *Escherichia coli sp.* (diarreas especialmente en infantes) y *Salmonella sp.* (enfermedades gastrointestinales causado por consumir alimentos contaminados con heces), se han convertido en un problema de salubridad, llegando en muchos casos a ser mortales para el ser humano.

Las bacterias desarrollan diferentes mecanismos de resistencia de manera natural o intrínseca, adquirida y transmisible. Estos mecanismos permiten a las bacterias sintetizar enzimas que inactivan al principio activo de los antibióticos que, para los Gram positivos son generalmente plasmídicas, inducibles y extracelulares y en Gram negativas son de origen plasmídicos o transposones, periplásmicas y constitutivas; también, las mutaciones genéticas ayudan a fortalecer las paredes celulares de ellas o a expulsar ciertas cantidades del antibiótico que llegan a ser hereditarias.

Una de las grandes fuentes naturales para la búsqueda de nuevos principios activos son las plantas, que han sido usadas por más de 50 años para el aislamiento e identificación de innumerables compuestos químicos, útiles para controlar y/o eliminar la propagación de bacterias y hongos (Sierra, Romero, & Orduz, 2012). A pesar, de los grandes avances científicos y tecnológicos que ha permitido la producción de medicamentos sintéticos inspirados en las plantas, el hombre recurre cada vez más a los extractos de estas para la producción de nuevos medicamentos (Peña, 2011).

Entre los metabolitos secundarios se encuentran los alcaloides, quien en diversos estudios han demostrado ser excelentes inhibidores bacterianos. De la especie *Ipomoea carnea* se han identificado 7 alcaloides relacionados con su actividad citotóxica en animales vacuno y caprino, siendo el alcaloide swainsonina el principal responsable de la inhibición celular, comprobado por medio de tejidos hepáticos, pancreáticos, renales y neuronales en cabras, vacas y ratones. Sin embargo, no hay estudios sobre sus efectos en células procariotas como las bacterias.

Por tal motivo, este proyecto de semillero plantea la pregunta ¿Cuál es el potencial antimicrobiano del crudo alcaloidal de la especie vegetal *Ipomoea carnea*?

3. Antecedentes

Varios estudios clínicos en animales (cabras, conejillo de indias y ratones), sobre el efecto de la especie *Ipomoea carnea* se presentan en la Tabla 1, llegando a concluir la veracidad del consumo tóxico de esta planta debido a los alcaloides que en ella se sintetizan, siendo el principal causante la swainsonina quien es un inhibidor de la α - manosidasa I y II, como se muestra a continuación

Tabla 1. Estudios realizados a nivel internacional

Título e investigador(es)	Objetivos	Metodología	Conclusiones
Compuestos alcaloidales de la planta tóxica, <i>Ipomoea carnea</i> (Convolvulaceae) (Haraguchi <i>et al.</i> , 2003)	Aislar y cuantificar los alcaloides presentes en la planta tóxica <i>Ipomoea carnea</i> (Convolvulaceae)	El aislamiento de las hojas, flores y semillas de <i>Ipomoea carnea</i> fueron verificadas por HPTLC en sílica gel usando como solvente PrOH/AcOH/H ₂ O (4:1:1) y un reactivo de cloro- <i>o</i> -toluidina o vapor de yodo. Después, se realizó una medición por rotación óptica y un reconocimiento por espectrometría de masas. Para el análisis GC-MS con un tratamiento de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida	Alcaloides fueron aislados de las hojas, flores y semillas de la planta. Entre los diferentes alcaloides aislados, se identificaron a la swainsonina, 2-epi-lentiginosina, las calysteginas B1, B2, B3 y C1, y N-metil-4-hidroxi-L-prolina
El conejillo de indias como modelo animal	Reportar signos clínicos, histológicos y	La planta fue colectada e identificada en la UNNE (Corrientes, Argentina). Por	El consumo de <i>I. carnea</i> sp. <i>Fistulosa</i> induce a una

<p>para <i>Ipomoea carnea</i> inducida a α-manosidosis (Cholich, Gimeno, Teibler, Jorge, & Acosta de Pérez, 2009)</p>	<p>análisis de histoquímica de lectina de la intoxicación por las hojas secas de la <i>Ipomoea carnea</i> en conejillos de india</p>	<p>un periodo de 45 días los conejillos de indias fueron criados y divididas en dos grupos, uno experimental que se alimentaron con comida vegetal a la que se le adicionó el 50% de la planta y otro de control donde se alimentó con comida con vegetales sin el contenido de <i>I. carnea</i>. Estos animales fueron observados, y se tomaron de ellos estudios clínicos de tamaño, muestras histológicas pancreáticas, renales y hepáticas.</p>	<p>acumulación intralisosomal de oligosacáridos que contienen α-manosa en los conejillos de india, convirtiéndolo en un modelo valioso para la reproducción de α-manosidosis inducida.</p>
<p>Cambios en las concentraciones de swainsonina, calistegina y nitrógeno en una base anual en <i>Ipomoea carnea</i> (Cook <i>et al</i>, 2015)</p>	<p>Conocer la relación del contenido tóxico y nutricional de <i>I. carnea</i> en el transcurso de un año.</p>	<p>Las plantas <i>I. carnea</i> fueron colectadas en Brasil y se tomaron de ellas una muestra de 10-12 hojas de manera mensual para determinar la cantidad de swainsonina, calysteginas y nitrógeno. Análisis de la swainsonina: se tomaron 50 mg del material vegetal seco, y en una solución de 1.5 mL de ácido acético al 2% se agitó por 18 horas. A 0.1 mL del extracto se le añadió 0.9 mL de acetato de amonio al 20 mM. La</p>	<p>La cantidad de swainsonina fueron detectadas cantidades necesarias para convertirla en una planta toxica para el consumo animal durante el transcurso del año, aunque presenta un mayor contenido en época de lluvia. En el contenido de la calystegina fue muy similar a la swainsonina, mientras que la cantidad del</p>

muestra se centrifugó y se analizó en un LC-MS calystegina: 100 mg de material vegetal seco y molido se le añadió 5 mL de ácido acético al 2% (contenía 21 mg/mL de castanosperimina) y 4 mL de cloroformo y se dejó en centrifugación por 16 horas. Luego, la fracción de alcaloides se eluyó con metanol y amoníaco. El extracto de alcaloide se evaporó a sequedad y se sililó con 200 mL de piridina y 50 mL de reactivo BSTFA. Análisis de nitrógeno: las hojas fueron secadas y molidas para pasar por un LEGO FP-528 Nitrogen Analyzer.

crudo de proteína fueron similar a otras especies de *Ipomoea*, explicando el porqué la *Ipomoea carnea* es apetecible para el ganado durante época de sequía.

<p>Actividad citotóxica inducida por el extracto alcaloide de <i>Ipomoea carnea</i> en cultivos gliales mixtos murinos primarios. (Cholic, Pistán, Torres, Ortega, & Bustillo, 2020)</p>	<p>Caracterizar la citotoxicidad <i>in vitro</i> y las alteraciones morfológicas inducidas por un extracto alcaloidal</p>	<p>A las hojas colectadas, secas y pulverizadas, se les adicionó etanol (96%), y el solvente fue evaporado a presión baja hasta obtener un extracto oscuro para luego ser diluido en agua eliminando el residuo ceroso, seguido de éter etílico, acetato de etilo y <i>n</i>-butanol</p>	<p>Se evidenció que la células gliales sufrieron una disfunción lisosomal y almacenamiento intracelular, probablemente por la actividad de la swainsonina y las</p>
--	---	--	---

de <i>Ipomoea carnea</i> utilizando un modelo mixto de células gliales.		saturado con agua, y la solución acuosa fue liofilizada obteniendo el extracto alcaloidal.	calysteginas, comprobando de esta manera que el estudio <i>in vitro</i> sirve como
		Para determinar la cantidad de swainsonina, una fracción del extracto se disolvió en agua por 16 horas, y metanol, siendo evaporada con nitrógeno a 60 °C y enfriada a temperatura ambiente, obteniendo el peso de ella. En una alícuota de 5 mL agua y 0.05 mL acetato de amonio al 20mM, fue llevado a HPLC-MS/MS para cuantificarla. Luego, se utilizaron cultivos cerebrales primarias de ratones recién nacidos que contenían células gliales mixtas, que fueron expuestos al extracto de alcaloides que contenían entre 0 y 20µM por 48 horas; y los cambios morfológicos fueron evidenciados por microscopia de contraste de fases y tinción de Rosenfeld	modelo para evidenciar la intoxicación y el efecto neurotóxico que sufre los animales al consumir esta planta.
El papel de los alcaloides en la toxicosis de <i>Ipomoea</i>	Evaluar en ratas los efectos tóxicos de la	47 ratas Wistar de 60 días de edad, se mantuvieron alojadas a 24-26 °C y luz de 12 horas.	Se demostró que los efectos tóxicos fueron más severos en el grupo

<p><i>carnea</i>: Un estudio en ratas. (Huerza, Guerra, Haraguchi, Asano, & Górnaiak, 2004)</p>	<p>fracción acuosa de <i>Ipomoea carnea</i> y de sus diferentes alcaloides.</p>	<p>El extracto de alcaloides se obtuvo de una solución de etanol (50%), filtrada y evaporada, y por medio de cromatografía de columna se obtuvieron la swainsonina y la calystegina.</p> <p>Los animales se repartieron en 6 grupos (1 como control), a un grupo se le suministró swainsonina y al otro calystegina B₁, B₂, B₃, C₁, respectivamente, durante 14 días.</p>	<p>de la swainsonina, promoviendo la vacuolización en los diferentes órganos de los animales, mientras que los grupos de las calysteginas no presentaron síntomas de intoxicación. Además, no se apreciaron alteraciones en el sistema nervioso central. De esto se puede decir que, las calisteginas actúan como coayudantes de las swainsonina en <i>Ipomoea carnea</i>, pero las ratas no demostraron ser un buen modelo para la reproducción de almacenamiento neuronal, debido a que no se obtuvieron efectos neurotóxicos evidentes.</p>
---	---	---	--

<p>Una enfermedad de almacenamiento lisosomal inducida por <i>Ipomoea carnea</i> en cabras en Mozambique. (de Balogh <i>et al.</i>, 1999)</p>	<p>Descubrir la causa de la enfermedad lisosomal inducida por <i>Ipomoea carnea</i> en cabras de la villa de Mozambique</p>	<p>7 cabras dividida en 3 grupos fueron alimentadas con <i>Ipomoea carnea</i>, dejando uno para control y los otros con dosis en su comida de 50 g y 25 g por peso corporal diario, quienes se tomaron muestra de sangre, tejido cerebral, medula espinal, nervio ciático, hígado, riñón, bazo, pulmón y miocardio para sus respectivos análisis clínicos. Para la identificación de los alcaloides, su extracto fue obtenido de las hojas secas, molidas, para diluirlas en metanol. Su purificación se realizó con hidróxido de amonio al 0.5% y cromatografía de intercambio de iones, obteniendo un extracto de color amarillo. Por último, fue llevado a un análisis de CG-MS para la identificación de los alcaloides</p>	<p>Se detectaron en las neuronas unos axones esféricos, y vacuolización citoplasmática en todos los tejidos. Del estudio cromatográfico se encontraron los alcaloides swainsonina, quien es un inhibidor de la α-manosidasa, y las calystegina B₂ y C₁, inhibidores de la glucosidasa.</p>
---	---	---	--

Estudio de la variación diaria de los derivados de ergolinas en <i>Ipomoea carnea</i> (Sandobal, Barrios, Hernández, & Medina, 2010)	Demostrar la toxicidad de la planta durante el periodo de 1 día.	Se tomaron flores y hojas cada 2 horas durante un día (de 6:00 am a 6:00 pm), seguido de una extracción de alcaloides tipo ergolinas con solventes orgánicos y se realizaron pruebas de ácido d-lisérgicos, prueba de fluorescencia y ensayos cromatográficos en capa fina.	Se demostró que las concentraciones de alcaloides se mantienen estable en el transcurso del día, siendo un riesgo para los rebaños caprinos.
--	--	---	--

4. Justificación

A nivel de Latinoamérica, las investigaciones que tienen como base el aislamiento de sustancias químicas y sus efectos en algunos seres vivos, tales como bacterias, virus y pequeños mamíferos, no alcanzan a tener el impacto suficiente en relación con la gran cantidad de flora y fauna que se encuentra presente. En Colombia, son pocos los estudios químicos sobre el efecto antimicrobiano que presentan especies de la familia Convolvulaceae, a pesar de que hay reportes sobre el uso de estas plantas para el tratamiento de enfermedades, ocasionadas, bien sea, por un agente externo (picaduras de insectos, serpientes, agentes bacterianos, etc.) o por un mal funcionamiento de nuestro organismo. En cuanto al uso de las plantas que son empleadas en la parte agrícola, cabe resaltar que algunas especies de Convolvulaceas han mostrado un gran potencial para servir como cubiertas de cultivo, así como suelen ser empleadas de manera ornamental dentro de los hogares, por la forma y el colorido de su flor.

Para nuestro país, muchas especies de Convolvulaceas son comúnmente conocidas como batatillas, que se encuentran ampliamente distribuidas y diversificadas dentro de nuestro territorio nacional, estimándose un total de 81 especies.

En lo que concierne a la especie vegetal *Ipomoea carnea*, se ha identificado en diversos estudios su alto nivel tóxico en las partes aéreas, raíces y frutos, probados en ensayos con especies de mamíferos como ganado vacuno, entre las cuales hay registro en ovejas y cabras, también en ratas y de igual forma en peces, generando diversos trastornos como pérdida de peso, cambios de conducta, marcha descoordinada y la muerte, esto solo se ha podido identificar en especies químicas de carácter alcaloidal como la swainsonina, 2-epi-lentiginosina, y las calysteginas B₁, B₂ y B₃, desconociéndose de esta manera los efectos de las resinas glicosídicas.

La identificación de los alcaloides de la especie *Ipomoea carnea* permitirá ampliar el conocimiento sobre el potencial biológico de la familia Convolvulaceae, siendo este estudio realizado en esta planta por primera vez en la región, en cuanto a la evaluación del efecto antimicrobiano de los crudos alcaloidales sobre diferentes cepas bacterianas.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

Determinar el potencial antimicrobiano del extracto crudo alcaloidal de la especie vegetal *Ipomoea carnea* sobre enterobacterias..

5.2 Objetivos específicos

- Obtener el crudo alcaloidal de las partes aéreas de la especie vegetal *Ipomoea carnea* mediante extracción ácida y básica.
- Identificar mediante pruebas cualitativas y la técnica de cromatografía en capa fina la presencia de alcaloides.
- Evaluar los crudos alcaloidales a diferentes concentraciones contra las bacterias *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* y *Serratia sp.* mediante la técnica de difusión en agar con sensidiscos.

6. Marco teórico

6.1 Clasificación botánica y distribución de la especie *Ipomoea carnea*.

La especie *Ipomoea carnea* es una planta perteneciente al orden Solanales y de la familia de las Convolvuláceas, dicho orden se caracteriza por ser biosintetizadores de alcaloides. De esta especie se ha encontrado dos subespecies: *Ipomoea carnea ssp carnea* (jacq) e *Ipomoea carnea ssp fistulosa* (Mart. Ex Choisy).

La planta *Ipomoea carnea ssp fistulosa* es una planta arbustiva que se encuentra ampliamente distribuida en América tropical, principalmente en Perú y Brasil. Presenta tallos con látex blanco y lenticelas cilíndricas cuando es joven y en el adulto no presenta vellosidad; sus hojas son alternas y miden de 10 a 20 cm con forma ovalada acorazonada, en la base de ella se aprecia de dos a cinco venas; sus flores son solitarias o en panículas axilares, la corona de las flores tiene un color rosado, y son hermafroditas y actinomorfas (Figura 1). Además, esta planta se caracteriza por ser muy resistente a las sequias, manteniendo su color verde durante todo el transcurso del año, volviéndola apetecible por los animales de pastoreo, provocando intoxicaciones e incluso la muerte (Sabogal & Borkowski, 2007).



Figura 1. *Ipomoea carnea* en el norte de la ciudad de Neiva-Huila. Tomada el 4 de septiembre del 2021

6.2 Toxicidad de *Ipomoea carnea*

Según Sabogal & Borkowski (2007), el 12% de las causas de muerte del ganado vacuno en El Pantanal (Brasil) es consecuencia del consumo de esta planta en época de sequía, esto se debe a la escasez de vegetación verde presente en dicho tiempo, siendo esta una de las pocas especies de plantas que conserva esta coloración.

Diversos estudios han mostrado la presencia de alcaloides como la swainsonina y las calysteginas B₁, B₂, B₃ y C₁ como los principales compuestos responsables de la toxicidad. También, el extracto de las hojas causa embriaguez y al fumarlas sus efectos son alucinógenos.

6.3 Alcaloides y su importancia en *Ipomoea carnea*

Por lo general, los alcaloides se constituyen a partir de los aminoácidos y son almacenados en las vacuolas, en las partes periféricas de las plantas, tales como, las hojas, tallos, flores, frutos, etc., llegando a cumplir funciones ecológicas importantes como el control de crecimiento de hongos perjudiciales para la planta y en ocasiones alcanzando a ser tóxicos para los animales en altas concentraciones.

Se ha encontrado que algunos alcaloides afectan a los neurotransmisores, otros a la membrana, la síntesis de proteínas o actividad sintética, y bloqueadores en la división celular cuando se encuentra en metafase (Sabogal & Borkowski, 2007).

6.4 Alcaloides

6.4.1 Definición

Grandes adelantos en la farmacología se dieron en el siglo XIX, (época conocida como el renacer de las ciencias), cuando se logró aislar ácidos orgánicos de las plantas por Carl Sheeler, y

el descubrimiento y aislamiento de la Morfina (principio activo del efecto somnífero de la amapola por Friedrich Wilhelm Sertürner en 1816), los alcaloides empezaron a dar sus primeros pasos. Ya, en el año 1820 Joseph Pelletier y Joseph Caventou, lograron aislar la estricnina y la Brucina de la Nuez Vómica, la cafeína, la colchicina, y posteriormente la quinina y la cinconina de quienes se realizaron estudios clínicos. Desde estas fechas, los alcaloides (junto con los antibióticos) comenzaron a ser sustancias naturales de interés terapéutico debido a la gran variedad en la actividad biológica, alcanzándose a mediados del siglo XX el aislamiento e identificación de 800 alcaloides y a finales del mismo siglo su número había ascendido a 7000 estructuras, gracias a los grandes avances tecnológicos y científicos (Arango, 2008).

Es así que, al principio el concepto de alcaloides fue dada a las sustancias nitrogenadas, básicas de origen natural y distribución restringida que presentan estructuras complejas, donde el nitrógeno se encuentra formando parte de un sistema heterocíclico, con una excelente actividad farmacológica, principalmente obtenidas de las plantas, concepto dado en el siglo XIX por Meissner en 1819. Pero hoy en día no existe una definición sencilla ni precisa que establezca una frontera conceptual con los demás metabolitos secundarios que presentan nitrógeno en su estructura (Jean, 2009).

6.4.2 Clasificación de los alcaloides

Según Arango (2008), la definición anterior permite clasificar a los alcaloides en 4 grupos:

- Alcaloides verdaderos: se forman a partir de aminoácidos, presenta un nitrógeno tetracíclico, son de carácter básico y se presenta en forma de sales en la naturaleza.
- Protoalcaloides: son aminas simples, su nitrógeno es extracíclico, de carácter básico y se sintetizan a partir de los aminoácidos.

6.4.3 Función de los alcaloides

Las funciones de los alcaloides no se encuentran del todo bien definidas, pero estos juegan un papel muy importante en las plantas como la relación planta-depredador, protegiéndola de la agresión de algunos animales (con su sabor amargo) u otras plantas; el almacenamiento de desechos o reservas de sustancias (pero la respuesta no ha sido aun contestada del todo); también en algunos casos se ha comprobado que intervine en el control de desarrollo de la planta. (Jean, 2009)

6.4.4 Propiedades fisicoquímicas de los alcaloides

Entre las propiedades fisicoquímicas de los alcaloides, según Arango (2008) y Jean (2009) se tienen:

- Masas moleculares altas, comprendida desde 100 g/mol hasta los 900 g/mol
- Incoloros a excepción de aquellos altamente conjugados como urabaina de (verde), berberina (amarillo), sanguinarina (rojo), y oxoaporfinas (van de amarillo a rojo).
- Se encuentran en estado sólido a temperatura ambiente, a excepción de algunas bases no oxigenadas como la nicotina y la esparteína quienes se encuentra en estado líquido.
- Son poco solubles en agua en su forma base, pero muy solubles en agua cuando se encuentra en forma de sales.

6.5 Swainsonina

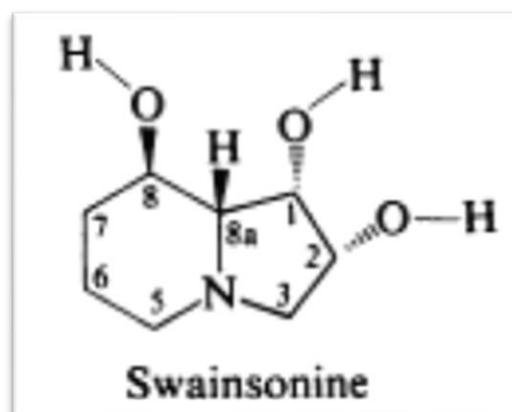


Figura 3. Estructura de la swainsonina. Tomada y modificada de (Dorling, Huxtable, & Colegate, 1980)

La swainsonina es un alcaloide indolizidínico (Figura 3), es decir, que presenta una estructura azabiciclico- [4,3,0]-nonano con un nitrógeno cabeza en el puente de su estructura (Rodríguez, 2016), y es conocida como un inhibidor de la enzima α -manosidasa y α -manosidasa II debido a la formación de media silla del catión swainsonina quien es similar al catión manosilo (Ren *et al.*, 2017), bloqueando el procedimiento oligosacárido en el aparato de Golgi, que ha permitido inhibir el proceso de crecimiento tumoral en murinos para fase experimentales (Goss, Baptiste, Fernandes, Baker, & Dennis, 1994), de igual manera, causa toxicosis en animales cuando esta consumida por el ganado (Noor *et al.*, 2021) y locoismo, llegando a provocar abortos y nacimientos de animales débiles con malformaciones (Sabogal & Borkowski, 2007).

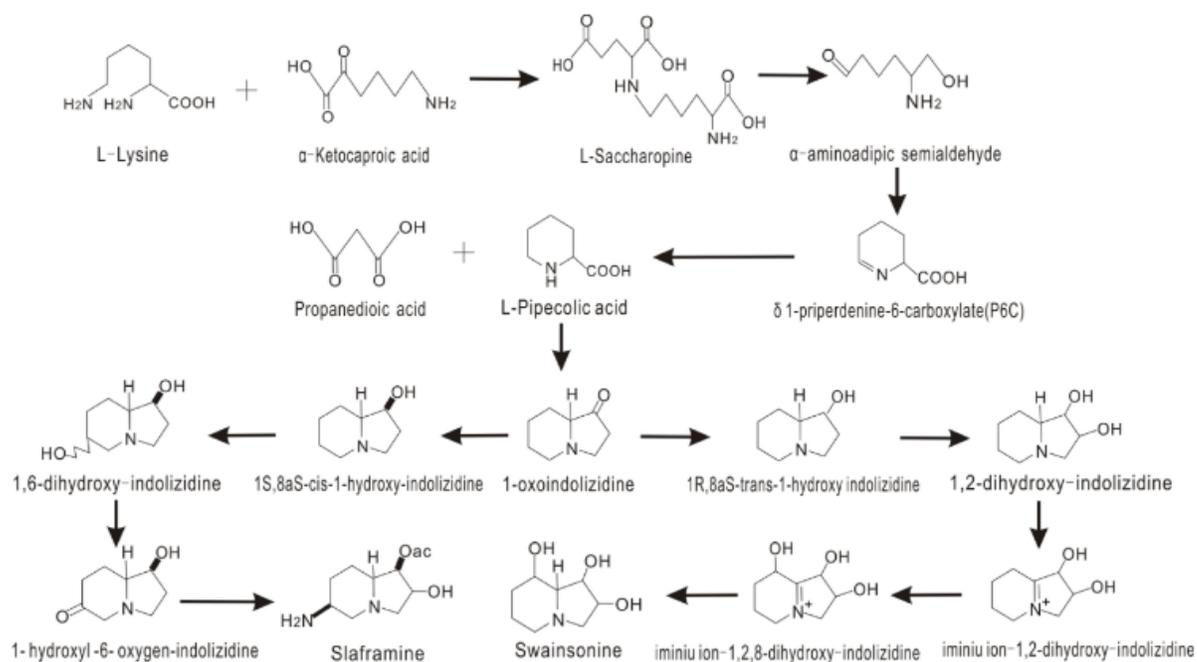


Figura 4. Biosíntesis de la swainsonina de la *Slafractonina leguminicola*. Tomada de (Ren *et al.*, 2017)

Este alcaloide fue descubierto por primera vez de la leguminosa *Swainsona canescens* de Australia, pero según una revisión bibliográfica realiza por Ren *et al.* (2017), la biosíntesis de este alcaloide se ha estudiado de diferentes plantas, tales como *Slafractofina leguminicola*, *Metarhizium anisopliae*, *Alternaria sect* y *Undifilum oxytropis* donde se puede concluir que la swainsonina parte de un aminoácido alifático, la lisina (un homólogo de la ornitina) por la vía ácido piperólico, sin embargo, Tan *et al.* (2018) mencionan que el ácido piperólico se puede obtener de tres rutas diferentes (Figuras 4 y 5).

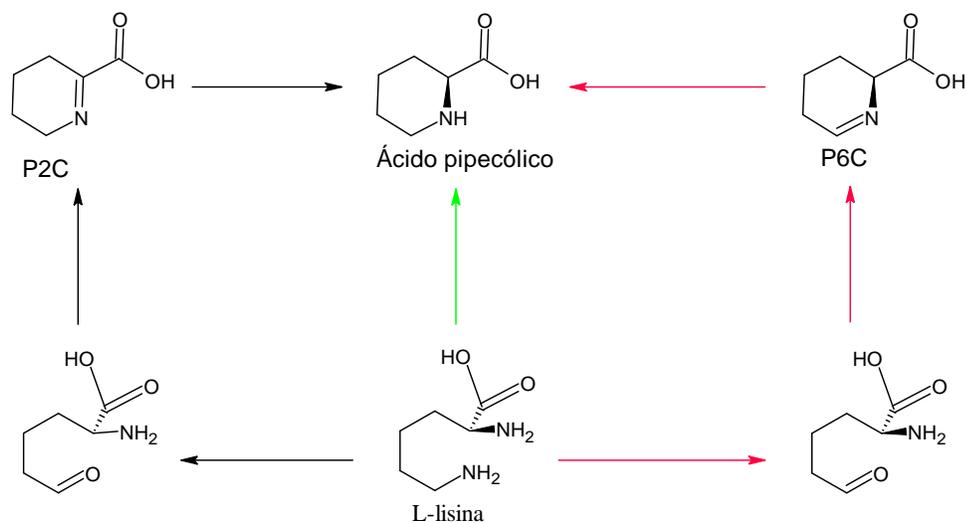


Figura 5. Rutas para la vía *l*-lisina - ácido piperidínico. La primera ruta demarcada con flechas negras, la segunda con flechas rojas y la tercera con flecha de color verde. Tomada y modificada de (Tan, Chen, Wu, Zhang, & Ding, 2018) utilizando el programa de ADC Lab.

En la primera ruta, la *L* – lisina sufre una oxidación convirtiéndola en una unidad de cetona, e inmediatamente después reacción a con el NH_2 formando el ácido Δ^1 -piperideína-2-carboxílico (*P2C*), para luego ser reducido y dar origen al ácido piperidínico. En la segunda, Una *L* – lisina ϵ – aminotransferasa (LAT) cataliza la lisina para formar *P6C*, que luego forma el ácido piperidínico bajo la acción de la pirrolina-5-carboxilato (*P5C*) reductasa. La tercera ruta, surge por la acción de la enzima llamada RapL para catalizar la ciclación desaminada de *L* – lisina a ácido piperidínico.

6.6 Calisteginas

Son una familia de alcaloides con núcleo nor-tropano e inmunoazúcares menos estudiados debido a su reciente descubrimiento por Tepfer *et al.* (1988) cuando lo aislaron por primera vez de *Calystegia sepium*.



Figura 6. Algunos ejemplos de la familia Calistegina, donde se resalta con morado su núcleo nor-tropano. Tomado y modificado de (Rodríguez, 2016) utilizando el programa de ADC Lab.

Al ser nortropánicas, presenta un sistema bicíclico [3.2.1]octano, con importantes funciones biológicas. Además, en función del número de grupos hidroxilos es su estructura, esta familia “se dividen en tres grandes grupos: calisteginas A (con tres grupos hidroxilo), calisteginas B (con cuatro grupos hidroxilo) y calisteginas C (con cinco grupos hidroxilo)” como se puede visualizar en la Figura 6 (Hernández Y. , 2016).

En cuanto a la biosíntesis de las calisteginas, esta no ha sido aclarada, pero una hipótesis trabajada pudo involucrar la modificación de la ruta biosintética de los alcaloides tropanos, comenzando con la tropanona, derivado por la L-lisina y L-arginina. Dräger ha propuesto que la pseudotropina, formada por la tropanona se da por la reducción de la tropanona reductasa II, pudo ser el intermediario para generar todas las calisteginas, teniendo en común la presencia de un grupo α -hidroxilo en la posición 3. Solo uno de los alcaloides descubierto es la excepción a esta regla, calistegina A₆, quien carece de un grupo hidroxilo en la posición 3. La reducción de la tropanona por la tropanona reductasa I da tropina, un típico precursor del alcaloide tropano éster (Figura 7) (Molyneux, Nash, & Asano).

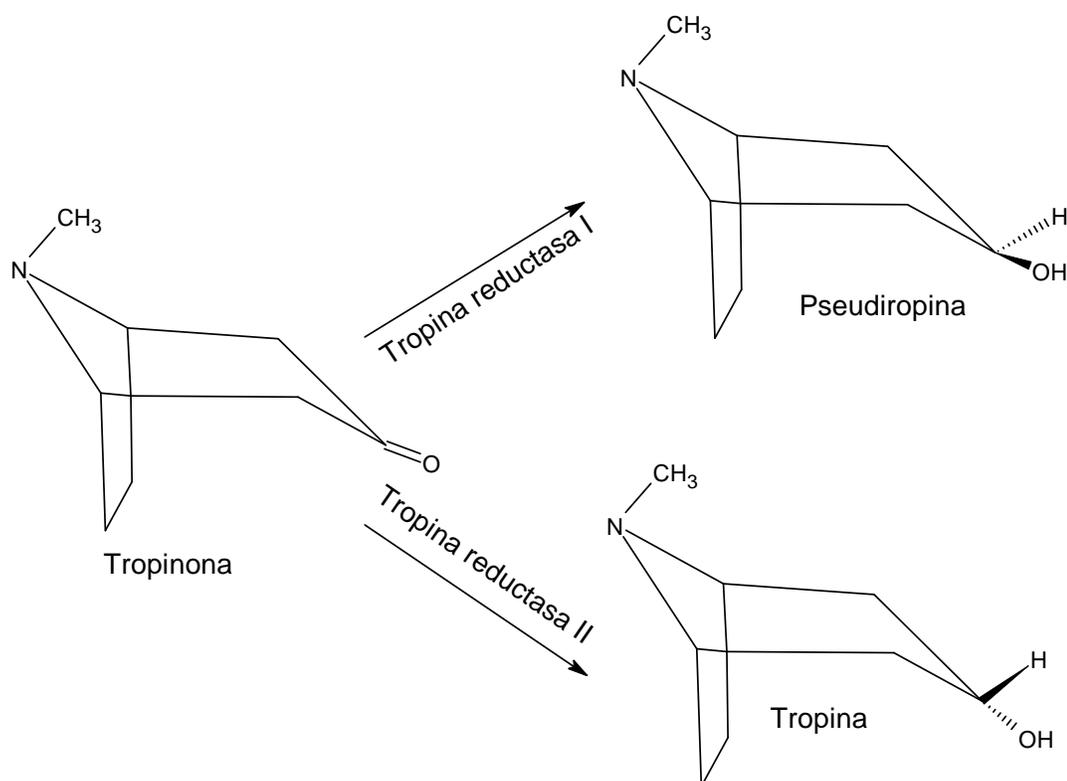


Figura 7. Biosíntesis de la Calistegina. Tomada y modificada de (Molyneux, Nash, & Asano) utilizando el programa de ADC Lab.

6.7 Extracción y aislamiento de los alcaloides

Los alcaloides son compuestos de carácter básico y apolares, siendo solubles en solventes orgánicos como el diclorometano, acetato de etilo, cloroformo, éter etílico, etc., pero en la naturaleza normalmente se encuentran en forma de sales, presentando un pH ácido debido a la presencia de un par de electrones en el nitrógeno, convirtiéndolas en sustancias polares, solubles en agua, solventes hidroalcohólicas y soluciones ácidas. Desde esta perspectiva, la extracción de los alcaloides se puede realizar de dos maneras diferentes (medio ácido y medio básico), buscando siempre transformar al metabolito secundario en forma de base (Figura 8) (Arango, 2008)

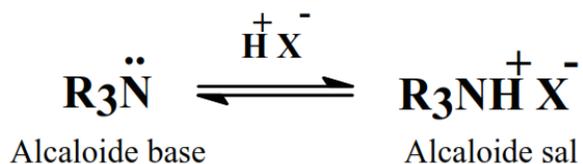


Figura 8. Desplazamiento de los alcaloides según el pH en el que se encuentra. Tomada de (Arango, 2008)

6.7.1 Preparación del material vegetal

El material vegetal a estudiar debe ser secado a una temperatura menor a 50°C, pulverizado y luego desengrasado con solventes apolares para la eliminación de las grasas, debido a su alto contenido de ácidos grasos (Arango, 2008).

6.7.2 Extracción por medio ácido

El material vegetal desengrasado y seco, es extraída con agua acidulada, con alcohol o una solución hidroalcohólica acidulada, para obtener los alcaloides en forma de sales. Desde este punto, el extracto obtenido puede ser procesado de diferentes formas (Arango, 2008)

- Alcalinización de la sustancia para la extracción de ella en forma base con un solvente no miscible.
- Fijación de los alcaloides sobre resina intercambiadoras de iones para luego ser separadas por elución con ácidos fuertes.
- Precipitación de los alcaloides en forma de yodomercuariatos como el reactivo de Mayer quien produce un precipitado que es filtrado o centrifugado, para luego disolverlo con una mezcla de agua-alcohol-acetona, y ser separada por una resina intercambiadora de iones. Dicha técnica es muy útil para alcaloides amonio cuaternarios.

6.7.3 Extracción en medio básico o alcalino

Con el material vegetal desengrasado y seco, se mezcla con una solución alcalina desplazando un electrón del par de electrones enlazado en el nitrógeno de la molécula, transformándola en su forma base (Cristancho & Cárdenas, 2017).

Luego, dicho extracto se mezcla con un solvente orgánico de polaridad media, donde se forman dos fases, una acuosa y la otra orgánica donde se encuentran los alcaloides, y para la eliminación total del agua en ella, se usa una sal anhidra. Esta es filtrada y concentrada a presión baja para la obtención de los alcaloides totales (Cristancho & Cárdenas, 2017).

6.8 Identificación de los alcaloides

6.8.1 Formación de precipitados

Según Arango (2008), el reconocimiento de los alcaloides se basa en la capacidad que tienen los alcaloides (en forma de sales) para formar precipitados cuando se combinan con yodo y metales pesados como el mercurio, bismuto y tungsteno.

Por consiguiente, en la práctica existen reactivos que permiten identificar los alcaloides con las soluciones:

- Yodo-yoduro de potasio (reactivo de Wagner)
- Mercurio tetrayoduro de potasio (reactivo de Mayer)
- Tetrayoduro bismuto de potasio (reactivo de Dragendorff)
- Ácido pícrico (reactivo de Hager)
- Ácido sílico tungstico (reactivo de Bertrand)
- *p*-dimetilamino benzaldehído (reactivo de Ehrlich)

- Nitración de alcaloides (reacción de Vital-Morin), utilizado para alcaloides en forma de base

Debido al carácter nitrogenado de los alcaloides, estos tienden a comportarse de manera similar al amoníaco en el reactivo de Mayer, y muchos alcaloides forman con el bismuto, yoduros dobles de fórmula general $BiI_3B \cdot HI$ que son insolubles.

6.8.2 Cromatografía en capa fina

La palabra cromatografía proveniente del griego *chroma* (color) *graphien* (escribir), es una escritura dada por uno o más compuestos cuando se pone a correr en una mezcla de disolventes (Figura 9). Por ende, es una técnica de separación de mezclas, utilizada ampliamente para identificar los compuestos y la purificación de ellas, cuando dicha mezcla es muy difícil de separar. Toda técnica cromatográfica consta de una fase estacionaria y una fase móvil [citar].



Figura 9. Ejemplo de cromatografía en capa fina. (Fuente Propia)

Existen varios tipos de cromatografía, entre estos la cromatografía en capa fina. Esta técnica cromatográfica tiene como fase estacionaria un sólido y una fase móvil líquida, que tuvo

un uso inicial en la industria farmacéutica, pero poco a poco se fue expandiendo, llegando a ser una herramienta ampliamente aplicada para estudios biológicos, bioquímicos, clínicos, entre otros (Skoog, West, & Crouch, 2014).

Cómo se mencionó anteriormente, esta consta de una fase estacionaria en estado sólido, que es una capa muy delgada de una sustancia adsorbente (celulosa, almidón, Sílica gel, azúcares alúmina, carbón activo o kieserlguhr) esparcida en una superficie principalmente de vidrio, cuya función es retener compuestos que presenten una polaridad igual o más cercana a ella y dejar pasar libremente aquellas con polaridad opuesta; y una fase móvil líquida constituida por uno o más disolventes (Éter de petróleo, éter dietílico, ciclohexano, acetato de etilo, tetracloruro de carbono, piridina, benceno, etanol, cloroformo, metanol, diclorometano, ácido acético, etc.) (Skoog, West, & Crouch, 2014).

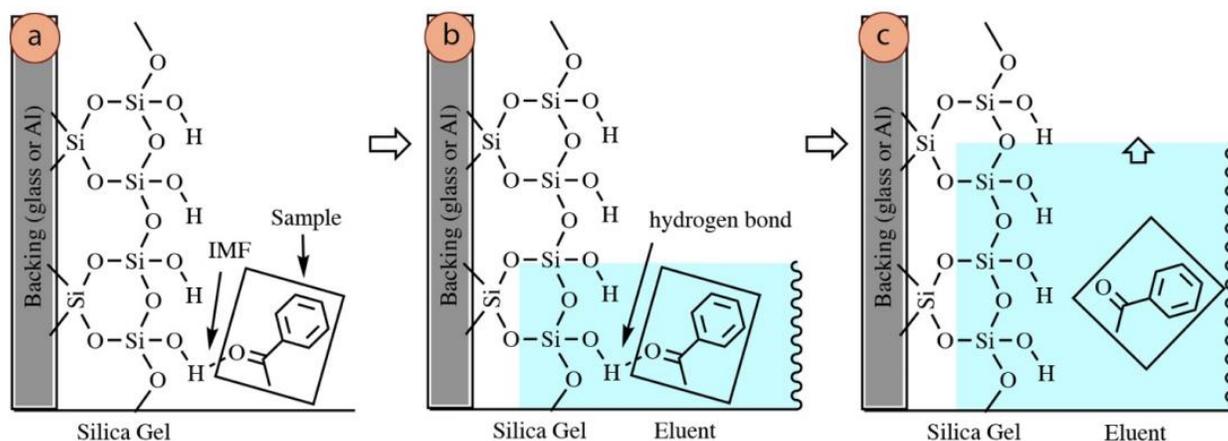


Figura 10. Diagrama estructural de compuestos apolares en una lámina de Sílica gel. tomada de (Nichols, 2022)

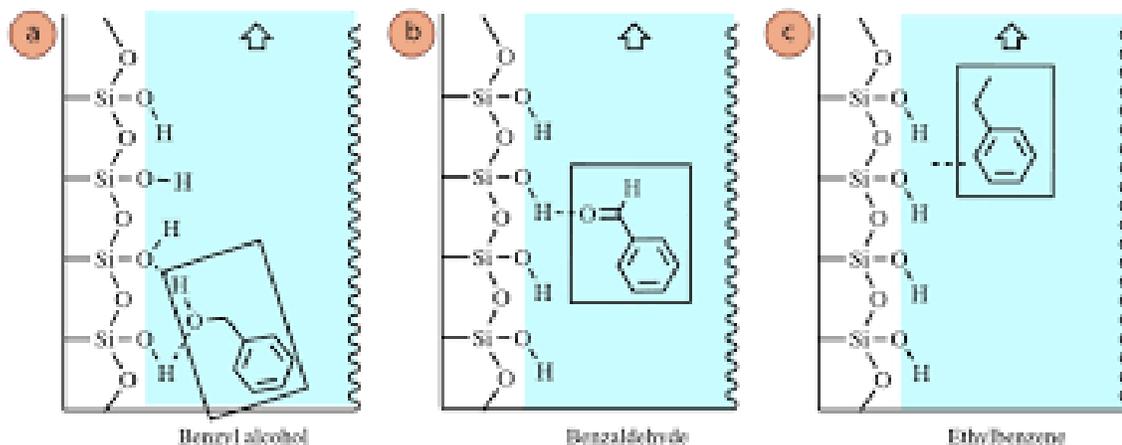


Figura 11. Diagrama estructural de compuestos polares en una lámina de Sílica gel. tomada de (Nichols, 2022)

La muestra es arrastrada por el solvente a través de placa por capilaridad, siendo las más retenidas aquellas cuya polaridad sea más a fin con la sustancia de la placa, es decir, si la fase estacionaria es Sílica gel, quien es altamente polar, las sustancias polares son retenidas más fácilmente por la fase estacionaria llegando a recorrer una menor distancia en comparación a aquellas que son apolares (Figuras 10 y 11). También, hay que tener en cuenta que la polaridad de la fase móvil arrastra con mayor facilidad los compuestos que sean más solubles a esta [citar].

Un parámetro que permite determinar la separación de una muestra en una placa cromatográfica es el Factor de Retención (R_f), que relaciona la distancia recorrida por la muestra sobre la distancia recorrida por el disolvente, obteniéndose valores comprendidos entre 0 y 1, donde 0 es quedarse en el punto de partida y 1 el final del recorrido.

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por una muestra}}{\text{distancia total recorrida por el disolvente}}$$

6.9 Actividad antimicrobiana

Diferentes métodos se han aplicado para identificar la sensibilidad de las bacterias frente a principios activos ya sea a nivel *in vivo* o *in vitro*, que tienen una enorme validez científica.

Los métodos para determinar la susceptibilidad de las bacterias de manera *in vitro* se denominan antibiogramas, y este método permite indicar la terapia adecuada para una infección específica, e incluso a un paciente en particular. El uso del agar de Müller Hilton es la más usada. Existen tres métodos principales: método de difusión, método de dilución y bioautografía (Ramirez & Castaño, 2009).

El método por difusión es ampliamente utilizado en la evaluación de extractos vegetales frente a las bacterias, y consiste en la siembra del microorganismo de estudio en una superficie de agar, para posteriormente ser aplicado un disco de papel previamente impregnado con la sustancia a una concentración determinada, empleándose como control un antibiotico, para después medir la zona de inhibición conocido como halo de inhibición (Montero, Vayas, Avilés, Pazmiño, & Erazo, 2018).

El método de dilución en caldo permite cuantificar la actividad antimicrobiana y medir la sensibilidad del antibiótico o sustancia a estudiar, preparado con agar Müller Hilton. Para esta metodología es necesaria estandarizar la cantidad del inóculo con ayuda de la escala de McFarland, para conocer la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM); permitiendo en la primera encontrar la concentración mínima óptima para evaluar la susceptibilidad y confirmar resistencias inusuales (Horna, Sivia, Vicente, & Tamaris, 2005).

7. Metodología

7.1 Enfoque metodológico

Según Hernández *et al* (2014), el presente trabajo tiene un enfoque mixto, debido a que se utilizó la recolección y el análisis de datos, tras la aplicación de las pruebas cualitativas que permitieron la identificación de alcaloides presentes en los crudos, el revelado cromatográfico, y en el antibiograma bacteriano.

7.2 Muestreo

La colecta de las partes aéreas de la planta (hojas y tallos) se realizó en septiembre del 2021, sobre las coordenadas 02°56'55.61''N, 75°17'10.63''W, ubicado al norte de la ciudad de Neiva por la carrera 16 vía al centro comercial Sanpedro Plaza.

7.3 Secado y pulverizado

El secado de la planta se realizó a temperatura ambiente bajo sombra durante 1 semana, después de esto, las hojas y los tallos fueron sometidas a una licuadora Oster, obteniéndose 525 g y 633 g de material pulverizado, respectivamente.

7.4 Extracción de alcaloides

Para la extracción de los alcaloides, se siguió la metodología planteada por Arango (2008), comenzando con el desengrase y la extracción de los alcaloides por dos medios diferentes (basico y acido).

7.4.1 Desengrase del material vegetal

Por duplicado, se tomaron 250 g del material pulverizado de hojas y tallos por separado y se le adicionaron 600 mL de hexano, dejándolo en agitación constante durante tres días con ayuda de un Shaker (ver Figura 12). Después, el material se filtró con ayuda de una gasa

esterilizada y se dejó secar por 2 días. El material vegetal se preparó para la extracción por medio básico y ácido.



Figura 12. Desengrase del material vegetal con hexano. (Fuente propia)

7.4.2 Extracción de los alcaloides en medio ácido

A 250 g del material vegetal seco y desengrasado, se le adicionaron 1500 mL de ácido perclórico ($HClO_4$) al 5%, y se dejó en agitación constante por tres días en el shaker (ver Figura 13).



Figura 13. Filtrado del material vegetal en una solución de ácido perclórico al 5%. (Fuente Propia).

Luego, la mezcla se filtró con gasa esterilizada, obteniéndose un filtrado acidulado de 600 mL para hojas y 1000 mL para tallos. A continuación, se le adicionaron lentamente 120 mL de hidróxido de sodio ($NaOH$) al 25% para el extracto de hojas y 197 mL para el extracto de tallos, hasta neutralización a un pH de 7.8 en hojas y 7.4 en tallos.



Figura 14. Neutralización del pH. (Fuente propia)

Seguidamente, a cada 200 mL de la solución neutralizada se le agregaron 200 mL cloroformo ($CHCl_3$) en un balón de decantación de 500 mL, se agitó vigorosamente, y se dejó reposar por un periodo muy corto de tiempo hasta la formación de dos fases (ver Figura 15), una fase orgánica de color claro (parte inferior) donde se encuentra presente los alcaloides y una fase acuosa de color oscuro (parte superior). Dicho proceso se repitió dos veces hasta agotar la solución neutralizada.



Figura 15. Extracción líquido-líquido para la separación de los alcaloides. (Fuente Propia)

Las fases orgánicas obtenidas de la separación líquido-líquido, fueron sometidas a rotaevaporación a una temperatura comprendida entre 40°C y 50°C (ver Figura 16), consiguiéndose de esta manera, la obtención de los crudos alcaloidales.

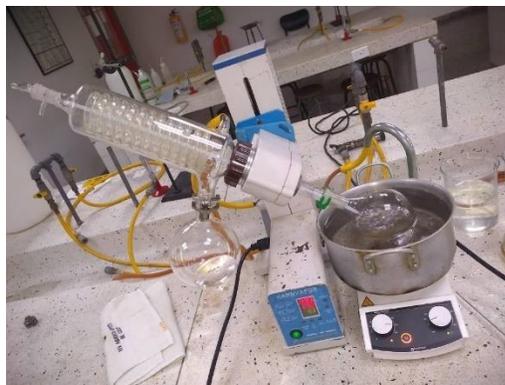


Figura 16. Eliminación del extracto por medio de rotaevaporación. (Fuente Propia)

7.4.3 Extracción de los alcaloides en medio básico

A 250 g del material vegetal seco y desengrasado (hojas y tallos, por separado), se le adicionaron 2000 mL de hidróxido de sodio ($NaOH$) al 5%, y se dejó en agitación constante por tres días en el shaker (ver Figura 17).

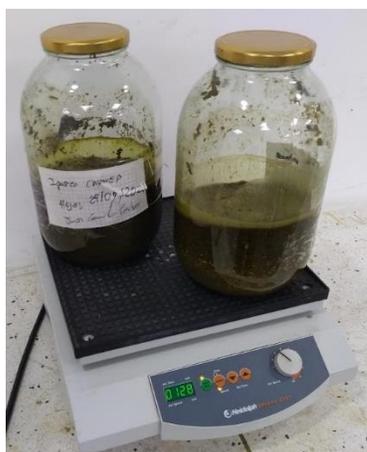


Figura 17. Material vegetal en solución de hidróxido de sodio al 5% en el shaker. (Fuente propia)

Después de transcurrido los tres días, la mezcla se llevó a filtración con una gasa esterilizada (ver Figura 18), obteniéndose 1700 mL y 1200 mL del filtrado de tallos y hojas, respectivamente.



Figura 18. Filtrado del material vegetal en solución alcalina. (Fuente propia)

Seguidamente, por cada 250 mL de la solución filtrada se le agregaron 250 mL cloroformo ($CHCl_3$) en un balón de decantación de 500 mL, se agitó vigorosamente, y se dejó reposar por un periodo muy corto de tiempo hasta la formación de 2 fases (ver Figura 19), una fase orgánica de color claro (parte inferior) donde se encuentran presentes los alcaloides y una fase acuosa de color oscuro (parte superior) (ver Figura 20). Dicho proceso se repitió cuatro veces hasta agotar el filtrado.



Figura 19. Montaje para la separación líquido-líquido con cloroformo. La fase acuosa es de color oscuro (arriba) y la orgánica es traslúcida (abajo). (Fuente propia)

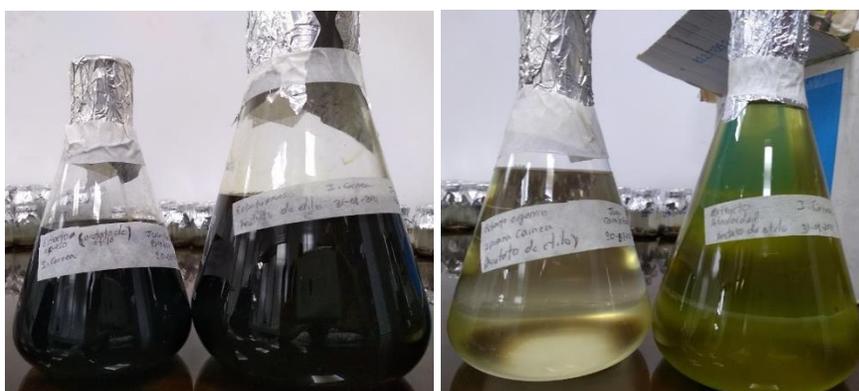


Figura 20. Obtención la fase acuosa en la primera foto y de los alcaloides en la fase orgánica de hojas (derecha) y tallos (izquierda) en la segunda foto. (Fuente propia)

Las fases orgánicas obtenidas de la separación líquido-líquido, fueron sometidas a rotavaporación a una temperatura comprendida entre 40°C y 50°C, obteniéndose de esta manera, el crudo alcaloidal.

7.5 Determinación de alcaloides por medio de precipitados

Para la determinación de la presencia o ausencia de alcaloides en los cuatro extractos, se realizaron por duplicado las siguientes pruebas cualitativas, adicionándose 0.25 mg del extracto alcaloidal, en cada una de ellas:

a) **Reactivos de Tanred:** comprende la preparación de dos soluciones:

Solución a: 18 g de yoduro de potasio disuelto en 200 mL de agua

Solución b: 6.75 g de bicloruro de mercurio en 200 mL de agua

La solución a se disolvió en la solución b y se aforó a 500 mL con ácido acético glacial.

La presencia de alcaloides se detecta con la aparición de un precipitado amarillo lechoso (similar a la leche cortada) cuando se le adiciona a la muestra problema 5 gotas del reactivo.

b) **Reactivo de Valsen:** se disolvieron 5.0 g de yoduro de potasio en 2.5 g de yoduro de mercurio II en 100 mL de agua, seguidamente se dejó reposar la mezcla y se filtró al vacío.

c) **Reactivo de Mayer:** 1.3 g de bicloruro de mercurio se disolvieron en 60 mL de agua y 5.0 g de yoduro de potasio en 10 mL de agua. Las dos soluciones se mezclaron y se aforaron hasta 100 mL con agua destilada.

La presencia de alcaloides se detecta con la aparición de un precipitado blanco o de color crema cuando se le agrega el reactivo de Mayer a la solución problema.

d) **Reactivo de Marquis:** Se adiciona una gota de formaldehído y nueve gotas de ácido sulfúrico a la muestra. Luego, se agita suavemente.

La aparición de una coloración violeta oscura, indica pruebas preliminares para opio y derivados de morfina, codeína y heroína.

e) **Reactivo de Dragendorff:** Comprende la preparación de dos soluciones:

- Solución a: 0.85 g de nitrato de bismuto se adicionan a una mezcla de 10 mL de ácido acético y 40 mL de agua.
- Solución b: 8.0 g de yoduro de potasio se disuelven en 20 mL de agua. Luego, se mezclan 5.0 mL de la solución **a** con 5.0 mL de la solución **b** y 20 mL de ácido acético. La solución resultante se afora con 100 mL de agua destilada. La presencia de alcaloides se detecta con la aparición de un precipitado blanco en una solución acidulada de la muestra problema.

7.6 Identificación de los alcaloides mediante Cromatografía en capa fina

7.6.1 Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina se realizó utilizando una lámina de Sílica Gel de 3 x 6 cm como fase estacionaria, marcando con un lápiz suavemente una línea a 0.5 cm de los bordes extremos (superiores e inferior), adicionalmente en la línea inferior se marcaron dos puntos de 1.0 centímetro de distancia desde los bordes laterales, puntos donde se depositó la muestra, una para el extracto de hojas y el otro para el extracto de tallos, como se muestra en las Figuras 21 y 22.



Figura 21. Placa cromatográfica con las muestras del crudo alcaloidal de hojas (izquierda) y tallos (derecha). (Fuente propia)

Primero se tomó como fase móvil el cloroformo, y después una mezcla 9:1 de cloroformo -metanol.



Figura 22. Montaje de la placa cromatográfica en capa fina. Tomada el 21 de febrero del 2022

A un beaker de 100 mL se le adicionó 5 mL de la fase móvil, luego se introdujo la lámina cromatográfica, y se tapó con un vidrio reloj hasta que la fase móvil llegara a la línea superior previamente trazada (Figura 22). Completado el recorrido de la fase móvil, la lámina se sacó del beaker con ayuda de una pinza y se dejó secar, para ser revelada por luz ultravioleta con longitudes de onda de 305 nm y 362 nm. Después, las placas fueron rociadas con el reactivo de Dragendorff con ayuda de un atomizador espray reveladas al calor en una plancha calefactora a 40 °C.

7.7 Evaluación antimicrobiana de los extractos alcaloidales

Para la prueba microbiológica, se seleccionaron las bacterias *Escherichia coli*, *Serratia sp* y *Salmonella sp*, siendo proporcionadas por el laboratorio de microbiología de la facultad de

Ciencias aplicadas y naturales de la universidad Surcolombiana. Se empleó el método de difusión con antibiograma disco-placa siguiendo la guía de Vanegas (2015), utilizando los extractos del crudo alcaloidal que dieron positivo en las pruebas cualitativas, diluidas a concentraciones de 1000 ppm, 2000 ppm, 5000 ppm y 10000 ppm, en una solución de Tween 80 al 20% como disolvente (Figura 27), teniendo como prueba control la cefalosporina de tercera generación (ver Figura 24). Además, la siembra se realizó en una cámara esterilizada previamente con luz ultravioleta.

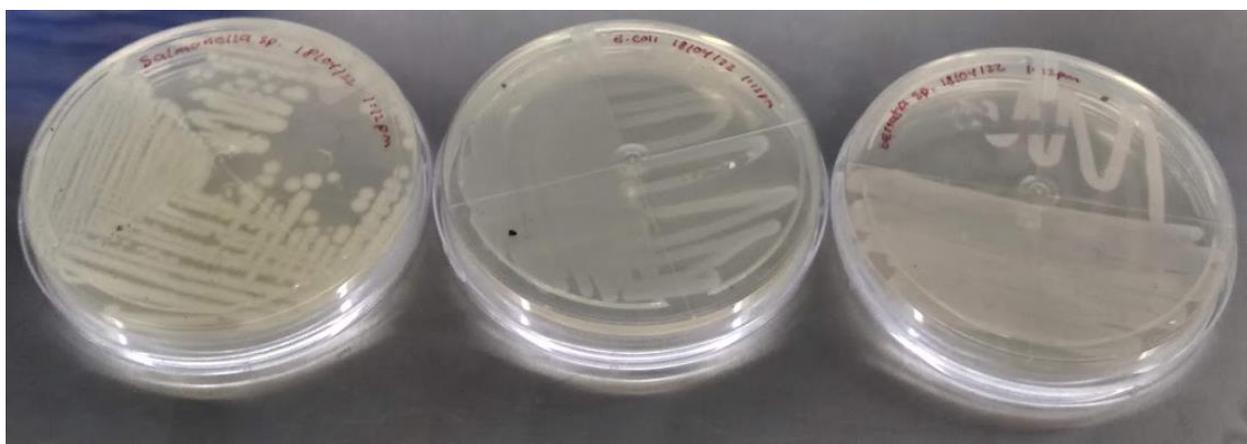


Figura 23. Sembrado de las cepas bacterianas *E. coli* sp., *Serratia* sp. y *Salmonella* sp. en agar nutritivo. tomada por Juan Camilo el día 18 de abril del 2022

Las bacterias fueron sembradas en cajas de Petri con agar nutritivo e incubadas en un horno por 24 horas a una temperatura de 37°C, dejándose listo para proceder con la estandarización del inóculo. Para ello, se realizó una siembra superficial en tubo de ensayo inclinado con agar nutritivo e incubadas a 37°C por un periodo comprendido entre 24 y 48 horas.



Figura 24. Antibiótico que contiene cefalosporina de tercera generación. Tomada por Juan Camilo Escobar el 11 de mayo del 2022

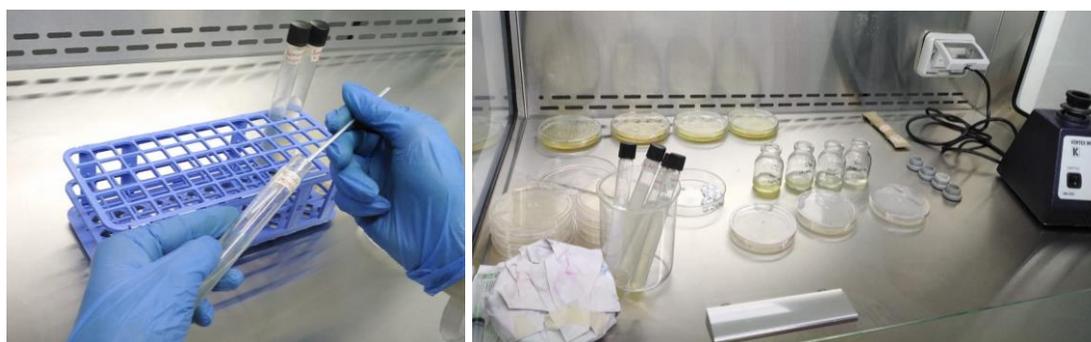


Figura 25. Siembra superficial de las cepas bacterianas en tubo de ensayo inclinado en agar nutritivo. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 18 y 25 de abril del 2022

Transcurrido este tiempo, a los tubos de ensayo se le adicionó una solución salina y se agitó con un contador de bacterias hasta que ellas se desprendiesen del agar, y se le siguió adicionando solución salina poco a poco hasta observar en los inóculos una turbidez de 0.5

comparada con el estándar de McFarland, quien equivale a un total de $1,5 \times 10^8$ bacterias/mL (ver Tabla 2), tomado como referencia la tarjeta de Wickerham junto con una solución de ácido sulfúrico al 1% y Cloruro de Bario al 1.175%, en las cantidades descritas en la Tabla 2 para el estándar mencionada anteriormente (ver Figura 26).

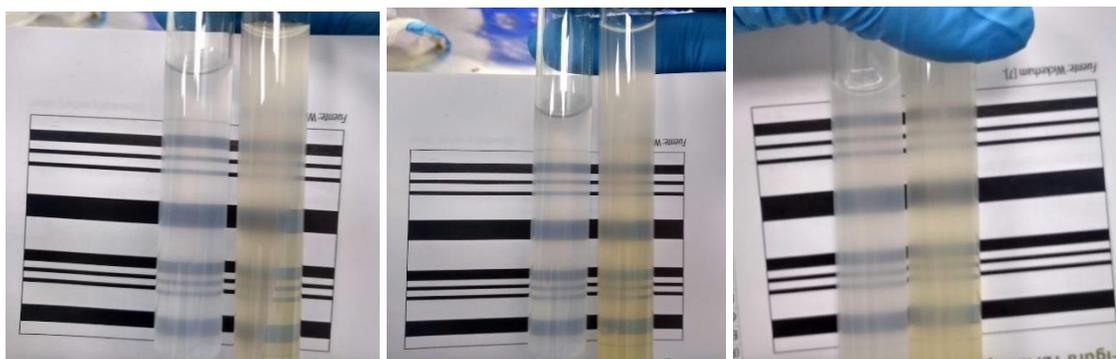


Figura 26. Estandarización a 0.5 en la escala de McFarland de los inóculos, usando la tarjeta de Wickerham. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 19 de abril del 2022



Figura 27. Disoluciones de los crudos alcaloidales alcalinos en Tween 80 al 20% a concentraciones de 1000 ppm y 2000 ppm. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 19 de abril del 2022.

Tabla 2. Preparación de los estándares del patrón de McFarland. Tomado de (Vanegas, 2015)

Estándar N°	Volumen de $BaCl_2$ al 1.175% (mL)	Volumen de H_2SO_4 al 1% (mL)	N° de bacterias/ mL ($\times 10^8$)
0,5	0.5	99.5	1,5
1	1.0	99.0	3
2	2.0	98.0	6
3	3.0	97.0	9
4	4.0	96.0	12
5	5.0	95.0	15
6	6.0	94.0	18
7	7.0	93.0	21
8	8.0	92.0	24
9	9.0	91.0	27
10	10.0	90.0	30

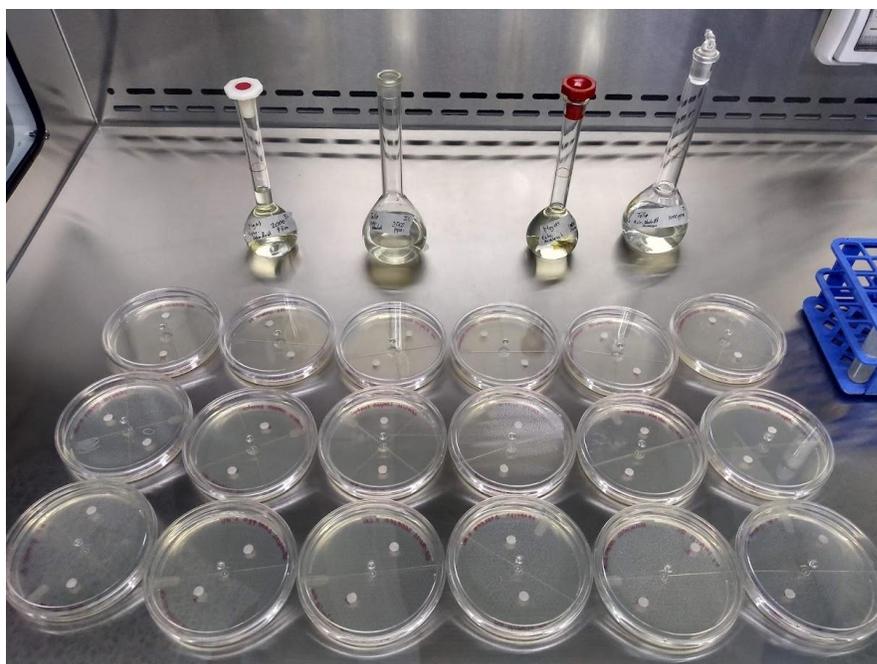


Figura 28. Siembra de los sensidiscos en la cámara esterilizada previamente con luz ultravioleta. (Fuente propia)

Después de estandarizado los inóculos, se realizó una siembra superficial masiva en cajas de Petri con agar Müller Hilton, seguido de la ubicación de los sensidiscos impregnados con las concentraciones de los crudos alcaloidales (Figura 28), los cuales fueron llevados al horno a una temperatura de $37^{\circ}C$, dicha siembra se realizó por triplicado. Por último, se realizaron las

observaciones a las 24 y 48 horas para apreciar el comportamiento antimicrobiano de los crudos alcaloidales de la *Ipomoea carnea*.

8. Resultados y análisis de resultados

Después de realizados los procesos para la obtención del crudo alcaloidal de *Ipomoea carnea*, se lograron obtener 4 extractos, dos de la extracción en medio ácido (1 de hojas y la otra en tallo) y dos con la extracción en medio básico (1 en hojas y otra en tallo) de consistencia sólida. El extracto alcaloidal del tratamiento alcalino de las hojas presentó un color verde oscuro y el extracto de tallos un color amarillo ocre oscuro.



Figura 29. Crudo de la extracción alcalina de las hojas. (Fuente propia)



Figura 30. Crudo de la extracción alcalina de los tallos. (Fuente propia)



Figura 31. Crudo de la extracción acida de los tallos. Tomada el 23 de febrero del 2022



Figura 32. Crudo de la extracción acida de los tallos. Tomada el 23 de febrero del 2022

8.1 Pruebas cualitativas para la identificación de alcaloides

A cada uno de los extractos obtenidos, se le realizaron las pruebas cualitativas con reactivos específicos (Tanred, Mayer, Valser, Maquis y Dragendorff) para la determinación de alcaloides, en el cual, dependiendo de la cantidad de precipitado formado se evaluó negativo para alcaloides con el signo menos (-), y positivo con el signo más (+), donde un mas (+) es poca formación de precipitado, dos más (++) una cantidad moderada de precipitado y tres más (+++) abundante formación de precipitado, a excepción de la prueba de Marquis, cuyo color morado indica positivo para alcaloides del opio y derivados, obteniéndose así resultados negativos en cada uno de los 4 extractos obtenidos, para este test.

Tabla 3. Pruebas cualitativas para la identificación de alcaloides presentes en el medio ácido. Las imágenes fueron tomadas y modificadas el 17 de diciembre del 2021 por Juan Camilo Escobar

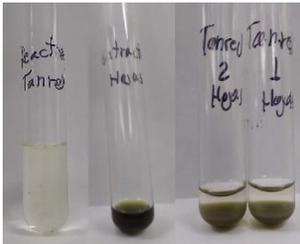
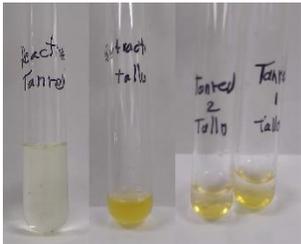
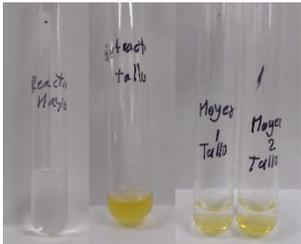
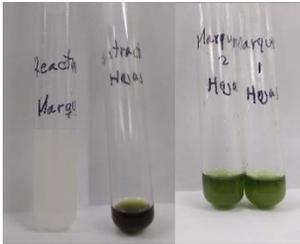
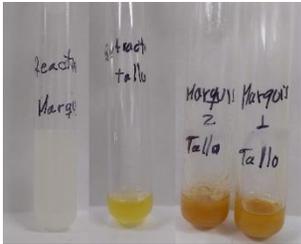
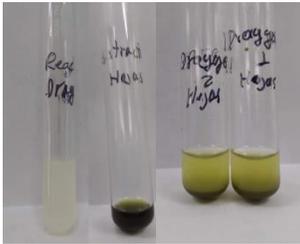
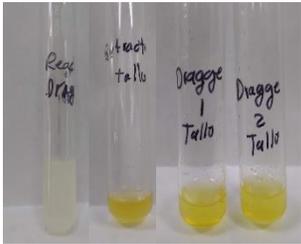
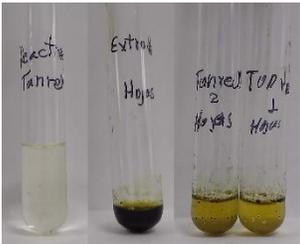
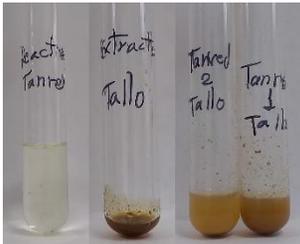
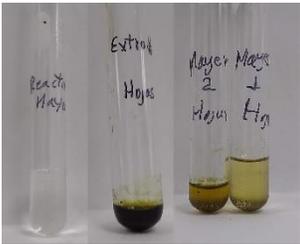
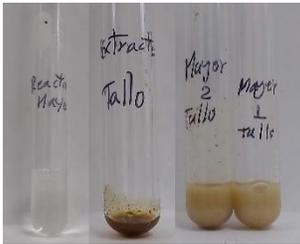
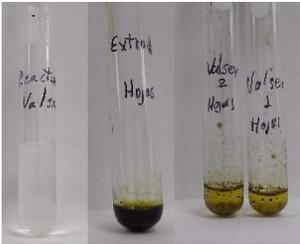
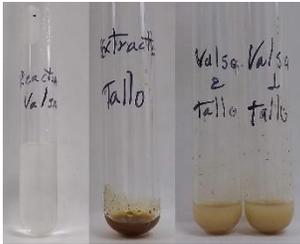
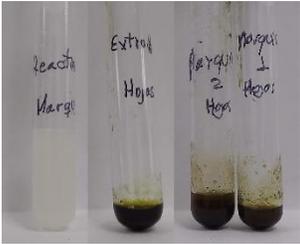
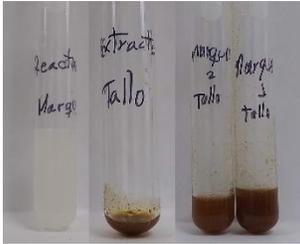
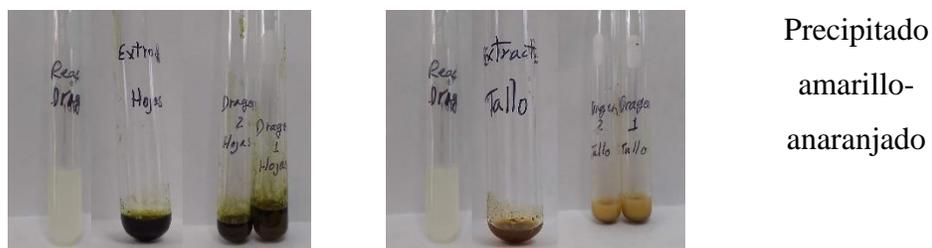
Reactivo	Muestras		Hojas		Tallos		Resultado positivo
	1	2	1	2	1	2	
Tanred	-	-			Precipitado amarillo		
Mayer	-	-			Precipitado blanco o color crema		
Valser	-	-					
Marquis	-	-			Coloración violeta (Opio y derivados)		
Dragendorff	-	-			precipitado amarillo- anaranjado		

Tabla 4. Pruebas cualitativas para la identificación de alcaloides presente en el medio básico. Las imágenes fueron tomadas y modificadas el 17 de diciembre del 2021 por Juan Camilo Escobar

Muestras Reactivo	Hojas		Tallos		Resultado positivo
	1	2	1	2	
Tanred	-	-	+++	+++	Precipitado amarillo
					
Mayer	-	-	+++	+++	Precipitado blanco o color crema
					
Valser	-	-	+++	+++	Precipitado blanco
					
Marquis	-	-	-	-	Coloración violeta (opio y derivados)
					
Dragendorff	-	-	+++	+++	



Los resultados obtenidos de las pruebas cualitativas permitieron determinar la presencia de alcaloides en el extracto alcaloidal de los tallos de *Ipomoea carnea* obtenido por tratamiento alcalino. En la Tabla 4, se logra apreciar la formación de precipitados con los colores correspondientes que indicaron la presencia presuntiva de los alcaloides en la especie a través de las pruebas de Tanred, Mayer, Valser y Dragendorff.

El reactivo de Mayer se usa para la caracterización no específica de alcaloides, dando como positivo un precipitado de color blanco o amarillo claro, debido a la formación de tetrayodo mercuriato de potasio, cuando el cloruro de mercurio y el yoduro de potasio se combinan con el alcaloide, protonándolo y enlazándose con un átomo de yodo, como se muestra en la Figura 33.

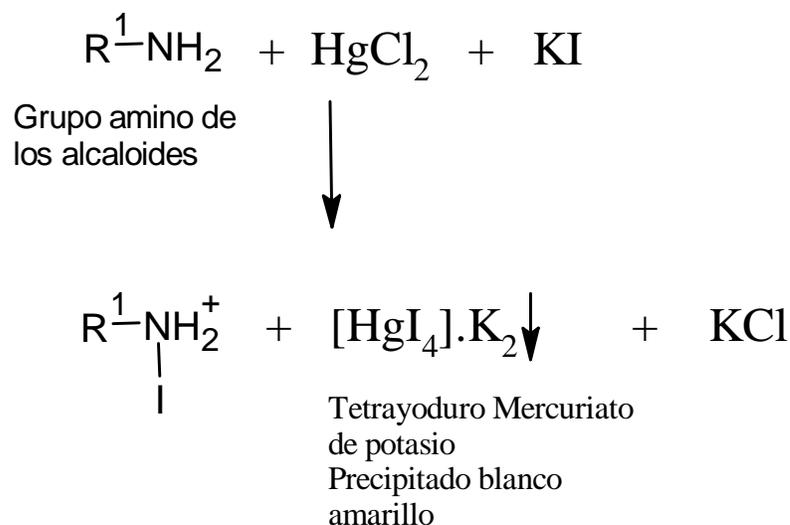


Figura 33. Reacción del alcaloide con el reactivo de Mayer. Tomada y modificada de (Huamaní, 2020) utilizando el programa de ADC Lab.

El reactivo de Marquis es una prueba utilizada para la identificación del opio y derivados como la heroína, y la aparición de una coloración violeta indica como positivo para este tipo de alcaloides, cuando una molécula de alcaloide se une con otra previamente conjugada con el aldehído (Monterroso, 2003). Por consiguiente, el resultado obtenido del crudo alcaloidal en este trabajo es negativo, ya que la presencia de un alcaloide perteneciente a la familia del opio y derivados no fueron identificados, en comparación con el estudio publicado por (Haraguchi *et al.*, 2003) donde se identificaron alcaloides indolizidínicos y nortropanos.

El reactivo de Dragendorff es una de las técnicas cualitativas para la identificación rápida y estimada de alcaloides por medio de la formación de un precipitado de color amarillo-anaranjado, debido a un complejo de yodo, como se muestra en la Figura 34.

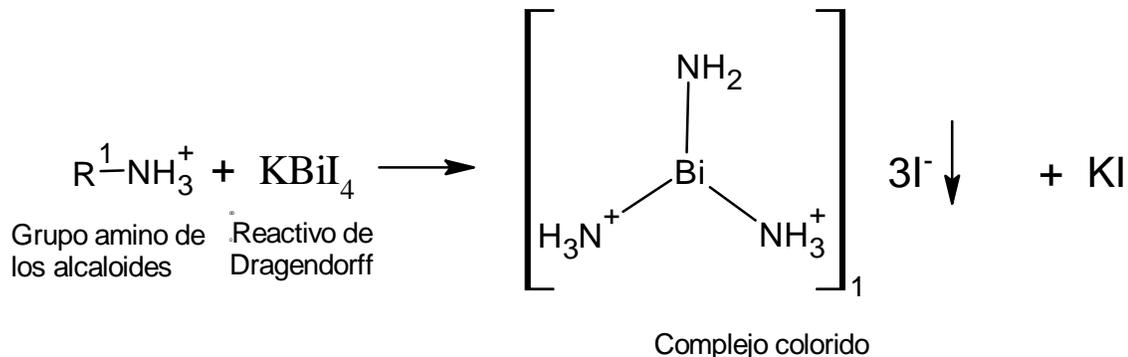


Figura 34. Reacción de precipitación con el reactivo de Dragendorff. Tomado y modificado de (Ochoa & Sarmineto, 2018) utilizando el programa de ADC Lab.

Esto demuestra que los alcaloides de *Ipomoea carnea* pueden encontrarse en su forma de sal, ya que el tratamiento con base permitió liberarlos en su forma de base libre, para luego ser extraídos con disolventes orgánicos. Estudios en la literatura reportan el uso de la cromatografía

de columna con resinas de intercambio iónico para la purificación de los alcaloides (Haraguchi *et al.*, 2003).

8.2 Identificación de los alcaloides por cromatografía en capa fina

Para la cromatografía en capa fina, se tomaron los extractos alcaloidales que dieron positivos en las pruebas cualitativas, es decir, el crudo alcaloidal obtenido por medio básico de los tallos. También, se empleó el extracto de hojas para determinar la presencia de compuestos cromóforos.

El revelado con luz ultravioleta para la placa cromatográfica donde se utilizó cloroformo como fase móvil, se puede evidenciar tonalidades fluorescentes de color rojo para hojas en ambas longitudes de ondas, y de colores azules fluorescentes en tallos, con el revelado por UV. Para el revelado con el reactivo de Dragendorff, en el extracto alcaloidal de tallos se observaron manchas ubicadas cerca al punto de origen, indicando la gran polaridad de los alcaloides.

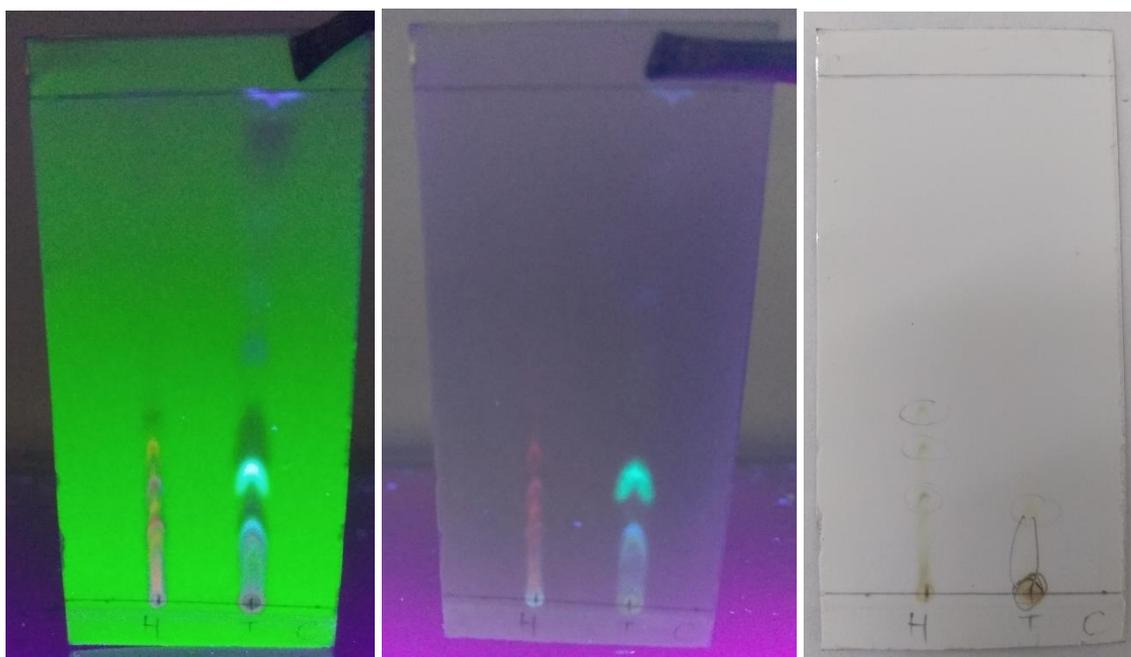


Figura 35. Placas cromatográficas del extracto alcaloidal alcalino en lámina de Sílica gel con fase móvil de cloroformo, revelado en luz ultravioleta a 302 nm (izquierda), 362 nm (mitad) y con el reactivo de Dragendorff. Tomadas por Juan Camilo Escobar el día 19 de noviembre del 2021.

Las medidas fueron realizadas con ayuda del programa de Imagej, y también con ayuda de este programa, se buscaron las manchas fluorescentes que coincidieran con las reveladas con el reactivo de Dragenforff. De tal manera, que en tallos se localiza una mancha fluorescente de color azul, el mismo mostrado en el punto de origen del recorrido, indicando la posible presencia de alcaloides aromáticos en *Ipomoea carnea*.

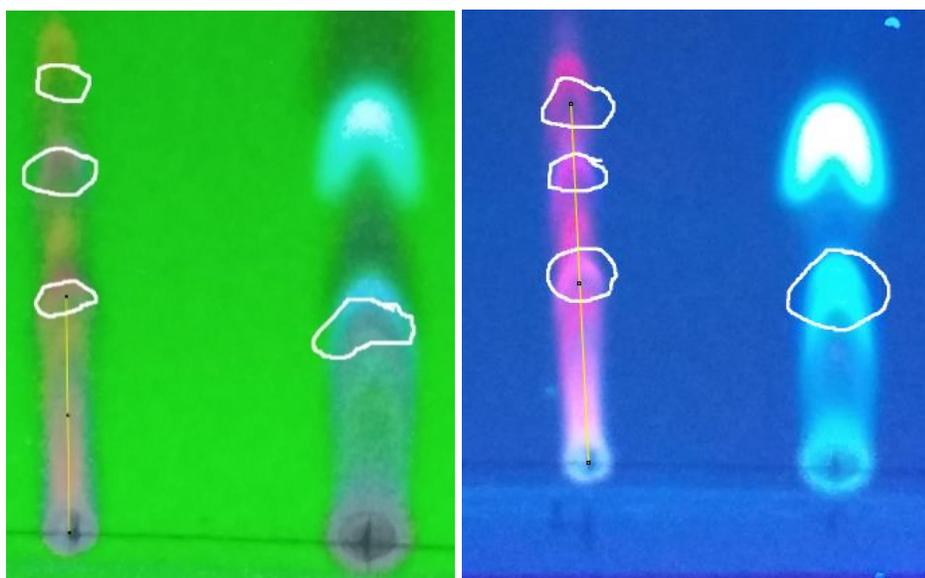


Figura 36. Localización de las manchas con luz ultravioleta a 302 nm (izquierda) y 362 nm (derecha) coincidiendo con el revelado realizado con el reactivo de Dragendorff. Realizado con el programa de ImageJ.

Ahora, en la placa cromatográfica con cloroformo- metanol (9:1) como fase móvil, se puede ver para hojas, unas manchas fluorescentes de color rojo y azul en el revelado de luz ultravioleta a 305 nm y a 362 nm. Para tallos, de observaron manchas de color azul siendo más

clara en longitudes de onda de 302 nm. El revelado con el reactivo de Dragendorff permitió mostrar 1 mancha a 3.661 cm para tallos.

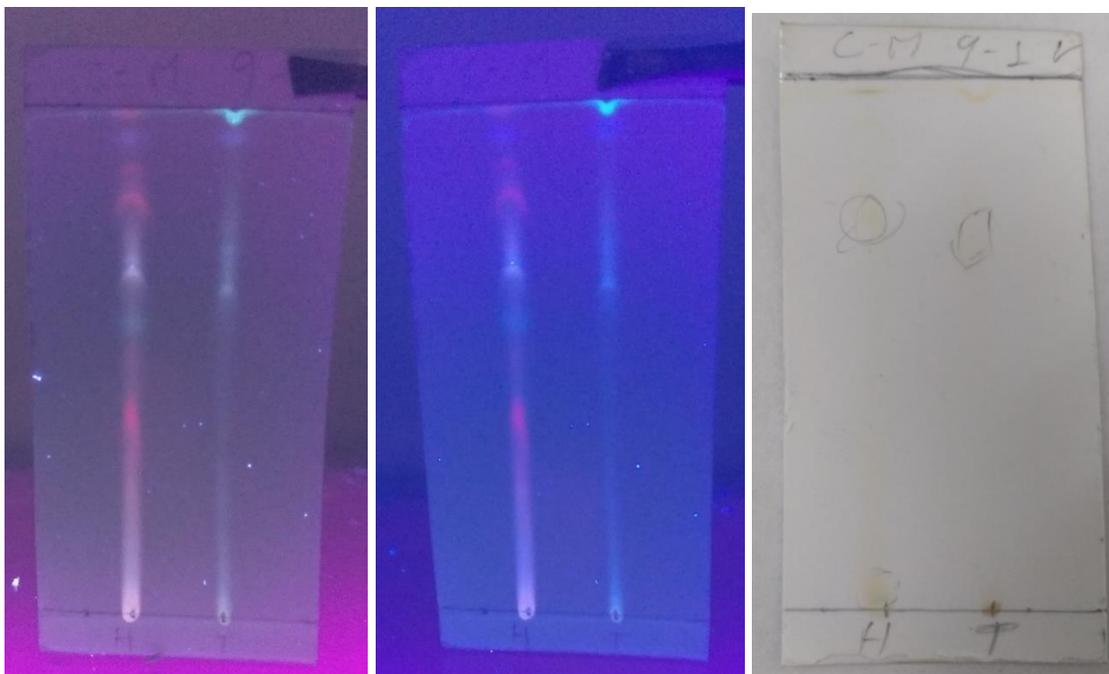


Figura 37. Placas cromatográficas del extracto alcaloidal alcalino en lamina con Sílica gel con fase móvil de cloroformo-metanol (9:1), revelado en luz ultravioleta a 302 nm (izquierda), 362nm (mitad) y con el reactivo de Dragendorff. Tomadas por Juan Camilo Escobar el día 19 del 2021

De igual manera que en la placa anterior, con ayuda del programa de ImageJ se encontraron las manchas de color azul-morado para ambas longitudes de ondas.



Figura 38. Localización de las manchas con luz ultravioleta a 302 nm (izquierda) y 362 nm (derecha) coincidiendo con el revelado realizado con el reactivo de Dragendorff. Realizado con el programa de ImageJ.

Según Leyva (2013), la swainsonina se revela con luz ultravioleta presentando un color violeta fluorescente, siendo este coherente con los resultados obtenidos.

En la Tabla 5, se muestran los R_f de los alcaloides identificados con el reactivo de Dragendorff, interpretando que son compuestos un poco más polares, teniendo en cuenta sus valores inferiores a 0.5 descritos en la primera columna, donde se usó un solvente de mediana polaridad (cloroformo), que arrastra las sustancias de mayor polaridad por debajo de la mitad de su recorrido y los de menor polaridad por encima de esta, causado por la interacción de los compuestos con el sílica gel ubicada en la fase estacionaria.

Tabla 5. R_f de la cromatografía en capa fina con fase móvil de cloroformo (100%) y cloroformo-metanol (9:1).

Cloroformo		Cloroformo-metanol (9:1)	
Hojas	Tallos	Hojas	Tallos
0.169	0.158	0.732	0.704
0.247	-	-	-
0.322	-	-	-

8.3 Evaluación de la actividad bacteriana

A continuación, se muestran los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana, donde no se observó la formación de halos alrededor de los sensidiscos impregnados de las concentraciones del extracto alcaloidal en ninguna de las bacterias Gram negativas seleccionadas para su evaluación, a pesar de estandarizar el número de bacterias por mililitro, como se puede observar en cada una de las Figuras 39 a 47



Figura 39. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *Serratia* sp. a una concentración de 2000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 21 de abril de 2022.



Figura 40. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *Serratia* sp. a una concentración de 1000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 21 de abril de 2022.

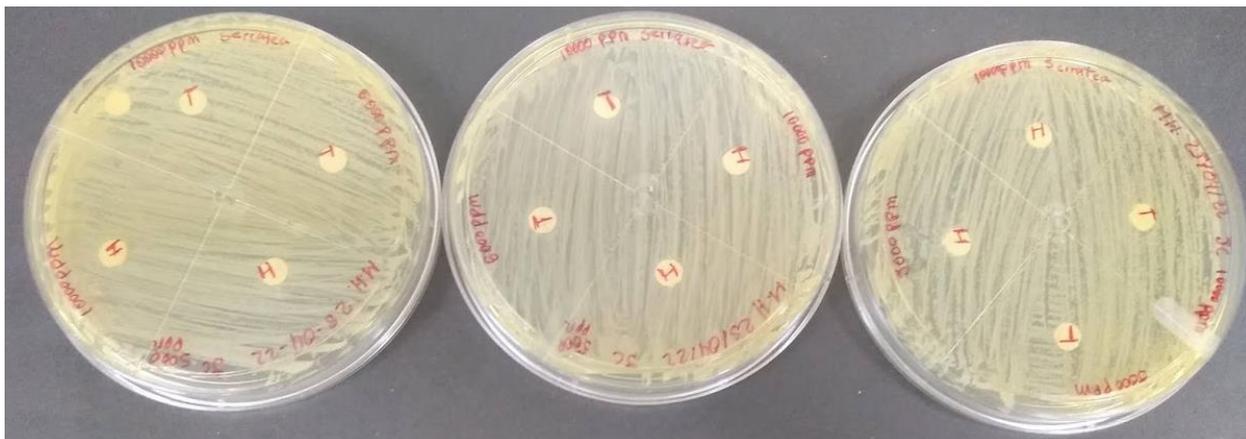


Figura 41. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *Serratia* sp. a concentraciones de 5000 ppm y 10000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 29 de abril de 2022



Figura 42. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *Salmonella* sp. a una concentración de 1000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 21 de abril de 2022.



Figura 43. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *Salmonella* sp. a una concentración de 2000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 21 de abril de 2022

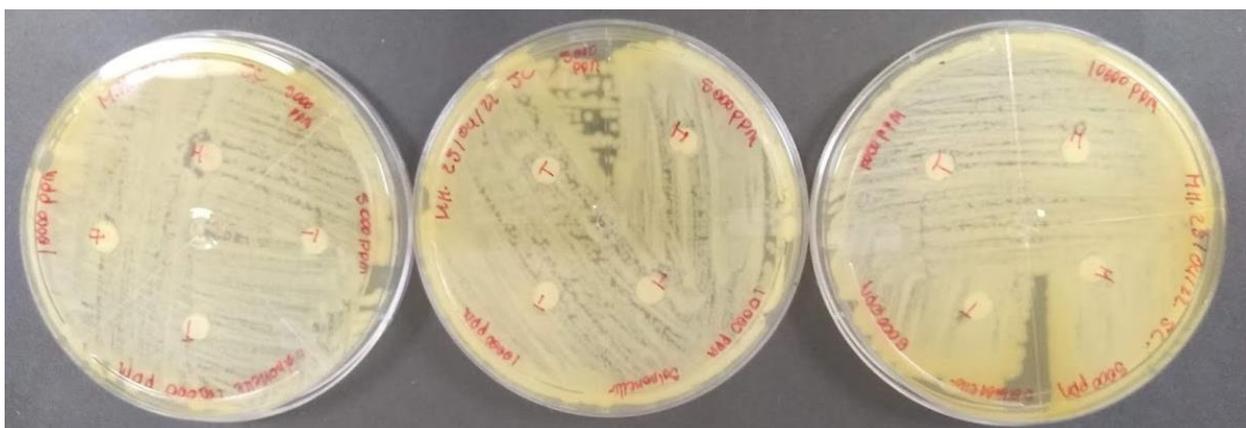


Figura 44. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *Salmonella* sp. a concentraciones de 5000 ppm y 10000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 29 de abril de 2022

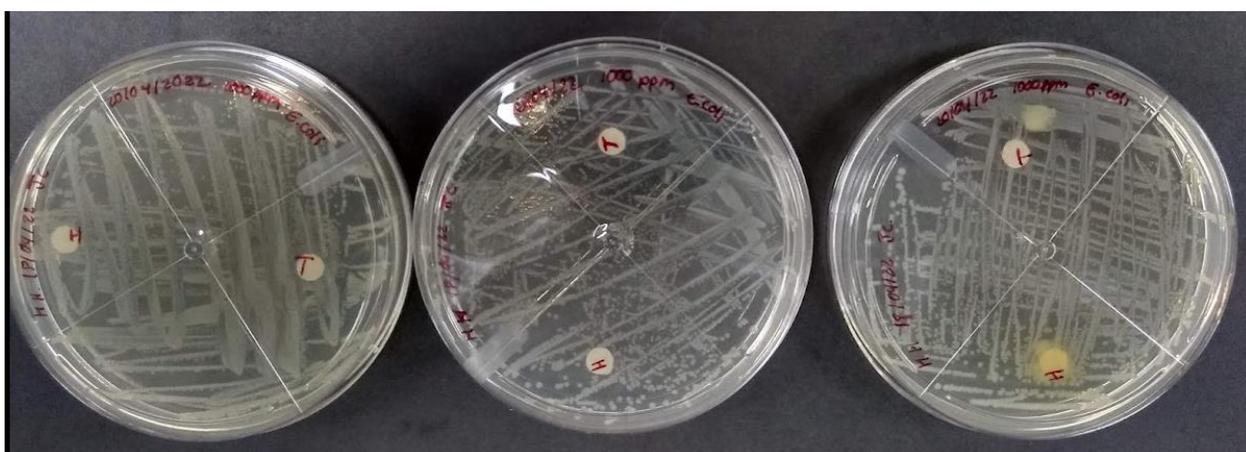


Figura 45. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *E. coli* sp. a una concentración de 1000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 21 de abril de 2022.

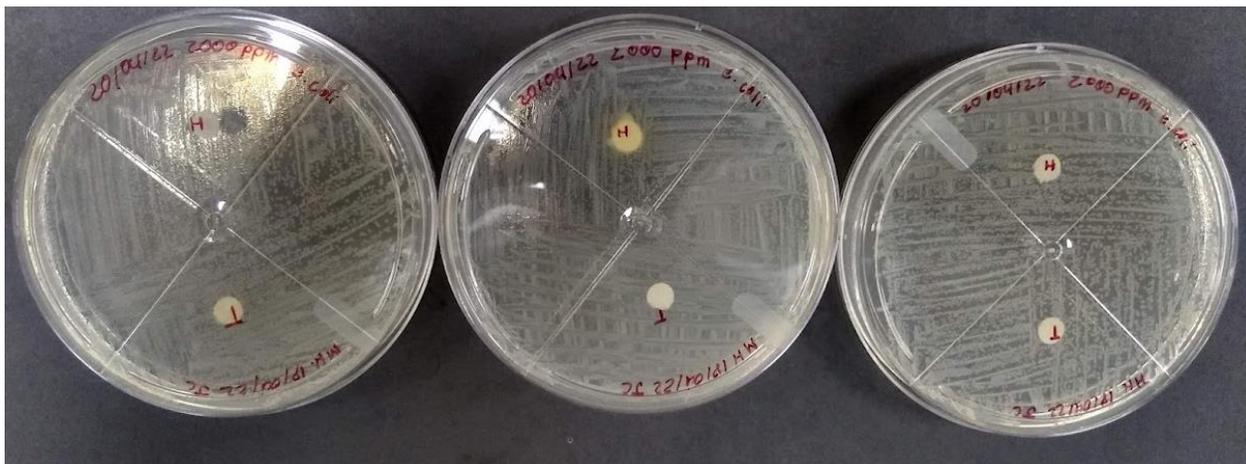


Figura 46. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *E. coli* sp. a una concentración de 2000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 21 de abril de 2022.

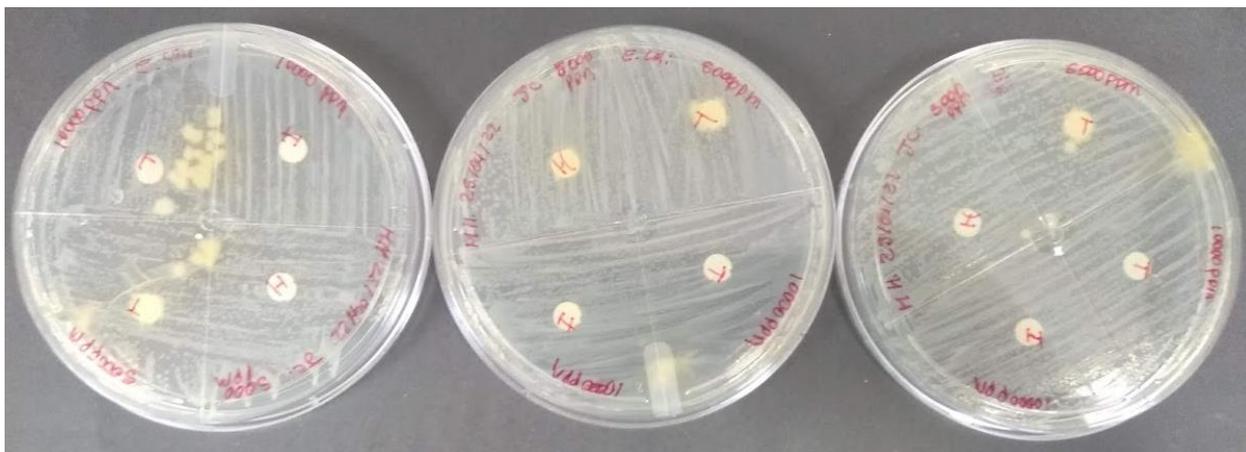


Figura 47. Lectura de la actividad antimicrobiana con la especie *E. coli* sp. a concentraciones de 5000 ppm y 10000 ppm a las 48 horas. Tomada por Juan Camilo Escobar el día 29 de abril de 2022.

La actividad antimicrobiana de un compuesto, se debe a la capacidad de alterar y penetrar la membrana celular de la bacteria quien presenta una estructura lipídica, ocasionando la desnaturalización de las proteínas y destruyendo la membrana celular volviéndola permeable, ocasionando un escape del contenido citoplasmático, la lisis celular, y al final la muerte. Por ende, se puede decir que, a estas concentraciones los alcaloides no desnaturalizan las proteínas de la membrana celular. Otro motivo, se debe a que las bacterias utilizadas en la prueba biológica fueron todas Gram negativas, quienes tienen la versatilidad de generar cambios en la bicapa

lipídica, pero comprometiendo la permeabilidad de ella, encabezado por los cambios de las porinas; quienes son “proteínas que forman canales llenos de agua embebidos en la membrana externa que regulan la entrada de algunos elementos...” (Ochoa & Sarmineto, 2018).

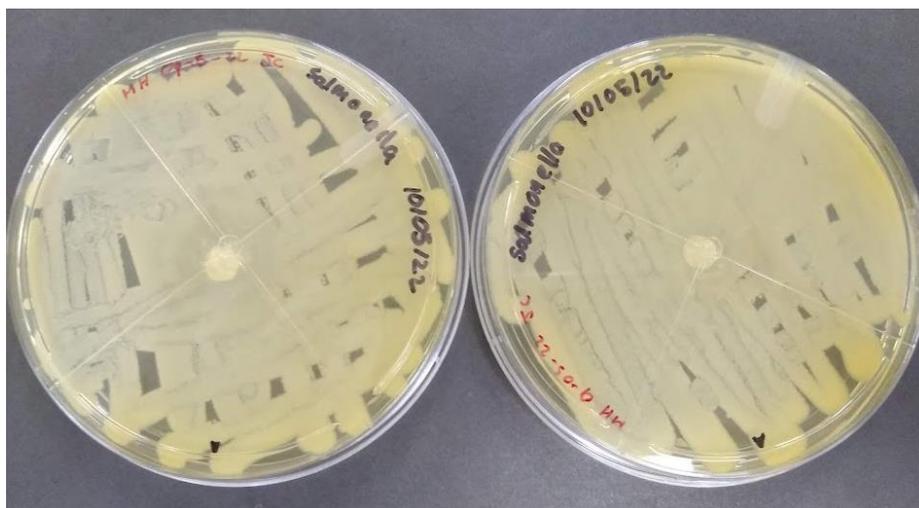


Figura 48. Prueba control de la salmonella sp. con Cefalosporina de tercera generación. Tomada por Juan Camilo Escobar el 11 de mayo del 2022

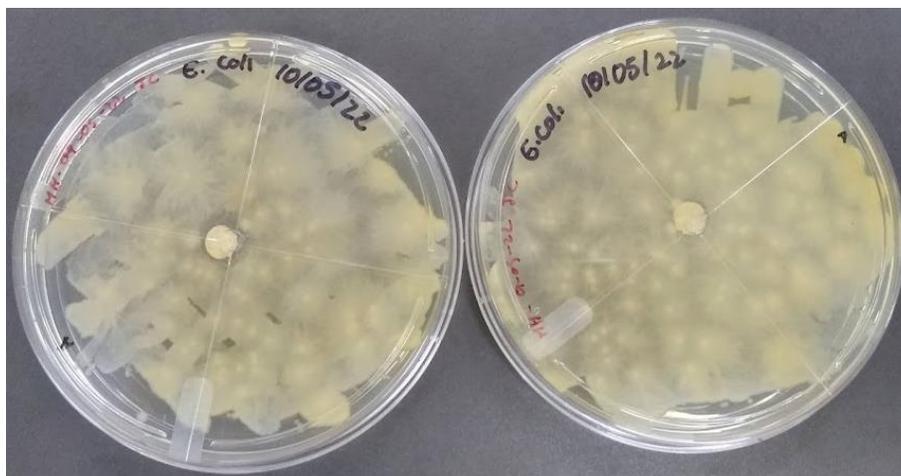


Figura 49. Prueba control de la E. coli sp. con Cefalosporina de tercera generación. Tomada por Juan Camilo Escobar el 11 de mayo del 2022



Figura 50. Prueba control de la *Serratia sp.* con Cefalosporina de tercera generación. Tomada por Juan Camilo Escobar el 11 de mayo del 2022

De las pruebas control, se puede deducir que la única muestra que presentó un halo de inhibición de 0.316 cm fue con la especie *E. coli sp.*, evidenciado en la Figura 49. Estos resultados permiten demostrar la gran resistencia que han desarrollado las bacterias incluso frente a antibióticos de tercera generación como la cefalosporina.

Por consiguiente, en esta investigación se demuestra la nula inhibición bacteriana de los extractos alcaloidales a las concentraciones ya mencionadas, invitando en futuros trabajos emplear concentraciones superiores a las 10000 ppm, así como también, la aplicación de otra metodología para la actividad antimicrobiana como son la dilución en caldo, obteniendo respuestas más cuantitativas, gracias al análisis con el CIM y CBM. Por otro lado, se aprecia bacterias ajenas a las sembradas alrededor de los sensidiscos presumiendo que los recipientes de los extractos llevaban consigo otras bacterias generando competencia con los crudos alcaloidales, aconsejando realizar la extracción de los crudos en lugares más esterilizados o cerca de un mechero para minimizar dicho problema.

9. Conclusiones y recomendaciones

- Se lograron obtener 4 extractos de las hojas y los tallos de la especie *Ipomoea carnea*, mediante el tratamiento con ácido y con base. Los resultados de las pruebas cualitativas permitieron determinar la presencia de alcaloides en el extracto de los tallos, obtenido mediante tratamiento alcalino.
- En la cromatografía en capa fina del crudo alcaloidal de los tallos se logró apreciar manchas que revelaron con el reactivo de Dragendorff y con radiación UV con valores de Rf inferiores a 0,5, indicando la gran polaridad de estos compuestos en el extracto.
- En las pruebas antimicrobianas con el crudo alcaloidal se logró apreciar la gran resistencia de las cepas bacterianas a las concentraciones evaluadas de 1000 ppm, 2000 ppm, 5000 ppm y 10000 ppm, por no observarse halos de inhibición en las placas.
- Se recomienda en futuros estudios emplear concentraciones superiores a las trabajadas en este estudio, así como también aplicar otras técnicas de evaluación biológica como la dilución en caldo o la microdilución.

10. Referencias

- Haraguchi, M., Gorniak, S., Ikeda, K., Minami, Y., Kato, A., Watson, A. L., . . . Asano, N. (2003). Alkaloidal Components in the Poisonous Plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *Journal Agricultural and food chemistry*, 51, 4995-5000.
- Arango, G. J. (2008). Alcaloides y compuestos nitrogenados . *Universidad de Antioquia*, 84.
- Cholic, L. A., Pistán, M. H., Torres, A. M., Ortega, H. H., & Bustillo, S. (2020). Cytotoxic activity induced by the alkaloid extract from *Ipomoea carnea* on primary murine mixed glial cultures. *Toxicon*(188), 134-141.
- Cholich, L. A., Gimeno, E. J., Teibler, P. G., Jorge, N. L., & Acosta de Pérez, O. C. (2009). The guinea pig as an animal model for *Ipomoea carnea* induced α -mannosidosis. *Toxicon*, 54, 276-282.
- Cook, D., Oliveira, C. A., Gardner, D. R., Pfister, J. A., Riet-Correa, G., & Riet-Correa, F. (2015). Changes in swainsonine, calystegine, and nitrogen concentrations on. *Toxicon*(95), 62-65.
- Coy, C. A., Parra, J., & Cuca, L. E. (2014). Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie *Raputia heptaphylla* (rutaceae. *Elementos*(4), 31-39. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5085372.pdf>
- Cristancho, N. L., & Cárdenas, K. J. (2017). *Aislamiento e Identificación del Alcaloide Mayoritario Presente en las Partes Aéreas (Hojas y Tallo) de la Especie Vegetal Pasiflora Maliforme (Cholupa)*. Neiva: Univesidad Surcolombiana.

- de Balogh, K. K., Dimande, A. P., van der Lugt, J. J., Molyneux, R. J., Naudé, T. W., & Welman, W. G. (1999). A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in. *J Vet Diagn Invest*(11), 266-273.
- Dorling, P. R., Huxtable, C. R., & Colegate, S. M. (1980). Inhibition of lysosomal α -mannosidase by swainsonine, an indolizidine alkaloid isolate from *Swainsona canescens*. *Biochem J*, *191*(2), 649-651.
- Goss, P. E., Baptiste, J., Fernandes, B., Baker, M., & Dennis, J. W. (1994). A Phase I Study of Swainsonine in Patients with Advanced Malignancies¹. *Cancer Research*, *54*(6), 1450-1457. Obtenido de <https://aacrjournals.org/cancerres/article/54/6/1450/500822/A-Phase-I-Study-of-Swainsonine-in-Patients-with>
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, M. d. (2014). *Metodología de la investigación* (Sexta ed.). Punta Santa Fe: McGraw Hill.
- Hernández, Y. (2016). *Nuevos inhibidores de glucosidasa. Análogo a las calisteginas*. Provincia de Salamanca: Universidad De Salamanca. Obtenido de <http://hdl.handle.net/10366/130273>
- Horna, G., Sivia, M., Vicente, W., & Tamaris, J. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Medica Herediana*, *16*(1), 39-45.
- Huamaní, C. Á. (2020). *Reaccion Le Rosen, Reaccion Dragendorff, Reaccion Mayer, Reaccion Yoduro Yodato, Reaccion FeCl3, Reaccion Nitrato De Plata, Reaccion De Farmacos, Reacciones Cualitativas De Farmacos*. Obtenido de

<https://pdfcookie.com/documents/reaccion-le-rosen-reaccion-dragendorff-reaccion-mayer-reacion-yoduro-yodato-reaccion-fec13-reaccion-nitrato-de-plata-reaccion-de-farmacos-reacciones-cualitativas-de-farmacos-wrvrn0q8x7lo>

Huerza, I. H., Guerra, J. L., Haraguchi, M., Asano, N., & Górnjak, S. L. (2004). The role of alkaloids in *Ipomoea carnea* toxicosis: A study in rats. *Science Irect*(57), 53-58.

doi:<https://doi.org/10.1016/j.etp.2005.02.004>

Jean, B. (2009). *Pharmacognosie, Phytichimie, plantes medicinales* (4 ed.). Lavoiser.

Leyva, M. A. (2013). *Extracción, Identificación y*. Arequipa: Universidad Católica de Santa María. Obtenido de <https://docplayer.es/74581917-Universidad-catolica-de-santa-maria-facultad-de-ciencias-farmaceuticas-bioquimicas-y-biotecnologicas.html>

Molyneux, R. J., Nash, R. J., & Asano, N. (s.f.). The Chemistry and biological activity of clistegine an related Nortropano alkaloids.

Montero, M., Vayas, L., Avilés, D., Pazmiño, P., & Erazo, V. (2018). Evaluación de Dos Métodos Para Medir la Sensibilidad de Inhibición de Crecimiento de la Cepa Certificada de. *Rv Inv Vet Perú*, 29(4), 1543-1547. doi:<http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15185>

Monterroso, T. (2003). *Manual tecnico científico, utilizado para la realizacion de pruebas quimicas de campo para la deteccion de opiaceos. (Heroína, morfina y codeína)*. tesis, Univesidad de San Carlos de Guatemala, Guatamala. Obtenido de <https://biblioteca-farmacia.usac.edu.gt/Tesis/QF871.pdf>

Nichols, L. (7 de abril de 2022). *Separation Theory*. Obtenido de

https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Organic_Chemistry_Lab_Te

chniques_(Nichols)/02%3A_Chromatography/2.03%3A_Thin_Layer_Chromatography_(TLC)/2.3D%3A_Separation_Theory

Noor, A., Nava, A., Neyas, M., Peter, C., Creamer, R., & Cook, D. (2021). Ectopic growth of the Chaetothyriales fungal symbiont on *Ipomoea carnea*. *Botany*, 99(10), 619-627.
doi:<https://doi.org/10.1139/cjb-2021-0037>

Ochoa, L. S., & Sarmineto, A. J. (2018). *ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA ESPECIE VEGETAL *Bucquetia glutinosa* (L. f.) DC. (Melastomataceae) Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA*. Universidad de ciencias aplicadas y ambientales, Bogota D.C. Obtenido de <https://repository.udca.edu.co/bitstream/handle/11158/996/TESIS%202018-05-22.pdf;jsessionid=E0AEF9EC524FFAAA02E6B28DD7481F6A?sequence=1>

Peña, D. H. (2011). *Evaluación de la Actividad Antibacteriana de los Alcaloides Provenientes de las Hojas de *Siparuna sessiliflora**. Bogota: Pontifica Universidad Javeriana. Obtenido de <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8731/tesis672.pdf?sequ>

Ramirez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías Para Evaluar In vitro la Actividad Antimicrobiana de Compuetos de Origen Vegetal. *Scientia et Technica Años XV*(42), 263-268.

Ren, Z., Song, R., Wang, S., Quan, H., Yang, L., Lu, S., . . . Lu, H. (2017). The Biosynthesis Pathway of Swainsonine, a New Anticancer Drug from Three Endophytic Fungi. *Journal Microbiol Biothechnol*, 27(11), 1897-1906. doi:<https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09003>

Rodríguez, C. (2016). *Alcaloides indolizidínicos de anfibios. Estudio en la síntesis de Indolizidinas 5,8-disustituídas*. San Cristobla de La Laguna: Universidad de La Laguna. Obtenido de <https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/5060/ALCALOIDES%20INDOLIZIDINIC>

OS%20DE%20ANFIBIOS.%20ESTUDIO%20EN%20LA%20SINTESIS%20DE%20IN
DOLIZIDINAS%205%2C8-DISUSTITUIDAS.pdf?sequence=1

- Sabogal, A., & Borkowski, D. (2007). Estado actual de la investigación sobre *Ipomoea carnea*: toxicidad en ganado caprino. *Revista de Química*, 21(1-2), 29-35.
- Sandobal, E., Barrios, M., Hernández, C., & Medina, R. (2010). Estudio de la variación diaria de los derivados de ergolíneas en *Ipomoea carnea*. *Revista Electronica de Veterinaria*, 11(3), 1-7. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/636/63613123012.pdf>
- Sierra, I. N., Romero, M., & Orduz, S. (2012). Determinación de la Actividad Antimicrobiana e Insecticida de Extractos Producidos por Bacterias Aisladas de Suelo. *Actualidades Biológicas*, 34(96), 5-19.
- Skoog, D. A., West, D. M., & Crouch, S. R. (2014). *Fundamentos de química analítica* (Novena ed.). Santa Fe: Cengage Learning.
- Tan, X.-m., Chen, A. J., Wu, B., Zhang, G.-s., & Ding, G. (2018). Advance of swainsonine biosynthesis. *Chinese Chemical Letters*, 29(3), 417-422.
doi:<https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2017.08.040>
- Tepfer, D., Goldmann, A., Pamboukdjian, N., Maille, M., Lepingle, A., Chevalier, D., . . . Rosenberg, C. (1988). A plasmid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegium sepium*. catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegium sepium*. *Journal Bacteriology*, 170(3), 1153-1161.
Obtenido de <https://journals.asm.org/doi/epdf/10.1128/jb.170.3.1153-1161.1988>
- Vanegas, M. C. (2015). *Guías para el laboratorio de microbiología*. Bogotá: Universida de los Andes.

