



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE GUAYAQUIL**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS  
ACUOSO Y ALCOHÓLICO DE LAS RAÍCES DE ALMACENAMIENTO DE  
*ERIOTHECA RUIZII***

Trabajo de titulación previo a la obtención del  
Título de Ingeniera en Biotecnología

**AUTOR:** DAMARIS MICHAELLE GANCHOZO ARÉVALO

**TUTOR:** ING. JOSÉ LUIS BALLESTEROS LARA Ph.D.

Guayaquil-Ecuador

2023

**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

Yo, Dámaris Michaelle Ganchozo Arévalo con documento de identificación N° 0931209654 manifiesto que:

Soy el autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total, o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 07 de septiembre del año 2023.

Atentamente,



Damaris Michaelle Ganchozo Arévalo

C.I. 0931209654

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO  
DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, Damaris Michaelle Ganchozo Arévalo con documento de identificación No. 0931209654 expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del Proyecto de Investigación TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y ALCOHÓLICO DE LAS RAÍCES DE ALMACENAMIENTO DE *ERIOTHECA RUIZII*, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 07 de septiembre del año 2023

Atentamente,



Damaris Michaelle Ganchozo Arévalo

CI. 0931209654

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, José Luis Ballesteros Lara con documento de identificación N° 1714838123, docente de la Universidad Politécnica Salesiana declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS ACUOSO Y ALCOHÓLICO DE LAS RAÍCES DE ALMACENAMIENTO DE *ERIOTHECA RUIZII*, realizado por Damaris Michaelle Ganchozo Arévalo con documento de identificación N° 0931209654, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Proyecto de Investigación que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 07 de septiembre del año 2023

Atentamente,



Ing. José Luis Ballesteros Lara

CI. 1714838123

## **Dedicatoria**

Este trabajo de titulación es dedicado a mi tía Gloria por ser mi inspiración y creer en mí, apoyándome en toda mi trayectoria académica, siempre con amor y cariño.

A mi adorada abuelita Aura por acompañarme en todo momento, siempre con una gran sonrisa e inmenso amor, dándome ánimos para afrontar las situaciones de la vida con esperanza y resiliencia.

A mi padre y mejor amigo Miguel por sacrificar todo por mí y mi bienestar, demostrándome que todo lo que me proponga lo puedo cumplir siempre y cuando confíe en mí.

## **Agradecimiento**

Agradezco a la Universidad Politécnica Salesiana por financiar este proyecto investigativo y otorgarme el conocimiento para poder ejecutarlo durante estos 4 años de preparación.

A mi tutor, José Luis Ballesteros Lara por su tiempo, dedicación y paciencia durante el desarrollo de este proyecto, así mismo por compartir sus conocimientos y permitirme lograr mis objetivos.

A la Ing. Alejandra De La Cruz por ser un pilar fundamental en mi investigación, brindándome su incondicional apoyo, conocimiento y paciencia.

A los laboratorios de Ciencias de la Vida y a sus analistas tanto de la Sede de Guayaquil como de Cuenca por facilitarme el uso de equipos así mismo como su asesoría.

Al profesor Ing. Jaime Naranjo Morán por siempre darme ánimos y compartir su conocimiento en todo momento, sin duda alguna un excelente profesional y maestro.

A mis amigos por acompañarme en esta travesía animándome y brindándome siempre su apoyo y amistad sincera.

## Resumen

La caracterización de especies vegetales con escasa investigación de la composición fitoquímica otorga la oportunidad de descubrir nuevos y valiosos compuestos permitiendo conocer sus propiedades para así ofrecer alternativas sostenibles para el desarrollo de productos con aplicaciones industriales de interés, validando científicamente al mismo tiempo los conocimientos ancestrales de las comunidades. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo la determinación del contenido cualitativo de las raíces de almacenamiento de *Eriotheca ruizii* mediante el tamizaje fitoquímico de los extractos, acuoso, alcohólico e hidroalcohólico siendo los metabolitos secundarios más representativos los alcaloides, carbohidratos y flavonoides, además se determinó al oleato de gliceril como el compuesto con mayor similitud por medio de la Espectrometría de Infrarrojos por Transformada de Fourier (FT-IR) con un porcentaje de similitud del 88.26%. Se comprobó la actividad antibacteriana en base a la técnica de microdilución donde se obtuvo una MIC de 1800,000  $\mu\text{g/mL}$  contra la cepa de *S. aureus* y 2076,923  $\mu\text{g/mL}$  para *E. coli* clasificándose como actividad antibacteriana "Moderada" para los extractos alcohólico e hidroalcohólico al 20% de concentración. Para la evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos mediante el método DPPH se obtuvieron los mejores resultados para el extracto hidroalcohólico con un  $\text{IC}_{50}$  de 150,8  $\mu\text{g/mL}$  considerándose como actividad antioxidante "Media".

Palabras clave: *Eriotheca ruizii*, MIC, FT-IR, metabolitos secundarios, DPPH.

## Abstract

The characterization of plant species with little research on the phytochemical composition gives the opportunity to discover new and valuable compounds, allowing to know their properties in order to offer sustainable alternatives for the development of products with industrial applications of interest, scientifically validating at the same time the ancestral knowledge of communities.

The purpose of this research work was to determine the qualitative content of the storage roots of *Eriotheca ruizii* through phytochemical screening of the aqueous, alcoholic and hydroalcoholic extracts. The most representative secondary metabolites were alkaloids, carbohydrates and flavonoids, in addition, Glyceryl oleate was determined as the compound with the greatest similarity following the technique of Fourier Transform Infrared Spectrometry (FT-IR) with a similarity percentage of 88.26%. The antibacterial activity was verified based on the micro dilution technique where a MIC of 1800,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  was obtained against the *S. aureus* strain and 2076,923  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for *E. coli*, classifying it as "Moderate" antibacterial activity for both alcoholic and hydroalcoholic extracts at 20% concentration. For the evaluation of the antioxidant capacity of the extracts was used the DPPH method, whereas the best results were obtained for the hydroalcoholic extract with an  $\text{IC}_{50}$  of 150.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , considered as "Medium" antioxidant activity.

Keywords: *Eriotheca ruizii*, MIC, FT-IR, secondary metabolites, DPPH.

## Índice de contenido

|   |    |
|---|----|
| 1. Introducción                                       | 1  |
| Pregunta de investigación                             | 2  |
| 1.1 Objetivos   | 3  |
| 1.1.2 Objetivo General                                | 3  |
| 1.1.3 Objetivos específicos                           | 3  |
| 1.2 Hipótesis   | 4  |
| 2. Fundamentación teórica                             | 5  |
| 2.1 Bosque seco tropical                              | 5  |
| 2.2 Bosque Cerro Paraíso                              | 7  |
| 2.3 Plantas medicinales en Ecuador                    | 7  |
| 2.4 Descripción botánica de <i>Eriotheca ruizii</i> . | 9  |
| 2.5 Extractos vegetales                               | 11 |
| 2.6 Control de calidad del material vegetal           | 12 |
| 2.7 Métodos de extracción de extractos vegetales      | 12 |
| 2.7.1 Maceración                                      | 12 |
| 2.7.2 Lixiviación                                     | 13 |
| 2.7.3 Percolación                                     | 13 |
| 2.7.4 Destilación por arrastre de vapor               | 14 |
| 2.7.5 Extracción Soxhlet                              | 15 |
| 2.7.6 Extracción asistida por ultrasonido             | 16 |
| 2.7.7. Liofilización                                  | 16 |
| 2.8 Tamizaje fitoquímico                              | 17 |
| 2.9 Metabolitos secundarios                           | 18 |

|   |    |
|---|----|
| 2.9.1 Terpenos  | 22 |
| 2.9.2 Compuestos fenólicos  | 22 |
| 2.9.3 Glicósidos  | 23 |
| 2.9.4 Alcaloides  | 23 |
| 2.10 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)          | 24 |
| 2.11 Actividad biológica  | 25 |
| 2.11.1 Actividad antimicrobiana   | 25 |
| 2.11.2 Resistencia microbiana   | 25 |
| 2.12 Métodos de prueba de susceptibilidad a los antibióticos                | 26 |
| 2.12.1 Difusión en disco Kirby-Bauer  | 26 |
| 2.12.2 Difusión de disco de gradiente Etest                                 | 27 |
| 2.12.3 Dilución en agar   | 29 |
| 2.12.4 Macro dilución en caldo  | 30 |
| 2.12.5 Micro dilución en caldo  | 31 |
| 2.12.6 2,3,5-Trifeniltetrazolio Cloruro (TTC)                               | 32 |
| 2.13 Actividad antioxidante por método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) | 33 |
| 2.13.1 Valor IC50   | 34 |
| 3. Materiales y métodos   | 36 |
| 3.1 Localización e identificación de material vegetal                       | 36 |
| 3.2 Control de calidad del material vegetal                                 | 37 |
| 3.2.1 Control fisicoquímico   | 37 |
| 3.2.2 Control microbiológico  | 37 |
| 3.3 Elaboración de extractos  | 38 |
| 3.4 Liofilización   | 40 |
| 3.5 FT-IR   | 40 |
| 3.6 Tamizaje fitoquímico  | 40 |
| 3.6.1 Determinación de alcaloides   | 42 |
| 3.6.2 Determinación de carbohidratos  | 42 |

|   |    |
|---|----|
| 3.6.3 Pruebas para la determinación de saponinas  | 42 |
| 3.6.4 Pruebas para la determinación de proteínas  | 43 |
| 3.6.5 Pruebas para la determinación de Lactonas sesquiterpénicas  | 43 |
| 3.6.6 Pruebas para la determinación de Flavonoides  | 43 |
| 3.6.7 Pruebas para la determinación de Saponinas  | 44 |
| 3.6.8 Pruebas para la determinación de Cumarinas  | 44 |
| 3.7 Actividad Biológica   | 45 |
| 3.7.1 Actividad antimicrobiana  | 45 |
| 3.7.2 Reactivación de cepas bacterianas   | 45 |
| 3.7.3 Preparación de las concentraciones de los extractos de <i>E. ruizii</i> , terpineol y penicilina. | 46 |
| 3.7.4 Estandarización de los inóculos bacterianos   | 46 |
| 3.7.5 Inoculación en placas multipocillo.   | 47 |
| 3.7.6 Preparación y adición de colorante 2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)                      | 48 |
| 3.7.8 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)  | 48 |
| 3.8 Actividad antioxidante  | 49 |
| 3.8.1 Preparación del reactivo DPPH y estándar  | 49 |
| 3.8.2 Preparación de soluciones   | 49 |
| 4. Resultados y Discusión   | 51 |
| 4.1 Recolección e Identificación de la especie vegetal  | 51 |
| 4.2 Control de calidad  | 52 |
| 4.2.1 Control fisicoquímico del material vegetal  | 52 |
| 4.3 Obtención de los Extractos  | 53 |
| 4.3.1 Extracto Acuoso   | 53 |
| Elaborado por: Ganchozo, (2023)   | 53 |
| 4.3.2 Extracto Alcohólico   | 53 |
| 4.3.3 Extracto Hidroalcohólico  | 54 |
| 4.4 Control de calidad  | 54 |
| 4.4.1 Control fisicoquímico de los extractos  | 54 |

|   |    |
|---|----|
| 4.4.2 Control microbiológico de los extractos   | 55 |
| 4.5 Tamizaje Fitoquímico  | 56 |
| 4.6 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)                                   | 65 |
| 4.6.1 Análisis FT-IR del extracto alcohólico.   | 65 |
| 4.6.2 Análisis FT-IR del extracto hidroalcohólico   | 68 |
| 4.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria MIC mediante la técnica de micro dilución. | 71 |
| 4.8 Actividad antioxidante  | 75 |
| 5. Conclusiones   | 79 |
| 6. Recomendaciones  | 80 |
| 7. Referencias  | 81 |

## Índice de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1: Distribución mundial del Bosque Seco Tropical.                              | 6  |
| Figura 2: Flor de <i>E. ruizii</i> .  | 10 |
| Figura 3: Estructura de un percolador.  | 14 |
| Figura 4: Equipo de extracción Soxhlet  | 15 |
| Figura 5: Ruta del ácido shikimico  | 19 |
| Figura 6: Ruta del acetato-mevalonato   | 20 |
| Figura 7: Ruta del acetato-malonato   | 21 |
| Figura 8: Prueba de Kirby-Bauer   | 27 |
| Figura 9: Configuración de gradiente Etest  | 28 |
| Figura 10: Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>                                | 28 |
| Figura 11: Metodología de la dilución en agar.  | 29 |
| Figura 12: Esquema del método de macrodilución en caldo                               | 30 |
| Figura 13: Procedimiento gráfico de micro dilución en placas multipocillo             | 32 |
| Figura 14: Resultado de microdilución en caldo en placa de 96 pocillos.               | 33 |
| Figura 15. Metodología propuesta para el desarrollo del proyecto de investigación     | 35 |
| Figura 16. Secado del material vegetal en estufa.                                     | 38 |
| Figura 17. Baño de ultrasonido.   | 39 |
| Figura 18. Filtración de extractos.   | 39 |
| Figura 19: Distribución de extractos y controles en las placas multipocillo           | 47 |
| Figura 20. Comparación de las raíces de almacenamiento en la aplicación “iNaturalist” | 51 |
| Figura 21. Extracto acuoso  | 53 |
| Figura 22. Extracto alcohólico  | 53 |
| Figura 23. Extracto hidroalcohólico   | 54 |
| Figura 24. Comparación del extracto acuoso con la guía de interpretación 3M.          | 55 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 25. Resultados obtenidos para la prueba de alcaloides   | 57 |
| Figura 26. Resultados obtenidos para la prueba de Carbohidratos                                      | 59 |
| Figura 27. Resultados obtenidos para la prueba de proteínas  | 60 |
| Figura 28. Resultados obtenidos para la prueba de lactonas sesquiterpénicas                          | 61 |
| Figura 29. Resultados obtenidos para la prueba de flavonoides  | 62 |
| Figura 30. Resultados obtenidos para la prueba de saponinas  | 63 |
| Figura 32. Prueba para la determinación de cumarinas   | 64 |
| Figura 33. Espectro FTIR del extracto alcohólico de las raíces de almacenamiento de <i>E. ruizii</i> | 65 |
| Figura 35. Contenido de los extractos de <i>E. ruizii</i> luego de la filtración y rotavaporación.   | 77 |

## Índice de Tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. División taxonómica de <i>E. ruizii</i> .  | 10 |
| Tabla 2. Ensayos realizados para la determinación de distintos metabolitos  | 41 |
| Tabla 3. Condiciones de crecimiento de microorganismos empleados.   | 45 |
| Tabla 4. Características morfológicas de las raíces de almacenamiento de <i>E. ruizii</i>   | 52 |
| Tabla 5. Control fisicoquímico de los extractos acuoso, alcohólico e hidroalcohólico de <i>E. ruizii</i> .  | 54 |
| Tabla 6. Contenido cualitativo de metabolitos secundarios presentes en tres extractos: Acuoso, Alcohólico e Hidroalcohólico.  | 56 |
| Tabla 7. Valores máximos espectrales del FTIR y grupos funcionales del extracto alcohólico de las raíces de almacenamiento de <i>E. ruizii</i> .  | 66 |
| Tabla 8. Posibles compuestos de utilidad industrial encontrados en el extracto alcohólico   | 68 |
| Tabla 9. Valores máximos espectrales del FTIR y grupos funcionales del extracto alcohólico de las raíces de almacenamiento de <i>E. ruizii</i>  | 69 |
| Tabla 10. Posibles compuestos de utilidad industrial encontrados en el extracto hidroalcohólico de las raíces de almacenamiento de <i>E. ruizii</i> . de acuerdo con el análisis FT-IR. | 70 |
| Tabla 11. Interpretación de valores de MIC.   | 71 |
| Tabla 12. MIC de extracto alcohólico e hidroalcohólico para frente a las cepas <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .  | 72 |
| Tabla 13. MIC de indicadores de control para <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i>  | 74 |
| Tabla 14. Valores obtenidos en el <b>IC50</b> de los distintos tipos de extractos de <i>E. ruizii</i> junto al estándar (Vitamina C)  | 75 |
| Tabla 15. Clasificación de antioxidantes basada en valores <b>IC50</b> .  | 75 |
| Tabla 16. Categorización del <b>IC50</b> de los extractos mediante el estadístico Kruskal Wallis  | 76 |

## Índice de Anexos

|   |           |
|---|-----------|
| Anexo 1. Ficha de información de cada microorganismo              | <b>81</b> |
| Anexo 2. Concentración mínima inhibitoria de los microorganismos. | <b>83</b> |
| Anexo 3. Resultados del programa estadístico InfoStat.            | <b>84</b> |

## 1. Introducción

La familia Malvaceae está comprendida por 10 familias, 338 géneros y 6005 especies de arbustos, árboles y enredaderas que se encuentran distribuidas en regiones tanto templadas como tropicales (Wang et al., 2021). Uno de los géneros más destacados es *Eriotheca* que incluye árboles con hojas palmeadas compuestas de 3-9 foliolos, pequeñas flores con un tubo estaminal estrecho y frutos pequeños con forma obovoide (Yoshikawa & Duarte, 2021).

Debido a la extensa variedad de compuestos presentes en la familia de las Malvaceas, se le atribuyen numerosas propiedades terapéuticas tales como agente antianémico, antiulcérico, en la especie *Eriotheca* (Quattrocchi, 2012; Ardiles, 2019); en *Bombax ceiba L.* actividad antibacteriana contra *Klebsiella neumonía*, *E. coli*, *P. aeruginosa* (Gram-negativas) y *S. aureus*, *B. subtilis* (Gram-positivas) (Rathore et al., 2017); tratamiento en dolencias molares para *Scleronema micranthum* (Moraes et al., 2019).

En Ecuador la especie *Eriotheca ruizii*, es endémica del bosque seco tropical, su lugar de crecimiento es generalmente laderas y colinas a una altitud de 1000 m.s.n.m. en las provincias de Loja, cantón Zapotillo, al centro y norte de la parroquia Garza Real, Guayas, cantón Guayaquil, Bosque Cerro “El paraíso”, Bosque “La Prosperina” y provincias de Manabí y El Oro (Benítez, 2021; Vázquez et al., 2001).

En vista del alto potencial que presenta este género, se decide abordar tanto el estudio fitoquímico como la evaluación de la actividad biológica de *Eriotheca ruizii*. Cabe destacar que, hasta la fecha, no se ha encontrado suficiente información sobre su composición química y sus posibles propiedades terapéuticas.

Actualmente la gran variedad de productos comerciales que poseen actividad antimicrobiana formulada usando componentes fitoterapéuticos con eficacia clínica estudiada sugiere que las plantas son fuentes potenciales para la identificación de nuevos tipos de agentes antimicrobianos en el futuro (Kokoska et al., 2019). En este sentido, surge el interés de descubrir agentes que resulten seguros y económicos siguiendo un protocolo para la identificación de la composición química de metabolitos secundarios responsables de los efectos terapéuticos, así como el aislamiento de estos.

### **Pregunta de investigación**

¿Poseen los extractos acuoso, alcohólico e hidroalcohólico de *E.ruizii* actividad biológica?

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.2 Objetivo General**

Realizar un estudio de tamizaje fitoquímico para los extractos acuoso, alcohólico e hidroalcohólico y actividad biológica del extracto alcohólico e hidroalcohólico de las raíces de almacenamiento de *Eriotheca ruizii*.

### **1.1.3 Objetivos específicos**

1. Identificar mediante tamizaje fitoquímico los tipos de metabolitos secundarios presentes obtenidos de los extractos acuoso, alcohólico e hidroalcohólico de las raíces de almacenamiento de *Eriotheca ruizii*, así como la determinación los grupos funcionales presentes mediante el análisis FT-IR.
2. Determinar la actividad antibacteriana del extracto alcohólico e hidroalcohólico en Gram negativa: *Escherichia coli* (ATCC 8739) y gram positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).
3. Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos acuoso, alcohólico e hidroalcohólico mediante el método de DPPH.

## 1.2 Hipótesis

Hipótesis nula: Los extractos acuoso, alcohólico e hidroalcohólico de *E. ruizii* poseen actividad biológica.

Hipótesis alternativa: Los extractos acuoso, alcohólico e hidroalcohólico de *E. ruizii* no poseen actividad biológica.

El tamizaje fitoquímico y la determinación de actividad antioxidante se llevó a cabo en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Guayaquil, Campus María Auxiliadora, mientras que las pruebas microbiológicas y análisis FT-IR se realizaron en los Laboratorios de Ciencias de la Vida Sede Cuenca, Campus El Vecino.

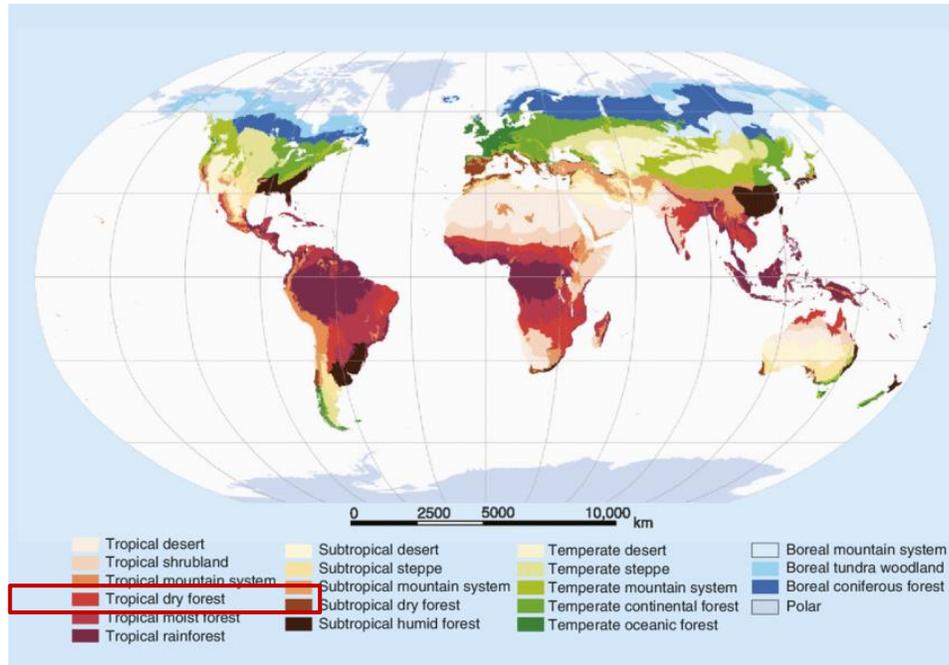
## **2. Fundamentación teórica**

### **2.1 Bosque seco tropical**

Los bosques secos tropicales se definen como ecosistemas que se encuentran en zonas de tierras bajas y calurosas, con pocas estaciones de lluvia, sus suelos son ricos en nutrientes y minerales lo que permite el cultivo de varios alimentos, además son conocidos por poseer una gran diversidad de árboles con madera de alta calidad (Banda et al., 2015). Cuando hay temporadas de ausencia de lluvia la vegetación tiene que sobrevivir con muy poca cantidad de agua, por lo cual se tiene que adoptar estrategias que les permitan reducir la pérdida en el calor o en el frío intenso, así mismo la mayoría de sus hojas son pequeñas, lo que permite que la vegetación reduzca el área de evapotranspiración, es decir, pérdida de agua (Morales & Arellano, 2023).

La distribución geográfica se encuentra localizada entre el Trópico de Capricornio y el Trópico de Cáncer, cerca de la Línea Ecuatorial, en Sur América, África y el sudoeste de Asia, posee una temperatura promedio de 25 grados centígrados, a pesar de ocupar tan solo el 6% del territorio global como se muestra en la Figura 1. En base a estudios realizados por (WWF, 2022) un kilómetro de este tipo de bosques puede albergar más de 100 especies de distintos árboles donde sus territorios representan alrededor del 80% de las especies documentadas en todo el mundo.

En Sonora, México, se hallan los bosques secos tropicales al norte, en el pasado, este tipo de ecosistema solía abarcar desde el norte de México hasta Centroamérica, sin embargo, en la actualidad, apenas subsiste un 15% de su extensión original, y lamentablemente, únicamente el 1% de este espacio cuenta con protección (Nature and Culture International, 2023).



*Figura 1: Distribución mundial del Bosque Seco Tropical.*

Fuente: (Schmitt, 2013)

Estos ecosistemas aportan una amplia gama de servicios ecosistémicos, frutos como níspero, mamoncillo y el hobo, variedades de pimienta y ají, fibras, maderas, plantas ornamentales compuestos como aceites esenciales, alcaloides, resinas, látex y fármacos (MINAMBIENTE, 2022).

La flora de este ecosistema se encuentra dominada por especies como guayacanes (*Tabebuia Chrysantha*), ceibos (*Ceiba Trichistandra*), palo santo (*Bursera Graveolens*), espinos (*Pseudobombax Millei*), muyuyo (*Cordia Lutea*), acacias (*Acacia Mill*), y una variedad de especies de árboles, con una altura de entre 18 a 20 metros, destacando el pasayo (*Eriotheca ruizii*), polo polo (*Cochlospermum Vitifolium*), algarrobos (*Prosopis Juliflora*), almendro (*Geoffroea Spinosa*), hualtaco (*Ficus Membranacea*) y el guarapo (*Terminalia Valverdeae*) (Riofrio, 2019).

El bosque seco tropical representa un banco genético in situ que poco a poco va siendo descubierto; las especies que se encuentran en estos ecosistemas podrían dar origen a diversos productos farmacéuticos, ser fuente de nuevos recursos genéticos y productos forestales no maderables como hongos, resinas, frutas y pienso para animales (Otero et al., 2006).

## **2.2 Bosque Cerro Paraíso**

En Ecuador este ecosistema se extiende a lo largo de la costa del Pacífico desde el sur de la provincia de Esmeraldas en el norte de Ecuador hasta la provincia de Guayas, terminando en el Golfo de Guayaquil (Baquero, 2017). En la ciudad de Guayaquil el Bosque Cerro Paraíso se encuentra ubicado en la parte alta del cerro San Eduardo, es un área natural situada dentro de la zona urbana de Guayaquil con una extensión de 299 hectáreas que destaca por su diversidad en aves con un número aproximado de 56 especies de aves terrestres y 11 especies de aves típicas de manglar, como lo son: “hornero del Pacífico”, “golondrina azuliblanca”, “vaquero brillante”, “fragata magnífica” o “martín pescador” (Torres, 2016) (Mendoza, 2012). A pesar de ser un área extensa y biodiversa, su flora no ha sido extensamente estudiada, aun así, alberga un sin número de ejemplares vegetales con alto potencial terapéutico.

## **2.3 Plantas medicinales en Ecuador**

Las plantas medicinales son aquellos vegetales de los cuales se elaboran productos con potencial terapéutico, estos componentes son llamados principios activos, que se definen como sustancias que ejercen una acción farmacológica, beneficiosa o perjudicial, sobre el organismo (Durán, 2019).

A lo largo del tiempo, el tratamiento de enfermedades con plantas medicinales ha sido una práctica muy común en las comunidades rurales, que se mantiene hasta la actualidad en el Ecuador y en muchos países alrededor del mundo (Gallegos Zurita, 2016). Del total de especies vegetales existentes en el planeta, solo un porcentaje menor al 10 % ha sido evaluado científicamente con fines medicinales, por lo que aproximadamente 15.000 plantas medicinales se encuentran en peligro de extinción (OPS, 2019).

Las plantas medicinales en Ecuador han sido durante años la solución de muchas afecciones que en conjunto con el conocimiento ancestral de diversas culturas se ha ido transmitiendo de generación en generación, de acuerdo con el docente e investigador de la Universidad Católica del Ecuador Omar Vacas “En Ecuador hay 2900 plantas de uso medicinal, entre las plantas más utilizadas se encuentran la sangre de drago, con 17%, el barbasco con 13%, la guayusa con 12%, la canela con 12%, y el chuchuwasu (utilizada ancestralmente para los dolores de cuerpo) con el 10% de utilización” (Flores, 2018). Entre las plantas medicinales más importantes para la población local de la provincia de Los Ríos ubicada en Ecuador destaca la sábila (*Aloe vera*) toronjil (*Melissa officinalis*), ruda de gallinazo (*Ruta graveolens*), valeriana (*Valeriana officinalis*), orégano (*Origanum vulgare*), hierba luisa (*Cymbopogon citratus*) y hoja del aire (*Kalanchoe pinnata*) (Buenaño et al., 2015).

Económicamente, entre las plantas que más se comercializa están la quinua, hierbas naturales y plantas medicinales tales como el cedrón (*Aloysia triphylla*), paico (*Chenopodium ambrosioides*), chilca (*Baccharis sp.*), matico (*Piper aduncum*), muña (*Minthostachys mollis*), isu (*Dalea coerulea*), amaranto, (*Amaranthus*), chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*), mashua (*Tropaeolum tuberosum*) y variedades de hortalizas aportando aproximadamente 175 millones de dólares anuales a la economía ecuatoriana hasta el 2008 (De la Torre et al., 2008).

#### **2.4 Descripción botánica de *Eriotheca ruizii*.**

Guayaquil, caracterizada como urbe dinámica, es el hogar de muchas especies vegetales con potencial medicinal aún sin estudiar, una de ellas es *E. ruizii*, también conocida tradicionalmente como pasayo cuya taxonomía se describe en la Tabla 1, es un árbol tipo caducifolio con una altura máxima de 20 m, característico por poseer madera suave con flores grandes y vistosas con pedúnculo como se muestra en la Figura 2, cáliz de 5 sépalos color verde cambiando a un café oscuro o canela al madurar (Benítez, 2021). Cabe destacar que, hasta la fecha, no se ha encontrado suficiente información sobre su composición química y sus posibles propiedades terapéuticas, no obstante, es utilizada en comunas para diversos fines. (Andrade & Jaramillo, 2012) mencionan que entre los usos tradicionales de *E. ruizii* se encuentra:

- La cocción de nódulos de las raíces para untarse en fracturas y sanar más rápido;
- La resina como cicatrizante para heridas;
- Tintura para ropa y alforjas extraído de la corteza;
- Forraje de hojas y frutos para el ganado vacuno y caprino;
- La elaboración de extractos y jugos para combatir la anemia.

Por otro lado, esta especie vegetal se usa tradicionalmente en comunas para tratar el salpullido y ronchas (Macías, 2015).



*Figura 2: Flor de E. ruizii.*  
 Fuente: (iNaturalist Network, 2023)

*Tabla 1. División taxonómica de E. ruizii.*

| Nombre científico | <i>Eriotheca<br/>ruizii</i> |
|-------------------|-----------------------------|
| Reino             | Plantae                     |
| Filo              | Tracheophyta                |
| Subfilo           | Angiospermae                |
| Clase             | Magnoliopsida               |
| Orden             | Malvales                    |
| Familia           | Malvaceae                   |
| Subfamilia        | Bombacoideae                |
| Género            | <i>Eriotheca</i>            |
| Especie           | <i>Eriotheca<br/>ruizii</i> |

Fuente:(Missouri Botanical Garden, 2023).

## 2.5 Extractos vegetales

Los extractos vegetales son preparados obtenidos de la extracción de diferentes sustancias vegetales a partir de diversos procesos, los principios activos presentes en cada planta son complejos fitoquímicos denominados metabolitos secundarios, que se pueden encontrar en gran variedad y diferentes concentraciones dependiendo de la especie (Delgado, 2023).

Los extractos de plantas se consideran las fuentes más apremiantes de biomoléculas, que pueden detectarse a partir de distintas partes de plantas, este procedimiento se logra utilizando varios solventes y métodos de extracción, un método típico para extraer extractos de plantas/biomoléculas de plantas es la filtración, Soxhlet y métodos exhaustivos en serie (Abdullahi et al., 2022).

Los extractos vegetales representan una opción prometedora como fuente de productos naturales bioactivos, más seguros y de bajo costo (Rodríguez-Montero et al., 2020). Las sustancias son extraídas directamente de las plantas, ya sea de sus frutos, semillas o de hojas, tallos y raíces, y tienen un uso muy variado en alimentación humana, animal, en la industria cosmética, y en el sector agrícola (Morera, 2023).

De acuerdo con (Abubakar & Haque, 2020) existen diversos factores por considerar en la elección del método de extracción, teniendo en cuenta que entre las más comunes están la maceración, percolación, lixiviación y arrastre por vapor:

- (a) Estabilidad al calor,
- (b) Naturaleza del disolvente,
- (c) Costo del producto final,
- (d) Duración de la extracción,

- (e) Volumen final requerido,
- (f) Uso previsto

## **2.6 Control de calidad del material vegetal**

En base a la normativa ecuatoriana “Fitoterápicos: Droga Cruda. Métodos de ensayo” se deben realizar ensayos al material vegetal antes de ser utilizada para la elaboración de extractos, estos se definen como:

- Identificación de materia extraña: Se refiere a todos los cuerpos extraños ajenos al material que se pueda visualizar macroscópicamente (Farmacopea, 2016).
- Contenido de humedad: Indica la cantidad de agua presente en un sólido, típicamente, se calcula la humedad utilizando un método termogravimétrico, que consiste en calentar la muestra y anotar la disminución de peso debido a la evaporación del agua, el límite permitido fluctúa entre 8 y 14% (Mettler-Toledo, 2022).
- Control microbiológico: Al elaborar extractos con material vegetal recogido del suelo puede acarrear consigo distintos tipos de microorganismos, en los que se incluyen: hongos, bacterias, causando contaminación, El recuento aeróbico total viable (TVC) del material herbario que se examina es determinado utilizando uno de los siguientes métodos: filtración por membrana, recuento en placas o dilución en serie (WHO, 2022).

## **2.7 Métodos de extracción de extractos vegetales**

### **2.7.1 Maceración**

Para la extracción por este método, es necesario hacer lisis de los tejidos vegetales como la pared celular para que penetre el solvente, esta técnica permite que el solvente (fase líquida) penetre en

los tejidos de la muestra vegetal conocida como fase sólida provocando que se ablande y se liberen fracciones solubles (Bejarano Navas et al., 2020).

En maceración, el material vegetal entero pulverizado se mantiene en contacto con el solvente en un recipiente tapado por un período determinado con agitación repetida hasta que la materia soluble se disuelve a temperatura ambiente por un período de 3 días (Rashid et al., 2021).

Esta técnica tiene ciertas limitaciones, como lo es el bajo rendimiento de extracción, la menor eficiencia y el uso de una gran cantidad de solventes que tienen muchos riesgos para la salud, además, la selección del solvente apropiado es importante a lo largo de la metodología para la extracción de extractos de plantas específicas (Farooq et al., 2022).

### **2.7.2 Lixiviación**

La lixiviación se define como un proceso donde se extrae uno o varios solutos de un sólido, mediante la utilización de un disolvente líquido, ambas fases entran en contacto y el soluto pueden difundirse desde la fase sólida a la fase líquida, como consecuencia se da una separación de componentes originales del sólido (Lopez, 2022).

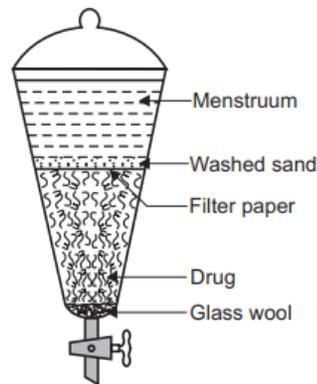
### **2.7.3 Percolación**

Es un método donde el mensturo atraviesa la fracción de especie vegetal pulverizada en un solo sentido, esto permite que se alcancen concentraciones de forma que el equilibrio entre el solvente dentro y fuera del marco nunca se alcanza, así, la muestra pulverizada mantiene todos sus componentes solubles de manera progresiva, representado en la Figura 3 (Carrión & García, 2019).

Entre las ventajas proceso de percolación de acuerdo con (Mukherjee, 2019), se incluyen:

- Consumo de menos tiempo y poca manipulación,

- Como la muestra se expone repetidamente al disolvente fresco, esta técnica es más adecuada para una extracción exhaustiva,
- Se puede utilizar un disolvente tanto frío como caliente.



*Figura 3: Estructura de un percolador.*  
Fuente: (Rutvik, 2023)

#### **2.7.4 Destilación por arrastre de vapor**

El procedimiento consiste en hacer pasar un flujo de vapor a través de la materia prima arrastrando consigo los aceites esenciales, luego, los vapores se enfrían y se condensan, dando lugar al destilado líquido que se encuentra formado por dos fases inmiscibles, la fase acuosa y la fase orgánica, conocida como aceite esencial. Estas se pueden separar por decantación debido a la diferencia de densidad existente entre ambas (Casado Villaverde, 2018).

La destilación al vapor es utilizada comúnmente para la extracción de aceites esenciales a temperaturas cercanas a los 100 °C, seguida de una condensación posterior que permite la formación de un líquido inmiscible del que se puede separar el aceite esencial en un clarificador (Moliterni et al., 2022).

Para estos tipos de compuestos, el material vegetal objetivo se puede moler antes de la destilación al vapor, esto hace que rompan las paredes celulares y se libere el aceite esencial facilitando su recuperación (Haq et al., 2023).

### 2.7.5 Extracción Soxhlet

En este método se utiliza un matraz de fondo redondo, una cámara de extracción, un tubo de sifón y un condensador en la parte superior, donde el material vegetal seco, molido y pulverizado se coloca dentro de una bolsa porosa hecha de un paño limpio o papel de filtro resistente y se cierra herméticamente como se muestra en la Figura 4 (Haque, 2020).

La principal ventaja de este método es el aumento de la tasa de transferencia de masa debido al uso de tanto altas temperaturas, como del reciclaje de disolvente fresco lo que mejora aún más el equilibrio de transferencia, esto hace que esta técnica sea mejor en términos de eficiencia de extracción, sin embargo, también depende del tipo de planta y solvente con el que se vaya a trabajar, no es un método adecuado para materiales vegetales termolábiles (Malik & Mandal, 2022).



*Figura 4: Equipo de extracción Soxhlet*  
Fuente: (Gerhardt, 2023)

### **2.7.6 Extracción asistida por ultrasonido**

Esta técnica se basa en la aplicación de sonidos de alta frecuencia y una cantidad limitada de solvente para producir una extracción efectiva de los compuestos contenidos en una matriz sólida (Herrero et al., 2012).

Este proceso implica la aplicación de energía de sonido a una frecuencia superior a 20 KHz para interrumpir todas las células de la planta y aumentar el área de superficie del fármaco para la penetración del disolvente, así, se liberarán metabolitos secundarios, se debe considerar que la muestra debe secarse primero, triturarse hasta obtener una potencia fina y tamizarse adecuadamente antes de realizar el proceso (Haque, 2020).

### **2.7.7. Liofilización**

La liofilización constituye un procedimiento en el cual el agua pasa de un estado sólido (hielo) a vapor mediante sublimación directa, eludiendo completamente la fase líquida, posteriormente, se procede a extraer el agua de la capa que queda "seca"(Nowak & Jakubczyk, 2020). Debido a la ausencia de agua líquida ya las bajas temperaturas requeridas para el proceso, se detienen la mayoría de los deterioros y reacciones microbiológicas lo que da un producto final de excelente calidad (Ratti, 2001).

La liofilización es un proceso complejo que consta de los siguientes pasos de acuerdo a (Nowak & Jakubczyk, 2020):

- La congelación del producto, más a menudo bajo presión atmosférica.
- Secado primario—secado por congelación adecuado—sublimación con hielo, la mayoría de las veces a presión reducida.

- Secado secundario—secado por desorción—secado del producto a la humedad final requerida.

## **Tamizaje fitoquímico y metabolitos secundarios de las plantas.**

### **2.8 Tamizaje fitoquímico**

El tamizaje fitoquímico se basa en la identificación de metabolitos secundarios presentes en los extractos de productos naturales, mediante reacciones y análisis químicos extraídos de plantas (Pujol et al., 2020). El tamizaje fitoquímico se le realiza seguidamente a los extractos etéreo, alcohólico y acuoso del producto natural con el propósito de identificar y comparar los metabolitos secundarios extraídos con cada disolvente de distintas polaridades (Castillo Mendoza et al., 2022). En esta técnica, se preparan extractos acuosos y orgánicos de aquellas muestras de plantas que son el reservorio de metabolitos secundarios, como por ejemplo hojas, raíces, tallos o corteza, para después, ser analizados con el objetivo de detectar la presencia de metabolitos como alcaloides, terpenos y flavonoides (Srivastava et al., 2014).

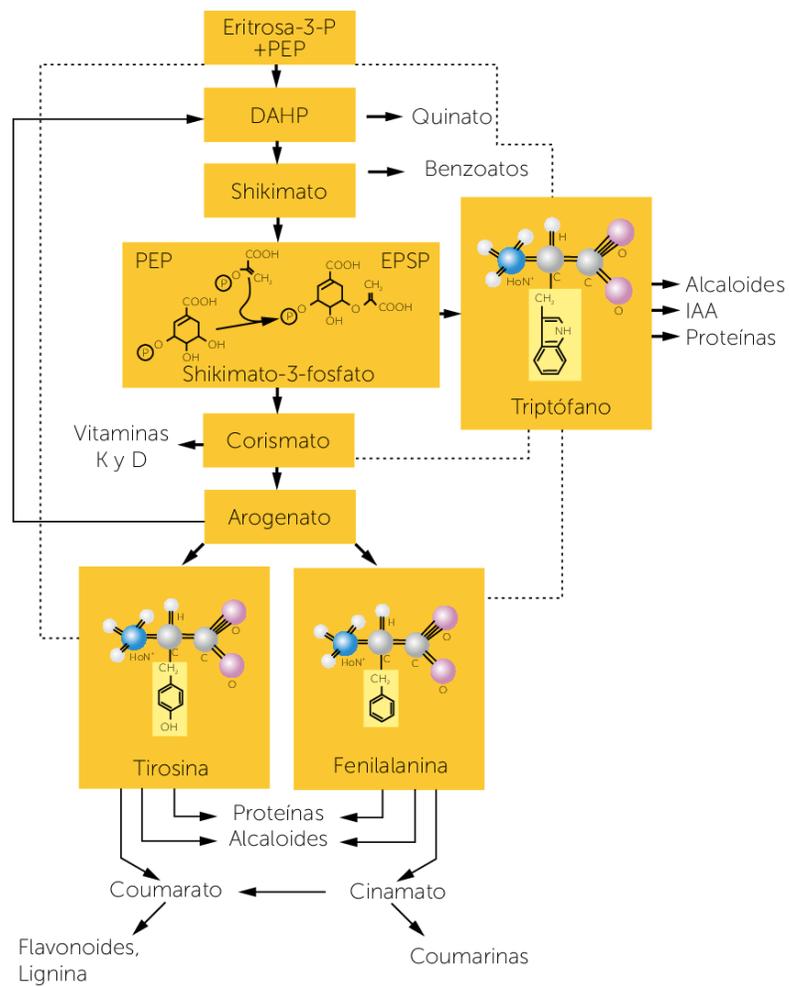
Los solventes apropiados para estos procedimientos pueden ser agua, acetona, alcohol, cloroformo y éter, por otro lado, existen otro tipo de solventes con funciones más específicas como el diclorometano, que se usa para la extracción de terpenoides (Bimlesh et al., 2011). Luego de la extracción, se llevan a cabo reacciones de coloración, que son sensibles, reproducibles y de bajo costo, algunas de las reacciones evalúan sustancias y otros la presencia de compuestos que pueden ser ácidos grasos, azúcares reductores, mucílagos y polisacáridos (Castillo et al., 2021).

## **2.9 Metabolitos secundarios**

Los metabolitos secundarios tienen una importante participación en la adaptación ante el estrés ambiental y en la defensa frente a potenciales depredadores y patógenos que causan enfermedades, estos metabolitos son producidos por las plantas por medio de su metabolismo y liberados cuando se encuentran inmersos en condiciones de estrés (Lustre Sánchez, 2022).

Aparte de las rutas metabólicas primarias que resultan cruciales para el desarrollo de las funciones vitales de las plantas, estas también presentan vías metabólicas adicionales que conducen a la formación de compuestos específicos, aunque estos compuestos no están directamente relacionados con los procesos esenciales de la célula, podrían tener importancia para el organismo en su conjunto, estas rutas metabólicas adicionales se agrupan bajo el término de metabolismo secundario (SEDICI, 2023).

En los organismos vivos se pueden diferenciar tres rutas biosintéticas que dan lugar a los metabolitos secundarios como se muestran en las Figuras 5 - 7:



*Figura 5: Ruta del ácido shikimico (Alcaloides y fenilpropanoides)*

Fuente: (Nissen, 2018)

### RUTA DEL ÁCIDO MEVALÓNICO

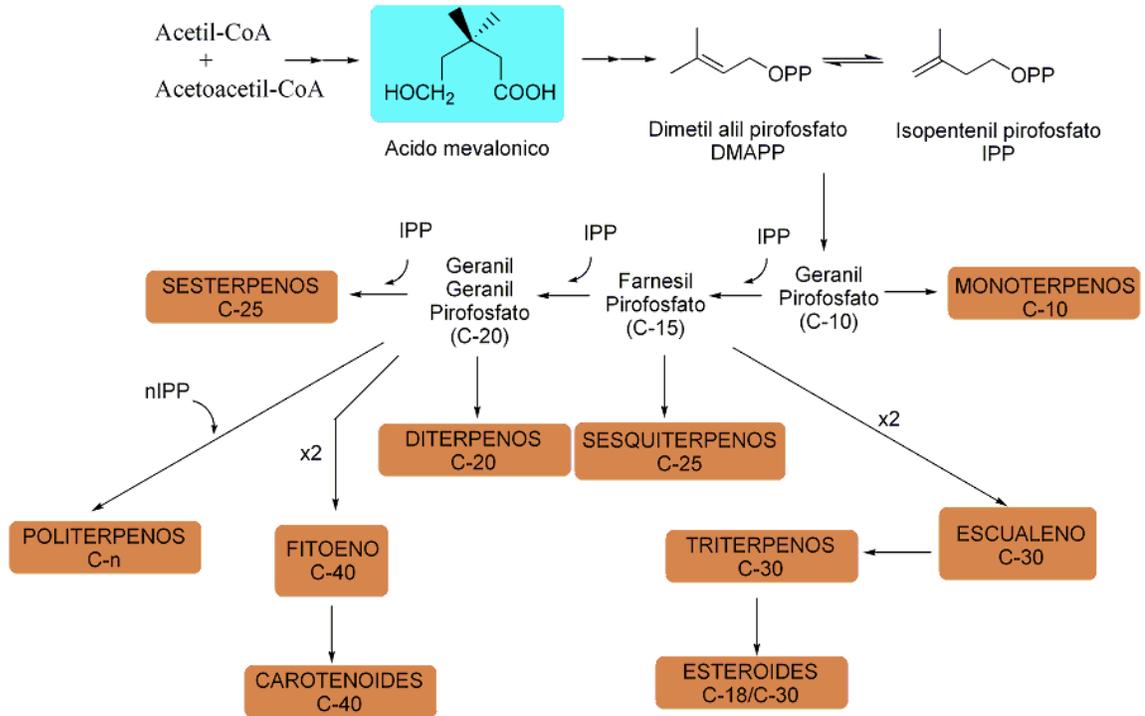


Figura 6: Ruta del acetato-mevalonato (Terpenos o isoprenoides)

Fuente: (Universidad de Grana, 2004)

## RUTA DE LOS POLICÉTIDOS

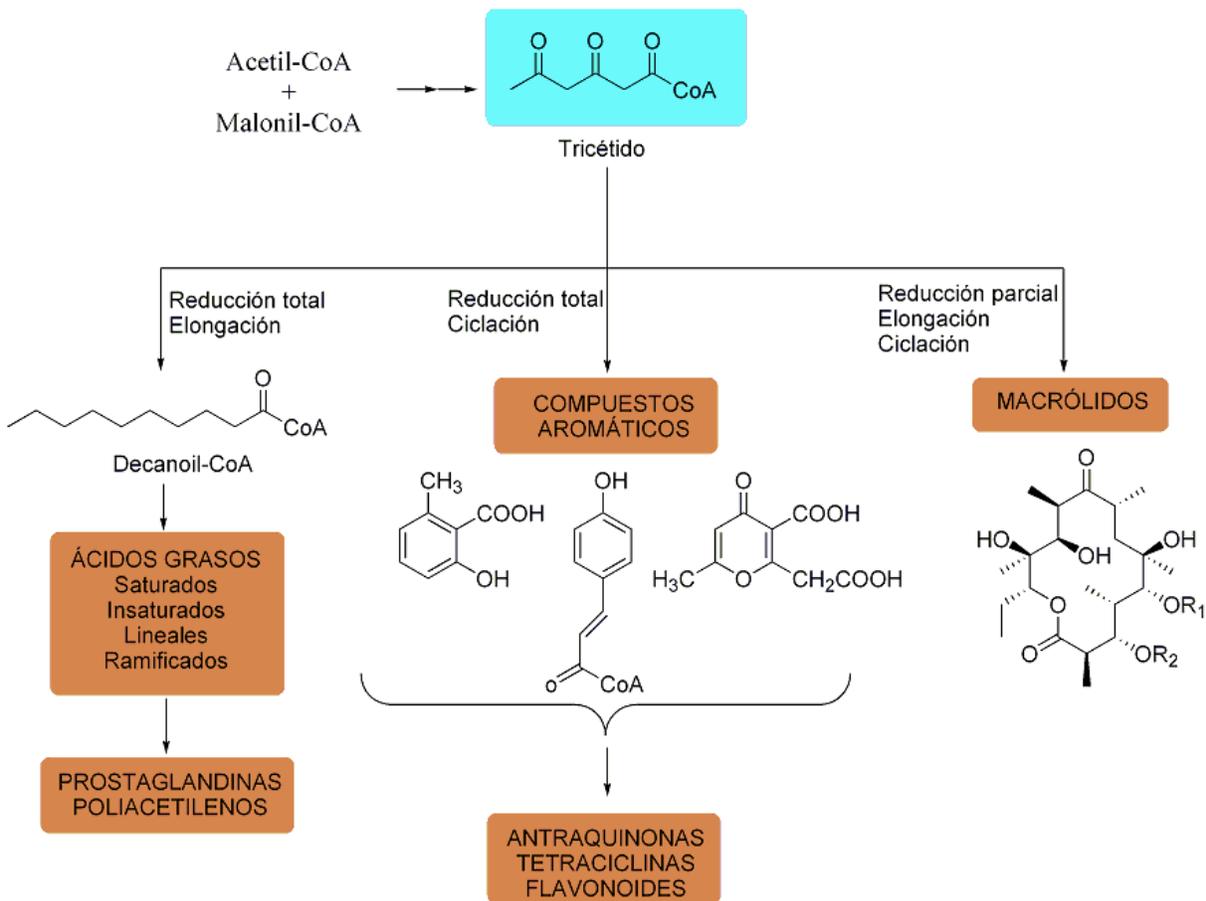


Figura 7: Ruta del acetato-malonato (Policétidos)

Fuente: Universidad de Grana, (2004)

Los metabolitos secundarios de acuerdo con (Ávalos & Pérez, 2009) se clasifican en cuatro clases principales.

- Terpenos: Pigmentos, hormonas o aceites esenciales.
- Compuestos fenólicos: Cumarinas, flavonoides, lignina y taninos.
- Glicósidos: Glicósidos cianogénicos, glicósidos cardiacos, glucosinolatos y saponinas.
- Alcaloides.

### **2.9.1 Terpenos**

Los terpenos son aquellos metabolitos secundarios sintetizados por vegetales derivados del isopreno, estos se polimerizan bajo acción enzimática de unidades y se clasifican en base al número de unidades de isopreno ensambladas en monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, hemiterpenos, tetraterpenos y triterpenos (Macías et al., 2010).

Los terpenos tienen funciones variadas, entre las cuales destacan; atraer polinizadores, proteger a las plantas de los herbívoros y actuar como insecticidas tóxicos, repelentes de insectos; estos pueden inhibir la actividad y el crecimiento de ciertos grupos microbianos mientras estimulan a otros (Chomel et al., 2016).

Varios monoterpenoides exhiben toxicidad contra los productos almacenados y las plagas urbanas, son buenos repelentes espaciales y podrían usarse en el control de plagas, y siendo los componentes principales de los aceites esenciales de las plantas, tienen alto efecto antibacterial (Gonzalez, et al., 2010).

### **2.9.2 Compuestos fenólicos**

Los fenoles se definen como metabolitos secundarios sintetizados por las plantas que actúan como fitoalexinas que son fenoles que secretan las plantas heridas para defenderse de posibles ataques fúngicos y que así mismo, contribuyen a la pigmentación de varias partes de la planta, también se consideran inestables ya que son sensibles a la oxidación (Gimeno, 2006; Pérez, 2014).

Estos compuestos pueden inhibir la absorción de amilasa en el tratamiento de la absorción de carbohidratos, como la diabetes, así mismo, los ácidos fenólicos y los flavonoides, podrían promover beneficios para la salud al reducir el riesgo de síndrome metabólico y las complicaciones relacionadas con la diabetes tipo 2 (Lin et al., 2016).

Se considera que los fenoles de las plantas desempeñan un papel clave como compuestos de defensa cuando el estrés ambiental, como la luz alta, la infección por patógenos, los herbívoros, las bajas temperaturas y la deficiencia de nutrientes, pueden contribuir a una mayor producción de radicales libres y otras especies oxidativas en las plantas (Lattanzio, 2013).

### **2.9.3 Glicósidos**

Muchos glicósidos son empleados en procesos biotecnológicos o como materias primas para la síntesis de diversos fármacos, como lo son los medicamentos esteroideos (anabolizantes, antiinflamatorios y anticonceptivos), además, muchos glicósidos presentan gran potencial terapéutico, actuando como inmunomoduladores y estimuladores de la respuesta inmune (Ferreira & Olivaro, 2022).

Los glucósidos representan un vasto grupo de productos metabólicos secundarios derivados de las plantas, que demuestran varias funciones, incluida la regulación del crecimiento, la alelopatía (inhibición del crecimiento de otras plantas) y los mecanismos de defensa contra el daño inducido por herbívoros y patógenos (Soto-Blanco, 2022).

Los glucósidos vegetales, así como los residuos glucosídicos, poseen una amplia gama de propiedades medicinales en enfermedades cardiovasculares, gastrointestinales, inflamatorias y cáncer (Gangasani et al., 2022).

### **2.9.4 Alcaloides**

Se denominan alcaloides a aquellos metabolitos secundarios que las plantas sintetizan a partir de aminoácidos, tienen en común la hidrosolubilidad en pH ácido y solubilidad en solventes orgánicos a pH alcalino (Beloqui Alcázar, 2023). Estos compuestos orgánicos de origen natural son

nitrogenados (Cordado & Escobar, 2013). El grupo incluye aproximadamente 12,000 productos, entre los cuales destacan los alcaloides indólicos, y derivados del triptófano. (Loyola et al., 2004). Los principales efectos tóxicos de los alcaloides resultan en alteraciones del sistema nervioso central, los procesos digestivos, la reproducción y el sistema inmunológico (Mohan et al., 2016). Se han detectado alcaloides en aproximadamente el 15% de las plantas, bacterias, hongos y animales, generalmente se encuentran en grupos primitivos como *Lycopodium* o *Equisetum*, en gimnospermas y angiospermas (Wink, 2016).

## **2.10 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)**

Se define como una técnica analítica fisicoquímica que proporciona una imagen clara de la composición metabólica de las hojas en un momento dado (Bobby et al. 2012). El análisis FT-IR se utiliza para identificar compuestos moleculares y funciona midiendo la absorbancia de la radiación infrarroja de una muestra, el espectro resultante se puede usar para identificar los grupos funcionales presentes en el compuesto (Mathias, 2022).

Cuando la radiación infrarroja (IR) atraviesa una muestra, parte de la radiación es absorbida, se registra la radiación que logra pasar a través de la muestra; dado que distintas moléculas, con sus estructuras únicas, generan espectros específicos, estos espectros pueden emplearse para la identificación y diferenciación de las moléculas (Celk, 2023). El método FT-IR mide las vibraciones de los enlaces dentro de los grupos funcionales químicos y genera un espectro que puede considerarse como una "huella digital" bioquímica o metabólica de la muestra (Nazneen & Wesely, 2012).

Se ha utilizado previamente para identificar las biomoléculas presentes en extractos de plantas de *Erythrina variegata*, *Myristica dactyloides*, y *Urtica dioica* (Pharmawati & Wrasati, 2020).

## **2.11 Actividad biológica**

### **2.11.1 Actividad antimicrobiana**

Existen varios mecanismos de acción antibacteriana que son desarrollados por plantas, por lo que los metabolitos implicados han sido estudiados a través de ensayos de susceptibilidad antimicrobiana y análisis fitoquímicos debido a que representan un alto potencial contra enfermedades de índole infeccioso que padece la población humana (Pesewu et al., 2008).

Aquellos extractos derivados a partir de las plantas y sus compuestos a través de estos procesos también se les evalúa el potencial biológico tanto en modelos biológicos *in vitro* e *in vivo*, un método de evaluación biológica son los denominados hongos fitopatógenos donde se expone el hongo a diferentes concentraciones de un extracto vegetal en medio agar selectivo, por ejemplo, PDA para evaluar y analizar su potencial (Mesa, 2019).

Los métodos para determinar la sensibilidad antimicrobiana basados en diluciones son más reproducibles que aquellos basados en la difusión en disco, por lo cual se considera que la micro dilución en caldo de cultivo es el método analítico actual de referencia (OMSA, 2023).

### **2.11.2 Resistencia microbiana**

De acuerdo con (Cavalieri et al., 2005) la resistencia antibacteriana se puede dar de las siguientes formas:

- 1) La bacteria produce una gran cantidad de enzimas que dañan el agente antimicrobiano antes que este alcance su objetivo, también pueden modificar este agente antimicrobiano haciendo que sea irreconocible ante su blanco;
- 2) la pared celular que posee la bacteria se vuelve impermeable ante el agente antimicrobiano, lo que impide su ingreso;

- 3) aquel sitio de ataque se alterado por mutación lo que ya no permite la unión del agente antimicrobiano al sitio de contacto con la bacteria;
- 4) La bomba de reflujo que la bacteria posee expulsa al agente antimicrobiano de la célula antes que este alcance su blanco;
- 5) las rutas metabólicas específicas que se encuentran dentro de la bacteria son alteradas genéticamente para que el agente antimicrobiano no pueda generar algún efecto específico

## **2.12 Métodos de prueba de susceptibilidad a los antibióticos**

### **2.12.1 Difusión en disco Kirby-Bauer**

Las pruebas de sensibilidad denominadas antibiogramas tiene la función de determinar la susceptibilidad de un microorganismo frente a medicamentos antibacteriales, el método de difusión en disco más usado se conoce como prueba de Kirby-Bauer, su procedimiento consiste en la colocación de discos impregnados con antibióticos en placas de agar que deben ser previamente inoculadas con el microorganismo a probar, después del periodo de incubación (16 horas a 18 horas), se mide el diámetro de la zona de inhibición que se forma llamado “halo” que rodea a cada disco como se puede apreciar en la Figura 8, cada combinación de microorganismo-antibiótico posee diámetros distintos que implican que es S, I o R (Vazquez-Pertejo, 2023).

La difusión en disco es sencilla, reproducible siempre y cuando esté estandarizada, y no necesita de una infraestructura costosa, como menciona (Cavaliere et al., 2005) entre sus ventajas destacan:

- i) Bajo precio,
- ii) Facilidad para la modificación de la prueba mediante el cambio de los discos cuando se requiera,

- iii) Aplicable a distintos tipos de cepas,
- iv) Posibilidad de identificación de subconjunto de cepas para pruebas futuras.



*Figura 8: Prueba de Kirby-Bauer: Difusión en discos.*

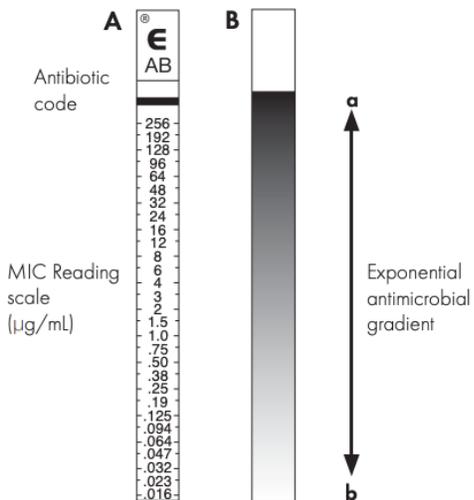
Fuente: (Libretexts, 2022)

### **2.12.2 Difusión de disco de gradiente Etest**

Etest es una técnica cuantitativa para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de Gram negativos y bacterias aerobias Gram positivas, se basa en una combinación de los conceptos de dilución y difusión donde Etest cuantifica directamente la susceptibilidad antimicrobiana en valores MIC discretos denotados en la Figura 9, pero, al usar un gradiente de concentración de antibiótico predefinido, estable y continuo, los valores de MIC de Etest pueden ser más precisos y reproducibles que los resultados obtenidos con los procedimientos convencionales basados en diluciones en serie dobles discontinuas (Biodisk, A, 2023).

En esta técnica se incorpora una serie de diluciones dobles de un antibiótico en una tira de soporte de plástico desde donde el antibiótico se difunde en el agar de forma que crea un gradiente de difusión a lo largo de la tira representado en la Figura 10, luego de la incubación durante la noche,

la MIC se lee como el punto donde la elipse de inhibición del crecimiento se cruza con la escala MIC en la tira (Kahlmeter & Brown, 2010).



*Figura 9: Configuración de gradiente Etest*  
Fuente: (Biodisk, 2023)



*Figura 10: Aislamiento de Staphylococcus aureus probado por el método de difusión de gradiente E-test*

Fuente: (Tankeshwar, 2022)

### 2.12.3 Dilución en agar

En este método el antibiótico que se probará contra una bacteria específica y se incorpora directamente en el medio de agar demostrado en la Figura 11, luego, las bacterias se inoculan en la superficie de la placa de agar, para después dejar incubar las placas y permitir que crezcan durante un período de 16 a 20 horas; Aunque solo se puede probar una concentración de antibiótico por placa de agar con esta metodología, se pueden probar múltiples organismos en una sola placa usando replicadores de inóculo, sin embargo, este método aún necesita una inspección manual para determinar los valores de MIC y, por lo tanto, a veces puede malinterpretarse si la zona de inhibición no es discernible (Puttaswamy et al., 2018).

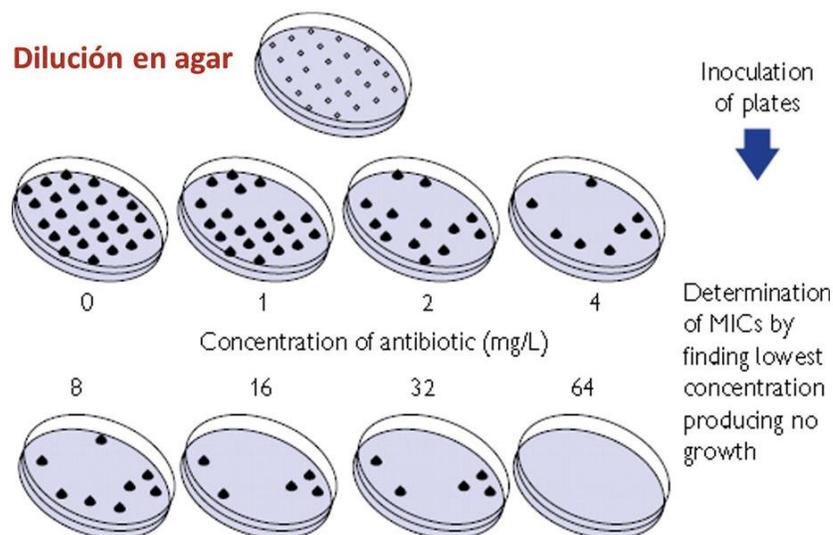


Figura 11: Metodología de la dilución en agar.

Fuente: (Buelna, 2015)

### 2.12.4 Macro dilución en caldo

En la dilución en caldo, se preparan diluciones dobles consecutivas (1, 2, 4, 8 y 12  $\mu\text{L}$ ) de antibióticos y se dispensan en tubos de microcentrífuga contenidos de medio de crecimiento bacteriano mostrado en la Figura 12, seguido de completar el volumen final agregando el medio e incubando durante la noche a 35 °C, para luego analizar el crecimiento con el objetivo de establecer el punto de corte a través de la turbidez de los medios de cultivo (Khan et al., 2019).

En esta técnica las bacterias de interés se aíslan para obtener colonias individuales en una placa de agar, suspendida en medio, diluida correctamente y añadido a cada tubo para así obtener una concentración final de aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC/ml (Puttaswamy et al., 2018).

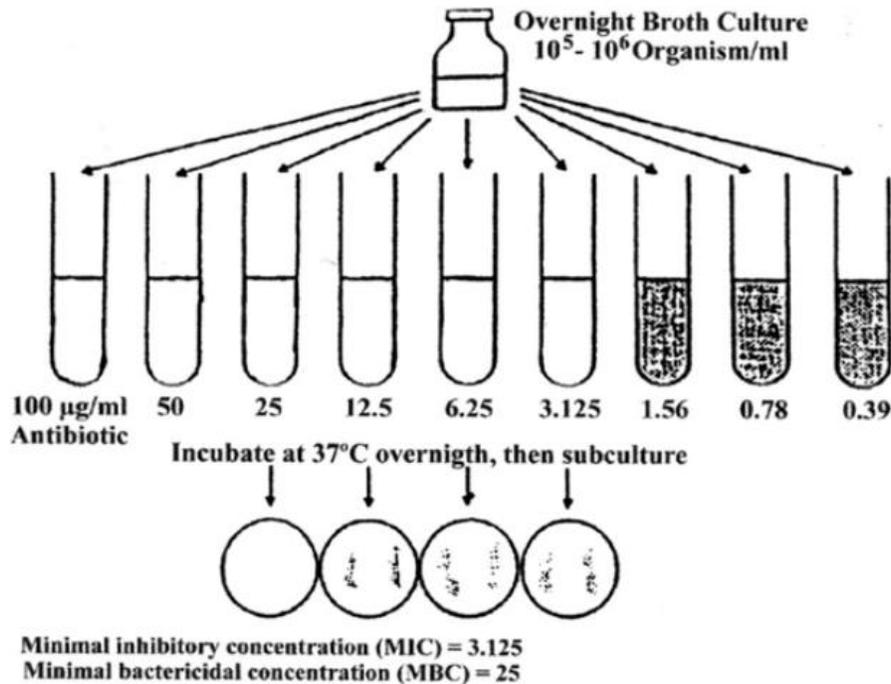


Figura 12: Esquema del método de macrodilución en caldo  
Fuente: (Malbrán, 2012)

### **2.12.5 Micro dilución en caldo**

Este método se utiliza para determinar la concentración mínima bactericida (MBC) así como la concentración mínima inhibitoria (MIC), que se define como la “concentración más baja de solución que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo específico después de ser incubado por 24 horas” (Ramirez & Marin, 2009).

La técnica de dilución en caldo emplea microplacas que contienen concentraciones ascendentes del extracto vegetal en análisis como se muestra en la Figura 13, este extracto se introduce en los distintos pozos de las microplacas y, después de un periodo determinado, se establece la Concentración Mínima Inhibitoria, conocida como MIC. (Ramirez & Marin, 2009).

El volumen final de cada pocillo es por lo general de 100µl de caldo con distintas concentraciones de antibiótico, donde luego se agrega 50 µl de suspensión bacteriana estandarizada. (Instituto de Salud Pública, 2015).

Los beneficios esta técnica son el ahorro de tiempo y reactivos, así mismo se necesita un mínimo espacio de trabajo, además, se considera actualmente como el estándar de oro y el método de referencia con un mayor grado de automatización, ya que proporciona una evaluación objetiva cuantitativa de la AST in vitro (Khan et al., 2019).

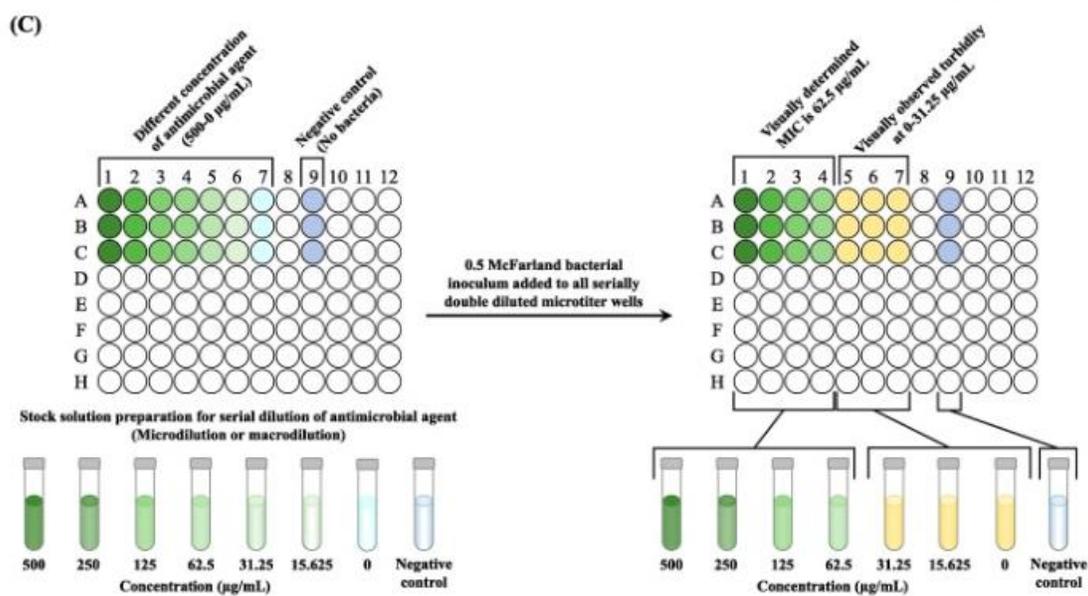


Figura 13: Procedimiento gráfico de micro dilución en placas multipocillo

Fuente: (Salam et al., 2023).

### 2.12.6 2,3,5-Trifeniltetrazolio Cloruro (TTC)

El TTC se emplea como aditivo en los medios de cultivo para detectar actividad biológica, dado que su forma incolora se transforma mediante hidrogenación o reducción en un pigmento rojo insoluble denominado trifenilformazán, el cual es fácilmente observable, si las células se mantienen vivas su coloración es roja mientras que si las células mueren, la coloración se mantiene amarilla tal como se puede apreciar en la Figura 14, este compuesto es sensible a la luz y la temperatura, lo que puede causar cambios en su color con el tiempo, variando desde un tono amarillo claro hasta un rojo intenso, por lo tanto, se debe almacenar en refrigeración y alejado de la luz directa (Atlas, 2010).

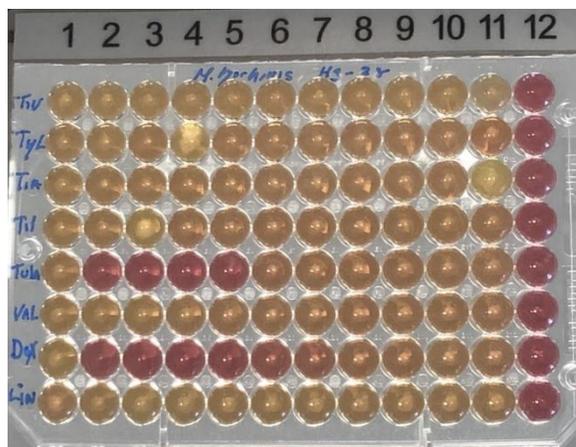


Figura 14: Resultado de microdilución en caldo en placa de 96 pocillos.  
Fuente: (IUSA-ULPGC, 2020)

### 2.13 Actividad antioxidante por método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

Los antioxidantes son esenciales para combatir radicales libres, es decir, pierden electrones y se mantienen estables, estas sustancias comprenden una amplia variedad de compuestos entre los que destacan: vitaminas, minerales, compuestos de material vegetal, por lo que se puede decir que los antioxidantes son esenciales para la salud humana, así mismo, son ampliamente estudiados y a menudo se encuentran en fuentes vegetales (Rodrigues et al., 2017).

Se han descrito varias técnicas para evaluar la capacidad antioxidante de alimentos y plantas medicinales, pero la que ha recibido atención preferente es la que emplea el radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo, abreviado como DPPH (Guija et al., 2014).

Este método determina actividades de captura de material radicalario, en presencia de una sustancia antioxidante, midiendo el potencial de inactivación de dicho radical en medio acuoso (Jiménez et al., 2012).

### **2.13.1 Valor IC<sub>50</sub>**

Es la concentración de una droga en particular que se necesita para inhibir un proceso biológico determinado hasta la mitad del máximo y proporciona una medida de la eficacia de un compuesto (Swinney, 2011).

## 2.14 Diseño de experimentación

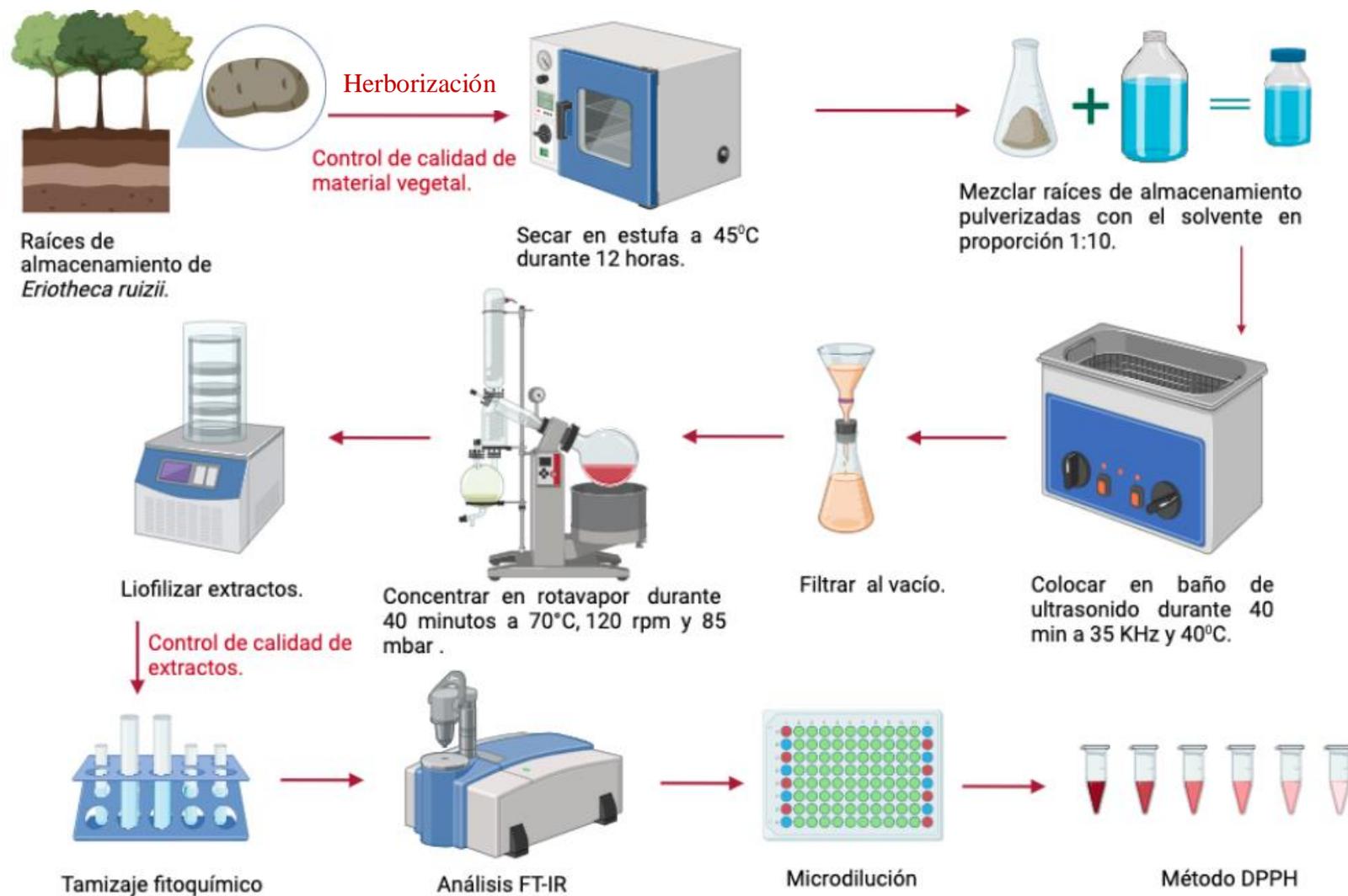


Figura 15. Metodología propuesta para el desarrollo del proyecto de investigación. Elaborado por: Biorender & Ganchozo, (2023)

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Localización e identificación de material vegetal

Las raíces de almacenamiento de *E. ruizii* fueron recolectadas en el Cerro “Paraíso” ubicado en la parroquia Tarqui de la ciudad de Guayaquil, con las siguientes coordenadas geográficas: 2°10'15.9"S 79°55'40.0"W entre los meses de Junio y Julio del año 2023 en temporada de lluvia que generalmente se lleva a cabo en invierno desde Junio – Octubre.

La identificación taxonómica se realizó por el Herbario de la Universidad Politécnica Salesiana a cargo del profesor Jaime Naranjo Morán, además del uso de la aplicación digital “iNaturalist”.

El tamizaje fitoquímico y la determinación de actividad antioxidante se llevó a cabo en los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Guayaquil, Campus María Auxiliadora, mientras que las pruebas microbiológicas y análisis FT-IR se realizaron en los Laboratorios de Ciencias de la Vida Sede Cuenca, Campus El Vecino.

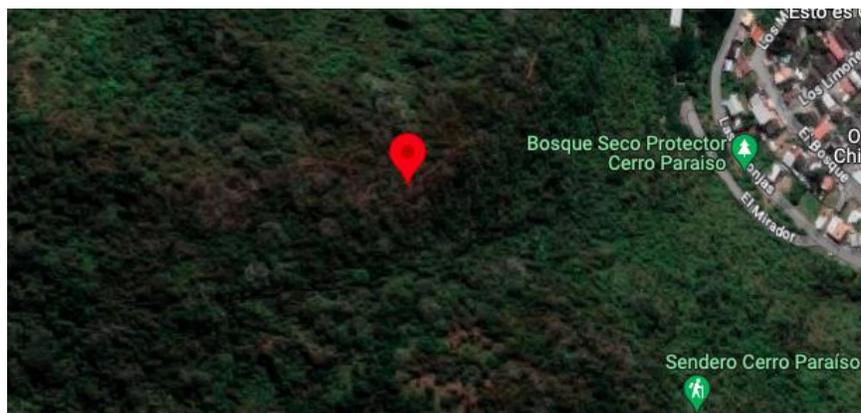


Figura 16. Localización de la recolección de las raíces de almacenamiento de *E. ruizii*.  
Fuente: (Google Earth, 2023)

### **3.2 Control de calidad del material vegetal**

Se tomó como referencia la normativa ecuatoriana “Fitoterápicos: Droga Cruda. Métodos de ensayo”.

#### **3.2.1 Control fisicoquímico**

##### **a) Control macroscópico**

Se realizó en base a la selección de raíces de almacenamiento libres de cortes e imperfecciones en la pulpa, misma que se caracteriza por poseer partes oscuras y secas.

##### **b) Determinación de humedad**

Se llevó a cabo mediante el equipo *Mettler Toledo (HB43-S)* siguiendo las especificaciones del fabricante, donde se tomaron 5 g de raíces de almacenamiento pulverizadas y se colocaron en el pocillo del analizador.

#### **3.2.2 Control microbiológico**

Para la determinación del control microbiológico se usó de placas Petrifilm™ de 3M™ para aerobios totales AC y mohos y levaduras YM, donde colocó una gota de extracto, se incubó durante el tiempo indicado para cada tipo de microorganismo, transcurrido el tiempo se verifican las placas donde, si se observan marcas de color rojo es indicativo de presencia de aerobios y verdes-azulados para la presencia de levaduras.

Para la medición de este parámetro no se tomaron en cuenta los extractos alcohólico e hidroalcohólico debido a la naturaleza antiséptica del solvente elegido.

### 3.3 Elaboración de extractos

#### Obtención de los extractos alcohólico, hidroalcohólico y acuoso.

El material vegetal recolectado se cortó en trozos usando un rallador convencional y luego se secó en una estufa marca *Binder* como se observa en la Figura 16, a 45 °C por 24 horas, se pulverizó con un molino para luego ser pasado por un tamiz de 850 con el objetivo de obtener una muestra homogénea.



*Figura 16. Secado del material vegetal en estufa.*  
Fuente: (Ganchozo, 2023)

Para obtener los extractos fueron mezclados 10g de las raíces de almacenamiento pulverizadas junto a 100 mL de cada solvente utilizado (agua destilada estéril, alcohol al 96%) siguiendo la metodología de (Raj et al., 2023). Con el fin de optimizar el proceso de extracción de moléculas de interés aumentando a su vez el rendimiento del extracto final se colocaron viales ámbar en un baño ultrasónico marca *iSonic* P4860, método conocido como extracción asistida por ultrasonido, con un sistema de control de temperatura a 40°C y un sistema de circulación a una frecuencia

constante de 35 KHz mostrado en la Figura 17. Los niveles de tratamiento con ultrasonido consistieron en un nivel de tiempo de extracción de 40 min y un nivel de intensidad de sonido al 100 % de acuerdo con la técnica empleada por (Safarzaei et al., 2020).



*Figura 17. Baño de ultrasonido.*  
Fuente: Ganchozo, (2023)

Después de los tratamientos de ultrasonido, los extractos se filtraron al vacío por succión usando una bomba marca *GAST* unida por una manguera a un matraz Kitasato conectado mediante un cono de goma a un embudo de vidrio en el cual se coloca papel filtro *Whatman* No. 1 para eliminar impurezas de los extractos como se muestra en la Figura 18.



*Figura 18. Filtración de extractos.*  
Fuente: (Ganchozo, 2023)

Luego, tanto el extracto alcohólico e hidroalcohólico se concentraron usando un rotavapor marca *Heidolph* durante 40 minutos a 70°C, 120 rpm y 85 mbar (Azmin & Mat Nor, 2020).

Para realizar el tamizaje fitoquímico con el extracto alcohólico se siguió la misma metodología usando la proporción original (1:10), con la ligera modificación en la concentración parcial del extracto en el rotavapor, pasando de media hora a 15 minutos con el objetivo de obtener un extracto líquido.

Los extractos se almacenaron en contenedores ámbar de 250 mL a -4 °C hasta su posterior uso.

### **3.4 Liofilización**

Para el proceso de liofilizado de los extractos alcohólico e hidroalcohólico se utilizó un equipo *Christ Alpha 1-4LSC*, con las siguientes condiciones: temperatura de congelación del condensador de -50°C, presión de vacío 0,04 mBar, secado principal 4 horas y secado final 3 horas, para finalmente ultracongelar los extractos a -80°C en base a metodología de (Cheaib et al., 2018).

### **3.5 FT-IR**

Para el análisis de FT-IR de los extractos liofilizados se empleó un equipo *Nicolet iS10* en un rango de lectura de 400-4000  $cm^{-1}$  con corrección ATR marca *Thermo Scientific*, y accesorio ATR “*Smart iTx*” con diamante.

### **3.6 Tamizaje fitoquímico**

Con el objetivo de determinar la composición química de compuestos de interés, se realizaron distintas pruebas para la identificación de metabolitos secundarios tanto en los extractos acuosos,

hidroalcohólico y alcohólico luego de ser filtrados por succión y concentrados mediante rotavapor, es importante mencionar que todas las pruebas fueron realizadas por triplicado.

A continuación, en la Tabla 2, se presentan las pruebas realizadas con su metabolito a caracterizar:

*Tabla 2. Ensayos realizados para la determinación de distintos metabolitos*

| <b>Ensayo</b>   | <b>Metabolito secundario</b> |
|-----------------|------------------------------|
| Mayer           | Alcaloides                   |
| Dragendorff     |                              |
| Wagner          |                              |
| Benedict        | Carbohidratos                |
| Ninhidrina      | Proteínas                    |
| Peróxido        | Saponinas                    |
| Molisch         |                              |
| Baljet          | Lactonas sesquiterpénicas    |
| Shinoda         | Flavonoides                  |
| Ácido sulfúrico |                              |
| Zinc            |                              |
| Espuma          | Glucósidos de saponina       |
| KOH             | Cumarinas                    |

Elaborado por: Ganchozo, (2023)

La metodología seguida para este procedimiento se basa en la técnica empleada por (Kancherla et al., 2019) con las siguientes especificaciones:

### 3.6.1 Determinación de alcaloides

- a) **Ensayo de Mayer:** Se agregó en un tubo de ensayo 3 gotas de extracto más 3 gotas de reactivo, si al cabo de unos minutos se forma un precipitado amarillento o blanco, la prueba es positiva.
- b) **Ensayo de Dragendorff:** Se agregó 3 gotas de extracto más 3 gotas de reactivo de Dragendorff, la formación de un precipitado color naranja marrón se considera positivo.
- c) **Ensayo de Wagner:** En un tubo de ensayo se colocó 3 gotas de extracto más 3 gotas de reactivo de Wagner, si se forma un precipitado floculento color marrón por mezclarse con solución de alcaloides en ácido diluido, el ensayo se considera positivo.

### 3.6.2 Determinación de carbohidratos

- a) **Ensayo de Benedict:** Se agregaron 8 gotas de extracto en un tubo de ensayo y 5 mL del reactivo de Benedict, seguido, se calentó en una plancha durante 5 minutos, si se forma un precipitado de color rojo oscuro la prueba es positiva.

### 3.6.3 Pruebas para la determinación de saponinas

- a) **Ensayo de peróxido:** Se agregó 3 gotas de extracto más 2 gotas de  $H_2O_2$  y se calentó el tubo durante 2 minutos, transcurrido el tiempo, se considera positivo si en el tubo de ensayo se visualiza la presencia de espuma.
- b) **Ensayo de Molisch:** En un tubo de ensayo se colocó 5 mL de extracto más 2 gotas de solución de alfa naftol diluido al 1% en etanol, seguido este paso se depositó por las paredes

del tubo del ensayo 1.5 mL de ácido sulfúrico concentrado, si se forma un anillo violeta se indica la presencia de saponinas.

#### **3.6.4 Pruebas para la determinación de proteínas**

- a) **Ensayo de Ninhidrina:** Se colocó en un tubo de ensayo 2 gotas de ninhidrina diluida al 0,2% más 1 mL de extracto, si al cabo de unos minutos se visualiza una tonalidad violeta en el tubo de precipitación se considera el ensayo como positivo.

#### **3.6.5 Pruebas para la determinación de Lactonas sesquiterpénicas**

- a) **Ensayo de Baljet:** Se colocaron 4 gotas de extracto en un tubo de ensayo más 3 gotas de una solución en proporción 1:1 preparada a partir de:
- Solución A: 10 g de ácido pícrico diluido en 100 mL de agua destilada
- Solución B: Hidróxido de sodio en una concentración al 10%
- Al cabo de unos minutos si la solución se torna naranja o rojo oscuro el ensayo es positivo para lactonas sesquiterpénicas, mientras que si la coloración es azul o violeta es positiva para glucósidos cardiotónicos.

#### **3.6.6 Pruebas para la determinación de Flavonoides**

- a) **Ensayo de Shinoda:** Se colocó en un tubo de ensayo 3 gotas de extracto, 0,5 cm de cinta de magnesio y 4 gotas de HCl concentrado, las distintas tonalidades observadas se asocian a distintos flavonoides.

- b) Ensayo de ácido sulfúrico:** En un tubo de ensayo se agregó 3 gotas de extracto más 3 gotas de ácido sulfúrico y se dejó reposar durante unos minutos, las distintas tonalidades observadas entre rojo y violeta se asocian a distintos flavonoides.
- c) Ensayo de Zinc:** Se colocaron 3 gotas de extracto en un tubo de ensayo seguido de 0,5 g de zinc en polvo y 4 gotas de HCl concentrado, si se visualiza una tonalidad roja es positivo para leucoantocianidinas mientras que si la coloración es café amarillento es positivo para catequinas.

### **3.6.7 Pruebas para la determinación de Saponinas**

- a) Ensayo de espuma:** En un tubo de ensayo se colocó una pequeña cantidad de extracto y se batió constantemente con agua, si se forma una espuma persistente, el ensayo es positivo.

### **3.6.8 Pruebas para la determinación de Cumarinas**

- a) Ensayo de KOH:** Se agregó 3 gotas de extracto más 3 gotas de KOH al 5%, al cabo de unos minutos si se visualiza el cambio de tonalidad de rojo a amarillo se considera el ensayo como positivo.

### 3.7 Actividad Biológica

#### 3.7.1 Actividad antimicrobiana

La actividad antibacteriana de los extractos orgánicos (alcohólico e hidroalcohólico) fueron examinados contra 2 tipos de cepas bacterianas de referencia obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC): Gram negativa: *Escherichia coli* (ATCC 8739) y Gram positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). El número ATCC se seleccionó en base al historial de investigación y la ficha de información de cada microorganismo pertinente (Anexo 1)

Se utilizó como control natural terpineol al 96% de pureza debido a su alto potencial antimicrobiano, penicilina líquida como control sintético y DMSO (dimetilsulfóxido) como blanco.

#### 3.7.2 Reactivación de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas fueron mantenidas y reactivadas de acuerdo con los siguientes parámetros mostrados en la Tabla 3:

Tabla 3. Condiciones de crecimiento de microorganismos empleados.

| Microorganismo                           | Medio de cultivo        | Temperatura | Tiempo (horas) | Atmósfera |
|--|-------------------------|-------------|----------------|-----------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) | Agar/Caldo              | 37 °C       | 24- 48         | aerobia   |
|  | Tryptic Soy Broth (TSB) |             |                |           |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)      | Agar/Caldo              | 37 °C       | 24- 48         | aerobia   |
|  | Tryptic Soy             |             |                |           |
|  | Broth (TSB)             |             |                |           |

Elaborado por: Ganchozo, (2023)

### **3.7.3 Preparación de las concentraciones de los extractos de *E. ruizii*, terpineol y penicilina.**

Para las pruebas antibacterianas se utilizó extracto alcohólico blando mientras que el extracto hidroalcohólico líquido, ambos al 20%, para lo que se diluyeron 0,5g de extracto alcohólico en 2,5 mL de DMSO y 2,7 mL de extracto hidroalcohólico en 10 mL de DMSO. Para el terpineol se tomó 1 mL y se diluyó en 4 mL de DMSO, finalmente se diluyeron 250 µL de penicilina en 4 mL de DMSO.

Todos los extractos y controles fueron preparados en viales ámbar de 5 mL, colocados durante 30 minutos en el ultrasonido a 40°C, filtrados con jeringas *Whatman* de 0,45 µm y almacenados a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

### **3.7.4 Estandarización de los inóculos bacterianos**

Se sembraron las bacterias descritas anteriormente en la Tabla 3 tomando dos muestras con un asa estéril de unidad formadora de colonia (UFC) de la placa de agar contenida del microorganismo y se colocó en un tubo de ensayo con 5 mL de caldo cultivo TSB previamente preparado, dejándolo incubar durante 24 horas a 37 °C.

Luego de las 24 horas, se confirmó el crecimiento mediante la visualización de turbidez y sedimento en el tubo de ensayo, y se almacenó en el refrigerador a 23 °C con el objetivo de evitar la reproducción de más bacterias lo que pudiera agotar los nutrientes disponibles, para ser posteriormente mezclados durante 3 minutos en un vórtex al momento de ajustar la turbidez.

Se ajustó la turbidez del inóculo a un patrón 0,5 en la escala McFarland lo que equivale a un aproximado de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL de suspensión utilizando un espectrofotómetro en una longitud de onda de 625 nm de acuerdo con la técnica de (Moussaoui et al., 2019) la densidad óptica obtenida debe ser entre 0,08 y 0,1 nm.

### 3.7.5 Inoculación en placas multipocillo.

Las microplacas de 96 pocillos fueron previamente esterilizadas y se usó una por microorganismo realizando todas las pruebas en una cámara de flujo laminar. En la primera fila denominada A se colocó 180  $\mu$ L de caldo TSB con una micro pipeta multicanal S6 marca *Rainin*, para luego disminuir la cantidad a 100  $\mu$ L en las siguientes filas (B a H). Luego se adicionó en la fila A 20  $\mu$ L de los extractos al 20%, controles naturales y sintéticos (terpineol y penicilina) todos diluidos previamente con DMSO como se muestra en la Figura 20.

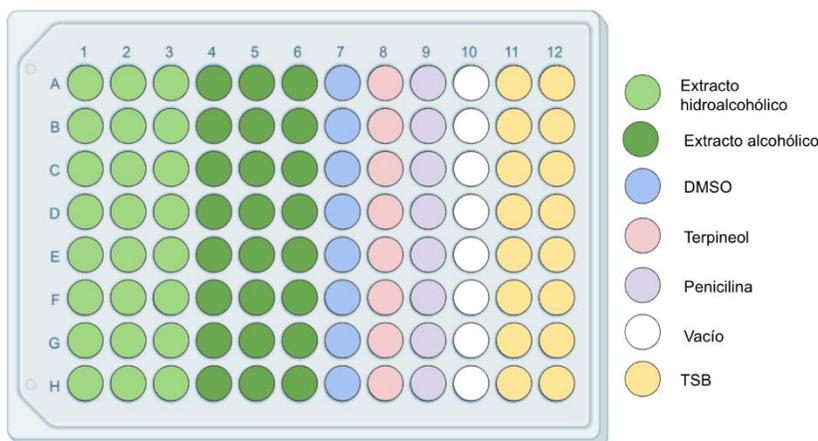


Figura 19: Distribución de extractos y controles en las placas multipocillo.

Fuente: (Biorender & Ganchozo, 2023)

Utilizando la micro pipeta multicanal se homogenizaron las soluciones en la fila A, para luego tomar 100  $\mu$ L y mezclarlo con el contenido de la fila B y así consecutivamente hasta llegar a la

fila H, donde los 100  $\mu\text{L}$  sobrantes se desecharon, esto con el objetivo de disminuir la concentración de las soluciones a medida que se pasaba a la siguiente fila.

Luego, se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de inóculo perteneciente a *E. coli*, previamente ajustado a un patrón 0,5 en la escala Mc Farland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) y 50  $\mu\text{L}$  de *S. aureus*.

Una vez agregado el inóculo se sellaron con papel aluminio y se incubaron durante 24 horas de acuerdo con las condiciones de cada microorganismo anteriormente descritas en la Tabla 3.

### **3.7.6 Preparación y adición de colorante 2,3,5 cloruro de trifeniltetrazolio (TTC)**

El colorante TTC con una pureza de 99% se preparó al 1% mezclando 100 mg en 10 mL de agua destilada estéril siendo colocado en un vial ámbar de 5 mL y refrigerado a  $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso, es importante que este sea preparado máximo hasta 24 horas antes para evitar así perder sus propiedades químicas.

Luego de las 24 horas de incubación de las placas multipocillo, se adicionó un volumen de 20  $\mu\text{L}$  para *E.coli* y 40  $\mu\text{L}$  para *S. aureus* respectivamente, una vez realizado este paso se procedió a incubar las placas selladas en papel aluminio durante 10 minutos para su posterior lectura.

### **3.7.8 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)**

Transcurrido los 10 minutos de incubación establecidos, (Mckens, 2023) se reduce la solución incolora de sal de tetrazolio a un compuesto rojo denominado formazán donde las células vivas se vuelven rojas mientras que las células muertas permanecen incoloras (Anexo 2).

Para determinar el efecto de los extractos junto al TTC se evaluó la MIC de forma cuantitativa midiendo la turbidez producida por las bacterias utilizando un lector Micro Elisa marca *Eliread* de 4 filtros.

### **3.8 Actividad antioxidante**

#### **3.8.1 Preparación del reactivo DPPH y estándar**

Para la elaboración del ensayo antioxidante se usó la técnica DPPH donde se procedió a pesar 10 mg del reactivo y se diluyó en 250 mL de etanol, mientras que como estándar se utilizó ácido ascórbico 100 ppm del cual se diluyó 5mg de ácido ascórbico en 500 mL de etanol.

Una vez preparados se sometieron a 20 minutos de ultrasonido y se filtraron utilizando jeringas *Whatman* de 0,45  $\mu\text{m}$  con el objetivo de eliminar trazas de impurezas de las soluciones, se dispensaron en matraces aforados para protegerlos de la luz y se almacenaron en la refrigeradora a -4 °C hasta su posterior uso.

Al mezclar la solución de DPPH que posee una coloración violeta, con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, se obtiene la forma reducida con la pérdida de color violeta (Kedare & Singh, 2011).

#### **3.8.2 Preparación de soluciones**

Las muestras se prepararon en viales ámbar de 5 mL de la siguiente manera:

- 1) 0  $\mu\text{L}$  de muestra + 100  $\mu\text{L}$  de etanol + 2,9 mL de DPPH
- 2) 5  $\mu\text{L}$  de muestra + 95  $\mu\text{L}$  de etanol + 2,9 mL de DPPH
- 3) 10  $\mu\text{L}$  de muestra + 90  $\mu\text{L}$  de etanol + 2,9 mL de DPPH
- 4) 20  $\mu\text{L}$  de muestra + 80  $\mu\text{L}$  de etanol + 2,9 mL de DPPH

5) 50  $\mu$ L de muestra + 50  $\mu$ L de etanol + 2,9 mL de DPPH

6) 80  $\mu$ L de muestra + 20  $\mu$ L de etanol + 2,9 mL de DPPH

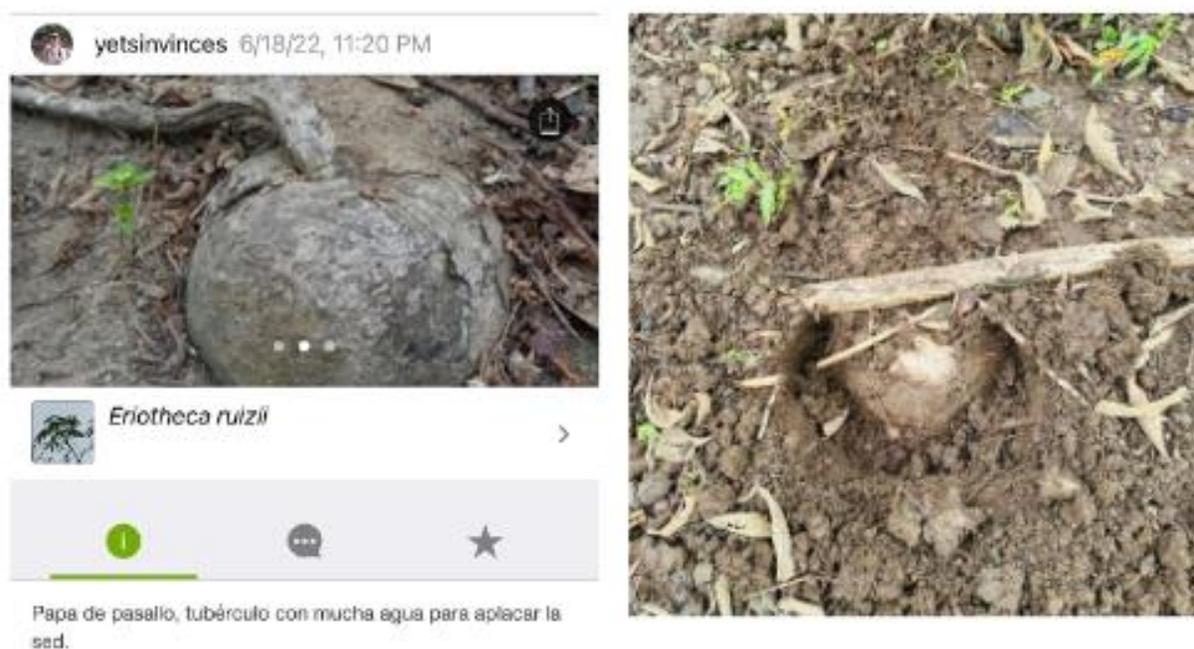
Una vez preparados se llevaron al ultrasonido por 20 minutos y se procedieron a leer en un espectrofotómetro UV- VIS marca *HACH* a una longitud de onda de 517 nm utilizando como blanco para encerrar el equipo etanol al 96% de pureza. Para medir la absorbancia se emplearon celdas de plástico y la lectura se realizó siguiendo el mismo orden especificado para su preparación

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Recolección e Identificación de la especie vegetal

La especie vegetal se recolectó en el Cerro “Paraíso” ubicado en la parroquia Tarqui de la ciudad de Guayaquil, con las siguientes coordenadas geográficas: 2°10'15.9"S 79°55'40.0"W entre los meses de Junio y Julio del año 2023.

Se identificaron mediante el Herbario UPS a cargo del docente Jaime Naranjo y la aplicación digital “iNaturalist” donde se compararon con observaciones realizadas por los usuarios como se visualiza en la Figura 20.



*Figura 20. Comparación de las raíces de almacenamiento en la aplicación “iNaturalist”*  
Fuente: (Ganchozo, 2023)

En la Tabla 4 se muestran las características morfológicas de las raíces de almacenamiento recolectadas.

Tabla 4. Características morfológicas de las raíces de almacenamiento de *E. ruizii*

| Características morfológicas de <i>E. ruizii</i> |                            |       |        |           |                             |                     |          |
|--|----------------------------|-------|--------|-----------|-----------------------------|---------------------|----------|
| Tamaño   | Color                      | Olor  | Forma  | Condición | Caracteres de la superficie | Sección transversal | Fractura |
| ±15 cm   | Café oscuro y pulpa rosada | Dulce | Ovoide | Fresca    | Estriada                    | 0,2 mm              | Dura     |

Elaborado por: Ganchozo, (2023)

Se recolectaron 2 kilos de raíces de almacenamiento para ser lavadas con agua destilada y cortadas en trozos usando un rallador convencional.

## 4.2 Control de calidad

### 4.2.1 Control fisicoquímico del material vegetal

Se hizo un control macroscópico donde se eliminaron aquellas raíces de almacenamiento que contaban con fisuras o cambios de color en su pulpa.

El contenido de humedad del material vegetal fue de 14.0% mismo que no sobrepasa los valores máximos establecidos por la normativa ecuatoriana.

### 4.3 Obtención de los Extractos

#### 4.3.1 Extracto Acuoso

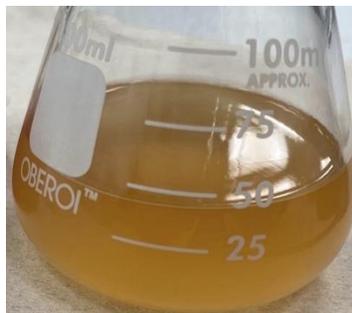
Para el extracto acuoso se emplearon 20 g de material vegetal en 200 mL de agua destilada estéril. Luego de filtrar al vacío se obtuvo un volumen final de 30 mL con una tonalidad transparente tenue como se observa en la Figura 21.



*Figura 21. Extracto acuoso*  
Elaborado por: Ganchozo, (2023)

#### 4.3.2 Extracto Alcohólico

Se obtuvo un extracto blando color ámbar brillante con un volumen final de 1,77 mL mientras que para realizar el tamizaje fitoquímico se concentró parcialmente el extracto en el rotavapor, quedando un volumen final de 19 mL color amarillo mostaza mostrado en la Figura 22.



*Figura 22. Extracto alcohólico*  
Elaborado por: Ganchozo, (2023)

### 4.3.3 Extracto Hidroalcohólico

Para el extracto hidroalcohólico luego de filtrar al vacío se utilizó un rotavapor para eliminar las trazas de alcohol y se obtuvo un volumen final de 21 mL de extracto color rojo intenso mostrado en la Figura 23.



*Figura 23. Extracto hidroalcohólico*  
Elaborado por: Ganchozo, (2023)

## 4.4 Control de calidad

### 4.4.1 Control fisicoquímico de los extractos

Se presenta en la Tabla 5 los parámetros medidos a los distintos extractos, siendo el pH el mismo para todos.

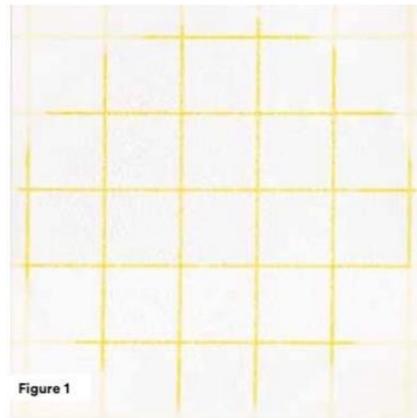
*Tabla 5. Control fisicoquímico de los extractos acuoso, alcohólico e hidroalcohólico de E. Ruizii.*

| Parámetros      |             |      |                      |                |
|-----------------|-------------|------|----------------------|----------------|
| Extracto        | Grados Brix | pH   | Índice de refracción | Color          |
| Acuoso          | 1.7         | 5.24 | 1.4                  | Transparente   |
| Alcohólico      | 1.8         | 5.24 | 1.7                  | Mostaza oscuro |
| Hidroalcohólico | 1.8         | 5.24 | 1.4                  | Rojo Intenso   |

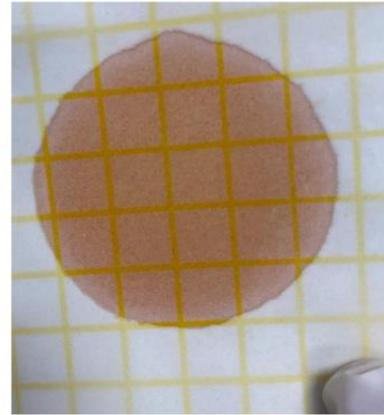
Elaborado por: Ganchozo, (2023)

#### 4.4.2 Control microbiológico de los extractos

Como se puede evidenciar en la Figura 24 no hubo crecimiento de bacterias pasadas las 24 horas de incubación en el extracto acuoso.



**Aerobic bacteria count = 0**  
3M Petrifilm Aerobic Count Plate without colonies.



Extracto acuoso de *E. ruizii*

*Figura 24. Comparación del extracto acuoso con la guía de interpretación 3M.*  
Elaborado por: Ganchozo, (2023)

#### 4.5 Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico demostró la presencia de metabolitos secundarios mayormente de Carbohidratos, Flavonoides y Alcaloides, los cuales se muestran en la Tabla 6:

*Tabla 6. Contenido cualitativo de metabolitos secundarios presentes en tres extractos: Acuoso, Alcohólico e Hidroalcohólico.*

| Metabolito                   | Extracto |            |                 |
|------------------------------|----------|------------|-----------------|
|                              | Acuoso   | Alcohólico | Hidroalcohólico |
| Alcaloides                   | -        | ++         | ++              |
| Carbohidratos                | +++      | +          | ++              |
| Proteínas                    | -        | -          | -               |
| Saponinas                    | -        | -          | -               |
| Lactonas<br>sesquiterpénicas | +        | +          | +               |
| Flavonoides                  | -        | ++         | ++              |
| Cumarinas                    | -        | +          | +               |

Alta intensidad causada por el metabolito = +++, Mediana intensidad causada por el metabolito = ++, Baja intensidad causada por el metabolito = +, Ausencia de metabolitos = -.

Elaborado por: Ganchozo, (2023).

La información de tamizaje fitoquímico encontrada en la literatura es mínima para la especie y para el género por lo que para comparar los resultados obtenidos se analizaron varias investigaciones con tubérculos de diferentes especies.

## Alcaloides:

Los resultados obtenidos en el contenido cualitativo de metabolitos secundarios evidenciaron que los extractos alcohólico e hidroalcohólico contienen alcaloides en mediana intensidad excepto por el extracto acuoso donde no se evidenció precipitado alguno como se demuestra en la Figura 25, esto se puede deber a que generalmente la mayoría de los alcaloides son compuestos con bases débiles que se disuelven ineficientemente en solventes acuosos, por lo que se suele preferir aquellos solventes orgánicos de mayor polaridad (Cidlová, 2016). La extracción de alcaloides se basa en su carácter básico y patrón de solubilidad por lo que, en caso de utilizar un extracto acuoso, el material vegetal en polvo se debe extraer con disolventes polares como agua o alcohol diluido que contengan ácido (Mahajan, 2017).

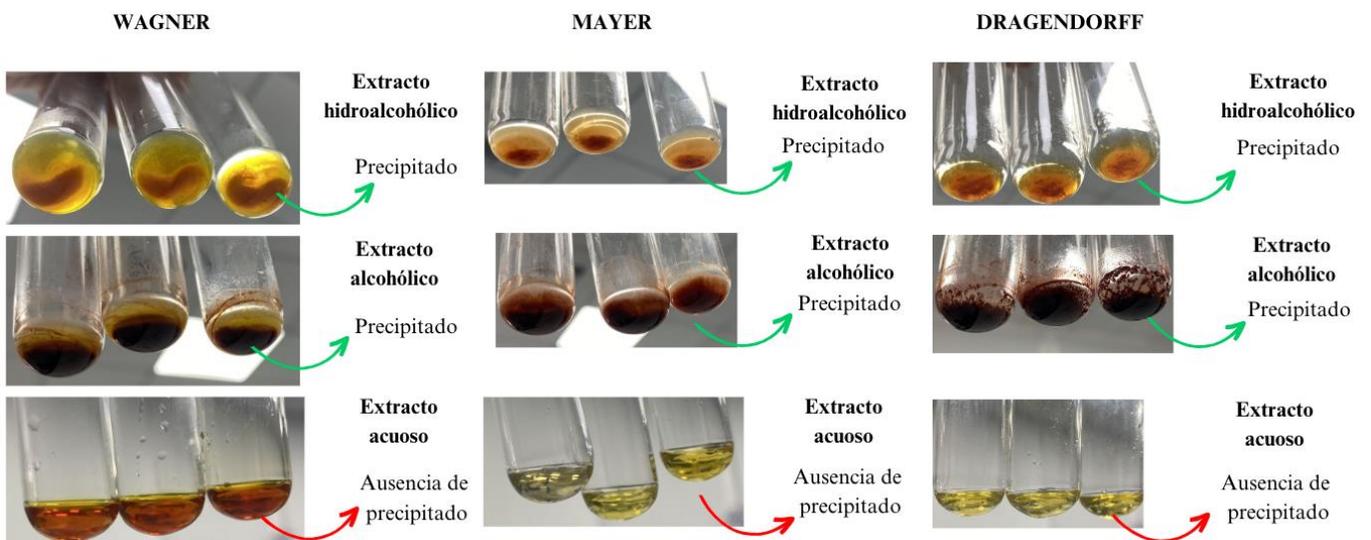
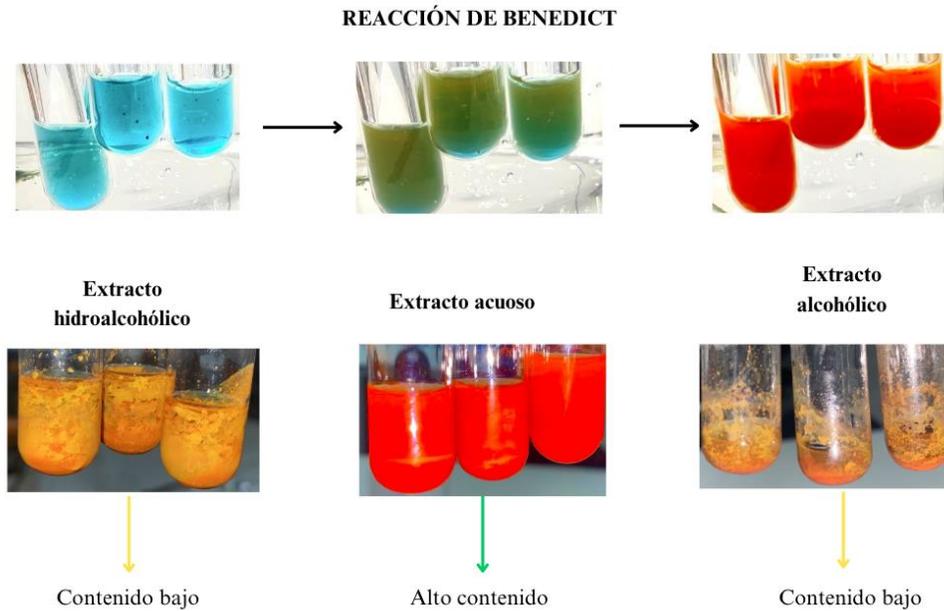


Figura 25. Resultados obtenidos para la prueba de alcaloides  
Elaborado por: Ganchozo, (2023)

Estudios fitoquímicos realizados en la Universidad de California demostraron que *Solanum tuberosum*, conocida comúnmente como papa doméstica, poseen alto contenido de alcaloides, en especial glicoalcaloides que son compuestos derivados de los alcaloides que contienen grupos de azúcar en su estructura (Friedman, 2006). Los extractos acuosos y etanólicos elaborados a partir de *Manihot esculenta* o “yuca” cultivadas en Nigeria contienen alcaloides, flavonoides, taninos, azúcares reductores y antocianósidos (Ebuehi et al., 2006) demostrando similitud en su composición química con *E. ruizii* lo que puede sugerir su valor medicinal como principio activo ya que los alcaloides son conocidos como agentes anestésicos, cardioprotectores y antiinflamatorios (Heinrich et al., 2021)

### **Carbohidratos:**

En el análisis fitoquímico para azúcares reductores se pudo evidenciar mayor coloración en el extracto acuoso en comparación al alcohólico e hidroalcohólico demostrado en la Figura 26, a pesar de contener la misma cantidad de material vegetal, esto puede deberse a que el alcohol del solvente puede actuar como agente reductor del reactivo de Benedict, de la misma forma en que reduce los iones cúpricos ( $\text{Cu}^{2+}$ ) a iones cuprosos ( $\text{Cu}^+$ ) (Hernández-López et al., 2020), afectando la solubilidad de los productos de la reacción, lo que se representa en la coloración final.



*Figura 26. Resultados obtenidos para la prueba de Carbohidratos*

Elaborado por: Ganchozo, (2023)

### **Proteínas:**

Los análisis demostraron ausencia de proteínas en todos los extractos como se muestra en la Figura 27, de acuerdo a la literatura es común que el contenido de proteína de la mayoría de tubérculos comestibles sea inferior al 10% en base a estudios realizados por (Shewry, 2003) donde además se demostró que este contenido puede variar inclusive en tubérculos de la misma familia como es el caso de *Colocasia esculenta* o “taro” originario de India y *Cytosperma chamissonis* “taro de pantano gigante” cosechado en Oceanía, que a pesar de pertenecer a la misma familia Araceae poseen distinto contenido aproximado de proteínas, 2% y 0,8% respectivamente. Existe también la posibilidad de que en *E. ruizii* exista un porcentaje mínimo de proteínas, el cual al ser cuantificado mediante equipos especializados resulte en valores inferiores al 1% pero que, en ensayos cualitativos, como la prueba de Ninhidrina, este sea imperceptible.



*Figura 27. Resultados obtenidos para la prueba de proteínas*  
Elaborado por: Ganchozo, (2023)

### **Lactonas sesquiterpénicas:**

Otro compuesto los cuales presentaron todos los extractos como se puede apreciar en la Figura 28 fueron lactonas sesquiterpénicas que forman parte del grupo de terpenos, estos cumplen funciones de protección en la planta ya que alteran la pared celular de hongos y bacterias invasoras, mientras que otros derivados protegen a la planta del estrés ambiental que podría causar daño oxidativo (Chadwick et al., 2013). De acuerdo con estudios, es común encontrar mayor concentración de lactonas en los brotes de la planta principalmente hojas y capullos de flores como es el ejemplo del tubérculo de la especie *Smilax sonchifolius* conocida como “yacón” que posee la mayor concentración de lactonas en sus hojas (Hohmann et al., 2016). La presencia de estos metabolitos secundarios en *E. ruizii* podría aportar de manera significativa a la industria farmacéutica para el

desarrollo de nuevos medicamentos como es el caso de lactona sesquiterpénica denominada artemisinina, aislada de la planta medicinal china *Artemisia annua* (Asteraceae) cuyo compuesto y derivados semisintéticos se utilizan hoy en día para el tratamiento de la malaria (Sülsen, 2021).

#### BALJET



Figura 28. Resultados obtenidos para la prueba de lactonas sesquiterpénicas

Elaborado por: Ganchozo, (2023)

#### Flavonoides:

Los ensayos realizados en los extractos de *E. ruizii* también fueron positivos para flavonoides como se demuestra en la Figura 29, sin embargo, solo hubo presencia de estos tipo de metabolito en el extracto alcohólico e hidroalcohólico, esto se puede deber a que los distintos solventes y su polaridad extraen distintas moléculas, lo cual se pudo ver reflejado en el color de los extractos después de haber sido filtrados al vacío, presentando tonalidades amarillo mostaza y rojo intenso respectivamente, a diferencia del extracto acuoso el cual se mantuvo transparente en su totalidad y fue aquel que resultó negativo.

Estos metabolitos se encuentran primordialmente en partes comestibles de plantas como frutas, verduras, tallos, granos y cortezas, la mayor acumulación de este compuesto ocurre en las células en división de la raíz (Roy et al., 2022; Abdel-Lateif et al., 2012). Existen distintas especies de *Raphanus sativus* o “rabano” que contienen compuestos antociánicos responsables de la

pigmentación del color, entre ellos la cianidina roja, callistefina y pelargonina, siendo en total 133 distintos tipos de flavonoides incluyendo flavonas, antocianinas, flavonoles (Zhang et al., 2020). Esto demuestra que las raíces de almacenamiento de *E. ruizii* poseen un interesante contenido de flavonoides con posible utilidad como conservante en la industria alimenticia para una variedad de productos como carnes rojas ya que actúa como protector inhibiendo la oxidación de lípidos y retardando el crecimiento de microorganismos de descomposición en las carnes (Ruiz-Cruz et al., 2017).



Figura 29. Resultados obtenidos para la prueba de flavonoides

Elaborado por: Ganchozo, (2023)

### Saponinas:

Las saponinas pertenecientes al grupo de glucósidos resultaron negativas para los todos los extractos de *E. ruizii* como se visualiza en la Figura 30. A pesar de que en la literatura científica existen especies como *Manihot esculenta* o “yuca” que contienen gran cantidad de glucósidos cianogénicos en especial linamarina (Rivadeneira-Domínguez et al., 2013). En *E. ruizii* este

compuesto no está presente lo que se podría atribuir a que pertenecen a distintas familias, o a que se encuentre en distintas partes de la planta como las hojas ya que de acuerdo con estos compuestos se suelen encontrar en diferentes cantidades y en diferentes composiciones entre especies de plantas, incluso en diferentes tejidos de la misma planta (Kytidou et al., 2020).

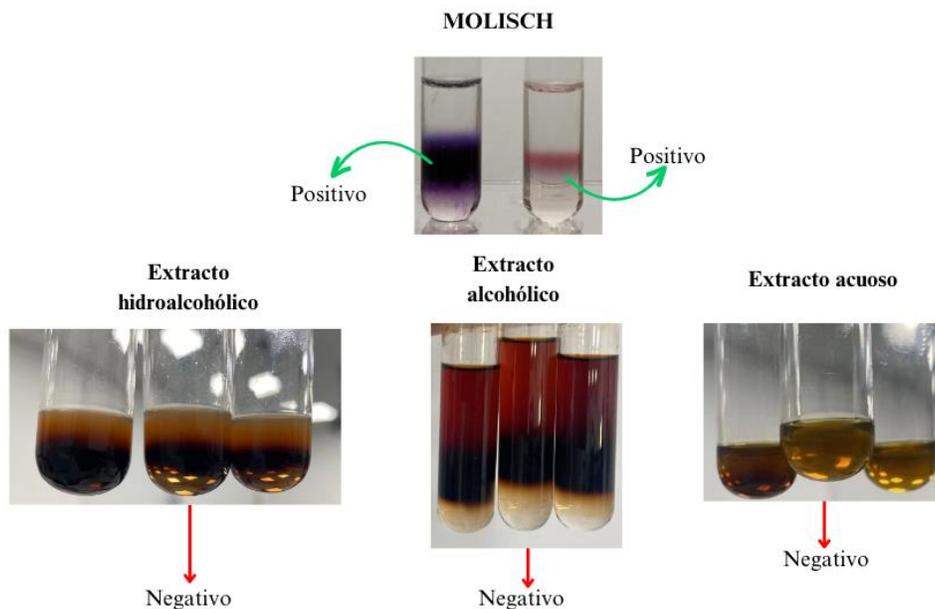


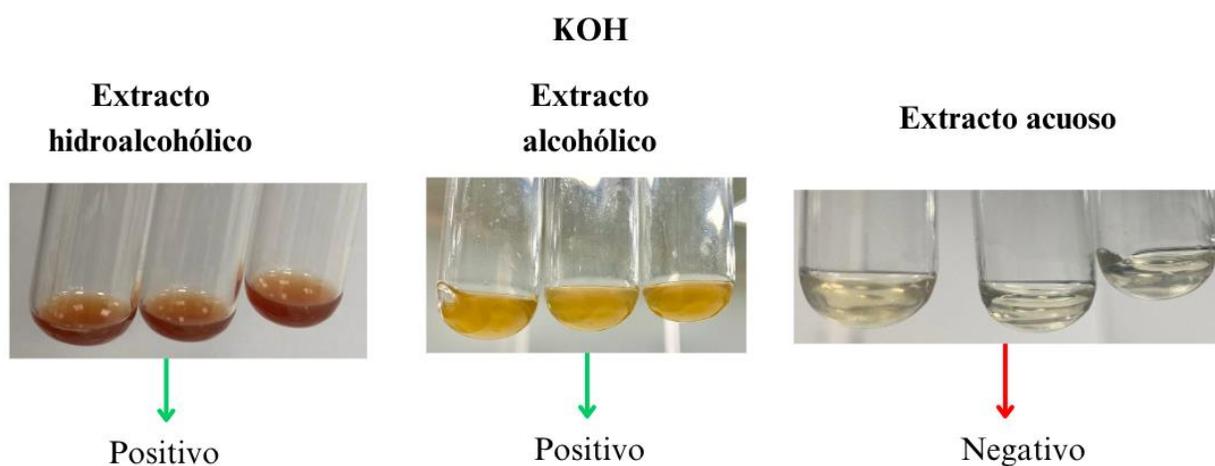
Figura 30. Resultados obtenidos para la prueba de saponinas  
Elaborado por: Ganchozo, (2023)

### Cumarinas:

Las pruebas de KOH en extractos alcohólicos e hidroalcohólicos de *E. ruizii* fueron positivas, mientras que en extracto acuoso no se evidenció coloración, tal como se visualiza en la Figura 31 lo que puede deberse al tipo de solvente utilizado, siendo el alcohol y el metanol los más eficientes para la extracción de estas moléculas (Wang & Li, 2021).

Estudios realizados en la Universidad de Andalas, Indonesia demostraron que la función del inhibidor (cumarina) es inducir los tubérculos inhibiendo la síntesis de giberelinas porque la

inducción de microtubérculos requiere niveles bajos de giberelinas lo que aumenta la concentración de cumarina en *Solanum tuberosum L* o “papa doméstica” lo que puede explicar la presencia en varios tipos de raíces de almacenamiento (Mustikasari et al., 2023). Algunas de las posibles aplicaciones de *E. ruizii* podría residir en la industria farmacéutica como principio activo debido sus propiedades hepatotóxicas y cancerígenas (Abraham et al., 2010).



*Figura 32. Prueba para la determinación de cumarinas*  
Elaborado por: Ganchozo, (2023)

## 4.6 Espectroscopía Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR)

### 4.6.1 Análisis FT-IR del extracto alcohólico.

El extracto acuoso no se tomó en cuenta para este ensayo debido a la baja presencia de metabolitos secundarios en el análisis fitoquímico previamente realizado.

Los enlaces químicos o grupos funcionales presentes en el extracto de las raíces de almacenamiento de *E. ruizii* fueron predecidos usando el equipo FT-IR. Los enlaces se determinaron interpretando los espectros de absorción infrarroja. La figura 33 muestra el espectro FT-IR del extracto mientras que la Tabla 7 muestra la interpretación de aquellos enlaces químicos encontrados en el extracto alcohólico.

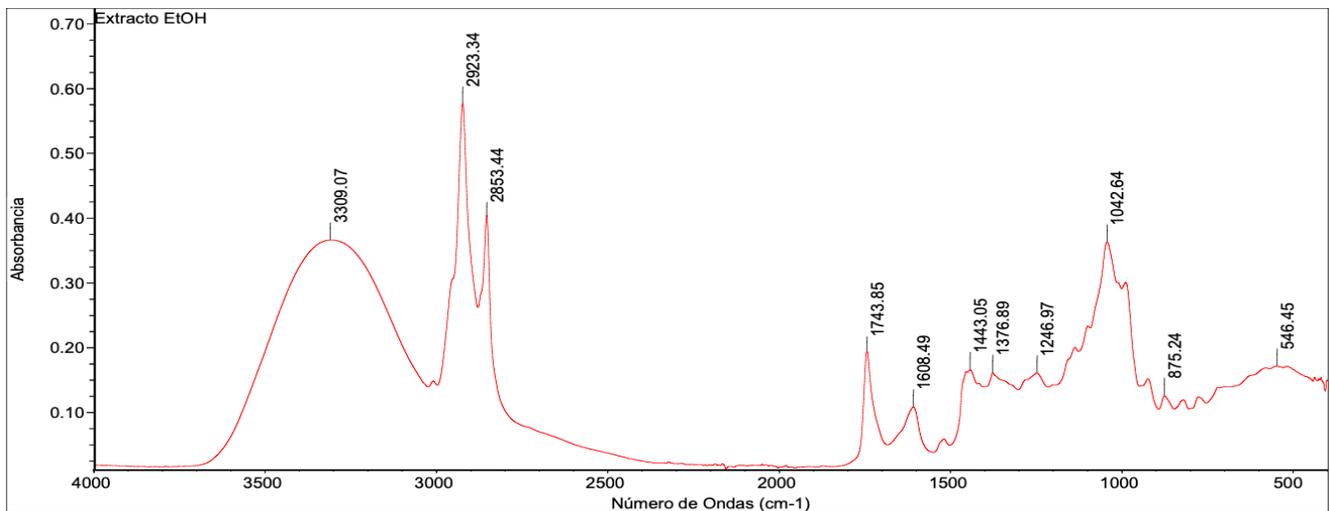


Figura 33. Espectro FTIR del extracto alcohólico de las raíces de almacenamiento de *E. ruizii*  
Elaborado por: Ganchozo, (2023).

Como se puede observar cada espectro posee una asignación de número de onda, esto representa un grupo funcional el cual se identifica mediante el rango en el que se encuentra dicho espectro.

Estudios realizados en la Universidad de Ohio ofrecen una referencia para la identificación de posibles compuestos, misma que sirvió de guía para la determinación de los picos observados en los extractos de *E. ruizii* que se detalla en la Tabla 6 Enders et al., (2021).

Tabla 7. Valores máximos espectrales del FTIR y grupos funcionales del extracto alcohólico de las raíces de almacenamiento de *E. ruizii*.

| Espectro No. | Número de onda<br>$cm^{-1}$ | Número de onda<br>$cm^{-1}$ | Asignación de<br>grupo funcional | Posible<br>Compuesto      |
|--------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------------------|---------------------------|
| 1            | 3309.07                     | 3500-3300                   | N-H                              | Amida                     |
| 2            | 2923.34                     | 2960-2850                   | C-C-H                            | Alcano                    |
| 3            | 2853.44                     | 2960-2850                   | C-C-H                            | Alcano                    |
| 4            | 1743.85                     | ≈1735                       | C=O                              | Éster                     |
| 5            | 1608.49                     | 1600-1450                   | C=C                              | Aromático                 |
| 6            | 1443.05                     | 1450-1420                   | CH                               | Vibraciones de<br>Flexión |
| 7            | 1376.89                     | 1385-1365                   | CH <sub>3</sub>                  | Vibraciones de<br>Flexión |
| 8            | 1246.97                     | 1250-1050                   | C-O                              | Ácido<br>carboxílico      |
| 9            | 1042.64                     | 1230-1020                   | C-N                              | Amina                     |
| 10           | 875.24                      | 1090-810                    | PH d                             | Fosfinas                  |
| 11           | 546.45                      | 785-540                     | C-Cl                             | Haluros de<br>Alquilo     |

t= vibración de tensión; d= deformación

Elaborado por: Ganchozo, 2023.

De acuerdo con estudios realizados en India se identificaron mediante FT-IR la composición de dos variedades de *Solanum tuberosum* donde destacaron vibraciones de torción N-H y vibraciones

asimétricas de flexión C–O lo que denota la concentración de una variedad de alcaloides, misma que concuerda con los extractos de *E. ruizii* debido a la naturaleza de ambos tubérculos lo cual se comprobó también mediante los ensayos cualitativos de tamizaje fitoquímico (Velraj et al., 2011).

Otro estudio realizado en Instituto de Ciencias de Indonesia demostró la caracterización tanto de *Manihot esculenta* “yuca” como de *Solanum tuberosum* “papa doméstica” así mismo comprobándose la presencia de grupos funcionales de tipo O – H, C – H, C – O y CH<sub>2</sub> demostrando que la yuca y la papa poseen estructura química similar a *E. ruizii* (Abdullah et al., 2018).

Una de las características del FT-IR es que con el análisis FT-IR se aprovecha la absorbancia de luz de un material utilizando la forma en que diferentes compuestos moleculares reaccionan al haz infrarrojo para determinar la composición del material bajo análisis, con esto no solo se puede calcular la composición molecular total de un material, sino además compararla con materiales similares registrados (Catterway, 2023). En Tabla 8 se enumera la lista de posibles compuestos similares al extracto alcohólico de las raíces de almacenamiento de *E. ruizii*, con su porcentaje de similitud y aplicaciones industriales.

*Tabla 8. Posibles compuestos de utilidad industrial encontrados en el extracto alcohólico de las raíces de almacenamiento de E. Ruizii de acuerdo con el análisis FT-IR.*

| Nombre del Compuesto   | Similitud (%) | Aplicación Industrial   | Referencia       |
|------------------------|---------------|---|------------------|
| Oleato de Gliceril     | 88.26         | Utilizado como emulsionante, humectante y cotensioactivo no iónico en productos de cuidado de piel y cabello. | (McMiller, 2023) |
| Monooleato de Glicerol | 87.76         | Se utiliza como antiespumante en el procesamiento de jugos.   | (ASHP, 2022)     |
| Lecitina               | 87.59         | Lubricantes derivados del petróleo, textiles, cuero, revestimientos, caucho, resinas y jabones.               | (List, 2015)     |

Elaborado por: Ganchozo, (2023)

#### **4.6.2 Análisis FT-IR del extracto hidroalcohólico**

Los enlaces se determinaron interpretando los espectros de absorción infrarroja. La figura 34 muestra el espectro FT-IR del extracto mientras que la Tabla 9 muestra la interpretación de aquellos enlaces químicos encontrados en el extracto hidroalcohólico.

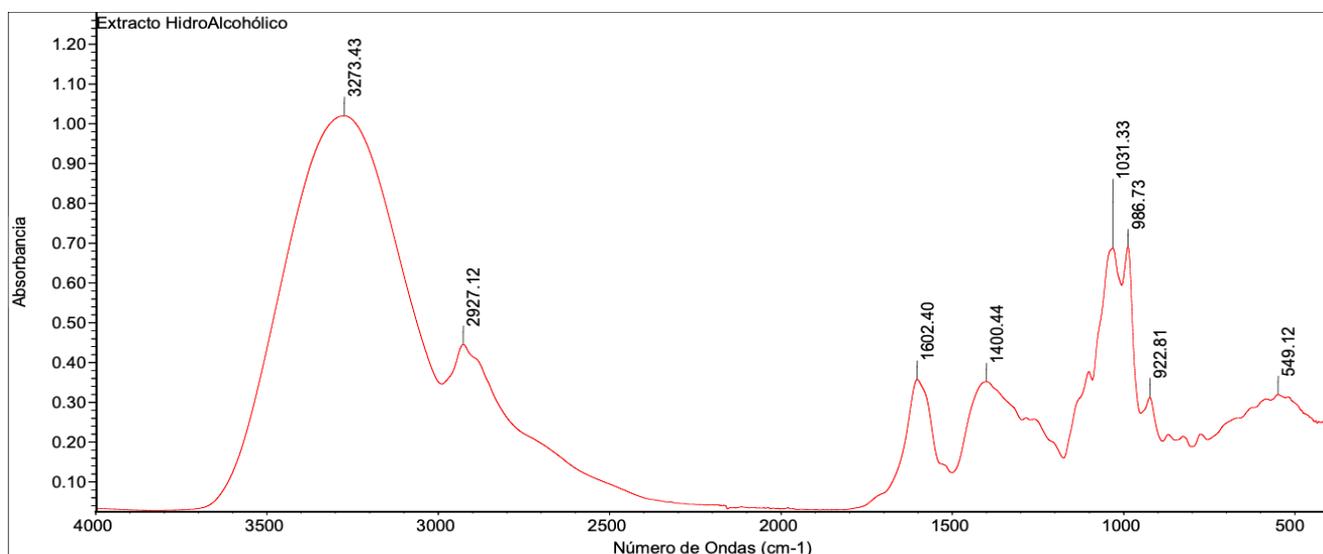


Figura 34. Espectro FT-IR del extracto hidroalcohólico de las raíces de almacenamiento de *E. ruizii*.

Fuente: (Ganchozo, 2023)

Tabla 9. Valores máximos espectrales del FTIR y grupos funcionales del extracto alcohólico de las raíces de almacenamiento de *E. ruizii*

| Espectro No. | Número de onda<br>$cm^{-1}$ | Número de onda<br>$cm^{-1}$   | Asignación de<br>grupo funcional | Posible<br>Compuesto  |
|--------------|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| 1            | 3273.43                     | 3650-3200                     | O-H                              | Alcohol               |
| 2            | 2927.12                     | 2960-2850                     | C-C-H                            | Alcano                |
| 3            | 1602.40                     | 1600-1450                     | C=C                              | Aromático             |
| 4            | 1400.44                     | 1440-1400                     | O-H d                            | Ácido<br>Carboxílico  |
| 5            | 1031.33                     | 1230-1020                     | C-N                              | Amina                 |
| 6            | 986.73                      | $\approx 990$ y $\approx 910$ | C-H<br>(monosustituído)          | Alqueno               |
| 8            | 549.12                      | 785-540                       | C-Cl t                           | Haluros de<br>alquilo |

t= vibración de tensión; d= deformación,  $\approx$ = aproximado.

Elaborado por: Ganchozo, (2023).

Con respecto al análisis del extracto hidroalcohólico, se detectaron menos picos en los espectros, esto puede deberse a la composición de los solventes de este extracto que fueron agua destilada estéril y alcohol al 96% en proporción 1:1 teniendo en cuenta que el agua no es lo suficientemente polar para extraer la mayor cantidad de compuestos, lo cual también se vió representado en el tamizaje, siendo el caso de los grupos funcionales éster y las vibraciones de flexión.

En la Tabla 10 se presenta la lista de posibles compuesto del extracto hidroalcohólico de las raíces de almacenamiento de *E. Ruizii*, con su porcentaje de similitud y aplicaciones industriales.

*Tabla 10. Posibles compuestos de utilidad industrial encontrados en el extracto hidroalcohólico de las raíces de almacenamiento de E. Ruizii. de acuerdo con el análisis FT-IR.*

| Nombre del Compuesto  | Similitud (%) | Aplicación Industrial   | Referencia     |
|-----------------------|---------------|---|----------------|
| D- Eritrosa           | 58.56         | Se utiliza ampliamente como aditivo en alimentos y medicamentos debido a su inercia química, dulzor y no toxicidad. | (ChEBI, 2023)  |
| Hidrato de D-Ribulosa | 54.49         | Se utiliza en amplia gama de fármacos como endulzante en formulaciones.   | (GLPBIO, 2017) |

Elaborado por: Ganchozo, (2023)

#### 4.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria MIC mediante la técnica de micro dilución.

Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos se excluyó el análisis del extracto acuoso debido a que este presentó baja cantidad de metabolitos secundarios extraídos de acuerdo con las pruebas realizadas en el tamizaje fitoquímico. Los valores de MIC se expresan en  $\mu\text{g/mL}$  los cuales se revelan cualitativamente mediante el uso del colorante TTC y cuantitativamente mediante lectura en el equipo Micro Elisa.

Como patrón de referencia para la interpretación de la concentración mínima inhibitoria se hace uso de la Tabla 11 propuesta por Başer & Buchbauer (2021) expresada en  $\mu\text{g/mL}$

Tabla 11. Interpretación de valores de MIC.

| MIC        | Sigla | $\mu\text{g/mL}$            |
|------------|-------|-----------------------------|
| Muy fuerte | MF    | $< 500$                     |
| Fuerte     | F     | $\geq 500$                  |
| Moderada   | M     | $500 < \text{MIC} < 5000$   |
| Débil      | D     | $5000 < \text{MIC} < 20000$ |
| Ausente    | A     | $> 20000$                   |

Fuente: (Başer & Buchbauer, 2021)

Para probar la efectividad de los extractos, en ambos se utilizó el rotavapor con el objetivo de eliminar las trazas de alcohol lo cual pudiera interferir con los resultados finales. Las bacterias de estudio fueron *E. coli* como gram negativa (ATTC 8739) y *S. aureus* como gram positiva (ATTC 6538).

En la Tabla 12 se muestran los distintos valores de MIC obtenidos en los extractos alcohólico e hidroalcohólico al 20% frente a las cepas en estudio.

Tabla 12. MIC de extracto alcohólico e hidroalcohólico para frente a las cepas *E. coli* y *S. aureus*.

| Bacteria de estudio          | ATTC | Extracto de <i>E. ruizii</i> al 20% |   |                 |   |
|------------------------------|------|-------------------------------------|---|-----------------|---|
|                              |      | MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )            |   |                 |   |
|                              |      | Alcohólico                          | S | Hidroalcohólico | S |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 6538 | 1800,000                            | M | 1800,000        | M |
| <i>Escherichia coli</i>      | 8739 | 2076,923                            | M | 2076,923        | M |

(S) Sigla; (MF) Muy fuerte; (F) Fuerte; (M) Moderado.

Elaborado por: Ganchozo, (2023).

Como se puede apreciar en la Tabla 11 para *S. aureus* el valor de MIC fue de 1800,000  $\mu\text{g/mL}$  tanto para el extracto alcohólico como hidroalcohólico mientras que de igual forma para *E. coli* se obtuvo un valor de 2076,923  $\mu\text{g/mL}$  para ambos extractos, lo cual de acuerdo al patrón de referencia de interpretación es considerado como Moderado, sin embargo, este resultado es solo válido cuando se tiene una concentración al 20% la cual puede ser considerada como muy alta ya que el alcohol utilizado como solvente en los extractos es autoconservante a una concentración superior al 20% (Haque, 2020).

Para el caso de ambas bacterias en estudio, no se han reportado ensayos donde se use extractos alcohólico e hidroalcohólico con *E. ruizii* y ninguna especie del género *Eriotheca*, por lo que generar y evaluar estos resultados es importante para poder realizar prácticas in vivo.

Investigaciones llevadas a cabo en la Universidad de Mbarara en Uganda, demostraron la eficacia de los extractos de tubérculos de *Echinops kebericho* usando distintos solventes contra cinco especies de bacterias, resaltando un alto potencial de inhibición contra *E. fecalis* para el extracto de acetato de etilo, atribuyendo este efecto a un tipo de lactona denominada “dehidrocostus” cuya actividad es comparable con la penicilina (Deyno et al., 2021). Este resultado es comparable con el resultado obtenido en *E. ruizii*, sin embargo, para mejores resultados se podría utilizar distintos métodos de extracción más especializados como los fluidos supercríticos donde los cambios de presión y temperatura, conllevan a una variación en la selectividad y el poder de solvencia de extractos, induciendo así un efecto antibacterial más prominente contra distintas cepas (Esquivel, 2007).

Estudios mencionan que la elección de distintos solventes muestra diferentes actividades antibacterianas siendo algunos buenos aceptores de Hidrógeno mientras que otros solventes incluyen alcoholes superiores y varios otros extractantes cuyo uso no es práctico para aislar compuestos bioactivos debido al alto punto de ebullición (Kotzé et al., 2002). pudiendo ser este el caso de *E. ruizii* ya que, a pesar de contener flavonoides y alcaloides los cuales en base a la literatura poseen alta capacidad antibacterial, su inhibición solo hizo efecto en el extracto directo, más no en aquellos diluidos, recordando que el solvente utilizado fue alcohol al 96% mientras que los metabolitos secundarios del extracto de *Echinops kebericho* mencionado anteriormente se extrajeron utilizando solventes de mayor polaridad como el acetato de etilo y metanol respectivamente

Para las pruebas microbiológicas se utilizaron como indicador de control terpineol y penicilina ambos al 20%, mismos que se presentan en la Tabla 13.

Tabla 13. MIC de indicadores de control para *S. aureus* y *E. coli*

| Bacteria de estudio          | ATTC | Indicadores de control |   |                |   |
|------------------------------|------|------------------------|---|----------------|---|
|                              |      | MIC (µg/mL)            |   |                |   |
|                              |      | Terpineol 20%          | S | Penicilina 20% | S |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 6538 | 5494,11                | M | 1800,000       | M |
| <i>Escherichia coli</i>      | 8739 | 2076,923               | M | 2076,923       | M |

(S) Sigla; (MF) Muy fuerte; (F) Fuerte; (M) Moderado; (D) Débil

Elaborado por: Ganchozo, (2023).

#### 4.8 Actividad antioxidante

Para evaluar la actividad antioxidante en los extractos acuoso, alcohólico e hidroalcohólico utilizó como método DPPH detallado en el capítulo 3 y se determinó el valor  $IC_{50}$  donde se muestran los valores en la Tabla 14.

Tabla 14. Valores obtenidos en el  $IC_{50}$  de los distintos tipos de extractos de *E. ruizii* junto al estándar (Vitamina C)

|                   | <b>Alcohólico</b> | <b>Acuoso</b> | <b>Hidroalcohólico</b> |
|-------------------|-------------------|---------------|------------------------|
|                   | 238,85            | 2739,20       | 132,34                 |
|                   | 228,24            | 2708,11       | 160,06                 |
|                   | 232,62            | 2740,06       | 159,86                 |
| <b>Promedio</b>   | 233,24            | 2729,13       | 150,75                 |
| <b>Desv. Est.</b> | 5,33              | 18,20         | 15,94                  |

Elaborado por: Ganchozo, (2023).

Como parámetro de comparación se muestra Tabla 15, con la clasificación de antioxidantes basada en valores  $IC_{50}$  propuesto por (Kusumawati, 2021).

Tabla 15. Clasificación de antioxidantes basada en valores  $IC_{50}$ .

| <b><math>IC_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b> | <b>Actividad antioxidante</b> |
|---|-------------------------------|
| <50   | Muy fuerte                    |
| 50-100  | Fuerte                        |
| 101-250   | Medio                         |
| 250-500   | Débil                         |
| >500  | Ausente                       |

Elaborado por: Kusumawati, (2021).

Como se puede observar, el extracto alcohólico posee un valor  $IC_{50}$  promedio de 233,24  $\mu\text{g/mL}$  el cual se clasifica como actividad antioxidante débil, mientras que el extracto hidroalcohólico presenta un valor de 150,8  $\mu\text{g/mL}$  que se categoriza en el rango de Medio, y finalmente el extracto acuoso no posee actividad antioxidante preponderante.

Se realizó una prueba de normalidad donde se obtuvo un p-valor inferior a 0,05 para todos los extractos, lo que indica que los datos no son paramétricos. Como análisis estadístico se aplicó la prueba de Kruskal Wallis obteniendo un p-valor de 0.017 el cual es menor a 0,05 lo que demuestra que los extractos no presentan el mismo nivel de captación de radicales libres, por lo que se diferencian en dos categorías A y B, representados en la Tabla 16 y en el Anexo 3.

*Tabla 16. Categorización del  $IC_{50}$  de los extractos mediante el estadístico Kruskal Wallis*

| <b>Extracto</b> | <b>Media</b> | <b>Desv. Estándar</b> | <b>Categoría</b> |
|-----------------|--------------|-----------------------|------------------|
| Hidroalcohólico | 150,94       | 15,94                 | A                |
| Alcohólico      | 233,24       | 5,33                  | A B              |
| Acuoso          | 2729,13      | 18,20                 | B                |

Elaborado por: Ganchozo, (2023)

En la tabla se presentan los valores con la prueba de Kruskal Wallis, donde se separan los extractos por categorías (A y B) y medias, las cuales se expresan en mg/g, siendo el mejor la categoría A que corresponde al extracto hidroalcohólico, eligiéndose este ya que no comparte categoría con ningún otro extracto denotando así que es estadísticamente diferente y representa la mínima concentración de planta que se requiere para que el extracto posea actividad antioxidante.

En la Figura 35 se representa gráficamente el factor  $IC_{50}$  con las medias presentadas en la prueba de Kruskal Wallis donde se visualiza que el extracto hidroalcohólico posee una mayor actividad antioxidante.

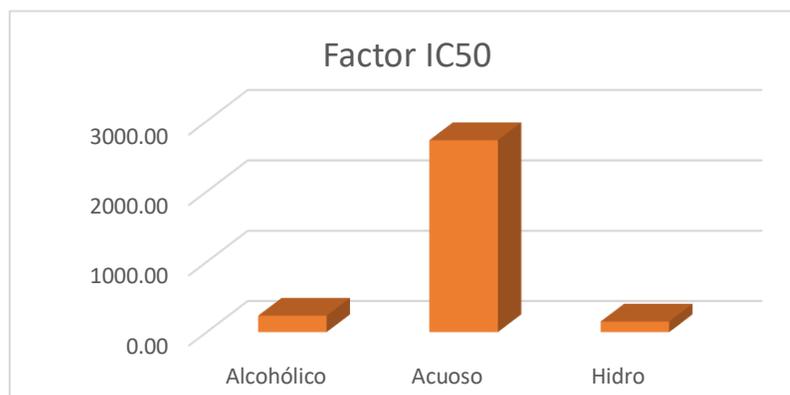


Figura 35. Contenido de los extractos de *E. ruizii* luego de la filtración y rotavaporación. Elaborado por: (Ganchozo, 2023)

La actividad antioxidante presentada en los extractos puede estar estrechamente asociada al contenido de flavonoides determinados mediante el tamizaje fitoquímico realizado, estudios similares demuestran que los terpenos, taninos, flavonoides y saponinas son metabolitos secundarios que contribuyen a las actividades antioxidantes (Cavazos et al., 2021). Investigaciones afirman que casi todos los grupos de flavonoides tienen la capacidad de actuar como antioxidantes, en especial las flavonas y catequinas (Panche et al., 2016). Esto también puede explicar por qué el extracto acuoso no presentó esta característica ya que en el análisis fitoquímico resultó negativo para flavonoides lo cual se pudo observar en la coloración del extracto siendo este transparente en su totalidad.

Estudios similares evaluaron la capacidad antioxidante de *Smallanthus sonchifolius* o “yacón” cultivado en Brasil, por medio del  $IC_{50}$  obteniendo un valor 187.26 mg mL<sup>-1</sup> para la pulpa fresca

del tubérculo, que, en base a la tabla de clasificación, se categoriza como una actividad antioxidante baja (Muñoz & Ramos, 2007).

Existe también la posibilidad de que exista una mayor actividad antioxidante en otras partes de la planta, estudios desarrollados en República Checa comprobaron que la mayor capacidad antioxidante reside en las hojas del yacón en comparación con su tubérculo, lo cual lo atribuyen al alto contenido fenólico presentado en los extractos de las hojas (Valentova et al., 2003).

Se ha demostrado mediante estudios en *Solanum tuberosum L.* o “papa doméstica” que la elección del potencial genético, el sitio de cultivo y el sistema de producción influyen significativamente en las propiedades antioxidantes, a pesar de que los flavonoles se encuentren en pequeñas cantidades en estos tubérculos, los factores mencionados juegan un papel importante en el desarrollo de su actividad biológica, ya que junto a otros constituyentes tales como proteínas o polisacáridos contribuyen no solo a la actividad antioxidante sino, por sobre todo a las propiedades sensoriales como sabor, color y astringencia (Keutgen et al., 2019). Es posible que controlando las condiciones de cultivo de *E. Ruizii* se incremente la actividad biológica, sintetizando metabolitos secundarios clave con propiedades de interés industrial.

Las investigaciones en base a la capacidad antioxidante con la planta en estudio son escasas, por lo que los datos reportados en esta investigación son de utilidad ya que el  $IC_{50}$  da una inhibición media, lo que concuerda con el uso medicinal que se le atribuye en Perú en preparaciones como croquetas, jugos y extractos para combatir la anemia (Trinidad, 2019).

## 5. Conclusiones

La caracterización mediante el tamizaje fitoquímico demostró la presencia mayoritariamente de carbohidratos, flavonoides, alcaloides y cumarinas el aprovechamiento de estos metabolitos secundarios puede tener aplicaciones en distintas aristas de la Biotecnología como el desarrollo de principios activos para formulaciones farmacéuticas y la elaboración de productos con alto valor nutricional.

Para la caracterización cuantitativa se analizaron los extractos liofilizados para una mayor precisión mediante el FT-IR, evidenciando grupos funcionales aminas, alcanos, ésteres y aromáticos. El extracto alcohólico tuvo además una alta similitud con el Oleato de Gliceril utilizado industrialmente como emulsionante y humectante en formulaciones cosméticas.

La evaluación de la Concentración Mínima Inhibitoria tanto en el extracto alcohólico como hidroalcohólico fue de 1800,000  $\mu\text{g/mL}$  para *S. aureus* y 2076,923  $\mu\text{g/mL}$  para *E. coli* lo que de acuerdo con el patrón de referencia de interpretación se considera como Moderado, por lo que no se recomienda utilizar las raíces de almacenamiento de esta especie con fines antibacteriales.

Para la evaluación de la capacidad antioxidante se determinó el coeficiente  $\text{IC}_{50}$  y se comprobó que el mejor extracto fue el hidroalcohólico con un valor de 150,75 clasificado como una actividad antioxidante media, y podría ser aplicada en distintos procesos como principio activo en formulaciones cosméticas o alimenticias, por lo que se recomienda continuar con el estudio de esta planta utilizando distintos métodos de extracción con solventes de mayor polaridad.

## 6. Recomendaciones

- Para un mayor rendimiento en la extracción de los principios activos de la especie se recomienda usar otros solventes orgánicos e identificar los métodos de extracción de mayor eficiencia.
- Realizar la cuantificación de los metabolitos secundarios identificados en el presente estudio mediante diversas técnicas analíticas.
- Dado que en el presente trabajo de investigación se obtuvo una capacidad antibacteriana media se recomienda evaluar *in vitro* en otros microorganismos (bacterias, hongos y levaduras).
- Se recomienda realizar la identificación cualitativa de los metabolitos secundarios en otras partes de la planta (tallos, hojas, frutos) para complementar el estudio fitoquímico y revalorizar esta especie endémica de la región.
- Comprobar la posible obtención de aceite esencial de las hojas de *E. ruizii* para el aprovechamiento de los compuestos volátiles presentes.

## 7. Referencias

- Abdullah, A. H., Chalimah, S., Primadona, I., & Hanantyo, M. H. (2018). Physical and chemical properties of corn, cassava, and Potato Starchs. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 160, 012003. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/160/1/012003>
- Abdullahi, A., Tijjani, A., Abubakar, A. I., Khairulmazmi, A., & Ismail, M. R. (2022). Plant Biomolecule Antimicrobials: An alternative control measures for food security and safety. *Herbal Biomolecules in Healthcare Applications*, 381–406. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85852-6.00024-x>
- Abraham, K., Wöhrlin, F., Lindtner, O., Heinemeyer, G., & Lampen, A. (2010). Toxicology and risk assessment of coumarin: Focus on Human Data. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(2), 228–239. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900281>
- Abubakar, A., & Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 12(1), 1. [https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_175_19)
- Andrade, J. L., & Jaramillo, A. (2012). *Potencialidad y tradiciones de usos de productos forestales no maderables de origen vegetal de los Bosques estacionalmente secos de Macará, provincia de Loja*. Universidad Nacional de Loja. <https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5337/1/POTENCIALIDAD%20Y%20TRADICIONES%20DE%20USOS%20DE%20PRODUCTOS%20FORESTALES.pdf>
- Andrade, J. L., & Jaramillo, A. (2012). *Potencialidad y tradiciones de usos de productos forestales no maderables de origen vegetal de los bosques estacionalmente secos de Macará, provincia*

de Loja. Universidad Nacional de Loja.

<https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5337/1/POTENCIALIDAD%20Y%20TRADICIONES%20DE%20USOS%20DE%20PRODUCTOS%20FORESTALES.pdf>

ASHP. (2022). *Glycerol monooleate: What is it and where is it used?*. Drugs.com.  
<https://www.drugs.com/inactive/glycerol-monooleate-229.html>

Atlas, R. M. (2010). *Handbook of Microbiological Media*. ASM Press.

Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). *Reduca (Biología)*, 2(3), 119–145.  
[https://doi.org/https://eprints.ucm.es/id/eprint/9603/1/Metabolismo\\_secundario\\_de\\_plantas.pdf](https://doi.org/https://eprints.ucm.es/id/eprint/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf)

Banda, K., Weintritt, J., & Gómez, M. J. (2015). *Royal Botanic Garden Edinburgh*. Jardín Botánico de Edimburgo. <http://www.dryflor.info/files/Cartilla%20Bosque%20Seco.pdf>

Baquero, A. (2017, May 24). *Western south america: Along the Pacific Coast of Ecuador*. WWF.  
<https://www.worldwildlife.org/ecoregions/nt0214>

Başer, K. H. C., & Buchbauer, G. (2021). *Handbook of Essential Oils: Science, technology, and applications*. CRC Press.

Bejarano Navas, D. A., Armenta Roncancio, J. E., López Muñoz, L. G., & Cruz Domínguez, M. A. (2020). Evaluación Cualitativa de extractos macerados con diferentes solventes para la extracción de glicoalcaloides y flavonoides de *Dioscorea bulbifera* en condiciones estándar obtenidos en los Llanos Orientales de Colombia. *Entre Ciencia e Ingeniería*, 14(28), 59–65. <https://doi.org/10.31908/19098367.2017>

Beloqui Alcázar, J. (2023). *Alcaloide*. Alcaloide - Enciclopedias Científico-LITERARIAS.

[https://dpd.educa2.madrid.org/web/argos/territorio-gaia/-  
/wiki/Vademecum/Alcaloide/pop\\_up?\\_36\\_redirect=https%3A%2F%2Fdpd.educa2.madrid.  
org%2Fweb%2Fargos%2Fterritorio-gaia%2F-  
%2Fwiki%2FVademecum%2Forphan\\_pages%2Fpop\\_up](https://dpd.educa2.madrid.org/web/argos/territorio-gaia/-/wiki/Vademecum/Alcaloide/pop_up?_36_redirect=https%3A%2F%2Fdpd.educa2.madrid.org%2Fweb%2Fargos%2Fterritorio-gaia%2F-%2Fwiki%2FVademecum%2Forphan_pages%2Fpop_up)

Benítez, A. (2021, March 7). *Chirigua*. Bosque Protector “La prosperina.”

<http://www.bosqueprotector.espol.edu.ec/biodiversidad/chirigua/>

Bimlesh, P., Gurpreet, K., & Harleen, K. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A

Review . Internationale Pharmaceutica Scientia, 1(1).

[https://doi.org/https://www.researchgate.net/publication/284051834\\_Phytochemical\\_screening\\_and\\_Extraction\\_A\\_Review](https://doi.org/https://www.researchgate.net/publication/284051834_Phytochemical_screening_and_Extraction_A_Review)

Biodisk, A. (2023). *Antimicrobial Susceptibility Testing For In Vitro Diagnostic Use*. Ilex

Medical. <https://www.illexmedical.com/files/E-test-Package-Insert/AntimicrobialSusceptibilityTesting.pdf>

Bittmag, W. (2023). Sucrose. National Center for Biotechnology Information. PubChem

Compound Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sucrose#section=Uses>

Buelna, P. (2015, April 26). *Estudio de la actividad antimicrobiana Antibiograma. Métodos e*

*Interpretación de los resultados*. SlidePlayer. <https://slideplayer.es/amp/3938089/>

Buenaño, M. P., Rodríguez, N. J., & Paredes, D. (2015). *Usos de Plantas Medicinales en la*

*comunidad San Jacinto del Cantón Ventanas, Los Ríos - Ecuador*. Revista U.D.C.A

Actualidad & Divulgación Científica.

<https://revistas.udca.edu.co/index.php/ruadc/article/view/452>

Carrión, A., & García, C. (2019). Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica. Universidad de Cuenca Facultad de Ciencias Químicas Escuela de Bioquímica y Farmacia.

[https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60162544/anexo\\_6\\_opcional20190730-67441-1961jlt-libre.pdf?1564522221=&response-content-](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60162544/anexo_6_opcional20190730-67441-1961jlt-libre.pdf?1564522221=&response-content-)

[disposition=inline%3B+filename%3DAnexo\\_6\\_opcional.pdf&Expires=1687283812](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60162544/anexo_6_opcional20190730-67441-1961jlt-libre.pdf?1564522221=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAnexo_6_opcional.pdf&Expires=1687283812)

[&Signature=Fn~g6pIfekHafJ9dZpYa9dked8VQpDP-](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60162544/anexo_6_opcional20190730-67441-1961jlt-libre.pdf?1564522221=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAnexo_6_opcional.pdf&Expires=1687283812&Signature=Fn~g6pIfekHafJ9dZpYa9dked8VQpDP-)

[kH4BqSnPfeXehZ65zoNE86kM-](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60162544/anexo_6_opcional20190730-67441-1961jlt-libre.pdf?1564522221=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAnexo_6_opcional.pdf&Expires=1687283812&Signature=Fn~g6pIfekHafJ9dZpYa9dked8VQpDP-kH4BqSnPfeXehZ65zoNE86kM-)

[aKAtdvWftIszkdqAXW53sgdcK8s6uAgTUpbHCzmmg47ELmGScGyzypmIuIP7dhDSbn](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60162544/anexo_6_opcional20190730-67441-1961jlt-libre.pdf?1564522221=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAnexo_6_opcional.pdf&Expires=1687283812&Signature=Fn~g6pIfekHafJ9dZpYa9dked8VQpDP-kH4BqSnPfeXehZ65zoNE86kM-aKAtdvWftIszkdqAXW53sgdcK8s6uAgTUpbHCzmmg47ELmGScGyzypmIuIP7dhDSbn)

[yrRofQB9pMsEogPzxSFHTOO-b2tQwEv6WL69JBQ0PUxjbXEGz-](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60162544/anexo_6_opcional20190730-67441-1961jlt-libre.pdf?1564522221=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAnexo_6_opcional.pdf&Expires=1687283812&Signature=Fn~g6pIfekHafJ9dZpYa9dked8VQpDP-kH4BqSnPfeXehZ65zoNE86kM-yrRofQB9pMsEogPzxSFHTOO-b2tQwEv6WL69JBQ0PUxjbXEGz-)

[7LuI~sqaZzA0rIkvcAYJ7tJmn2iYN5kXZ4-](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60162544/anexo_6_opcional20190730-67441-1961jlt-libre.pdf?1564522221=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAnexo_6_opcional.pdf&Expires=1687283812&Signature=Fn~g6pIfekHafJ9dZpYa9dked8VQpDP-kH4BqSnPfeXehZ65zoNE86kM-7LuI~sqaZzA0rIkvcAYJ7tJmn2iYN5kXZ4-)

[iFqXMNSoEi9NqklLdM~7R8HAmCbVeGUHb~56ATpty-](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60162544/anexo_6_opcional20190730-67441-1961jlt-libre.pdf?1564522221=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAnexo_6_opcional.pdf&Expires=1687283812&Signature=Fn~g6pIfekHafJ9dZpYa9dked8VQpDP-kH4BqSnPfeXehZ65zoNE86kM-iFqXMNSoEi9NqklLdM~7R8HAmCbVeGUHb~56ATpty-)

[qckVPED8332p5yF6VCWeYNTsiI0CKF3tMixA18SwFcNeNe5EljhlO73HVgztNXWnGc](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60162544/anexo_6_opcional20190730-67441-1961jlt-libre.pdf?1564522221=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAnexo_6_opcional.pdf&Expires=1687283812&Signature=Fn~g6pIfekHafJ9dZpYa9dked8VQpDP-kH4BqSnPfeXehZ65zoNE86kM-qckVPED8332p5yF6VCWeYNTsiI0CKF3tMixA18SwFcNeNe5EljhlO73HVgztNXWnGc)

[ks3f5gGxiUsmryBflk77noyO8A\\_\\_&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60162544/anexo_6_opcional20190730-67441-1961jlt-libre.pdf?1564522221=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DAnexo_6_opcional.pdf&Expires=1687283812&Signature=Fn~g6pIfekHafJ9dZpYa9dked8VQpDP-kH4BqSnPfeXehZ65zoNE86kM-ks3f5gGxiUsmryBflk77noyO8A__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA)

Casado Villaverde, I. (2018, February 1). *Optimización de la extracción de Aceites Esenciales por destilación en corriente de vapor*. Inicio. <https://oa.upm.es/49669/>

Castillo Mendoza, B. E., Cajas Palacios, M. P., Montoya Vizuete, S. N., & Garcia Larreta, F. S. (2022). *Actividad Antioxidante, Polifenoles Totales Y tamizaje fitoquímico de chilangua (eryngium foetidum)*. *RECIAMUC*, 6(3), 480–489.

[https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.\(3\).julio.2022.480-489](https://doi.org/10.26820/reciamuc/6.(3).julio.2022.480-489)

Castillo, G., Zavala, D., & Carrillo, M. L. (2021). Análisis fitoquímico: una herramienta para develar el potencial biológico y farmacológico de las plantas. *Análisis Fitoquímico: Una Herramienta Para develar el potencial*. <https://www.eumed.net/rev/tlatemoani/24/analisis-fitoquimico.html>

Catterway, D. (2023, August 11). *FTIR - a helpful tool to determine chemical composition*. Pacific BioLabs. <https://pacificbiolabs.com/ftir-medical-device-raw-material#:~:text=FTIR%20takes%20advantage%20of%20a,of%20the%20material%20under%20analysis.>

Cavalieri, S., Harbeck, R., McCarter, Y., Ortez, J., Rankin, I., Sautter, R., Sharp, S., & Spiegel, C. (2005). *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. Pan American Health Organization. Retrieved 2023, from <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>.

Cavazos, P., Gonzalez, D., Lanorio, J., & Ynalvez, R. (2021). Secondary metabolites, antibacterial and antioxidant properties of the leaf extracts of acacia rigidula Benth. and Acacia Berlandieri Benth. *SN Applied Sciences*, 3(5). <https://doi.org/10.1007/s42452-021-04513-8>

Celk, L. (2023). *FTIR Spectroscopy*. What is FTIR spectroscopy? <https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/photometry-and-reflectometry/ftir-spectroscopy>

- Chadwick, M., Trewin, H., Gawthrop, F., & Wagstaff, C. (2013). Sesquiterpenoids lactones: Benefits to plants and people. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(6), 12780–12805. <https://doi.org/10.3390/ijms140612780>
- Cheaib, D., El Darra, N., Rajha, H., El-Ghazzawi, I., Maroun, R., & Louka, N. (2018). Effect of the extraction process on the biological activity of lyophilized apricot extracts recovered from apricot pomace. *Antioxidants*, *7*(1), 11. <https://doi.org/10.3390/antiox7010011>
- ChEBI, E. W. (2023). CHEBI. D-erythrose (CHEBI:27904). <https://www.ebi.ac.uk/chebi/searchId.do?chebiId=CHEBI%3A27904>
- Chomel, M., Guittonny-Larchevêque, M., Fernandez, C., Gallet, C., DesRochers, A., Paré, D., Jackson, B. G., & Baldy, V. (2016). Plant secondary metabolites: A key driver of litter decomposition and soil nutrient cycling. *Journal of Ecology*, *104*(6), 1527–1541. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12644>
- Cidlová, H. (2016). *Natural substances – Alkaloids*. Pedagogická fakulta Masarykovy Univerzity. [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/pdf/ps16/chemistry/web/pages/ns-alkaloids.html#:~:text=Many%20alkaloids%20dissolve%20poorly%20in,%E2%80%931%20g%20FL\).](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/pdf/ps16/chemistry/web/pages/ns-alkaloids.html#:~:text=Many%20alkaloids%20dissolve%20poorly%20in,%E2%80%931%20g%20FL).)
- Cordado, M., & Escobar, S. (2013). *Extracción y determinación de la presencia de alcaloides en la flor del árbol de pito (Erythrina Berteroana)*. Escuela especializada en ingeniería ITCA-FEPADE. <http://www.redicces.org.sv/jspui/bitstream/10972/1310/1/Alcaloides.pdf>

- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). Biblioteca Digital real Jardín Botánico (RJB-CSIC)E. Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador .  
[https://bibdigital.rjb.csic.es/medias/63/42/27/85/63422785-1490-4c78-9c97-a4a75a66cc63/files/TOR\\_En\\_Pl\\_Ut\\_Ecuador.pdf](https://bibdigital.rjb.csic.es/medias/63/42/27/85/63422785-1490-4c78-9c97-a4a75a66cc63/files/TOR_En_Pl_Ut_Ecuador.pdf)
- Delgado, M. (2023). *Manuales prácticos para la elaboración de Bioinsumos - gob.mx*. Estrategia de Acompañamiento Técnico.  
[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/737322/10\\_Extractos\\_vegetales.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/737322/10_Extractos_vegetales.pdf)
- Deyno, S., Mtewa, A. G., Hope, D., Bazira, J., Makonnen, E., & Alele, P. E. (2021). Antibacterial activities of Echinops kebericho mesfin tuber extracts and isolation of the most active compound, dehydrocostus lactone. *Frontiers in Pharmacology*, 11.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.608672>
- Dias, M. C., Pinto, D. C., & Silva, A. M. (2021). Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26(17), 5377. <https://doi.org/10.3390/molecules26175377>
- Durán, H. (2019, January 4). Manual de Plantas Medicinales - PPD-Ecuador.org. Inventario y Capacidad de Producción de plantas medicinales. <https://www.ppd-ecuador.org/wp-content/uploads/2019/FondoBecas/SierraCentro-Sur/MANUAL-DE-PLANTAS-MEDICINALES.pdf>
- Ebuehi, O., Babalola, O., & Ahmed, Z. (2006). Phytochemical, nutritive and anti-nutritive composition of cassava (*manihot esculenta l*) tubers and leaves. *Nigerian Food Journal*, 23(1). <https://doi.org/10.4314/nifoj.v23i1.33597>

- El Moussaoui, A., Jawhari, F. Z., Almehti, A. M., Elmsellem, H., Fikri Benbrahim, K., Bousta, D., & Bari, A. (2019). Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of total polyphenols of *Withania frutescens*.l. *Bioorganic Chemistry*, 93, 103337. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103337>
- Enders, A. A., North, N. M., Fensore, C. M., Velez-Alvarez, J., & Allen, H. C. (2021). Functional group identification for FTIR spectra using image-based machine learning models. *Analytical Chemistry*, 93(28), 9711–9718. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00867>
- Esquivel, A. (2007). *Uso de Aceites Esenciales Extraídos Por Medio de Fluidos Supercríticos Para La Elaboración de Alimentos Funcionales*, 20. <https://doi.org/https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4835787>
- Farmacopea, M. (2016). *Sice - Oas*. Métodos de Farmacognosia. [http://www.sice.oas.org/trade/mrcsrs/resolutions/RES\\_017-2016\\_s.pdf](http://www.sice.oas.org/trade/mrcsrs/resolutions/RES_017-2016_s.pdf)
- Farooq, S., Mir, S. A., Shah, M. A., & Manickavasagan, A. (2022). Extraction techniques. *Plant Extracts: Applications in the Food Industry*, 23–37. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-822475-5.00005-3>
- Ferreira, F., & Olivaro, C. (2022). *Glicósidos vegetales y su importancia en la bioprospección*. Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Uruguay. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/10755/1/SAD-749p9.pdf>

- Flores, G. (2018). *Ecuador tiene 2 900 Plantas Medicinales - El comercio*. Diario “El Comercio.”  
<https://www.elcomercio.com/tendencias/ambiente/ecuador-plantas-medicinales-napo-amazonia.html>
- Friedman, M. (2006). Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), 8655–8681.  
<https://doi.org/10.1021/jf061471t>
- Gallegos Zurita, M. (2016). Las Plantas Medicinales: Principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de La Facultad de Medicina*, 77(4), 327. <https://doi.org/10.15381/anales.v77i4.12647>
- Gangasani, J. K., Pemmaraju, D. B., Murthy, U. S. N., Rengan, A. K., & Naidu, V. G. M. (2022). Chemistry of herbal biomolecules. *Herbal Biomolecules in Healthcare Applications*, 63–79.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85852-6.00018-4>
- Gerhardt. (2023). *Métodos de extracción en el análisis de grasas*. C. Gerhardt Analytical Systems.  
<https://www.gerhardt.de/es/know-how/metodos-analiticos/metodos-de-extraccion-en-el-analisis-de-grasas/>
- Gimeno, E. (2006). Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. *ELSEVIER*, 23(6), 80–84. <https://doi.org/https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-compuestos-fenolicos-un-analisis-sus-13063508>
- GLPBIO. (2017). D-Ribulose. Ir a la página de inicio. <https://www.glpbio.com/sp/d-ribulose.html>

- Gonzalez-Coloma, A., Reina, M., Diaz, C. E., & Fraga, B. M. (2010). Natural product-based biopesticides for insect control. *Comprehensive Natural Products II*, 237–268. <https://doi.org/10.1016/b978-008045382-8.00074-5>
- Guija, E., Inocente, M. Á., & Ponce, J. (2014). Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antio[oxidante. *Scielo Perú*. <https://doi.org/http://www.scielo.org.pe/pdf/hm/v15n1/a08v15n1.pdf>
- Haq, I.-U., Khan, S., Sohail, M., Iqbal, M. J., Awan, K. A., & Nayik, G. A. (2023). Tea tree essential oil. *Essential Oils*, 479–500. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91740-7.00017-7>
- Haque, M. (2020). Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, 12(1), 1. [https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/jpbs.jpbs_175_19)
- Heinrich, M., Mah, J., & Amirkia, V. (2021). Alkaloids used as medicines: Structural phytochemistry meets Biodiversity—an update and forward look. *Molecules*, 26(7), 1836. <https://doi.org/10.3390/molecules26071836>
- Hernández-López, A., Sánchez Félix, D. A., Zuñiga Sierra, Z., García Bravo, I., Dinkova, T. D., & Avila-Alejandre, A. X. (2020). Quantification of reducing sugars based on the qualitative technique of Benedict. *ACS Omega*, 5(50), 32403–32410. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04467>

- Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2012). Extraction techniques for the determination of phenolic compounds in food. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 159–180. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-381373-2.00132-0>
- Hohmann, M. S. N., Longhi-Balbinot, D. T., Guazelli, C. F. S., Navarro, S. A., Zarpelon, A. C., Casagrande, R., Arakawa, N. S., & Verri, W. A. (2016). Sesquiterpene lactones. *Studies in Natural Products Chemistry*, 243–264. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-63601-0.00007-7>
- Huana. (2023). Sorbitan ester nonionic lipophilic surfactants, sorbitan fatty acid esters - huana. Guangdong Huana Chemistry Co., Ltd. <https://www.huanachemical.com/products/sorbitan-esters/>
- Instituto de Salud Pública. (2015). Recomendaciones para el control de calidad en bacteriología: estudio de susceptibilidad antimicrobiana por método de dilución. *Recomendaciones Para El Control de Calidad En Bacteriología*. [https://www.ispch.cl/sites/default/files/resolucion/2016/04/Resolucion\\_Exenta\\_N\\_1350.pdf](https://www.ispch.cl/sites/default/files/resolucion/2016/04/Resolucion_Exenta_N_1350.pdf)
- IUSA-ULPGC. (2020). Investigadores del iusa-ulpgc analizan el uso de los antibióticos antimicrobianos en enfermedades porcinas, en uno de los estudios más amplios del sur de europa. *ULPGC Research*. Retrieved 2023, from <https://research.ulpgc.es/investigadores-iusa-ulpgc-analizan-uso-antibioticos-antimicrobianos-enfermedades-porcinas>.
- Jiménez, A., Sánchez, M., & Martínez, M. (2012). Optimización del método captación del radical 2,2- Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) para evaluar actividad antioxidante en bebida de café.

*Tecnología de Alimentos, Nutrición y Bromatología*, 1(1), 2–3.  
<https://doi.org/https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/37659/1/Optimizaci%C3%B3n%20del%20m%C3%A9todo%20captaci%C3%B3n%20del%20radical%202%2C2-difenil-1-picrilhidrazilo%20%28DPPH%29%20para%20evaluar....pdf>

Kahlmeter, G., & Brown, D. (2010). Laboratory control of antimicrobial therapy. *Antibiotic and Chemotherapy*, 115–122. <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-4064-1.00009-9>

Kancherla, N., Dhakshinamoothi, A., Chitra, K., & Komaram, R. B. (2019). Preliminary Analysis of Phytoconstituents and Evaluation of Anthelmintic Property of *Cayratia auriculata* (In Vitro)Nagaraju. *National Library of Medicine*, 350–356.  
<https://doi.org/10.26574/maedica.2019.14.4.350>

Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422.  
<https://doi.org/10.1007/s13197-011-0251-1>

Keutgen, A. J., Wszelaczyńska, E., Pobereźny, J., Przewodowska, A., Przewodowski, W., Milczarek, D., Tatarowska, B., Flis, B., & Keutgen, N. (2019). Antioxidant properties of potato tubers (*solanum tuberosum* L.) as a consequence of genetic potential and growing conditions. *PLOS ONE*, 14(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0222976>

Khan, Z. A., Siddiqui, M. F., & Park, S. (2019). Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing. *Diagnostics*, 9(2), 49. <https://doi.org/10.3390/diagnostics9020049>

Kokoska, L., Kloucek, P., Leuner, O., & Novy, P. (2019). Plant-derived products as antibacterial and antifungal agents in human health care. *Current medicinal chemistry*.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30182844/>

Kotzé, M., Eloff, J. N., & Houghton, P. J. (2002). Extraction of antibacterial compounds from *Combretum microphyllum* (Combretaceae). *South African Journal of Botany*, 68(1), 62–67.  
[https://doi.org/10.1016/s0254-6299\(16\)30456-2](https://doi.org/10.1016/s0254-6299(16)30456-2)

Kusumawati, A. (2021). Antioxidant activity and sun protection factor of black glutinous rice (*Oryza sativa* var. *glutinosa*). *Tropical Journal of Natural Product Research*, 5(11), 1958–1961. <https://doi.org/10.26538/tjnpr/v5i11.11>

Kytidou, K., Artola, M., Overkleeft, H. S., & Aerts, J. M. (2020). Plant glycosides and glycosidases: A treasure-trove for therapeutics. *Frontiers in Plant Science*, 11.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00357>

Lattanzio, V. (2013). Phenolic compounds: Introduction. *Natural Products*, 1543–1580.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6\\_57](https://doi.org/10.1007/978-3-642-22144-6_57)

Libretexts. (2022, November 2). *Prueba de susceptibilidad de Disco Kirby-Bauer*. LibreTexts Español.  
[https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Libro%3A\\_Microbiolog%C3%ADa\\_\(Sin\\_1%C3%ADmites\)/13%3A\\_Medicamentos\\_antimicrobianos/13.5%3A\\_Medicaci%C3%B3n\\_de\\_la\\_susceptibilidad\\_a\\_los\\_medicamentos/13.5B%3A\\_Prueba\\_de\\_Susceptibilidad\\_de\\_Disco\\_Kirby-Bauer](https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Libro%3A_Microbiolog%C3%ADa_(Sin_1%C3%ADmites)/13%3A_Medicamentos_antimicrobianos/13.5%3A_Medicaci%C3%B3n_de_la_susceptibilidad_a_los_medicamentos/13.5B%3A_Prueba_de_Susceptibilidad_de_Disco_Kirby-Bauer)

- Liliana, C., & Oana-Viorela, N. (2020). Red beetroot: Composition and health effects - A Review. *Journal of Nutritional Medicine and Diet Care*, 5(2). <https://doi.org/10.23937/2572-3278.1510043>
- Lin, D., Xiao, M., Zhao, J., Li, Z., Xing, B., Li, X., Kong, M., Li, L., Zhang, Q., Liu, Y., Chen, H., Qin, W., Wu, H., & Chen, S. (2016). An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. *Molecules*, 21(10), 1374. <https://doi.org/10.3390/molecules21101374>
- List, G. R. (2015). Soybean lecithin: Food, industrial uses, and other applications. *Polar Lipids*, 1–33. <https://doi.org/10.1016/b978-1-63067-044-3.50005-4>
- Lopez, A. (2022). Métodos de extracción. - Colecciones Digitales Udlap. Colecciones Digitales Udlap. [http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lpro/lopez\\_a\\_e/capitulo1.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lpro/lopez_a_e/capitulo1.pdf)
- Loyola, V., Sánchez, P., Canto, B., Gutiérrez, L., Galaz, R., & Moreno, O. (2004). Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. *Scielo*, 48, 67–94. <https://doi.org/https://www.scielo.org.mx/pdf/rsqm/v48n1/v48n1a13.pdf>
- Lustre Sánchez, H. (2022). *Los superpoderes de las plantas: Los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa*. *Revista Digital Universitaria*, 23(2). <https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2022.23.2.10>
- Lustre Sánchez, H. (2022). Los superpoderes de las plantas: Los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa. *Revista Digital Universitaria*, 23(2). <https://doi.org/10.22201/cuaieed.16076079e.2022.23.2.10>

- Macías, R. (2015). *Conocimientos locales sobre flora y fauna del área*. Registro y puesta en valor del patrimonio de la cultura manteña de los cerros hojas, jaboncillo, negrita, bravo y guayabal. <https://www.patrimoniocultural.gob.ec/wp-content/uploads/2022/09/Conocimientos-Locales-Fauna-Flora.-Macias-2015.pdf>
- Macías, V., Álvarez, J., & Suárez, H. (2010). *Terpenos Con Actividad Biológica Anti-VIH*, 7(2), 257–258. <https://doi.org/https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=512156323008>
- Mahajan, M. (2017). *Chapter – 1 alkaloids, an overview*. Government College for Women Gandhi Nagar, Jammu, . <https://www.gcwgandhinagar.com/econtent/document/1588068142ch-1.pdf>
- Malbrán, C. (2012). *Determinacion de la sensibilidad método de dilución*. Servicio Antimicrobianos . <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>
- Malik, J., & Mandal, S. C. (2022). Extraction of herbal biomolecules. *Herbal Biomolecules in Healthcare Applications*, 21–46. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85852-6.00015-9>
- Mathias, J. (2022, December 20). *Ftir Analysis Beginner’s Guide: Interpreting Results: Innovatech*. Innovatech Labs. <https://www.innovatechlabs.com/newsroom/1882/interpreting-analyzing-ftir-results/>
- Mckens P. (2023). *2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC; tetrazolium chloride)*. GoldBio. <https://goldbio.com/product/115/235-triphenyltetrazolium-chloride-ttc-tetrazolium->



<https://www.minambiente.gov.co/direccion-de-bosques-biodiversidad-y-servicios-ecosistemicos/bosque-seco-tropical/>

Missouri Botanical Garden. (2023). *Name - eriotheca ruizii (K. Schum.) A. Robyns*. Tropicos.org. <http://legacy.tropicos.org/Name/3900655>

Mohammad Azmin, S. N., & Mat Nor, M. S. (2020). Chemical fingerprint of *Centella Asiatica*'s bioactive compounds in the ethanolic and aqueous extracts. *Advances in Biomarker Sciences and Technology*, 2, 35–44. <https://doi.org/10.1016/j.abst.2020.10.001>

Mohan, V. R., Tresina, P. S., & Daffodil, E. D. (2016). Antinutritional factors in legume seeds: Characteristics and determination. *Encyclopedia of Food and Health*, 211–220. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384947-2.00036-2>

Mohanraj, R., & Sivasankar, S. (2014). Sweet Potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam) - A Valuable Medicinal Food: A Review. *Journal of Medicinal Food*, 17(7), 733–741. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.2818>

Moliterni, V. M., Pojić, M., & Tiwari, B. (2022). Industrial hemp by-product valorization. *Industrial Hemp*, 301–340. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-90910-5.00007-5>

Morales-Fernández, S. D., Rafael Mora-Aguilar, R., Salinas-Moreno, Y., Rodríguez-Pérez, J. E., Colinas-León, M. T., & Lozoya-Saldaña, H. (2018). Growth and sugar content of potato tubers in four maturity stages under greenhouse conditions. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, XXIV(1), 53–67. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2016.11.029>

- Morales, J., & Arellano, L. (2023, June 22). Los bosques tropicales secos y su contribución al bienestar humano. Los Bosques tropicales secos y su contribución al bienestar humano. <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/770-los-bosques-tropicales-secos-y-su-contribucion-al-bienestar-humano>
- Morera, J. (2023, April 6). Qué son los extractos vegetales y por qué son tan necesarios. Morera S.L. <https://morera.com/descubre-que-son-los-extractos-vegetales-y-por-que-son-tan-necesarios/>
- Mukherjee, P. K. (2019). Extraction and other downstream procedures for evaluation of Herbal Drugs. *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs*, 195–236. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813374-3.00006-5>
- Muñoz, A. M., & Ramos, F. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 73(3). [https://doi.org/http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2007000300003](https://doi.org/http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2007000300003)
- Mustikasari, T., Hervani, D., & Warnita, W. (2023). Application of coumarin concentrations and number of nodes on induction potato (*solanum tuberosum* L.) micro tuber in vitro. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1177(1), 012024. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1177/1/012024>
- Mustikasari, T., Hervani, D., & Warnita, W. (2023). Application of coumarin concentrations and number of nodes on induction potato (*solanum tuberosum* L.) micro tuber in vitro. *IOP*

*Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1177(1), 012024.  
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/1177/1/012024>

Nature and Culture International. (2023, May 15). *Bosque Seco Tropical naturaleza y cultura internacional. Naturaleza y Cultura Internacional* .  
<https://www.natureandculture.org/es/tropical-dry-forests/>

Nature. (2015). Roche Gobbles Smarticles. *Nature Biotechnology*, 33(10), 1012–1012.  
<https://doi.org/10.1038/nbt1015-1012a>

Nazneen, B., & Wesely, E. (2012). Ft-ir studies on the leaves of albizia lebbeck benth. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4(3).  
[https://doi.org/https://www.researchgate.net/profile/Md-Bobby/publication/332652908\\_FT-IR\\_studies\\_on\\_the\\_leaves\\_of\\_Albizia\\_lebbeck\\_benth/links/617a789feef53e51e1f74220/F-T-IR-studies-on-the-leaves-of-Albizia-lebbeck-benth.pdf](https://doi.org/https://www.researchgate.net/profile/Md-Bobby/publication/332652908_FT-IR_studies_on_the_leaves_of_Albizia_lebbeck_benth/links/617a789feef53e51e1f74220/F-T-IR-studies-on-the-leaves-of-Albizia-lebbeck-benth.pdf)

Nowak, D., & Jakubczyk, E. (2020). The freeze-drying of foods—the characteristic of the process course and the effect of its parameters on the physical properties of food materials. *Foods*, 9(10), 1488. <https://doi.org/10.3390/foods9101488>

OMSA. (2023). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las vacunas Para Los Animales terrestres.  
[https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/E\\_summry.htm](https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/E_summry.htm)

- OPS. (2019). Situación de las plantas medicinales en Perú Informe de reunión del grupo de expertos en plantas medicinales. Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/documentos/situacion-plantas-medicinales-peru-informe-reunion-grupo-expertos-plantas-medicinales>
- Otero, E., Mosquera, L., Silva, G., & Guzmán, J. (2006). Dinámica y Estructura del bosque seco. Bosque Seco Tropical - Colombia - Colección ecológica del Banco de Occidente. <https://www.imeditores.com/banocc/seco/cap5.htm#:~:text=En%20casi%20todos%20los%20bosques,como%20el%20mamoncillo%2C%20y%20las>
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5. <https://doi.org/10.1017/jns.2016.41>
- Paredes, D., Buenaño, M., & Mancera, N. (2015). USOS DE PLANTAS MEDICINALES EN LA COMUNIDAD SAN JACINTO DEL CANTÓN VENTANAS, LOS RÍOS - ECUADOR. *Scielo*, 18. [https://doi.org/http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-42262015000100006#:~:text=Las%20plantas%20medicinales%20m%C3%A1s%20importantes,el%20or%C3%A9gano%20\(Origanum%20vulgare\).](https://doi.org/http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262015000100006#:~:text=Las%20plantas%20medicinales%20m%C3%A1s%20importantes,el%20or%C3%A9gano%20(Origanum%20vulgare).)
- Pérez, I. (2006). *Metabolitos secundarios aislados de las raíces y hojas de Stevia jorullensis*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/317/Metabolitos%20secundarios%20aislados.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Pérez, N. (2014). *Tema no 8. Compuestos Fenólicos*. Universidad Central de Venezuela.  
<http://caelum.ucv.ve/bitstream/10872/7968/1/8.%20COMPUESTOS%20FENOLICOS%202013-2014.pdf>
- Pesewu, G. A., Cutler, R. R., & Humber, D. P. (2008). Antibacterial activity of plants used in traditional medicines of Ghana with particular reference to MRSA. *Journal of Ethnopharmacology*, *116*(1), 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.11.005>
- Pharmawati, M., & Wrsiati, L. (2020). Phytochemical screening and ftir spectroscopy on crude Extract from enhalus acoroides leaves. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, *24*(70). [https://doi.org/https://mjas.analis.com.my/mjas/v24\\_n1/pdf/Pharmawati\\_24\\_1\\_8.pdf](https://doi.org/https://mjas.analis.com.my/mjas/v24_n1/pdf/Pharmawati_24_1_8.pdf)
- Pozo, K. (2021). *Composición, estructura y diversidad Florística del bosque seco en la comuna Aguadita-San Marcos, de la provincia de Santa Elena*. Repositorio UPSE. <https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/6522/1/UPSE-TIA-2021-0129.pdf>
- Pujol, A., Tamargo, B., Salas, E., Calzadilla, C., Acevedo, R., & Sierra, G. (2020). Tamizaje fitoquímico de extractos obtenidos de la planta *Sapindus saponaria* L que crece en Cuba. *Revista Bionatura*, *1*, 1–6. <https://doi.org/10.21931/RB/2020.05.03.7>
- Puttaswamy, S., Gupta, S. K., Regunath, H., Smith, L. P., & Sengupta, S. (2018). A comprehensive review of the present and future antibiotic susceptibility testing (AST) systems. *Archives of Clinical Microbiology*, *09*(03). <https://doi.org/10.4172/1989-8436.100083>
- Raj, S. J., BM, G. K., SB, D., A, F. A., GM, G. R., & S, H. S. (2023). Antibacterial activity of *Sesbania grandiflora* leaf extracts against various pathogens. *International Journal of*

*Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 79(1).

<https://doi.org/10.47583/ijpsrr.2023.v79i01.023>

Ramirez, L., & Marin, D. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Redalyc*, 15(42), 263–268.  
<https://doi.org/https://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>

Rashid, S., Majeed, L. R., Nisar, B., Nisar, H., Bhat, A. A., & Ganai, B. A. (2021). Phytomedicines: Diversity, Extraction, and conservation strategies. *Phytomedicine*, 1–33.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-824109-7.00009-1>

Ratti, C. (2001). Hot air and freeze-drying of high-value foods: A Review. *Journal of Food Engineering*, 49(4), 311–319. [https://doi.org/10.1016/s0260-8774\(00\)00228-4](https://doi.org/10.1016/s0260-8774(00)00228-4)

Riofrio, I. (2019, April 25). El Bosque Seco, Una Joya Amenazada en el Ecuador. Mongabay.  
<https://es.mongabay.com/2018/07/ecuador-bosque-seco/>

Rivadeneira-Domínguez, E., Vázquez-Luna, A., Rodríguez-Landa, J. F., & Díaz-Sobac, R. (2013). Neurotoxic effect of linamarin in rats associated with cassava (*manihot esculenta* Crantz) consumption. *Food and Chemical Toxicology*, 59, 230–235.  
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.06.004>

Rodrigues, L. S., Silva, A. R., & Macêdo, A. A. (2017). Noni (*Morinda citrifolia* Linn.): Determinação Fitoquímica e potencial antioxidante Pelo Método DPPH. *Conexões - Ciência e Tecnologia*, 11(4), 47. <https://doi.org/10.21439/conexoes.v11i4.921>

- Rodríguez-Montero, L., Berrocal-Jiménez, A., Campos-Rodríguez, R., & Madriz-Martínez, M. (2020). Determinación de la actividad biocida de Extractos vegetales para el combate de la mosca blanca *bemisia tabaci* (Hemíptera: Aleyrodidae). *Revista Tecnología En Marcha*. <https://doi.org/10.18845/tm.v33i3.4373>
- Ruiz-Cruz, S., Chaparro-Hernández, S., Ruiz, K. L., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Ortega, L. E., Ornelas-Paz, J. de, & Mata, M. A. (2017). Flavonoids: Important Biocompounds in food. *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. <https://doi.org/10.5772/67864>
- Rutvik. (2023, February 5). *Percolation*. Pharmacy Guideline. <https://www.pharmacyguideline.com/2023/02/percolation.html>
- Safarzaei, A., Sarhadi, H., Haddad Khodaparast, M. H., Shahdadi, F., & Dashipour, A. R. (2020). Optimization of aqueous and alcoholic extraction of phenolic and antioxidant compounds from caper (*Capparis spinosa* L.) roots assisted by ultrasound waves. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 22(4). <https://doi.org/10.5812/zjrms.100747>
- Salam, Md. A., Al-Amin, Md. Y., Pawar, J. S., Akhter, N., & Lucy, I. B. (2023). Conventional methods and future trends in antimicrobial susceptibility testing. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(3), 103582. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103582>
- Schmitt, C. B. (2013). Global Tropical Forest types as support for the consideration of biodiversity under REDD+. *Global tropical forest types as support for the consideration of biodiversity under REDD+*.

<https://www.researchgate.net/publication/258925740> Global tropical forest types as support for the consideration of biodiversity under REDD

SEDICI. (2023). *Producción de metabolitos*. Repositorio de la Universidad Nacional de La Plata. [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/5/Producci%C3%B3n\\_de\\_metabolitos.pdf?sequence=7](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2211/5/Producci%C3%B3n_de_metabolitos.pdf?sequence=7)

Shewry, P. R. (2003). Tuber storage proteins. *Annals of Botany*, 91(7), 755–769. <https://doi.org/10.1093/aob/mcg084>

Soto-Blanco, B. (2022). Herbal glycosides in healthcare. *Herbal Biomolecules in Healthcare Applications*, 239–282. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-85852-6.00021-4>

Srivastava, P., Singh, M., Devi, G., & Chaturvedi, R. (2014). Herbal Medicine and biotechnology for the benefit of human health. *Animal Biotechnology*, 563–575. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416002-6.00030-4>

Sülsen, V. P. (2021). Sesquiterpene lactones and diterpenes: Promising therapeutic candidates for infectious diseases, Neoplasms and other chronic disorders. *Molecules*, 26(5), 1251. <https://doi.org/10.3390/molecules26051251>

Swinney, D. C. (2011). Molecular mechanism of action (mtoa) in Drug Discovery. *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 301–317. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-386009-5.00009-6>

- Tankeshwar, A. (2022, June 9). *E-TEST (Epsilometer): Principle, procedure, results • microbe online*. Microbe Online. <https://microbeonline.com/e-test-epsilometer-test-principle-purpose-procedure-results-and-interpretations/>
- Torres, C. (2016, October 22). *El Bosque Seco de El Paraíso se recupera Lentamente*. El Telégrafo. <https://web.archive.org/web/20161030233341/http://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/guayaquil/10/el-bosque-seco-de-el-paraiso-se-recupera-lentamente>
- Triana, Y., Utami, P. R., Laksono, A. D., Awali, J., & Tajalla, G. U. (2021). The effect of addition organic inhibitor bintaro fruit extract (Cerbera Manghas) to inhibition efficiency and corrosion rate on JIS G3131 Steel in 0,1 M H<sub>2</sub>so<sub>4</sub> environment. *Journal of Physics: Conference Series*, 1803(1), 012013. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1803/1/012013>
- Trinidad, M. (2019, July 26). *El Pasallo, El Rizoma que disminuye la anemia*. Revista Agronoticias. <https://agronoticias.pe/alimentacion-y-salud/el-pasallo-el-rizoma-que-disminuye-la-anemia/>
- Valentova, K., Cvak, L., Muck, A., Ulrichova, J., & Simanek, V. (2003). Antioxidant activity of extracts from the leaves of *Smallanthus sonchifolius*. *European Journal of Nutrition*, 42(1), 61–66. <https://doi.org/10.1007/s00394-003-0402-x>
- Vazquez-Pertejo, M. T. (2023, May 20). *Pruebas de sensibilidad O antibiogramas - enfermedades infecciosas*. Manual MSD versión para profesionales. <https://www.msmanuals.com/es/professional/enfermedades->

infecciosas/diagn%C3%B3stico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas

Velraj, G., Ramya, R., & Nazni, P. (2011). Fourier Transform Infrared Spectroscopic Study on Glycoalkaloid Concentration in Varieties of *Solanum tuberosum*. *Journal of Experimental Sciences*, 1(2), 68–71. <https://doi.org/https://core.ac.uk/download/pdf/236016068.pdf>

WHO. (2022). *Quality Control Methods - World Health Organization*. World Health Organization.

[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44479/9789241500739\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44479/9789241500739_eng.pdf)

Wink, M. (2016). Alkaloids: Properties and determination. *Encyclopedia of Food and Health*, 97–105. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384947-2.00019-2>

WWF. (2022). *Glosario ambiental: ¿Qué son los bosques tropicales?*. WWF. <https://www.wwf.org.mx/?329990%2FGlosario-ambiental-Que-son-los-bosques-tropicales#:~:text=En%20su%20nombre%20se%20encuentra,y%20el%20sudoeste%20de%20Asia>.

Zhang, J., Qiu, X., Tan, Q., Xiao, Q., & Mei, S. (2020). A Comparative Metabolomics Study of Flavonoids in Radish with Different Skin and Flesh Colors (*Raphanus sativus* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(49), 14463–14470. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c05031>

## 8. Anexos

### Anexo 1. Ficha de información de cada microorganismo



# *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers

8739™

Product Sheet

## Description

*Escherichia coli* strain Crooks is a whole-genome sequenced bacterial strain that was isolated from feces. This product has applications as a quality control strain in testing antimicrobial handwashing formulations, media testing, efficacy testing, and bioresistance testing.

**Strain designation:** Crooks

**Deposited As:** *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers

**Type strain:** No

**Toxin genes:** *stx1* (Shiga toxin 1) negative; *stx2* (Shiga toxin 2) negative

---

## Storage Conditions

**Product format:** Freeze-dried

**Storage conditions:** 2°C to 8°C

---

## Intended Use

This product is intended for laboratory research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic use, any human or animal consumption, or any diagnostic use.



# ***Staphylococcus aureus*** **subsp. *aureus* Rosenbach**

6538™

## **Description**

*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* strain FDA 209 was isolated from a human lesion. This whole-genome sequenced bacterium can be used in testing media, sanitizers, disinfectants, antimicrobial preservatives, and bactericides. This strain is also recommended as a test microorganism for USP chapters <1072>, <2021>, <51>, <61>, <62>, and <71>.

**Strain designation:** FDA 209

**Deposited As:** *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach

**Type strain:** No

---

## **Storage Conditions**

**Product format:** Freeze-dried

**Storage conditions:** 2°C to 8°C

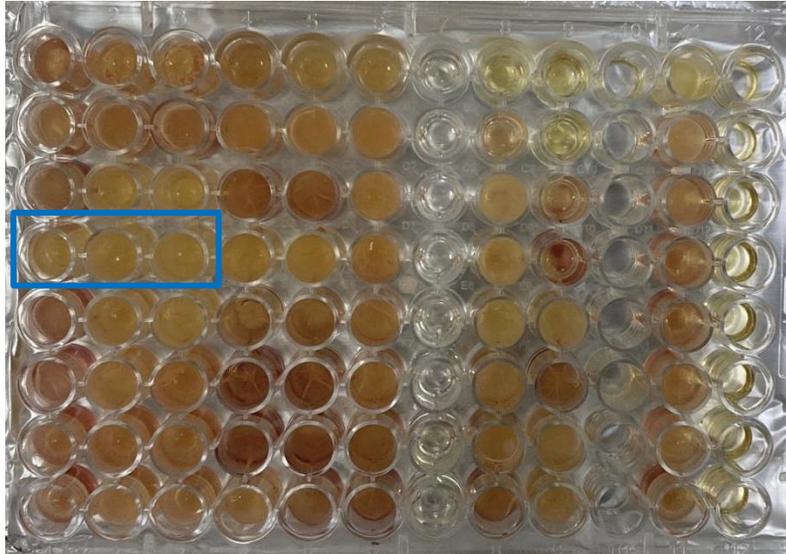
---

## **Intended Use**

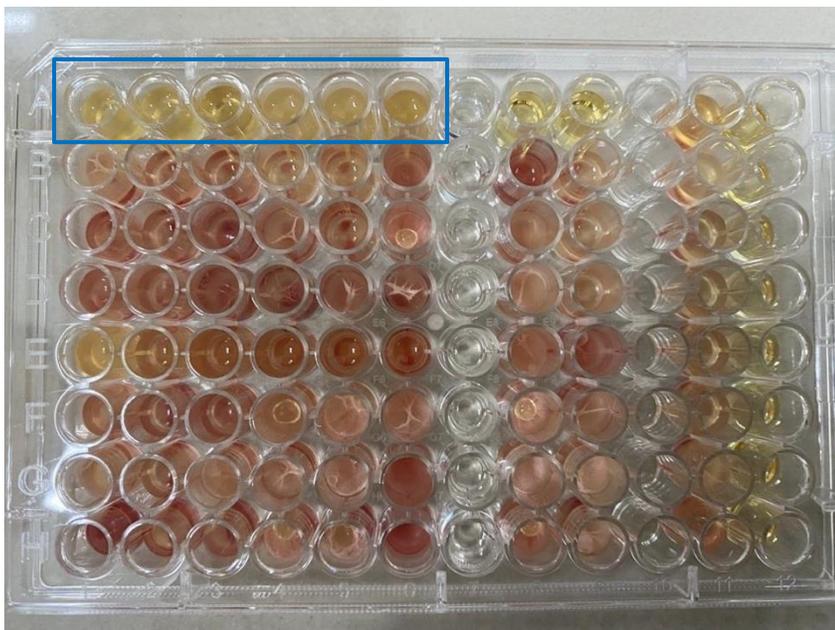
This product is intended for laboratory research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic use, any human or animal consumption, or any diagnostic use.

Anexo 2. Concentración mínima inhibitoria de los microorganismos evaluados por microdilución.

*S. aureus*



*E. coli*



### Anexo 3. Resultados del programa estadístico InfoStat.

Nueva tabla : 26/8/2023 - 15:44:28 - [Versión : 30/4/2020]

#### Prueba de Kruskal Wallis

| Variable | tipo extracto | N | Medias  | D.E.  | Medianas | H    | p      |
|----------|---------------|---|---------|-------|----------|------|--------|
| ic 50    | Acuoso        | 3 | 2729,13 | 18,20 | 2739,21  | 6,49 | 0,0107 |
| ic 50    | Alcohólico    | 3 | 233,24  | 5,33  | 232,62   |      |        |
| ic 50    | Hidro         | 3 | 184,09  | 41,79 | 160,07   |      |        |

| Trat.      | Medias  | Ranks    |
|------------|---------|----------|
| Hidro      | 184,09  | 2,33 A   |
| Alcohólico | 233,24  | 4,67 A B |
| Acuoso     | 2729,13 | 8,00 B   |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )