**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**
**SEDE GUAYAQUIL**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

# EXPLORACIÓN FITOQUÍMICA, CROMATOGRÁFICA LÍQUIDA AL VACÍO Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ORGÁNICO DE *TECOMA CASTANIFOLIA* CONTRA *CANDIDA ALBICANS*, CAUSANTE DE PATOLOGÍAS OPORTUNISTAS

*Trabajo de titulación previo a la obtención del título de ingeniero en Biotecnología*

**AUTORES:**

JORDAN MATÍAS PEÑA PÁEZ
BECKER JOSUÉ BURGOS BANCHÓN

**TUTOR:**

ING. DIANA KATHIUSCA ÁGUILA CHÁVEZ Mgtr.

**GUAYAQUIL - ECUADOR**
**2024**

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

Nosotros, **Jordan Matías Peña Páez** con documento de identificación N° 0951921709 **y Becker Josué Burgos Banchón** con documento de identificación N° 0931063440; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos 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, 14 de septiembre del año 2024

Atentamente,

Jordan Matías Peña Páez
CI: 0951921709

Becker Josué Burgos Banchón
CI: 0931063440

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

Nosotros, **Jordan Matías Peña Páez** con documento de identificación N° 0951921709 **y Becker Josué Burgos Banchón** con documento de identificación N° 0931063440, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo experimental: **"EXPLORACIÓN FITOQUÍMICA, CROMATOGRÁFICA LÍQUIDA AL VACÍO Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ORGÁNICO DE *TECOMA CASTANIFOLIA* CONTRA *CANDIDA ALBICANS*, CAUSANTE DE PATOLOGÍAS OPORTUNISTAS"**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniero/a en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

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

Guayaquil, 14 de septiembre del año 2024

Atentamente,

Jordan Matías Peña Páez
CI: 0951921709

Becker Josué Burgos Banchón
CI: 0931063440

**CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo, **Diana Kathiusca Águila Chávez** con documento de identificación N° 0950174763, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **"EXPLORACIÓN FITOQUÍMICA, CROMATOGRÁFICA LÍQUIDA AL VACÍO Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ORGÁNICO DE *TECOMA CASTANIFOLIA* CONTRA *CANDIDA ALBICANS*, CAUSANTE DE PATOLOGÍAS OPORTUNISTAS",** realizado por **Jordan Matías Peña Páez** con documento de identificación N° 0951921709 y **Becker Josué Burgos Banchón** con documento de identificación N° 0931063440, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 14 de septiembre del año 2024

Atentamente,

Diana Kathiusca Águila Chávez

CI: 0950174763

**Dedicatoria**

Por Jordan Peña.

A mis padres, por ser mi fuente inagotable de amor, apoyo y sabiduría. Gracias por guiarme con paciencia y por creer en mí en cada paso de este camino. Este logro también es suyo, y lo comparto con ustedes con todo mi corazón.

A mi querido Vegeta, mi fiel compañero en las largas noches de estudio. Gracias por estar siempre a mi lado, brindándome calma y alegría. Eres más que una mascota, eres una parte esencial de mi vida.

**Dedicatoria**

Por Becker Burgos.

Esta tesis está dedicada a mis padres, Beker Burgos y Jasmín Banchón quienes con su amor, esfuerzo, sacrificio y apoyo incondicional me han guiado en cada paso de mi vida. Esta tesis es un reflejo de los valores que me inculcaron y del esfuerzo que han hecho para que yo alcanzara mis sueños. Gracias por confiar siempre en mí y en todo mi proceso.

A mi esposa e hijo quienes fueron mi motor y motivación para no derrumbarme, por su comprensión, paciencia y constante ánimo durante este arduo proceso. Su apoyo a sido fundamental para que hoy pueda celebrar este logro.

Para mis tíos Tamara Banchón y Aldo Banchón quienes en vida fueron como mis padres y ahora gracias a sus consejos que un día mencionaron ahora soy el hombre y padre que soy, a ellos por ser parte principal de mi vida, allá en el cielo estoy orgulloso de culminar mis estudios y es por ustedes y para ustedes.

**Agradecimientos**

Por Jordan Peña.

A mis padres, por ser el pilar fundamental en mi vida. Su amor incondicional, su apoyo constante y sus sabias palabras han sido mi mayor motivación para alcanzar esta meta. Les agradezco profundamente por estar siempre a mi lado, en cada momento de esta travesía.

A mi tutora de tesis, Diana Águila, por su dedicación y guía en todo este proceso. Su conocimiento y paciencia me han permitido crecer tanto académica como personalmente. Gracias por su tiempo y por compartir su experiencia conmigo.

Al profesor Jaime, por su valiosa orientación y por inspirarme a seguir adelante. Sus enseñanzas han dejado una marca imborrable en mi formación.

A mis amistades, que con su compañía y palabras de aliento han hecho de este camino algo más llevadero. Gracias por estar allí en los momentos de alegría y también en los de dificultad. Este logro es un reflejo del apoyo y cariño que me han brindado.

**Agradecimientos**

Por Becker Burgos.

Esta tesis representa el fruto de un largo camino académico que no habría sido posible sin el apoyo, la guía y el aliento de muchas personas, a quienes quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

En primer lugar, agradecer a Dios por permitirme llegar tan lejos y haber hecho posible la culminación de mis estudios. Así mismo agradecer a mi padre Beker Burgos y Jasmin Banchon por todo el apoyo desde el inicio de este largo camino hasta el final, quienes fueron, son y serán pilar fundamental para que todo esto sea posible. Su apoyo incondicional y emocional me incentivaron a seguir adelante todos los días, por eso estoy muy agradecido y soy muy afortunado de tener a los mejores padres del mundo y agradezco a Dios y a la vida por eso.

También agradecer a mi tutora de tesis Diana Águila por sus valiosos consejos y paciencia a lo largo de todo este proceso. Su experiencia y conocimiento han sido fundamentales para el desarrollo de esta investigación. Quisiera expresar mi gratitud a la institución que me vio crecer a lo largo de mi carrera universitaria la Universidad Politécnica Salesiana y a todos quienes la conforman. De igual manera agradezco a los profesores Msc. Kevin Cedeño, Msc. Jaime Naranjo, Msc. Gabriela Andrade que me acompañaron en mi formación y preparación de este trabajo de investigación, quienes estuvieron para mí no solo en lo académico si no también en lo personal y quienes han compartido conmigo su conocimiento.

Para finalizar agradecer, a mi amigo Jeem Vera por todo el apoyo dentro de mi proceso y trabajo de investigación, persona que me ha ayudado incondicionalmente y ha venido junto a mi desde el inicio de mi carrera y ahora que ya somos colegas profesionales. Y así agradecer a todos aquellos que, de una u otra manera, han contribuido a la culminación de esta tesis. Gracias por ser parte de este viaje.

**Resumen**

El género *Tecoma* es un grupo de árboles y arbustos pequeños nativos de América tropical y subtropical, que ha sido objeto de investigación fitoquímica por su potencial como fuente de compuestos bioactivos. Estos incluyen alcaloides, flavonoides y glicósidos, que son conocidos por sus propiedades antibacterianas y antioxidantes. La presente tesis examinó la capacidad biológica del extracto orgánico de *Tecoma castanifolia* para combatir el hongo *Candida albicans*. El objetivo principal fue realizar una evaluación de la actividad biológica del extracto orgánico de *Tecoma castanifolia* obtenido utilizando cromatografía líquida al vacío (VLC). Los objetivos específicos incluyeron la obtención del extracto, la caracterización fitoquímica del mismo y la identificación de su actividad antifúngica mediante micro dilución en placas multipocillos. La recolección y preparación del material vegetal, la extracción asistida por ultrasonido y la concentración del extracto mediante rotavapor fueron los pasos de la técnica. Se utilizó VLC para dividir el extracto orgánico en siete partes y se analizó su composición fitoquímica para descubrir la presencia de alcaloides y cumarinas. Finalmente, se realizó la prueba de micro dilución para determinar si *Candida albicans* estaba inhibida. Los hallazgos indicaron que, a pesar de la obtención de 106,38 gramos de extracto orgánico, no se logró detener el crecimiento de *Candida albicans*. Una posible causa de la falta de inhibición fue identificada como una baja concentración de extracto. En conclusión, aunque la cromatografía líquida al vacío fue un método efectivo para obtener y fraccionar el extracto, la cantidad y la concentración obtenidas no demostraron una actividad antifúngica significativa. Para mejorar su eficacia contra *Candida albicans*, las investigaciones futuras deberían enfocarse en optimizar la concentración del extracto o combinar varias técnicas de extracción.

**Palabras claves:** *Tecoma castanifolia*; Extracto orgánico; Cromatografía líquida al vacío; *Candida albicans*; Actividad antifúngica.

**Abstract**

The *Tecoma* genus is a group of small trees and shrubs native to tropical and subtropical America, which has been the subject of phytochemical research due to its potential as a source of bioactive compounds. These include alkaloids, flavonoids, and glycosides, known for their antibacterial and antioxidant properties. This thesis examined the biological capability of the organic extract from *Tecoma castanifolia* to combat the fungus *Candida albicans*. The main objective was to evaluate the biological activity of the organic extract of *Tecoma castanifolia* obtained using vacuum liquid chromatography (VLC). The specific objectives included obtaining the extract, characterizing its phytochemical profile, and identifying its antifungal activity through microdilution in multi-well plates. The technique involved the collection and preparation of plant material, ultrasound-assisted extraction, and the concentration of the extract using a rotary evaporator. VLC was used to divide the organic extract into seven parts, and its phytochemical composition was analyzed to reveal the presence of alkaloids and coumarins. Finally, the microdilution test was performed to determine if *Candida albicans* was inhibited. The findings indicated that, despite obtaining 106.38 grams of organic extract, the growth of *Candida albicans* was not inhibited. A possible cause for the lack of inhibition was identified as a low concentration of the extract. In conclusion, although vacuum liquid chromatography was an effective method for obtaining and fractionating the extract, the quantity and concentration obtained did not demonstrate significant antifungal activity. To improve its efficacy against *Candida albicans*, future research should focus on optimizing the extract's concentration or combining multiple extraction techniques.

**Key words:** *Tecoma castanifolia*; Organic extract; Vacuum liquid chromatography; *Candida albicans*; Antifungical activity.

## Índice de Contenido

**Capítulo 1 ..... 1**

**Antecedentes ..... 1**

Introducción ..... 1

Planteamiento del problema ..... 3

Justificación ..... 4

Objetivos ..... 6

Objetivo General ..... 6

Objetivos Específicos ..... 6

**Capítulo 2 ..... 7**

**Marco Teórico ..... 7**

Bosque Seco Tropical ..... 7

Género Tecoma ..... 8

Tecoma castanifolia ..... 8

Descripción botánica ..... 9

Distribución geográfica y hábitat ..... 11

Uso tradicional ..... 11

Candida albicans ..... 12

Características biológicas y morfológicas de Candida albicans. ..... 12

Mecanismos de patogenicidad. ..... 13

Enfermedades asociadas y su impacto en la salud pública ..... 14

Tratamientos convencionales y problemas de resistencia antifúngica ..... 15

Fitoquímicos y su importancia ..... 16

Definición ..... 16

Clasificación ..... 16

Mecanismos de acción de los compuestos fitoquímicos con actividad antifúngica ..... 18

Tamizaje fitoquímico ..... 19

Principales métodos de extracción de compuestos bioactivos ..... 19

Cromatografía liquida ..... 19

Actividad antifúngica de extractos vegetales ..... 20

Principales métodos de evaluación antifúngica ..... 20

Método de micro dilución ..... 21

**Capítulo 3 ..... 22**

**Materiales y Métodos ..... 22**

Obtención de extracto orgánico por medio de VLC ..... 23

Selección, recolección del material vegetal ..... 23

Secado, molienda y almacenamiento ..... 24

Preparación de soluciones y extracción por ultrasonido ..... 25

Rota evaporado, recuperación y adición ..... 25

Extracción mediante VLC ..... 25

Liofilización del extracto ..... 26

Obtención del perfil fitoquímico y actividad biológica ..... 27

Perfil fitoquímico ..... 27

Actividad biológica por prueba de micro dilución en placa multipocillos ..... 34

Almacenamiento y análisis de datos ..... 36

**Capítulo 4 ..... 37**

**Resultados y Discusiones ..... 37**

4.1. Obtención del extracto orgánico por VLC de *Tecoma castanifolia.* ..... 37

4.2. Perfil fitoquímico del extracto de *Tecoma castanifolia* ..... 38

4.3. Actividad biológica ..... 42

4.3.1. Prueba de micro dilución ..... 42

**Capítulo 5 ..... 44**

**Conclusiones y Recomendaciones ..... 44**

5.1. Conclusiones ..... 44

5.2. Recomendaciones ..... 45

**Referencias Bibliográficas ..... 46**

## Índice de Figuras

**Figura 1.** Ubicación de los bosque secos de Ecuador ..... 7

**Figura 2.** Ejemplar de Tecoma castanifolia ..... 9

**Figura 3**. Ejemplar de Tecoma castanifolia en diferentes estadíos ..... 10

**Figura 4**. Morfología de C. albicans ..... 12

**Figura 5.** Mecanismos de patogenicidad de C. albicans ..... 14

**Figura 6**. Ejemplos representativos de los antimicóticos disponibles actualmente para tratar la candidiasis ..... 15

**Figura 7.** Vías del metabolismo secundario de las plantas ..... 17

**Figura 8.** Clasificación de compuestos bioactivos ..... 18

**Figura 9.** Métodos para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) ..... 21

**Figura 10.** Metodología parte I ..... 22

**Figura 11.** Delimitaciones de las tres zonas de caracterización botánica en el bosque seco cerro blanco en el Panteón Metropolitano ..... 24

**Figura 12**. Metodología parte II, Perfil fitoquímico y Actividad biológica por el método de micro dilución ..... 27

**Figura 13**. Estructura de la placa multipocillos ..... 35

## Índice de Tablas

**Tabla 1.** Taxonomía de T. castanifolia ..... 11

**Tabla 2.** Taxonomía de Candida albicans..... 13

**Tabla 3.** Caracterización de los Flavonoides ..... 31

**Tabla 4.** Caracterización de los Flavonoides ..... 31

**Tabla 5.** Caracterización de los Flavonoides ..... 32

**Tabla 6.** Interpretación de resultados de tamizaje fitoquímico..... 39

**Tabla 7**. Resultados de pruebas y resultados en tamizaje fitoquímico ..... 39

## Índice de imágenes

**Imagen 1.** Peso del extracto orgánico obtenido..... 38

# Capítulo 1

## Antecedentes

### Introducción

El género Tecoma, es un género de arbustos con flores y árboles pequeños nativos de las regiones tropicales y subtropicales de América. El cual ha sido objeto de interés en la investigación fitoquímica debido a su potencial como fuente de compuestos bioactivos (Fernandes & Mankad, 2022). Diferentes especies de Tecoma poseen una variedad de compuestos, incluyendo alcaloides, flavonoides y glicósidos fenilethanoides en diferentes especies de Tecoma. Estos compuestos han mostrado actividad antioxidante y antibacteriana, así como capacidad sinérgica con antibióticos comunes. La exploración de la composición química y la actividad biológica de las especies del género Tecoma ofrece una base sólida para investigaciones adicionales sobre el muyuyo de montaña (*Tecoma castanifolia*) y su potencial como fuente de agentes antioxidantes y antibacterianos de origen vegetal (Gonçalves et al., 2022).

Existen una variedad de compuestos en las especies de Tecoma, incluidos alcaloides, iridoides, flavonoides y ésteres de ácidos grasos (El Hawary et al., 2020). La tecomina, uno de los alcaloides que se encuentran en esta planta, se aisló de *Tecoma stans* y demostró actividad antimicrobiana (Al-Azzawi et al., 2012). En un estudio realizado por Bakr et al., (2019) se analizó las propiedades antifúngicas de la planta, a través del método de difusión en agar donde se obtuvieron resultados que demostraron una eficacia comparable al antifúngico “anfotericina B”.

El desarrollo de resistencia a los fármacos antifúngicos es un proceso complejo en el que influyen varios factores, como la alteración en los objetivos de los fármacos, sobreexpresión de bombas de eflujo y cambios en la biosíntesis de esteroles (Ghannoum & Rice,

1999). La aparición de cepas resistentes a múltiples fármacos plantea un desafío significativo en el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas, particularmente en pacientes inmunodeprimido (Perlin et al., 2015). Por otro lado, el uso de fungicidas en la agricultura puede contribuir al desarrollo de resistencia en los hongos, que luego pueden transmitirse a los humanos a través de los alimentos (CDC, 2022).

En Ecuador *Candida albicans* es la especie fúngica que más comúnmente causa infecciones, en un estudio realizado por Chila Santana et al., (2022), se encontró que el 80.76% de las infecciones por Candida eran causadas por C. albicans, ubicando una alta tasa por encima del 50% de infecciones detectadas en incidencia de pacientes hospitalizados observada en los centros de salud evaluados en el estudio, lo que lleva a altas tasas de morbilidad y mortalidad. Además, la falta de recursos y experiencia en los laboratorios, junto con la disponibilidad limitada de ciertos medicamentos antimicóticos en Ecuador, plantea desafíos para diagnosticar y tratar eficazmente las infecciones por Candida (Acosta-Mosquera et al., 2024).

**Planteamiento del problema**

La creciente resistencia a los antifúngicos convencionales en especies como *Candida albicans* representa un desafío significativo para la salud pública haciendo que las infecciones sean más difíciles de tratar y sean más recurrentes, propagando la resistencia de cepas de *C. albicans* entre pacientes de un entorno de hospital, agravando los sistemas de hospitales y por último, al limitar las opciones terapéuticas disponibles aumentará la morbimortalidad asociada a infecciones fúngicas (Pristov & Ghannoum, 2019). Es por esto que la búsqueda de alternativas es crucial para asegurar que los tratamientos sigan siendo efectivos en el futuro, mejorar los resultados para los pacientes y reducir la carga global de las infecciones fúngicas resistentes.

**Justificación**

El género Tecoma ha sido identificado como una fuente potencial de compuestos bioactivos con actividad antifúngica, que sugiere su posible utilidad en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos. Este proyecto de tesis se centra en evaluar la actividad biológica de un extracto acuoso del Muyuyo de montaña a través del método de micro dilución en placa e identificar cual es el aporte del perfil fitoquímico que esta especie pueda tener. El Muyuyo de montaña se destaca por sus propiedades medicinales tradicionales y su contenido de metabolitos secundarios con posibles efectos terapéuticos. Sin embargo, la actividad antifúngica específica de un extracto acuoso de Muyuyo de montaña frente a *Candida albicans* no ha sido evaluada exhaustivamente. La identificación y caracterización de los compuestos fitoquímicos responsables de esta actividad podrían contribuir significativamente al desarrollo de nuevos agentes antifúngicos.

La tolerancia a los antifúngicos es una preocupación creciente, ya que algunas especies muestran resistencia intrínseca y otras desarrollan resistencia adquirida durante el tratamiento (Sanguinetti et al., 2015). La importancia de buscar nuevos tratamientos antifúngicos observada en especies como Candida radica en la necesidad crítica de contar con opciones terapéuticas efectivas frente a la creciente resistencia a los antifúngicos existentes. Lo que limita las alternativas de tratamiento disponibles, para las infecciones fúngicas y tiene un impacto significativo en la salud pública al dificultar el control de estas infecciones y aumentar la morbimortalidad asociada (Logan et al., 2022). La incidencia anual de infecciones por Candida en Estados Unidos es de 6,0 por cada 100 000 habitantes, donde se ha vuelto resistente a los antifúngicos derivados de los azoles (Diekema et al., 2002).

El desarrollo de esta investigación representa un aporte para futuras investigaciones para el desarrollo de antifúngicos que permitan aplicarse en el hongo de la Candida. Esto tendría un

impacto en la introducción de nuevos tratamientos para esta enfermedad, el cual podría contribuir en una baja a la resistencia al no utilizar medicamentos convencionales a los cuales las cepas de *C. albicans* se han vuelto resistentes. Por otro lado, la accesibilidad de este recurso podría ser una ventaja debido a que las plantas de Tecoma podrían cultivarse en diversas regiones tropicales y subtropicales.

## Objetivos

### *Objetivo General*

Evaluar la actividad biológica del extracto orgánico de la planta *Tecoma castanifolia* mediante cromatografía líquida al vacío sobre el microorganismo de interés hongo *Candida albicans*

### *Objetivos Específicos*

Obtener el extracto orgánico concentrado mediante cromatografía líquida al vacío (VLC) de la planta *Tecoma castanifolia.*

Caracterizar el perfil fitoquímico del extracto acuoso orgánico de la planta *Tecoma castanifolia*.

Identificar la actividad biológica del extracto acuoso orgánico de la planta *Tecoma castanifolia* mediante micro dilución en placa multipocillos para determinar la inhibición del hongo *Candida albicans*.

# Capítulo 2

# Marco Teórico

## Bosque Seco Tropical

Los bosques seco tropical son un tipo de bosques en donde se presentan precipitaciones menores a 1.600 mm anuales, poseen una temporada seca en donde las precipitaciones no llegan a los 100 mm y pueden extenderse hasta los seis meses (Pennington et al., 2000). Los bosque secos en Ecuador ubican principalmente en la región Costa, (**Figura 1**) desde el suroccidente de la provincia de Esmeraldas hasta la frontera sur con Perú, en un terreno que va desde los 0 a los 2.000 msnm en algunas partes de la provincia de Loja (Aguirre et al., 2006).

**Figura 1.** *Ubicación de los bosque secos de Ecuador*

*Nota* Elaborado en Google Earth, por los Autores, (2024) *Adaptado de* Aguirre et al., (2006)

El bosque seco tropical, destaca por tener una gran variedad de flora y fauna, también posee uno de los endemismos más altos específicamente en especies de flora (Madsen et al., 2001). La flora de los bosques seco tropical se caracteriza por su adaptación a ambientes secos, fisionomía única y de tener un componente de caducifolia. En los bosques secos existe un nivel escaso de información y estudios a pesar de su endemismo, por otro lado sufre de alto riesgo de amenazas de deforestación y el cambio climático (Escribano-Ávila, 2016).

**Género Tecoma**

El género de las *Tecoma*, son arbustos perennes nativos de América del Sur y Central que se ha naturalizado en numerosas regiones tropicales y subtropicales. Con una altura máxima de 8 metros, hojas opuestas y flores amarillas brillantes que atraen polinizadores como colibríes, esta planta muestra una amplia adaptabilidad a suelos bien drenados y climas soleados. Su ciclo de vida perenne, capacidad de propagación vegetativa y dispersión de semillas por el viento contribuyen a su distribución global en al menos 86 países e islas. Estos exhiben un crecimiento rápido, resistencia a la sequía y plagas, y semillas que pueden almacenarse por largos períodos, lo que la convierte en una especie exitosa y versátil en diversos entornos (Singh et al., 2024).

El género *Tecoma* está conformado por 14 especies de arbustos. En las comunidades locales de Ecuador y Perú los han utilizado como forraje de ganado, tratamientos para el cáncer y como antimicrobiano (Chávez Fernández et al., 2020). El género *Tecoma* tiene la presencia de varios compuestos bioactivos como: alcaloides, glicósidos, flavonoides, terpenos, taninos, etc (Sundas et al., 2016).

**Tecoma castanifolia**

*Tecoma castanifolia* es una especie que pertenece a la familia Bignoniaceae, se encuentra en el corredor del bosque seco tropical (Aguirre et al., 2006). Es un árbol con flores

tubulares de color amarillo y frutos en cápsulas indehiscentes, y se utiliza con fines ornamentales (Bosque Protector La Prosperina, n.d.). *T. castanifolia* tiene hojas simples, a diferencia de otras especies de Tecoma (**Figura 2**).

**Figura 2.** *Ejemplar de Tecoma castanifolia*

*Nota* Tomado de (Ruth Ripley, 2013)

### *Descripción botánica*

*T. castanifolia* es un arbusto que puede llegar a los 6 metro de altura y 15 cm de diámetro. Su corteza es de un color café y lenticelada, a un estadio mayor puede mostrar marcas de fisuras longitudinales. Las hojas presentan márgenes aserrados a dentados y son de lámina simple. Sus ramas terminales poseen pseudoestípulas diminutas. La disposición que tienen las flores sobre

las ramas se presenta en forma de racimos o panículas terminales. Su fruto son silicuas angostas y se encuentran comprimidas en los laterales (Anchundia, 2017). Las semillas de *T. castanifolia* se encuentran de tipo aladas, con una forma ovoide donde son mayormente alargadas, su superficie es lisa (Mendoza, 2015). En un estudio realizado por Anchundia, (2017), se ilustró el crecimiento vegetativo de *T. castanifolia* en la ciudad de Guayaquil entre la estación seca y lluviosa como se observa en la (**Figura 3.**).

**Figura 3**. *Ejemplar de Tecoma castanifolia en diferentes estadíos*

*Nota:* I) El arbusto en estado de dormancia en la época seca, II) Producción de hojas en las primeras lluvias de la estación lluviosa, III) Pleno crecimiento vegetativo durante la época de lluvias de la ciudad de Guayaquil. Tomado de (Anchundia, 2017)

## Taxonomía de *T. castanifolia*

**Tabla 1.** *Taxonomía de T. castanifolia*

| | |
|---|---|
| Reino | Plantae |
| Filo | Estreptofita |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Lamiales |
| Familia | Bignoniaceae |
| Género | *Tecoma* |
| Especie | *Tecoma castanifolia* |

*Nota* Datos tomados de (Gentry, 1999)

## Distribución geográfica y hábitat

*Tecoma castanifolia* es una especie de planta con flores originaria de Ecuador y Perú, perteneciente al bosque seco tropical y se encuentra restringida en la zona del Deciduo del Pacífico Ecuatorial (Anchundia, 2017).

## Uso tradicional

*T. castanifolia* se ha caracterizado por tener madera dura, la cual se ha utilizado para la fabricación de herramientas y leña, también ha servido como especie rompeviento en zonas semiáridas. En países asiáticos y Estados Unidos esta especie es comercializada para su uso ornamental (Cornejo, 2015).

## Candida albicans

### *Características biológicas y morfológicas de Candida albicans.*

Debido a su capacidad para causar infecciones, particularmente en personas inmunodeprimidas, *Candida albicans*, es un patógeno fúngico prevalente en humanos, ha sido ampliamente estudiado (Kabir et al., 2012). *C. albicans* es una levadura polimórfica diploide de las mucosas que se encuentra en el tracto gastrointestinal, respiratorio y genitourinario (Dadar et al., 2018).

La morfología de *Candida albicans* incluye varias formas como levadura, pseudohifas e hifas como se ilustra en (**Figura 4.**). Se sabe que *C. albicans* crece como levadura, pseudohifas o hifas verdaderas dependiendo de las condiciones ambientales. Forma clamidosporas y pseudomicelias, siendo las clamidosporas grandes formaciones en los extremos de las hifas. Estas estructuras juegan un papel en la reproducción y crecimiento del hongo (Kadosh & Mundodi, 2020).

**Figura 4**. *Morfología de C. albicans*

*Nota* Tomado de (Drummond, 2019)

**Taxonomía de *Candida albicans***

**Tabla 2.** *Taxonomía de Candida albicans*

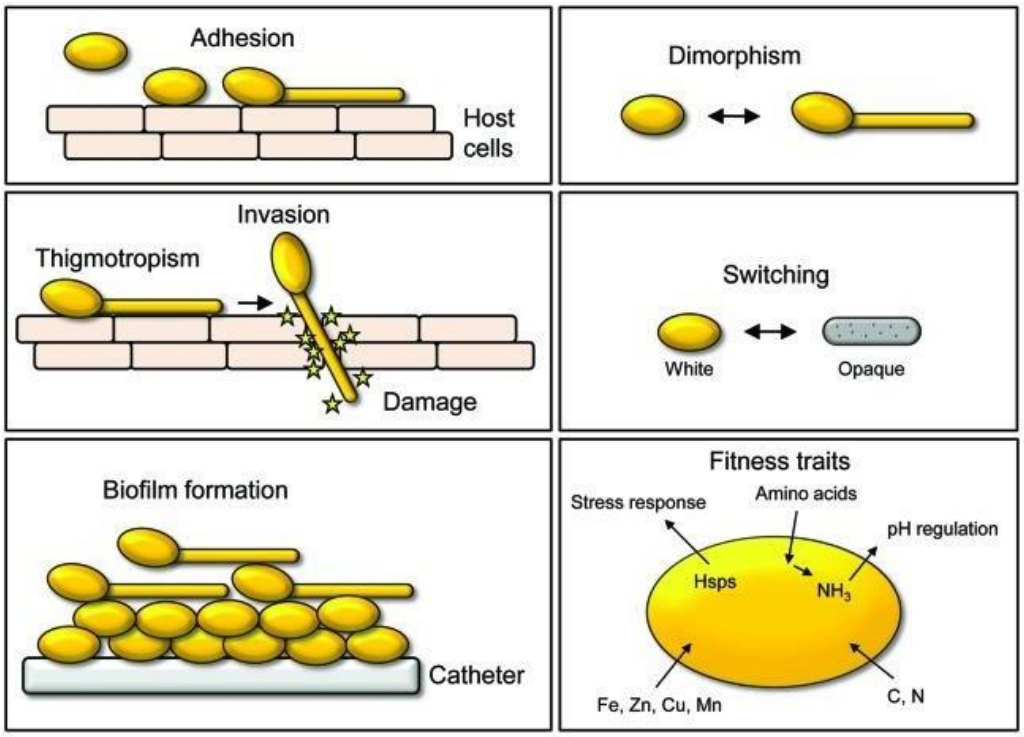
| | |
|---|---|
| Dominio | Eucariota |
| Reino | Fungi |
| División | Ascomicota |
| Clase | Sacaromiceto |
| Orden | Sacarmicetales |
| Familia | Saccharomycetaceae |
| Género | *Candida* |
| Especie | *Candida albicans* |

*Nota* Datos tomados de (Schoch et al., 2020)

***Mecanismos de patogenicidad.***

Los factores de virulencia clave incluyen moléculas de adhesión conocidas como adhesinas, que ayudan a la levadura a adherirse a la superficie del huésped, otro factor es la secreción de hidrolasa, transición de levadura a hifa, formación de biopelículas y cambio fenotípico como se observa en la (**Figura 5**), además se le atribuye una rápida adaptación a las fluctuaciones del pH del ambiente, flexibilidad metabólica, un potente sistema que le permite adquirir nutrientes y mecanismo robusto a la respuesta de estrés (Mayer et al., 2013). Las interacciones huésped-patógeno involucran varios receptores y respuestas celulares, como TLR, receptores de lectina de tipo C e inflamasomas (Pattnaik et al., 2021).

**Figura 5.** *Mecanismos de patogenicidad de C. albicans*




*Nota* Tomado (Mayer et al., 2013)

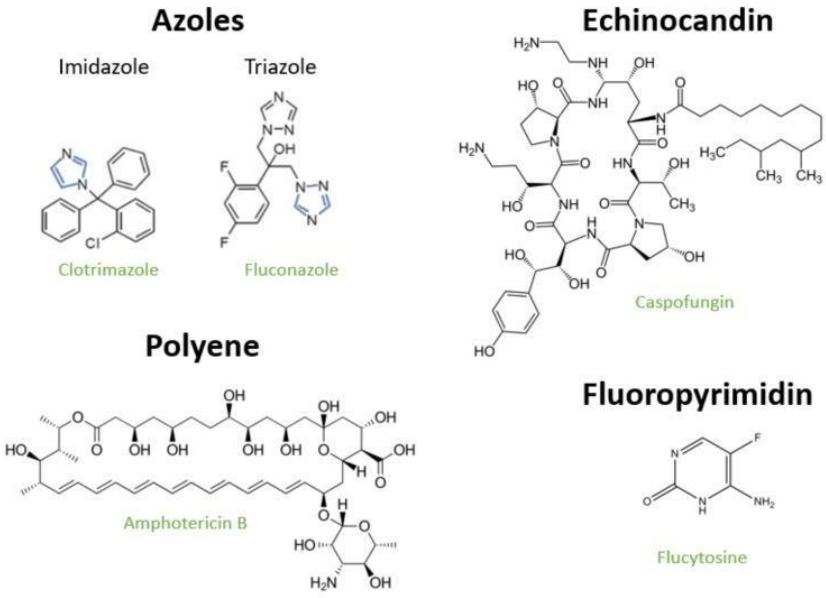
***Enfermedades asociadas y su impacto en la salud pública.***

*C. albicans* causa la enfermedad conocida como candidiasis, puede afectar varias partes del cuerpo, incluida la cavidad bucal, partes íntimas y otras áreas (Warren & Body, 2023). Este patógeno también puede causar infecciones de las mucosas y atravesar las barreras celulares o tisulares, invadiendo tejido más profundos y causando infecciones a nivel sistemático. Los individuos que tienen un sistema inmune débil o predisposiciones genéticas son los más afectados, en la actualidad existe una creciente alarma por la mortalidad que llega a un 75% en personas con una infección sistemática (Zipfel et al., 2011).

***Tratamientos convencionales y problemas de resistencia antifúngica.***

La principal elección de tratamiento para la *C. albicans* es el fluconazol a dosis de > 6 mg/kg/día o 400 mg cada día. Existen otros tratamientos como el anfotericina B desoxicolato en dosis 0,7 mg/kg/día, que pueden cambiarse por fluconazol cuando la cepa causante de la enfermedad es identificada como sensible (Gavaldàa & Ruiza, 2003). En adultos, cuando el personal médico detecta una candidiasis invasiva también existen opciones que pueden administrarse por vía intravenosa como la caspofungina, micafungina o anidulafungica (CDC, 2023). En la (**Figura 6.**) se ilustra los antimicóticos más representativos que se encuentran disponibles para el tratamiento de la candidiasis, las cuales están agrupados por la clase de fármaco (Salazar et al., 2020).

**Figura 6**. *Ejemplos representativos de los antimicóticos disponibles actualmente para tratar la candidiasis*




*Nota* Tomado de (Salazar et al., 2020)

La resistencia a los antimicóticos cada vez va tomando más terreno en el ámbito clínico, especialmente en los azoles (**Figura 6.**), todo esto es debido a que han aparecido nuevas

levaduras con una mayor patogenicidad, a la prescripción irracional de los antimicóticos como la profilaxis y al aumento en dosis terapéuticas (López-Ávila et al., 2016).

## Fitoquímicos y su importancia

### *Definición*

Los fitoquímicos son compuestos bioactivos no nutritivos sintetizados por las plantas a través de vías metabólicas primarias y secundarias (Alamgir, 2018). En las plantas, los compuestos fitoquímicos pueden tener diferentes funciones para su reproducción y protección, aportando características como el olor y el color. En los humanos, al consumir alimentos que aporten con algun fitoquímico pueden tener actividad biológica, muchos de los fitoquímicos que se encuentran en alimentos vegetales se relacionan con la reducción de riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles, como la diabetes tipo 2 o enfermedades cardiovasculares (Huang et al., 2016).

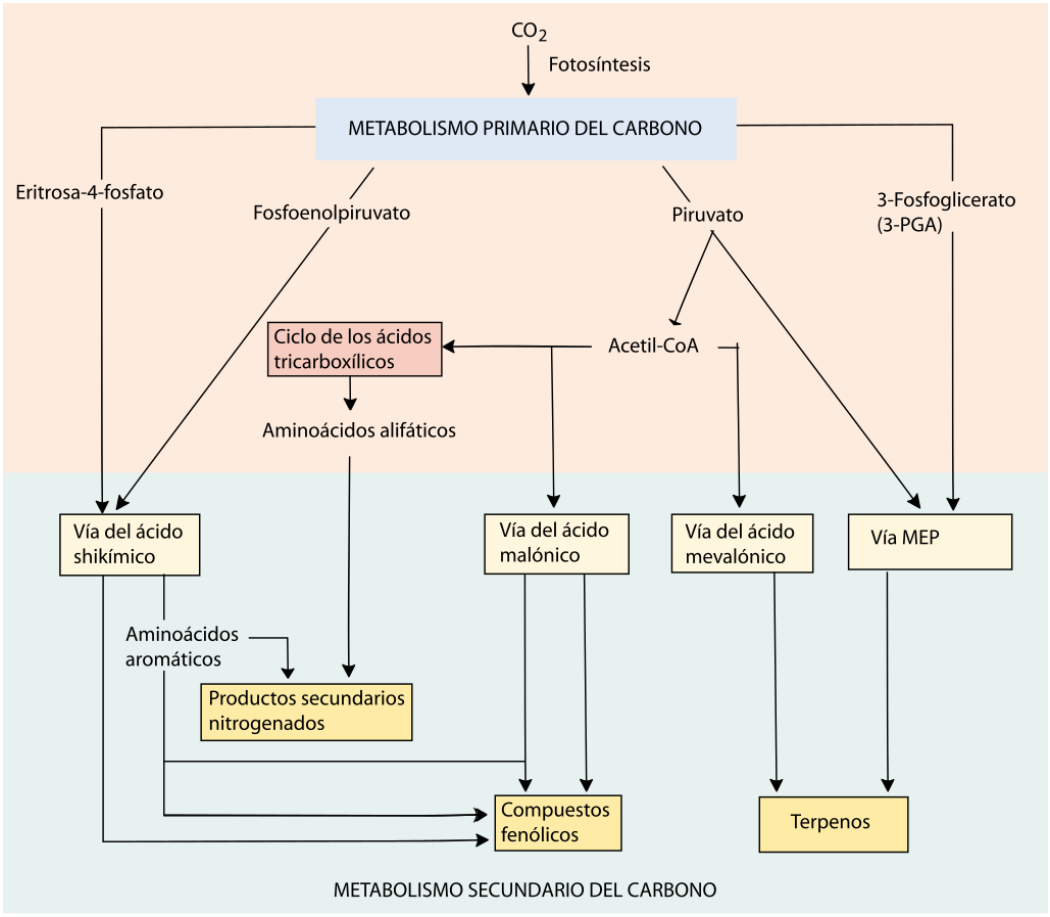
Los fitoquímicos juegan un rol importante como fuente de nuevos fármacos y desarrollo de nuevos tratamientos, debido a su potencial las nuevas investigaciones en fármacos o terapias alternativas están orientados a los fitoquímicos (Obulesu, 2022). Los fitoquímicos extraídos dependen de métodos usados para su extracción, tipo de solvente usado y otros parámetros como el tiempo y temperatura, con esto se podría optimizar su rendimiento, pureza y estabilidad estructural (Kumar et al., 2023).

### *Clasificación*

Los fitoquímicos se pueden clasificar como metabolitos primarios y metabolitos secundarios, esto va a depender de la función en el metabolismo de una planta. Los metabolitos primarios son de gran importancia para la vida de la planta en donde se pueden encontrar carbohidratos, proteínas, lípidos, etc. Por otro lado, los metabolitos secundarios son producidos

por las células de la planta a través de vías metabólicas (**Figura 7.**) que derivan de las vías metabólicas primarias (Rabizadeh et al., 2022). Los componentes de los metabolitos secundarios producidos por las plantas se pueden catalogar según su potencial como antivirales, antifúngicos y antibióticos, que son responsables de la protección de las plantas frente a patógenos. Además, son responsables de evitar daño severo en sus hojas a causa de los rayos UV (Bourgaud et al., 2001).

**Figura 7.** *Vías del metabolismo secundario de las plantas*

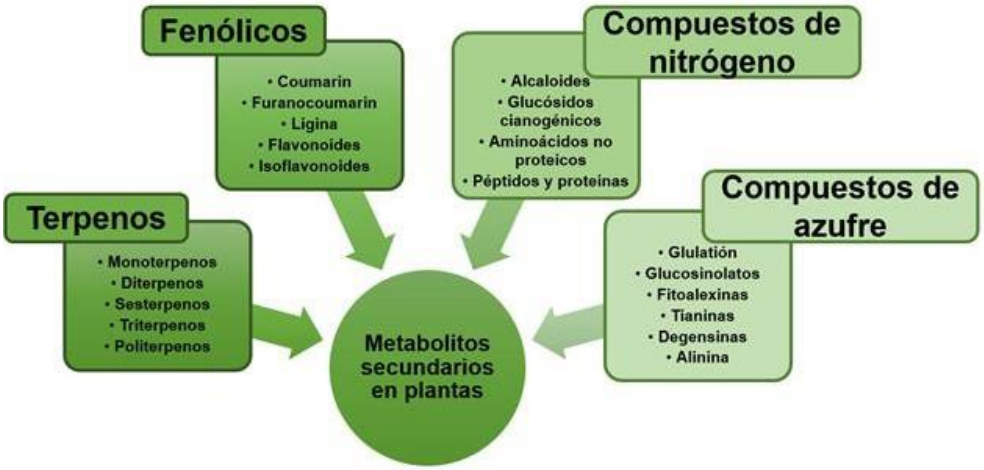



*Nota* Tomado de (Lincoln & Zeige, 2006)

Los fitoquímicos también se pueden clasificar en función de sus constituyentes elementales, orígenes biosintéticos o estructuras químicas (Alamgir, 2018). Como se observa en la (**Figura 8**) las categorías principales incluyen alcaloides, terpenoides, fenoles, flavonoides

y carotenoides**.** Estos compuestos cumplen diversas funciones en las plantas, como la protección contra patógenos, plagas y estreses ambientales (Thacker, 2020).

**Figura 8.** *Clasificación de compuestos bioactivos*




*Nota* Tomado de (Reyes-Blas et al., 2021)

### *Mecanismos de acción de los compuestos fitoquímicos con actividad antifúngica*

Los fitoquímicos de las plantas exhiben importantes propiedades antifúngicas, ofreciendo alternativas potenciales a los fungicidas sintéticos. Estos compuestos incluyen terpenoides, fenólicos, alcaloides y aceites esenciales (Elgharbawy et al., 2020). Sus mecanismos de acción varían, y los terpenoides alteran principalmente las membranas celulares y causan disfunción mitocondrial (Anna K Jager, 2014). Los polifenoles y tioles también muestran una prometedora actividad antifúngica, inhibiendo el crecimiento y la germinación micelial (Redondo-Blanco et al., 2020). Algunos fitocompuestos, como el honokiol, el magnolol y la shikonina, demuestran una potente actividad contra las especies de Candida resistentes a los fármacos, con concentraciones inhibitorias mínimas ≤8 μg/mL (Lu et al., 2017).

## Tamizaje fitoquímico

La detección fitoquímica es un paso crucial en la identificación de los constituyentes químicos de las plantas, lo que puede conducir al aislamiento de compuestos bioactivos (Uddin et al., 2011). Este proceso implica el uso de diversas pruebas, como reacciones de color y precipitaciones, para detectar la presencia de grupos químicos específicos en extractos de plantas (Mandal et al., 2015). Se pueden utilizar diferentes métodos de extracción, incluidas técnicas tanto tradicionales como novedosas, para obtener estos fitoquímicos a partir de materiales vegetales (Silva et al., 2017). Estos métodos y pruebas son esenciales para la extracción y el cribado cualitativo de plantas medicinales, que son fuentes ricas en fitoquímicos (Bandiol, 2018).

## Principales métodos de extracción de compuestos bioactivos

Los principales métodos convencionales son la maceración y Soxhlet, también existen métodos de extracción avanzados incluyen extracción asistida por ultrasonidos, extracción asistida por microondas, campo eléctrico pulsado, extracción con fluidos supercríticos y caída de presión controlada instantánea (Usman et al., 2022). Las técnicas de extracción avanzada ofrecen ventajas como mayores tasas de extracción, menores impurezas, conservación de compuestos termosensibles y menor consumo de energía (Jha & Sit, 2022).

### *Cromatografía liquida*

La cromatografía líquida es un método clave para extraer y analizar compuestos bioactivos de las plantas. La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se utiliza comúnmente para la separación y cuantificación de estos compuesto (Rohit Saxena, 2023). La cromatografía líquida es un tipo de cromatografía en la que la separación de una mezcla se logra haciendo pasar una muestra en una corriente de solvente líquido a través de alguna forma de material que proporcione resistencia en virtud de las interacciones químicas entre los

componentes de la muestra y el material (Pungor, 2020). Esta técnica de separación es indispensable para la purificación o análisis de uno o varios componentes de una mezcla que puede contener una variedad de moléculas simples y complejas (Mallik et al., 2008).

### Cromatografía líquida al vacío

La cromatografía líquida al vacío (VLC) es una técnica versátil para separar y aislar compuestos bioactivos de extractos de plantas. La VLC normalmente emplea gel de sílice como adsorbente y utiliza la elución en gradiente con varias combinaciones de disolventes. Las fracciones obtenidas a menudo se analizan mediante cromatografía de capa fina (TLC) y otros métodos analíticos para identificar y caracterizar los compuestos separados (Mroczek et al., 2020).

## Actividad antifúngica de extractos vegetales

### *Principales métodos de evaluación antifúngica*

Los métodos de evaluación antifúngica abarcan enfoques tanto in vitro como in vivo. Las técnicas in vitro incluyen pruebas de susceptibilidad estandarizadas para determinar las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) (**Figura 9.**) y la actividad fungicida (Scorzoni et al., 2016). El Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y el European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) han establecido métodos de referencia para ciertos antifúngicos, los cuales son métodos in vitro son el método de dilución en caldo, difusión de disco, dilución en agar, el de microdilución, etc. (Arikan, 2007).

**Figura 9.** *Métodos para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI)*

*Nota* Tomado de (Rodríguez-Rico et al., 2019)

### *Método de micro dilución*

El método de micro dilución, descrito por De-Souza-Silva et al., (2018), es una técnica utilizada en el cribado de alto rendimiento y en experimentos químicos y biológicos. Implica la dilución precisa y exacta de soluciones dentro de gotas, lo que permite la generación de gradientes de concentración (Niu et al., 2011).

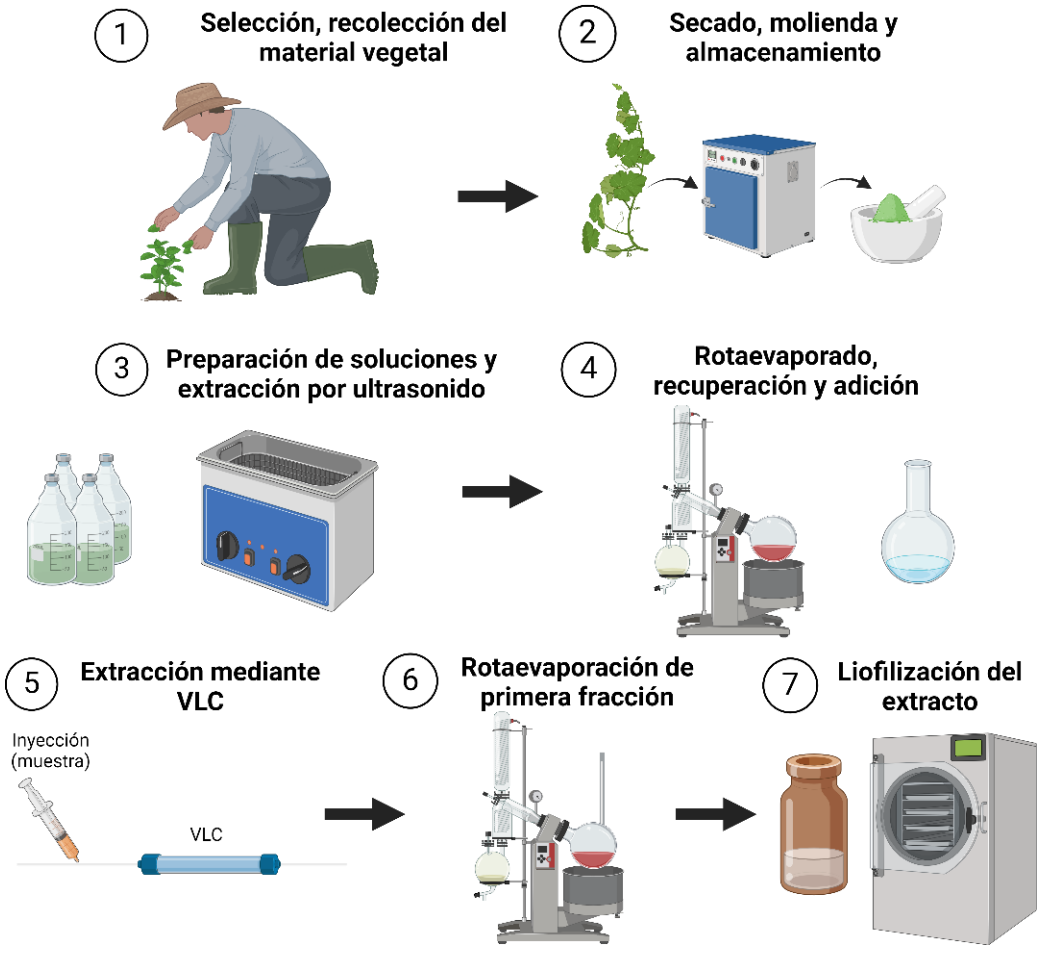
El método de micro dilución es un sistema estandarizado y automatizado para determinar las concentraciones mínimas inhibidoras y fungicidas de fármacos antimicóticos, evitando el método clásico de dilución en caldo, que requiere mucha mano de obra (Polonelli & Morace, 2004).

# Capítulo 3

## Materiales y Métodos

En la metodología propuesta (**Figura 10.**) se espera llevar a cabo un enfoque descriptivo y experimental, con el fin de obtener un extracto acuoso que permita evaluar la actividad biológica frente al hongo de la *Candida albicans.*, con esto poder identificar si existen metabolitos presentes con potencial antifúngico que puedan ser de gran interés Biotecnológico, debido a que la planta *Tecoma castanifolia* (Muyuyo de montaña) no ha sido estudiado y se desconoce su potencial.

**Figura 10.** *Metodología parte I*




*Nota.* Elaborado en Biorender por los Autores, 2024. Adaptado de (Coli & Bowden, 1986); (Maurya et al., 2018)

**Obtención de extracto orgánico por medio de VLC**

***Selección, recolección del material vegetal***

Se realiza la recolección de la planta a estudiar (*Tecoma castanifolia*) en un total de 3 kilos de material vegetal fresco y posteriormente colocadas en fundas, recolectados en el mes de mayo en la zona del bosque seco cerro blanco la ubicación de la recolección se extiende desde el parqueadero de senderismo, localizado detrás del panteón metropolitano hasta antenas de cerro blanco y sendero nº2 de ciclismo.

Estas tres zonas se dividieron debido a los distintos tipos de hábitats de los árboles, los cuales son (**Figura 11**.):

- Zona 1 (rojo): Va desde la zona del parqueadero hasta sendero 1 de ciclismo **2°10'57"S 79°57'15"W**.

- Zona 2 (amarillo): Va desde inicio del sendero 1 de ciclismo hasta final de sendero 1 **2°10'55"S 79°57'14"W.**

- Zona 3 (azul): Va desde inicio sendero 2 de ciclismo **2°11'05"S 79°57'22"W.**

**Figura 11.** *Delimitaciones de las tres zonas de caracterización botánica en el bosque seco cerro blanco en el Panteón Metropolitano*

*Nota* Tomado de Google Maps, 2024

***Secado, molienda y almacenamiento***

Una vez recolectado el material vegetal se separan las hojas del tallo y se llevan a secar en un horno a temperatura máxima de 37°C y mínima de 34°C, se trituran las hojas secas hasta tener un polvo fino que luego pasa por tamizaje #20 para asegurar que el tamaño de la partícula sea uniforme. Después de terminada la molienda se conserva la especie aplicando un sellado al vacío y rotulando para luego almacenar (Adolfo Soto Rodriguez, 2012).

***Preparación de soluciones y extracción por ultrasonido***

Se prepara una solución alcohólica en proporciones 1:1, 500 ml de diclorometano y 500 ml de metanol la cual se colocará en 4 botellas de vidrio color ámbar de 1 litro teniendo un total de 4 litros. Posteriormente se realiza la extracción por ultrasonido, por 20 minutos sin temperatura una vez terminada la extracción se realiza un filtrado al vacío para obtener el extracto crudo.

***Rota evaporado, recuperación y adición***

Realizamos la extracción de la solución diclorometano - metanol mediante rota evaporación de los 4 litros que se obtuvieron de la extracción por ultrasonido, se recupera la solución y se almacena para ser utilizado en las fracciones. El material vegetal crudo rota evaporado se recolecta y se almacena, luego se emplea una limpieza del balón con diclorometano y se vuelve a rota evaporar hasta sacar todo el material restante y adicionamos 2 gr de sustrato C18 para que se vuelva biomasa el material extraído.

***Extracción mediante VLC***

Se emplea la extracción por VLC (cromatografía líquida), la muestra en solución es inyectada en la fase móvil, los componentes de la solución emigran de acuerdo con las interacciones no-covalentes de los compuestos en la columna. Estas interacciones químicas determinan la separación de los compuestos de la muestra. Extrayendo la fracción acuosa con agua tipo 1.

**Rotaevaporación de primera fracción**

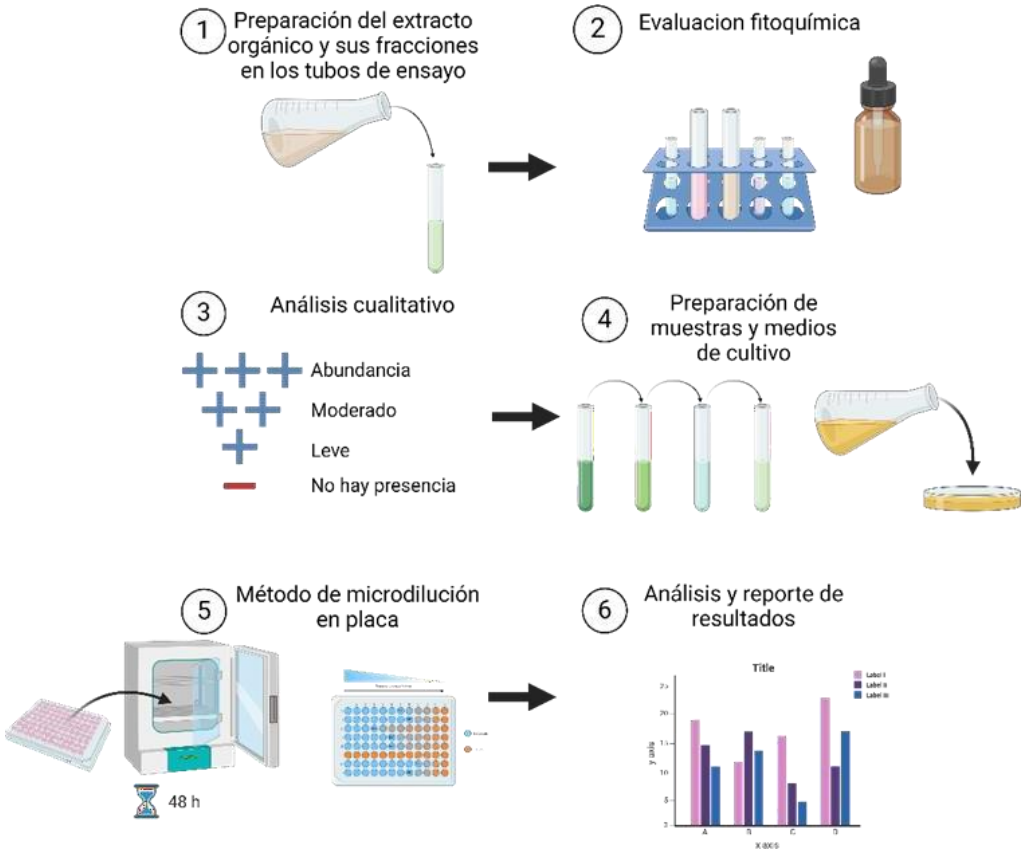
Una vez realizada la extracción mediante VLC se lleva a rota evaporar la fracción orgánica acuosa (agua tipo 1) concentrándolo en un vial pequeño de 2 a 3 ml.

***Liofilización del extracto***

Se realiza la liofilización del extracto puro concentrado colocando el extracto vegetal en cajas petri pequeñas previamente lavadas y secadas, luego se llevan a ultracongelación por un tiempo de 15 min y a una temperatura de -80ºC. Se retiran las placas, del ultra congelador y se colocan en el equipo en el cual se va a realizar la liofilización a una presión de 0.040mBar. Pasado el proceso se raspa con una espátula estéril y el producto liofilizado se coloca en un vial previamente desecado para eliminar la humedad del vial, por último, se almacena el vial con parafilm y papel aluminio.

**Obtención del perfil fitoquímico y actividad biológica**

**Figura 12**. *Metodología parte II, Perfil fitoquímico y Actividad biológica por el método de micro dilución*




*Nota*. Elaborado en Biorender por los Autores, 2024. *Adaptado de* (Jachak et al., 2023); (Gutiérrez-Pineda & Herrera, 2022); (Jan Hudzicki, 2009); (Rodriguez-Tudela et al., 2008); (Wiegand et al., 2008); (Santos & Hamdan, 2005)

***Perfil fitoquímico***

**I. Preparación del extracto orgánico**

Se prepara el extracto orgánico liofilizado previamente ya obtenido, en tubos de ensayo para realizar la evaluación de 13 pruebas fitoquímicas siendo estas: Mayer, Hager, Wagner, Dragendorff, Peróxido, Shinoda, KOH, Baljet, Ácido sulfúrico, Fehling, Zinc, Legal (Valencia et al., 2020).

## II. Evaluación fitoquímica

Se realizan las pruebas de evaluación fitoquímica usando la fracción acuosa orgánica extraída en cada una de las pruebas para la detección de agentes flavonoides, alcaloides y triterpenos, cumarinas (Lorenzo chang, 2013).

### *1) Prueba de alcaloides*

Antes de realizar el ensayo de pruebas presuntivas, es necesario añadir de 2 a 3 gotas de ácido clorhídrico o ácido sulfúrico concentrado.

- **Reacción de Mayer**

**Material:** Reactivo de Mayer + 1 tubo de ensayo + extracto

En un tubo de ensayo de 10 mL, añade 3 gotas del extracto y 3 gotas del reactivo de Mayer. Se considerará positivo si se forma un precipitado (Jagdeep Kumar, 2020).

- **Reacción de Dragendorff**

**Material:** Reactivo de Dragendorff + 1 tubo de ensayo + extracto

En un tubo de 10 mL, añade 3 gotas del extracto filtrado y 3 gotas del reactivo. Se considerará positivo si se observa la formación de un precipitado de color rojo, naranja o marrón (Amina Ahmady, 2020).

- **Reacción de Hager**

**Material:** Ácido pícrico + agua: Reactivo de Hager + tubo de ensayo + extracto

En un tubo de 10 mL, añade 3 gotas del extracto filtrado y 3 gotas del reactivo. Se considerará positivo si se forma un precipitado amorfo al mezclarse con la solución de alcaloides en ácido diluido.

- **Reacción de Wagner**

**Material:** Yodo + yoduro de potasio: Reactivo de Wagner + tubo de ensayo + extracto

En un tubo de 10 mL, colocar 3 gotas del extracto filtrado y 3 gotas del reactivo. Se reportará como positivo cuando se forme un precipitado floculante color marrón por mezclarse con solución de alcaloides en ácido diluido se considera positiva.

### *2) Prueba para saponinas*

- **Prueba de Peróxido**

**Material:** Peróxido de hidrogeno + tubo de ensayo + calentador + extracto.

En un tubo de ensayo de 5 mL, añade 3 gotas del extracto y 2 gotas de peróxido de hidrógeno. Agita continuamente mientras calientas la mezcla a 40 °C. La presencia de saponinas y su concentración se evaluarán según la cantidad de espuma que se forme.

### *3) Prueba de lactonas sesquiterpénicas*

- **Prueba Legal**

**Material:** Piridina + Nitroprusiato de sodio + hidróxido de potasio + tubo de ensayo + calentador + extracto.

En un tubo de ensayo de 10 ml agregar las siguientes soluciones: 4 gotas del extracto, 2 gotas de piridina, 1 gota de nitroprusiato de sodio al 5%, 4 gotas de KOH 2N (agregar gotas a gota). El procedimiento debe realizarse en una campana de extracción debido al uso de piridina. La prueba para lactonas sesquiterpénicas ($\alpha,\beta-$) se considerará positiva si se observa la aparición de un color rosa. (Muazzam Sheriff Maqbul, 2020)

- **Prueba de Baljet**

**Material**: Hidróxido de sodio + ácido pícrico + agua destilada + tubos de ensayo + extracto.

La solución A se compone de 1 g de ácido pícrico en 100 ml de agua destilada; La solución B se forma al preparar una solución de hidróxido de potasio al 5%; La solución C se obtiene con la solución A y B en relación 1:1; La presencia del metabolito aglicona esteroidal se califica cuando se observa un color azul o violeta. (Patil, 2020)

#### *4) Prueba de flavonoides*

- **Prueba de shinoda**

**Material**: Cinta de magnesio + Ácido clorhídrico + tubo de ensayo + extracto

En un tubo de ensayo de 5 ml, adicionar 3 gotas del extracto y 2 cm de cinta de magnesio y 4 gotas de HCl concentrado. Realizar este procedimiento en una campana de extracción. Se identifica el tipo de metabolito secundario según la coloración de la reacción de acuerdo con la siguiente tabla 3:

**Tabla 3.** *Caracterización de los Flavonoides*

| Flavonoides | Rx coloración |
|---|---|
| Flavonas<br>Flavonoles | Amarillo |
| Antocianinas | Rojo intenso |
| Chalconas<br>Auronas | Amarillo - Rojo |

*Nota* Datos tomados de (VALENCIA, 2020)

- **Prueba de ácido sulfúrico**

**Material:** Ácido sulfúrico + tubo de ensayo + extracto

En un tubo de ensayo de 5 ml, añadir 3 gotas de extracto y 3 gotas de ácido sulfúrico grado reactivo (concentración > 98%). Se identifica el tipo de metabolito secundario según la coloración de la reacción de acuerdo con la siguiente tabla 4:

**Tabla 4.** *Caracterización de los Flavonoides*

| Flavonoides | Rx coloración |
|---|---|
| Chalconas | Rojo azulado |
| Auronas | Rojo-guinda |
| Flavonas | Amarillo intenso |
| Flavononas | Naranja o guinda |
| Flavonoles | Amarillo intenso |

*Nota* Datos tomados de (VALENCIA, 2020)

- **Prueba de zinc**

**Material:** Ácido clorhídrico + Zinc + tubo de ensayo + extracto

En un tubo de ensayo de 5 ml, adicionar 3 gotas del extracto, 0,5 gramos de zinc en granalla o polvo y 4 gotas de HCl concentrado. Se identifica el tipo de metabolito secundario según la coloración de la reacción de acuerdo con la siguiente tabla 5:

**Tabla 5.** *Caracterización de los Flavonoides*

| **Flavonoides** | **Rx coloración** |
|---|---|
| Leucoantocianidinas | Rojo |
| Catequinas | Café amarillento |

*Nota* Datos tomados de (Patil, 2020)

***5) Prueba de cumarinas***

- **Prueba de fluorescencia**

**Material:** Hidróxido de amonio al 10 % + tubo de ensayo + extracto

En un tubo de ensayo de 5 mL agregar 3 gotas del extracto y 3 gotas de hidróxido de amonio al 10 %. Realizar la prueba de la luz ultravioleta: tapar el tubo y exponer a diferentes longitudes de onda. No tocar la luz directa de la lámpara. La presencia de cumarinas se identifica mediante la aparición de un color azul, verde o violeta fluorescente. (Vijaya Saradhi Settaluri, 2023)

- **Prueba de KOH (Hidróxido de potasio)**

**Material:** Hidróxido de potasio + tubo de ensayo + extracto

En un tubo de ensayo de 5mL agregar 3 gotas del extracto y 3 gotas del KOH al 5 %. La presencia de cumarinas se identifica mediante el cambio de color de fuerte a tenue de rojo a amarillo. (VALENCIA, 2020)

### *6) Prueba de glucósidos cardiotónicos*

- **Prueba de Baljet**

**Material:** Hidróxido de sodio + ácido pícrico + agua destilada + tubos de ensayo + extracto

La solución A se compone de 1 g de ácido pícrico en 100 ml de agua destilada; La solución B se forma al preparar una solución de hidróxido de potasio al 10 %; La solución C se obtiene con la solución A y B en relación 1:1; Se califica la presencia del metabolito a-glicona esteroidal cuando se genera un color azul o violeta. (Patil, 2020)

### *7) Prueba de carbohidratos*

- **Prueba de Fehling**

**Material:** Reactivo de Fehling + agua destilada + tubo de ensayo + extracto

Se disolvió el extracto en 1 a 2 ml de agua destilada. Se adicionaron 2 ml del reactivo de Fehling y se calentó por 3min a 37ºC. El ensayo se consideró positivo si la solución se tornó de color rojo o apareció un precipitado rojo. (Muazzam Sheriff Maqbul, 2020)

## III. Análisis cualitativo

Se emplean análisis cualitativos al extracto orgánico para determinar la viabilidad de la muestra y composición del extracto orgánico.

### *Actividad biológica por prueba de micro dilución en placa multipocillos*

#### Preparación de las muestras y medios de cultivo

Se prepara la muestra del extracto y el medio de cultivo TSB para la prueba de micro diluciones en placa. El material para utilizar se esteriliza en el autoclave incluido el TSB, puntas, matraces, pinzas y tubos de ensayo.

#### Prueba de Micro-dilución

Se realiza la prueba de micro dilución por placa para evaluar la actividad inhibitoria de los compuestos sobre el microorganismo sin llegar a eliminarlos por completo. Esta metodología tiene ventajas, tales como la posibilidad de realizar múltiples diluciones en una sola placa y facilita controles y replicas experimentales. Cada pocillo de la placa debe ser analizado con un pH después que se haya preparado, el pH debe estar en un rango aproximado de 7,2 y 7,4 luego cada lote es evaluado utilizando una colección estandarizada de organismos de control de calidad (salinas, 2023).

#### Preparación del inóculo de *Candida albicans*

Previamente preparado el inóculo en tubos de ensayo con caldo TSB estéril incubado 24h antes, se procede a agitar el medio con el hongo crecido y con la ayuda de un espectrofotómetro el cual se le ajusto la densidad óptica en 0,5 en la escala McFarland a una longitud de onda de 530nm, se medió la absorbancia.

#### Preparación microplaca

Se emplearon métodos y materiales con variaciones de acuerdo con el hongo estudiado, en una placa multipocillos se colocaron los siguientes componentes:

1. Muestra de hongo candida albicans

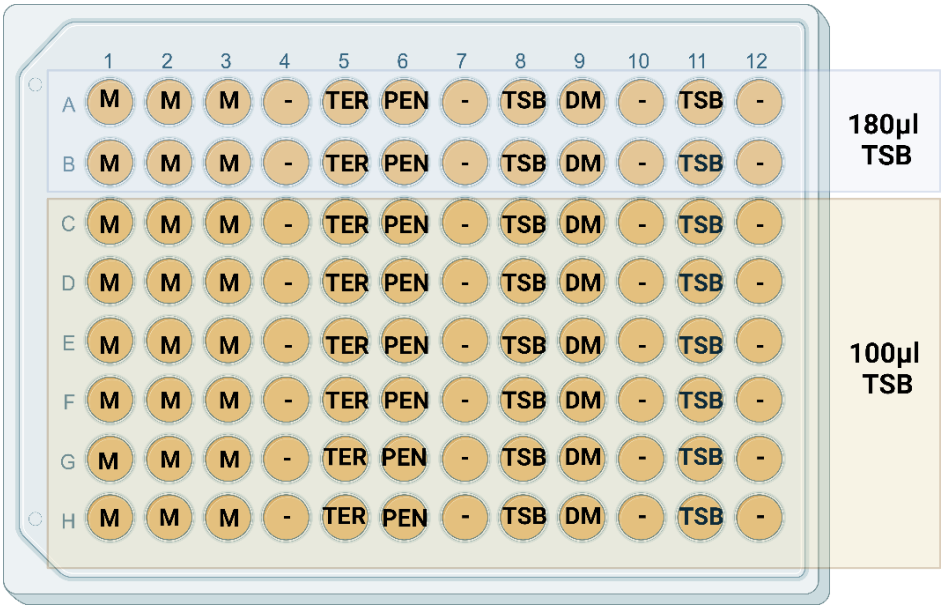
2. Medio TSB

3. Terpinediol al 20% (como control positivo)

4. Penicilina al 10% (como control positivo)

5. DMSO (dimetilsulfóxido)

**Figura 13**. *Estructura de la placa multipocillos*




*Nota*. Elaborado en Biorender por los Autores, 2024. Leyenda: M: muestra; TER: Terpinediol; PEN: Penicilina; DM: DMSO; (-): vacío.

Tomando en cuenta la anterior tabla de estructura se colocan 180µl de medio TSB en la fila A y en el resto se colocan solo 100ul, después se agrega 20 µl de la muestra del extracto de Tecoma castanifolia en las filas 1, 2 y 3 esto con el fin de completar 200 µl en la primera fila, luego se resuspende cada pocillo y tomo 100µl del primero y resuspende en toda la columna y al final descartar 100µl. En la fila 5 y 6 se colocan los 2 controles positivos que son el

Terpinediol y la penicilina, fila 8, 11 y 9 se colocaron medio TSB y DMSO. Para finalizar se colocan 10µl del inóculo de *Candida albicans* en todos los pocillos de la placa y se deja incubar por 24h con una agitación de 50rpm.

***Almacenamiento y análisis de datos***

Los resultados obtenidos en las pruebas anteriores se llevan analizar para medir el porcentaje de inhibición y luego almacenar los datos resultantes en una base de datos para futuros análisis.

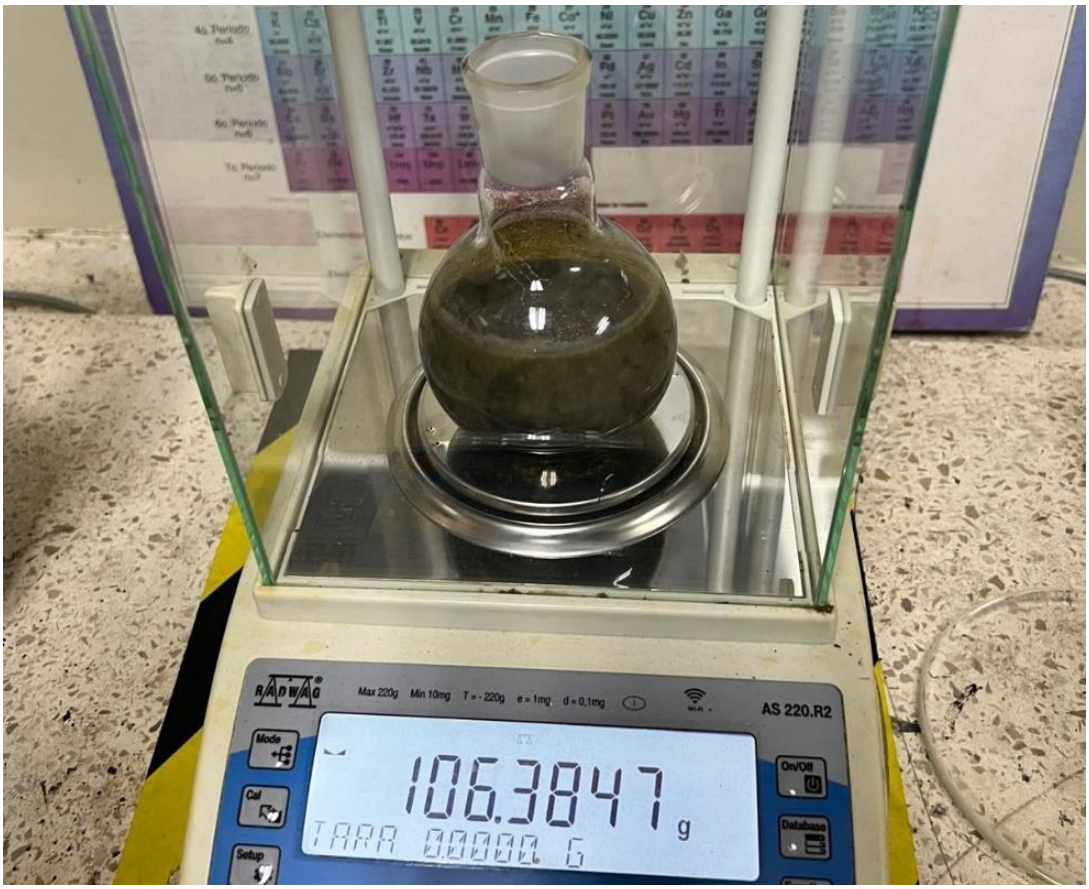
# Capítulo 4

# Resultados y Discusiones

## 4.1. Obtención del extracto orgánico por VLC de *Tecoma castanifolia.*

A partir de *Tecoma castanifolia,* se obtuvo un extracto orgánico concentrado el cual involucró tres fases principales. En la primera parte, la planta seca y molida fue sometida a un extracción alcohólica en donde se utilizó una mezcla de metanol-diclorometano en un balón de 500 ml. A continuación, para mejorar la obtención de compuestos bioactivos se realizó ultrasonido, que se ha demostrado que la extracción asistida por ultrasonido mejora el rendimiento de compuestos bioactivos y la actividad antioxidante en extractos de plantas (Boeira et al., 2018). Por último, se llevó a cabo en el rotavapor la eliminación del solvente y poder concentrar el extracto orgánico. Se obtuvo el extracto y se lo pesó (**Figura 11.**), obteniendo como resultado 106,38 g de extracto orgánico. Luego se dividió en siete fracciones para asegurar una mejor afinidad de los compuestos bioactivos, en donde cada uno de ellos pasó por la columna de VLC.

**Imagen 1.** *Peso del extracto orgánico obtenido*




*Nota* Tomado por los autores, 2024.

## 4.2. Perfil fitoquímico del extracto de *Tecoma castanifolia.*

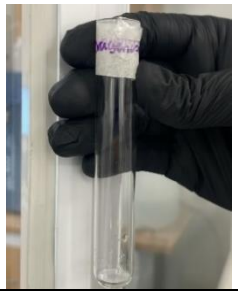
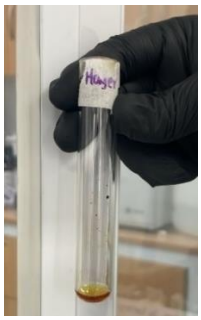
El perfil fitoquímico del extracto acuoso orgánico de Tecoma castanifolia mostró la presencia de cumarinas y alcaloides (**Tabla 7.**). El tamizaje fitoquímico en laboratorio reveló cambios físicos que confirmaron la presencia de estos metabolitos. En particular, la prueba de Mayer mostró una coloración marrón amarillenta y la prueba de Hager mostró un precipitado moderado de coloración ligeramente amarillenta, ambas indicando resultados positivos. La prueba de fluorescencia también mostró luminosidad bajo luz fluorescente, lo que confirma la presencia de cumarinas en el extracto.

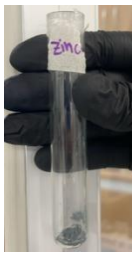
**Tabla 6.** *Interpretación de resultados de tamizaje fitoquímico*

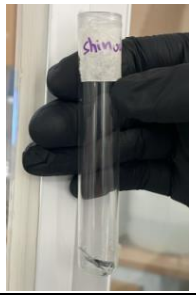
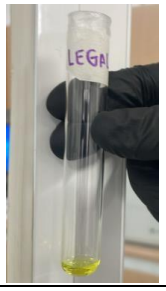
| | |
|---|---|
| - | Ausencia de metabolito |
| + | Presencia de metabolito |

*Nota* Elaborado por los autores, 2024

**Tabla 7**. *Resultados de pruebas y resultados en tamizaje fitoquímico*

| Prueba | Resultado | Imagen | Observación |
|---|---|---|---|
| Dragendorff | – |  | Ninguna |
| Mayer | + |  | Presentó coloración marrón amarillento indicando positivo en la prueba |
| Hager | + | | Presentó precipitado moderado con coloración ligeramente amarilla dando positivo para Hager |
| Wagner | – | | Ninguna |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Fehling | – | | Ninguna |
| KOH | – | | Ninguna |
| Peróxido | – | | Ninguna |
| Zinc | – |  | Ninguna |
| Fluorescencia | + | | Presentó luminosidad ante luz fluorescente dando positivo para prueba de fluorescencia |
| Baljet | – | | Ninguna |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Shinoda | – |  | Ninguna |
| Ácido sulfúrico | – | | Ninguna |
| Legal | – |  | Ninguna |

En estudios previos realizados por (Rajamurugan et al., 2013) y (Larbie et al., 2019) sobre el género de Tecoma han demostrado la presencia de compuestos bioactivos como alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, esteroides y glucósidos. Esto respalda su potencial antimicrobiano contra una variedad de microorganismos, como *S. aureus*, *E. coli y K. pneumoniae.* Sin embargo, en contraste con estos resultados, el extracto acuoso orgánico de Tecoma castanifolia examinado en este estudio no demostró tener ninguna capacidad para inhibir la propagación de *Candida albicans*. Esta discrepancia podría ser el resultado de variaciones en la composición química de las diferentes especies de Tecoma, variaciones en las técnicas de extracción o una concentración inadecuada del extracto utilizado. En futuras investigaciones, es posible que una mayor concentración del extracto o un método de extracción diferente muestre una actividad antimicrobiana más evidente.

Aunque las cumarinas tienen una actividad antifúngica reconocida, como lo demuestran investigaciones realizadas por Montagner et al., (2008) que demuestran su eficacia contra el hongo *Candida albicans* a través de múltiples mecanismos, los hallazgos con el extracto acuoso de *Tecoma castanifolia* no lograron detener el crecimiento del hongo. Esta discrepancia podría ser el resultado de una falta de cumarinas en el extracto o de una falta de compuesto bioactivo en su totalidad. Aunque cumarinas como el ostenol han demostrado ser efectivas a concentraciones específicas, es posible que el extracto evaluado no haya alcanzado la concentración mínima inhibitoria requerida, lo que subraya la importancia de optimizar tanto la extracción como la concentración para aprovechar plenamente el potencial antifúngico de estas moléculas en futuras investigaciones. A pesar de que los alcaloides han demostrado propiedades antifúngicas significativas contra varias especies de Candida, el extracto acuoso de *Tecoma castanifolia* no logró inhibir la infección de *Candida albicans*. La falta de eficacia puede ser el resultado de la baja concentración de alcaloides en el extracto. Debido a que alcaloides como la berberina han demostrado eficacia notable, es posible que se requiera una concentración o extracción más eficiente para ver un efecto inhibidor significativo en futuras investigaciones (Noguti et al., 2016).

### 4.3. Actividad biológica.

#### *4.3.1. Prueba de micro dilución*

Se utilizó la técnica de micro dilución en placas multipocillos para determinar la actividad biológica del extracto acuoso orgánico de *Tecoma castanifolia*, pero los resultados mostraron que no inhibió el hongo *Candida albicans*. La falta de extracto y la baja concentración son las razones de este resultado negativo. Después de 24 horas de incubación, se agregó TTC para ver si había respiración celular; algunos pocillos cambiaron de color a rojo, lo que indicaba actividad metabólica. No obstante, al leer las placas a 530 nm, no se encontró un porcentaje significativo de inhibición, lo que indica que la concentración del extracto no fue suficiente

para detener el crecimiento de *Candida albicans.* A pesar de la eficacia de esta técnica, los resultados obtenidos con el extracto acuoso en este estudio no mostraron inhibición del hongo. Esto puede estar relacionado con la baja concentración del extracto utilizado, que podría no haber alcanzado la CMI necesaria para inhibir el crecimiento de *C. albicans* (Vinuesa & Fernández, 2021). El uso de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) permitió la detección de microorganismos viables, pero la falta de inhibición sugiere que, aunque la técnica de microdilución es precisa y confiable, la cantidad y concentración del extracto fueron insuficientes para demostrar una actividad antifúngica significativa en este caso (Veiga et al., 2019).

# Capítulo 5

# Conclusiones y Recomendaciones

## 5.1. Conclusiones

La cromatografía líquida al vacío (VLC) fue un método exitoso para obtener el extracto orgánico concentrado de *Tecoma castanifolia*, este proceso permitió fraccionar y concentrar los compuestos presentes en la planta. En esta investigación se obtuvo 106,38 g de extracto orgánico de *T. castanifolia*, el cual fue fraccionado para su uso en el análisis fitoquímico y evaluación de la actividad biológica.

El perfil fitoquímico del extracto acuoso orgánico de T. castanifolia reveló la presencia de alcaloides y cumarinas, compuestos conocidos por su potencial actividad antifúngica, identificados mediante las pruebas Mayer y Hager para alcaloides y en la prueba de la fluorescencia para cumarinas.

A pesar de la presencia de cumarinas y alcaloides en el extracto acuoso, no se logró inhibir el crecimiento de *Candida albicans*, utilizando la técnica de micro dilución en placas multipocillos, lo que indica que la concentración del extracto utilizado fue insuficiente para alcanzar a inhibir el crecimiento de *C. albicans*. Esto resalta la importancia de optimizar tanto la cantidad del extracto como su concentración para alcanzar niveles de inhibición efectivos en futuras investigaciones

## 5.2. Recomendaciones

Tener en cuenta variables como el tiempo de ultrasonido e incrementar intervalos de 10 minutos durante la extracción, con el fin de evaluar cómo afecta al rendimiento y a la concentración de los compuestos del extracto orgánico.

Aumentar las concentraciones de las fracciones obtenidas con el fin de poder identificar la fracción con una mayor efectividad para inhibir a *Candida albicans*.

Realizar estudios con incrementos del 25% de la concentración del extracto orgánico de *T. castanifolia* para poder determinar si a concentraciones más altas se puede alcanzar la CMI necesaria para inhibir el crecimiento de *C. albicans.*

Aplicar un análisis cuantitativo de cumarinas y alcaloides presentes en el extracto orgánico por medio de HPLC y espectrometría de masas, para determinar sus concentraciones exactas y determinar una correlación entre compuesto y actividad biológica.

Extender el ensayo biológico a diferentes especies de patógenos, para poder evaluar si el extracto orgánico de *T. castanifolia* tiene otro potencial en diferentes patógenos de interés clínico o agrícola.

## Referencias Bibliográficas

Acosta-Mosquera, Y., Tapia, J. C., Armas-González, R., Cáceres-Valdiviezo, M. J., Fernández-Cadena, J. C., & Andrade-Molina, D. (2024). Prevalence and Species Distribution of Candida Clinical Isolates in a Tertiary Care Hospital in Ecuador Tested from January 2019 to February 2020. *Journal of Fungi*, *10*(5), 304. https://doi.org/10.3390/jof10050304

Aguirre, Z., Lars-Kvist, P., & Sánchez, O. (2006). Bosques secos en Ecuador y su diversidad. *Botánica Económica de Los Andes Centrales*, 162–187.

Alamgir, A. N. M. (2018). *Phytoconstituents—Active and Inert Constituents, Metabolic Pathways, Chemistry and Application of Phytoconstituents, Primary Metabolic Products, and Bioactive Compounds of Primary Metabolic Origin* (pp. 25–164). https://doi.org/10.1007/978-3-319-92387-1_2

Al-Azzawi, A., Al-Sameraei, K., Al-Khateeb, E., & Al-Juboori, A. (2012). Antibacterial activity and the histopathological study of crude extracts and isolated tecomine from Tecoma stans Bignoniaceae in Iraq. *Pharmacognosy Research*, *4*(1), 37. https://doi.org/10.4103/0974-8490.91033

Anchundia, N. (2017). *Visitantes florales, polinización y biología floral de Tecoma castanifolia (D. Don) Melch. (Bignoniaceae), en dos sitios de la ciudad de Guayaquil, Ecuador.* [Tesis de pregrado]. Universidad de Guayaquil.

Anna K Jager, S. H. F. (2014). Correlation between Plant Secondary Metabolites and Their Antifungal Mechanisms–A Review. *Medicinal & Aromatic Plants*, *03*(02). https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000154

Arikan, S. (2007). Current status of antifungal susceptibility testing methods. *Medical Mycology*, *45*(7), 569–587. https://doi.org/10.1080/13693780701436794

Bakr, R., Fayed, M. A., Salem, M., & Hussein, A. (2019). Tecoma stans: Alkaloid profile and antimicrobial activity. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, *11*(4), 341. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_79_19

Bandiol, T. (2018). Extraction and Qualitative Phytochemical Screening of Medicinal Plants: A Brief Summary. *Medicine*.

Boeira, C. P., Piovesan, N., Soquetta, M. B., Flores, D. C. B., Lucas, B. N., Barin, J. S., Da Rosa, C. S., & Terra, N. N. (2018). Ultrasonic assisted extraction to obtain bioactive, antioxidant and antimicrobial compounds from marcela. *Ciência Rural*, *48*(6), e20170722. https://doi.org/10.1590/0103-8478CR20170772

Bosque Protector La Prosperina. (n.d.). *MUYUYO DE MONTAÑA - bosque*. Retrieved May 26, 2024, from http://www.bosqueprotector.espol.edu.ec/biodiversidad/muyuyo-de-montana/

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, *161*(5), 839–851. https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3

CDC. (2022). *Antimicrobial-Resistant Fungi | Fungal Diseases | CDC*. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). https://www.cdc.gov/fungal/antifungal-resistance.html

CDC. (2023). *Treatment of Candidiasis | Candidiasis | CDC*. U.S. Centers for Disease Control and Prevention. https://www.cdc.gov/candidiasis/treatment/index.html

Chávez Fernández, J., Lizárraga Lazo, V., & Vargas de Nieto, E. (2020). Caracterización Físico Química De Los Componentes Volátiles Del Tecoma Fulva Subsp. Arequipensis (Cahuato). *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, *86*(3), 246–259. https://doi.org/10.37761/rsqp.v86i3.298

Chila Santana, L. A., Anzules Guerra, J., Milian Hernández, E., & Izaguirre Bordelois, M. (2022). Perfil clínico-microbiológico de la Candidiasis Vulvovaginal en mujeres embarazadas. *Revista Científica Biomédica Del ITSUP*, *6*(1).

Coli, J. C., & Bowden, B. F. (1986). The application of vacuum liquid chromatography to the separation of terpene mixtures. *Journal of Natural Products*, *49*(5), 934–936. https://doi.org/10.1021/NP50047A033/ASSET/NP50047A033.FP.PNG_V03

Cornejo, X. (2015). Árboles y arbustos nativos del Bosque Seco del Pacífico Ecuatorial para la arborización urbana en la costa de Ecuador y noroccidente de Perú. *Revista Científica de Ciencias Naturales y Ambientales*, *9*(2).

Dadar, M., Tiwari, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Shahali, Y., & Dhama, K. (2018). Candida albicans - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis*, *117*, 128–138. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.028

de-Souza-Silva, C. M., Guilhelmelli, F., Zamith-Miranda, D., de Oliveira, M. A., Nosanchuk, J. D., Silva-Pereira, I., & Albuquerque, P. (2018). Broth Microdilution In Vitro Screening: An Easy and Fast Method to Detect New Antifungal Compounds. *Journal of Visualized Experiments*, *132*. https://doi.org/10.3791/57127

Diekema, D. J., Messer, S. A., Brueggemann, A. B., Coffman, S. L., Doern, G. V., Herwaldt, L. A., & Pfaller, M. A. (2002). Epidemiology of Candidemia: 3-Year Results from the Emerging Infections and the Epidemiology of Iowa Organisms Study. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(4), 1298–1302. https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1298-1302.2002

Drummond, R. (2019). *Candida albicans*. BiteSized Immunology.

El Hawary, S. S., Khattab, A. R., Marzouk, H. S., El Senousy, A. S., Alex, M. G. A., Aly, O. M., Teleb, M., & Abdelmohsen, U. R. (2020). In silico identification of SARS-CoV-2 spike (S) protein–ACE2 complex inhibitors from eight Tecoma species and cultivars analyzed by LC-MS. *RSC Advances*, *10*(70), 43103–43108. https://doi.org/10.1039/D0RA08997D

Elgharbawy, A. A. M., Samsudin, N., Benbelgacem, F. F., Hashim, Y. Z. H.-Y., Salleh, H. M., & Santhanam, J. (2020). Phytochemicals with antifungal properties: Cure from nature. *Malaysian Journal of Microbiology*. https://doi.org/10.21161/mjm.190551

Escribano-Ávila, G. (2016). El bosque seco neotropical de la provincia Ecuatoriana: un pequeño gran desconocido. *Ecosistemas*, *25*(2), 1–4. https://doi.org/10.7818/ECOS.2016.25-2.01

Fernandes, A., & Mankad, A. (2022). An Appraise On Tecoma Stans (L.) Ex. Juss, Kunth. - Phytochemical Potentials. *International Association of Biologicals and Computational Digest*, *1*(2), 259–274. https://doi.org/10.56588/iabcd.v1i2.79

Gavaldàa, J., & Ruiza, I. (2003). Recomendaciones para el tratamiento de la infección fúngica invasiva. Infeccion fúngica invasiva por Candida spp. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* , *21*(9), 498–508.

Gentry, A. H. (1999). Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden. In P. M. Jørgensen & S. León-Yánez (Eds.), *Missouri Botanical Garden.* (Vol. 8, pp. 1–1181).

Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *12*(4), 501–517. https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.501

Gonçalves, T. P. R., Parreira, A. G., Zanuncio, V. S. dos S., Farias, K. de S., Silva, D. B. da, & Lima, L. A. R. dos S. (2022). Antibacterial and antioxidant properties of flowers from Tecoma stans (L.) Juss. ex Kunth (Bignoniaceae). *South African Journal of Botany*, *144*, 156–165. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.08.028

Gutiérrez-Pineda, K. M., & Herrera, M. (2022). Caracterización fitoquímica preliminar de los extractos etanólicos de hoja, fruto verde y maduro de Terminalia catappa L. (Almendro) en Panamá. *La Granja*, *36*(2). https://doi.org/10.17163/lgr.n36.2022.01

Huang, Y., Xiao, D., Burton-Freeman, B. M., & Edirisinghe, I. (2016). Chemical Changes of Bioactive Phytochemicals during Thermal Processing. *Reference Module in Food Science*. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.03055-9

Jachak, S. M., Goyal, A., Dey, A., Kulshreshtha, S., & Deshmukh, K. N. (2023). Experimental Protocols in Phytochemistry and Natural Products: An Ever-Evolving Challenge. *The Quintessence of Basic and Clinical Research and Scientific Publishing*, 149–168. https://doi.org/10.1007/978-981-99-1284-1_10

Jan Hudzicki. (2009). *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. ASM Education.

Jha, A. K., & Sit, N. (2022). Extraction of bioactive compounds from plant materials using combination of various novel methods: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *119*, 579–591. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.11.019

Kabir, M. A., Hussain, M. A., & Ahmad, Z. (2012). Candida albicans: A Model Organism for Studying Fungal Pathogens. *ISRN Microbiology*, *2012*, 1–15. https://doi.org/10.5402/2012/538694

Kadosh, D., & Mundodi, V. (2020). A Re-Evaluation of the Relationship between Morphology and Pathogenicity in Candida Species. *Journal of Fungi*, *6*(1), 13. https://doi.org/10.3390/jof6010013

Kumar, A., P, N., Kumar, M., Jose, A., Tomer, V., Oz, E., Proestos, C., Zeng, M., Elobeid, T., K, S., & Oz, F. (2023). Major Phytochemicals: Recent Advances in Health Benefits and Extraction Method. *Molecules*, *28*(2), 887. https://doi.org/10.3390/molecules28020887

Larbie, C., Owusu Nyarkoh, C., & Owusu Adjei, C. (2019). Phytochemical and Safety Evaluation of Hydroethanolic Leaf Extract of Tecoma stans (L.) Juss. ex Kunth. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM*, *2019*. https://doi.org/10.1155/2019/7417624

Lincoln, T., & Zeige, E. (2006). Secondary Metabolites and Plant Defense. In *Plant Physiology* (Fourth, pp. 283–308). Sinauer Associates, Inc.

Logan, A., Wolfe, A., & Williamson, J. C. (2022). Antifungal Resistance and the Role of New Therapeutic Agents. *Current Infectious Disease Reports*, *24*(9), 105–116. https://doi.org/10.1007/s11908-022-00782-5

López-Ávila, K., Dzul-Rosado, K. R., Lugo-Caballero, C., Arias-León, J. J., & Zavala-Castro, J. E. (2016). Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles en Candida albicans. Una revisión. *REVISTA BIOMÉDICA*, *27*(3). https://doi.org/10.32776/revbiomed.v27i3.541

Lu, M., Li, T., Wan, J., Li, X., Yuan, L., & Sun, S. (2017). Antifungal effects of phytocompounds on Candida species alone and in combination with fluconazole. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *49*(2), 125–136. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.10.021

Madsen, J. E., Mix, R., & Balslev, H. (2001). *Flora of Puná Island: Plant resources on a neotropical island*. Aarhus Universitetsforlag. https://pure.au.dk/portal/en/publications/flora-of-pun%C3%A1-island-plant-resources-on-a-neotropical-island

Mallik, B., Chakravarti, B., & Chakravarti, D. N. (2008). Overview of Chromatography. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, *00*(1). https://doi.org/10.1002/9780470089941.et0601s00

Mandal, S. C., Mandal, V., & Das, A. K. (2015). Qualitative Phytochemical Screening. In *Essentials of Botanical Extraction* (pp. 173–185). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802325-9.00009-4

Maurya, A., Kalani, K., Verma, S. C., Singh, R., & Srivastava, A. (2018). Vacuum Liquid Chromatography: Simple, Efficient and Versatile Separation Technique for Natural Products. *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, *7*(2), 80–82. https://doi.org/10.19080/OMCIJ.2018.07.555710

Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). Candida albicans pathogenicity mechanisms. *Virulence*, *4*(2), 119–128. https://doi.org/10.4161/viru.22913

Mendoza, N. (2015). *Análisis de variación morfológica de semillas y embriones de diez especies distribuidas en los bosques secos de la provincia de Manabí* [Tesis de pregrado]. Universidad Técnica Particular de Loja.

Montagner, C., De Souza, S. M., Groposo, C., Delle Monache, F., Smânia, E. F. A., & Smânia, A. (2008). Antifungal activity of coumarins. *Zeitschrift Fur Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, *63*(1–2), 21–28. https://doi.org/10.1515/ZNC-2008-1-205

Mroczek, T., Dymek, A., Widelski, J., & Wojtanowski, K. K. (2020). The Bioassay-Guided Fractionation and Identification of Potent Acetylcholinesterase Inhibitors from Narcissus c.v. 'Hawera' Using Optimized Vacuum Liquid Chromatography, High Resolution Mass Spectrometry and Bioautography. *Metabolites*, *10*(10), 395. https://doi.org/10.3390/metabo10100395

Niu, X., Gielen, F., Edel, J. B., & deMello, A. J. (2011). A microdroplet dilutor for high-throughput screening. *Nature Chemistry*, *3*(6), 437–442. https://doi.org/10.1038/nchem.1046

Noguti, J., Rajinia, M., Zancope, B. R., Marquezin, M. C. S., Seleem, D., Pardi, V., & Murata, R. M. (2016). Antifungal Activity of Alkaloids Against Candida albicans. *Journal of the California Dental Association*, *44*(8), 493–498.

Obulesu, M. (2022). Potential plant extracts in the treatment of Parkinson's disease. *Plant Extracts in Neurodegenerative Diseases*, 17–31. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-95762-5.00003-5

Pattnaik, S., Maharana, L., & Sethi, M. (2021). *Pathogenicity Mechanism of Candida albicans*. https://doi.org/10.5772/intechopen.99737

Pennington, R., Prado, D. E., & Pendry, C. A. (2000). Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography*, *27*(2), 261–273. https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2000.00397.x

Perlin, D. S., Shor, E., & Zhao, Y. (2015). Update on Antifungal Drug Resistance. *Current Clinical Microbiology Reports*, *2*(2), 84–95. https://doi.org/10.1007/s40588-015-0015-1

Polonelli, L., & Morace, G. (2004). A microautomated dilution method for susceptibility testing with antifungal drugs. *Mycopathologia*, *86*(1), 21–28. https://doi.org/10.1007/BF00437225

Pristov, K. E., & Ghannoum, M. A. (2019). Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, *25*(7), 792–798. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.028

Pungor, E. (2020). Liquid Chromatography. In *A Practical Guide to Instrumental Analysis* (pp. 233–328). CRC Press. https://doi.org/10.1201/9781003069096-25

Rabizadeh, F., Mirian, M. S., Doosti, R., Kiani-Anbouhi, R., & Eftekhari, E. (2022). Phytochemical Classification of Medicinal Plants Used in the Treatment of Kidney Disease Based on Traditional Persian Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2022*, 1–13. https://doi.org/10.1155/2022/8022599

Rajamurugan, R., Thirunavukkarasu, C., Sakthivel, Sivashanmugam, M., & RaghavanC, M. (2013). Phytochemical screening, Antioxidant and antimicrobial activities of ethanolic extract of Tecoma Stan Flowers. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*.

Redondo-Blanco, S., Fernández, J., López-Ibáñez, S., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2020). Plant Phytochemicals in Food Preservation: Antifungal Bioactivity: A Review. *Journal of Food Protection*, *83*(1), 163–171. https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-163

Reyes-Blas, H., Olivas-Armendariz, I., Martel-Estrada, S. A., & Valencia, L. (2021). Uso de Biomateriales Funcionalizados con Moléculas Bioactivas en la Ingeniería Biomédica. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, *40*(3). https://doi.org/10.17488/RMIB.40.3.9

Rodríguez-Rico, D., Mena Favela, A., Marszalek, J. E., & De la Fuente-Salcido, N. M. (2019). Determinación preliminar del potencial bioterapeútico de nanoparticulas de quitosano plus extracto de Prosopis contra Candida albicans . *Investigación y Desarrollo En Ciencia y Tecnología de Alimentos*, *4*, 225–229.

Rodriguez-Tudela, J. L., Arendrup, M. C., Barchiesi, F., Bille, J., Chryssanthou, E., Cuenca-Estrella, M., Dannaoui, E., Denning, D. W., Donnelly, J. P., Dromer, F., Fegeler, W., Lass-Flörl, C., Moore, C., Richardson, M., Sandven, P., Velegraki, A., & Verweij, P. (2008). EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*(4), 398–405. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01935.x

Rohit Saxena. (2023). Exploring Approaches for Investigating Phytochemistry: Methods and Techniques . *Medalion Journal: Medical Research, Nursing, Health and Midwife Participation*, *4*(2), 65–73. https://doi.org/10.59733/medalion.v4i2.76

Ruth Ripley. (2013). Tecoma castanifolia. In *iNaturalistEc*.

Salazar, S. B., Simões, R. S., Pedro, N. A., Pinheiro, M. J., Carvalho, M. F. N. N., & Mira, N. P. (2020). An Overview on Conventional and Non-Conventional Therapeutic Approaches for the Treatment of Candidiasis and Underlying Resistance Mechanisms in Clinical Strains. *Journal of Fungi*, *6*(1), 23. https://doi.org/10.3390/jof6010023

Sanguinetti, M., Posteraro, B., & Lass-Flörl, C. (2015). Antifungal drug resistance among Candida species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses*, *58*(S2), 2–13. https://doi.org/10.1111/myc.12330

Santos, D. A., & Hamdan, J. S. (2005). Evaluation of Broth Microdilution Antifungal Susceptibility Testing Conditions for *Trichophyton rubrum*. *Journal of Clinical Microbiology*, *43*(4), 1917–1920. https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1917-1920.2005

Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, *2020*. https://doi.org/10.1093/database/baaa062

Scorzoni, L., Sangalli-Leite, F., de Lacorte Singulani, J., de Paula e Silva, A. C. A., Costa-Orlandi, C. B., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2016). Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. *Journal of Microbiological Methods*, *123*, 68–78. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.02.005

Silva, G., Abeysundara, A., & Aponso, M. (2017). Extraction methods, qualitative and quantitative techniques for screening of phytochemicals from plants. American . *Journal of Essential Oils and Natural Products*, *5*, 29–32.

Singh, S., Miller, C. T., Singh, P., Sharma, R., Rana, N., Dhakad, A. K., & Dubey, R. K. (2024). A comprehensive review on ecology, life cycle and use of Tecoma stans (bignoneaceae). *Botanical Studies*, *65*(1), 6. https://doi.org/10.1186/s40529-024-00412-4

Sundas, I., Zaheer-Ud-Din, K., Rizwana, R., & Anjum, P. (2016). Evaluation of antibacterial activity of leaf extracts of Mansoa alliacea (Lam.) A. H. Gentry, Tecomaria capensis (Thunb.) Spach and Tecoma stans (L.) Juss. Ex H. B. & K. . *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, *9*(1), 68–75.

Thacker, H. (2020). Role of Phytochemicals in Plants: A Review. *International Journal for Research in Applied Science and Engineering Technology*, *8*(12), 19–21. https://doi.org/10.22214/ijraset.2020.32384

Uddin, G., Rauf, A., Shaheen Siddiqui, B., & Qaiser Shah, S. (2011). Preliminary Comparative Phytochemical Screening of Diospyros lotus Stewart. *Middle-East Journal of Scientific Research*, *10*(1), 78–81.

Usman, I., Hussain, M., Imran, A., Afzaal, M., Saeed, F., Javed, M., Afzal, A., Ashfaq, I., Al Jbawi, E., & A. Saewan, S. (2022). Traditional and innovative approaches for the extraction of bioactive compounds. *International Journal of Food Properties*, *25*(1), 1215–1233. https://doi.org/10.1080/10942912.2022.2074030

Valencia, D., Rueda Puente, E. O., Leyva Peralta, M. A., Mazón-López, S. R., & Ortega-García, J. (2020). Compuestos bioactivos, actividad antioxidante y perfil de ácidos grasos en aceite de semilla de Mezquite (Prosopis spp). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, *70*(1), 50–59. https://doi.org/10.37527/2020.70.1.006

Veiga, A., Toledo, M. da G. T., Rossa, L. S., Mengarda, M., Stofella, N. C. F., Oliveira, L. J., Gonçalves, A. G., & Murakami, F. S. (2019). Colorimetric microdilution assay: Validation of a standard method for determination of MIC, IC50%, and IC90% of antimicrobial compounds. *Journal of Microbiological Methods*, *162*, 50–61. https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2019.05.003

Vinuesa, M. A., & Fernández, A. (2021). A Simple Antifungal assay for Testing Actinomycetes and Other Microbial Extracts. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *2296*, 217–225. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1358-0_13

Warren, N. G., & Body, B. A. (2023). Candidiasis. *Sexually Transmitted Diseases: Epidemiology, Pathology, Diagnosis, and Treatment*, 149–163. https://doi.org/10.1201/9780367811457-11

Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, *3*(2), 163–175. https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521

Zipfel, P. F., Skerka, C., Kupka, D., & Luo, S. (2011). Immune escape of the human facultative pathogenic yeast Candida albicans: The many faces of the Candida Pra1 protein. *International Journal of Medical Microbiology*, *301*(5), 423–430. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.010