

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE – QUITO

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

Tesis previa a la obtención del título de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:
“CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE
ORYCTANTHUS SPICATUS (LORANTHACEAE)”

AUTORA:
NORMA DANIELA GUERRERO ALEAGA

DIRECTOR:
WILSON FABIÁN TAPIA HERNÁNDEZ

Quito, mayo del 2014

**DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO
DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, autorizo a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además declaro que los conceptos, análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de la autora.

Quito, mayo del 2014.

NORMA DANIELA GUERRERO ALEAGA

CC: 1803665411

DEDICATORIA

A esas personas importantes en mi vida, que siempre estuvieron listas para brindarme su apoyo y aliento para seguir adelante, con mucho cariño esta tesis se la dedico a ustedes:

Papá Nelson

Mamá Marina

Amor Israel

Amigos

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Politécnica Salesiana por forjar en sus instalaciones mi desarrollo profesional y humano.

Al personal docente de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales, en especial, al Q.F. Wilson Tapia Hernández por compartir conmigo su tiempo, conocimientos y, por permitirme ser parte del proyecto de investigación que financió esta tesis.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES	3
1.1.Justificación.....	3
1.2.Hipótesis.....	4
1.3.Objetivos	5
CAPÍTULO II	6
MARCO TEÓRICO	6
2.1.Loranthaceae	6
2.1.1.Descripción morfológica	6
2.1.3.Generalidades	7
2.2. <i>Oryctanthus spicatus</i>	7
2.2.1.Clasificación taxonómica.....	7
2.2.2.Uso etnomedicinal.....	7
2.3.Metabolitos secundarios.....	8
2.3.1.Alcaloides.....	9
2.3.2.Esteroles	9
2.3.3.Flavonoides	10
2.3.4.Quinonas	11
2.3.5.Fenoles	11
2.3.6.Taninos.....	12
2.3.7.Saponinas	12
2.3.8.Sesquiterpenolactonas	13
2.3.9.Cumarinas	13

2.3.10.Heterósidos Cardiotónicos	14
2.4.Extracción	15
2.4.1.Determinación de condiciones de extracción.....	15
2.4.2.Maceración.....	17
2.5.Tamizaje fitoquímico	17
2.6.Cromatografía	18
2.6.1.Cromatografía en capa fina	18
2.6.1.1.Polaridad	19
2.7.Actividad biológica.....	21
2.7.1.Actividad antibacteriana y antifúngica.....	21
2.7.2.Pruebas de sensibilidad bacteriana.....	21
2.7.3.Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	22
2.7.4.Microorganismos	22
2.8.Actividad antioxidante	24
2.8.1.Métodos químicos para determinar actividad antioxidante	25
CAPÍTULO III.....	28
METODOLOGÍA EMPLEADA PARA CARACTERIZAR LA COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA Y EVALUAR LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE <i>Oryctanthus Spicatus</i>.....	28
3.1.Obtención de la muestra vegetal	28
3.1.2.Recolección de la especie vegetal <i>Oryctanthus spicatus</i>	28
3.1.3.Identificación taxonómica.....	29
3.1.4.Selección, estabilización y conservación de la muestra vegetal	30
3.2.Obtención de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso.....	30
3.3.Screening fitoquímico	34

3.3.1.Ensayos a realizar en el extracto etéreo, alcohólico y acuoso.....	35
3.4.Concentración de extractos	40
3.5.Valoración de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.	42
3.6.Cromatografía en capa fina	44
3.6.1.Fraccionamiento del extracto alcohólico para cromatografía en capa fina.....	44
3.6.2.Extracción, identificación y obtención del perfil cromatográfico de las fracciones de metabolitos secundarios.	45
3.7.Actividad antibacteriana y antimicótica.....	55
3.7.1.Antibiograma por el método de difusión en agar Kirby-Bauer.....	56
3.7.2.Determinación de concentración mínima inhibitoria (MIC) por el método de dilución en caldo.	60
3.8.Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH.	61
3.8.1.Extracto alcohólico seco de <i>Oryctanthus spicatus</i>	62
3.8.2.Extracto alcohólico seco de <i>Camellia sinensis</i> (Té verde, antioxidante de referencia natural)	63
3.8.3.Disolución de vitamina C (antioxidante de referencia comercial).....	64
CAPÍTULO IV	66
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
4.1.Obtención de la muestra vegetal de <i>O. spicatus</i>	66
4.1.1.Información de campo.....	66
4.1.2.Información sobre la planta.....	66
4.2.Identificación taxonómica.....	67
4.3.Selección, estabilización y conservación de la muestra vegetal	67
4.4.Obtención de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso.....	67
4.5.Screening fitoquímico	69

4.6.Valoración de fenoles totales	70
4.7.Perfil cromatográfico de las fracciones obtenidas de <i>O. spicatus</i>	71
4.7.1.Fracción B (Alcaloides)	71
4.7.2.Fracción C (Triterpenos y esteroides)	72
4.7.3.Fracción D (Quinonas).....	73
4.7.4.Fracción D (Flavonoides).....	75
4.8.Actividad antibacteriana y antimicótica.....	82
4.8.1.Antibiograma por el método de difusión en agar Kirby-Bauer.....	82
4.8.2.Determinación de concentración mínima inhibitoria (MIC) por el método de dilución en caldo.	90
4.9.Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH.	95
4.9.1.Extracto alcohólico seco de <i>Oryctanthus spicatus</i>	95
4.9.2.Extracto alcohólico seco de <i>Camellia sinensis</i> (antioxidante de referencia natural)..	96
4.9.3.Disolución de vitamina C (antioxidante de referencia comercial).....	98
4.9.4.Comparación de la actividad antioxidante de <i>O. spicatus</i> , <i>C. sinensis</i> y vitamina C..	99
CONCLUSIONES.....	101
RECOMENDACIONES.....	102
LISTA DE REFERENCIAS	103
ANEXOS	108

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción taxonómica, <i>O. spicatus</i>	7
Tabla 2. Valores de la constante dieléctrica de algunos solventes.....	20
Tabla 3. Preparación de soluciones de ensayo de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu... 43	43
Tabla 4. Concentraciones y soluciones del extracto seco de <i>O. spicatus</i>	63
Tabla 5. Concentraciones y soluciones del extracto seco de <i>C. sinensis</i>	63
Tabla 6. Concentraciones y soluciones de la disolución de vitamina C.	64
Tabla 7. Screening fitoquímico del extracto etéreo, metanólico y acuoso de <i>O. spicatus</i> ... 69	69
Tabla 8. Determinación de fenoles totales en extracto alcohólico de <i>O. spicatus</i>	70
Tabla 9. Determinación de fenoles totales en extracto acuoso de <i>O. spicatus</i>	70
Tabla 10. Halos de inhibición de los extractos de <i>O. spicatus</i> frente a <i>aeruginosa</i>	82
Tabla 11. Kruskal-Wallis para <i>aeruginosa</i> ; elaborado mediante Statistix.....	83
Tabla 12. Test de comparación mediante Kruskal-Wallis para <i>aeruginosa</i> ; elaborado mediante Statistix.	83
Tabla 13. Halos de inhibición de los extractos de <i>O. spicatus</i> frente a <i>B. spizizenii</i>	84
Tabla 14. Kruskal-Wallis para <i>B. spizizenii</i> ; elaborado mediante Statistix.	85
Tabla 15. Test de comparación mediante Kruskal-Wallis para <i>B. spizizenii</i> ; elaborado mediante Statistix.	85
Tabla 16. Halos de inhibición de los extractos de <i>O. spicatus</i> frente a <i>E. coli</i>	86
Tabla 17. Kruskal-Wallis para <i>E. coli</i> ; elaborado mediante Statistix.	87
Tabla 18. Test de comparación mediante Kruskal-Wallis para <i>E. coli</i> ; elaborado mediante Statistix.	87
Tabla 19. Halos de inhibición de los extractos de <i>O. spicatus</i> frente a <i>S. aureus</i>	88
Tabla 20. Kruskal-Wallis para <i>S. aureus</i> ; elaborado mediante Statistix.....	89
Tabla 21. Test de comparación mediante Kruskal-Wallis para <i>S. aureus</i> ; elaborado mediante Statistix.	89
Tabla 22. Halos de inhibición de los extractos de <i>O. spicatus</i> frente a <i>C. albicans</i>	90
Tabla 23. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) por	91
Tabla 24. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de <i>O. spicatus</i> sobre <i>S. aureus</i>	92

Tabla 25. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) por $\mu\text{g/ml}$ de extracto alcohólico de <i>O. spicatus</i> sobre <i>B. spizizenii</i>	93
Tabla 26. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) por $\mu\text{g/ml}$ de extracto acuoso de <i>O. spicatus</i> sobre <i>aeruginosa</i>	94
Tabla 27. Absorbancia y porcentaje de inhibición del extracto alcohólico de <i>O. spicatus</i> . .	95
Tabla 28. Determinación de la absorbancia y porcentaje de inhibición del extracto alcohólico de <i>C. sinensis</i>	96
Tabla 29. Determinación de la absorbancia y porcentaje de inhibición de la disolución de vitamina C.	98
Tabla 30. IC 50 del extracto de <i>O. spicatus</i> comparado con el extracto de <i>C. sinensis</i> (Antioxidante natural) y con la disolución de vitamina C (Antioxidante comercial).	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tropano, quinoleína e isoquinoleína.	9
Figura 2. Colesterol.	10
Figura 3. Estructura química de uno de los flavonoides más comúnmente hallados en la naturaleza, la quercetina.	10
Figura 4. Naftoquinona y Antraquinona.	11
Figura 5. Fenol.	11
Figura 6. Ácido gálico.	12
Figura 7. Farnesil-pirofosfato.	13
Figura 8. Cumarina (1, 2 benzopirona).	14
Figura 9. Genina esteroídica de tipo cardenólido,	14
Figura 10. Lugar de recolección (San Miguel de Inimkis) y ubicado en el mapa provincial del Ecuador.	28
Figura 11. Extracción sucesiva del material vegetal para obtención de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de <i>O. spicatus</i>	32
Figura 12. Maceración a temperatura ambiente de la muestra vegetal con disolventes de polaridad creciente (éter etílico, metanol y agua destilada).	33
Figura 13. Residuo sólido seco de la muestra vegetal.	33
Figura 14. Esquema de las reacciones a realizar en el extracto de éter etílico.	35
Figura 15. Esquema de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico.	36
Figura 16. Esquema de las reacciones a realizar en el extracto acuoso.	36
Figura 17. Concentración de los extractos a presión reducida mediante el rotavapor.	41
Figura 18. Obtención del extracto seco no volátil.	41
Figura 19. Separación del extracto B (parte inferior).	46
Figura 20. Esquema de la extracción y TLC de alcaloides en el extracto alcohólico.	47
Figura 21. Esquema de la extracción y aislamiento de esteroides, flavonoides, fenoles y/o taninos y quinonas en el extracto alcohólico.	48
Figura 22. Adición del revelador para esteroides a la placa cromatográfica corrida.	49
Figura 23. Esquema de la extracción y TLC de flavonoides.	51
Figura 24. Esquema de la extracción y TLC de quinonas.	52

Figura 25. Esquema de la identificación y TLC de Coumarinas y Heterósidos Cardiotónicos	54
Figura 26. Perfil cromatográfico de la fracción B (Alcaloides) en <i>O. spicatus</i> en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.....	71
Figura 27. Perfil cromatográfico de la fracción C en <i>O. spicatus</i> en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.....	72
Figura 28. Perfil cromatográfico de la fracción D alcohólica e hidroalcohólica de <i>O. spicatus</i> en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.	73
Figura 29. Perfil cromatográfico de la fracción D hidroalcohólica (Naftoquinonas) de <i>O. spicatus</i> en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.....	74
Figura 30. Perfil cromatográfico del revelado de Antraquinonas (izquierda) y Naftoquinonas (derecha) de <i>O. spicatus</i> en luz UV 366 nm.....	75
Figura 31. Perfil cromatográfico de flavonoides aglicosídicos en éter de <i>O. spicatus</i> en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.....	76
Figura 32. Perfil cromatográfico de flavonoides aglicosídicos en éter de <i>O. spicatus</i> en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.....	76
Figura 33. Perfil cromatográfico de flavonoides aglicosídicos en ácido acético de <i>O. spicatus</i> en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.....	77
Figura 34. Perfil cromatográfico de flavonoides aglicosídicos en ácido acético de <i>O. spicatus</i> en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.....	77
Figura 35. Perfil cromatográfico de flavonoides aglicosídicos en acetato de etilo de <i>O. spicatus</i> en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.....	78
Figura 36. Perfil cromatográfico de flavonoides aglicosídicos en acetato de etilo de <i>O. spicatus</i> en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.....	79
Figura 37. Perfil cromatográfico de flavonoides aglicosídicos en butanol de <i>O. spicatus</i> en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.....	79
Figura 38. Perfil cromatográfico de flavonoides aglicosídicos en butanol de <i>O. spicatus</i> en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.....	80
Figura 39. Perfil cromatográfico de flavonoides glicosídicos en éter, ácido acético, acetato de etilo, butanol de <i>O. spicatus</i> en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.....	81

Figura 40. Perfil cromatográfico de flavonoides glicosídicos en éter, ácido acético, acetato de etilo, butanol de <i>O. spicatus</i> en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.	81
Figura 41. Curva de la concentración del extracto alcohólico de <i>O. spicatus</i> VS absorbancia.....	95
Figura 42. Porcentaje de inhibición de radicales DPPH frente a extracto alcohólico de <i>O. spicatus</i>	96
Figura 43. Curva de la concentración del extracto alcohólico de <i>C. sinensis</i> VS absorbancia.....	97
Figura 44. Porcentaje de inhibición de radicales DPPH frente al extracto alcohólico de <i>C. sinensis</i>	97
Figura 45. Curva de concentración de la disolución de vitamina C VS absorbancia.	98
Figura 46. Porcentaje de inhibición de radicales DPPH frente a disolución de vitamina C.....	99
Figura 47. Actividad antioxidante de <i>O. spicatus</i> , <i>C. sinensis</i> y vitamina C.	100

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Soluciones y reactivos para el screening fitoquímico.	108
Anexo 2. Microorganismos experimentales.....	109
Anexo 3. Certificado de identificación taxonómica.....	111
Anexo 4. Boucher de <i>Oryctanthus spicatus</i> (Pajarito).....	112
Anexo 5. Identificación de metabolitos secundarios en cada una de las fracciones obtenidas para cromatografía en capa fina.....	113
Anexo 6. Antibiograma por el método de difusión en agar Kirby-Bauer.....	115
Anexo 7. Dilución doble seriada del extracto de <i>O. spicatus</i> ; <i>E. coli</i>	115

RESUMEN

Caracterización fitoquímica y actividad biológica de *Oryctanthus spicatus* (Loranthaceae)

Se caracterizó la composición química de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso obtenidos por maceración de las hojas de *Oryctanthus spicatus* en muestras recolectadas en la provincia de Morona Santiago, mediante técnicas tales como: tamizaje fitoquímico, encontrándose: aceites y grasas, alcaloides, triterpenos y esteroides, catequinas, azúcares reductores, lactonas y coumarinas, saponinas, polifenoles y taninos, quinonas, flavonoides, y principios amargos; espectrofotometría Uv-Vis para determinar fenoles totales y cromatografía en capa fina para observar el perfil cromatográfico de metabolitos secundarios en las fracciones obtenidas de cada extracto.

Se evaluó la actividad antimicrobiana usando el método de difusión en agar (Kirby-Bauer) y la técnica de dilución doble seriada para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) frente a cepas certificadas de *aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 9637, *B. subtilis* subes *spizizenii* ATCC 6633 *S. aureus* ATCC 6538, y *Candida albicans* ATCC 10231 demostrando actividad antibacteriana de amplio espectro pero en menor proporción a los estándares de comparación.

Se determinó la actividad antioxidante de acuerdo al método del DPPH sobre el extracto alcohólico obtenido de las hojas de *Oryctanthus spicatus* encontrándose que es superior a la del té verde (estándar natural) e inferior a la vitamina C.

Palabras clave: *Oryctanthus spicatus*, actividad antimicrobiana, actividad antioxidante.

ABSTRACT

Phytochemical characterization and biological activity of *Oryctanthus spicatus* (Loranthaceae)

The chemical composition of the ethereal, alcoholic and aqueous extracts obtained by maceration of leaves of *Oryctanthus spicatus* in samples collected in the province of Morona Santiago was characterized by techniques such as: phytochemical screening, finding: oils and greases, alkaloids, triterpenes and steroids, catechins, reducing sugars, lactones and coumarins, saponins, polyphenols and tannins, quinones, flavonoids, and bitter principles, Uv-Vis spectrophotometry to determine total phenols and chromatography in thin layer to observe the chromatographic profile of secondary metabolites in fractions obtained from each extract.

Evaluating the antimicrobial activity using the agar diffusion method (Kirby- Bauer) and the serial double dilution technique for determining the minimum inhibitory concentration (MIC) against certified strains of *aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 9637, *B. subtilis* subes *spizizenii* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 6538 and *Candida albicans* ATCC 10231 showing wide spectrum of the antibacterial activity but to a lesser extent compared to the standards.

Determining the antioxidant activity according to the DPPH method about the alcoholic extract obtained from the leaves of *Oryctanthus spicatus* finding that is superior to green tea (natural standard) and below the vitamin C.

Keywords: *Oryctanthus spicatus*, antimicrobial activity, antioxidant activity.

INTRODUCCIÓN

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo y tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna (Bermúdez *et al*, 2005) puesto que se utiliza una gran variedad de plantas medicinales para desarrollar medicamentos altamente efectivos contra diversas enfermedades partiendo del conocimiento ancestral y la etnomedicina (Greulach y Adams, 1986) que ha sido la fuente de información preliminar para la investigación fitoquímica, la identificación de principios activos y estudios de actividad biológica que, en algunos casos, han permitido el desarrollo de nuevas drogas. El progreso de la industria farmacéutica y la producción de drogas sintéticas, han limitado en alguna medida la utilización de la Fitoterapia; sin embargo, en los últimos años ha crecido el interés por las plantas y la Amazonia se considera la zona más promisoría del planeta (Aguirre, 1995).

En Ecuador se encuentran más de 16.000 especies de plantas vasculares de las que el 30% pertenecen a la Amazonía, de las cuales ocho mil especies son plantas medicinales, que durante siglos han sido utilizadas por las comunidades indígenas que la habitan: Huaorani, Shuar, Ashuar, Kichwa, Siona Secoya, Cofán, Záparos y Quijos. Este conocimiento ancestral unido al avance tecnológico nos permite investigar la composición química de las plantas y su actividad biológica que durante siglos han permitido curar las dolencias de sus habitantes, para así ponerlas en conocimiento y consideración de la ciencia (Coba *et al*, 2010).

Se pone en consideración la “Caracterización fitoquímica y actividad biológica de *Oryctanthus spicatus* (Loranthaceae)” cuyo objetivo es justificar con una base científica el uso ancestral que nuestras comunidades amazónicas le han brindado a esta especie.

El capítulo I contiene los antecedentes de la presente investigación como la justificación, hipótesis, y objetivos llevados a cabo.

El capítulo II aborda temas generales sobre la especie vegetal en estudio como su descripción morfológica, distribución geográfica; clasificación taxonómica, uso etnomedicinal y se explica brevemente el fundamento de las técnicas de análisis químico y microbiológico que son de uso común en la caracterización de la composición química, y la evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de los extractos vegetales.

En el capítulo III se describe la obtención y el tratamiento de la muestra vegetal y las metodologías utilizadas en la elaboración de extractos y su caracterización química así como las técnicas empleadas en la evaluación de su actividad antimicrobiana y antioxidante.

El capítulo IV abarca los resultados obtenidos en la presente investigación, la discusión de los mismos y el tratamiento estadístico.

En el capítulo V se presenta las conclusiones finales de la investigación y las recomendaciones.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. Justificación

Se calcula que existen en el mundo más de 250 mil especies vegetales; de entre ellas se consideran como potencialmente medicinales unas 12 mil especies, pero debe tenerse en cuenta que solo se tiene conocimiento científico de un 10% del total de las especies. Debido a su complejidad química, las plantas consideradas medicinales han constituido y constituyen una fuente valiosísima de principios activos y de modelo para la síntesis o hemisíntesis química de numerosos e importantes medicamentos. (Alonso, 2007).

En el Ecuador se estima que el 80 % de la población depende de la medicina tradicional y por consiguiente de las plantas y productos naturales para la atención primaria de la salud y bienestar. En el campo todavía dependen directa o indirectamente de las plantas para cubrir sus necesidades de alimento, medicina y vivienda. En las ciudades el uso de plantas medicinales es menor, no obstante el uso y el comercio se mantiene como una práctica activa en los mercados particularmente en las urbes del callejón interandino, en donde se expenden por lo menos 273 especies de hierbas medicinales, mismas que se emplean para tratar más de 70 dolencias. Si consideramos que nuestras culturas son poseedoras de un enorme bagaje de conocimientos ancestrales sobre el uso de plantas, la cantidad de especies usadas y que las practicas medicinales tradicionales podrían ser más diversas de las que hasta ahora se han documentado y publicado (Ansaloni *et al*, 2010); es fundamental continuar con estudios etnobotánicos que permitan sistematizar y difundir estos valiosos conocimientos a toda la población.

El género *Oryctanthus* según el Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP) 2011 es utilizado comúnmente como antimalárico, para tratar fracturas, esguinces y luxaciones. No se han encontrado otros estudios que revelen usos etnomedicinales para infecciones bacterianas, por lo que se justifica esta investigación en la búsqueda de nuevas aplicaciones medicinales.

Por las razones expuestas anteriormente, en esta investigación consideramos relevante la evaluación de la actividad biológica (antimicrobiana y antioxidante) de la especie *Oryctanthus spicatus* (Loranthaceae).

1.2. Hipótesis

1.2.1. Hipótesis alternativa

-Existe por lo menos una concentración de los extractos vegetales (etéreo, alcohólico y acuoso) de las hojas de *Oryctanthus spicatus* que tiene actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas y actividad antifúngica frente a una cepa de levadura.

-Existe al menos uno de los cinco microorganismos experimentales (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*) cuyo desempeño biológico frente a las diferentes concentraciones de los extractos vegetales (etéreo, alcohólico y acuoso) de *Oryctanthus spicatus* es diferente al de los demás.

-El extracto vegetal alcohólico de las hojas de *Oryctanthus spicatus* presenta actividad antioxidante ante el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).

1.2.2. Hipótesis nula

-Ninguna concentración de los extractos vegetales (etéreo, alcohólico y acuoso) de las hojas de *Oryctanthus spicatus* tiene actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas y actividad antifúngica frente a una cepa de levadura.

-Ninguno de los cinco microorganismos experimentales (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans*), tiene un desempeño biológico frente a las diferentes concentraciones de los extractos vegetales (etéreo, alcohólico y acuoso) de *Oryctanthus spicatus*, diferente al de los demás.

-El extracto vegetal alcohólico de las hojas de *Oryctanthus spicatus* no presenta actividad antioxidante ante el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo).

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Caracterizar la composición fitoquímica y evaluar la actividad biológica de la especie *Oryctanthus spicatus*. (Loranthaceae).

1.3.2. Objetivos específicos

- Recolectar, identificar y acondicionar las muestras, de la especie *Oryctanthus spicatus*, en la ciudad de Macas ubicada en la Provincia de Morona Santiago.
- Obtener extractos por maceración en éter etílico, metanol y agua, a partir de las hojas de las muestras vegetales recolectadas.
- Caracterizar la composición química de los extractos mediante tamizaje fitoquímico.
- Determinar fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu.
- Evaluar la actividad antimicrobiana usando el método de difusión en placa y concentración mínima inhibitoria por dilución doble seriada.
- Determinar la actividad antioxidante utilizando el método del DPPH sobre el extracto obtenido de las hojas del material vegetal recolectado.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Loranthaceae

2.1.1. Descripción morfológica

Loranthaceae es una familia de plantas generalmente arbustivas, epifitas, hemiparásitas, siempre con clorofila (a veces poca). Hojas simples, enteras o escuamiformes, de disposición helicoidal o verticilada. Flores unisexuales o hermafroditas, actinomorfas, una envuelta con 4-6 piezas, androceo con igual número de piezas que el periantio, de ovario ínfero, unilocular, con 2-3 carpelos; además presenta óvulos reducidos al saco embrionario. Frutos por lo común en baya, semillas con tendencia al desdoblamiento de los cotiledones (2-4-6) y protegidas por una substancia pegajosa segregada por el eje floral (viscina, usada como liga para pájaros) (Coba *et al*, 2010).

2.1.2. Distribución geográfica

Las Loranthaceae comprenden alrededor de 40 géneros que abarcan cerca de 1.500 especies, presentan una amplia distribución geográfica mundial, abundan en regiones tropicales y subtropicales; se extienden desde los trópicos hasta las zonas templadas y desde el nivel del mar hasta los páramos de los continentes mayores (Sánchez y Barrera, 1990).

En el Ecuador la familia de las Loranthaceae están distribuidas en todo el país, sobre todo en las provincias que tienen climas tropicales, aunque cabe indicar que según el Missouri Botanical Garden (2010) las plantas están distribuidas en las provincias de Carchi, Esmeraldas, Guayas, Napo, Pastaza, Morona Santiago, Orellana, Zamora Chinchipe y Sucumbíos.

2.1.3. Generalidades

Las Loranthaceae invaden progresivamente a numerosos cultivos de interés económico tales como: *Coffea arabica*, árboles frutales como *Citrus sinensis*, *Mangifera indica*, *Psidium guajava* y ornamentales como *Jecsende caucana*, *Guazuma ulmifolia*, *Calistemon citrinus* entre otras especies, por tal razón se les asocia generalmente con plantas "dañinas", "perjudiciales" y en algunas ocasiones "plagas" (Sánchez y Barrera, 1990).

2.2. *Oryctanthus spicatus*

2.2.1. Clasificación taxonómica

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Santalales
Familia	Loranthaceae
Género	<i>Oryctanthus</i>
Especie	<i>Oryctanthus spicatus</i>

Tabla 1. Descripción taxonómica, *O. spicatus*

Fuente: Jacquín, 2009.

2.2.2. Uso etnomedicinal

El género *Oryctanthus* según el Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP) 2011, es utilizado comúnmente como antimalárico, para tratar fracturas, esguinces y luxaciones.

Según Rios (2006), la *Phthirusa pyrifolia* es utilizada para fracturas, moliendo o machacando las hojas, aplicándola en el lugar de la fractura, la *O. florulentus* y la *O. occidentalis* se las utiliza para torceduras de coyunturas. La planta entera es macerada. Se dice que este tratamiento cura la lesión, así como fracturas en forma de emplastos y como agua para el lavado de la misma. No se han encontrado estudios que revelen otras aplicaciones etnomedicinales.

Estas especies corresponden a la subfamilia Loranthoideae al igual que la *Oryctanthus spicatus* por lo que se le puede relacionar una actividad biológica similar.

2.3. Metabolitos secundarios

Cualquier molécula biológica es un “producto natural”, pero este concepto es reservado usualmente a los metabolitos secundarios, pequeñas moléculas producidas por un organismo pero que no son estrictamente necesarias para la supervivencia del organismo (Cannell, 1998). Las sustancias que las plantas elaboran y acumulan en sus tejidos son importantes desde varios puntos de vista, muchas poseen propiedades farmacológicas y pueden utilizarse en la preparación de medicamentos (Valencia, 1995, p 11-31).

Los metabolitos secundarios también se conocen como “*Fitoanticipinas*”, y los compuestos que se producen en respuesta al ataque de patógenos son llamados “*Fitoalexinas*”. Los patógenos responden a las defensas químicas de la planta hospedera por medio de genes que los ayudan a evitarlas, degradarlas y alteran su fisiología (Agrios, 2005). Ha sido ampliamente reconocido que las plantas constituyen un inestimable reservorio de metabolitos secundarios biológicamente activos en el control de diversas enfermedades (Cos et al., 2008; Gibbons 2008).

2.3.1. Alcaloides

Reciben esta denominación los compuestos nitrogenados heterocíclicos, constituidos además por carbono e hidrógeno, muchos llevan oxígeno, lo que les confiere una serie de propiedades físicas (sólida, cristalizables), y raramente suelen contener azufre. Son sintetizados a partir de aminoácidos, tienen por característica ser amargos en el gusto, solubles en alcohol, éter, cloroformo o hexano, poco solubles en agua. La actividad biológica de los alcaloides es muy amplia, sin embargo su papel en los vegetales no es muy claro, se localizan generalmente en los tejidos periféricos. El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo (Gómez, 2010).

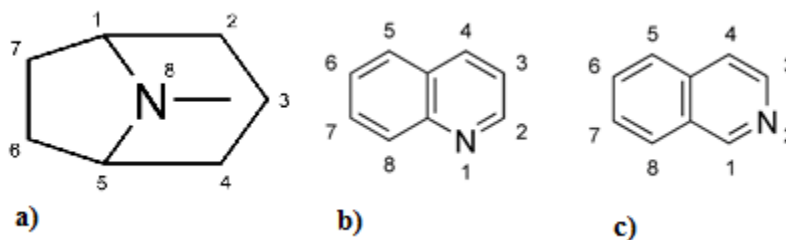


Figura 1. Tropano, quinoleína e isoquinoleína.

Fuente: SISIB, 2014.

2.3.2. Esteroles

Están caracterizados por la presencia de una función alcohólica en la posición 3. Tienen una cadena carbonada alifática insaturada y ramificada. Están presentes de forma natural en pequeñas cantidades en muchas frutas como verduras, semillas, cereales, legumbres, aceites vegetales y otras fuentes similares. La importancia de estos metabolitos secundarios en Fitoterapia radica en el potencial para disminuir el colesterol ya que reducen la absorción intestinal del mismo (Miño, 2007).

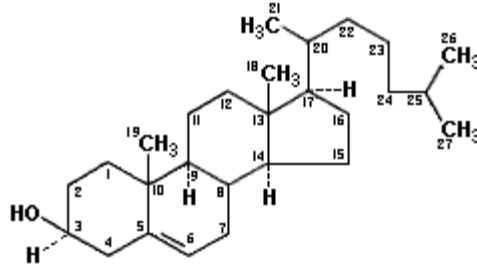


Figura 2. Colesterol.

Fuente: Zamora, 2014.

2.3.3. Flavonoides

Son pigmentos casi universales en los vegetales. Son hidrosolubles, responsables del color de las flores, frutos y hojas. De manera general son moléculas que tienen dos anillos bencénicos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, los autores los denominan simplemente como compuestos $C_6C_3C_6$ (Martínez, 2005). La principal actividad atribuida a los flavonoides es la de ser venoactivas, es decir, ser capaces de disminuir la permeabilidad de los capilares sanguíneos y aumentan la resistencia. Se les atribuye propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y antiespasmódicas. (Miño, 2007)

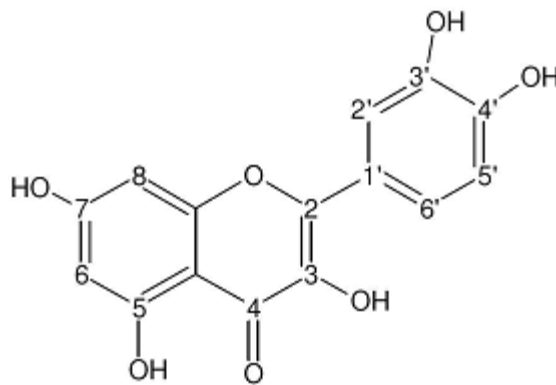


Figura 3. Estructura química de uno de los flavonoides más comúnmente hallados en la naturaleza, la quercetina.

Fuente: Martínez, 2005.

2.3.4. Quinonas

Son anillos aromáticos con dos funciones cetona. Son ubicuas en la naturaleza y causantes del color marrón que se produce en las frutas cuando son dañadas. Poseen una alta reactividad, formando complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función. Debido a esto, el potencial antimicrobiano de este grupo es amplio (Lizcano y Vergara, 2008).

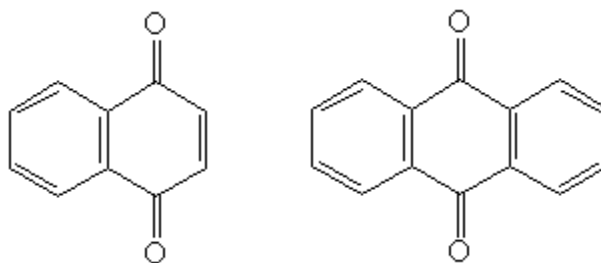


Figura 4. Naftoquinona y Antraquinona.

Fuente: Alquilarenos, fenoles y anilinas, 2014.

2.3.5. Fenoles

Son los compuestos más simples y consisten en un anillo fenólico sustituido. Tienen una actividad fisiológica marcada porque poseen propiedades antisépticas. Hidroquinol, timol (este último también antihelmíntico), eugenol (igualmente anestésico local), apiol es emenagogo, anetol es carminativo y antidiarreico a pequeñas dosis y veneno para el Sistema Nervioso Central (SNC) a altas dosis. El tetrahidrocannabinol es alucinógeno, los polifenoles del hebrecho son antihelmínticos (Lizcano y Vergara, 2008).

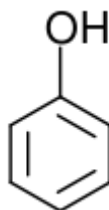


Figura 5. Fenol.

Fuente: SISIB, 2014.

2.3.6. Taninos

Son sustancias de origen vegetal, no nitrogenadas de estructura polifenólica, solubles en agua, alcohol y acetona. El término tanino se empleó para denominar ciertas sustancias presentes en extractos vegetales capaces de combinarse con proteínas de la piel animal, evitando su putrefacción y convirtiéndola en cuero, dentro de los vegetales, se encuentran en las vacuolas celulares combinados con alcaloides, proteínas o carbohidratos. Tienen propiedades cicatrizantes, antidiarreicas, antídotos para envenenamientos, antimicrobianas. Su actividad biológica se debe a que actúan como inhibidores enzimáticos además de privar a los microorganismos de medio apropiado para que pueda desarrollarse (Gómez, 2010).

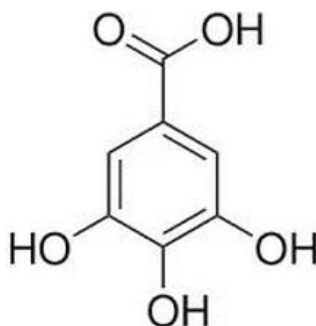


Figura 6. Ácido gálico.

Fuente: Govea, 2013.

2.3.7. Saponinas

Son heterósidos naturales (ver fig. 9), solubles en agua y característicamente espumosos tras agitar una solución acuosa que los contenga. Poseen propiedades diuréticas, digestivas, antiinflamatorias, expectorantes, antimicrobianas generalmente antiprotozoaria, y otras. Prevalen en las partes subterráneas de las plantas, su actividad biológica se debe a que las saponinas se unen al colesterol y otros esteroides de la membrana celular causando su inestabilidad, lisis y muerte celular (Gómez, 2010).

2.3.8. Sesquiterpenolactonas

Las lactonas sesquiterpénicas constituyen un grupo numéricamente importante de sustancias. Se encuentran distribuidas en varios hongos y en algunas angiospermas. Poseen estructuras variadas, pero todas relacionadas con el producto de ciclación, ciclodecadienílico, del 2E, 6E-farnesil-pirofosfato (fig. 7) (Miño, 2007).

Son sustancias amargas que se encuentran en todas las partes de las plantas, en concentraciones que varían entre 0,01 y 8 % del peso seco, siendo las concentraciones mayores generalmente en las hojas; son bastante solubles en cloroformo y éter etílico. Presentan gran importancia por la variada acción biológica que han demostrado: acción citotóxica, tumoral, analgésicas, inhibidoras del crecimiento de bacterias, entre otras (Lizcano y Vergara, 2008).

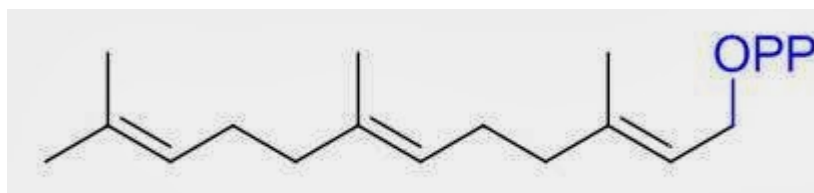


Figura 7. Farnesil-pirofosfato.

Fuente: Kitina, 2013.

2.3.9. Cumarinas

Las cumarinas son 2H-1benzopiran-2-onas que se pueden considerar como las lactonas de los ácidos 2-hidroxi-Z-cinámicos. Se encuentran distribuidas en todo el reino vegetal. Al igual que otros derivados fenilpropánicos, las cumarinas proceden del metabolismo de la fenilalanina. Las cumarinas libres son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos (Miño, 2007).

Tiene propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y vasodilatadoras. Parece que su mecanismo de acción antimicrobiano es mediante interacción con el ADN eucariota, lo que explica también su actividad antiviral (Lizcano y Vergara, 2008).

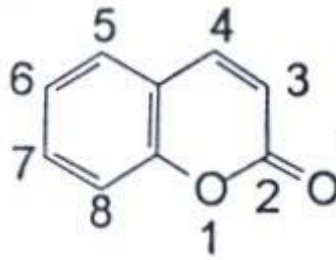


Figura 8. Cumarina (1, 2 benzopirona).

Fuente: González, 2011.

2.3.10. Heterósidos Cardiotónicos

Constituyen un grupo perfectamente individualizado y de una gran homogeneidad, tanto estructural como farmacológica. Estas moléculas naturales de origen vegetal continúan siendo medicamentos interesantes en el tratamiento a largo plazo de la insuficiencia cardiaca. Su estructura es sumamente homogénea, esta consta de una genina esteroídica de tipo cardenólido (en C₂₃) o bufadienólido (en C₂₄) y una parte osídica, generalmente oligosídica. Ejercen su actividad sobre el corazón a diferentes niveles: fuerza y velocidad de contracción, frecuencia, conductibilidad. Estos efectos se traducen por las modificaciones electrocardiográficas normalmente observadas (Miño, 2007).

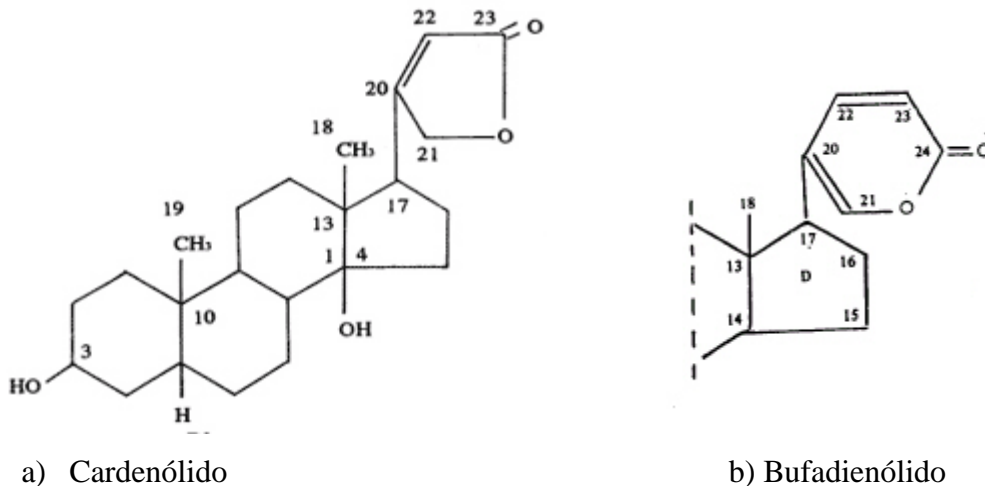


Figura 9. Genina esteroídica de tipo cardenólido, digitoxigenina (digital) y de tipo bufadienólido.

Fuente: SISIB, 2014

2.4.Extracción

La extracción sólido-líquido es una operación que está presente prácticamente en todos los procesos tecnológicos relacionados con la industria química y médico-farmacéutica; dentro de ésta están, los métodos de extracción por maceración y la percolación o lixiviación son los más utilizados (Farmacopea de Estados Unidos, 2007).

2.4.1. Determinación de condiciones de extracción

Las variables que interfieren en el proceso de extracción, independientemente de la escala de producción o del tipo de producto final son:

2.4.1.1.Solventes. Respecto a los solventes utilizados, la polaridad se encuentra muy relacionada con la solubilidad, es por ello que un compuesto que forma enlaces de hidrógeno con el agua tiende a ser más soluble en ella que uno que no los forma. Por tanto, se puede decir que el agua es un excelente disolvente de compuestos iónicos. Así también, el metanol forma puentes de hidrógeno y puede disolver compuestos iónicos, pero en menos proporción; mientras que el éter etílico no puede disolver compuestos iónicos por lo que se lo utiliza para extraer compuestos apolares. Dependiendo de la finalidad deseada, el solvente utilizado extrae, selectivamente o no, ciertas clases de compuestos. Estos solventes logran extraer la gran mayoría de las sustancias naturales de interés (Santizo, 2004).

2.4.1.2.Estado de división de la planta. La eficiencia del proceso extractivo sería mayor cuando menor sea el tamaño de la partícula ya que, así, se obtiene una mayor área de contacto con el solvente. En la práctica, la presencia de partículas muy finas dificulta el proceso de extracción, pues presentan compactación y los procesos de maceración, en donde las partículas pasan al extracto, hacen necesaria la realización de la etapa adicional de filtración, la cual no siempre es de fácil ejecución. La penetración del solvente en fragmentos mayores de la planta es lenta y la salida de las sustancias extraíbles es difícil. Por esta razón, se recomienda

la utilización de tamaños de partícula semejante a polvos moderadamente gruesos (Santizo, 2004).

2.4.1.3. Agitación. Hace que nuevas cantidades de solvente, pobre en las sustancias extraíbles, entre en contacto con el sólido y un nuevo punto de equilibrio de saturación es alcanzado. El movimiento del líquido desplaza el equilibrio en el sentido de la saturación del solvente, aumentando la eficacia del proceso (Santizo, 2004).

2.4.1.4. Temperatura. La disolución de las sustancias extraíbles es facilitada por el aumento de la temperatura; de la misma manera que la agitación, la temperatura contribuye al desplazamiento de la constante de equilibrio de saturación y aumenta la eficiencia del proceso. Sin embargo, muchos principios activos son termolábiles y pueden ser degradados, total o parcialmente, a temperaturas elevadas. El aumento de la temperatura también puede causar la pérdida de sustancias volátiles (Santizo, 2004). Por lo que en Sharapin (2000, p. 49) se recomienda trabajar con una temperatura máxima de 60 °C como condiciones de operación al concentrar extractos de plantas medicinales.

2.4.1.5. pH. Influye en la solubilidad de diversos compuestos ya que permite la posibilidad de formación de sales. La obtención de alcaloides constituye un ejemplo clásico de la influencia del pH en el proceso de extracción. La extracción de alcaloides con solventes orgánicos de baja polaridad exige un pre tratamiento con soluciones alcalinas, buscando con esto liberar los alcaloides de sus sales y, así, volverlos solubles en el solvente orgánico. En el caso de extracción de alcaloides con soluciones acuosas es necesario un pH ácido, buscando con esto la conversión de los alcaloides en sus respectivas sales, solubles en agua (Santizo, 2004).

2.4.1.6. Tiempo de extracción. Se determina, experimentalmente, en función del solvente y el equipo seleccionado. Esta variante es resultante de todos los factores mencionados previamente. El tiempo de extracción debe ser suficiente para permitir la

separación de los compuestos de interés, aunque se debe prestar cuidado para que no sea excesivo. Prolongar el tiempo de extracción más allá del estrictamente necesario, no influye en el proceso negativamente, pero, si influye en los costos del consumo de energía y de mano de obra no necesaria, lo que acarrea encarecimiento del proceso industrial (Santizo, 2004).

2.4.2. Maceración

La maceración consiste en dejar la planta en contacto con el solvente durante varios días, con agitación constante. Se trata de un proceso que da como resultado un equilibrio de concentración de metabolitos entre la planta y el solvente, y, depende de factores que están relacionados con la planta, por ejemplo: su naturaleza, el tamaño de partícula, su contenido de humedad y cantidad, asimismo factores que están relacionados con el solvente, por ejemplo: la selectividad y la cantidad. El rendimiento del extracto disminuye cuando la relación planta/solvente aumenta. El hinchamiento de la planta es factor importante, porque aumenta la permeabilidad de la pared celular y la difusión del solvente (Santizo, 2004).

2.5. Tamizaje fitoquímico

Es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y orientar la extracción y/o el fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Consiste en la extracción de la planta con disolventes apropiados que van en función de la polaridad de los principios activos que se desean extraer y la aplicación de reacciones de coloración. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados del “screening” farmacológico (Sharapin, 2000, p. 198).

2.6.Cromatografía

La cromatografía es un método de análisis que permite separar los componentes individuales puros de una mezcla para determinar la proporción de estos componentes. En la cromatografía las moléculas se distribuyen entre dos fases distintas. Las separaciones se obtienen al introducir compuestos orgánicos en una fase estacionaria y dejando luego que una fase móvil fluya a través de la mezcla. Los componentes unidos con menos fuerza a la fase estacionaria y más soluble en la fase móvil recorren una distancia mayor que los demás componentes (Bruneton, 2003).

2.6.1. Cromatografía en capa fina

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. Los requisitos esenciales son: un adsorbente, placas de vidrio, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas. La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares (García y García, 2013).

La cromatografía en capa fina presenta una serie de ventajas frente a otros métodos cromatográficos. El tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor y la separación es generalmente mejor. Pueden usarse reveladores corrosivos, permitiendo observar a simple vista la separación de los componentes. El método es simple y los resultados son fácilmente reproducibles, lo que hace que sea un método adecuado para fines analíticos (García, 2007).

El gel de sílice o ácido silícico es uno de los más utilizados, es débilmente ácido, su pH oscila entre 4-5 con lo cual no se deberá utilizar con sustancias que se corrompan con los

ácidos. Se emplea placas de sílica GF₂₅₄ que representa al factor de fluorescencia; el cual revelará mediante luz UV las manchas de las sustancias que absorben luz ultravioleta, el número que aparece como subíndice nos indica la longitud de onda de excitación del indicador utilizado y el grosor del gránulo de la placa. Generalmente lleva incorporado un agente aglomerante, yeso (sulfato de cálcico semihidratado), para proporcionar firmeza al adsorbente. También han sido incorporados dos indicadores del ultravioleta (Bruneton 2003).

2.6.1.1.Polaridad

Es una propiedad de las moléculas que representa la separación de las cargas eléctricas en la misma. Está íntimamente relacionada con otras propiedades como la solubilidad, punto de fusión, punto de ebullición, fuerzas intermoleculares, etc. Al formarse una molécula de modo covalente el par de electrones tiende a desplazarse hacia el átomo que tiene mayor electronegatividad, esto origina una densidad de carga desigual entre los núcleos que forman el enlace (se forma un dipolo eléctrico). El enlace es más polar cuanto mayor sea la diferencia entre las electronegatividades de los átomos que se enlazan. Pero un enlace polar no requiere siempre una molécula polar; para averiguar si una molécula es polar hay que atender a la cantidad de enlaces polares y la estructura de la molécula. Para ello es necesario determinar un parámetro físico llamado momento dipolar eléctrico del dipolo eléctrico (Barragán, 2011).

La capacidad de asociación puede expresarse en términos de la constante dieléctrica. Cuanto más polar sea un solvente mayor será su respectiva constante dieléctrica. Compuestos ionizables y/o altamente polares se disuelven en solventes de elevada constante dieléctrica; al igual que compuestos apolares se disolverán en solventes de baja constante dieléctrica (Sharapin, 2000, p. 35).

Solventes	Constante dieléctrica (ϵ) a 25°C
Hexano	1,89
Ciclohexano	2,02
1,4-dioxano	2,21
Tetracloruro de carbono	2,24
Benceno	2,28
Tolueno	2,38
Acetonitrilo	3,88
Éter etílico	4,34
Cloroformo	4,87
Acetato de etilo	6,02
Ácido acético	6,15
Tetrahidrofurano	7,58
Diclorometano	9,14
Piridina	12,3
2-butanol	15,8
1-butanol	17,8
2-propanol	18,3
1-propanol	20,1
Acetona	20,7
Etanol	24,3
Metanol	33,6
Glicerina	43,0
Agua	78,3

Tabla 2. Valores de la constante dieléctrica de algunos solventes.

Fuente: Sharapin, 2000.

La polaridad es una característica muy importante ya que puede ayudarnos a reconocer moléculas. También es importante en disoluciones ya que un disolvente polar solo disuelve otras sustancias polares y un disolvente apolar solo disuelve sustancias apolares ("semejante disuelve a semejante"). Aunque la polaridad de un disolvente depende de muchos factores, puede definirse como su capacidad para solvatar y estabilizar cargas. Por último la polaridad influye en el estado de agregación de las sustancias así como en termodinámica, ya que las moléculas polares ofrecen fuerzas intermoleculares (llamadas fuerzas de atracción dipolo-dipolo) además de las fuerzas de dispersión o fuerza de London (Barragán, 2011).

2.7.Actividad biológica

2.7.1. Actividad antibacteriana y antifúngica

La actividad antibacteriana de los extractos vegetales ha revelado el potencial de las plantas superiores como fuente de agentes anti infecciosos, permitiendo de esta manera un avance al uso empírico de las especies vegetales con una base científica. Para lograr esto se hace necesario el uso de la investigación fitoquímica la cual cubre un amplio campo de trabajo cuyos objetivos principales son aislar principios activos, identificarlos, determinar su estructura y encontrar sus posibles aplicaciones (Bilboa, 1971).

2.7.2. Pruebas de sensibilidad bacteriana

Las pruebas de sensibilidad bacteriana se llevan a cabo mediante el antibiograma que sirve para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos. El estudio de la sensibilidad *in vitro* es uno de los requisitos previos para la eficacia *in vivo* de un tratamiento antibiótico (García *et al*, 2000, p. 54).

2.7.2.1.Método de difusión en agar

Es una prueba en la que se enfrenta la bacteria, inoculada sobre la superficie de un medio con agar, a una solución antibiótica absorbida en discos de papel filtro. Este método fue estandarizado por Bauer en 1966 y dio lugar al conocido método Kirby – Bauer, que es el recomendado por la *Food and Drug Administration (FDA)* y el *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)* (Gamazo, 2005, p. 122).

El microorganismo a investigar se inocula en una o varias placas de agar y sobre su superficie se disponen los discos correspondientes a varios antibióticos. Se incuban

las placas durante 18-24 horas y se estudia el crecimiento en ellas. Se valora el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco y se compara con las referencias oportunas. De esta manera se sabe si el microorganismo es sensible (S), tiene sensibilidad intermedia (I) o es resistente (R) a cada uno de los antimicrobianos ensayados (García *et al*, 2000, p. 54).

2.7.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Los métodos de dilución son los más utilizados para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI); estos pueden realizarse en medio sólido (dilución en agar) o en medio líquido (dilución en caldo). Las diluciones dobles seriadas de un antibiótico determinado se enfrentan con una suspensión bacteriana donde la menor concentración de antibiótico ($\mu\text{g/ml}$) que inhibe el desarrollo de la bacteria se conoce como la concentración mínima inhibitoria (Gamazo, 2005, p. 127).

2.7.4. Microorganismos

Los microorganismos son responsables de procesos biológicos y enfermedades; algunos pueden ser beneficiosos, inocuos, nocivos y/o mortales (Ville, 1996).

Las bacterias pertenecen al *filum* de las *Shizomycophyta*, se les llama también microbios o gérmenes. Son de pequeño tamaño entre 1 y 10 μm . Casi siempre son unicelulares. Están recubiertas por una pared celular de naturaleza quitinosa en su superficie externa, esta pared que rodea a las bacterias es compleja y existen dos formas básicas: pared celular grampositiva con una gruesa capa de péptidoglucano y una pared gramnegativa con una delgada capa de péptidoglucano, así como una membrana externa. En la tinción de Gram, las grampositivas retienen la tinción azul mientras que las gramnegativas quedan decoloradas. Poseen prolongaciones filamentosas que les permiten desplazarse otras tienen flagelos (Asca *et al*, 2010).

Las levaduras son hongos que forman sobre los medios de cultivo colonias pastosas, constituídas en su mayor parte por células aisladas que suelen ser esféricas, ovoideas, elipsoideas o alargadas. Unas pocas presentan hifas. Las dimensiones pueden oscilar de 1 a 9 μm de ancho y 2 a más de 20 μm de longitud según la especie, nutrición, edad y otros factores. Algunos hongos fitopatógenos forman colonias levaduriformes en cultivos axénicos y varios patógenos de animales se presentan como levaduras en los materiales clínicos (Carlile *et al*, 2001, p.70).

2.7.4.1. *Staphylococcus aureus*

Son cocos gram positivo, aerobios o anaerobios facultativos, inmóviles que generalmente se disponen en racimos irregulares semejantes a los de uvas, presentan un diámetro de 1 μm . La proliferación en los tejidos puede producir forúnculos, infecciones cutáneas, infecciones postoperatorias de heridas, septicemia, endocarditis, osteomielitis y neumonía (Mims *et al*, 2002).

2.7.4.2. *Bacillus subtilis* subes *spizizenii*

Es una subespecie de *Bacillus subtilis*; es una bacteria gram positiva, aerobia facultativa, en forma de bastón sus colonias son de color amarillo, tiene la habilidad de formar una endospora protectora resistente, permitiendo tolerar condiciones ambientales extremas. No es considerado patógeno humano; sin embargo puede contaminar los alimentos, pero pocas veces causan intoxicación alimenticia (Calderón, 2011).

2.7.4.3. *Escherichia coli*

Son bacilos gram negativos no esporulados, móviles con flagelo o inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos. *E. coli* puede provocar infecciones de la vía urinaria, enfermedades diarreicas, meningitis del recién nacido y septicemia. Se transmite por contacto y por ingestión y se la asocia a alimentos (Mims *et al*, 2002).

2.7.4.4. *Pseudomona aeruginosa*

Es una bacteria gram negativa, aeróbica y posee un flagelo para su movimiento; es un patógeno oportunista de individuos con inmunodeficiencias, e infecta el tracto pulmonar, el urinario, tejidos, heridas y puede causar diferentes infecciones sanguíneas (Espinoza, 2012).

2.7.4.5. *Candida albicans*

Es un hongo dimórfico que aparece como una levadura tiene un tamaño medio de 2 a 4 micras, crecimiento rápido, circular, liso, blanco o cremoso, pastoso y blando, de bordes precisos y centro ligeramente prominente; que normalmente vive en simbiosis con nuestro cuerpo; siendo los tractos digestivo y respiratorio, junto con la mucosa genital (vagina) los reservorios más importantes en los seres humanos (Spicer, 2009).

2.8. Actividad antioxidante

Los antioxidantes pueden proteger directa o indirectamente a las células contra los efectos adversos de numerosas drogas y sustancias carcinogénicas. Tienen una gran capacidad para disminuir la carga de radicales en el organismo y desempeñan una importante función para la prevención de numerosas patologías e incluso el proceso de envejecimiento (Bendich, 1990).

Últimamente se ha registrado un marcado interés por los radicales libres y la función que desempeñan en los sistemas biológicos. Un radical libre se define como una especie química con existencia propia que en su conformación involucra electrones desapareados en los orbitales que participan en las uniones químicas (Molina, 2001). La incapacidad de nuestro cuerpo para neutralizar los radicales libres a los que nos exponemos diariamente nos obliga a recurrir a componentes con la propiedad de neutralizarlos. Estos compuestos actúan liberando electrones en nuestra sangre que son

captados por los radicales libres convirtiéndose así en moléculas estables (Desmarchelier, 1998).

Los fitonutrientes son componentes de las plantas que contribuyen en la estabilización de los radicales libres en el cuerpo. Estos incluyen los polifenoles, como la catequina, localizada en el té verde (Benzie *et al.*, 1999). Antocianinas encontradas en las semillas de uva; ácido elálgico encontrado en uvas y nueces; ácidos fenólicos del vino tinto y el frijol de soya; tioles en la cebolla y ajo; carotenos en los frutos y vegetales rojos y amarillos; limonoídes en las cáscaras de los cítricos; índoles en brócoli y repollo; y bioflavonoides en los frutos cítricos. Algunos de estos compuestos como los isotiocianatos y el sulfuro de alilo presentes en el ajo bloquean la acción carcinogénica de diversos químicos (Yeon *et al.*, 2001).

2.8.1. Métodos químicos para determinar actividad antioxidante

Se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o la muestra. Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en la medida del punto final, en la técnica instrumental utilizada y en las posibles interacciones de la muestra con el medio de reacción. (Paráfrasis Frankel 2000, Wang 2004, Pérez 2000, Schwarz 2001, Arnao 1999).

2.8.1.1. Método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)

Este método, desarrollado por Brand-Williams *et al.*, se basa en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH, por antioxidantes. Con modificaciones el método descrito por KIM *et al.*, se basa en la medida de la absorbancia del radical DPPH 100 μM (3,9 ml) disuelto en metanol al 80%, a la longitud de onda de 517 nm. Se añade 0,1 ml de la muestra o patrón, la mezcla se homogeniza cuidadosamente, y se mantiene en la oscuridad durante 30 minutos. Las medidas de absorbancia a 517 nm se

realizan antes de añadir la muestra (A_0) y pasados los 30 y 60 minutos (A_f). La concentración de DPPH en el medio de reacción se calcula a partir de una curva de calibrado obtenida por regresión lineal.

2.8.1.2. Método ABTS (2,2-azino-bis-[3-etilbenzotiazolin-6-ácido sulfónico])

Según la metodología desarrollada por Re *et al* y descrita por Kuskoski *et al.*, el radical $ABTS^{•+}$ se obtiene tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM, concentración final) incubados a temperatura ambiente ($\pm 25^\circ C$) y en la oscuridad durante 16 h. Una vez formado el radical $ABTS^{•+}$ se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 ($\pm 0,1$) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Las muestras filtradas (antocianos) se diluyen con etanol hasta que se produce una inhibición del 20 al 80%, en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir 20 μL de la muestra. A 980 μL de dilución del radical $ABTS^{•+}$ así generado se le determina la A_{754} a $30^\circ C$, se añade 20 μL de la muestra (dilución de antocianos) y se mide de nuevo la A_{754} pasado 1 minuto. La absorbancia se mide de forma continua transcurridos 7 minutos. El antioxidante sintético de referencia, Trolox, se ensaya a una concentración de 0-15 μM (concentración final) en etanol, en las mismas condiciones, lo que se hace también con ácido ascórbico (0-20 mg/100 ml). Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox) y en VCEAC (actividad antioxidante equivalente a vitamina C), en este último caso al tratarse de alimentos.

2.8.1.3. Método DMPD (dicloridrato de N-N-dimetil-p-fenilenediamina)

Se determina la actividad antioxidante aplicando el método propuesto por Fogliano *et al.* Este se basa en añadir 1 ml de la disolución de DMPD 100 mM a 100 ml de disolución tamponada con ácido acético/ acetato de sodio 0,1 M (pH 5,25). Tras la adición de 0,2 ml de una disolución de cloruro férrico 0,05 M (concentración final de 0,1 mM) se forman radicales cationes coloreados ($DMPD^{\bullet+}$). Un mililitro de esta disolución se traslada a una cubeta midiéndose su absorbancia, comprendida entre 0,90 ($\pm 0,1$), a 506

nm. Se añade 50 μL de una disolución patrón de antioxidante o de muestras diluidas y transcurridos diez minutos (a 25°C) se hace otra medida de absorbancia a 506 nm. La disolución tamponada de acetato se utiliza como blanco de referencia. Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox (en mM o μM) o bien en VCEAC, actividad equivalente a vitamina C (mg/L o mg/100 g).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA EMPLEADA PARA CARACTERIZAR LA COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA Y EVALUAR LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE *Oryctanthus Spicatus*

Todos los procedimientos se llevaron a cabo en el Laboratorio CIVABI de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede – Quito, Campus – El Girón a excepción de la obtención de muestra vegetal e identificación taxonómica.

3.1. Obtención de la muestra vegetal

3.1.2 Recolección de la especie vegetal *Oryctanthus spicatus*

La recolección del material vegetal se realizó en la provincia de Morona Santiago, cantón Morona, parroquia de Sevilla Don Bosco, comunidad de San Miguel de Inimkis en las coordenadas: latitud 02°16'0,5" S, longitud 78°05'16" W, altitud promedio de 1052 msnm, temperatura de 22.4°C (varía de los 13.6°C a 31.5°C), la precipitación promedio anual es de 2105 mm varía de 536 mm a 2394 mm, la humedad relativa promedio es de 81% varía de 45% a 100% y pertenece al bosque húmedo montano (Ministerio de Turismo Gerencia Regional Amazónica, 2013).

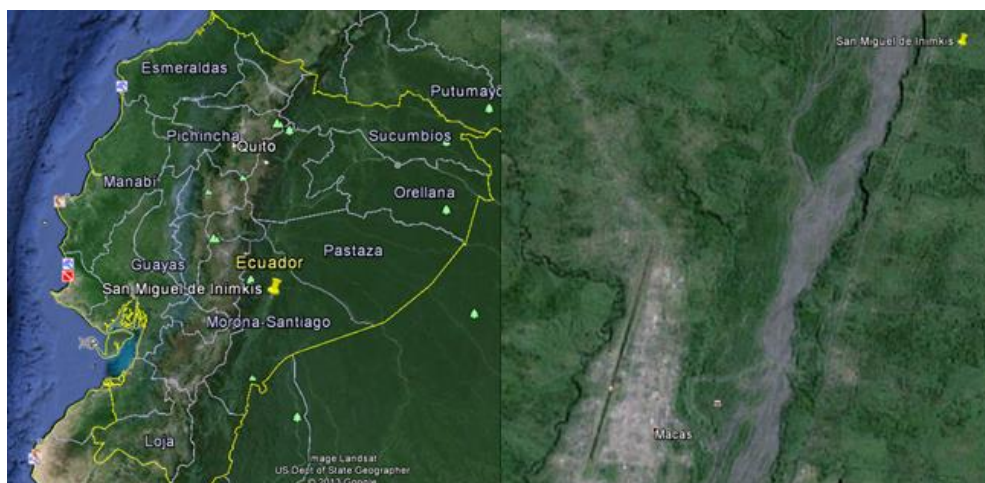


Figura 10. Lugar de recolección (San Miguel de Inimkis) y ubicado en el mapa provincial del Ecuador.

Fuente: Google earth, 2013.

Materiales

- ✓ Costal de fibra plástica
- ✓ Cartón
- ✓ Papel periódico
- ✓ Cuerda
- ✓ Tijeras de podar
- ✓ Libreta de campo

Equipo

- ✓ GPS
- GARMIN modelo GPSmap
60CSx

Procedimiento

Se buscó el lugar apropiado donde se encontraban los árboles que contenían la muestra botánica que corresponde a la porción terminal de una rama de unos 30-35 cm de longitud, en la que, con una tijera se realizó un corte limpio para obtener varias muestras con un peso de aproximadamente 1kg. Se colectó además una muestra vegetal provista de todas sus partes vegetales intactas para prensarla con el papel periódico procurando esparcir las hojas para que no queden amontonadas, se envolvió con la cuerda en forma de cruz para posteriormente realizar la identificación taxonómica. En la libreta de campo se registró el nombre de la localidad, con la ayuda del GPS se determinó las coordenadas y la altitud en metros sobre el nivel del mar, fecha, nombre de la colectora y equipo de colección, nombre científico, familia botánica, con la ayuda del guía de campo el nombre común por el cual es conocida la planta en la zona y usos.

3.1.3 Identificación taxonómica

Procedimiento

La identificación taxonómica se realizó en el Herbario Nacional de Quito con la participación del Dr. Marco Cerna C., docente de la Universidad Politécnica Salesiana quien emitió el certificado taxonómico correspondiente.

3.1.4 Selección, estabilización y conservación de la muestra vegetal

Materiales

- ✓ Fundas plásticas
- ✓ Bandejas de aluminio

Equipos

- ✓ Estufa Memmert modelo SM 200
- ✓ Molino manual corona modelo 500#

Reactivos

- ✓ Solución acuosa de hipoclorito de sodio al 5%
- ✓ Agua destilada

Procedimiento

De la muestra obtenida se seleccionó las hojas que se encuentren en mejores condiciones. Se desinfectó con solución acuosa de hipoclorito de sodio al 5% y posteriormente se lavó con agua destilada. Posterior al lavado la muestra se llevó a la estufa en bandejas de aluminio para ser secada a una temperatura de 40° C. La muestra vegetal seca se trituró en el molino para obtener partículas de 0.5 mm aproximadamente. Finalmente se conservó la muestra vegetal en una funda plástica bien cerrada y etiquetada tomando mucho cuidado de que siempre esté protegida de la luz y la humedad.

3.2 Obtención de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso

Materiales

- ✓ Material vegetal
- ✓ Percolador de vidrio de 1000 ml
- ✓ Algodón
- ✓ Papel filtro
- ✓ Embudo de 100 ml
- ✓ Soporte universal

- ✓ Pinzas y aro de metal
- ✓ Balanza Mettler Toledo modelo ML 204/01
- ✓ Papel de aluminio
- ✓ Vaso de precipitación
- ✓ Probeta
- ✓ Frasco ámbar

Reactivos

- ✓ Éter etílico 99% pureza. Grado RA
- ✓ Metanol $\geq 99.8\%$ pureza. Grado RA
- ✓ Agua destilada.

Procedimiento

- La muestra seca y previamente molida es sometida a tres extracciones sucesivas con disolventes de polaridad creciente (éter etílico, metanol y agua destilada).
- Para ello se pesó 200 g del material vegetal en contacto con 800 ml de éter etílico y se maceró durante 48 horas a temperatura ambiente con agitación periódica (3 veces por día); se filtró para obtener el extracto etéreo que se almacenó en un frasco ámbar muy bien etiquetado.
- El residuo sólido luego de haber sido secado y pesado, se extrajo con tres veces su peso en volumen con metanol absoluto por maceración durante 48 horas a temperatura ambiente con agitación constante a cada hora; se filtró para obtener el extracto alcohólico que se almacenó en un frasco ámbar muy bien etiquetado.
- El residuo sólido luego de haber sido secado y pesado, se extrajo con tres veces su peso en volumen con agua destilada por maceración durante 48 horas a temperatura ambiente; se filtró para obtener el extracto acuoso que se almacenó en un frasco ámbar muy bien etiquetado; el residuo sólido luego de secado y pesado se desechó (Miranda, 2000, p 41-42).

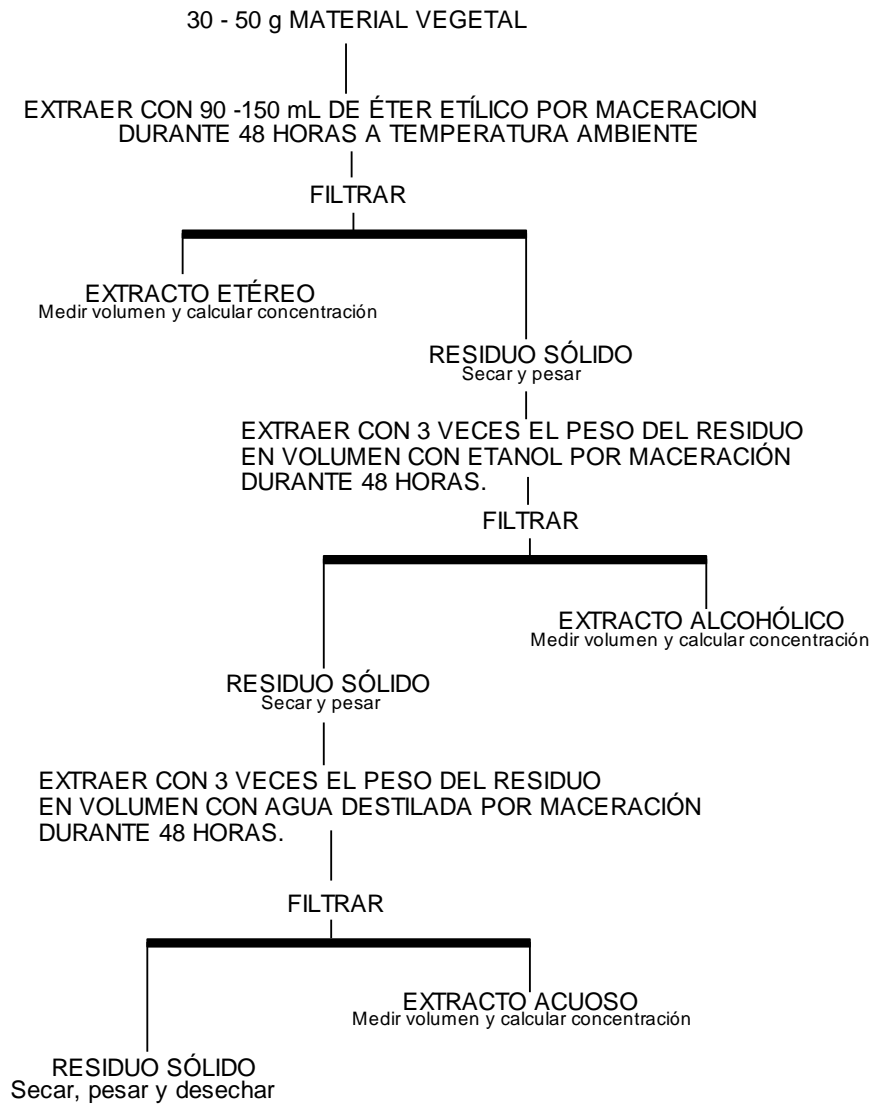


Figura 11. Extracción sucesiva del material vegetal para obtención de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso de *O. spicatus*.

Fuente: Miranda, 2000.



Figura 12. Maceración a temperatura ambiente de la muestra vegetal con disolventes de polaridad creciente (éter etílico, metanol y agua destilada).

Elaborado por: Norma Guerrero.



Figura 13. Residuo sólido seco de la muestra vegetal.

Elaborado por: Norma Guerrero.

3.3 Screening fitoquímico

Materiales

- ✓ Gradilla
- ✓ Termómetro
- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Pinzas
- ✓ Pipetas de vidrio
- ✓ Goteros de plástico
- ✓ Papel de filtro
- ✓ Vaso de precipitación
- ✓ Guantes de nitrilo
- ✓ Mascarilla
- ✓ Gafas de protección

Equipo

- ✓ Lámpara de Luz UV marca CAMAG modelo s/n
- ✓ Hotplate Alton modelo SB81
- ✓ Vortex Mixer Gemmy modelo VM 300

Reactivos

- ✓ Colorante Sudan III o IV grado RA
- ✓ Ácido clorhídrico 37% pureza. Grado ACS
- ✓ Cloruro de sodio 99% pureza. Grado RA
- ✓ Hidróxido de potasio $\geq 85\%$ pureza como KOH. Grado ACS
- ✓ Cloroformo $\geq 99,8\%$ pureza. Grado ACS
- ✓ Anhídrido acético $\geq 85\%$ pureza. Grado RA
- ✓ Carbonato de sodio $\geq 99\%$ pureza. Grado RA
- ✓ Cloruro férrico $\geq 98\%$ pureza. Grado RA
- ✓ Acetato de sodio $\geq 99\%$ pureza. Grado RA

- ✓ Ninhidrina grado RA
- ✓ Cinta de magnesio metálico
- ✓ Alcohol amílico $\geq 98\%$ pureza. Grado ACS
- ✓ Ácido sulfúrico $\geq 95\%$ pureza. Grado ACS
- ✓ Reactivo de Dragendorff
- ✓ Reactivo de Baljet
- ✓ Reactivo de Kedde
- ✓ Reactivo de Fehling
- ✓ Solución salina al 0.9 %
- ✓ Alcohol 96% pureza.
- ✓ Agua destilada

Procedimiento

En cada extracto (etéreo, metanólico y acuoso) por separado se procedió a tomar una alícuota para someterla a las reacciones específicas encaminadas a cualificar la presencia de metabolitos secundarios de interés farmacognóstico de acuerdo a Miranda (2000, p 43-49).

3.3.1. Ensayos a realizar en el extracto etéreo, alcohólico y acuoso

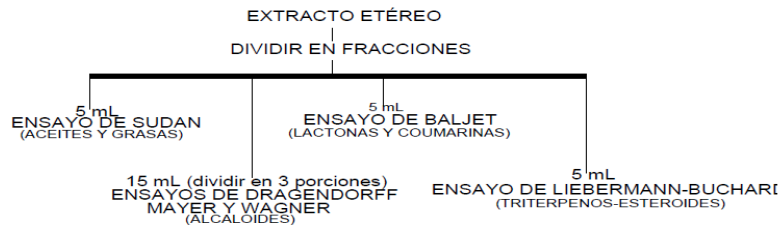


Figura 14. Esquema de las reacciones a realizar en el extracto de éter etílico.

Fuente: Miranda, 2000.

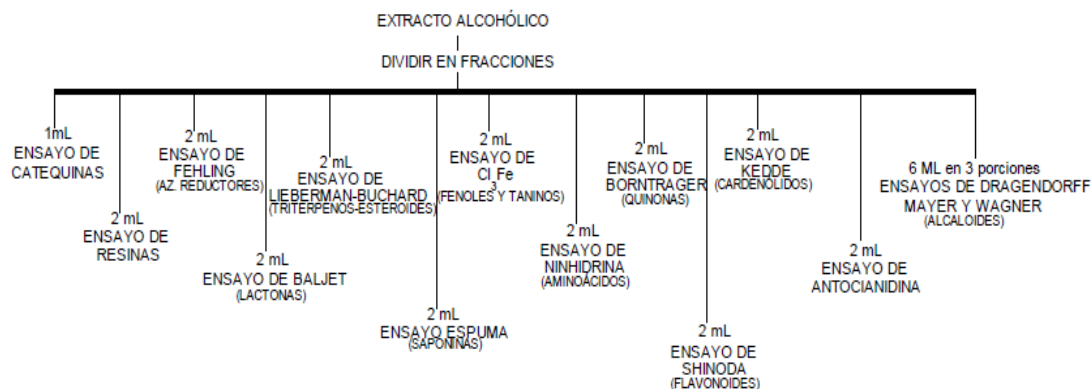


Figura 15. Esquema de las reacciones a realizar en el extracto alcohólico.

Fuente: Miranda, 2000.

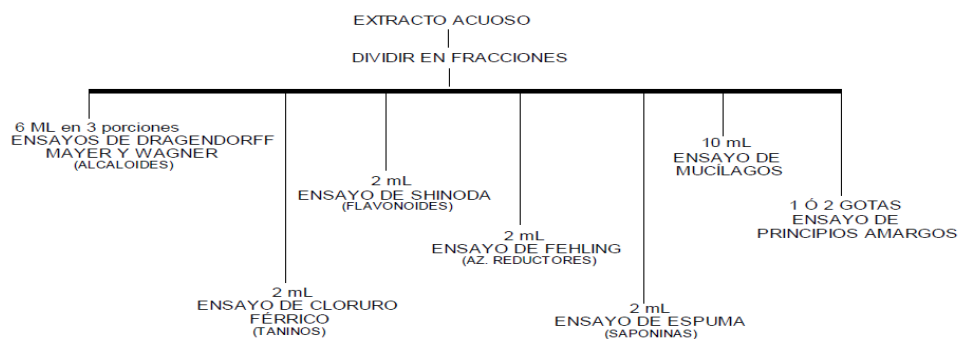


Figura 16. Esquema de las reacciones a realizar en el extracto acuoso.

Fuente: Miranda, 2000.

De acuerdo al texto de Miranda (2000) *Farmacognosia y productos naturales, Manual de Práctica*, se cita a cada uno de los ensayos de las figuras 14,15, y 16 con fines descriptivos y en el anexo 1 se describe la preparación de las soluciones y reactivos:

- Ensayo de Sudan: Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos. La presencia de estos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente.
- Ensayo de Dragendorff: Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides. Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++).

- Ensayo de Mayer: Proceda de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añada 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia (+), Turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).
- Ensayo de Wagner: Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma.
- Ensayo de Baljet: Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Coumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivo al ensayo.
Las soluciones de Baljet se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar la cual si no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad. En estas condiciones se adiciona 1mL del reactivo, considerándose un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++ y +++) respectivamente.
- Ensayo de Liebermann-Burchard: Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides, por ambos tipos de productos poseer un núcleo del androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.
Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:
 - 1- Rosado-azul muy rápido.
 - 2- Verde intenso-visible aunque rápido.
 - 3- Verde oscuro-negro-final de la reacción.
- Ensayo de catequinas: Para ello, tome de la solución alcohólica obtenida una gota, con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel de filtro.

Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio. La aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo.

- Ensayo de resinas: Para detectar este tipo de compuesto, adicione a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo.
- Ensayo de Fehling: Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar.
- Ensayo de la espuma: Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.
El ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por más de 2 minutos.
- Ensayo del cloruro férrico: Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:
 - Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
 - Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.

- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

- Ensayo de la ninhidrina: Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. Se toma una alícuota del extracto en alcohol, o el residuo de la concentración en baño de agua, si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, se mezcla con 2 mL de solución al 2 % de ninhidrina en agua. La mezcla se calienta 5-10 minutos en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo.

- Ensayo de Borntrager: Permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio ó amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su ulterior separación. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).

- Ensayo de Shinoda: Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol o agua, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.
El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos.

- Ensayo de Kedde: Permite reconocer en un extracto la presencia de glicósidos cardiotónicos. Una alícuota del extracto en etanol se mezcla con 1 mL del reactivo y se deja reposar durante 5-10 minutos. Un ensayo positivo es en el que se desarrolla una coloración violácea, persistente durante 1-2 horas.
Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar.

- Ensayo de antocianidinas: Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C₆-C₃-C₆ del grupo de los flavonoides. Se calientan 2 mL del extracto etanólico 10 min. con 1 mL de HCL conc. se deja enfriar y se adiciona 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agita y se deja separar las dos fases. La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, es indicativa de un ensayo positivo.
- Ensayo de mucílagos: Permite reconocer en los extractos de vegetales la presencia de esta estructura tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para ello una alícuota del extracto en agua se enfría a 0-5 °C y si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo.
- Ensayo de principios amargos y astringentes: El ensayo se realiza saboreando 1 gota del extracto acuoso o del vegetal y reconociendo el sabor de cada uno de estos principios, bien diferenciados al paladar.

3.4 Concentración de extractos

El extracto alcohólico y etéreo obtenido de la filtración se concentró a presión reducida en rotavapor. El extracto acuoso se concentró en bañomaría para obtener un extracto seco no volátil.

Materiales

- ✓ Vaso de precipitación
- ✓ Embudo

Equipo

- ✓ Rotavapor IKA modelo BS1HB10, RV10
- ✓ Baño María SHEL - LAB modelo W14M-2

Reactivos

- ✓ Extracto etéreo, metanólico y acuoso

Procedimiento

Se concentró cada uno de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso a presión reducida mediante el rotavapor con una temperatura constante de 40°C y con una rotación de 60 rpm hasta la mitad de su volumen. Después se adicionó el volumen obtenido previamente en un vaso de precipitación para someterlo a sequedad completa a baño María con una temperatura constante de 40°C (Miño, 2007).



Figura 17. Concentración de los extractos a presión reducida mediante el rotavapor.

Elaborado por: Norma Guerrero.



Figura 18. Obtención del extracto seco no volátil.

Elaborado por: Norma Guerrero.

3.5 Valoración de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu.

Para la cuantificación de compuestos fenólicos se analizaron los extractos alcohólico y acuoso de acuerdo al Manual de Miranda (2000, p 77-78). La concentración en extractos se midió por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu. El estándar utilizado fue el ácido gálico.

Materiales	Equipo
✓ Erlenmeyer	✓ Balanza analítica DENVER INST. modelo TR - 104
✓ Embudo	
✓ Papel de filtro	✓ Espectrofotómetro SHIMADZU- UV mini modelo 1240
✓ Pipeta de 5ml	
✓ Matraz aforado 50 ml	✓ Shaker THERMO SCIENTIFIC modelo 4310

Reactivos
✓ 1g de extracto seco alcohólico y acuoso
✓ Alcohol 96% pureza. Grado ACS
✓ Agua destilada
✓ Ácido gálico
✓ Reactivo de Folin-Ciocalteu.
✓ Carbonato de sodio anhidro $\geq 99\%$ pureza. Grado ACS

Procedimiento

- Preparación de la solución muestra (Sm).

1,0 g de extracto seco (alcohólico y/o acuoso) se llevó a un frasco cónico de 50 ml con 50 ml de alcohol al 50 %. Se mantuvo en agitación durante 6 h en Shaker, se dejó en reposo 8 h, se agitó nuevamente 30 min. y se filtró. Se transfirió 3 ml del filtrado a un matraz aforado de 50 ml y se diluyó con agua destilada hasta enrase (Sm).

- Preparación de la solución de referencia (Sr).

Se pesaron con exactitud 25 mg de ácido gálico (previamente secado a 100 °C durante 2 h) y se disolvió en agua hasta completar 100 ml. Se tomó una alícuota de 20 ml de la solución y se diluyó a 100 ml con agua destilada (Sr).

- Preparación de la Solución de carbonato de sodio.

Se disolvieron 10 g de carbonato de sodio anhidro en 50 ml de agua destilada. Con las soluciones preparadas previamente se preparó un juego de 5 matraces aforados de 50 ml cada uno (B, P, M₁, M₂, M₃) y se procedió de la siguiente forma:

Reactivo	B	P	M₁-M₂-M₃
Solución muestra. (Sm)	-	-	1,0 ml
Solución referencia. (Sr): Ácido gálico.	-	3,0 ml	-
Agua destilada	5,0 ml	2,0 ml	4,0 ml
Reactivo de Folin-Ciocalteu.	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
Se agita se deja en reposo 5 min.			
Solución de Carbonato de Sodio	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Se completa con agua destilada hasta enrase y se mezcla bien.			

Tabla 3. Preparación de soluciones de ensayo de acuerdo al método de Folin-Ciocalteu.

Fuente: Miranda, 2000.

Importante.- Se leen la absorbancia de la solución de referencia y las muestras a 700 nm en un término no mayor de 2 min.

Los cálculos se determinan según (Miranda, 2000):

$$C_m = \frac{A_m \times W_{Sr} \times F_d}{A_{Sr} \times W_m}$$

Dónde:

C_m = concentración de compuestos fenólicos en la droga.

A_m = absorbancia de la muestra.

A_{Sr} = absorbancia de la solución de referencia.

W_{Sr} = peso de la sustancia de referencia (mg).

W_m = peso de la droga (g)

F_d = factor de dilución.

3.6 Cromatografía en capa fina

3.6.1 Fraccionamiento del extracto alcohólico para cromatografía en capa fina

Se fraccionó el extracto alcohólico con la finalidad de investigar su composición mediante cromatografía en capa fina según Miño, 2007 para los siguientes metabolitos:

- Fracción B para la determinación de Alcaloides en fase orgánica.
- Fracción C para la determinación de Esteroles en fase orgánica.
- Fracción D para la determinación de Flavonoides, Taninos, y Quinonas en fase acuosa.
- Fracción E para la determinación de compuestos con agrupamientos Lactónicos (Coumarinas) y Heterósidos Cardiotónicos en fase orgánica.

Materiales

- ✓ Extracto metanólico seco
- ✓ Embudo de separación de 500 ml.
- ✓ Placas de sílica gel GF 254
- ✓ Termómetro

Equipos

- ✓ Phmetro METTLER TOLEDO modelo Seven Multi S47K
- ✓ TLC CAMAG modelo Linomat 5
- ✓ Lámpara de luz UV CAMAG modelo s/n

Reactivos

- ✓ Ácido Clorhídrico 37% pureza. Grado ACS
- ✓ Ácido Fórmico $\geq 95\%$ pureza. Grado RA
- ✓ Hidróxido de sodio en lentejas $\geq 97\%$ pureza. Grado RA
- ✓ Hidróxido de potasio $\geq 85\%$ pureza como KOH. Grado ACS
- ✓ Diclorometano 99.5% pureza. Grado ACS
- ✓ Reactivos para alcaloides Dragendorff, Mayer, Wagner
- ✓ Éter etílico 99% pureza. Grado RA
- ✓ Reactivo para Esteroles Lieberman-Buchard
- ✓ N-hexano $\geq 95,0\%$ pureza. Grado ACS
- ✓ Vainillina $\geq 98\%$ pureza. Grado RA
- ✓ Ácido sulfúrico $\geq 95\%$ pureza. Grado ACS
- ✓ Reactivo para Flavonoides Shinoda
- ✓ Reactivo para Quinonas Borntrager
- ✓ Etanol 99% pureza. Grado RA
- ✓ Acetato de etilo $\geq 99,9\%$ pureza. Grado RA
- ✓ Ácido acético glacial $\geq 99.7\%$ pureza. Grado ACS
- ✓ N-butanol 99,5 % pureza. Grado RA
- ✓ Reactivo para compuestos Fenólicos Cloruro férrico
- ✓ Cloroformo $\geq 99,8\%$ pureza. Grado ACS
- ✓ Metanol $\geq 99.8\%$ pureza. Grado RA
- ✓ Acetato de plomo 98%. Grado RA
- ✓ Sulfato de sodio anhidro 98% pureza. Grado RA
- ✓ Reactivo para Glucósidos cardiotónicos Kedde
- ✓ Reactivo para agrupamientos Lactónicos Baljet
- ✓ Acetona 99.5 % pureza. Grado ACS

3.6.2 Extracción, identificación y obtención del perfil cromatográfico de las fracciones de metabolitos secundarios.

Procedimiento

- Alcaloides

Extracción. Se tomó una alícuota del extracto alcohólico seco y se disolvió con etanol para obtener extracto etanólico. Se añadió ácido clorhídrico al 5% para llevar a pH 5. Se adicionó hidróxido de sodio al 20% para llevar a pH 8. Se transfirió el extracto alcalinizado a un embudo de separación, y se extrajo con diclorometano, utilizando un volumen igual al del extracto. Se separó la fase de diclorometano (inferior) obteniéndose la fracción B (Fig.19).



Figura 19. Separación del extracto B (parte inferior).

Elaborado por: Norma Guerrero.

Identificación

- ✓ Prueba de Dragendorff, Mayer y Wagner.

Perfil cromatográfico.

El análisis cromatográfico de la Fracción B fue el siguiente:

Fase estacionaria: placas de sílica gel GF 254

Fase móvil: (BAW) Butanol: ácido acético: agua (10:2:1)

Siembra: Se realizó con el equipo Linomat 5 en las placas de 10 cm x 10 cm, el volumen de inyección fue de 20 ul y ancho de banda de 10 mm.

Revelador: Dragendorff (acético) si existe una reacción positiva se observarán manchas de color naranja.

Frente de referencia: $\frac{\text{Distancia que ha recorrido el disolvente}}{\text{Distancia que ha recorrido la mancha}}$

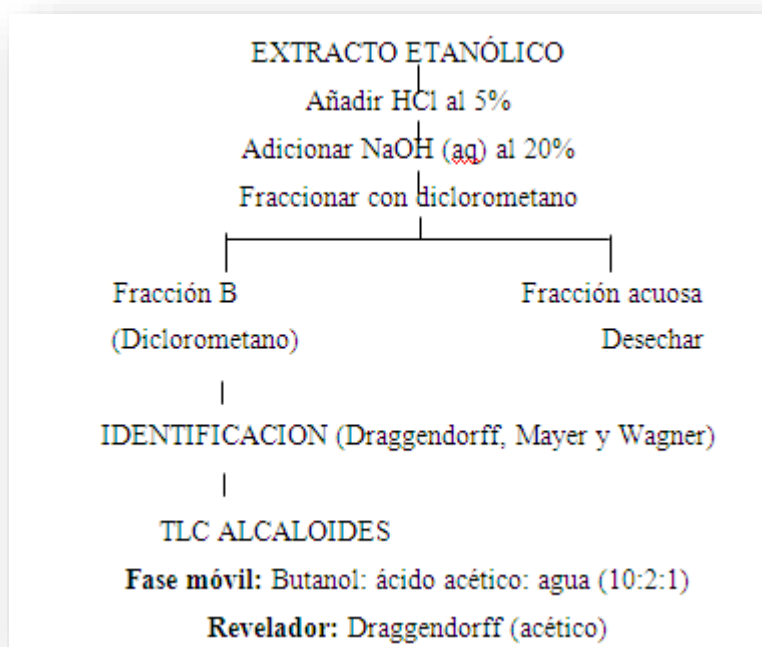


Figura 20. Esquema de la extracción y TLC de alcaloides en el extracto alcohólico.

Elaborado por: Norma Guerrero

- Esteroles, Flavonoides, Taninos y Antraquinonas

Extracción. Se tomó una cantidad de extracto etanólico y se colocó en un embudo de separación de 500 mililitros. Se adicionó una cantidad igual de éter de petróleo, y se separó el extracto etéreo (capa superior) obteniéndose la fracción C. La fase acuosa

(capa inferior) corresponde a la fracción D en la que se hará la extracción de flavonoides, taninos y quinonas (Fig. 21).

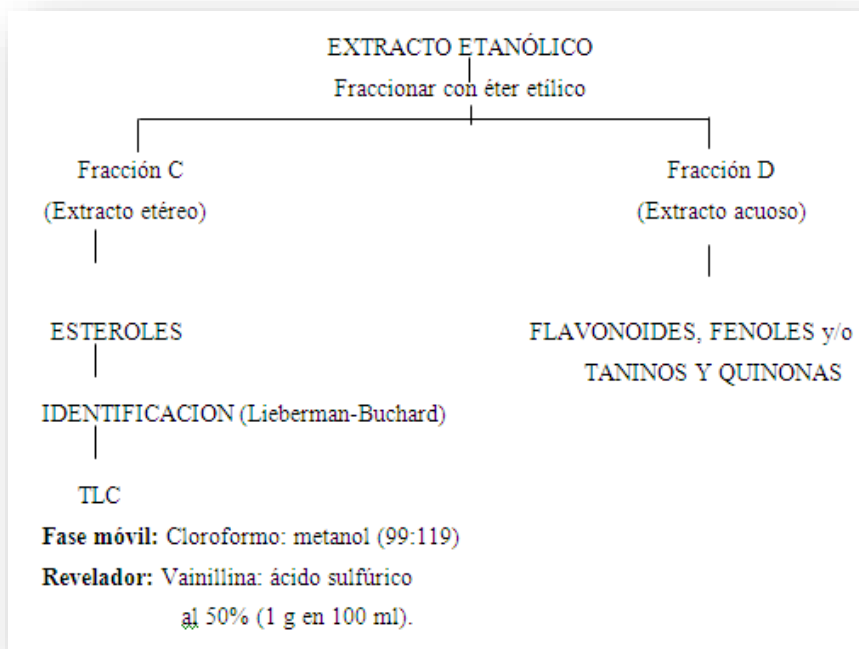


Figura 21. Esquema de la extracción y aislamiento de esteroides, flavonoides, fenoles y/o taninos y quinonas en el extracto alcohólico.

Elaborado por: Norma Guerrero.

- Esteroides

Identificación

- ✓ Prueba de Lieberman-Buchard.

Perfil cromatográfico:

El análisis cromatográfico de la Fracción C fue el siguiente:

Fase estacionaria: placas de sílica gel GF 254.

Fase móvil: Cloroformo: metanol (99:119)

Siembra: Se realizó con el equipo Linomat 5 en las placas de 10 cm x 10 cm, el volumen de inyección fue de 20 μ l y ancho de banda de 10 mm.

Revelador: Vainillina: ácido sulfúrico al 50% (1 g en 100 ml). Calentar a 120°.

Se observó en luz visible, mediante la cámara de ultravioleta con una longitud de onda de 254 nm y 365 nm., la presencia de manchas fluorescentes.

Frente de referencia: $\frac{\text{Distancia que ha recorrido el disolvente}}{\text{Distancia que ha recorrido la mancha}}$



Figura 22. Adición del revelador para esteroides a la placa cromatográfica corrida.

Elaborado por: Norma Guerrero.

- Flavonoides

Identificación

- ✓ Prueba de Shinoda
- ✓ Prueba con Cloruro férrico

Extracción. La fracción D se evaporó con calentamiento no superior a los 50°C y se realizaron particiones sucesivas con éter etílico, acetato de etilo, ácido acético y n-butanol, añadiendo 1,5 ml del extracto más 1,5 ml de cada solvente. Se mezcló en vórtex. Se centrifugó por 20 min y se sembró del sobrenadante 20 ul, con un ancho de banda de 10 mm en las posiciones 15, 50 y 85 mm en una placa de sílica gel GF 254 de 10 cm x 10 cm. Los flavonoides apolares quedan en la fase etérea, los medianamente polares en la fase acetato de etilo y ácido acético y los más polares en n-butanol. Cada una de estas fracciones se analizó por Cromatografía en capa fina (Fig. 21 y 23).

Perfil cromatográfico para el análisis de las agliconas flavonoides

Fase estacionaria: placas de sílica gel GF 254, aplicar una alícuota de cada una de las particiones obtenidas previamente.

Fase móvil: n-hexano: acetato de etilo (6:4).

Siembra: Se realizó con el equipo Linomat 5 en las placas de 10 cm x 20 cm, el volumen de inyección fue de 20 ul y ancho de banda de 10 mm.

Se procede a observar a luz visible, mediante la cámara de ultravioleta con una onda de longitud de 254 nm y 365 nm. Se observan las manchas fluorescentes. (Martínez, 2005 y Miño, 2007).

Perfil cromatográfico para el análisis de glicósidos flavonoides

Fase estacionaria: placas de sílica gel GF 254, aplicar una alícuota de cada una de las particiones obtenidas previamente.

Fase móvil: acetato de etilo: ácido fórmico: ácido acético: agua (100:11:11:27).

Siembra: Se realizó con el equipo Linomat 5 en las placas de 10 cm x 20 cm, el volumen de inyección fue de 20 ul y ancho de banda de 10 mm.

Se procede a observar a luz visible, mediante la cámara de ultravioleta con una onda de longitud de 254 nm y 365 nm. Se observan las manchas fluorescentes (Martínez, 2005 y Miño, 2007).

$$\text{Frente de referencia: } \frac{\text{Distancia que ha recorrido el disolvente}}{\text{Distancia que ha recorrido la mancha}}$$

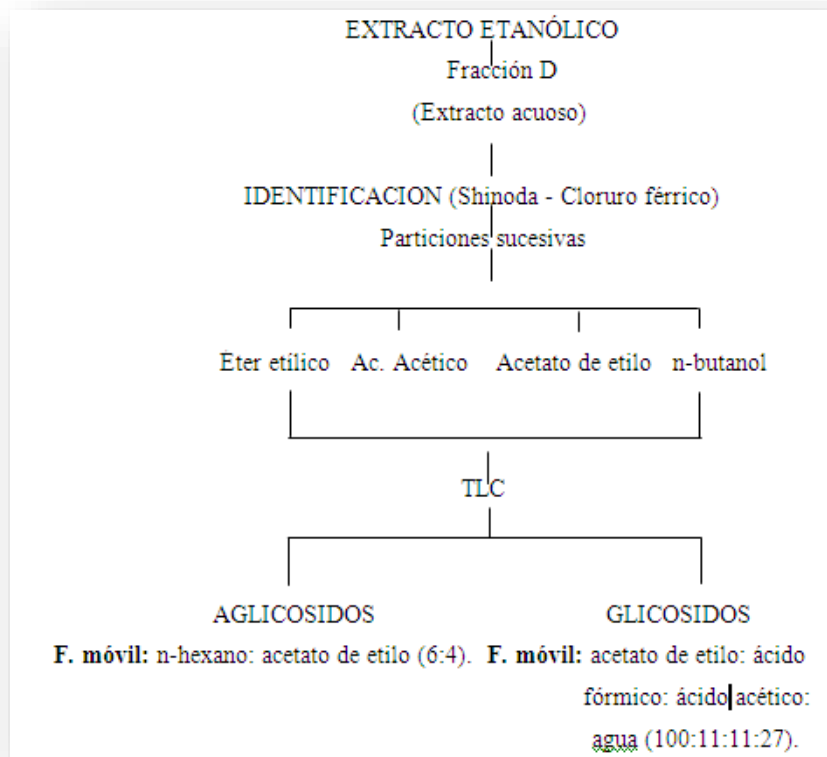


Figura 23. Esquema de la extracción y TLC de flavonoides.

Elaborado por: Norma Guerrero.

- Taninos

Identificación

- ✓ Prueba con Cloruro férrico

- Quinonas

Identificación

- ✓ Prueba de Borntrager

Perfil cromatográfico de Antraquinonas

El análisis cromatográfico de la Fracción D fue el siguiente:

Fase estacionaria: placas de sílica gel GF 254.

Fase móvil: Cloroformo: metanol (99:119)

Perfil cromatográfico de Naftoquinonas

El análisis cromatográfico de la Fracción D fue el siguiente:

Fase estacionaria: placas de sílica gel GF 254.

Fase móvil: Cloroformo: metanol (5:5)

Siembra: Se realizó con el equipo Linomat 5 en las placas de 10 cm x 10 cm, el volumen de inyección fue de 20 ul y ancho de banda de 10 mm.

Se procede a observar a luz visible, mediante la cámara de ultravioleta con una onda de longitud de 254 nm y 365 nm. Se observan las manchas fluorescentes.

Reveladores tanto en Antraquinonas como en Naftoquinonas:

Hidróxido de Potasio (KOH) al 10% en metanol. Si existe una reacción positiva se observarán manchas de color amarillo café que cambian a rojo, violeta, verde o púrpura.

Se procede a observar a luz visible, mediante la cámara de ultravioleta con una longitud de onda de 254 nm y 365 nm. Se observan manchas oscuras y fluorescentes respectivamente.

Frente de referencia: $\frac{\text{Distancia que ha recorrido el disolvente}}{\text{Distancia que ha recorrido la mancha}}$

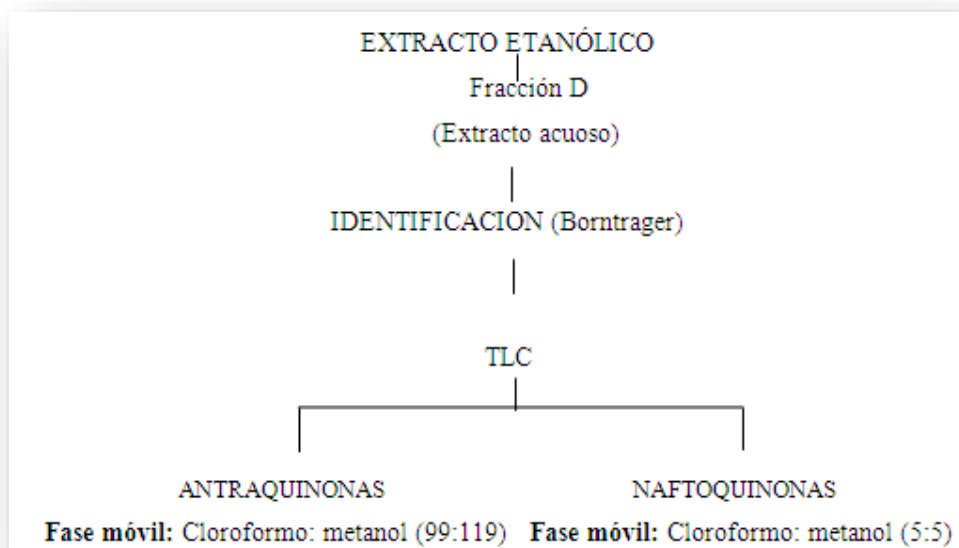


Figura 24. Esquema de la extracción y TLC de quinonas.

Elaborado por: Norma Guerrero.

- Compuestos con agrupamiento Lactónico (Coumarinas) y Heterósidos Cardiotónicos

Extracción. Se tomó una alícuota de extracto etanólico, se precipitó con una solución de acetato de plomo al 5%, filtrar y al filtrado se extrajo con diclorometano (parte inferior). El extracto de diclorometano tratarlo con una alícuota de sulfato de sodio anhidro, filtrar y concentrar. A este extracto obtenido lo denominaremos Fracción E (Fig. 25).

- Coumarinas

Identificación

- ✓ Prueba de Baljet

Perfil cromatográfico

El análisis cromatográfico de la Fracción E fue el siguiente:

Fase estacionaria: placas de sílica gel GF 254.

Fase móvil: Cloroformo: acetona (9:1)

Siembra: Se realizó con el equipo Linomat 5 en las placas de 10 cm x 10 cm, el volumen de inyección fue de 20 ul y ancho de banda de 10 mm.

Revelador: Hidróxido de potasio (KOH) 5% en metanol

Se procede a observar a luz visible, mediante la cámara de ultravioleta con una onda de longitud de 254 nm y 365 nm. Se observan las manchas fluorescentes.

$$\text{Frente de referencia: } \frac{\text{Distancia que ha recorrido el disolvente}}{\text{Distancia que ha recorrido la mancha}}$$

- Heterósidos Cardiotónicos

Identificación

- ✓ Prueba de Kedde

Perfil cromatográfico

El análisis cromatográfico de la Fracción E fue el siguiente:

Fase estacionaria: placas de sílica gel GF 254.

Fase móvil: Cloroformo: acetona (9:1)

Siembra: Se realizó con el equipo Linomat 5 en las placas de 10 cm x 10 cm, el volumen de inyección fue de 20 ul y ancho de banda de 10 mm.

Revelador: Reactivo de Kedde

Se procede a observar a luz visible, mediante la cámara de ultravioleta con una onda de longitud de 254 nm y 365 nm. Se observan las manchas fluorescentes.

$$\text{Frente de referencia: } \frac{\text{Distancia que ha recorrido el disolvente}}{\text{Distancia que ha recorrido la mancha}}$$

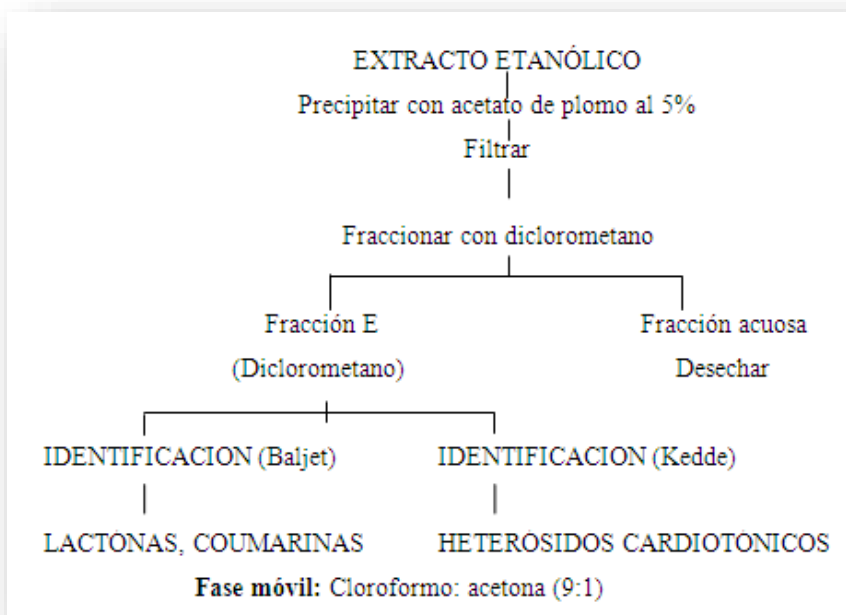


Figura 25. Esquema de la identificación y TLC de Coumarinas y Heterósidos Cardiotónicos

Elaborado por: Norma Guerrero.

3.7 Actividad antibacteriana y antimicótica.

Materiales

- ✓ Frascos ámbar
- ✓ Frascos Boeco
- ✓ Embudo
- ✓ Papel filtro
- ✓ Vasos de precipitación
- ✓ Probeta
- ✓ Cajas petri
- ✓ Tubos de ensayo
- ✓ Asa bacteriológica
- ✓ Espátula de Drigalski
- ✓ Mechero
- ✓ Pipeta de 5 y 10 ml
- ✓ Micropipeta de 10, 100 y 1000 μ l
- ✓ Vidrio reloj
- ✓ Gradilla
- ✓ Discos en blanco
- ✓ Celdas
- ✓ Hisopos estériles
- ✓ Pie de rey

Equipos

- ✓ Balanza analítica METTLER TOLEDO modelo ML 204
- ✓ Ultrasonido Fisher Scientific modelo FS 600
- ✓ Autoclave vertical Phoenix modelo AV50
- ✓ Cámara de Flujo laminar Forma Scientific modelo 1845
- ✓ Incubadora SHEL LAB modelo 1525
- ✓ Baño maría SHEL LAB modelo W14M-2
- ✓ Espectrofotómetro SHIMADZU-UVmini modelo 1240
- ✓ Refrigeradora INDURAMA modelo VFV-400
- ✓ Vortex Mixer Gemmy modelo VM 300

Reactivos y Medios de cultivo

- ✓ Agua destilada
- ✓ Solución salina estéril al 0.9%
- ✓ Dimetil sulfóxido (DMSO) \geq 99.9% pureza. Grado ACS
- ✓ Agar Mueller Hinton
- ✓ Caldo de tripticasa-soja (TSB)

- ✓ Agar tripticasa-soja (TSA)
- ✓ Caldo Mueller Hinton
- ✓ Sabouraud Dextrose Agar (SDA)
- ✓ Gentamicina 10 µg
- ✓ Fluconazol 25 µg

3.7.1 Antibiograma por el método de difusión en agar Kirby-Bauer.

Cepas

Las cepas de bacterias y levadura fueron obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC) (Ver Anexo 2):

- ✓ *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853
- ✓ *Bacillus subtilis* subes *spizizenii* ATCC 6633
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 9637
- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- ✓ *Candida albicans* ATCC 10231

Viabilidad de cepas certificadas

Se preparó 1000 ml de TSA, previamente esterilizado, se dispensa en las cajas Petri estériles dentro de una cámara de flujo laminar y se deja solidificar. Se etiquetan las cajas Petri con el nombre de cada cepa. Se rompe las esferas que contiene la cepa liofilizada y con el hisopo se siembra en forma de estriado. La siembra de cada cepa se realiza por triplicado. Se incuba de 24 a 48 horas para observar crecimiento bacteriano. En tubos de ensayo estériles se realiza subcultivos en pico de flauta con aproximadamente 10 ml de agar TSA; de cada cepa viabilizada se toma dos colonias para resembrar en los picos de flauta, se deja incubar por 24 h; y posterior se los

conserva en refrigeración de 4°C a 8°C con lo que su crecimiento es inferior y la necesidad de hacer subcultivos se prolonga de 1 a 3 meses.

Preparación de concentraciones de los extractos

Se trabajó con los extractos secos no volátiles preparados previamente y con DMSO para obtener 3 concentraciones por cada extracto. En 800 mg de extracto seco se añade 4ml de DMSO para obtener una concentración de 200.000 µg/ml. La segunda concentración se obtendrá pesando 400 mg de extracto seco y añadiendo 4ml de DMSO para obtener una concentración de 100.000 µg/ml. La tercera concentración en 800mg de extracto se añadió 2 ml de DMSO para obtener una concentración de 400.000 µg/ml. Las concentraciones de los extractos se mezclan bien en el shaker y ultrasonido para conservarlas en refrigeración hasta su uso.

Preparación del agar Mueller Hinton y Sabouraud Dextrose Agar

- Mueller Hinton para Bacterias Gram positivas y negativas

Se prepara 4000ml de agar Mueller-Hinton, previamente esterilizado, se dispensa en placas Petri estériles aproximadamente 25 ml, se deja solidificar. El procedimiento se realiza en la cámara de flujo laminar. Las cajas Petri con agar se conservan en refrigeración hasta su uso (15 días máximo).

- Sabouraud Dextrose Agar para Levaduras

Se prepara 2000 ml de Sabouraud Dextrose Agar, previamente esterilizado, se dispensa en placas Petri aproximadamente 25 ml, se deja solidificar. El procedimiento se realiza en la cámara de flujo laminar. Las cajas Petri con agar se conservan en refrigeración hasta su uso (15 días máximo).

Over night

Se prepara 500 ml de TSB, previamente esterilizado se dispensa 5ml en cada tubo de ensayo estéril. Se procede a tomar 3 colonias de las cajas Petri que contenga la cepa de interés para ser colocado en los tubos de ensayo con TSB. Se incuba por 24 h.

Posteriormente se sedimentan los tubos con las cepas en la centrifuga por 20 min para obtener el pellet.

Se conserva el pellet y se elimina el sobrenadante. Al pellet se le adiciona 4ml de solución salina estéril al 0.9%, se agita en el vórtex y seguidamente se añade un volumen de solución salina estéril adecuado para alcanzar una densidad óptica de 0,2 ABS equivalente a una concentración bacteriana aproximada de 10^6 ufc/ml del inoculo.

Preparación de discos

En la cámara de flujo laminar previamente desinfectada, se coloca los discos en blanco dentro de cajas Petri estériles y etiquetadas con las concentraciones de los extractos de *O. spicatus* de 400.000 µg/ml, 200.000 µg/ml y 100.000 µg/ml, el antibiótico Gentamicina 10 µg, el antimicótico Fluconazol 25 µg y los discos con DMSO.

Con una micropipeta se coloca a cada disco en blanco, 40 µl de las concentraciones de los extractos a ser evaluados. Se deja que el disco absorba el extracto. Se prepara discos con los extractos para 5 repeticiones.

3.7.1.1 Evaluación de sensibilidad

Para bacterias se usa Agar Mueller- Hinton y para levadura Sabouraud Dextrose Agar.

En la cámara de flujo laminar, se etiqueta las cajas Petri con las concentraciones a ser evaluadas con la designación: C1, C2, C3. Con hisopos estériles se procede a introducir en el tubo de ensayo que contiene la cepa regulada la densidad óptica a 0,2 ABS equivalente a una concentración bacteriana aproximada de 10^6 ufc/ml para tomar un

inoculo y sembrarlo en estría procurando que abarque la totalidad del área del agar contenido en la caja Petri.

Posteriormente se coloca los discos con las tres concentraciones sobre el agar, usando como control negativo o blanco discos con DMSO y como control positivo discos con Gentamicina 10 µg para bacterias, mientras que para levadura se usa como control positivo discos con Fluconazol 25 µg.

Se deja incubar de 24 h. a 48 h. para posteriormente con un pie de rey proceder a la lectura de los halos de inhibición. Según Alonso (2006) se considera con actividad antibacteriana positiva el halo con un diámetro mayor a 9 mm; si el halo se encontró entre 6 – 9 mm la actividad se consideró intermedia o moderada y si el diámetro del halo fue menor a 6 mm se consideró actividad bacteriana negativa o sin actividad. Esto permitirá partir de la concentración que inhibió a los microorganismos dependiendo el extracto.

3.7.1.2 Análisis estadístico

Utilizamos el análisis de Kruskal-Wallis que determina si tres o más grupos de datos poseen medianas estadísticamente similares o no (entre bloques). Con el objeto de contrastar los halos de inhibición buscando determinar si existe algún efecto debido a factores como el tipo de extracto y/o sus concentraciones en cada una de las especies de microorganismos testadas en el programa *Statistix*.

Hipótesis:

- Hipótesis Nula

Los grupos de datos contrastados presenta medianas con inhibición estadísticamente similares.

- Hipótesis Alternativa

El valor de la mediana de al menos uno de los grupos de datos presenta inhibición diferente a la de los otros grupos.

Se trabajó con un nivel de significancia de α : 0.05. y se efectuó un test a posteriori con los resultados de Kruskal-Wallis con el que se discriminó los grupos de datos que fueron diferentes entre sí.

3.7.2 Determinación de concentración mínima inhibitoria (MIC) por el método de dilución en caldo.

Se utilizó el método de dilución en caldo según el Manual de Microbiología de Gamazo (2005, p 127-131) con las bacterias que presentaron sensibilidad frente a los extractos (etéreo, metanólico o acuoso).

- Selección de bacteria y extracto según su sensibilidad

Para continuar con el ensayo de concentración mínima inhibitoria elegimos las bacterias que presentaron sensibilidad *E. coli* ATCC 9637, frente al extracto acuoso, *S. aureus* ATCC 6538 frente al extracto acuoso y alcohólico, *B. spizizenii* ATCC 6633 frente al extracto alcohólico y sensibilidad intermedia *aeruginosa* ATCC 27853 frente al extracto acuoso, *S. aureus* ATCC 6538 frente al extracto etéreo de *Oryctanthus spicatus*.

- Método de dilución en caldo

Se prepararon 200 ml de caldo Mueller Hinton estéril. Se colocó en 10 tubos de ensayo estériles 1 ml de caldo Mueller Hinton estéril, posteriormente se añade 1ml de la concentración de la solución madre (extracto etéreo, alcohólico o acuoso a una concentración de 100.000 $\mu\text{g/ml}$, 200.000 $\mu\text{g/ml}$ o 400.000 $\mu\text{g/ml}$), que presentó sensibilidad antimicrobiana de acuerdo a la lectura, al primer tubo de ensayo y a partir

de este se preparan diluciones dobles seriadas tomando 1 ml del primer tubo y transfiriéndolo al segundo tubo con caldo. Después de mezclar bien el contenido del segundo tubo se transfieren 1 ml de este al tercer tubo con caldo y se continuó así sucesivamente hasta el décimo tubo con caldo, del cual se tomó 1 ml y fue eliminado. Las concentraciones de los extractos del primero al décimo tubo son las siguientes; partiendo de 400.000 µg/ml de solución madre (100000; 50000; 25000; 12500; 6250; 3125; 1562,5; 781,25; 390,625 y 195,3125 µg/ml), de 200.000 µg/ml de solución madre (50000; 25000; 12500; 6250; 3125; 1562,5; 781,25; 390,625; 195,3125 y 97,65625 µg/ml) y de 100.000 µg/ml de solución madre (25000; 12500; 6250; 3125; 1562,5; 781,25; 390,625; 195,3125; 97,65625 y 48,828125 µg/ml).

Luego se añadió a cada tubo con extracto y caldo, 1 ml del inóculo bacteriano preparado previamente tomando 0,2 ml de la suspensión bacteriana con la turbidez estándar (overnight) y mezclándolo en 19,8 ml de caldo Mueller Hinton estéril.

Se incubó por 24 h, posteriormente se tomó 100 µl y se depositó sobre la superficie de agar Mueller Hinton para bacterias y Sabouraud Dextrose Agar para levaduras, con un asa de Digrafsky se extendió el inóculo sobre el agar. Dicho procedimiento se realizó con todos los tubos que contienen el extracto a determinadas concentraciones y este análisis se realizó por quintuplicado.

Transcurridas las 24 horas de incubación, se examinaron cuidadosamente todas las placas y se determinó la concentración del extracto a partir del cual empezó a existir crecimiento bacteriano.

3.8 Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH.

Materiales

- ✓ Viales ámbar
- ✓ Micropipeta de 1 a 10 µl
- ✓ Micropipeta de 10 a 100 µl
- ✓ Puntas de plástico

Equipos

- ✓ Agitador Shaker THERMO SCIENTIFIC modelo 4310
- ✓ Espectrofotómetro SHIMADZU modelo UVmini-1240

Reactivos

- ✓ Etanol al 96%
- ✓ Radical libre DPPH (2,2 difenil-picrilhidrazilo)
- ✓ Pajarito (*Oryctanthus spicatus*)
- ✓ Té verde (*Camellia sinensis*)
- ✓ Vitamina C o Ácido ascórbico

Procedimiento

El método se basa en la reducción de un compuesto cromóforo estable en este caso el DPPH en presencia de moléculas antioxidantes, éste a condiciones normales es de color violeta si se añade diversas concentraciones de un antioxidante este fomentara la reducción del compuesto (cuando reacciona con la sustancia antioxidante dona un hidrógeno) , es capturado el radical libre y hace que este se decolore a un tono amarillento, entre mayor es la decoloración (reducción) mayor es su actividad antioxidante. Usamos una solución 0,5 mM de DPPH en etanol al 96% (49mg de DPPH aforados a 250mL de etanol), la colocamos en un frasco ambar y mantenemos en refrigeración hasta el momento de realizar el ensayo (Scartezzini et al, 2006).

3.8.1 Extracto alcohólico seco de *Oryctanthus spicatus*

Pesar 1g del extracto de *Oryctanthus spicatus* seco, disolver en 10 ml de etanol al 96%, tomar 1 ml de esta disolución y diluir 10 veces más. Luego se procedió a preparar las siguientes soluciones:

SOLUCIÓN	PREPARACIÓN	CONCENTRACIÓN mg/ml
1	100 µl de etanol	0
2	1 µl de extracto diluido 1/100 + 99 µl de etanol	0,003
3	2 µl de extracto diluido 1/100 + 98 µl de etanol	0,007
4	5 µl de extracto diluido 1/100 + 95 µl de etanol	0,016
5	10 µl de extracto diluido 1/100 + 90 µl de etanol	0,033
6	20 µl de extracto diluido 1/100 + 80 µl de etanol	0,066
7	30 µl de extracto diluido 1/100 + 70 µl de etanol	0,100
8	40 µl de extracto diluido 1/100 + 60 µl de etanol	0,133
9	50 µl de extracto diluido 1/100 + 50 µl de etanol	0,166
10	100 µl de extracto diluido 1/100	0,333

Tabla 4. Concentraciones y soluciones del extracto seco de *O. spicatus*.

Fuente: Scartezzini et al, 2006.

3.8.2 Extracto alcohólico seco de *Camellia sinensis* (Té verde, antioxidante de referencia natural)

Se obtiene un extracto alcohólico seco de *Camellia sinensis* como estándar natural. Pesar 1 g disolver en 100 ml de etanol al 96%. Luego se procede a preparar las siguientes soluciones:

SOLUCIÓN	PREPARACIÓN	CONCENTRACIÓN mg/ml
1	100 µl de etanol	0
2	1 µl de extracto diluido 1/100 + 99 µl de etanol	0,003
3	2 µl de extracto diluido 1/100 + 98 µl de etanol	0,007
4	5 µl de extracto diluido 1/100 + 95 µl de etanol	0,016
5	10 µl de extracto diluido 1/100 + 90 µl de etanol	0,033
6	20 µl de extracto diluido 1/100 + 80 µl de etanol	0,066
7	50 µl de extracto diluido 1/100 + 50 µl de etanol	0,100
8	80 µl de extracto diluido 1/100 + 20 µl de etanol	0,133

Tabla 5. Concentraciones y soluciones del extracto seco de *C. sinensis*.

Fuente: Scartezzini et al, 2006.

3.8.3 Disolución de vitamina C (antioxidante de referencia comercial)

Preparar una solución como estándar comercial de 0,1g de vitamina C en 100ml de etanol al 96%. Luego se procede a preparar las siguientes soluciones:

SOLUCIÓN	PREPARACIÓN	CONCENTRACIÓN mg/ml
1	100 µl de etanol	0,000
2	1 µl de vitamina C diluida 1/1000 + 99 µl de etanol	0,0003
3	2 µl de vitamina C diluida 1/1000 + 98 µl de etanol	0,001
4	5 µl de vitamina C diluida 1/1000 + 95 µl de etanol	0,002
5	10 µl de vitamina C diluida 1/1000 + 90 µl de etanol	0,003
6	20 µl de vitamina C diluida 1/1000 + 80 µl de etanol	0,007
7	30 µl de vitamina C diluida 1/1000 + 70 µl de etanol	0,010
8	40 µl de vitamina C diluida 1/1000 + 60 µl de etanol	0,013
9	50 µl de vitamina C diluida 1/1000 + 50 µl de etanol	0,017
10	80 µl de vitamina C diluida 1/1000 + 20 µl de etanol	0,027

Tabla 6. Concentraciones y soluciones de la disolución de vitamina C.

Fuente: Scartezzini et al, 2006.

A las soluciones anteriores se añade 2.9 ml de la solución de DPPH previamente preparada. Se agita en la oscuridad por 30 minutos en un agitador.

Las soluciones se colocan en celdas desde la menor a mayor concentración, se lee en el espectrofotómetro a una absorbancia de 517 nm, la medición se realiza por triplicado en cada solución.

Se calcula para el extracto de *Oryctanthus spicatus* el porcentaje de inhibición y el IC 50, los cuales se compara con los del extracto de *Camellia sinensis* y con la disolución de Vitamina C.

Para calcular el % de inhibición se aplica la siguiente ecuación (Scartezzini et al, 2006):

$$\% \text{ de inhibición} = \left\{ \left[1 - \left(\frac{A_A}{A_B} \right) \right] \times 100 \right\}$$

Dónde:

$A_A = \text{absorbancia DPPH} + \text{la muestra}$

$A_B = \text{absorbancia DPPH}$

Para calcular el IC_{50} se debe elaborar un gráfico con la regresión logarítmica de la concentración de la muestra versus el porcentaje de inhibición del radical DPPH.

La actividad antioxidante se expresa en términos de la concentración de inhibición al 50 por ciento (IC_{50}), que es la concentración del extracto requerida para dar un 50 por ciento de disminución de la absorbancia de DPPH (Scartezzini *et al*, 2006).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención de la muestra vegetal de *O. spicatus*

Se colectó aproximadamente 1Kg de muestra vegetal.

4.1.1 Información de campo

Equipo de colección: Norma Guerrero, Wilson Tapia y Charim Guanka (guía)

Fecha de colección: 15 de Abril del 2012

Lugar de colección: Parroquia de Sevilla Don Bosco

País: Ecuador

Provincia: Morona Santiago

Localidad: San Miguel de Inimkis

Lugar: Bosque húmedo montano

Coordenadas:

Latitud: 02°16'0, 5" S

Longitud: 78°05'16" W

Altura: 1052 msnm

Hábitat: Parasitando árboles frutales como *Citrus sinensis*.

4.1.2 Información sobre la planta

Familia: Loranthaceae

Nombre Científico: *Oryctanthus spicatus*

Referencia: Dr. Marco Cerna

Nombre Común: Reciben diversos nombres en diversos lugares; en Inglaterra "mlstletoe", en Francia, "guy"; en Alemania, "mistel"; en Brasil "erva de passarinho" o "enxerto de passarinho"; en Venezuela, la "tiña", "guate", "pajarito"; en Chile "ouintral

de quisco" o "ouintral de boldo"; en Nicaragua, "liga", "matapalo", "moquillo"; en Colombia y Honduras "pajarito", "matapalo", "muérdago", "suelta - suelta" y en el Salvador y Guatemala "matapalo" y "muérdago" (Sánchez y Barrera, 1990). En Ecuador pajarito (guía de la colección).

Usos: Antimalárico (IIAP, 2011), para fracturas, torceduras de coyunturas (Ríos, 2006).

Descripción del uso: Infusión, emplastos, baños.

Parte utilizada: La planta entera, especialmente las hojas.

Referencia: Ríos, M., 2006.

4.2 Identificación taxonómica

La identificación taxonómica fue realizada por trabajadores del Herbario Nacional de Quito en colaboración con el doctor en Biología Marco Cerna C., quien emitió el certificado taxonómico correspondiente a la especie *Oryctanthus spicatus* (Jacquin) Eichlesr. (Ver Anexo 3). El Boucher se ingresó al Herbario de la Universidad Politécnica Salesiana (Ver Anexo 4).

4.3 Selección, estabilización y conservación de la muestra vegetal

Luego de la limpieza, selección, desinfección, secado y triturado de la muestra vegetal se conservó en una funda plástica bien cerrada y etiquetada tomando mucho cuidado de que siempre esté protegida de la luz y la humedad.

4.4 Obtención de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso

4.4.1 Extracto etéreo

Nombre de la especie botánica: *Oryctanthus spicatus*

Órgano ensayado: Hojas

Peso del material vegetal seco: 200 g

Volumen de éter etílico: 800 ml
Tiempo de maceración: 48 horas
Fecha de la realización del ensayo: 10/12/2012
Peso del residuo seco: 172 g
Rendimiento: 14 %

4.4.2 Extracto metanólico

Nombre de la especie botánica: *Oryctanthus spicatus*
Órgano ensayado: Hojas
Peso del material vegetal seco: 172 g
Volumen de metanol: 688 ml
Tiempo de maceración: 48 horas
Fecha de la realización del ensayo: 12/12/2012
Peso del residuo seco: 158 g
Rendimiento: 8.1 %

4.4.3 Extracto acuoso

Nombre de la especie botánica: *Oryctanthus spicatus*
Órgano ensayado: Hojas
Peso del material vegetal seco: 158 g
Volumen de agua destilada: 640 ml
Tiempo de maceración: 48 horas
Fecha de la realización del ensayo: 14/12/2012
Peso del residuo seco: 116 g
Rendimiento: 26.6 %

4.5 Screening fitoquímico

METABOLITO ENSAYADO	ENSAYO	TIPO DE EXTRACTO		
		ETÉREO	ALCOHOLICO	ACUOSO
Aceites y grasas	Sudan	+		
Alcaloides	Dragendorff	+	++	+
	Mayer	-	+++	+++
	Wagner	+++	+++	+++
Lactonas, en particular Coumarinas	Baljet	-	-	-
Triterpenos y/o esteroides	Liebermann-Burchard	+	+	
Catequinas		+		
Resinas		-		
Azúcares reductores	Fehling		+	+
Saponinas	Espuma		+	+
Compuestos fenólicos y/o taninos			+	+
Aminas, en particular aminoácidos libres	Ninhidrina		-	
Quinonas	Borntrager		+++	
Flavonoides	Shinoda		+	+
Glicósidos cardiotónicos	Kedde		-	
Antocianidinas			-	
Mucílagos				-
Principios amargos				+

Tabla 7. Screening fitoquímico del extracto etéreo, metanólico y acuoso de *O. spicatus*

Abundante (+++), *Moderado* (++) , *Leve* (+), *Nulo* (-).

Elaborado por: Norma Guerrero.

4.6 Valoración de fenoles totales

Estándar de referencia: Ácido Gálico

Extracto alcohólico

Absorbancia de la muestra (Am)	Absorbancia estándar (ASr)	Peso estándar (mg) (WSr)	Peso de la droga (g) (Wm)	Concentración de compuestos fenólicos ($\frac{mg \text{ de fenoles}}{g \text{ de muestra}}$) (Cm)
0,218±0,012	0,102	25,100	1,020	262,97 mg en 1,00g

Tabla 8. Determinación de fenoles totales en extracto alcohólico de *O. spicatus*.

Elaborado por: Norma Guerrero.

$$Cm = \frac{Am \times WSr \times Fd}{ASr \times Wm}$$

$$Cm = \frac{0,218 \times 25,100 \times 5,000}{0,102 \times 1,020}$$

$$Cm = 262,97 \frac{mg \text{ de fenoles}}{g \text{ de muestra}}$$

Extracto acuoso

Absorbancia de la muestra (Am)	Absorbancia de la solución de referencia (ASr)	Peso de la sustancia de referencia (mg) (WSr)	Peso de la droga (g) (Wm)	Concentración de compuestos fenólicos ($\frac{mg \text{ de fenoles}}{g \text{ de muestra}}$) (Cm)
0,204±0,004	0,102	25,100	1,000	251,00 mg en 1,00 g

Tabla 9. Determinación de fenoles totales en extracto acuoso de *O. spicatus*.

Elaborado por: Norma Guerrero.

$$Cm = \frac{0,204 \times 25,100 \times 5,000}{0,102 \times 1,000}$$

$$C_m = 251,00 \frac{\text{mg de fenoles}}{\text{g de muestra}}$$

4.7 Perfil cromatográfico de las fracciones obtenidas de *O. spicatus*

4.7.1 Fracción B (Alcaloides)

pH fracción B: 8,3

Identificación

Prueba de Dragendorff: ++

Mayer: +++

Wagner: +++

Perfil cromatográfico

- Extracto etanólico fracción B

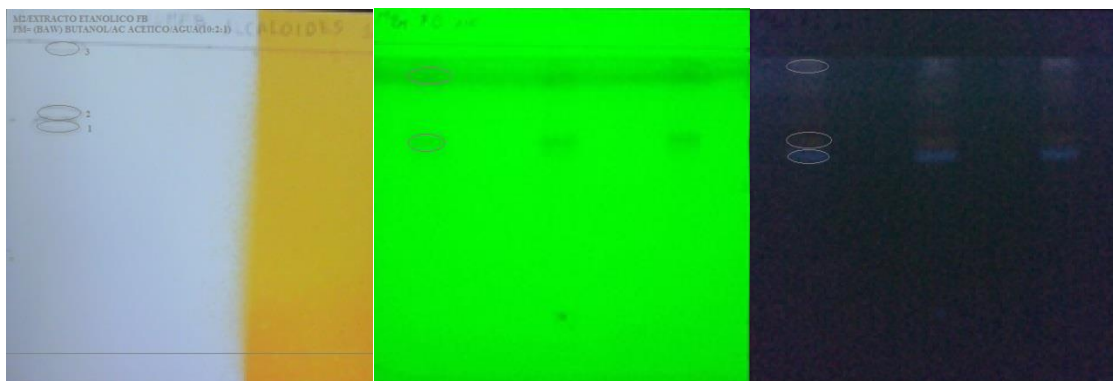


Figura 26. Perfil cromatográfico de la fracción B (Alcaloides) en *O. spicatus* en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.

Elaborado por: Norma Guerrero.

Frentes de referencia del positivo

$$Fr1 = \frac{5,6}{8} = 0,7$$

$$Fr2 = \frac{5,9}{8} = 0,74$$

$$Fr3 = \frac{7,9}{8} = 0,99$$

La figura 26 muestra la forma en que se detectó la presencia de alcaloides en la fracción B usando el reactivo de Dragendorff como revelador cuya aplicación produce manchas

de color naranja (Lock 1994), determinándose tres Rf correspondientes a los positivos. A 366 nm se pudo observar varias manchas fluorescentes, que a excepción de la mancha naranja las demás no necesariamente corresponden a alcaloides sino a complejos que se forman con otros metabolitos secundarios (Miño, 2007).

4.7.2 Fracción C (Triterpenos y esteroides)

Identificación

- Extracto etanólico

Prueba de Lieberman-Buchard: +

- Extracto hidroalcohólico al 70%

Prueba de Lieberman-Buchard: +++ (Ver anexo 5)

Según la reacción de Liebermann-Burchard las estructuras presentes en el extracto alcohólico son estructuras esteroidales ya que se produjo cambio de color a azul verdoso en los ensayos (Miranda, 2000).

Perfil cromatográfico

- Extracto Etanólico FC 2 siembras / Extracto Hidroalcohólico FC 2 siembras

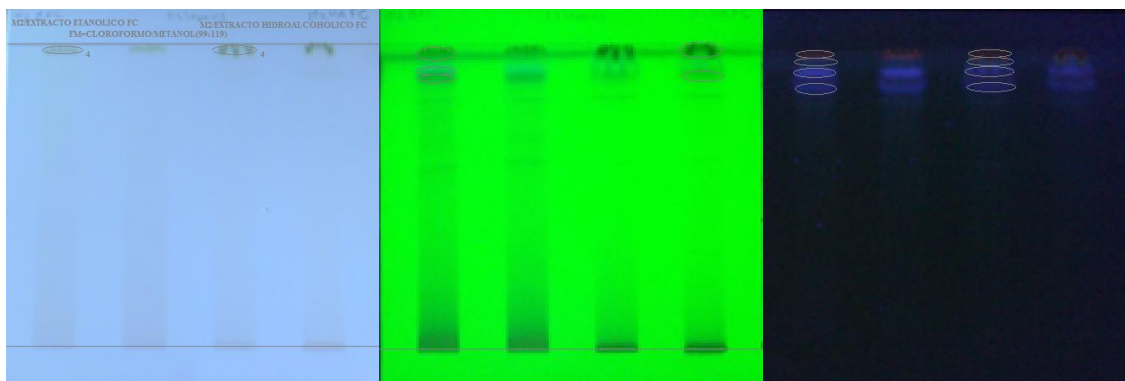


Figura 27. Perfil cromatográfico de la fracción C en *O. spicatus* en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.

Elaborado por: Norma Guerrero.

Frentes de referencia del positivo

$$\text{Fr1} = \frac{6,9}{8} = 0,86$$

$$\text{Fr2} = \frac{7,1}{8} = 0,89$$

$$\text{Fr3} = \frac{7,4}{8} = 0,93$$

$$\text{Fr4} = \frac{7,8}{8} = 0,98$$

En la figura 27 a 366 nm se puede observar manchas fluorescentes de color celeste, morado, amarillo y naranja que confirman la presencia de los esteroides con los Rf correspondientes a los positivos (Miño, 2007).

4.7.3 Fracción D (Quinonas)

Identificación

- Extracto etanólico

Prueba de Borntrager: +++++

- Extracto hidroalcohólico al 70%

Prueba de Borntrager: +++ (Ver anexo 5)

Perfil cromatográfico de antraquinonas: Extracto Etanólico FD 2 siembras / Extracto Hidroalcohólico FD2 siembras

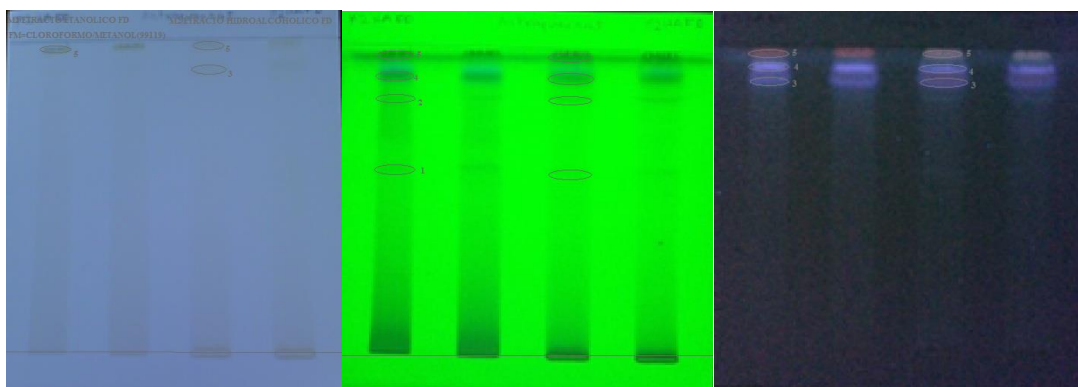


Figura 28. Perfil cromatográfico de la fracción D alcohólica e hidroalcohólica de *O. spicatus* en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.

Elaborado por: Norma Guerrero.

Frentes de referencia del positivo

$$Fr1 = \frac{5}{8} = 0,63$$

$$Fr2 = \frac{6,7}{8} = 0,84$$

$$Fr3 = \frac{7,2}{8} = 0,9$$

$$Fr4 = \frac{7,4}{8} = 0,93$$

$$Fr5 = \frac{7,9}{8} = 0,99$$

En la figura 28 a longitud de onda 366 nm se observa manchas fluorescentes de color amarillo, morado, celeste que confirma la presencia de este metabolito (Miño, 2007).

- Perfil cromatográfico de naftoquinonas: Extracto Hidroalcohólico FD

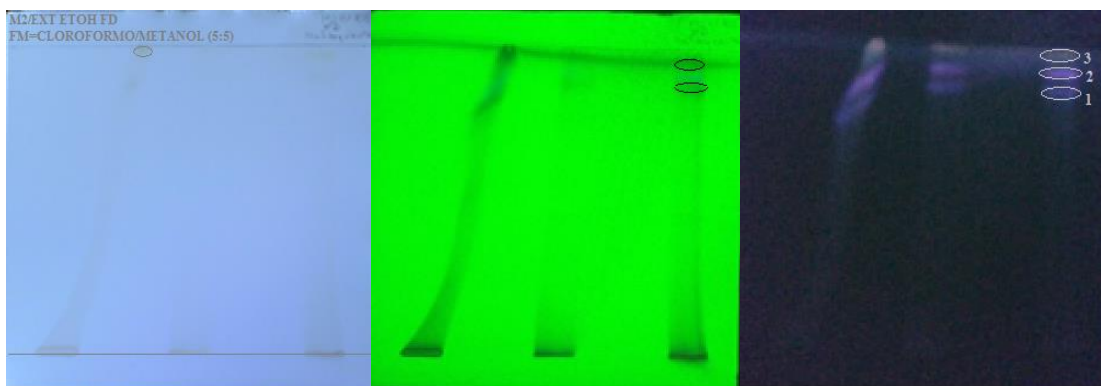


Figura 29. Perfil cromatográfico de la fracción D hidroalcohólica (Naftoquinonas) de *O. spicatus* en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.

Elaborado por: Norma Guerrero.

Frentes de referencia del positivo

$$Fr1 = \frac{6,9}{8,1} = 0,85$$

$$Fr2 = \frac{7,2}{8,1} = 0,88$$

$$Fr3 = \frac{7,4}{8,1} = 0,91$$

En la figura 29 en el Extracto Hidroalcohólico FD a longitud de onda 366 nm se observa manchas fluorescentes de color amarillo y morado que confirma la presencia de este metabolito (Miño, 2007).

Perfil cromatográfico luego del revelador.

Además de la presencia de manchas fluorescentes en la siguiente figura a 366 nm se pudo comprobar la existencia de quinonas por el cambio de color de las manchas al

añadir el revelador (Hidróxido de Potasio (KOH) al 10% en metanol) de amarillo, morado y celeste a rojo y verde.

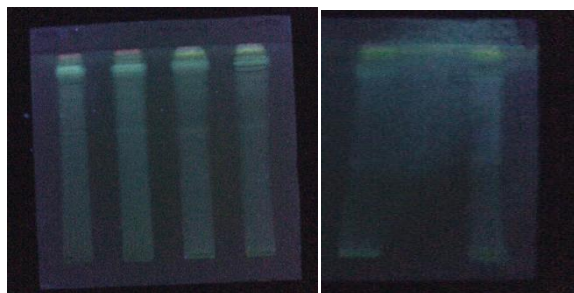


Figura 30. Perfil cromatográfico del revelado de Antraquinonas (izquierda) y Naftoquinonas (derecha) de *O. spicatus* en luz UV 366 nm.

Elaborado por: Norma Guerrero.

4.7.4 Fracción D (Flavonoides)

Identificación

- Extracto etanólico

Prueba de Shinoda: ++

Prueba con Cloruro férrico: + (Ver anexo 5)

- Extracto hidroalcohólico al 70% fracción D

Prueba de Shinoda: +++ (Ver anexo 5)

Prueba con Cloruro férrico: +

Perfil cromatográfico de flavonoides aglicosídicos

- Extracto Etanólico en éter

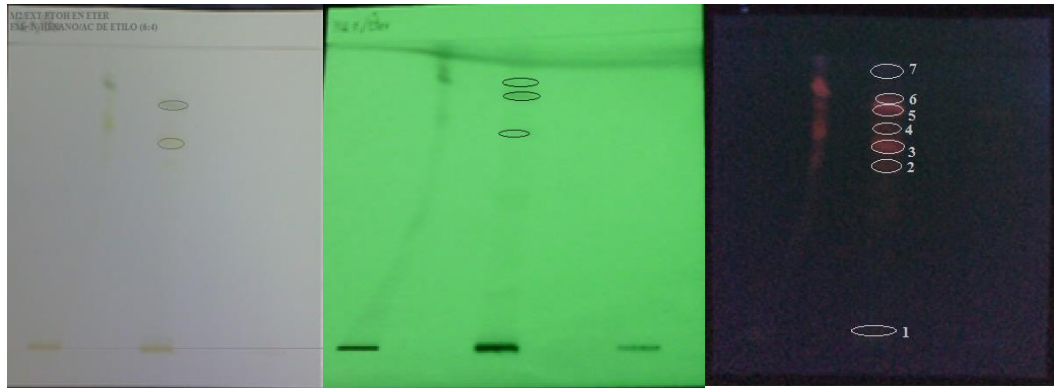


Figura 31. Perfil cromatográfico de flavonoides aglicosídicos en éter de *O. spicatus* en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.

Elaborado por: Norma Guerrero.

Frentes de referencia del positivo

$$\text{Fr1} = \frac{3}{8} = 0,375$$

$$\text{Fr2} = \frac{4,9}{8} = 0,61$$

$$\text{Fr3} = \frac{5,5}{8} = 0,69$$

$$\text{Fr4} = \frac{6}{8} = 0,75$$

$$\text{Fr5} = \frac{6,5}{8} = 0,81$$

$$\text{Fr6} = \frac{7,4}{8} = 0,93$$

$$\text{Fr7} = \frac{7,7}{8} = 0,96$$

- Extracto Hidroalcohólico al 70% FD en éter

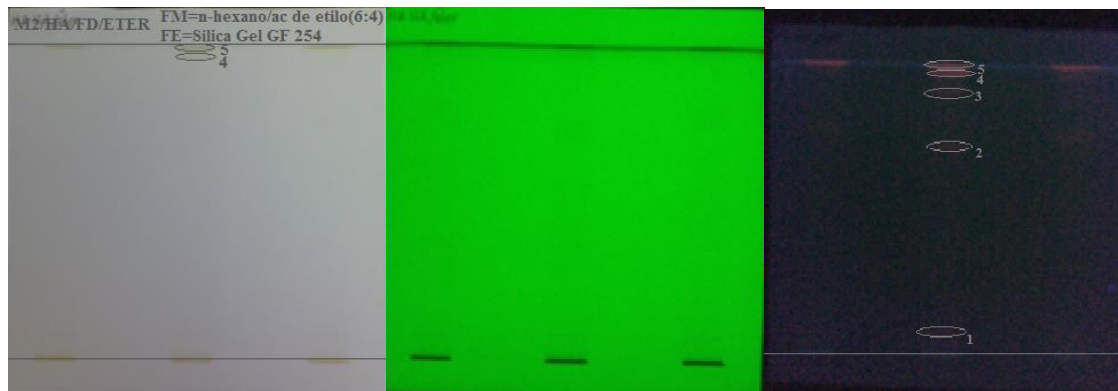


Figura 32. Perfil cromatográfico de flavonoides aglicosídicos en éter de *O. spicatus* en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.

Elaborado por: Norma Guerrero.

Frentes de referencia del positivo

$$\text{Fr1} = \frac{0,7}{8,2} = 0,085$$

$$\text{Fr2} = \frac{5,3}{8,2} = 0,65$$

$$\text{Fr3} = \frac{7,4}{8,2} = 0,90$$

$$\text{Fr4} = \frac{7,9}{8,2} = 0,96$$

$$\text{Fr5} = \frac{8,1}{8,2} = 0,98$$

- Extracto Etanólico en ácido acético



Figura 33. Perfil cromatográfico de flavonoides aglicosídicos en ácido acético de *O. spicatus* en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.

Elaborado por: Norma Guerrero.

Frentes de referencia del positivo

$$\text{Fr1} = \frac{6,8}{8} = 0,85$$

$$\text{Fr2} = \frac{7,2}{8} = 0,9$$

$$\text{Fr3} = \frac{7,5}{8} = 0,94$$

$$\text{Fr4} = \frac{7,7}{8} = 0,96$$

$$\text{Fr5} = \frac{7,9}{8} = 0,99$$

- Extracto Hidroalcohólico al 70% FD en ácido acético

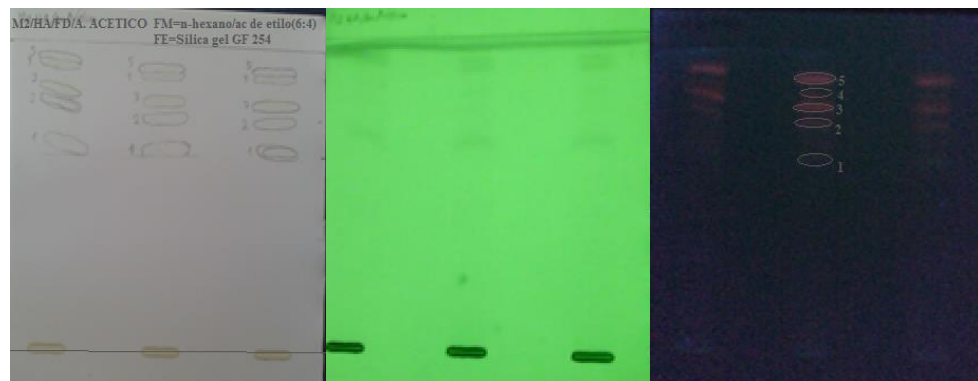


Figura 34. Perfil cromatográfico de flavonoides aglicosídicos en ácido acético de *O. spicatus* en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.

Elaborado por: Norma Guerrero.

Frentes de referencia del positivo

$$\text{Fr1} = \frac{5,1}{8} = 0,64$$

$$\text{Fr2} = \frac{6}{8} = 0,75$$

$$\text{Fr3} = \frac{6,5}{8} = 0,81$$

$$\text{Fr4} = \frac{7,1}{8} = 0,89$$

$$\text{Fr5} = \frac{7,3}{8} = 0,91$$

- Extracto Etanólico en acetato de etilo

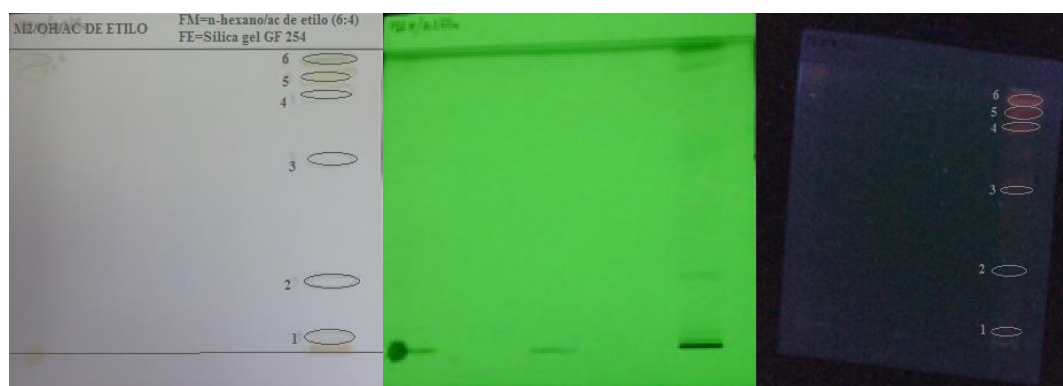


Figura 35. Perfil cromatográfico de flavonoides aglicosídicos en acetato de etilo de *O. spicatus* en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.

Elaborado por: Norma Guerrero.

Frentes de referencia del positivo

$$\text{Fr1} = \frac{0,4}{7,9} = 0,05$$

$$\text{Fr2} = \frac{1,8}{7,9} = 0,23$$

$$\text{Fr3} = \frac{5}{7,9} = 0,63$$

$$\text{Fr4} = \frac{6,7}{7,9} = 0,85$$

$$\text{Fr5} = \frac{7,2}{7,9} = 0,91$$

$$\text{Fr6} = \frac{7,6}{7,9} = 0,96$$

- Extracto Hidroalcohólico al 70% FD en acetato de etilo

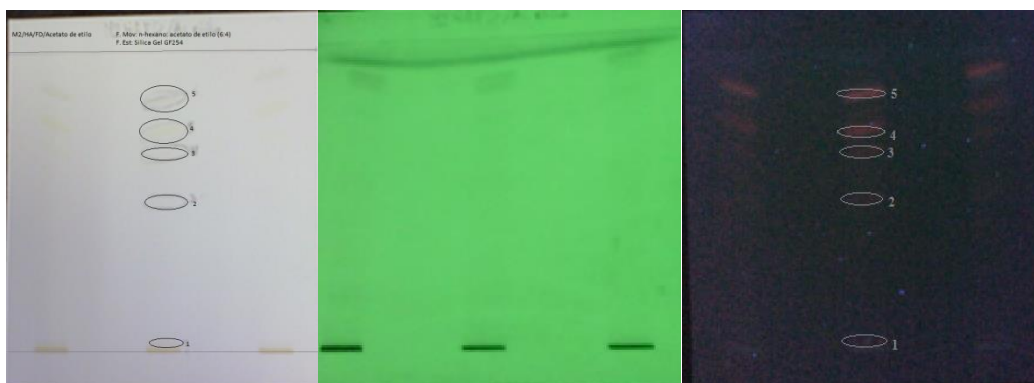


Figura 36. Perfil cromatográfico de flavonoides aglicosídicos en acetato de etilo de *O. spicatus* en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.

Elaborado por: Norma Guerrero.

Frentes de referencia del positivo

$$Fr1 = \frac{0,2}{8} = 0,025$$

$$Fr2 = \frac{4}{8} = 0,5$$

$$Fr3 = \frac{5,3}{8} = 0,66$$

$$Fr4 = \frac{5,8}{8} = 0,73$$

$$Fr5 = \frac{6,2}{8} = 0,78$$

- Extracto Etanólico en butanol

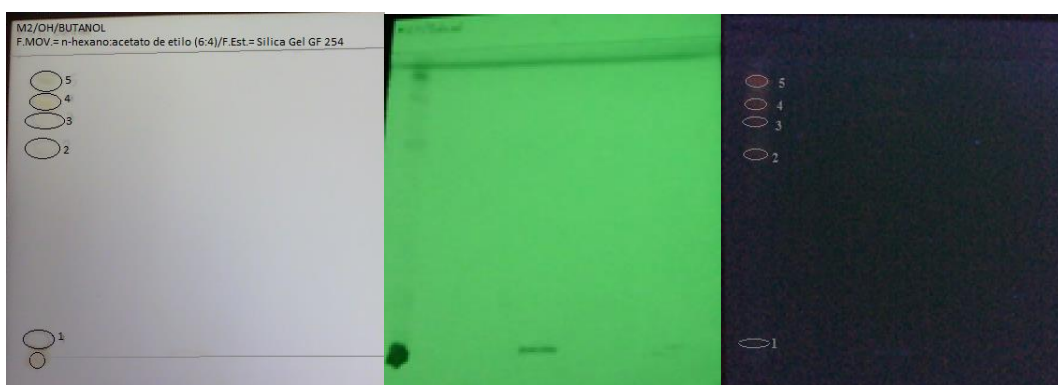


Figura 37. Perfil cromatográfico de flavonoides aglicosídicos en butanol de *O. spicatus* en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.

Elaborado por: Norma Guerrero.

Frentes de referencia del positivo

$$Fr1 = \frac{0,5}{8,1} = 0,06$$

$$Fr2 = \frac{5,6}{8,1} = 0,69$$

$$Fr3 = \frac{6,4}{8,1} = 0,79$$

$$\text{Fr4} = \frac{6,7}{8,1} = 0,83$$

$$\text{Fr5} = \frac{7,4}{8,1} = 0,91$$

- Extracto Hidroalcohólico al 70% FD en butanol

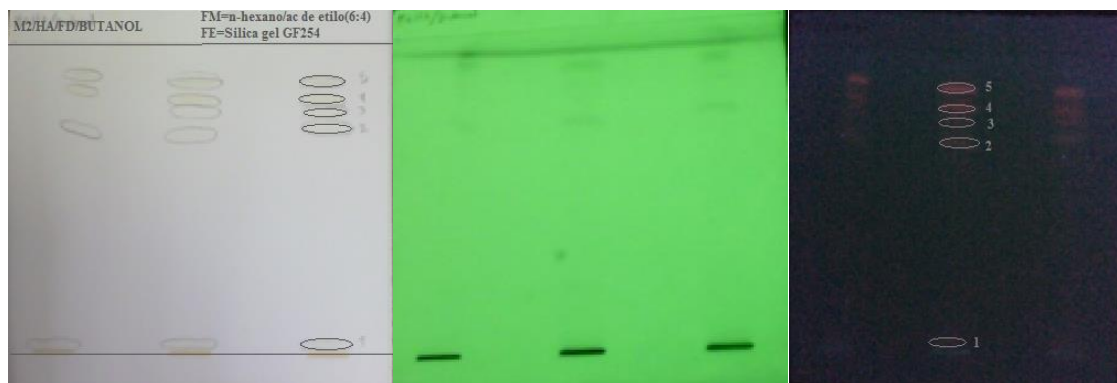


Figura 38. Perfil cromatográfico de flavonoides aglicosídicos en butanol de *O. spicatus* en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.

Elaborado por: Norma Guerrero.

Frentes de referencia del positivo

$$\text{Fr1} = \frac{0,3}{8} = 0,04$$

$$\text{Fr2} = \frac{5,9}{8} = 0,74$$

$$\text{Fr3} = \frac{6,3}{8} = 0,79$$

$$\text{Fr4} = \frac{6,6}{8} = 0,83$$

$$\text{Fr5} = \frac{7}{8} = 0,88$$

En todas las figuras anteriores de flavonoides aglicosídicos a longitud de onda 366 nm se observan manchas fluorescentes de colores que comprenden desde el amarillo tenue hasta el rojo por lo que se comprobó en la cromatografía en capa fina la presencia de este metabolito secundario (Martínez, 2005).

Perfil cromatográfico de flavonoides glicosídicos

- Extracto Etanólico en éter, ácido acético, acetato de etilo, butanol

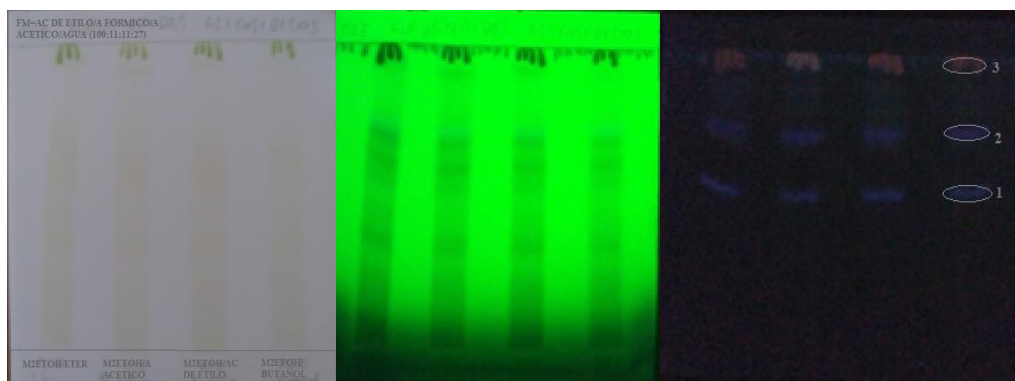


Figura 39. Perfil cromatográfico de flavonoides glicosídicos en éter, ácido acético, acetato de etilo, butanol de *O. spicatus* en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.

Elaborado por: Norma Guerrero.

Frentes de referencia del positivo

$$Fr1 = \frac{4,2}{8,2} = 0,51$$

$$Fr2 = \frac{5,7}{8,2} = 0,70$$

$$Fr3 = \frac{7,5}{8,2} = 0,91$$

- Extracto Hidroalcohólico FD en éter, ácido acético, acetato de etilo, butanol

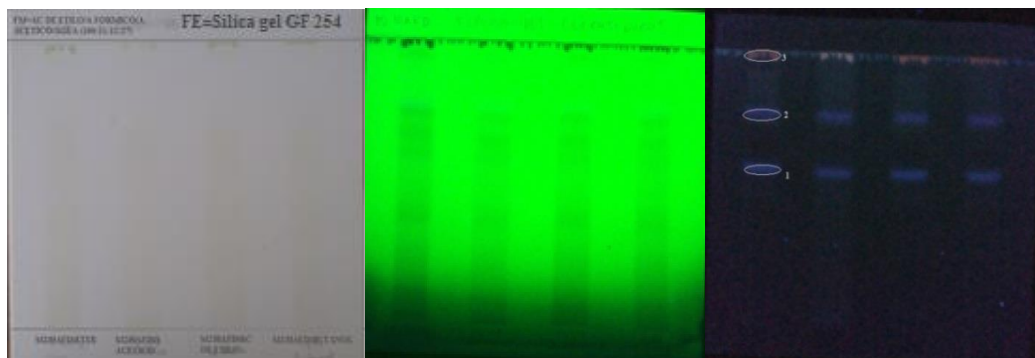


Figura 40. Perfil cromatográfico de flavonoides glicosídicos en éter, ácido acético, acetato de etilo, butanol de *O. spicatus* en luz normal, UV 254 nm y UV 366 nm.

Elaborado por: Norma Guerrero.

Frentes de referencia del positivo

$$Fr1 = \frac{4,2}{8,2} = 0,51$$

$$Fr2 = \frac{5,7}{8,2} = 0,70$$

$$Fr3 = \frac{7,5}{8,2} = 0,91$$

En las ilustraciones 39 y 40 de flavonoides glicosídicos a longitud de onda 366 nm se observan manchas fluorescentes de colores amarillo tenue, naranja y morado lo que comprueba la presencia de este metabolito secundario (Miño, 2007).

4.8 Actividad antibacteriana y antimicótica

4.8.1 Antibiograma por el método de difusión en agar Kirby-Bauer

En el antibiograma la sensibilidad bacteriana a los extractos de *O. spicatus* se determinó mediante los tamaños de los halos de inhibición que según Alonso (2006) se considera con actividad antibacteriana positiva o sensible (S) si el halo fue mayor a 9 mm; si el halo se encontró entre 6 – 9 mm la actividad antibacteriana se considera intermedia o moderada (I) y si el halo fue menor a 6 mm se considera actividad bacteriana negativa o resistente (R). En las tablas mostradas a continuación el signo (-) significa ausencia de halo visible equivalente al diámetro del sensidisco (6 mm).

4.8.1.1 *Pseudomona aeruginosa*

BACTERIA	#R	BL. N (mm)	BL. P (mm)	HALOS (mm) EXTRACTO <i>O. spicatus</i>										
				ETEREO			ALCOHOLICO			ACUOSO				
				C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3		
<i>Pseudomona aeruginosa</i> ATCC 27853	1	-	16,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,1	
	2	-	15,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,0	
	3	-	16,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,8	
	4	-	16,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,0	
	5	-	16,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,0	
	MEDIA	-	16,34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,6
	ACT.	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I

Tabla 10. Halos de inhibición de los extractos de *O. spicatus* frente a *aeruginosa*.

Repeticiones (#R), Actividad (ACT), Blanco negativo (BL. N=DMSO), Blanco positivo (BL.

P=GENTAMICINA 10 µg), Concentración 1 (200000 µg/ml), 2 (100000 µg/ml) y 3 (400000 µg/ml)

Elaborado por: Norma Guerrero.

Análisis estadístico

Prueba de Kruskal-Wallis

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV		
Variable	Mean Rank	Sample Size
AQC1	20.5	5
AQC2	20.5	5
AQC3	43.0	5
ETC1	20.5	5
ETC2	20.5	5
ETC3	20.5	5
OHC1	20.5	5
OHC2	20.5	5
OHC3	20.5	5
Total	23.0	45

Kruskal-Wallis Statistic	43.8150
P-Value, Using Chi-Squared Approximation	0.0000

Tabla 11. Kruskal-Wallis para *aeruginosa*; elaborado mediante Statistix.

Elaborado por: Norma Guerrero.

La variable extracto y concentración presenta un P menor (0,00) al nivel de significancia α : 0.05 por lo que se acepta la hipótesis alternativa: El valor de la mediana de al menos uno de los grupos de datos presenta inhibición diferente a la de los otros grupos.

Test a posteriori

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test		
Variable	Mean	Homogeneous Groups
AQC3	43.000	A
AQC1	20.500	A
AQC2	20.500	A
ETC1	20.500	A
ETC2	20.500	A
ETC3	20.500	A
OHC1	20.500	A
OHC2	20.500	A
OHC3	20.500	A

Tabla 12. Test de comparación mediante Kruskal-Wallis para *aeruginosa*; elaborado mediante Statistix.

Elaborado por: Norma Guerrero.

En el test a posteriori se puede observar que *aeruginosa* presenta sensibilidad intermedia o moderada únicamente frente al extracto acuoso de *O. spicatus* a 400.000 µg/ml.

4.8.1.2 *Bacillus spizizenii*

BACTERIA	#R	BL. N (mm)	BL. P (mm)	HALOS (mm) EXTRACTO <i>O. spicatus</i>								
				ETEREO			ALCOHOLICO			ACUOSO		
				C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
<i>Bacillus spizizenii</i> ATCC 6633	1	-	20.8	-	-	-	8.2	7.3	9.9	-	-	-
	2	-	20.4	-	-	-	8.2	7,1	10.3	-	-	-
	3	-	21.5	-	-	-	8.6	7.5	10.2	-	-	-
	4	-	22.5	-	-	-	8.5	7.4	10.0	-	-	-
	5	-	22	-	-	-	8.4	7.2	10.1	-	-	-
	MEDI A	-	21.44	-	-	-	8.4	7.3	10.1	-	-	-
ACT.	-	S	-	-	-	I	I	S	-	-	-	

Tabla 13. Halos de inhibición de los extractos de *O. spicatus* frente a *B. spizizenii*.

Repeticiones (#R), Actividad (ACT), Blanco negativo (BL. N=DMSO), Blanco positivo (BL. P=GENTAMICINA 10 µg),

Concentración 1 (200000 µg/ml), 2 (100000 µg/ml) y 3 (400000 µg/ml)

Elaborado por: Norma Guerrero.

Análisis estadístico

Prueba de Kruskal-Wallis

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV

Variable	Mean Rank	Sample Size
AQC1	15.5	5
AQC2	15.5	5
AQC3	15.5	5
ETC1	15.5	5
ETC2	15.5	5
ETC3	15.5	5
OHC1	38.0	5
OHC2	33.0	5
OHC3	43.0	5
Total	23.0	45

Kruskal-Wallis Statistic	43.7570
P-Value, Using Chi-Squared Approximation	0.0000

Tabla 14. Kruskal-Wallis para *B. spizizenii*; elaborado mediante Statistix.

Elaborado por: Norma Guerrero.

La variable extracto y concentración presenta un P menor (0,00) al nivel de significancia α : 0.05 por lo que se acepta la hipótesis alternativa: El valor de la mediana de al menos uno de los grupos de datos presenta inhibición diferente a la de los otros grupos.

Test a posteriori

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
OHC3	43.000	A
OHC1	38.000	AB
OHC2	33.000	AB
AQC1	15.500	B
AQC2	15.500	B
AQC3	15.500	B
ETC1	15.500	B
ETC2	15.500	B
ETC3	15.500	B

Tabla 15. Test de comparación mediante Kruskal-Wallis para *B. spizizenii*; elaborado mediante Statistix.

Elaborado por: Norma Guerrero.

En el test a posteriori se puede observar que *B. spizizenii* presenta alta sensibilidad frente al extracto alcohólico a 400000 µg/ml y sensibilidad intermedia o moderada desde 100000 µg/ml. Mientras que es resistente al extracto acuoso y etéreo en todas las concentraciones.

4.8.1.3 *Escherichia coli*

BACTERIA	#R	BL. N (mm)	BL. P (mm)	HALOS (mm) EXTRACTO <i>O. spicatus</i>									
				ETEREO			ALCOHOLICO			ACUOSO			
				C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	1	-	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	15,8	
	2	-	16	-	-	-	-	-	-	-	-	15,0	
	3	-	15,1	-	-	-	-	-	-	-	-	15,3	
	4	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	15,3	
	5	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	15,5	
	MEDIA	-	14,72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15,4
	ACT.	-	S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S

Tabla 16. Halos de inhibición de los extractos de *O. spicatus* frente a *E. coli*.

Repeticiones (#R), Actividad (ACT), Blanco negativo (BL. N=DMSO), Blanco positivo (BL. P=GENTAMICINA 10 µg), C1 (200000 µg/ml), C2 (100000 µg/ml) y C3 (400000 µg/ml)

Elaborado por: Norma Guerrero.

Análisis estadístico

Prueba de Kruskal-Wallis

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV

Variable	Mean Rank	Sample Size
AQC1	20.5	5
AQC2	20.5	5
AQC3	43.0	5
ETC1	20.5	5
ETC2	20.5	5
ETC3	20.5	5
OHC1	20.5	5
OHC2	20.5	5
OHC3	20.5	5
Total	23.0	45

Kruskal-Wallis Statistic	43.8150
P-Value, Using Chi-Squared Approximation	0.0000

Tabla 17. Kruskal-Wallis para *E. coli*; elaborado mediante Statistix.

Elaborado por: Norma Guerrero.

La variable extracto y concentración presenta un P menor (0,00) al nivel de significancia α : 0.05 por lo que se acepta la hipótesis alternativa: El valor de la mediana de al menos uno de los grupos de datos presenta inhibición diferente a la de los otros grupos.

Test a posteriori

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
AQC3	43.000	A
AQC1	20.500	A
AQC2	20.500	A
ETC1	20.500	A
ETC2	20.500	A
ETC3	20.500	A
OHC1	20.500	A
OHC2	20.500	A
OHC3	20.500	A

Tabla 18. Test de comparación mediante Kruskal-Wallis para *E. coli*; elaborado mediante Statistix.

Elaborado por: Norma Guerrero.

En el test a posteriori se puede observar que *E. coli* presenta sensibilidad únicamente frente al extracto acuoso de *O. spicatus* a 400000 µg/ml.

4.8.1.4 *Staphylococcus aureus*

BACTERIA	#R	BL. N (mm)	BL. P (mm)	HALOS (mm) EXTRACTO <i>O. spicatus</i>								
				ETEREO			ALCOHOLICO			ACUOSO		
				C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1	-	29,7	8,4	-	9,5	8	6,8	20,0	-	-	10,0
	2	-	27,9	6,8	-	8,2	8,4	7,1	19,5	-	-	10,7
	3	-	26,6	9,7	-	7,8	8,3	7,4	19	-	-	10,6
	4	-	26,6	8,0	-	9,0	8,1	7,1	19,3	-	-	10,8
	5	-	26,6	8,0	-	8,7	8,0	7,0	19,5	-	-	10,0
	ME DIA	-	27,5	8,2	-	8,6	8,2	7,1	19,5	-	-	10,4
	AC T.	-	S	I	-	I	I	I	S	-	-	S

Tabla 19. Halos de inhibición de los extractos de *O. spicatus* frente a *S. aureus*. (Ver anexo 6)

Repeticiones (#R), Actividad (ACT), Blanco negativo (BL. N=DMSO), Blanco positivo (BL. P=GENTAMICINA 10 µg),

Concentración 1 (200000 µg/ml), 2 (100000 µg/ml) y 3 (400000 µg/ml)

Elaborado por: Norma Guerrero.

Análisis estadístico

Prueba de Kruskal-Wallis

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV

Variable	Mean Rank	Sample Size
AQC1	8.0	5
AQC2	8.0	5
AQC3	38.0	5
ETC1	26.8	5
ETC2	8.0	5
ETC3	27.3	5
OHC1	28.3	5
OHC2	19.6	5
OHC3	43.0	5
Total	23.0	45

Kruskal-Wallis Statistic	41.4279
P-Value, Using Chi-Squared Approximation	0.0000

Tabla 20. Kruskal-Wallis para *S. aureus*; elaborado mediante Statistix.

Elaborado por: Norma Guerrero.

La variable extracto y concentración presenta un P menor (0,00) al nivel de significancia $\alpha: 0.05$ por lo que se acepta la hipótesis alternativa: El valor de la mediana de al menos uno de los grupos de datos presenta inhibición diferente a la de los otros grupos.

Test a posteriori

Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test

Variable	Mean	Homogeneous Groups
OHC3	43.000	A
AQC3	38.000	A
OHC1	28.300	AB
ETC3	27.300	AB
ETC1	26.800	AB
OHC2	19.600	AB
AQC1	8.0000	B
AQC2	8.0000	B
ETC2	8.0000	B

Tabla 21. Test de comparación mediante Kruskal-Wallis para *S. aureus*; elaborado mediante Statistix.

Elaborado por: Norma Guerrero.

En el test a posteriori se puede observar que *S. aureus* presenta alta sensibilidad frente al extracto alcohólico y al extracto acuoso a 400000 µg/ml. Mientras que presenta sensibilidad intermedia o moderada frente al extracto alcohólico desde 100000 µg/ml y frente al extracto etéreo desde 200000 µg/ml. Finalmente es resistente al extracto acuoso a 100000 µg/ml y 200000 µg/ml y al extracto etéreo a 100000 µg/ml.

4.8.1.5 *Candida albicans*

LEVADURA	#R	BL. N (mm)	BL. P (mm)	HALOS (mm) EXTRACTO <i>O. spicatus</i>								
				ETEREO			ALCOHOLICO			ACUOSO		
				C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MEDIA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 22. Halos de inhibición de los extractos de *O. spicatus* frente a *C. albicans*.

Repeticiones (#R), Actividad (ACT), Blanco negativo (BL. N=DMSO), Blanco positivo (BL. P=FLUCONAZOL 25 µg),
Concentración 1 (200000 µg/ml), 2 (100000 µg/ml) y 3 (400000 µg/ml)

Elaborado por: Norma Guerrero.

Para *C. albicans* en la tabla 22 se puede observar que es resistente a todos los tratamientos probados. El extracto etéreo, alcohólico y acuoso de *O. spicatus* en ninguna de las concentraciones tiene actividad antifúngica.

4.8.2 Determinación de concentración mínima inhibitoria (MIC) por el método de dilución en caldo.

Se determinó la MIC con las bacterias que presentaron sensibilidad ante los extractos de *O. spicatus* en los ensayos de antibiograma por el método de difusión en agar (Kirby-Bauer).

Sensibles (S)

- ✓ *E. coli*, frente al extracto acuoso.
- ✓ *S. aureus* frente al extracto etéreo.
- ✓ *B. spizizenii* frente al extracto alcohólico.

Sensibilidad intermedia (I)

- ✓ *aeruginosa* frente al extracto acuoso.
- ✓ *S. aureus* frente al extracto acuoso y alcohólico.

4.8.2.1 MIC en *Escherichia coli*

Para la dilución doble seriada partimos de la C3 = 400000 µg/ml del extracto acuoso que evidencio un halo de 15.4 mm.

EXTRACTO ACUOSO	ESPECIE
Concentración 3 (µg/ml)	<i>E. coli</i>
100000	Ausencia
50000	Ausencia
25000	Ausencia
12500	Ausencia
6250	Ausencia
3125	Ausencia
1562,5	Ausencia
781,25	Ausencia
390,625	Ausencia
195,3125	Ausencia

Tabla 23. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) por µg de extracto acuoso de *O. spicatus* sobre *E. coli*. (Ver Anexo 7)

Elaborado por: Norma Guerrero.

Como se puede observar en la tabla 23, todas las concentraciones ensayadas tienen ausencia total de crecimiento bacteriano de *E. coli* lo que probablemente representa que la MIC está por debajo de 195,3125 µg/ml y que la bacteria es totalmente sensible al extracto acuoso de *O. spicatus* aunque es destacable que en la prueba de sensibilidad no generó halos de inhibición para C1 y C2.

4.8.2.2 MIC en *Staphylococcus aureus*

Para la dilución doble seriada partimos de la C3 = 400000 µg/ml para los tres extractos; el acuoso evidenció un halo de 8.6 mm, el alcohólico un halo de 19.5 mm, y el extracto etéreo un halo de 10.4 mm.

EXTRACTO ACUOSO	ESPECIE	EXTRACTO ALCOHOLICO	ESPECIE	EXTRACTO ETEREO	ESPECIE
Concentración 3 (µg/ml)	<i>S. aureus</i>	Concentración 3 (µg/ml)	<i>S. aureus</i>	Concentración 3 (µg/ml)	<i>S. aureus</i>
100000	Crecimiento	100000	Crecimiento	100000	Crecimiento
50000	Crecimiento	50000	Crecimiento	50000	Crecimiento
25000	Crecimiento	25000	Crecimiento	25000	Crecimiento
12500	Crecimiento	12500	Crecimiento	12500	Crecimiento
6250	Crecimiento	6250	Crecimiento	6250	Crecimiento
3125	Crecimiento	3125	Crecimiento	3125	Crecimiento
1562,5	Crecimiento	1562,5	Crecimiento	1562,5	Crecimiento
781,25	Crecimiento	781,25	Crecimiento	781,25	Crecimiento
390,625	Crecimiento	390,625	Crecimiento	390,625	Crecimiento
195,3125	Crecimiento	195,3125	Crecimiento	195,3125	Crecimiento

Tabla 24. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de *O. spicatus* sobre *S. aureus*.

Elaborado por: Norma Guerrero.

Como se puede observar en la tabla 24, todas las concentraciones ensayadas tienen crecimiento bacteriano desde y por debajo de 100000 µg/ml de *S. aureus* lo que representa que la bacteria es totalmente resistente a los extractos de *O. spicatus* en concentraciones menores y que la MIC es 400000 µg/ml para los tres extractos acuoso, alcohólico y etéreo.

4.8.2.3 MIC en *Bacillus spizizenii*

Para la dilución doble seriada partimos de la C3 = 400000 µg/ml del extracto alcohólico que evidencio un halo de 11 mm.

EXTRACTO ALCOHOLICO	ESPECIE
Concentración 3 (µg/ml)	<i>B. spizizenii</i>
100000	Ausencia
50000	Crecimiento
25000	Crecimiento
12500	Crecimiento
6250	Crecimiento
3125	Crecimiento
1562,5	Crecimiento
781,25	Crecimiento
390,625	Crecimiento
195,3125	Crecimiento

Tabla 25. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) por µg/ml de extracto alcohólico de *O. spicatus* sobre *B. spizizenii*.

Elaborado por: Norma Guerrero.

Como se puede observar en la tabla 25 el extracto alcohólico de *O. spicatus* presentó una MIC de 100000 µg/ml contra *B. spizizenii*.

4.8.2.4 MIC en *Pseudomona aeruginosa*

Para la dilución doble seriada partimos de la C3 = 400000 µg/ml del extracto acuoso que evidencio un halo de 7,6 mm.

EXTRACTO ACUOSO	ESPECIE
Concentración 3 (µg/ml)	<i>aeruginosa</i>
100000	Ausencia
50000	Crecimiento
25000	Crecimiento
12500	Crecimiento
6250	Crecimiento
3125	Crecimiento
1562,5	Crecimiento
781,25	Crecimiento
390,625	Crecimiento
195,3125	Crecimiento

Tabla 26. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) por µg/ml de extracto acuoso de *O. spicatus* sobre *aeruginosa*.

Elaborado por: Norma Guerrero.

Como se puede observar en la tabla 26, el extracto acuoso de *O. spicatus* presentó una MIC de 100000 µg/ml contra *aeruginosa*.

4.9 Evaluación de la actividad antioxidante por el método DPPH.

4.9.1 Extracto alcohólico seco de *Oryctanthus spicatus*

CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ABSORBANCIA	% DE INHIBICIÓN
0	0,879±0,010	0,000
0,003	0,758±0,043	13,804
0,007	0,661±0,030	24,839
0,016	0,389±0,050	55,745
0,033	0,325±0,047	62,988
0,066	0,195±0,039	77,816
0,100	0,129±0,017	85,324
0,133	0,096±0,015	89,078
0,166	0,084±0,011	90,406
0,333	0,068±0,007	92,302

Tabla 27. Absorbancia y porcentaje de inhibición del extracto alcohólico de *O. spicatus*.

Elaborado por: Norma Guerrero.

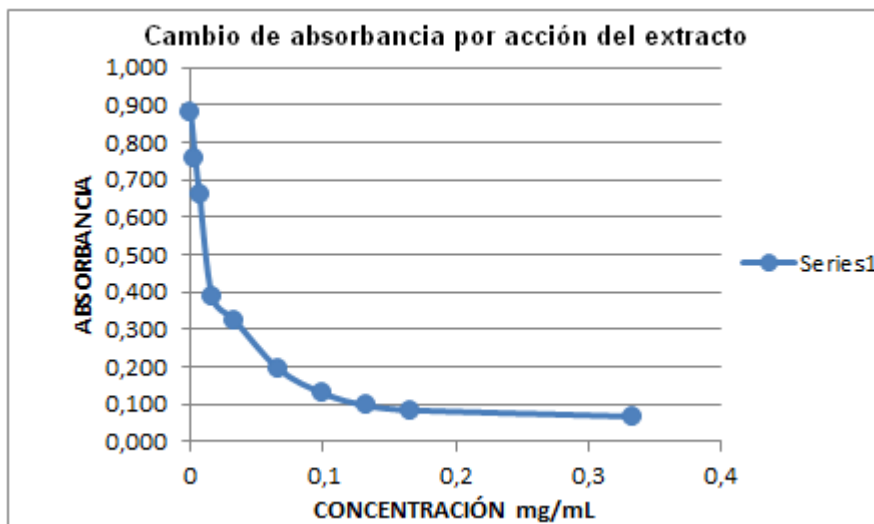


Figura 41. Curva de la concentración del extracto alcohólico de *O. spicatus* VS absorbancia.

Elaborado por: Norma Guerrero.

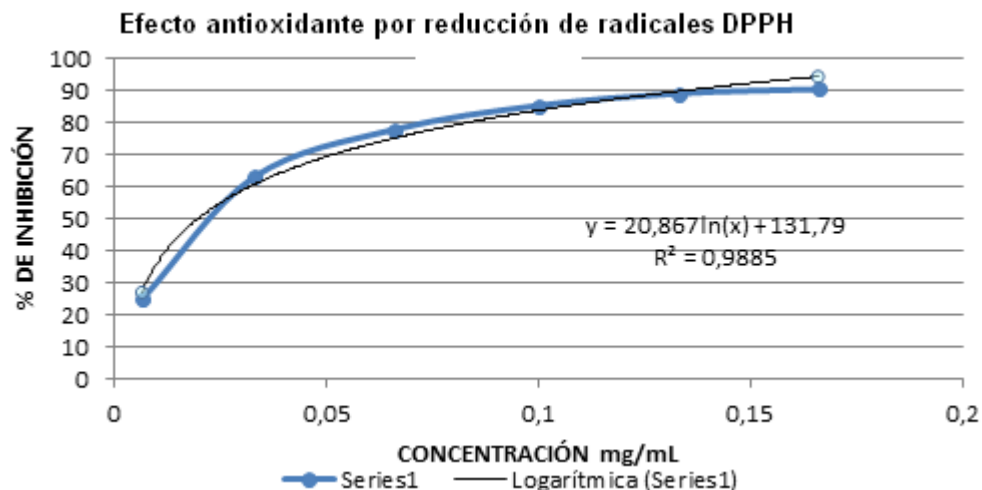


Figura 42. Porcentaje de inhibición de radicales DPPH frente a extracto alcohólico de *O. spicatus*.

Elaborado por: Norma Guerrero.

$$Y = 20,867 \ln(x) + 131,79$$

$$50 = 20,867 \ln(x) + 131,79$$

$$\ln(x) = ((50-131,79) / 20,867)$$

$$\ln(x) = -3,920$$

$$\text{Antilog} = \text{Exp}(-3,920)$$

$$\text{IC } 50 = 20 \mu\text{g/ml}$$

4.9.2 Extracto alcohólico seco de *Camellia sinensis* (antioxidante de referencia natural)

CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ABSORBANCIA	% DE INHIBICIÓN
0.000	0,915±0,000	0.000
0,003	0,869±0,001	5,027
0,007	0,835±0,001	8,707
0,017	0,702±0,001	23,315
0,033	0,613±0,001	33,042
0,067	0,447±0,001	51,184
0,167	0,099±0,001	89,144
0,267	0,108±0,000	88,197

Tabla 28. Determinación de la absorbancia y porcentaje de inhibición del extracto alcohólico de *C. sinensis*.

Elaborado por: Norma Guerrero.

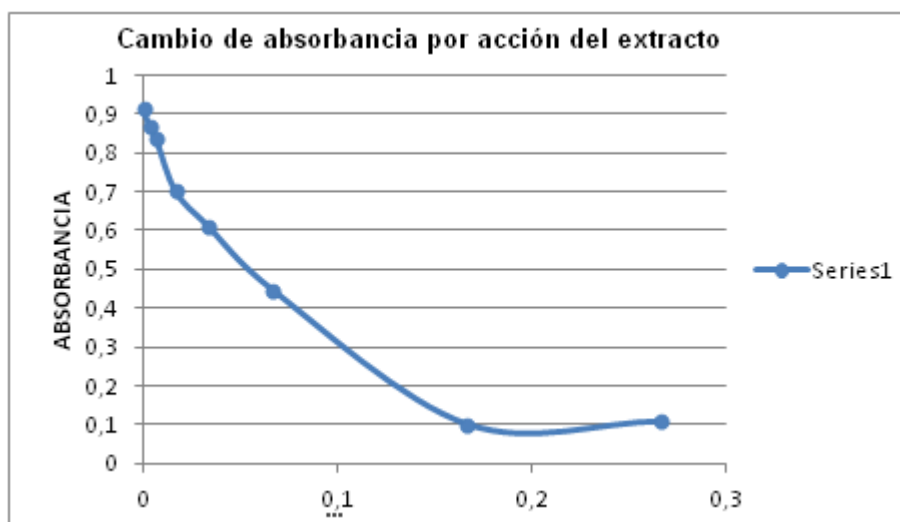


Figura 43. Curva de la concentración del extracto alcohólico de *C. sinensis* VS absorbancia.

Elaborado por: Norma Guerrero.

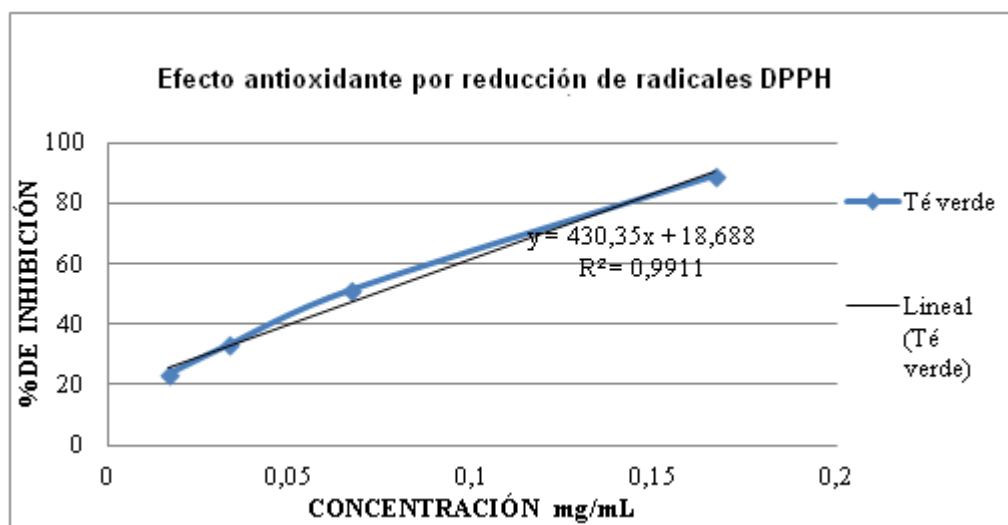


Figura 44. Porcentaje de inhibición de radicales DPPH frente al extracto alcohólico de *C. sinensis*

Elaborado por: Norma Guerrero.

$$IC_{50} = 72 \mu\text{g/ml}$$

4.9.3 Disolución de vitamina C (antioxidante de referencia comercial)

CONCENTRACIÓN (mg/ml)	ABSORBANCIA	% DE INHIBICIÓN
0	0,878	0
0,0003	0,873	0,569
0,001	0,864	1,595
0,002	0,823	6,264
0,003	0,701	20,159
0,007	0,437	50,228
0,010	0,383	56,378
0,013	0,257	70,729
0,017	0,214	75,626
0,027	0,070	92,027

Tabla 29. Determinación de la absorbancia y porcentaje de inhibición de la disolución de vitamina C.

Elaborado por: Norma Guerrero.

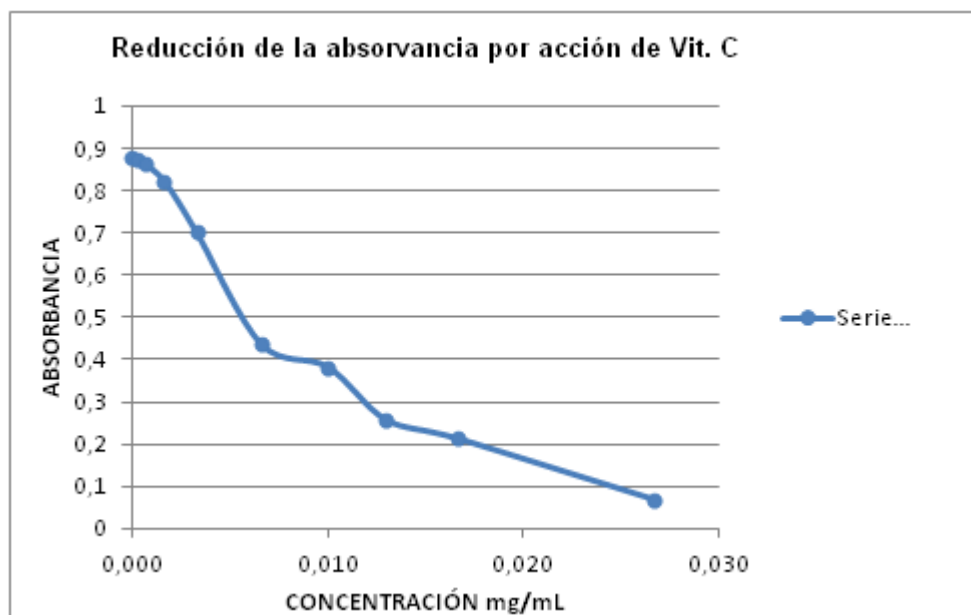


Figura 45. Curva de concentración de la disolución de vitamina C VS absorbancia.

Elaborado por: Norma Guerrero.

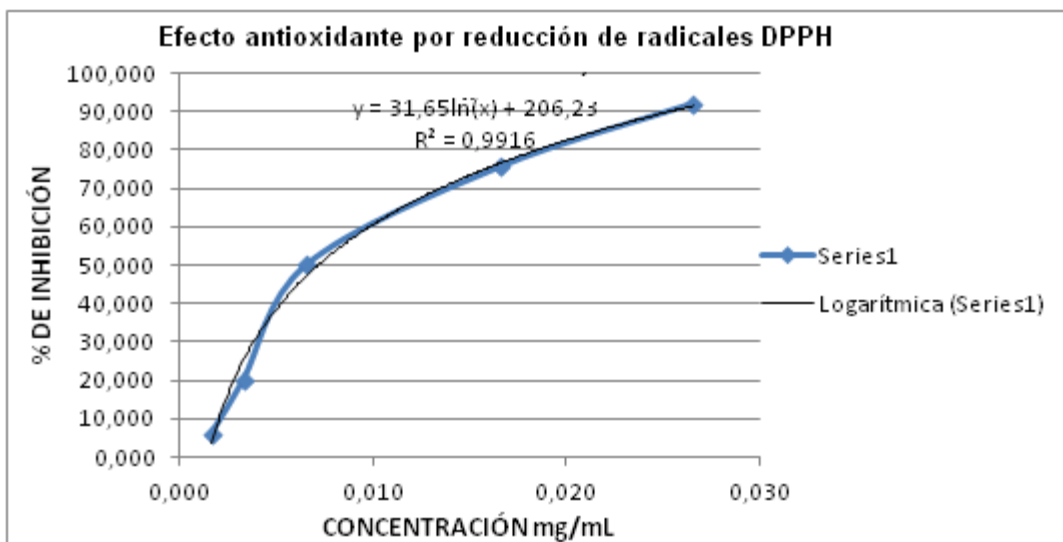


Figura 46. Porcentaje de inhibición de radicales DPPH frente a disolución de vitamina C.

Elaborado por: Norma Guerrero.

$$IC_{50} = 7 \mu\text{g/ml}$$

4.9.4 Comparación de la actividad antioxidante de *O. spicatus*, *C. sinensis* y vitamina C.

ANTIOXIDANTE	MUESTRA	NATURAL	COMERCIAL
		<i>O. spicatus</i>	<i>C. sinensis</i>
IC 50	20 $\mu\text{g/ml}$	72 $\mu\text{g/ml}$	7 $\mu\text{g/ml}$

Tabla 30. IC 50 del extracto de *O. spicatus* comparado con el extracto de *C. sinensis* (Antioxidante natural) y con la disolución de vitamina C (Antioxidante comercial).

Elaborado por: Norma Guerrero.

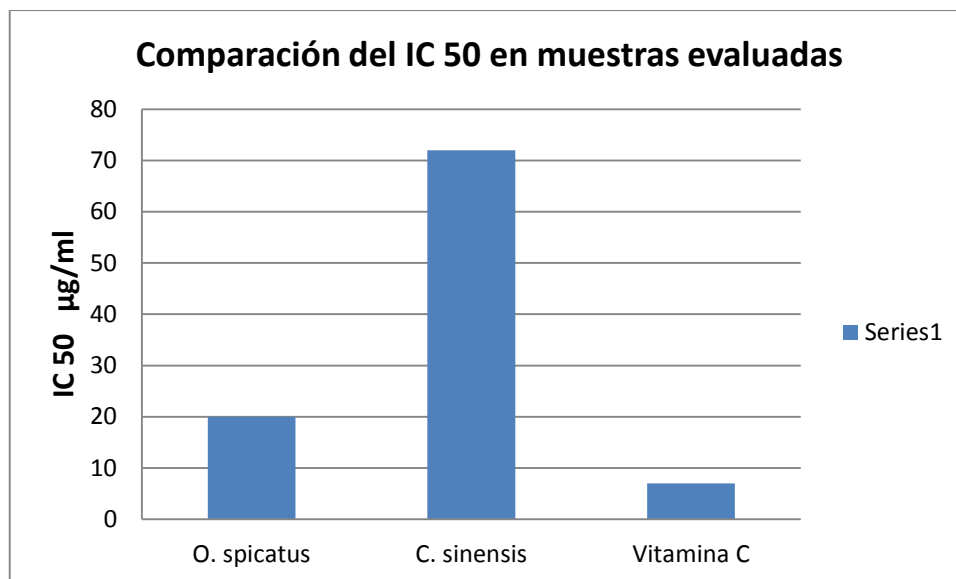


Figura 47. Actividad antioxidante de *O. spicatus*, *C. sinensis* y vitamina C.

Elaborado por: Norma Guerrero.

El IC₅₀ es la concentración de la sustancia antioxidante que reduce el 50% en la absorbancia del radical DPPH. Este radical posee una absorción característica a 517 nm (color púrpura), la cual decrece significativamente cuando está expuesto a la acción de «barrido» por parte de un extracto rico en compuestos fenólicos antioxidantes por suministro de átomos de hidrógeno o por donación de electrones. Una disminución en la absorbancia, a 517 nm indica un alto barrido del radical por parte del extracto. El barrido de los radicales libres es uno de los mecanismos conocidos mediante el cual los antioxidantes inhiben la oxidación de los lípidos. El ensayo permite evaluar en forma rápida la actividad antioxidante in vitro de compuestos específicos o extractos (Rincón *et al*, 2011).

Podemos observar en el figura 47 que *O. spicatus* al presentar un IC₅₀ de 20 µg/ml inferior al de *C. sinensis* (72 µg/ml) y superior al de la Vitamina C (7 µg/ml) posee una alta actividad antioxidante dada la alta concentración de compuestos fenólicos antioxidantes.

CONCLUSIONES

1.- Las hojas de *Oryctanthus spicatus* contienen aceites y grasas, alcaloides, triterpenos y esteroides, catequinas, azúcares reductores, lactonas y coumarinas, saponinas, polifenoles y taninos, quinonas, flavonoides, y principios amargos.

2.- *Oryctanthus spicatus* contiene altas cantidades de fenoles totales calculados como ácido gálico (262.97 mg/g de droga) determinados por el método de Folin-Ciocalteu.

3.- Los extractos de las hojas *Oryctanthus spicatus* tienen actividad antibacteriana de amplio espectro pero en menor proporción que el control positivo frente a las bacterias testadas, con una CMI de 0.2 mg/ml de extracto acuoso para *E. coli*; 100 mg/ml de extracto alcohólico para *B. subtilis* subes *spizizenii*, 100 mg/ml de extracto acuoso para *aeruginosa* y de 400 mg/ml para extracto acuoso, alcohólico y etéreo para *S. aureus*.

4.- El extracto alcohólico de las hojas de *Oryctanthus spicatus* con un IC₅₀ de 20 µg/ml, tiene mayor actividad antioxidante que el té verde (IC₅₀ de 72 µg/ml) e inferior a la de vitamina C (IC₅₀ de 7 µg/ml).

RECOMENDACIONES

1. El estudio realizado en cuanto a la caracterización de la composición química es un análisis preliminar a la elucidación estructural, quedando pendiente la investigación de las fracciones aisladas obtenidas por cromatografía en capa fina.
2. La actividad antibacteriana de amplio espectro puede determinar una posible aplicación como agente preservante si se desea incluir el extracto como aditivo alimentario, excipiente cosmético, entre otros.
3. Los resultados obtenidos en la actividad antioxidante, dan un indicio sobre la posibilidad de utilizar la especie *Oryctanthus spicatus* como planta promisoría para el aislamiento y purificación de compuestos fenólicos. Debido al resultado, se puede utilizar como principio activo o excipiente en productos naturales, alimentos y cosméticos con estudios posteriores.

LISTA DE REFERENCIAS

- Aguirre, E. (1995). *Plantas Medicinales Amazónicas: Realidad y Perspectivas*. Lima.
- Agrios, G. (2005). *Plant pathology*. 5 ed. Elsevier Academic Press.
- Alonso, J. (2006). Técnicas de comprobación de actividad terapéutica de las plantas medicinales. Recuperado de http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/comprobacion_de_la_actividad_terapeutica_de_las_plantas.pdf/
- Alonso, J. (2007). *Tratado de Fitofármacos y Nutracéuticos*. Edit Corpus.
- Alquilarenos, fenoles y anilinas. (2014), Recuperado de <http://www.uam.es>
- Ansaloni, R. *et al.* (2010). “Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en algunas comunidades de las Provincias de Azuay, Cañar y Loja, para afecciones del aparato gastrointestinal”. *Revista Tecnológica ESPOL – RTE*, 23(1), 89-97.
- Govea, M. *et al.* (2013). “Actividad Anticancerígena del Ácido Gálico en Modelos Biológicos in vitro”. *AQM*, 5(9).
- Arnao M.B. (1999). “Methods to measure the antioxidant activity in plant material. A comparative discussion”, *Free Rad Res.*; 31: S89-96.
- Asca, A., Aldea, K., Arrué, K. & Valverde, K. (2010). Bacterias Gram Positivas y Gram Negativas. Universidad de San Martín de Porres, Chiclayo – Perú.
- Barragán, E. (2011, 17 de mayo). La polaridad química o sólo polaridad. Recuperado de <http://es.scribd.com/doc/55649948/LA-POLARIDAD-QUIMICA-O-SOLO-POLARIDAD>
- Bendich, A. (1990). “Antioxidant micronutrients and immune responses”. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 587:168-80.
- Benzie L., Szeto Y. (1999). “Total Antioxidant Capacity of Teas by the Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay”. *J. Agric Food Chem*, 47, 633-636.
- Bermúdez, A. *et al.* (2005). “La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales”. *Interciencia*. 11 (8), 453-454.
- Bilboa, M. (1971), Estudio Fitoquímico del *Schinus molle*, Tesis ITESM. Monterrey N.L.

- Brand-Williams, W. *et al.* (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. Technol.*, 22, 25-30.
- Bruneton J. (2003). *Farmacognosia, Fitoquímica y Plantas Medicinales*. Segunda Edición. Editorial ACRIBIA S.A. España.
- Calderón, J. (2011). *Caracterización fitoquímica, actividad antibacteriana y antioxidante de extractos de plantas medicinales utilizadas en Pereira y Santa Rosa de Cabal (RISARALDA)*. Trabajo de Grado UT Pereira.
- Cannell, R. (1998). *Methods in Biotechnology. Natural Products Isolation. Glaxo Wellcome & Development*, Stevenage, UK. Humana Press Inc. Totowa, N.J. Vol.4, 1-285.
- Coba, *et al.* (2010). “Importancia de la actividad antioxidante y evaluación de extractos en etanol del género *Oryctanthus*”. *La Granja*. Quito. 11 (1): 22-30.
- Carlile, MJ. *et al.* (2001). *The Fungi*. 2ª ed. (p.70). Academic Press. San Diego.
- Cos, L. Maes, A. Vlietinck & L. Pieters. (2008). Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection – an update. *Planta Med.* 28, 1323-1337.
- Desmarchelier C. & Ciccía G. (1998). “Antioxidantes de Origen Vegetal”. *Ciencia Hoy*, Vol. 8, N°. 44.
- Espinoza, J. (2012). Blogspot. Recuperado de <http://pseudomonaeruinosabacteria.blogspot.com/>
- Farmacopea de Estados Unidos. (2007). 565 Botanical extracts. USP 30.
- Fogliano, O.; Verde, V.; Randazzo, G.; Ritieni, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem.* 47, 1035-1040, 1999.
- Frankel N. & Meyer AS. (2000). “Review the problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants”. *J Sci Food Agric*, 80: 1925-1941.
- Gamazo, C. L.-G. (2005). *Manual practico de microbiologia*. (pp. 121-131). Barcelona- España: MASSON.

García, J. *et al.* (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica, *Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos*. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. (p. 54).

García, J. (2007). *Técnicas instrumentales y análisis en bioquímica*. (pp. 296-300). Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Técnicas Cromatográficas. México.

García, J. y García, F. Cromatografía en columna. Universidad de Burgos, Recuperado de <https://sites.google.com/site/grupodepolimeros/cromatografia-en-columna>

Gibbons S. (2008). Phytochemicals for bacterial resistance – strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Med*, 74: 594-602.

Gómez, C. (2010). Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de *Myrciastes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo), especies reportadas en Peguche – Imbabura, sobre *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* causantes de enfermedades bucofaríngeas, ESPE, Sangolquí.

González, M. (2011, 3 de octubre). Cumarinas, Recuperado de <http://quimica.laguia2000.com/elementos-quimicos/cumarinas>

Google earth, 2013.

Greulach, V. y Adams, E. (, 1986). *Manual de Botánica y Ecología*, 3ra Ed. Ciencia y Técnica, México.

Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP). (2010). *Prospección y evaluación de sustancias bioactivas y productos naturales*. Recuperado de <http://www.iiap.org.pe/cdpublicaciones2011/documentos/pdf/piba/pu/22.pdf>

Jacquin, E. Centro de datos para la conservación (CDC). (2009). *Oryctanthus spicatus*. Recuperado de

<http://cdc.lamolina.edu.pe/SYSCDC/Taxonomia/Taxonesficha.php?idtaxones=1417>

7

Kim, D-O.; Lee, K.W.; Lee, H.J.; Lee, C.Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3713-3717, 2002.

- Kitina, (2013, 10 de noviembre). De esteroides y otros demonios (I), Recuperado de <http://asporcompas.blogspot.com/>
- Kuskoski, E.M.; Asuero, A.G.; Troncoso, A.M.; Garcia-Parilla, M. C.; Fett, R. (2004). “Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos”. *Rev. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.*, 24(4), 691-693.
- Lizcano, A. y Vegarara, J. (2008). *Evaluación de la actividad antibacteriana de pilosa, Hesperomles ferruginea, Myrcianthes rophaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatogenos*. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.
- Mahecha, G. (2006). Guía para la recolección y preservación de muestras botánicas en campo. Colombia.
- Martínez, A. (2005). *Flavonoides*. Universidad de Antioquia. Medellín.
- Mims, C. W. (2002). *Microbiología medica*. Madrid- España: Harcourt.
- Ministerio de Turismo Gerencia Regional Amazónica. Inventario de Atractivos turísticos de Morona Santiago. Recuperado de <http://www.moronasantiago.gob.ec/up/rpublico/Turismo9.pdf>
- Miño, G. (2007). “Investigación fitoquímica e identificación del principio activo en seis especies del Género *Baccharis*”. ESPE. Ecuador.
- Miranda, M. (2000). *Farmacognosia y productos naturales*. Manual de Practica. Facultad de Farmacia. Universidad de la Habana. Habana - Cuba.
- Missouri Botanical Garden (MOBOT). (2010). *Neotropicos*, Disponible en <http://www.tropicos.org/>
- Molina-Salinas, G. M. (2001). Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos y hexánico del clavo (*Eugenia caryophyllata*). UANL. Fac. de Medicina.
- Pérez, D. *et al.* (2000). “A comparison of methods employed to evaluate antioxidant capabilities”. *Biol. Res.*; 33 (2): 71-77.
- Ríos M. y Koziol, M. (2006). *Plantas Útiles Del Ecuador*. Ediciones Abya-Yala, Quito-Ecuador.

Sanchez, J. y Barrera, E. (1990). Aporte al estudio florístico y ecológico de las Loranthaceae del jardín botánico "El Bosque" Silvania. *Agronomia Colombiana*. Cundinamarca, 7,76-88.

Santizo, I. (2004), Identificación de familias de metabolitos secundarios en *Myrica cerifera*. Tesis. Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Scartezzini , Antognoni F., Raggi M. A., Poli F. y Sabbioni C. (2006). Vitamin C content and antioxidant activity of the fruit and of the Ayurvedic preparation of *Emblica officinalis* Gaertn. *Journal of Ethnopharmacology*, 104,113-118.

Schwarz K. *et al.* (2001). "Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds". *Eur Food Res Technol*, 212 (3), 319-328.

Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Ed. Quebecor- Impreandes. Colombia.

Sistema de Servicios de Información y Bibliotecas (SISIB), *Alcaloides, Fenoles, Heterosidos*, Universidad de Chile, Recuperado de <http://mazinger.sisib.uchile.cl>

Spicer, J. (2009). *Microbiología clínica y enfermedades infecciosas*. Barcelona-España: Elsevier España S.L.

Valencia, C. O. (1995). *Fundamentos de fitoquímica*. (pp. 11-31). Ed. Trillas. México.

Ville, C. (1996). *Biología*. México: McGraw-Interamerica Editores S.A.

Wang C., *et al.* (2004). "Trolox-Equivalent Antioxidant capacity Assay Versus Oxygen radical Absorbance Capacity Assay in plasma". *Clin Chem.*; 50 (5), 952-954.

Yeon H. B., *et al.* (2001). "Antioxidant Benzoylated Flavan-3-ol Glycoside from *Celastrus orbiculatus*". *Journal Nat. Prod*, 64, 82-84.

Zamora, A. (2014). Grasas, Aceites, Ácidos grasos, Triglicéridos. *Scientific Psychic*. Recuperado de <http://www.scientificpsychic.com/>

ANEXOS

Anexo 1. Soluciones y reactivos para el screening fitoquímico.

1. Reactivo de Baljet: Solución A: 1 g de ácido pícrico (2,4,5-Trinitrofenol) en 100 mL de etanol. Solución B: 10 g de NaOH en 100 mL de agua.
2. Reactivo de Burchardat: 2 g de cristales de yodo, 4 g de KI y agua destilada csp 100 mL.
3. Solución de carbonato de sodio $c(\text{CO}_3\text{Na}_2 / z^*)_2$ mol/L: 12,5 g de carbonato de sodio se disuelven en agua destilada, csp 100 mL.
4. S. R de Dragendorff: Mezclar 21,3 mL de ácido nítrico ($d = 1,42$) con suficiente agua destilada para hacer 62 mL. En 20 mL de esta solución se disuelven 5 g de subnitrate de bismuto. Por separado, se disuelven 31,2 g de yoduro de potasio en 69 mL de agua. Mezclar luego ambas soluciones.
5. S. R de Fehling: Solución A: 7 g de sulfato de cobre se disuelven en 100 mL de agua destilada, conteniendo 0,1 mL de ác. sulfúrico. Solución B: 35 g de tartrato de sodio y potasio y 15,5 g de NaOH disueltos en 100 mL de agua. Se mezclan partes iguales de A y B, en el momento de usarse. S. R de Kedde (modificación de Bus y Taylor): Ácido 3,5-dinitrobenzoico al 2 % en metanol. KOH al 5,7 % en agua.
6. S. R de Liebermann: 1 mL de ác. sulfúrico concentrado se mezclan con 20 mL de anhídrido acético y 50 mL de cloroformo.
7. S. R de Mayer: 1,258 g de cloruro mercúrico se disuelven en 60 mL de agua. Por otra parte se disuelven 5 g de yoduro de potasio en 20 mL de agua, se mezclan ambas soluciones y se enrasa a 100 mL con agua.
8. S. R de Sudán III: Solución al 6 % en partes iguales de alcohol y glicerina.
9. S. R de Wagner: Se disuelven 2 g de yodo y 2 g de yoduro de potasio en un pequeño volumen de agua, y luego llevando el enrase a 100 mL, con agua.

Fuente: Miranda, 2000.

Anexo 2. Microorganismos experimentales.

Pseudomona aeruginosa ATCC 27853.



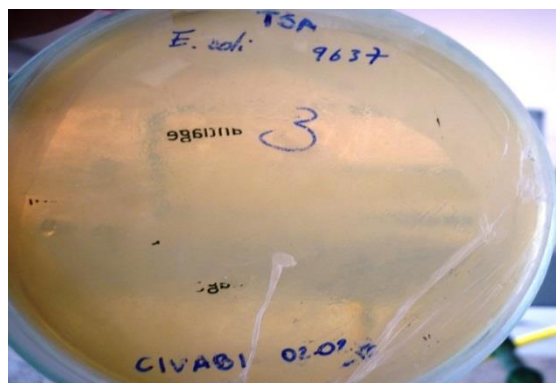
Elaborado por: Norma Guerrero.

Bacillus. spizizenii ATCC 6633.



Elaborado por: Norma Guerrero.

Escherichia coli ATCC 9637.



Elaborado por: Norma Guerrero.

Staphylococcus aureus ATCC 6538.



Elaborado por: Norma Guerrero.

Candida albicans ATCC 10231.



Elaborado por: Norma Guerrero.

Anexo 3. Certificado de identificación taxonómica.

Quito, 29 de junio del 2012

CERTIFICADO DE AUTENTIFICACIÓN BOTÁNICA

Yo, Marco Fernando Cerna Cevallos; Doctor en Biología con especialidad en Flora del Ecuador, Certifico:

Qué las muestras botánicas colectadas por el Ing. Wilson Tapia Hernandez corresponde a las siguientes especies:

Oryctanthus spicatus (Jaquin) Eichlesr.

Estos Bouchers reposan en el Herbario Nacional MNCC-Quito.

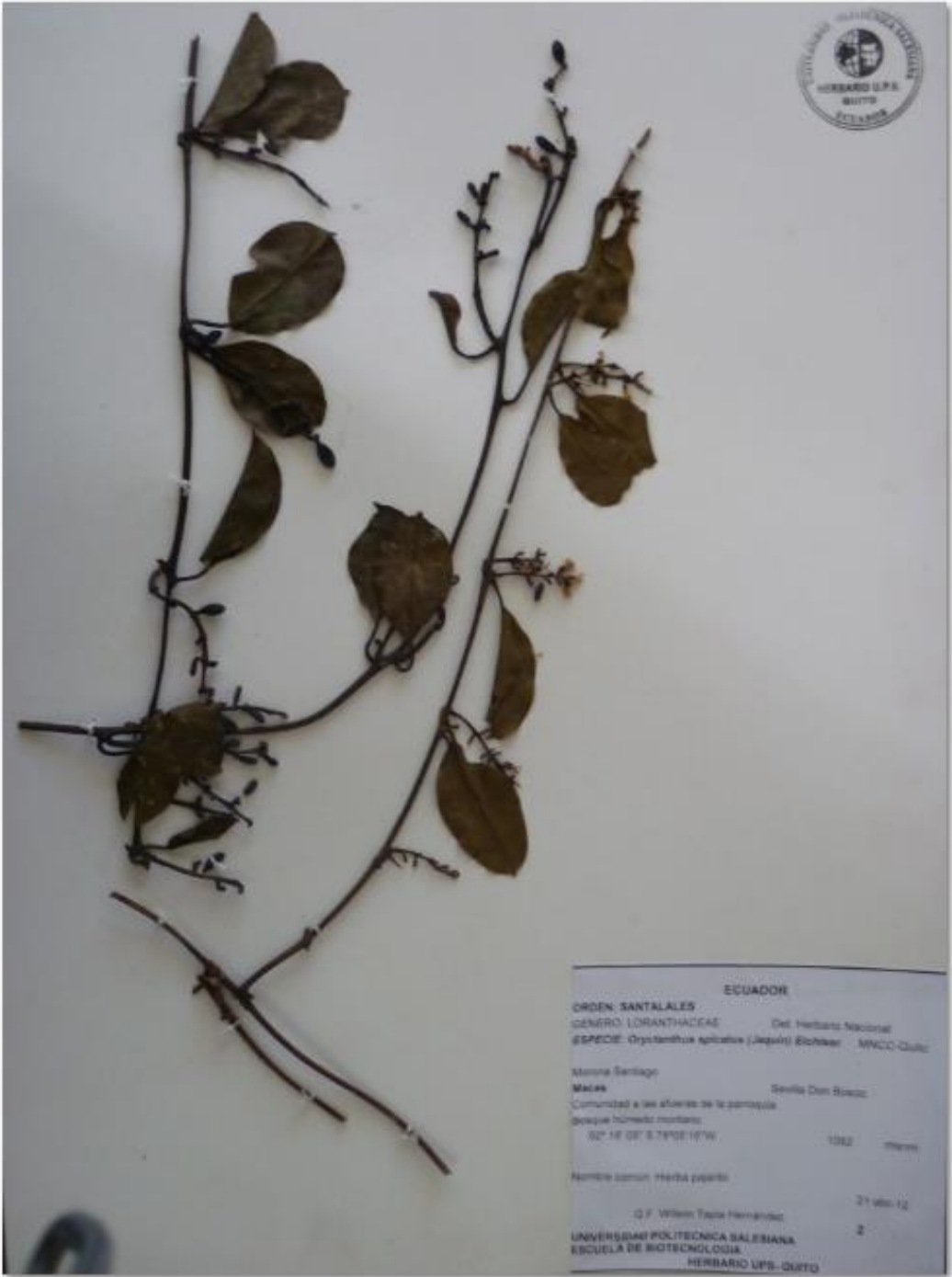
Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad.



Atte.
Marco Cerna
DOCTOR EN BIOLOGÍA

Fuente: Wilson Tapia.

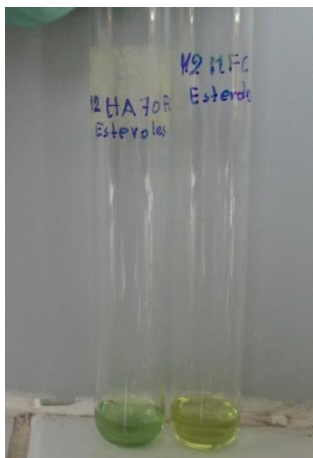
Anexo 4. Boucher de *Oryctanthus spicatus* (Pajarito).



Fuente: Wilson Tapia.

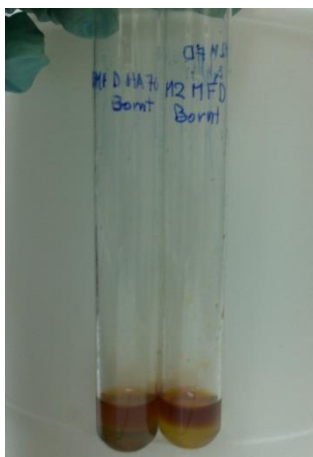
Anexo 5. Identificación de metabolitos secundarios en cada una de las fracciones obtenidas para cromatografía en capa fina.

Prueba de Lieberman-Buchard para esteroides en extracto etanólico e hidroalcohólico fracción C.



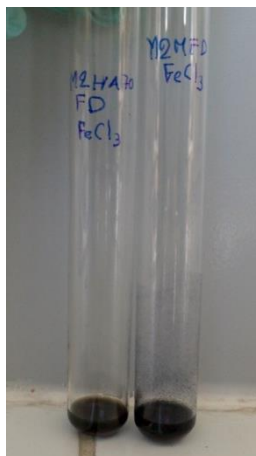
Elaborado por: Norma Guerrero.

Prueba de Borntrager para quinonas en extracto etanólico e hidroalcohólico fracción D.



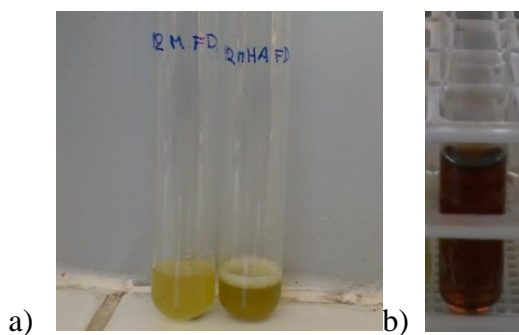
Elaborado por: Norma Guerrero.

Prueba con cloruro férrico para fenoles y taninos en extracto etanólico e Hidroalcohólico FD.



Elaborado por: Norma Guerrero.

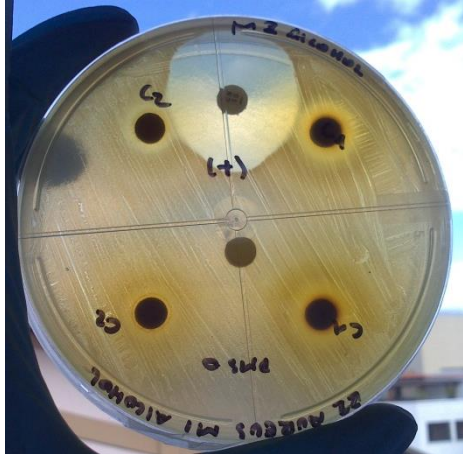
Prueba de Shinoda para flavonoides en extracto etanólico e hidroalcohólico fracción D.
a) (Extracto FD + (HCl) (c) + cinta de magnesio). b) (Extracto FD + (HCl) (c) + cinta de magnesio + alcohol amílico).



Elaborado por: Norma Guerrero.

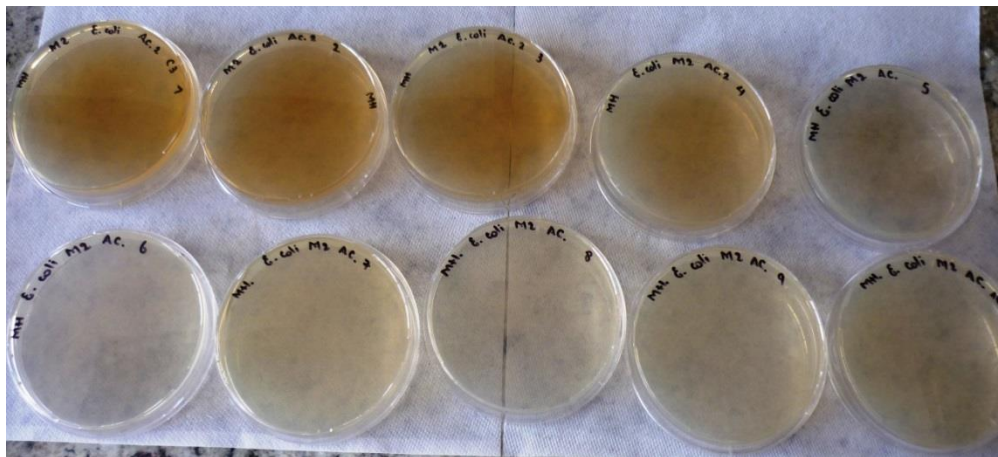
Anexo 6. Antibiograma por el método de difusión en agar Kirby-Bauer.

Halos de inhibición del extracto de *O. spicatus* frente a bacterias (*S. aureus*).



Elaborado por: Norma Guerrero.

Anexo 7. Dilución doble seriada del extracto de *O. spicatus*; *E. coli* (acuoso C3 = 400000 $\mu\text{g/ml}$).



Elaborado por: Norma Guerrero.