



# POSGRADOS

## MAESTRÍA EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS NATURALES

RPC-SO-09-NO.174-2020

OPCIÓN DE TITULACIÓN:

[TESIS]

TEMA:

*[ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA  
ESPECIE VEGETAL OTHOLOBIUM  
MEXICANUM (TRINITARIA) Y  
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD  
BIOLÓGICA Y ANTIOXIDANTE]*

AUTOR(ES)

[GABRIELA MONSERRATH DIAZ  
BETANCOURT]

HAGA CLIC O PULSE AQUÍ PARA ESCRIBIR  
TEXTO.

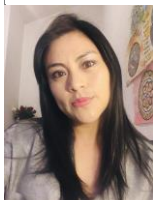
DIRECTOR:

[CHRISTIAN FABRICIO LARENAS  
URIA]

[QUITO] – ECUADOR  
2023



**Autor(es):**



Gabriela Monserrath Diaz Betancourt  
Ingeniera en Biotecnología  
Candidata a Magíster en Administración de Empresas por la  
Universidad Politécnica Salesiana – Sede Quito.  
gdiazb@est.ups.edu.ec

**Dirigido por:**



Christian Fabricio Larenas Uria  
Químico  
PhD. Química analítica  
clarenas@ups.edu.ec

Todos los derechos reservados.

Queda prohibida, salvo excepción prevista en la Ley, cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública y transformación de esta obra para fines comerciales, sin contar con autorización de los titulares de propiedad intelectual. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual. Se permite la libre difusión de este texto con fines académicos investigativos por cualquier medio, con la debida notificación a los autores.

**DERECHOS RESERVADOS**

2023 © Universidad Politécnica Salesiana.  
QUITO – ECUADOR – SUDAMÉRICA  
**Gabriela Monserrath Diaz Betancourt**

Estudio fitoquímico de la especie vegetal *Otholobium mexicanum* (Trinitaria) y evaluación de su actividad biológica y antioxidante.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo de investigación, está dedicado a todas las mujeres de mi familia, mis bis abuelas y madre que están en el cielo, ya que han sido mi inspiración para valorar las plantas como fuente de investigación.

A papa Enrique, mama Cecy (+) y mi hija Camila por su amor, paciencia y constante aliento desde el inicio de este proyecto.

Finalmente, dedico este estudio a la comunidad científica del Ecuador, esperando que esta sea una contribución al conocimiento y un punto de partida para continuar con investigaciones de la especies vegetales endémicas del país.

## **AGRADECIMIENTO**

Extiendo un agradecimiento a todas las personas que con su participación han tenido un papel fundamental en la realización de este trabajo de investigación.

En primer lugar, agradezco a mi director de tesis, Dr. Christina Larenas, por su guía en la parte técnica del proceso. Al Dr. Paco Noriega, Director del Programa de la maestría Producción en productos naturales por sus comentarios constructivos y valiosas sugerencias.

Quiero expresar mi gratitud al personal técnico del laboratorio de la Facultad de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad Salesiana, por toda su colaboración en la ejecución de la parte práctica de esta investigación. De manera especial a Ely y Bryan.

Con gratitud sincera,

Gaby Díaz.

# TABLA DE CONTENIDO

Resumen .....	8
Abstract .....	10
1. Introducción .....	12
2. Determinación del Problema.....	14
3. Marco teórico referencial.....	16
3.1 descripción botánica de la especie vegetal .....	17
3.1.1 Familia Fabaceae .....	17
3.1.2 Características generales.....	17
3.2 Metabolitos secundarios en especies vegetales .....	19
3.2.1 Técnicas de extracción de metabolitos secundarios en especies vegetales. 21	
3.3 Técnicas de identificación de metabolitos secundarios en extractos vegetales . 23	
3.3.1 Tamizaje Fitoquímico.....	23
3.3.2 Cromatografía en capa Fina (TLC) .....	25
3.3.3 técnica de cromatografía de gases.....	27
3.3.4 Técnica de Espectrometría de Masas.....	28
3.4 Capacidad antioxidante en extractos vegetales.....	29
3.4.1 Prueba de DPPH (2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl) .....	31
3.5 actividad biológica de extractos vegetales.....	32
3.5.1 Capacidad bactericida: generalidades.....	33
3.5.2 Métodos de microdilución en caldo .....	34
3.5.3 Determinación de la concentración mínima bactericida .....	34
3.5.4 Técnica de TLC- Bioautografía .....	35
4. Materiales y metodología.....	37
4.1 Material vegetal.....	37
4.2 Preparación de los extractos vegetales de trinitaria.....	38
4.3 Tamizaje fitoquímico de extractos vegetales .....	38
4.4 Cromatografía en capa fina .....	39
4.5 Actividad antioxidante por ensayo DPPH de extractos Otholobium mexicanum 39	
4.6 Determinación de la actividad antimicrobiana de otholobium mexicanum.....	41
4.6.1 Preparación de cultivos bacterianos .....	41

4.6.2 Determinación de Concentración mínima inhibitoria (CIM) y la concentración bactericida mínima (CBM) de los extractos vegetales D1 y D2 de Trinitaria ( <i>Otholobium mexicanum</i> ) .....	42
4.6.3 Bioautografía por contacto placa tlc .....	44
4.6.4 Identificación de componentes por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. ....	45
5. Resultados y discusión.....	46
5.1. Rendimiento de los extractos vegetales .....	46
5.2. Tamizaje fitoquímico .....	47
5.3 Cromatografía en capa fina y determinación del valor R <sub>f</sub> por .....	51
5.4 Bioautografía por contacto de placa tlc .....	53
5.5 Determinación de Concentración Mínima Bactericida (MIC) de los extractos por el método de microdilución en caldo.....	64
5.5.1 Evaluación de la CMI para <i>Escherichia coli</i> ATCC 65380 .....	64
5.5.2 Evaluación de la CMI para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 8739 .....	66
5.5.3 Análisis estadístico actividad biológica de extractos <i>Otholobium mexicanum</i> Trinitaria .....	69
5.6 Determinación de la capacidad antioxidante.....	76
5.6.1 Determinación de la capacidad antioxidante del ácido ascórbico.....	76
5.6.2 Determinación de la capacidad antioxidante del extracto de Trinitaria <i>Otholobium mexicanum</i> (D1) a una dilución (1:1) .....	77
5.6.2. Determinación de la capacidad antioxidante del extracto vegetal de <i>Otholobium mexicanum</i> Trinitaria (D2), a una dilución (1:1).....	79
5.7 Análisis estadístico para la capacidad antioxidante de los extractos vegetales D1 y D2 de <i>Otholobium mexicanum</i> Trinitaria frente a el ácido ascórbico. ....	81
6. Conclusiones.....	86
Referencias .....	89

*ESTUDIO  
FITOQUÍMICO DE LA  
ESPECIE VEGETAL  
OTHOLOBIUM  
MEXICANUM  
(TRINITARIA) Y  
EVALUACIÓN DE  
ACTIVIDAD BIOLÓGICA  
Y ANTIOXIDANTE*

AUTOR(ES):

GABRIELA MONSERRATH DIAZ BETANCOURT

## RESUMEN

En la actualidad, la investigación de nuevas moléculas o compuestos con propiedades terapéuticas han cobrado un gran protagonismo. En este ámbito, el Ecuador se muestra como un reservorio de compuestos activos presentes en su flora endémica y que, por muchos años, han sido utilizados como medicina tradicional. Sin embargo, no han contado con una base técnico-científica para darse a conocer como potenciales especies vegetales.

Este el caso de la Trinitaria (*Otholobium mexicanum*). En el presente trabajo se identificaron los principales grupos de metabolitos secundarios en tres extractos de Trinitaria (acetato de etilo D1, etanol D2 y etanol: agua D3) a través del tamizaje fitoquímico y cromatografía en capa fina (TLC).

Se analizaron los perfiles cromatográficos del aceite esencial de Trinitaria través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) caracterizando compuestos como Z-dimetoxi-citral (9%), beta-pineno (7,04%), Timol (4,71%), metil nerolato (2,43%), cis-p-menta-2,8-dien-1-ol con el 24,99%, cyclocolorenona (16,13%), entre otros.

Posteriormente, se analizó la capacidad antimicrobiana de Trinitaria con la técnica de bioautografía y microdilución en caldo. Mostrando actividad biológica, con valores de CMI de 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en los extractos D1 y D2 respectivamente, para la *Escherichia coli* ATCC 6538. Para *Staphylococcus aureus* ATCC 8739 se reportó CMI de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Además, se obtuvo un CMB de 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para las dos bacterias.

Por último, se determinó la capacidad antioxidante de los extractos de Trinitaria, empleando la metodología DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo), se utilizó ácido ascorbico como control. Obteniendo para D1 un porcentaje de capacidad antioxidante de 58,7% y un IC50 de 40,158  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , D2 un porcentaje de 73,9% y un IC50 28,332  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se realizó el análisis estadístico aplicando la prueba de ANOVA

multifactorial y la prueba de comparación LSD tanto para los datos de porcentaje de actividad inhibitoria de crecimiento bacteriano, así como para la capacidad antioxidante. Mostrando que los compuestos de la Trinitaria se presentan como una fuente potencial de compuestos antimicrobianos y antioxidantes.

**Palabras clave:** Trinitaria, Tamizaje fitoquímico, microdilución, bioautografía, DPPH.

## ABSTRACT

---

Currently, the research of new molecules or compounds with therapeutic properties has gained great prominence. In this context, Ecuador stands out as a reservoir of active compounds present in its endemic flora, which have been used for many years in traditional medicine. However, they have lacked a technical-scientific basis to be recognized as potential plant species.

This is the case of *Trinitaria* (*Otholobium mexicanum*). In this study, the main groups of secondary metabolites in three *Trinitaria* extracts (ethyl acetate D1, ethanol D2, and ethanol: water D3) were identified through phytochemical screening and thin-layer chromatography (TLC).

The chromatographic profiles of *Trinitaria* essential oil were analyzed using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), characterizing compounds such as Z-dimethoxy-citral (9%), beta-pinene (7.04%), thymol (4.71%), methyl nerolate (2.43%), cis-p-mentha-2,8-dien-1-ol (24.99%), cyclocolorenone (16.13%), among others.

Subsequently, the antimicrobial capacity of *Trinitaria* was analyzed using the bioautography and broth microdilution techniques. It showed biological activity, with MIC values of 15 µg/mL and 7.5 µg/mL in extracts D1 and D2, respectively, against *Escherichia coli* ATCC 6538. For *Staphylococcus aureus* ATCC 8739, an MIC of 30 µg/mL was reported. Additionally, an MBC of 60 µg/mL was obtained for both bacteria.

Finally, the antioxidant capacity of the *Trinitaria* extracts was determined using the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) method, with ascorbic acid as a control. The antioxidant capacity percentage for D1 was 58.7%, with an IC<sub>50</sub> of 40.158 µg/mL, and for D2, the percentage was 73.9%, with an IC<sub>50</sub> of 28.332 µg/mL. Statistical analysis was performed using multifactorial ANOVA and the LSD comparison test for both bacterial growth inhibitory activity and antioxidant capacity, showing that *Trinitaria* compounds present a potential source of antimicrobial and antioxidant compounds.

**Keywords:** Trinitaria, Phytochemical screening, microdilution, bioautography, DPPH..|

# 1. INTRODUCCIÓN

El Ecuador, por su riqueza etnobotánica, es uno de los países de América Latina, en donde el uso de plantas con propiedades curativas, es desde tiempos inmemorables una herramienta de la medicina tradicional, esto porque los ingredientes botánicos son la primera fuente de atención sanitaria accesible y asequible para la población [1].

Una de las plantas utilizadas en la medicina tradicional, es *Otholobium mexicanum* L.W (Grimes), conocida con nombres comunes como Ruchica, Trinitaria o Culen se desarrolla en países como Perú, Colombia, Venezuela y Ecuador, su principal uso se destaca en trastornos digestivos [2].

En la última década, en el Ecuador se han realizado estudios con extractos vegetales de *Otholobium mexicanum*, obteniendo evidencia de la presencia de fitocompuestos (taninos, terpenos, terpenoides, entre otros) con un gran potencial terapéutico y actividad microbiana frente a bacterias como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* [3].

El presente estudio permitirá identificar y cuantificar los principales de grupos de metabolitos secundarios de la especie vegetal Trinitaria (*Otholobium mexicanum*) con la preparación de extractos en diferentes solventes (acetato de etilo, etanol y etanol: agua), en una relación 1:10 planta: solvente. Para la caracterización de las sustancias químicas, se realizará el tamizaje fitoquímico, cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía de gases.

La actividad biológica de la especie vegetal Trinitaria, frente a las bacterias *Escherichia coli* ATCC 65380 y *Staphylococcus aureus* ATCC 8739, así como la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB), será evaluada a través de la técnica de bioautografía y microdilución en caldo, respectivamente.

Además, se evaluará la capacidad antioxidante de los extractos de *Otholobium mexicanum*, expresada como la concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ), con el uso del compuesto químico 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

## 2. DETERMINACIÓN DEL PROBLEMA

A nivel global, el uso de plantas medicinales, como alternativa para el cuidado de la salud, se constituye en una práctica cultural milenaria, fundamentada en la experiencia empírica de la población que la aplica [4].

El estudio de extractos naturales ha permitido la identificación química de metabolitos secundarios con actividad terapéutica, utilizando técnicas físico-químicas, tecnologías de extracción más precisas y herramientas de ingeniería molecular. Descubriendo moléculas naturales innovadoras, que podrán ser utilizadas en tratamientos medico-preventivos y fitosanitarios [5] [6].

Las familias vegetales con mayor número de publicaciones científicas, corresponden a las familias: Piperaceae, Rutacea, Bromeliaceae, entre otras. Sin embargo, los fitocompuestos de especies pertenecientes a la Familia Fabacea no han sido completamente caracterizados a pesar de que su uso en la medicina tradicional, son ampliamente descritos a nivel nacional y países de la region andina [7].

En la última década, se registran, tan solo dos investigaciones de este tipo en el Ecuador. Una de ellas, fue realizada por León. D, en el año 2014 por la Universidad de técnica particular de Loja. Este estudio, se determinaron moléculas de interés con gran potencial fitoterapéutico en extractos de Trinitaria, perteneciente a la Familia Fabacea [8].

En este sentido, el presente proyecto de estudio se enfoca en la caracterización del perfil fitoquímico, actividad biológica frente a *Escherichia coli* ATCC 65380 y *Staphylococcus aureus* ATCC 8739, así como la capacidad antioxidante de Trinitaria. Con el objetivo de proporcionar una base científica sólida para su aprovechamiento y valorización. Se espera que los resultados de este estudio de investigación contribuyan al conocimiento científico de plantas endémicas del Ecuador y se

---

promueva el desarrollo de nuevos productos y aplicaciones basados en esta especie vegetal prometedora.

### 3. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

---

Durante el transcurso de la historia, el ser humano ha interactuado con su entorno, utilizando todos los recursos naturales, que le aseguraban bienestar. Uno de estos recursos, fueron las plantas; las cuales se convirtieron en proveedoras de remedios para muchas culturas antiguas [9].

Esto permitió, por medio de un conocimiento empírico, discernir entre los recursos vegetales que ejercían una cura a una enfermedad de los que provocaban toxicidad. En el siglo XIX, se utilizó por primera vez el término “fitoterapia” para denominar al uso médico-científico de los principios activos de las plantas [9].

El estudio de las rutas metabólicas de los principales grupos funcionales de los metabolitos secundarios y el desarrollo de procesos de extracción y purificación de los principios activos de las plantas, lograron confirmar la actividad terapéutica de estas moléculas en el organismo [5] [10].

El Ecuador, por su ubicación geográfica, se convierte en un territorio de especies vegetales, con gran potencial para la investigación de moléculas activas con efecto terapéutico. Sin embargo, existe escasa información técnico-científica de las plantas medicinales y su correcta aplicación curativa y de los efectos sobre la salud de la población [10].

### 3.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE VEGETAL

#### 3.1.1 FAMILIA FABACEAE

De acuerdo, a estudios actuales, la familia Fabacea o Leguminosae, está formada por alrededor de 20 000 especies y 750 géneros. Tienen una amplia capacidad adaptativa ya que se desarrollan en varios pisos climáticos y ecosistemas alrededor del mundo [11].

Por su gran diversidad, se han descrito tres subfamilias: Mimosoideae, Cesalpinoideae y Faboideae [11].

La subfamilia Faboideae, en su mayoría son especies herbáceas. Que se presentan en forma de arbustos, con hojas compuestas, flores agrupadas y de color morado. Estas especies en su mayoría han sido utilizadas para el forraje de animales y la alimentación [11].

#### 3.1.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES

Tabla 1: Descripción botánica de *Otholobium mexicanum*

<b>Nombre Científico</b>	<i>Otholobium mexicanum</i>
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Phylum</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Fabales
<b>Familia</b>	Fabaceae
<b>Género</b>	<i>Otholobium</i>
<b>Epíteto específico</b>	<i>Mexicanum</i>
<b>Autor epíteto específico</b>	(L.f) J.W. Grimes

Fuente: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/141721/>

Trinitaria (*Otholobium mexicanum*), son arbustos medianos (1 m a 2,5 m de altura).

Presenta un tallo semileñoso [12], inflorescencia en forma de racimos con pétalos

azul- violeta de 10 a 12 mm (tienen un pétalo grande llamado quilla), en forma de mariposa y anteras de color amarillo; él primer estandarte de los pétalos presenta forma ovado orbicular. Sus hojas son alternas compuestas, con tres hojuelas lanceoladas de borde entero de 5 a 8 cm de longitud por 1,5 a 2,5 cm de ancho [12]. A lo largo de su estructura presenta tricomas (pelitos blanco grisáceos) [13] [14].

Para su reproducción se utilizan semillas, estas son de crecimiento rápido en condiciones adecuadas [12]. Se desarrolla a una altitud de 3000 msnm en áreas de bosque secundario [14] [13]. En el Ecuador esta planta se desarrolla en la cordillera andina, así como en valles, de las provincias de Pichincha y Azuay. Tiene nombres comunes de Culin, Culen, Washwa yura, Trinitaria [13].

Dentro del uso tradicional, se lo realiza en forma de infusiones de hojas y flores para tratar acidez/dolor estomacal, infecciones y flatulencias. En algunas comunidades se utiliza como anticonceptivo femenino [13].

En la planta Trinitaria (*Otholobium mexicanum*), se han identificado aceites esenciales, taninos, gomas, resinas, furanocumarinas, terpenoides dentro de este grupo el compuesto más significativo es el Bakuchiol, éste es un terpenoide fenólico, que tiene una actividad antimicrobiana y citotóxica [12].

En especies como *Otholobium glandulosum* y *Otholobium pubescens*, se han cuantificado grandes cantidades de psoraleno que pertenece al grupo de metabolitos secundarios de las cumarinas. Además, el uso de *Otholobium pubescens*, ha demostrado propiedades hipoglicemiantes y astringentes por la presencia de grupos taninos [15] [12].

### 3.2 METABOLITOS SECUNDARIOS EN ESPECIES VEGETALES

Las especies vegetales son fuentes de moléculas activas, denominadas metabolitos secundarios. Compuestos que a pesar de no participar directamente en el desarrollo de la planta, intervienen en la interacción de esta con el medio ambiente [16].

A continuación, se detallan los principales grupos de metabolitos secundarios que se sintetizan en las especies vegetales:

Tabla 2: Principales metabolitos secundarios en especies vegetales.

Nombre de metabolitos Secundario	Característica
Terpenoides	<p>Se forman por la polimerización de unidades de isoprenos y esteroides [17].</p> <p>Se dividen en seis grupos: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y esteroides (carotenos, glicósidos cardiotónicos, taxol) [17]</p> <p>Los terpenos junto con los compuestos aromáticos, forman los aceites esenciales de las plantas.</p> <p>Son compuestos utilizados en la industria farmacéutica y alimentaria como materia prima.</p>

	<p>Estas moléculas tienen actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, antitumoral y antiviral [18].</p>
Alcaloides y compuestos nitrogenados	<p>Son moléculas sintetizadas mediante aminoácidos. En su estructura química cuentan con el elemento nitrógeno. Su distribución es a lo largo de todas las partes de la planta (hojas, semillas, raíces, frutos) [19].</p> <p>Estos compuestos son utilizados en la industria farmacéutica por generar efectos en el sistema nervioso central, al ser compuestos psicoactivos [19] .</p>
Fenilpropanoides y compuestos fenólicos relacionados	<p>Se encuentran formados por moléculas de hidroxibenceno, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. Dentro de los estos metabolitos se encuentran las cumarinas, flavonoides, lignina y taninos [20].</p> <p>Se ha comprobado acción antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena y antiinflamatoria [20].</p>
Glicósidos	<p>Son grupos de moléculas formadas por un glúcido y un compuesto no glúcido o aglicona. Las plantas almacenan estos compuestos como glucósidos inactivos, que de acuerdo a la necesidad se pueden hidrolizar en medio acuoso por acción enzimática, generando</p>

	<p>glucósidos libres para el metabolismo vegetal [21] [22].</p> <p>La clasificación se dá por la estructura de la aglicona, siendo esta, la responsable de acción bioquímica y farmacológica. Se puede nombrar los siguientes grupos: Glucósidos antraquinónicos, Glucósidos alcohólicos, glucósidos cardíacos, saponinas, etc [21].</p>
--	--

La calidad y cantidad de metabolitos secundarios que se pueden obtener en un extracto crudo depende de factores ambientales (temperatura, radiación solar, estrés hídrico, entre otros) que influyen en el metabolismo celular de la planta [16].

Además, es importante considerar la fase vegetativa y la parte elegida (hojas, raíz, flor) de la planta. Así, como el proceso de secado del material vegetal y los métodos empleados para la extracción de los compuestos de interés [16].

### 3.2.1 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN ESPECIES VEGETALES.

En las últimas décadas se han desarrollado varias técnicas y métodos analíticos para la caracterización y cuantificación de metabolitos secundarios [23].

Dentro de estas se pueden nombrar:

- a. Extracción mecánica por expresión e incisiones, estos procesos consisten en aplicar en el material vegetal una presión mecánica y realizar cortes en capas externas de la planta, respectivamente [16] [22].
- b. Hidrodestilación, método que utiliza un medio acuoso en presencia del material vegetal, el conjunto es llevado a temperatura de ebullición, provocando que las

moléculas sean arrastradas por el vapor de agua y al final se separen por diferencia de densidad, al condensarse en una superficie fría [16] [24].

- c. Extracción con disolventes, dentro de esta técnica se puede hablar de la decocción, la infusión y la maceración. Esta última consiste en cubrir al material vegetal con un disolvente, dejar en reposo por un periodo entre 3 y 5 días a temperatura y humedad ambientales (25°C y 70 %HR). Se sugiere que se realice agitación en el sistema para lograr la mayor extracción de principios activos [16] [25].
- d. Extracción asistida por ultrasonidos, se utilizan ondas ultrasónicas de 20 kHz, que atraviesan matrices vegetales y microbianas, generando zonas con alta tensión de cizallamiento y temperatura, lo cual forma burbujas de cavitación. Este mecanismo alcanza un alto rendimiento en la recuperación de varios compuestos. Además de ser efectivo, disminuye la contaminación al no utilizar solventes químicos [16] [24] [26].
- e. Extracción asistida por microondas, los analitos se separan de la matriz de estudio utilizando energía de microondas [16] [24] [26].
- f. Extracción con fluidos supercríticos, se utilizan como disolventes, fluidos super críticos como el dióxido de carbono. Esta técnica permite alcanzar una adecuada estabilidad de los extractos, ya que proporciona un medio no oxidante en las muestras [16] [24].

### *3.3 TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS EN EXTRACTOS VEGETALES*

#### *3.3.1 TAMIZAJE FITOQUÍMICO*

La identificación cualitativa de los extractos vegetales, se realiza a partir de procesos descritos en técnicas de farmacognosia de los productos naturales. A continuación, se describen las principales reacciones químicas para los principales grupos de metabolitos secundarios.

a. Determinación de Alcaloides. Ensayo de Dragendorff

Se utiliza para determinar la presencia de alcaloides en estado de sal (forma común en los extractos), considerando que estos compuestos por su carácter nitrogenado suelen comportarse de manera similar al amoníaco [27].

Por lo cual en presencia de yodo y un metal pesado (bismuto), forman yoduros dobles insolubles  $\text{BiI}_3 \cdot \text{HI}$  (Reactivo de Dragendorff). Esta reacción ocasiona la presencia de un precipitado, de color pardo [27].

b. Determinación de azúcares reductores. Ensayo de Fehling

Utiliza como principio el poder reductor del grupo carbonilo de un aldehído que pasa a ácido reduciendo la sal cúprica de cobre (III), en medio alcalino, a óxido de cobre (I), formando un precipitado de color rojo [28].

c. Determinación de saponinas. Ensayo de la espuma

Las saponinas al ser glicósidos hidrosolubles de naturaleza anfílica, poseen propiedades tensoactivas y hemolíticas [29].

La espuma formada en el ensayo in- vitro, por la agitación del medio acuoso, se produce por la presencia de saponócidos, compuestos que disminuyen la

tensión superficial del agua. Otorgándoles a las saponinas, la característica de ser tensoactivos naturales [30].

d. Determinación de flavonoides. Ensayo de Shinoda

En esta reacción, el magnesio metálico es oxidado por el HCl concentrado, formando  $H_2$ , este es eliminado en forma de gas y el  $MgCl_2$ , que es responsable de formar complejos con las estructuras de los flavonoides dando coloraciones características. A la vez, el magnesio divalente intensifica la reacción por presentar doble enlace [31].

e. Determinación de compuestos fenólicos y/o Taninos. Ensayo de cloruro Férrico 5%.

Se utiliza para la identificación de taninos, por ser polímeros de polifenoles con 1 a 2% de hidróxidos fenólicos libres. Estos compuestos precipitan en presencia de cloruro férrico. Esta reacción se produce como respuesta a la ruptura del enlace entre el ion cloruro y el hidrogeno del grupo hidroxilo. Dando lugar a la formación del complejo del grupo fenóxido al hierro (color violeta) [27].

f. Determinación de triterpenos y esteroides. Ensayo de Liebermann-Burchard.

Esta reacción es característica en compuestos esteroides que contienen dos dobles enlaces conjugados en un mismo anillo, en dos anillos adyacentes o un doble enlace de un anillo adyacente con un grupo hidroxilo. El cloroformo solubiliza a la muestra favoreciendo la captación de alguna molécula de agua y el ácido sulfúrico, favorece la deficiencia electrónica del anhídrido acético, logrando una estabilización de los electrones en los dobles enlaces, provocando la coloración respectiva [31].

g. Determinación de Quinonas. Ensayo de Borntrager

Las naftoquinonas y antroquinonas libres al ser tratadas con la solución de hidróxido de potasio forman compuestos de color ladrillo [27].

### 3.3.2 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA (TLC)

La cromatografía en capa fina (TLC) es una herramienta que permite la separación de los componentes de una muestra compleja de compuestos. Se basa en el principio de migración de las moléculas a través de una superficie inerte, utilizando como medio de elución solventes de diferente polaridad [32].

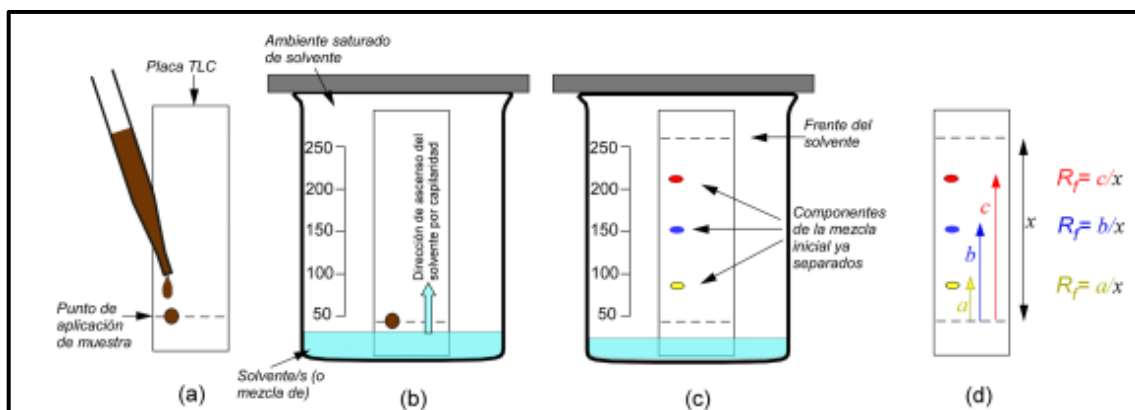
La TLC se ha convertido en una técnica analítica rápida, sencilla y eficaz para determinar el grado de pureza de un analito [32].

#### ***Fundamentos de la TLC***

El fundamento de la técnica se basa en el fenómeno de adsorción. Para lo cual el analito de interés que se encuentra en solución debe ser colocado en una fase estacionaria (placa TLC). Posteriormente, esta es colocada en un volumen determinado de solvente o mezcla de solventes denominada fase móvil. Por capilaridad, se produce un reparto diferencial de los compuestos que están presentes en la muestra. Los componentes que tienen una mayor afinidad por la fase estacionaria se retendrán más y se desplazarán a menor velocidad. Al contrario, las moléculas que dispongan de una menor afinidad se eluirán a más velocidad [32].

Los fragmentos son identificados en forma de bandas en la placa TLC, y su ubicación es determinada con el uso de luz ultravioleta o la aplicación de reactivos químicos denominados como reveladores [32].

Figura 1: Técnica para el desarrollo de Cromatografía en capa Fina (TLC)



Fuente: La cromatografía en capa fina: una alternativa vigente en la industria farmacéutica, 2019 [32].

Para la correcta interpretación de los resultados, se realiza una comparación de las posiciones de las bandas identificadas con respecto a sustancias estándar de referencia y con el cálculo de factores de retención ( $R_f$ ). Este factor relaciona la distancia recorrida por un determinado compuesto frente a la distancia de traslado del disolvente [32].

El valor de  $R_f$  depende de dos variables experimentales. En primer lugar, a la fase estacionaria, en la que se debe considerar la calidad del adsorbente, así como la distribución y el tamaño de las moléculas del analito. Uno de los materiales para la fase estacionaria, es la sílica gel, siendo esta la más empleada ya que permite la separación de grupos esteroides, aminoácidos, alcoholes, hidrocarburos, lípidos, aflatoxinas, vitaminas y alcaloides [33]. Es importante recordar que la polaridad de los principales grupos funcionales de los metabolitos secundarios se distribuye de la siguiente manera: alcanos < alquenos < hidrocarburos < aromáticos = cloroalcanos < sulfuros < éteres < cetonas = aldehídos = ésteres < alcoholes < amidas < fenoles, aminas y ácidos carboxílicos [34].

El segundo factor para considerar es la fase móvil, la cual puede ser un solvente o una mezcla. La elección de los solventes de trabajo provoca una adecuada separación de los compuestos, ya que otorga una adecuada velocidad de migración de las moléculas en la fase estacionaria, migrando de una menor a una mayor

polaridad. Se recomienda que esto sean de una pureza apropiada, de baja viscosidad y una adecuada miscibilidad. Para esto se cuenta con la escala de Snyder o la serie eluotrópica [34].

Para la interpretación de los resultados se debe siempre considerar que la retención de la muestra es más fuerte cuando la polaridad de la fase estacionaria aumenta y la polaridad de la fase móvil disminuye [34]

### 3.3.3 TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES

Esta técnica permite la separación y análisis de mezclas de sustancias volátiles. Dentro de las técnicas de cromatografía, la cromatografía de gases (CG) es una de las más utilizadas por la sensibilidad de análisis de compuestos volátiles. Es importante mencionar que los límites para su utilización, se ven establecidos por la estabilidad térmica de los analitos [35] [36] .

Por ello se debe considerar muestras cuyos componentes tengan pesos moleculares inferiores a 1000 con una temperatura máxima de trabajo de aproximadamente 400 °C [36].

Para su operación, se inyecta un volumen determinado de analito a separar en una corriente de gas inerte a elevada temperatura; este flujo atraviesa una columna cromatográfica que separa los compuestos de la mezcla, utilizando un mecanismo de partición (cromatografía gas líquido), de adsorción (cromatografía gas sólido) o, en ciertos casos una combinación de los mismos [36].

Una vez que los componentes se han separado, los dispositivos del equipo permiten realizar lecturas de las columnas detectadas por el sistema y que van emergiendo a intervalos discretos [36] [37].

La selección de los elementos para el trabajo con la técnica de cromatografía de gases es crucial para los resultados, por ello se recomienda tener en cuenta lo siguiente [37]:

- a. La selección de la columna.

b. La naturaleza y velocidad del gas portador.

Para la elección del gas portador, se debe considerar los requerimientos del equipo y la rapidez de los resultados del análisis. Para el caso, de la elección de la velocidad, esta debe ser la velocidad lineal del gas [36] [37].

c. Temperatura del detector.

Para elegir la temperatura, se debe considerar que esta siempre sea más elevada que la máxima temperatura de trabajo a que se someta la columna, esto se debe considerar para que no se produzca condensación de compuestos de baja volatilidad en el detector [37].

d. Temperatura de inyección.

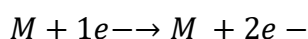
La temperatura de inyección debe ser lo suficientemente elevada para que garantice la volatilización de todos los componentes de la muestra. Sin embargo, se debe manejar con cuidado para evitar la descomposición del analito [37].

### 3.3.4 TÉCNICA DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Corresponde a un método analítico que permite determinar la estructura de las especies moleculares de acuerdo a su masa. En la actualidad se aplica para conocer la masa molecular de una sustancia y con ello determinar la fórmula molecular. También, se aplica para detectar abundancias isotópicas de elementos particulares, entre otros [38] [39] [40].

Para cumplir estos propósitos se emplea un espectrómetro de masas. Este cuenta con una cámara de vacío, donde el analito se vaporiza. Este gas de la muestra ingresa a una cámara de ionización donde interactúa con un campo eléctrico de un potencial en 10 y 20 kV. La colisión de electrones, ocasionado por el campo contra las moléculas, genera su ionización (cationes-radicales), de acuerdo a la fórmula [38] [39]:

### Ecuación 1: Fórmula ionización de cationes-radicales



Considerando la energía suministrada, ciertos iones experimentan fragmentaciones, originando nuevos iones. Al término del proceso, el campo magnético variable curva las trayectorias de las especies cargadas, de acuerdo a relación masa/carga ( $m/z$ ) y un detector es el encargado de dar a conocer el punto de colisiones, así como el número de las mismas. Generando una gráfica de la abundancia relativa frente a  $m/z$  [38] [39].

En términos generales, se debe tener presente conceptos que permiten una correcta identificación de los resultados. Uno de estos es el de pico base, mismo que corresponde al de mayor abundancia relativa y es el resultado del fragmento que tiene una mayor probabilidad para formarse [38] [39]. Otro término muy importante es el de ión molecular, el cual suele ser el pico de mayor masa y debe cumplir la regla del nitrógeno. La abundancia relativa de este ión molecular está relacionada con la estructura de la molécula, así como con la energía que se aplicó en el proceso de ionización [38]. Por ejemplo, las moléculas que son ramificadas, suelen fragmentarse con mayor facilidad y presentan un pico molecular débil. Por el contrario, moléculas sin mayor cantidad de ramificaciones evidencian picos moleculares intensos [38] [39].

En esta técnica analítica se debe tener presente la relación  $m/z$  del ión molecular porque este coincide con la masa molecular del compuesto [38] [39].

### *3.4 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS VEGETALES*

Un compuesto antioxidante se define como una molécula con la característica de prevenir o disminuir el proceso oxidativo de otras moléculas, principalmente de moléculas denominados como “radicales libres”. Los llamados radicales libres, son especies químicas independientes altamente reactivos que por su distribución

electrónica presentan uno o más electrones libres en su capa electrónica externa, siendo propensos a formar parte de reacciones oxidativas [41]. En su fórmula se identifican con un ( $\bullet$ ). Tienen la capacidad de compartir el electrón libre o atraer un electrón de otra molécula de radical libre y formar un par electrónico, ocasionado así, una cadena de reacciones. Los radicales libres se encuentran en una gran variedad de elementos biológicos como el oxígeno, hidrógeno, carbono y nitrógeno [42].

Las moléculas antioxidantes, comparten un electrón o captan grupos reactivos como el oxígeno. Esta conjugación de electrones y/o grupos con los radicales libres, permite generar una protección al organismo del deterioro celular y por ende del envejecimiento prematuro.

El estudio de los extractos vegetales, ha proporcionado evidencia sobre la actividad antioxidante de metabolitos secundarios como polifenoles (flavonoides, taninos y ácidos fenólicos) por la capacidad de formar complejos por procesos de donación o captura de electrones de los radicales libres. En el caso de vitaminas como la C y E, presentes en frutas y semillas respectivamente, estas tienden a neutralizar las moléculas oxidantes en medio acuoso o graso [41].

La literatura describe técnicas para el estudio de la capacidad antioxidante de los compuestos, entre los que se puede mencionar a pruebas que identifican la transferencia de un átomo de hidrogeno, como: Prueba de la capacidad de absorción del radical oxígeno (ORAC), reacción total del potencial antioxidante (TRAP) y capacidad total de eliminación de antioxidantes (TOSC) [43]

Además, de lo mencionado, los ensayos que permiten determinar la transferencia de dos átomos de hidrogeno y un electrón, son de gran utilidad. En esta categoría se incluyen los ensayos de: 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolines-6-sulfonic acid) ABTS, y la prueba de 2,2-di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl DPPH [43].

Todos estos métodos tienen como fundamento las reacciones químicas de los sustratos, y la evaluación de la cinética a través de la espectrofotometría. Ya que

este tipo de reacciones tienen la característica de generar soluciones coloreadas que pueden ser medidos a una longitud específica [43].

### 3.4.1 PRUEBA DE DPPH (2,2-DI(4-TERT-OCTYLPHENYL)-1-PICRYLHYDRAZYL)

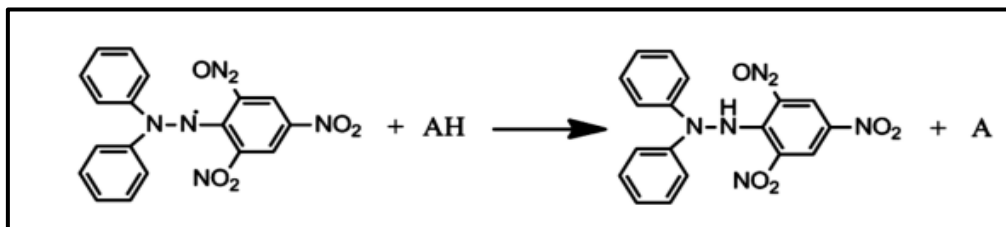
El compuesto DPPH, en su forma monomérica es considerado como un radical libre tanto en estado sólido, así como en solución, de color violeta oscuro. La molécula en su estructura presenta grupos fenilo unidos a un anillo de benceno, con un grupo nitro (-NO<sub>2</sub>) y un grupo azo (-N=N-) también incluidos en el anillo bencénico [44].

Presenta un electrón desapareado, ocasionando que sea altamente reactivo y propenso a aceptar electrones de sustratos que donen electrones, como las moléculas antioxidantes que se encuentren en una muestra determinada. Al recibir el electrón, el DPPH se reduce (estabilizando así al radical libre) y el color violeta característico cambia, por la reducción del compuesto. Este resultado en la reacción, es cuantificada por la técnica espectrofotométrica a una longitud de onda específica de 517 nm [45] [44] .

La reacción está formada por un agente reductor, que corresponde al analito, este dona un electrón al radical libre del DPPH. Formando un compuesto reducido y un radical del analito (Figura 2) [45].

Cuanto mayor sea la capacidad antioxidante del analito, mayor será la reducción del DPPH y, por lo tanto, se evidenciará la disminución en la absorbancia [44] [45].

Figura 2: Reacción antioxidante del radical libre de la molécula DPPH y el analito



Fuente: Munteanu, I., Apetrei, C. (2021)

### 3.5 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS VEGETALES

En la última década se han realizado varias investigaciones, donde se evidencia que los extractos de especies vegetales pueden ejercer una actividad antimicrobiana. Esta característica, ha sido atribuida a la presencia de metabolitos secundarios como los fenoles y flavonoides [46].

Los compuestos fenólicos provocan una ruptura en la membrana celular, disminuyendo la actividad enzimática bacteriana y alterando la síntesis de proteínas. Además, los fenoles pueden intervenir en la formación de puentes disulfuro, así como en el intercalamiento con la pared celular y/o ADN bacteriano [46].

En el caso de los flavonoides, las flavononas son las que ejercen mayor inhibición en el desarrollo bacteriano, ya que impiden la duplicación bacteriana. Esto se debe a la disposición de los dobles enlaces de sus átomos de carbono (C-2 / C-3) y el número de grupos hidroxilos (-OH) y metoxilo (-O-CH<sub>3</sub>) [47].

Según, Modak B et al (2002), en su investigación con los flavonoides presentes en los exudados resinosos de *Heliotropium sinuatum*, determinaron que, para ejercer una actividad antimicrobiana, las flavononas deben tener un grupo -OH y un nivel medio de lipofilicidad. Esto crea un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, por la generación de acidez del grupo hidroxilo [47]. Provocando un exceso de protones en la membrana mitocondrial alterando el transporte electrónico adecuado para la formación de ATP. Por lo tanto, fenoles y flavonoides, actúan como eficientes desacopladores, al transferir más protones por molécula, alterando la membrana citoplasmática bacteriana [47].

Estas investigaciones, permiten visualizar a los extractos vegetales como una herramienta frente a la resistencia de los microorganismos a los antibióticos [48].

Este fenómeno de resistencia a los antibióticos, se ve potenciado por el inadecuado consumo de los fármacos por los pacientes. Así como, por el medio ambiente, ya que en recientes investigaciones se ha podido corroborar que los antibióticos suministrados a los animales de consumo en la dieta diaria, suministran trazas de antibióticos al organismo de los consumidores [49].

### 3.5.1 CAPACIDAD BACTERICIDA: GENERALIDADES

Para determinar la capacidad bactericida de los compuestos antimicrobianos se utilizan tres métodos [48] [49]:

- a. Concentración mínima bactericida (CMB)
- b. Curva de letalidad
- c. Actividad bactericida del suero

#### ***Concentración mínima bactericida (CMB)***

Este método permite determinar la menor concentración a la que un antimicrobiano es capaz de eliminar una cepa bacteriana, utilizando los procedimientos de macrodilución en tubo o microdilución en placa. El fundamento de estas técnicas permite determinar la CMB, así como la concentración mínima inhibitoria (CMI) [48] [49].

Por investigaciones se puede indicar que los valores de CMB y CMI en los antibióticos considerados como bactericidas son similares. Sin embargo, existen casos en que esto no ocurre, por lo cual se han planteado dos fenómenos [48]:

- a. Fenómeno paradójico o de Eagle: Este se presenta cuando un número considerable de bacterias sobrevive a concentraciones superiores a la CMB. En tratamientos médicos este fenómeno no marca trascendencia [48].
- b. Fenómeno de tolerancia: Se evidencia una disminución o desaparición de la capacidad de un antibiótico bactericida sobre una determinada cepa. En casos clínicos se recomienda asociar este antimicrobiano con otro antimicrobiano para potenciar su función [48].

- c. Fenómeno de persistencia: Este se presenta cuando existe una pequeña población bacteriana la cual muestra resistencia a la acción bactericida. El recuento suele ser menor del 0.1% y por esto, la definición de CMB se refiere a la muerte del 99.9% del inóculo [48].

### 3.5.2 MÉTODOS DE MICRODILUCIÓN EN CALDO

El método de dilución en agar o en caldo son pruebas para evaluar la susceptibilidad microbiana y permiten determinar la concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de incubar por 24 horas, y la (CMB) como la concentración más baja que puede prevenir el crecimiento de un organismo después de subcultivar en un medio libre del compuesto evaluado [50] [51] [52].

Para la microdilución en caldo se utilizan microplacas que contienen concentraciones crecientes del extracto vegetal. El microorganismo en estudio es inoculado en los pozos de las microplacas y la MIC es determinada terminado el periodo de incubación [50] [53].

Cuando se trabaja con productos naturales, utilizar el método de microdilución tiene la ventaja de aumentar la sensibilidad para cantidades pequeñas de la muestra. Además, permite diferenciar entre un efecto bactericida o bacteriostático [53].

### 3.5.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA

La MIC se ha establecido como la técnica más empleada para la cuantificación de la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana, ya que, además, permite confirmar resistencias inusuales [50] [53].

Para el desarrollo de la técnica se utiliza placas de 96 pocillos, en cada pocillo se evalúa la acción *in vitro* de las sustancias antimicrobianas en las diferentes

diluciones frente a determinadas cepas bacterianas. Las placas deben sellarse e incubar a 35 °C por un periodo de 18 a 20 horas. Para los resultados, se analiza la turbidez o se añade bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). Las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución a formazán, evidenciándose de esta forma la actividad metabólica [50] [53].

El MTT, permite visualizar la actividad de la enzima deshidrogenada, la cual remueve el hidrogeno del sustrato y lo transfiere al aceptor de hidrógenos, generalmente una coenzima. De esta coenzima, se transfiere al MTT, provocando la generación de un compuesto reducido que presenta un color intenso llamado formazán. El formazán absorbe a una longitud de onda de 550 a 570 nm [50] [53].

### 3.5.4 TÉCNICA DE TLC- BIOAUTOGRAFÍA

En los últimos años, la ciencia usa herramientas que permiten una detección precisa de moléculas que presentan actividad biológica, principalmente de fuentes naturales por su alto contenido de metabolitos secundarios con esta característica [54].

La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica eficiente que permite la separación de compuestos naturales, que se encuentran en matrices vegetales. TLC-Bioautografía, se presenta actualmente como un ensayo eficiente para la caracterización de los compuestos y la identificación de su actividad biológica, permitiendo el descubrimiento de nuevas drogas. Posterior a la verificación de la actividad biológica, los fragmentos aislados pueden ser identificados fuera de la placa cromatográfica por un acoplamiento a la espectrometría de masas [54].

La técnica consiste en la preparación de la placa TLC, matriz que permite la elución de los compuestos de acuerdo a la polaridad que presentan frente a una determinada fase móvil. La placa se pone en contacto con una suspensión de microorganismos o con un sistema enzimático que presente sensibilidad a la actividad biológica que se desea identificar. Posterior a lo mencionado, se debe incubarse a temperatura y periodo de acuerdo a las necesidades del microorganismo.

Este periodo es crucial para una correcta interacción entre los diferentes fragmentos de la placa y las bacterias [55].

Para la evaluación de los resultados, se debe evidenciar áreas de inhibición del crecimiento bacteriano (cambios de color) indicando la presencia de compuestos bioactivos en la muestra. Estos fragmentos, pueden ser purificados para ser identificados molecularmente por espectroscopía de masas [55].

## 4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

### 4.1 MATERIAL VEGETAL

Las hojas de Trinitaria (*Otholobium mexicanum*), fueron recolectadas en la rivera del río Pita de la ciudad de Sangolquí, Cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha (02°19'S 78°25'O), a una altura de 2500 msnm. Durante el mes de enero del 2023.

La identificación de la muestra fue realizada por el Dr. Marco Cerna, docente de unidad de posgrados y responsable del herbario de la Universidad Politécnica Salesiana (UPS), el material vegetal reposa en el herbario de Facultad de Ingeniería en Biotecnología de la UPS con número de herbario 3899 colección 1.

Figura 3: Especie vegetal Trinitaria



Fuente: G. Diaz (2023)

El material vegetal fue secado a temperatura ambiente (18 °C- 22°C) durante 8 días en hojas de papel absorbente. Terminado el periodo de secado, las hojas se

molieron manualmente. Se almacenaron a condiciones ambientales normales (22 °C y 70 %HR) evitando el contacto directo con la luz.

## *4.2 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES DE TRINITARIA*

20g de muestra seca y molida de hojas, se maceraron con tres solventes de polaridad ascendente, Acetato de etilo (D1), Etanol (D2) y Etanol: Agua (D3). Conservando una relación 1:10 planta: solvente.

Se realizó un proceso de maceración mixta. Se alternaron tres periodos de 45 minutos con maceración estática, en conjunto con periodos de agitación de 5 minutos, por solvente. Posteriormente, se ejecutaron tres filtraciones utilizando papel filtro, para la separación del material vegetal e impurezas. Obteniendo un volumen de 100 mL (D1), 150 mL (D2) y 130 mL (D3).

Para la concentración de los extractos vegetales, se utilizó el equipo rotavapor HB 10 BASIC a 50 revoluciones por minuto (rpm). Las condiciones de presión atmosférica, temperatura y tiempo de separación del solvente variaron de acuerdo al solvente utilizado en el proceso de extracción.

## *4.3 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE EXTRACTOS VEGETALES*

Se realizó una marcha fitoquímica cualitativa en los tres extractos D1, D2 y D3 de Trinitaria (*Otholobium mexicanum*), para determinar el extracto con mayor presencia de metabolitos secundarios. Para lo cual se utilizó los ensayos de Dragendorff, Mayer, Fehling, Lieberman-Burchard, Espuma, Borntrager, Shinoda y Cloruro férrico. Para todas las pruebas se utilizó 1 mL de muestra.

#### 4.4 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Para el desarrollo de esta técnica analítica, se utilizaron placas HPTLC (10 x 10 de sílica gel 60 F254, Merk, Darmstadt, Germany). Se realizaron diluciones en una relación 1:1 y 1:4 de los extractos D1 y D2. Para la siembra de los extractos en la placa de HPTLC, se utilizó el equipo marca CAMAG, modelo Linomat 5, con un volumen de inyección de 6 µL por cada dilución de los extractos vegetales.

Se prepararon 50 mL de fase móvil con los solventes Hexano: acetato de etilo en una proporción 4:1. Este volumen se colocó en una cámara de cromatografía. Posteriormente se colocó la placa cromatográfica. Tras la corrida, se retiró la placa de sílicagel y se llevó a la lámpara de luz UV para evaluar la separación de los fragmentos, mediante el cálculo de  $R_f$ , utilizando la siguiente ecuación.

Ecuación 2: Fórmula para cálculo de factor de retención  $R_f$

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}}{\text{Distancia recorrida por la muestra}}$$

#### 4.5 ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR ENSAYO DPPH DE EXTRACTOS OTHOLOBIUM MEXICANUM

Para la preparación de la solución DPPH se peso 40 mg del reactivo y se disolvió en 100 mL de etanol al 96%, se colocó en un lugar protegido de la luz por 30 minutos antes de su uso. Se utilizaron los extractos D1 y D2 en una dilución 1:1. Se utilizó esta proporción ya que reveló una mejor definición de los fragmentos tras la aplicación de la técnica de cromatografía en capa fina.

Posteriormente, se tomo 100 µL de cada extracto y se disolvieron en 900 µL de etanol absoluto (99,9% de pureza). Como control positivo, se utilizó el ácido ascórbico a una concentración de 1000 ppm.

Se utilizó una microplaca de 96 pocillos. Se colocaron volúmenes de 15, 20, 30, 50, 80, 100 y 120  $\mu\text{L}$  de cada extracto vegetal (D1 y D2). Para el control positivo se utilizaron los volúmenes de 5, 15, 20, 30, 50, 80, 100 y 120  $\mu\text{L}$ . Se añadió el reactivo DPPH a cada pocillo hasta completar los 200  $\mu\text{L}$  por pocillo. Se realizaron tres repeticiones para cada dilución.

Figura 4: Esquema de distribución en microplaca para ensayo con DPPH

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	15 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	120 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$					D1	
B														
C														
D	15 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	120 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$					D2	
E														
F														
G	0 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	15 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	30 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	120 $\mu\text{L}$	150 $\mu\text{L}$			Control Bn	
H														
I														

Fuente: G.Diaz (2023)

La placa se sometió a agitación utilizando una mesa agitadora orbital marca TECNAL TE-141, a 54 rpm, por 30 minutos, protegida de la luz. La lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 517 nm por espectrofotometría UV/VIS del equipo BIOTEK microplates, modelo EPOCH.

Para determinar el porcentaje de inhibición de DPPH, se utilizó la siguientes ecuación:

Ecuación 3: Fórmula para cálculo de % de inhibición DPPH

$$\% \text{ inhibición DPPH} = ((Abs \text{ blanco} - Abs \text{ muestra}) / (Abs \text{ blanco})) \times 100$$

## 4.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *OTHOLOBIUM* *MEXICANUM*

### 4.6.1 PREPARACIÓN DE CULTIVOS BACTERIANOS

Las cepas utilizadas para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de Trinitaria, fueron: *Escherichia coli* ATCC 65380 y *Staphylococcus aureus* ATCC 8739 (provistas por el laboratorio de Ingeniería en Biotecnología de la UPS).

Las bacterias se subcultivaron en placas petri utilizando el medio de cultivo Trypticase Soy Agar (TSA) para *Staphylococcus aureus* ATCC 8739 y agar nutriente para *Escherichia coli* ATCC 65380. Las placas se incubaron por 24 horas a 37°C en una marca MEMMERT.

Para realizar el ajuste de cultivo microbiano a escala de Mac Farland específica de 0,5; se tomó una muestra del inóculo de *Escherichia coli* ATCC 65380 y de *Staphylococcus aureus* ATCC 8739. Cada cepa se sembró en 9 mL caldo Muller Hinton. Se incubaron por 24 horas a 35°C. Transcurrido el periodo de incubación, se tomó 1 mL de cada cultivo, se sometió a centrifugación en microcentrífuga 5420 Eppendorf, a 10 000 rpm por 10 minutos. El pellet se resuspendió en solución salina estéril.

Se utilizó el espectrofotómetro UV-Vis para alcanzar una absorbancia de 0,2 a una longitud de onda de 625 nm. Asegurando una concentración bacteriana de 0,5 en escala Mac Farland.

#### 4.6.2 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CIM) Y LA CONCENTRACIÓN BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) DE LOS EXTRACTOS VEGETALES D1 Y D2 DE TRINITARIA (*OTHOLOBIUM MEXICANUM*)

Para la determinación de la CIM de las bacterias *Escherichia coli* ATCC 65380 y *Staphylococcus aureus* ATCC 8739, se empleó el ensayo de microdilución de caldo en placa de poliestireno de alta transparencia de 96 pocillos.

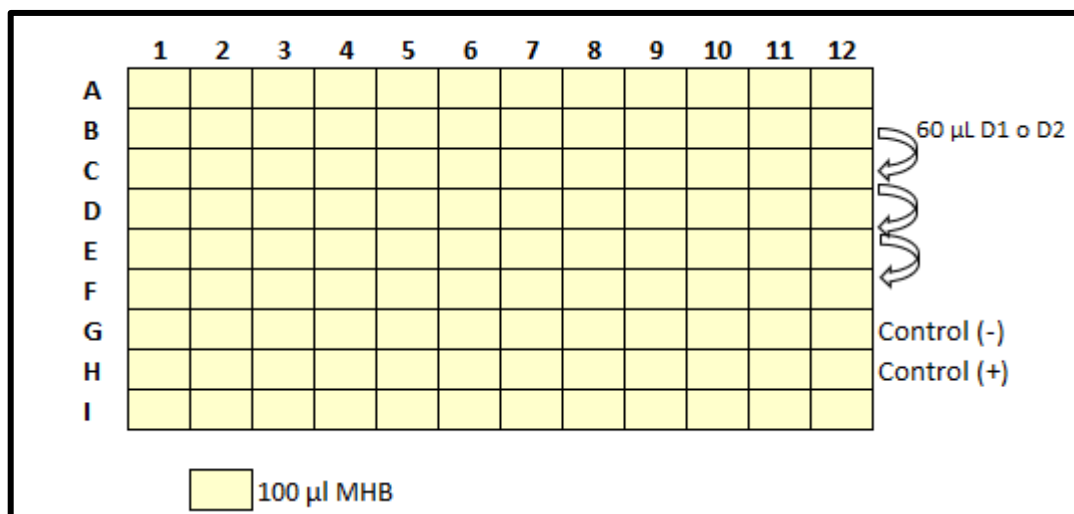
##### **Microdilución en caldo**

Se colocó 100  $\mu$ L de caldo Muller Hinton, en todos los pocillos de la microplaca, utilizando una micropipeta multicanal de 8 canales.

- En la Fila B desde el pocillo 1 al pocillo 12 se colocó 60  $\mu$ L del extracto vegetal de Trinitaria. Se homogenizó las muestras y con el uso de una micropipeta multicanal, se realizaron diluciones seriadas, tomando 100  $\mu$ L de los doce pocillos de la Fila B y colocando en la Fila C. El procedimiento se repitió para las filas D y E.
- En la Fila G desde el pocillo 1 al pocillo 12 se colocó 40  $\mu$ L del antibiótico Gentamicina 160 mg.
- La Fila H se utilizó para colocar el control negativo.
- En cada pocillo de las Filas B a la Fila H se colocó 20  $\mu$ L de los microorganismos ajustados a 0,5 en escala Mac Farland.

El esquema detallado se utilizó para los extractos de Trinitaria de D1 y D2 a una dilución de 1:1. Para cada una de las bacterias *Escherichia coli* ATCC 65380 y de *Staphylococcus aureus* ATCC 8739.

Figura 5: Esquema de distribución en microplaca para ensayo de microdilución en caldo



Fuente: G.Diaz (2023)

Una vez finalizado, las microplacas fueron incubadas con agitación en una incubadora marca TE-4200/1, a 37°C., por un periodo de 24 para la bacteria *Escherichia coli* ATCC 65380 y por 48 horas para la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 8739, a una temperatura de 37°C.

Transcurrido el periodo de incubación de las microplacas, se colocó 20 µL de reactivo tetrazolium salt (TTS) a una concentración de 2%. Se colocaron las placas en agitación por 45 minutos a 2500 rpm. Finalmente, se realizó una lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 405 nm, en el equipo BIOTEK microplates, modelo EPOCH utilizando el software Gen5 3.11.

Al finalizar se verificó el cambio de coloración de los pocillos. Las lecturas de las absorbancias en el equipo Microplate serán utilizadas para el análisis estadístico.

Para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano en presencia de los extractos vegetales y del antibiótico comerciales se utilizó la siguiente ecuación.

Ecuación 4: Fórmula para cálculo de porcentaje de Inhición en ensayo por DPPH

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{Ab (\text{blanco}) - Ab (\text{muestra})}{Ab (\text{blanco})} \times 100$$

Donde:

Ab (blanco): Absorbancia Blanco

Ab (muestra): Absorbancia de la muestra obtenida.

### 4.6.3 BIOAUTOGRAFÍA POR CONTACTO PLACA TLC

Para el desarrollo de la técnica, previamente se realizó la siembra de los extractos de Trinitaria D1 y D2 a una dilución 1:1, en dos placas HPTLC (10 x 10 de silica gel 60 F254, Merk, Darmstadt, Germany). Siguiendo la metodología descrita en el punto 4.4 y por duplicado.

En un frasco Boeco de 250 mL se colocó 100 mL del medio de cultivo Mueller-Hinton agar, se añadió 500 µL de las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 8739 ajustada a escala 0,5 Mac Farlan. Para el inóculo estandarizado de la bacteria *Escherichia coli* ATCC 65380 se tomó 500 µL y se colocó en 100 mL agar nutritivo.

A cada preparación se añadió 250 µL del indicador TTC al 1% y se mantuvo a constante agitación.

Cada placa cromatográfica TLC, con la separación de los componentes de los extractos D1 y D2, se colocaron por separado en cajas petri de 12 cm. Posteriormente, para para el desarrollo de la técnica de superposición de agar; se vertió la solución preparada de las bacterias en cada placa.

Las placas se refrigeraron por 1 hora a 4°C y se incubaron por 24 horas para *Escherichia coli* ATCC 65380 y 48 horas para *Staphylococcus aureus* ATCC 8739 a 37°C en la incubadora MEMMERT.

#### 4.6.4 IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

Tras la identificación de fragmentos con actividad biológica en la técnica de bioautografía. Se realiza un raspado de estas zonas y se coloca 1 mL de metanol. Se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos. El pellet obtenido se reconstituyó en 1 mL de metanol.

Se utilizó el equipo de cromatografía, modelo 3900. Los componentes fueron identificados con la base de datos NIST 2001, la evaluación de los tiempos de retención teóricos se comparó con la base de datos Adams 2009, y el cálculo experimental de los índices de retención en comparación con una serie de C8-C30 de alcanos.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS VEGETALES

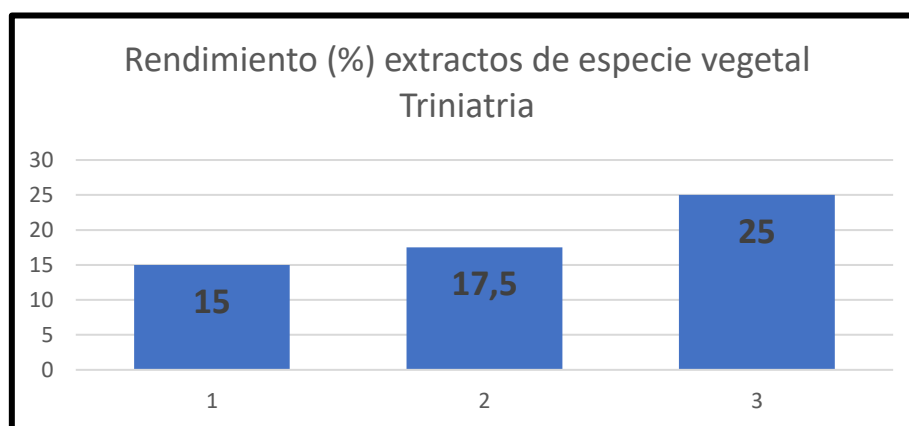
En la Tabla 3, se presentan los resultados del rendimiento de los extractos de Trinitaria (*Otholobium mexicanum*), tomando en cuenta el peso de muestra del material vegetal.

Tabla 3: Rendimiento de los extractos vegetales de *Otholobium mexicanum*-Trinitaria

Solventes utilizados para proceso de extracción	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Rendimiento (%)
D1 Acetato de etilo	20	3	15
D2 Etanol		3,5	17,5
Etanol: Agua D3		5	25

Fuente: G.Diaz (2023)

Gráfico. 1: Gráfico comparativo de los rendimientos de los extractos de Trinitaria (*Otholobium mexicanum*).



Fuente: G.Díaz (2023)

La combinación de solventes Etanol: agua (3:1) D3 y Etanol (D2) presentaron el mayor porcentaje de rendimiento 25% y 17,5% respectivamente, en relación solvente-peso del material vegetal utilizado.

Esto se debe a que la combinación de las moléculas polares etanol y agua en solución, provoca que la característica de polaridad de estos solventes se intensifique, ya que los átomos de hidrógeno del grupo hidróxilo (-OH) del etanol forman puentes hidrógeno con los átomos de oxígeno del agua. Ocasionando, que en contacto con matrices vegetales que tienen compuestos polares, su extracción se vuelve más eficiente. Alcanzando rendimientos considerablemente más altos en relación al uso de otros solventes [56].

## 5.2. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

En la Tabla 4, se presentan los resultados de los obtenidos en el tamizado fitoquímico de los extractos purificados D1, D2 y D3 de Trinitaria.

Tabla 4: Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos vegetales de Trinitaria *Otholobium mexicanum*.

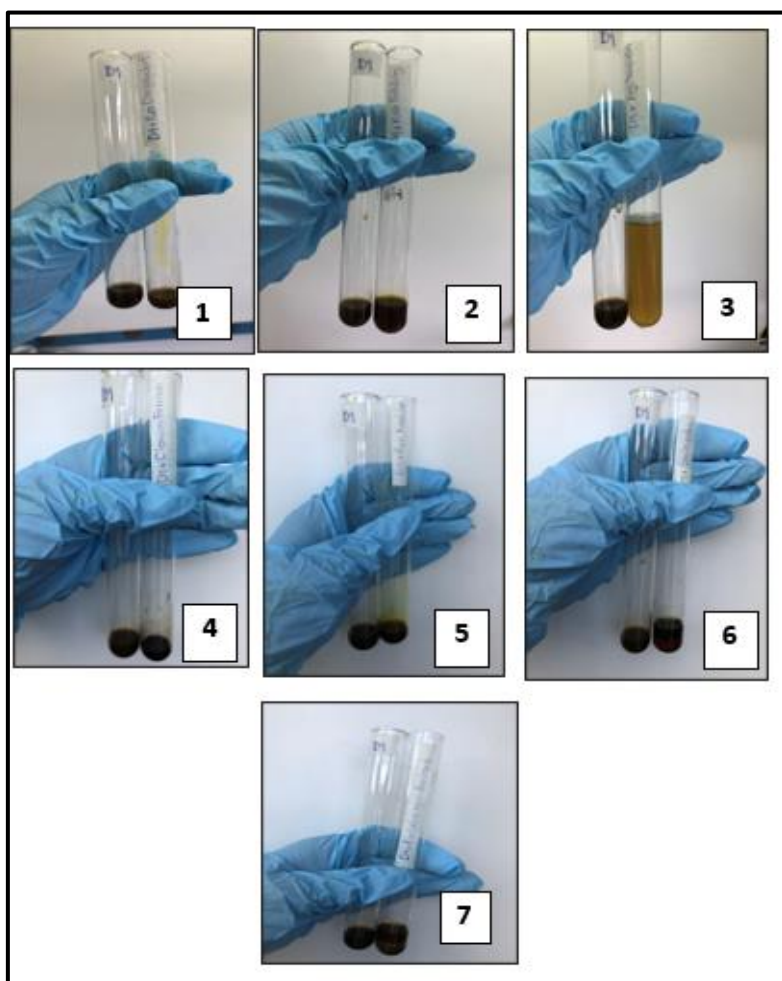
Extracto	Ensayo Metabolito						
	Dragendorff	Fehling	Espuma	Lieberman-Burchard	Borntrager	Shinoda	Cloruro férrico
	<i>Alcaloides</i>	<i>Azúcares reductores</i>	<i>Saponinas</i>	<i>Triterpenoides esteroides</i>	<i>Naftoquinonas, Antraquinonas y antronas</i>	<i>Flavonoides</i>	<i>Taninos</i>
<b>D1</b>	-	++ pp (rojo)	+++	-	++	+	+
<b>D2</b>	-	+++ pp (rojo)	+	+ pp (azul verdoso)	+++	+++	+
<b>D3</b>	-	+++ pp (rojo)	+++	-	+	+	+

Resultados: (+++) abundante; (++) moderado; (+) leve; (-) negative, pp (precipitado)

Fuente: G.Diaz (2023)

Los resultados de tamizaje fitoquímico, sugieren que los extractos con mayor presencia de metabolitos secundarios fueron D1 y D2. Donde se evidencia compuestos como azúcares reductores, saponinas, naftoquinonas, antraquinonas, antronas, flavonoides y taninos. En general, estos solventes tienen la capacidad de extraer compuestos polares y no polares.

Figura 6: Metabolitos secundarios extracto Trinitaria D1: 1. Dragendorff 2. Fehling 3. Espuma 4. Cloruro férrico 5. Borntrager 6. Shinoda 7. Lieberman-Burchard



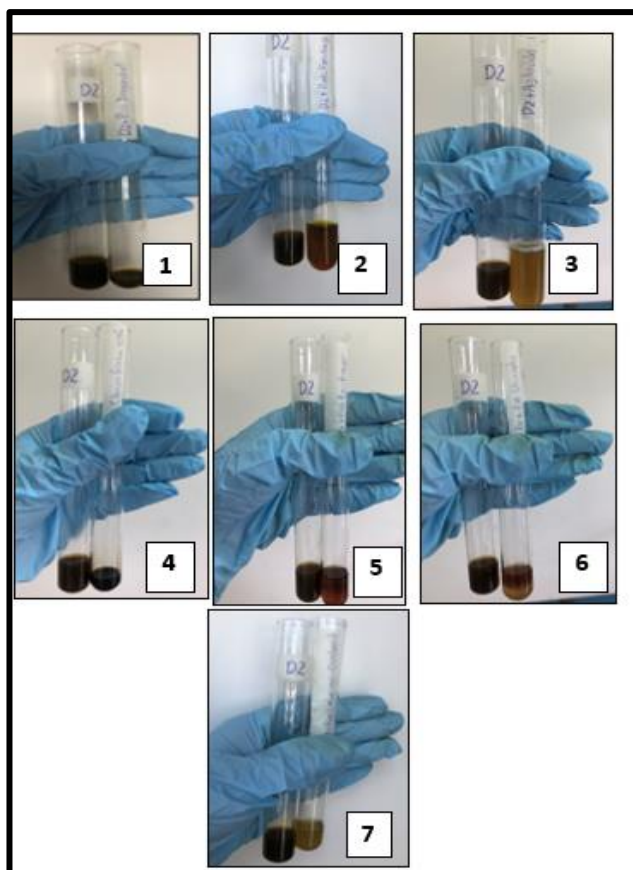
Fuente: G. Diaz (2023)

Proporcionando de esta manera porcentajes mas altos de estos compuestos en los extractos hidroalcohólicos [57]. Sin embargo, se debe mencionar que el acetato de etilo (EtOH) al ser un solvente de polaridad moderada y con actividad intermedia entre moléculas polares y apolares, permitió la extracción de una amplia variedad de compuestos [58].

El tamizaje fitoquímico, para la determinación del grupo de los alcaloides, a través del ensayo de Dragendorff, no fue positiva (no se detectarán cambios de coloración en el ensayo de ninguno de los solventes), corroborando la ausencia de este grupo de metabolitos secundarios [12]. Al aplicar, la prueba de Lieberman-Burchard se forma un

precipitado azul verdoso en el extracto D2, determinándose una respuesta leve para la presencia de triterpenoides esteroides.

Figura 7: Metabolitos secundarios extracto Trinitaria D1: 1. Dragendorff 2. Fehling 3. Espuma 4. Cloruro férrico 5. Borntrager 6. Shinoda 7. Lieberman-Burchard



Fuente: G. Diaz (2023)

Los metabolitos secundarios con una respuesta abundante (+++) fueron las saponinas, en los extractos D1 y D2. La presencia de burbujas en la superficie, se evidenció por mas de 2 minutos.

De acuerdo a investigaciones realizadas por Salgorre (2005), en extractos hidroalcohólicos de hojas, de la familia *Otholobium* se evidencia la presencia de taninos, antraquinonas, saponinas, flavonoides, azúcares reductores, triterpenoides y/o esteroides.

Dentro de la Familia Fabacea, no existen mayor información acerca de los metabolitos secundarios para la especie *Otholobium mexicanum*, sin embargo, se reportan estudios para la especie *Otholobium pubescens* J.W.Grimes, donde en el tamizaje fitoquímico de extractos etanólicos de hojas, tallos y flores se encuentran lactonas sesquiterpenos, saponinas, taninos y alcaloides [59].

De igual manera en especies como el garbanzo (*Astragalus garbancillo*) y Taya (*Lupinus sarmmentosus*), pertenecientes a la Familia Fabacea, se menciona la presencia de flavonoides, lactonas, sesquiterpenos, taninos y alcaloides en extractos etanólicos. Lo cual corrobora el perfil fitoquímico obtenido en el presente estudio [59]. Esto se corrobora con los resultados obtenidos.

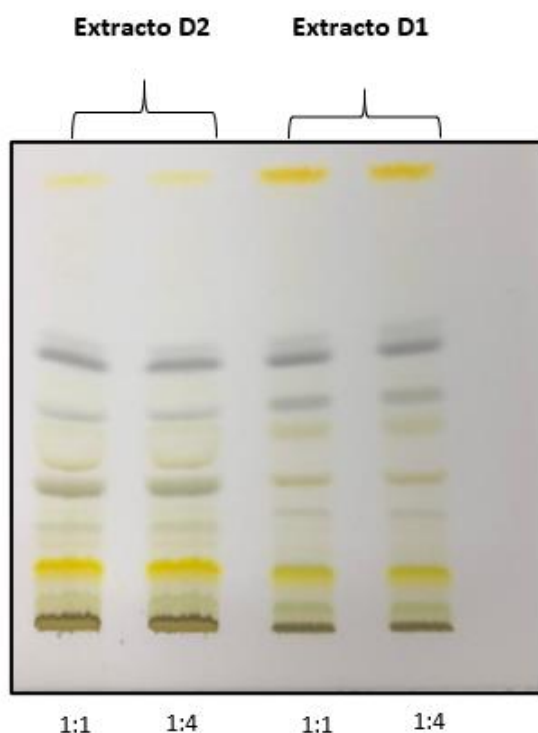
### 5.3 CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA Y DETERMINACIÓN DEL VALOR $R_f$ POR

La técnica de cromatografía en capa fina (TLC) permitió la identificación de 9 fragmentos, los cuales se encuentran tanto en el extracto D1 y D2. Mostrándose visibles a luz UV 254 nm. La dilución, con relación 1:1, fue la que mejor resolución presentó. Esto permitió corroborar la variedad de metabolitos secundarios que se presentaron en el tamizaje fitoquímico.

El valor promedio de  $R_f$  fue de 0,55. Estableciéndose, los siguientes valores de  $R_f$ : 0,15; 0,24;0,31; 0,36; 0,42; 0,54; 0,59; 0,67; 0,70;0,75;0,93. La fase móvil utilizada permitió la elución de compuestos poco polares y de polaridad media, con grupos éteres, aldehidos/cetonas, ésteres, aminos, fenoles y ácidos carboxílicos respectivamente [60].

De acuerdo a investigaciones realizadas, en extractos hidroalcohólicos de la especie *Otholobium mexicanum*, al utilizar la técnica de cromatografía en capa fina se han determinado hasta 22 fracciones [8].

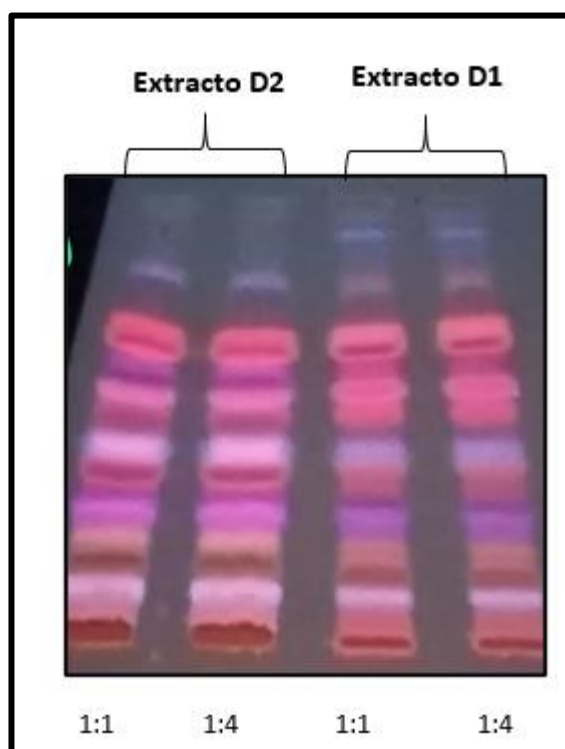
Figura 8: Placa de cromatografía en capa fina para extracto D1 y D2 de *Otholobium mexicanum*.



Fuente: G. Diaz (2023)

Los fragmentos separados, presentaron colores característicos: amarillo ( $R_F=0,24$  y  $R_F=0,93$ ), verde ( $R_F=0,15$ ), gris ( $R_F=0,42$ ,  $R_F=0,59$ ,  $R_F=0,67$ ). Estos colores, de acuerdo a bibliografía, se corresponden a compuestos como los flavonoides (amarillo) y compuestos como la clorofila u otros pigmentos propios de la Trinitaria (verde). Además, con luz UV 254 nm fueron visibles dos fragmentos adicionales ( $R_F=0,70$  y  $R_F=0,75$ ).

Figura 9: Placa de cromatografía en capa fina para extracto D1 y D2 de *Otholobium mexicanum* (luz UV 254 nm)

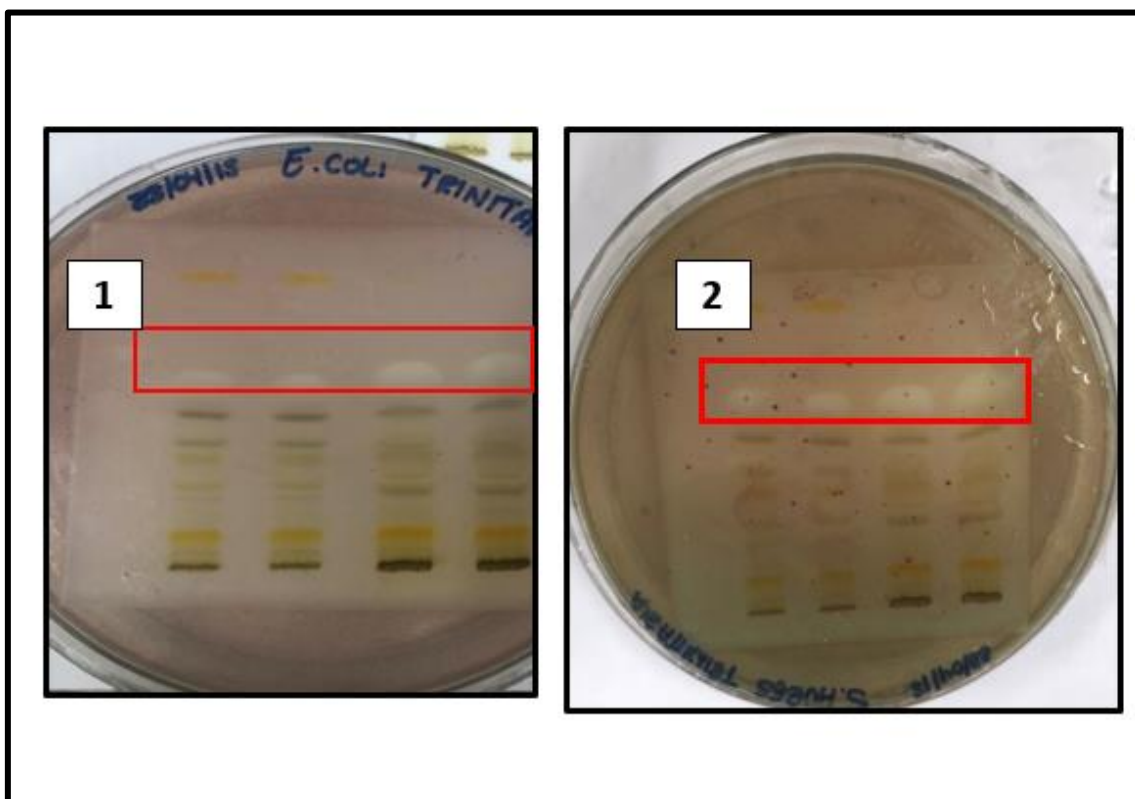


Fuente: G. Diaz (2023)

#### 5.4 BIOAUTOGRAFÍA POR CONTACTO DE PLACA TLC

Los resultados obtenidos permitieron establecer la existencia de compuestos que presentaron actividad biológica para las bacterias *Escherichia coli* ATCC 65380 y *Staphylococcus aureus* ATCC 8739. La zona de inhibición en la placa TLC (zona clara) se presentó en los fragmentos que no presentaron coloración en la placa TLC. Los valores de  $R_f$  estuvieron en el rango entre 0,70 y 0,75 para las dos bacterias. Respecto, al halo de inhibición mostrado para la bacteria *Escherichia coli* ATCC 65380, el extracto D1 mostro un promedio de 11 mm y el extracto D2 4,5 mm. Para la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 8739, se evidenciaron halos de inhibición de 16 mm y 6,5 mm para los extractos D1 y D2 respectivamente. Esto se visualiza en la siguientes Figura 10.

Figura 10: Zona de inhibición bacteriana en placa TLC: (1) *Escherichia coli* ATCC 65380.  
(2) *Staphylococcus aureus* ATCC 8739.



Fuente: G. Diaz (2023)

En estudios realizados en el 2016, con el aceite esencial de *Otholobium pubescens*, frente a las bacterias *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), los resultados indican que la cepa de *S.aureus* es sensible a una concentración del 50% y 100 % del aceite esencial, con halos de inhibición entre 15 y 20 mm. Para la bacteria Gram negativa, no se reporta actividad biológica en ninguno de las concentraciones del estudio [61].

Los fragmentos con zonas activas determinadas en la bioautografía para los extractos D1 y D2 a una dilución 1:1, fueron analizados por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas CG-EM. Determinando la identidad y estructura de los compuestos a través de los perfiles cromatográficos del aceite esencial de los **extractos D1 y D2 de Trinitaria.**

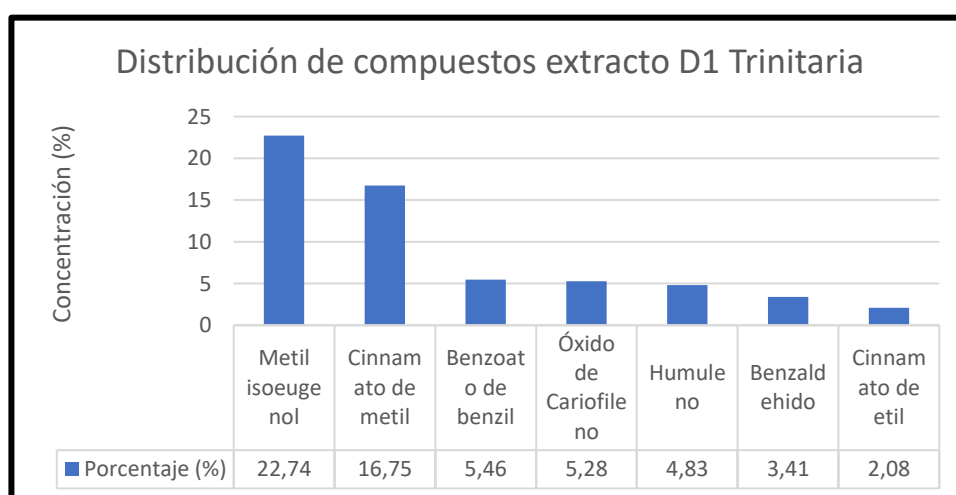
Para el extracto D1, se identificaron los compuestos que se detallan a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5: Perfiles cromatográficos del aceite esencial de los extractos D1 de *Otholobium mexicanum*-Trinitaria.

Nombre de la	Porcentaje	Tiempo de retención	de	Clasificación
Benzaldehido	3,41	4,39		Aldehído
Cinnamato de metilo	16,75	35,48		Éster Fenílico
Cinnamato de etilo	2,08	42,77		Éster Fenílico
Metil isoeugenol	22,74	47,93		Éster metílico
Óxido de Cariofileno	5,28	51,07		Sesquiterpeno
Humuleno	4,83	52,26		Sesquiterpeno
Benzoato de benzil	5,46	57,29		Éster

Fuente: G.Diaz (2023)

Gráfico 2: Distribución de compuestos identificados CG-EM extracto D1 Trinitaria



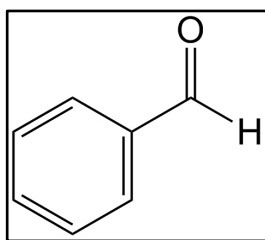
Fuente: G.Diaz (2023)

Los compuestos con mayor porcentaje fueron el metil isoeugenol y Cinnamato de metil con el 22,74% y 16,75%. Los otros compuestos identificados tuvieron una presencia

menor al 10%, distribuidos de la siguiente manera: benzaldehído (3,41%), cinnamato de etil (2,08%), Benzoato de benzil (5,46%), Óxido de Cariofileno (5,28%) y Humuleno (4,83%).

De acuerdo a diversas investigaciones, los compuestos identificados tienen capacidad antibacterial y antioxidantes. Así, el compuestos benzaldehído, por ser parte de la ruta biosintética del ácido fenilpropanoico, tiene la capacidad de formar compuestos como el tiomicarbazona de belzaldehído, el cual ha mostrado efecto sobre la cepa de *Mycobacterium tuberculosis* (bacteria gram positiva), con una concentración mínima inhibitoria (MIC) en un rango de 0,14 -2,2  $\mu\text{M}$  [62]. En las plantas el benzaldehído cumple funciones de defensa para patógenos y hervíboros. También, el grupo aldehído (-CHO) unido al grupo benceno le otorga el olor característico.

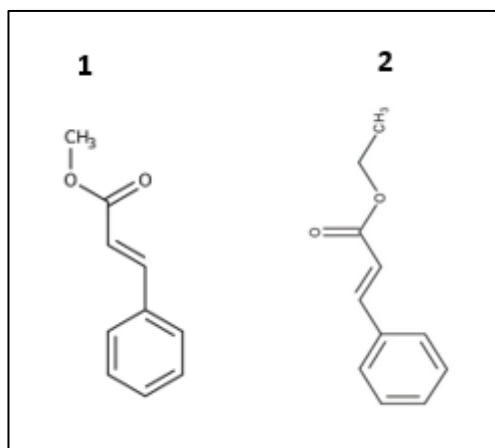
Figura 11: Estructura molecular Benzaldehído



Fuente: The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils, 2013 [63]

Dentro de las funciones biológicas se destacan dos biomoléculas el cinnamato de metilo y cinnamato de etilo. Por estudios in vitro publicados en el 2015, se ha evidenciado un actividad acaricida contra *Psoroptes cuniculi*, con una concentración letal media (LC50) 63,7%, siendo incluso de 2,1 a 8,3 veces mas activos que el medicamento ivermectina [64].

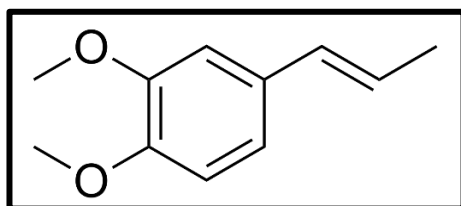
Figura 12: Estructura molecular (1) Cinnamato de metil. (2) Cinnamato de etilo



Fuente: The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils, 2013 [63]

Las investigaciones realizadas con el metabolito secundario isoeugenol, demuestra que presenta un efecto del 70 % sobre el “quorum” de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. “Quórum” se refiere a la concentración crítica de bacterias necesarias para la activación de la producción de procesos virulentos y formación de biopelículas. El Isoeugenol bloquea la comunicación del “quorum” uniéndose a sus principales regulares como LASI, LasR, PqsE y SidA [65].

Figura 13: Estructura molecular Metil de isoeugenol

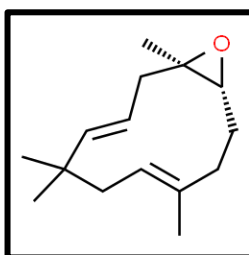


Fuente: The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils, 2013 [63]

Como se mencionó, el uso de infusiones de las hojas de *Otholobium mexicanum*, se presentó, desde siempre, como una alternativa para afecciones en el sistema digestivo. Uno de las biomoléculas que ejercen este beneficioso es el  $\alpha$ -humuleno. Una investigación del (2021), realizada en modelos de ratas con gastritis aguda inducida por ácido clorhídrico/Etanol y en líneas celulares mastocíticas humanas (HMC-1), demostró que el humuleno inhibe significativamente las lesiones gástricas, disminuyendo las

secreciones de ácido gástrico y úlceras gástricas producidas por la bacteria *Helicobacter pylori* in vivo. También, este compuesto tuvo acción antiinflamatoria, ya que redujo los niveles de expresión de los genes de citocinas como interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6 y factor de necrosis tumoral (TNF) mediante la regulación a la baja de la translocación nuclear del factor nuclear kappa B (NF-kB) [66].

Figura 14: Estructura molecular Humuleno epoxide II



Fuente: The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils, 2013 [63]

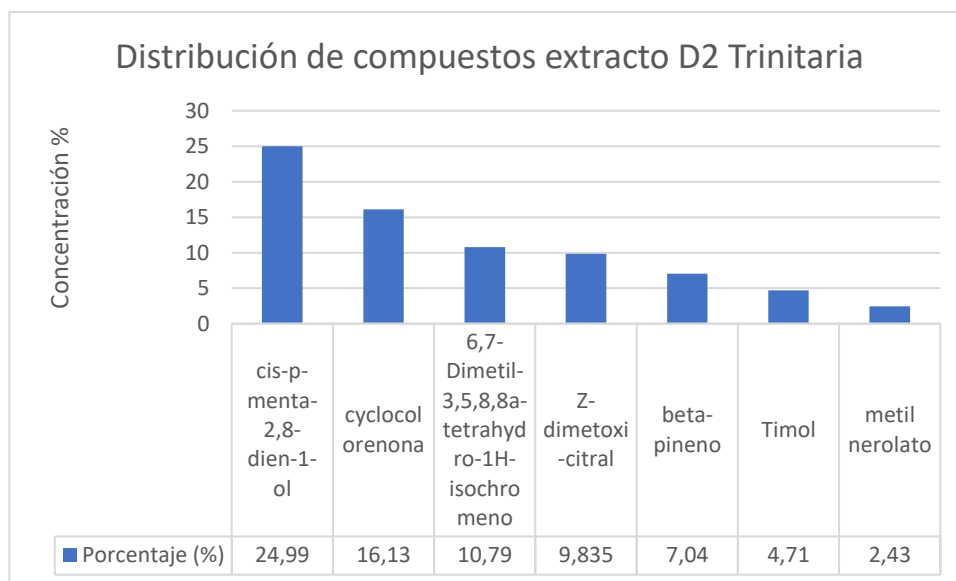
A continuación se detallan, los compuestos para el extracto D2 de Trinitaria.

Tabla 6: Perfiles cromatográficos del aceite esencial de los extractos D2 de *Otholobium mexicanum*-Trinitaria.

Nombre Biomolécula activa	Porcentaje (%)	Tiempo de retención (min)	Clasificación
6,7-Dimetil-3,5,8,8a-tetrahydro-1H-isochromeno	10,79	21,5	Fenoles
beta-pineno	7,04	23,4	Terpenoide
cis-p-menta-2,8-dien-1-ol	24,99	24,68	Terpenoide
Timol	4,71	27,34	Fenoles
Z-dimetoxi-citral	9,835	31,37	Terpenoide
Cyclocolorenona	16,13	56,84	Sesquiterpenos
metil nerolato	2,43	64,97	Éster

Fuente: G.Diaz (2023).

Gráfico 3: Distribución de compuestos identificados CG-EM extracto D1 Trinitaria

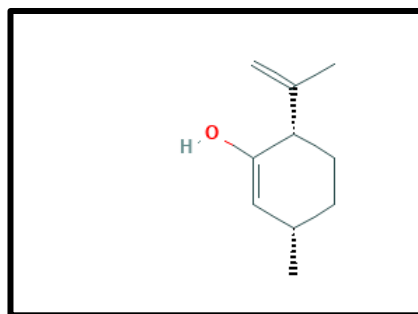


Fuente: G.Diaz (2023).

Se identificó el compuesto cis-p-menta-2,8-dien-1-ol, con un porcentaje de abundancia relativa del 24,99 % con un tiempo de retención de 24,68 min. Este compuesto es un terpenoide con propiedades aromáticas y biológicas. En estudios recientes con el aceite esencial de la especie vegetal *Cymbopogon gigantes*, se determinó que el cis-p-menta-2,8-dienol, en combinación con otras biomoléculas, tiene una fuerte actividad antitripanosómica con una adecuada selectividad. Esto se determinó al realizar ensayos de citotoxicidad in vitro con líneas celulares de ovario (CHO) y líneas celulares de fibroblastos no cancerosos humanos (WI38) [67].

Otro estudio que evidencia la actividad antimicrobiana de este compuesto del aceite esencial, es el realizado con la especie *Chenopodium ambrosioides*, en el cual en combinación con otras biomoléculas como el Timol y Neral mostraron actividad antimicrobiana frente a bacterias como *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 [68].

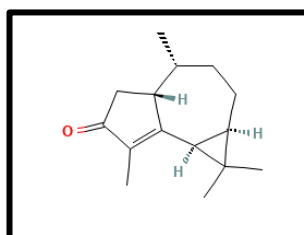
Figura 15. Estructura molecular cis-p-menta-2,8-dienol



Fuente: The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils, 2013 [63]

El compuesto cyclocolorenona con una abundancia relativa de 16,136% y un tiempo de retención de 56,84 min. Esta molécula pertenece a la clasificación de los sesquiterpenos. Dentro de las propiedades biológicas se han descrito, acción citotóxica contra líneas celulares cancerosas, así como propiedades antifúngicas, antibacteriales y antiparasitarias. Un estudio realizado en el año 2022, demostró que este metabolito secundario presentó una actividad antileishmanial con un  $IC_{50}=4,54\%$ . Estos resultados se evaluaron in vitro, en las diferentes etapas y formas de la Leishmania, incluyendo los amastigotes y promastigotes [69]. El aislamiento de cyclocolorenona se obtuvo del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Duguetia lanceolata*, especie vegetal perteneciente a la familia de Annonaceae. Además, ha sido mencionado como responsable de intervenir en el mecanismo de respuesta antiinflamatoria, inhibiendo la producción de NO (óxido nítrico) y citocinas proinflamatorias [70].

Figura 16. Estructura molecular Cyclocolorenona

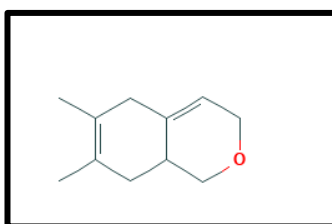


Fuente: The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils, 2013 [63]

También, se pudo identificar el compuesto 6,7-dimetil-3,5,8,8a-tetrahydro-1H-isochromeno con una abundancia relativa de 10,7% y un tiempo de retención de 21,5

min. Esta biomolécula pertenece a la clase de los isocrómeros, uno de los representantes del grupo de los fenoles. En su estructura se caracteriza por presentar un anillo de cromeno (la unidad de cromeno está formado por un anillo de benceno junto con un anillo de pirano) fusionado con un anillo aromático. La literatura otorga varias propiedades biológicas a este compuesto como por ejemplo antimicrobianas, antitumorales, antiinflamatorias y antioxidantes [71].

Figura 17. Estructura molecular 6,7-dimetil-3,5,8,8a-tetrahydro-1H-isochromeno



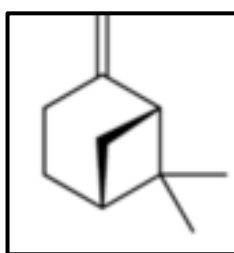
Fuente: The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils, 2013 [63]

El compuesto Z-dimetoxi-citral con una abundancia relativa de 9,835% y un tiempo de retención de 36,5 min. Esta biomolécula se clasifica dentro del grupo de los terpenoides, en la literature, se lo menciona con el nombre de citral dimetil éter. Se debe mencionar que la “Z” en su designación nos indica la disposición geométrica de los dobles enlaces en la molécula. Dentro las propiedades biológicas se destaca la actividad, antimicrobiana, antioxidantes y antiinflamatorias. En estudios in vivo e in vitro, utilizando ratas se ha determinado que a una determinada dosis de citral se logra una modificación de cierto tipo de enzimas CYP y enzimas de desintoxicación de fase II, lo cual sugiere que este metabolito secundario participa en la modulación de enzimas hepáticas, por su gran poder antioxidante [72]. A pesar que no se cuenta con respaldo de actividad de la forma z-citral, si se puede mencionar que las formas  $\alpha$  y  $\beta$  citral presentan actividad antimicrobiana frente a bacterias gram positivas y gram negativas. En un estudio realizado en el 2020, se utilizó citral frente a cepas de enterobacterias que han mostrado resistencia a los antibióticos beta-lactámicos (carbapenems). En los resultados se pudo establecer que el citral a una concentración de 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , tiene actividad minima inhibitoria (MIC). Además, el citral se mostró como una biomolécula capaz de destruir la integridad de la membrana celular, inhibiendo su crecimiento [73].

Otro compuesto identificado en los extractos hidroalcohólicos de Trinitaria, corresponde al  $\beta$ -pineno con una abundancia relativa de 7,04% y un tiempo de retención de 23,4 min. Siendo este un terpeno (hidrocarburo bicíclico) similar al pipereno. Este metabolito secundario se caracteriza por presentar aroma, lo cual permite su uso en la industria de fragancias. Sin embargo, lo que se ha estudiado son sus efectos antiinflamatorios, analgésicos, antimicrobianos y antioxidantes [74]. También, se lo describe como un coadyuvante del sistema respiratorio y del sistema inmunológico [74].

De acuerdo, al uso tradicional de la Trinitaria, que es principalmente para trastornos gastrointestinales, estudios demuestran que los monoterpenos  $\alpha$  y  $\beta$  pireno, son considerados como una fuente de agentes terapéuticos para desordenes en el sistema digestivo por tener un efecto gastroprotector. Esto se probó, en ratones a los cuales se les indujo a la adquisición de úlceras gástricas por el consumo de etanol. Los resultados indicaron una reducción de lesiones en la mucosa del estómago de los ratones que tuvieron un pre-tratamiento con  $\alpha$  y  $\beta$  pireno de la especie vegetal *E. tereticornis*. Otro efecto, de los  $\alpha$  y  $\beta$  pireno se reflejaron en el aumento del tono gástrico y el movimiento a nivel del duodeno [74] [75] [76].

Figura 18. Estructura molecular  $\beta$ -Pineno



Fuente: The Illustrated Encyclopedia of Essential Oils, 2013 [63].

En los extractos hidroalcohólicos (D2) de *Otholobium mexicanum*, también, se identificó el compuesto timol con una abundancia relativa de 4,7% y un tiempo de retención de 27,3 min. El timol pertenece al grupo de los Fenoles, principalmente se lo describe por tener efecto antimicrobiano, antifúngico y antioxidante. La molécula de timol tiene la capacidad de actuar a nivel de los fosfolípidos de la membrana celular bacteriana, provocando permeabilidad y muerte celular [77]. Las principales investigaciones para

la actividad antimicrobiana de este metabolito secundario, se han realizado con cepas de bacterias gram positivas, *Streptococcus mutans* ATTC 35668, cuyos resultados indican que a una concentración del 1% de timol, se presenta un efecto inhibitorio. Además, al compararse con la clorhexidina al 0,12% el timol refirió mejores efectos de inhibición [78].

El último compuesto identificado fue el metil-nerolato con una abundancia relativa de 2,5% y un tiempo de retención de 64.9 min. Corresponde a un Éster.

León, D (2014), reportó metabolitos adicionales en extractos hidroalcohólicos de *Otholobium mexicanum*, los cuales se presentaron con un  $R_f=0,7$ , correspondiendo a un monoterpeno cuya fórmula corresponde a 4-(3,7-dimethyl-3-vinyl-octa-1,6-dienyl)-phenol, denominado como bakuchiol, siendo este común en el género *Psoralea* [8]. Dentro de las propiedades bioactivas que se le atribuye al bakuchiol incluyen actividad antimicrobiana, citotóxica, antiinflamatoria y recientemente se lo describió como un inhibidor de las enzimas DNA polimerasas [8].

Además, este compuesto tiene la capacidad de actuar como un regulador de la glucosa en sangre de acuerdo a estudios realizados con modelo de ratones con fenotipo y genotipo para diabetes tipo II, alcanzando una reducción de la glucosa en sangre a las 4.5 h de la administración oral [8] [12].

Los resultados del perfil cromatográfico para el aceite esencial de Trinitaria, presenta una combinación de moléculas bioactivas de los grupos fenoles, terpenoides, sesquiterpenos y ésteres. A pesar de la limitada referencia bibliográfica para estudios similares, se puede evidenciar que *Otholobium mexicanum*, se presenta como una especie prometedora y con beneficios potenciales como agente antibacteriano en cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

En estudios similares, para los perfiles cromatográficos de aceites esenciales de mandarina y eucalipto se reportaron compuestos comunes a los reportados para Trinitaria como son el limoneno, terpineno, octanal, mirceno entre otros. Además, se debe mencionar que el porcentaje de abundancia de los compuestos es relativamente más alta en la Trinitaria. Así, en el perfil cromatográfico de Trinitaria se observa para

beta pineno un 7,04 % de abundancia, siendo superior a los reportados en mandarina (*Citrus reticulata*) y eucalipto (*Eucalyptus globulus*) con valores de 5,685 y 5,26% respectivamente. De igual manera para el compuesto isoeugenol en el aceite esencial de oregano (*Origanum vulgare*) se reporta un valor de 1,82% de abundancia y en extracto D1 del presenta trabajo se obtuvo un 22,74% de abundancia relativa [79].

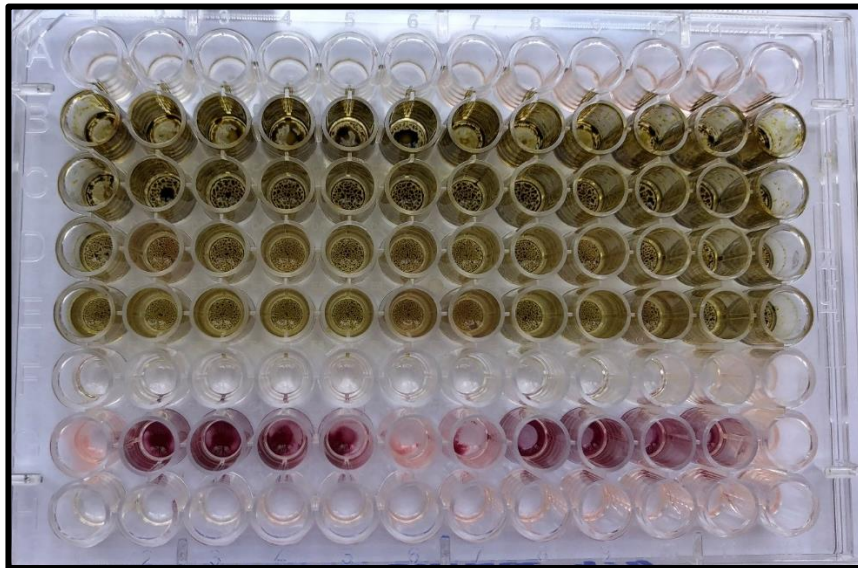
## 5.5 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (MIC) DE LOS EXTRACTOS POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN EN CALDO.

### 5.5.1 EVALUACIÓN DE LA CMI PARA *ESCHERICHIA COLI* ATCC 65380

La determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) cualitativa del extracto D1 de Trinitaria, se determinó considerando la presencia/ausencia de crecimiento bacteriano, revelado por el reactivo TTC al 2%. Evidenciándose, que en las filas B y C se conserva el color verde propio del extracto. En las filas D y E se observa una ligera degradación del color, provocado por una reacción redox del reactivo TTC, dando como resultado el cambio a un color rojo. Esto como resultado de la presencia de células bacterianas viables y metabólicamente activas lo que representa la inactividad antimicrobiana del extracto a una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 15 ug / mL (Figura 19).

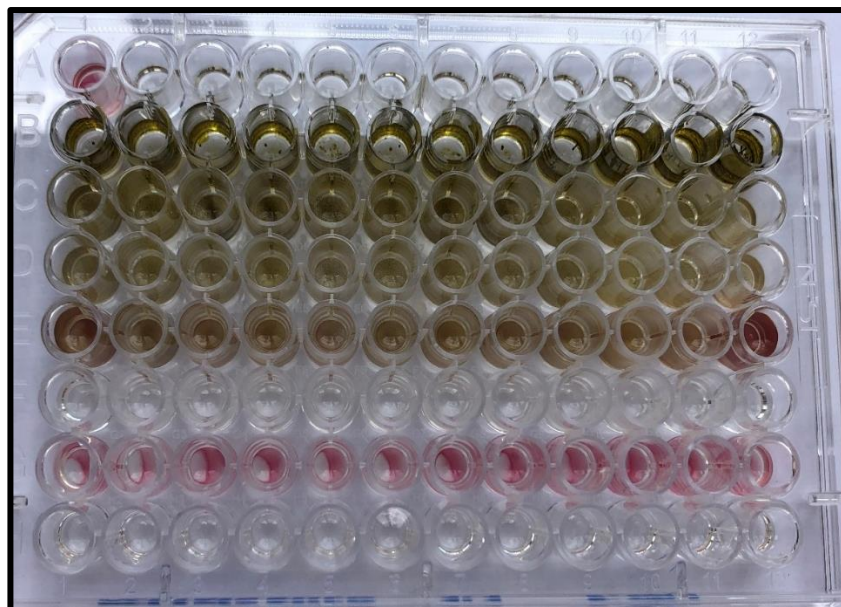
Los resultados de la CMI del extracto D2 para la bacteria *Escherichia coli* ATCC 65380, indican que en las filas B, C y D de la microplaca se conserva el color verde propio del extracto vegetal. En la fila E, se observa el cambio de color (rojo) a una concentración mínima inhibitoria CMI de 7,5 ug/mL (Figura 20).

Figura 19. Resultados de inhibición para extracto D1 *Otholobium mexicanum spp* frente a *Escherichia coli* ATCC 65380



Fuente: G. Diaz (2023).

Figura 20. Resultados de inhibición para extracto D2 *Otholobium mexicanum spp* frente a *Escherichia coli* ATCC 65380



Fuente: G. Diaz (2023).

En cuanto al porcentaje de inhibición para los extractos vegetales D1 y D2 de *Otholobium mexicanum* para *Escherichia coli* ATCC 65380 en las dos microplacas se

encuentran sobre el 50% a una concentración de 60 µg/mL, considerando el valor de absorbancia a la concentración mencionada (Tabla 7)

En estudios similares, D. León (2014), menciona que no se evidencia una capacidad mínima inhibitoria (CMI) frente a bacterias Gram negativas.

Tabla 7: Lectura de absorbancias de la MIC en equipo Auto Microplate Reader para *Escherichia coli* ATCC 65380.

MICROPLACA					
		D1		D2	
		I		II	
ESPECIE	Fila	Abs	% Inhibición	Abs	% Inhibición
EC	FB	0,603	53,328	0,614	56,101
EC	FC	0,943	26,977	0,873	37,592
EC	FD	1,168	9,541	1,560	0,000
EC	FE	1,262	2,208	1,890	0,000

Nota: EC (E.Coli), FB-FE (extractos a 60,30,15 y 7,5 µg/mL), Abs (absorbancias promedio)

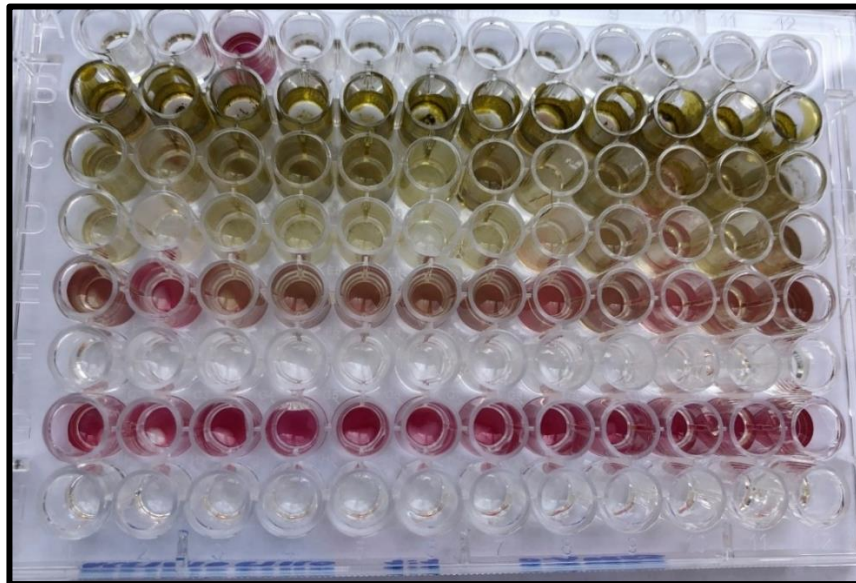
Fuente: G. Diaz (2023).

A una concentración de 60 µg/mL tanto para el extracto D1 como D2, se considera como una concentración requerida para inhibir el crecimiento de al menos el 50% de la población de la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* ATCC 65380.

### 5.5.2 EVALUACIÓN DE LA CMI PARA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 8739

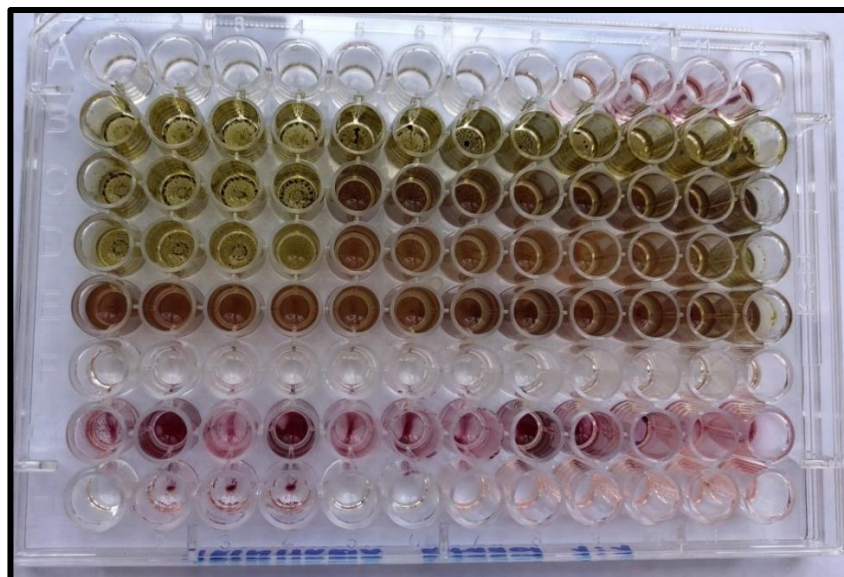
Para la determinación cualitativa de la CMI para *Staphylococcus aureus* ATCC 8739, se verificó la presencia/ausencia de crecimiento bacteriano en los pocillos de las microplacas. Estableciéndose que tanto para el extracto D1 y D2 el CMI fue de 30 µg/mL. Ya que se pudo evidenciar que los pocillos de la Fila C presentaron un color rojo, siendo el resultado de presencia de bacterias Gram positivas viables (Figura 21 y 22).

Figura 21. Resultados de inhibición para extracto D1 *Otholobium mexicanum spp* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 8739



Fuente: G. Diaz (2023).

Figura 22. Resultados de inhibición para extracto D2 *Otholobium mexicanum spp* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 8739



Fuente: G. Diaz (2023).

A la vez se pudo establecer que una concentración de 60 µg/mL, es necesaria para inhibir en al menos el 50% el crecimiento de la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 8739. Esta concentración se estableció tanto en el extracto D1 como D2 de *Otholobium mexicanum* (Trinitaria). Estos resultados se pueden evidenciar en la Tabla 8.

Tabla 8. Lectura de absorbancias de la MIC en equipo Auto Microplate Reader para *Escherichia coli* ATCC 65380.

MICROPLACA					
		D1		D2	
		I		II	
ESPECIE	FILA	Abs	%Inhibición	Abs	%Inhibición
S.A	FB	0,318	59,759	0,715	51,659
S.A	FC	0,510	35,377	1,142	22,814
S.A	FD	0,793	0,000	1,456	1,633
S.A	FE	0,876	0,000	1,736	0,000

Nota: EC (*S. Aureus*), FB-FE (extractos a 60,30,15 y 7,5 µg/mL), Abs (absorbancias promedio)

Fuente: G. Diaz (2023).

Es importante mencionar que el control positivo (fila E) no presentó ninguna coloración y el control negativo conservó el color rojo propio de la reacción del reactivo TTC por presencia del microorganismo evaluado (fila H).

En estudios realizados por D. León (2014), en extractos con el solvente acetato de etilo se alcanza un CMI para *S. aureus* de 15,62 µg/mL. En el caso del extracto con el solvente metanol, no se reporta actividad inhibitoria.

La actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de Trinitaria, frente a la bacteria *S. aureus*, también, fue estudiada a través de la técnica de método de difusión en placa. Para lo cual, se realizaron 8 diluciones seriadas de 1 mL del extracto en 10 mL de agua estéril. Los resultados indican que en la dilución 1, 2 y 3, el valor de los halos de inhibición (2,0 mm) son similares a los obtenidos con el antibiótico Clindamicina (2,3 mm) [80]. Con lo cual el efecto de los compuestos antimicrobianos presentes en los extractos tanto D1 como D2 son efectivos como agentes terapéuticos alternativos.

Dentro de los compuestos, encontrados en el perfil cromatográfico de la presente investigación y que tienen la capacidad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, destacan moléculas como el pineno, limoneno, neral, timol, humuleno, entre otros.

De acuerdo a Holetz et al., (2002) se clasifican especificaciones de la actividad antimicrobial de la siguiente manera.

**Buena: CMI <100** ug/mL (0,1 mg/mL)

Moderada: **CMI <100 a 500** ug/mL (0,1 -0,5 mg/mL)

Débil: **CMI <500 a 1000** ug/mL (0,5-1 mg/mL)

Inactiva: **CMI < más de 1000** ug/mL (1 mg/mL)

En este estudio los valores de CMI tanto para *Escherichia coli* ATCC 65380 y *Staphylococcus aureus* ATCC 8739 fueron inferiores a 100 ug/mL, clasificándose dentro de una buena CMI.

### 5.5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE EXTRACTOS *OTHLOBIUM MEXICANUM* TRINITARIA

Los resultados de las absorbancias obtenidos en el equipo Auto Microplate Reader se tomaron como variables, a ser analizadas en el programa estadístico Statgraphics Versión 18. Planteándose las siguientes hipótesis.

**Hipótesis alternativa (Ha):** Los extractos vegetales D1 y D2 a una concentración (1:1) obtenidos de la especie vegetal *Othlobium mexicanum spp* (Trinitaria) presenta actividad antimicrobiana para la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* ATCC 65380 y la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 8739.

**Hipótesis nula (Ho):** Los extractos vegetales D1 y D2 a una concentración (1:1) obtenidos de la especie vegetal *Othlobium mexicanum spp* (Trinitaria) no presentan actividad antimicrobiana para la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* ATCC 65380 y la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 8739.

Para comparar las medias de los grupos de los extractos vegetales D1 y D2; así como establecer si existen diferencias significativas entre ellos, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA MULTIFACTORIAL) como herramienta estadística para probar las Hipótesis planteadas. Obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 9. ANOVA del porcentaje de inhibición (Abs) de *Escherichia coli* ATCC 65380 entre los extractos vegetales D1 y D2

Analysis of Variance for Resultado - Type III Sums of Squares					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A:Solvente	1,38696	1	1,38696	50,55	0,0000
B:Dilucion_T	13,7748	3	4,5916	167,34	0,0000
RESIDUAL	2,49685	91	0,0274379		
TOTAL (CORRECTED)	17,6586	95			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Fuente: G. Diaz (2023)

Para el análisis de varianza multifactorial de los extractos vegetales D1 y D2 a una concentración (1:1) de *Otholobium mexicanum* frente a *Escherichia coli* ATCC 65380, se tomó en cuenta las contribuciones de dos factores, el primero corresponde al tipo solvente utilizado, en este estudio fueron acetato de etilo (D1) y etanol (D2); el segundo factor, fueron las diluciones seriadas en la microplaca, iniciando con 60 ug/mL del extracto vegetal. Dado que los dos factores p son inferiores a 0,05; estos tienen un efecto estadísticamente significativo en el resultado al 95% del nivel de confianza. Por lo cual los extractos vegetales de Trinitaria D1 y D2 tienen efecto inhibitorio para el crecimiento de la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* ATCC 65380.

Para determinar qué tipo de solvente (acetato de etilo o etanol) utilizado para la extracción de los principios activos de Trinitaria, tuvo un mejor efecto sobre *Escherichia coli* ATCC 65380, se aplicó la prueba de comparación múltiple LSD para el grupo solvente (Tabla 10). Determinándose, que las medias de los solventes fueron significativamente diferentes por presentar un valor estadísticamente significativo al 95% de nivel de confianza, con lo cual el acetato de etilo (LS mean 0,993) permitió una mejor extracción y biodisponibilidad de las moléculas con actividad bactericida que el solvente etanol (LS mean 1,234).

Tabla 10. Resultados de prueba de múltiples rangos LSD de Fisher, para evaluar capacidad inhibitoria del solvente (Acetato de etilo y etanol) utilizados para la preparación del extracto de Trinitaria.

Method: 95,0 percent LSD				
Solvente	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
ACETATO DE ETILO	48	0,993833	0,0239086	X
ETANOL	48	1,23423	0,0239086	X

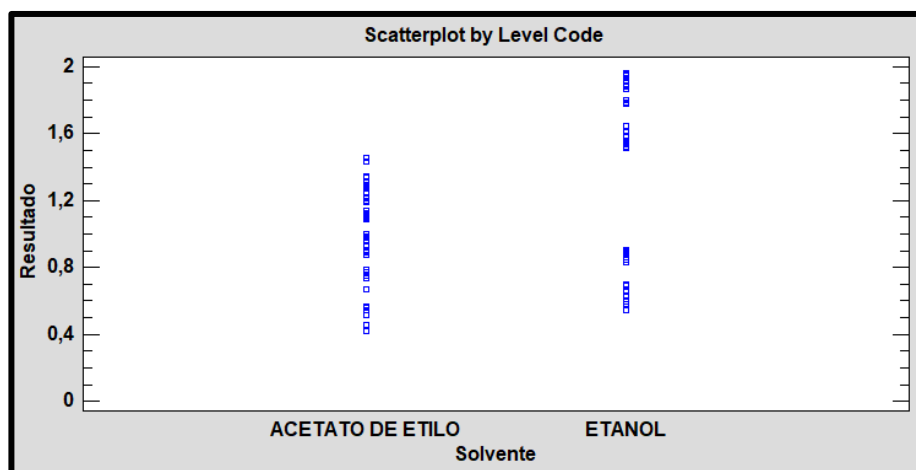
Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
ACETATO DE ETILO - ETANOL	*	-0,240396	0,0671634

\* denotes a statistically significant difference.

Fuente: G. Diaz (2023)

Esto se puede corroborar en el siguiente gráfico, donde se observa que la distribución de la población de datos del solvente acetato de etilo es homogénea y no presenta dispersión.

Gráfico 4: Distribución poblacional de las medias de los solventes de los extractos D1 y D2 de Trinitaria.



Fuente: G. Diaz (2023)

Para establecer a que concentración de dilución de los solventes ensayados en la microplaca tuvieron un adecuado efecto inhibitorio para el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 65380, se planteó la prueba de comparación múltiple LSD entre diluciones (Fila B a Fila E). Donde a una concentración de 60 µg/mL y un valor de media de 0,608 se

presenta como la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto para la bacteria ensayada.

Tabla 11. Prueba de comparación múltiples rangos LSD de Fisher entre diluciones (Fila B a Fila E) *Escherichia coli* ATCC 65380

Method: 95,0 percent LSD				
Dilucion_T	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
D-1B	24	0,608375	0,0338119	X
D-2C	24	0,907958	0,0338119	X
D-3D	24	1,36379	0,0338119	X
D-4E	24	1,576	0,0338119	X

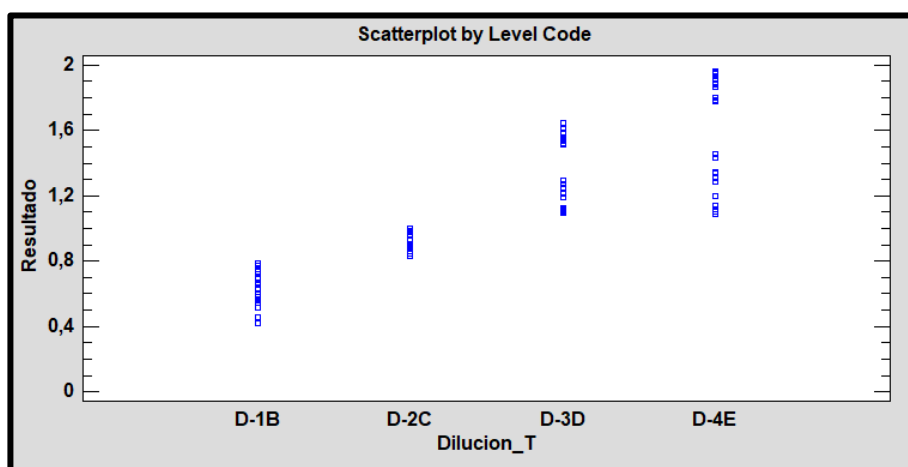
Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
D-1B - D-2C	*	-0,299583	0,0949834
D-1B - D-3D	*	-0,755417	0,0949834
D-1B - D-4E	*	-0,967625	0,0949834
D-2C - D-3D	*	-0,455833	0,0949834
D-2C - D-4E	*	-0,668042	0,0949834
D-3D - D-4E	*	-0,212208	0,0949834

\* denotes a statistically significant difference.

Fuente: G. Diaz (2023)

En la gráfica se presenta la distribución de datos de las diluciones en las microplacas ensayadas, evidenciándose que la media para los datos de la Fila B es de 0,608. Este valor es el menor en relación a las medias del grupo de diluciones (Fila C-Fila E).

Gráfico 5. Distribución poblacional de las medias entre diluciones (Fila B a Fila E) *Escherichia coli* ATCC 65380



Fuente: G. Diaz (2023)

Para determinar el efecto inhibitorio de los extractos vegetales D1 y D2 de *Otholobium mexicanum* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 8739, de igual manera que el ensayo con *Escherichia coli* ATCC 65380, se aplicó un análisis de varianza multifactorial (Tabla 12). Con resultados de valores p inferiores a 0,05; estos tienen un efecto estadísticamente significativo en el resultado al 95% del nivel de confianza. Con lo cual los dos extractos vegetales de Trinitaria presentaron un efecto inhibitorio para el crecimiento de la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 8739.

Tabla 12. ANOVA del porcentaje de inhibición (Abs) de *Staphylococcus aureus* ATCC 8739 entre los extractos vegetales D1 y D2

Analysis of Variance for Resultado - Type III Sums of Squares					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
<b>MAIN EFFECTS</b>					
A:Solvente	9,76842	1	9,76842	163,82	0,0000
B:Dilucion_T	8,63593	3	2,87864	48,28	0,0000
RESIDUAL	5,42612	91	0,0596277		
TOTAL (CORRECTED)	23,8305	95			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

Fuente: G. Diaz (2023)

Para determinar el efecto inhibitorio de los extractos vegetales D1 y D2 de *Otholobium mexicanum* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 8739, de igual manera que el ensayo con *Escherichia coli* ATCC 65380, se aplicó un análisis de varianza multifactorial. Con resultados de valores P inferiores a 0,05; estos tienen un efecto estadísticamente significativo en el resultado al 95% del nivel de confianza. Con lo cual los dos extractos vegetales de Trinitaria presentaron un efecto inhibitorio para el crecimiento de la bacteria Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 8739.

Se aplicó la prueba de comparación múltiple LSD para solvente (Tabla 13). Determinándose, que las medias de los solventes fueron significativamente diferentes por presentar un valor estadísticamente significativo al 95% de nivel de confianza. El acetato de etilo presentó un valor para la media de 0,624 y la media para el solvente etanol fue de 1,262. Con lo cual el acetato de etilo presentó una mejor actividad bactericida frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 8739.

Tabla 13. Resultados de prueba de múltiples rangos LSD de Fisher, para evaluar capacidad inhibitoria del solvente (Acetato de etilo y etanol) utilizados para la preparación del extracto vegetal de Trinitaria.

Method: 95,0 percent LSD				
Solvente	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
ACETATO DE ETILO	48	0,624188	0,0352455	X
ETANOL	48	1,26217	0,0352455	X

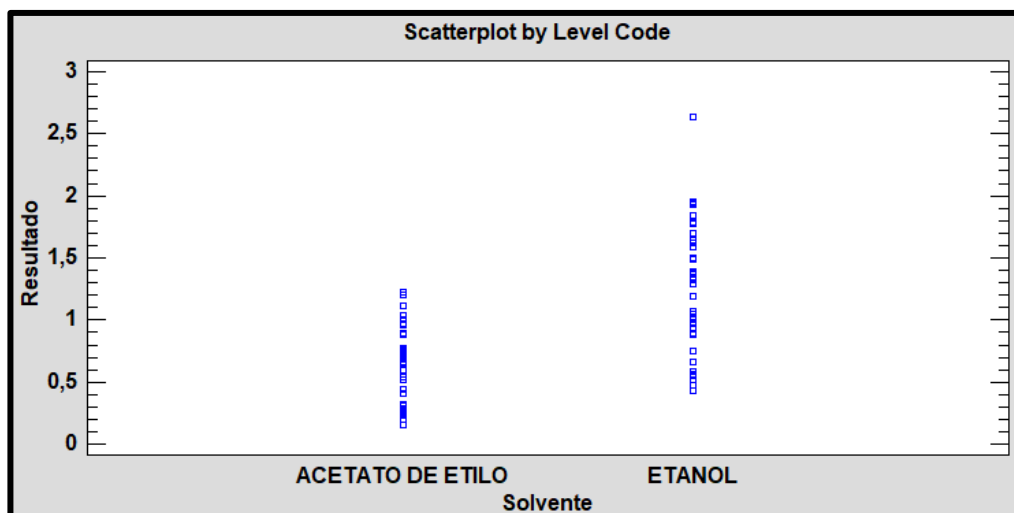
Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
ACETATO DE ETILO - ETANOL	*	-0,637979	0,0990105

\* denotes a statistically significant difference.

Fuente: G. Diaz (2023)

En el gráfico 6, se puede observar la distribución de los datos de acuerdo al tipo de solvente, con lo cual es acetato de etilo tuvo una menor dispersión de resultados. Lo cual corrobora el valor de la media para este solvente.

Gráfico 6. Distribución poblacional de las medias de los solventes de los extractos D1 y D2 de Trinitaria.



Fuente: G. Diaz (2023)

Se aplicó la prueba de comparación múltiple LSD (Tabla 14), para la concentración de las diferentes diluciones de los solventes (acetato de etilo y etanol) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 8739. Generando los siguientes resultados.

Tabla 14. Resultados de prueba de múltiples rangos LSD de Fisher, para evaluar capacidad inhibitoria entre las diluciones de los solventes (Acetato de etilo y etanol) utilizados para la preparación del extracto vegetal de Trinitaria.

Method: 95,0 percent LSD				
Dilucion_T	Count	LS Mean	LS Sigma	Homogeneous Groups
D-1B	24	0,516583	0,0498446	X
D-2C	24	0,826292	0,0498446	X
D-3D	24	1,12408	0,0498446	X
D-4E	24	1,30575	0,0498446	X

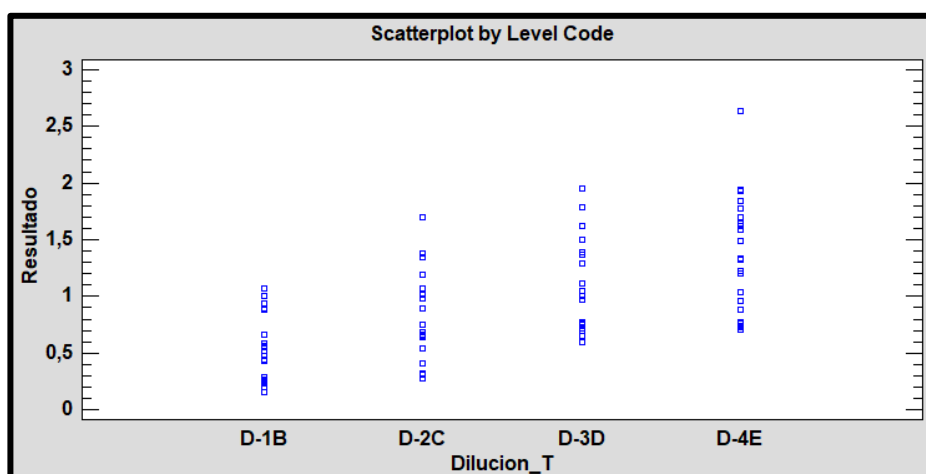
Contrast	Sig.	Difference	+/- Limits
D-1B - D-2C	*	-0,309708	0,140022
D-1B - D-3D	*	-0,6075	0,140022
D-1B - D-4E	*	-0,789167	0,140022
D-2C - D-3D	*	-0,297792	0,140022
D-2C - D-4E	*	-0,479458	0,140022
D-3D - D-4E	*	-0,181667	0,140022

\* denotes a statistically significant difference.

Fuente: G. Diaz (2023)

Siendo la dilución de la fila B, a una concentración de 60 µg/mL y una media de 0,516 la que mejor respuesta de inhibición al crecimiento bacteriano presentó.

Gráfico 7. Distribución poblacional de las medias entre diluciones (Fila B a Fila E) *Staphylococcus aureus* ATCC 8739.



Fuente: G. Diaz (2023)

## 5.6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

### 5.6.1 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ÁCIDO ASCÓRBICO

Tabla 15. Resultados de porcentaje de capacidad antioxidante de ácido ascórbico.

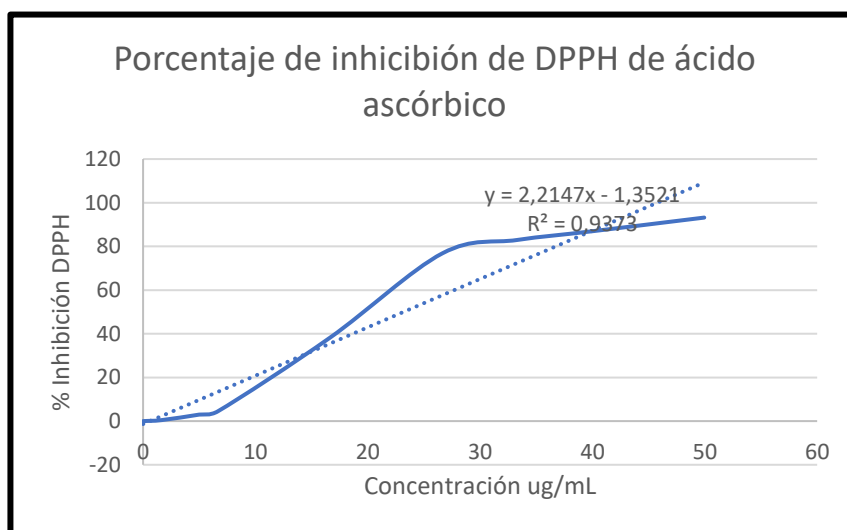
uL de ácido ascórbico	Concentración (ug/mL)	Absorvancia a 517 nm			Promedio	% capacidad antioxidante
Blanco	0	2,908	2,908	2,909	2,909	0,000
5	1,665	2,868	2,882	2,875	2,875	0,464
15	4,995	2,823	2,822	2,822	2,822	2,974
20	6,660	2,782	2,7524	2,767	2,767	4,486
50	16,650	1,796	1,787	1,792	1,792	38,249
80	26,640	0,662	0,675	0,668	0,668	76,825
100	33,300	0,485	0,498	0,492	0,492	82,946
120	39,960	0,382	0,373	0,378	0,378	86,934
150	49,950	0,199	0,197	0,198	0,198	93,192
					<b>IC 50</b>	<b>23,186 ug/mL</b>

Fuente: G. Diaz (2023)

Los resultados del presente estudio indican que el ácido ascórbico (vitamina C) a una concentración de 150 ppm tiene un porcentaje de capacidad antioxidante de 93,192%. La concentración inhibitoria media ( $IC_{50}$ ) se determinó mediante la construcción de la curva: concentración  $\mu\text{g/mL}$  vs % inhibición con DPPH. El valor reportado para el  $IC_{50}$ , fue de 23,186  $\mu\text{g/mL}$ . En estudios similares para determinar el porcentaje de captación de radicales libres por ácido ascórbico, se evidencia un 81,521 % de capacidad antioxidante a una concentración de 100  $\mu\text{L}$ , siendo similar al 82,946% obtenido [81].

A continuación, se presenta (Gráfico 8), la relación entre concentración de ácido ascórbico y el porcentaje de inhibición con DPPH.

Gráfico 8. Porcentaje capacidad antioxidante de ácido ascórbico utilizando el reactivo DPPH.



Fuente: G. Diaz (2023)

### 5.6.2 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO DE TRINITARIA *OTHOLOBIUM MEXICANUM* (D1) A UNA DILUCIÓN (1:1)

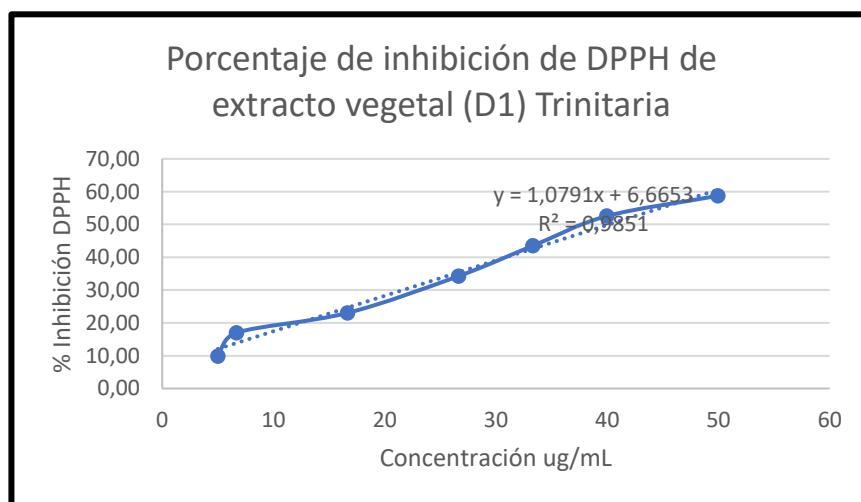
Tabla 16. Resultados de porcentaje de capacidad antioxidante de extracto vegetal de Trinitaria utilizando como solvente acetato de etilo.

uL de extracto vegetal (Acetato de etilo)	Concentración (ug/mL)	Absorbancia a 517 nm			Promedio	% capacidad antioxidante
Blanco	0	2,908	2,908	2,909	2,909	0,000
15	4,995	2,645	2,598	2,621	2,621	9,873
20	6,660	2,425	2,542	2,276	2,414	16,990
50	16,650	2,399	2,239	2,238	2,292	23,036
80	26,640	1,905	1,881	1,95	1,912	34,262
100	33,300	1,587	1,662	1,683	1,644	43,476
120	39,960	1,348	1,38	1,413	1,380	52,541
150	49,950	1,152	1,247	1,203	1,201	58,719
					<b>IC 50</b>	<b>40,158</b>

Fuente: G. Diaz (2023)

Los resultados obtenidos para la capacidad antioxidante con DPPH del extracto D1, a una concentración de 150  $\mu$ L fue del 58,719 %. La concentración inhibitoria media  $IC_{50}$  fue 40,158. Siendo esta menor a la capacidad antioxidante en comparación con ácido ascórbico.

Gráfico 9. Porcentaje capacidad antioxidante de extracto D1 de Trinitaria utilizando el reactivo DPPH.



Fuente: G. Diaz (2023)

## 5.6.2. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL EXTRACTO VEGETAL DE *OTHOLOBIUM MEXICANUM* TRINITARIA (D2), A UNA DILUCIÓN (1:1)

Tabla 17. Resultados de porcentaje de capacidad antioxidante de extracto vegetal de Trinitaria utilizando como solvente etanol.

uL de extracto vegetal (Etanol)	Concentración (ug/mL)	Absorvancia a 517 nm			Promedio	% capacidad antioxidante
Blanco	0	2,908	2,908	2,909	2,909	0,000
15	4,995	2,439	2,769	2,547	2,585	11,123
20	6,660	2,246	2,28	2,256	2,261	22,274
50	16,650	1,736	1,911	1,962	1,870	35,717
80	26,640	1,574	1,684	1,754	1,671	42,559
100	33,300	0,986	1,125	1,135	1,082	62,799
120	39,960	0,724	0,817	0,826	0,789	72,873
150	49,950	0,68	0,783	0,811	0,758	73,938
					<b>IC 50</b>	<b>28,332</b>

Fuente: G. Diaz (2023)

Los resultados para el porcentaje de la capacidad antioxidante del extracto D2 de Trinitaria, a una concentración de 150  $\mu$ L fue de 73,938%. La concentración inhibitoria media  $IC_{50}$ , fue de 28,332.

Gráfico 10. Porcentaje capacidad antioxidante de extracto D1 de Trinitaria utilizando el reactivo DPPH.

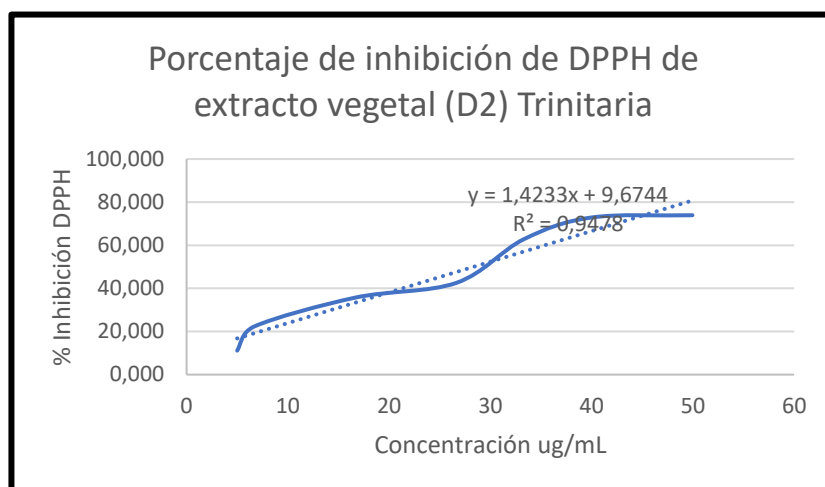
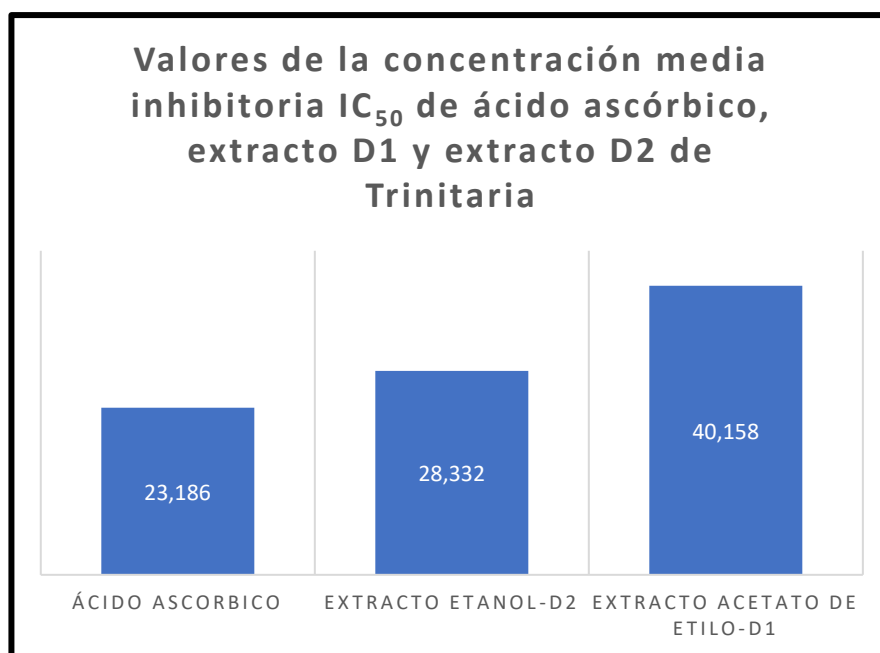


Gráfico 11: Distribución comparativa de los valores de  $IC_{50}$  de ácido ascórbico, extracto D1 y Extracto D2 de Trinitaria



Fuente: G. Diaz (2023)

Conociendo que el  $IC_{50}$  es una medida que indica la concentración necesaria de antioxidante para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%. En este estudio, los valores de  $IC_{50}$  para los extractos D1 y D2 frente al ácido ascórbico reflejaron una diferencia significativa. Tanto D1 con un  $IC_{50}$  de 40,158 y D2 con un  $IC_{50}$  28,332 mostraron

valores más altos en comparación con el ácido ascórbico  $IC_{50}$  23,186. Con lo cual se requiere una mayor concentración de los extractos de Trinitaria para lograr una actividad similar al control. Sin embargo, la concentración del extracto D2, se mostró como solución capaz de neutralizar los radicales libres en el ensayo de DPPH, de una manera óptima, es decir tuvo la capacidad de reaccionar como un sustrato antioxidante [82]. Estos valores reportados en el extracto etanólico se debe a la presencia de compuestos con capacidad antioxidante como: Cinnamato de metilo, Cinnamato de etilo, Metil isoeugenol, Óxido de Cariofileno, Humuleno y Benzoato de benzil. Estos metabolitos secundarios se caracterizan por su gran potencial para la captación de radicales libres.

De igual manera, el extracto D2 de Trinitaria con un valor de  $IC_{50}$  del 40.15, se presenta con esta actividad por la presencia de compuestos como los fenoles, terpenos, sesquiterpenos entre otros.

En un estudio realizado por, Matulevich, J (2017), con extractos de acetato de etilo, de la especie *Senna reticulata*, perteneciente a la Familia Fabaceae. Se obtuvo como resultado un  $IC_{50}$  de 40 con el ensayo de DPPH [83]. Con lo cual, los valores reportados en este estudio para el  $IC_{50}$  Trinitaria tienen buenos resultados.

### *5.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS EXTRACTOS VEGETALES D1 Y D2 DE OTHOLOBIUM MEXICANUM TRINITARIA FRENTE A EL ÁCIDO ASCÓRBICO.*

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico Statgraphics versión 18.

Se verificó normalidad en las poblaciones de datos, utilizando la prueba de Shapiro-Wilks. Planteándose las siguientes hipótesis:

Ho: Los datos presentan una distribución normal

Ha: Los datos no presentan una distribución normal

Tabla 18. Prueba de Normalidad para poblaciones de solventes de extractos de Trinitaria

Pruebas de Normalidad para Acetato de etilo		
Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,917955	0,0789887

Pruebas de Normalidad para Etanol		
Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,912544	0,0616536

Fuente: G. Diaz (2023)

El valor p-obtenido para evaluar la hipótesis nula de normalidad de la distribución, presento valores  $p > 0,05$ , para el solvente acetato de etilo y etanol con  $p=0,07$  y  $p=0,06$  respectivamente. Estableciéndose que los datos se ajustan a una distribución normal, con un nivel de confianza del 95%.

Para probar normalidad en los datos de absorbancias del ácido ascórbico se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk, obteniendo un valor p de 0,00017. Con lo cual se rechaza la Hipótesis nula de normalidad.

Tabla 19. Prueba de Normalidad para población de datos para ácido ascórbico

Pruebas de Normalidad para Ácido Ascórbico		
Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,786147	0,000176417

Fuente: G. Diaz (2023)

Para evaluar la igualdad de medias entre los grupos de solventes utilizados en los extractos de Trinitaria, se utilizó la prueba ANOVA. Planteándose las siguientes hipótesis.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$$

$$H_a: \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$$

Tabla 20. Análisis ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,2859	1	1,2859	3,47	0,0323
Intra grupos	14,8215	40	0,370539		
Total (Corr.)	16,1074	41			

Fuente: G. Diaz (2023)

El valor p obtenido en la prueba corresponde a 0,0323. Considerando que este valor es  $p < 0,05$ , existe evidencia estadística para rechazar la hipótesis nula y con ello establecer que al menos una de las medias de las soluciones con capacidad antioxidante (ácido ascórbico, extracto D1, extracto D2) es diferente.

Para establecer las diferencias entre los grupos analizados, se realizó la prueba de múltiples Rangos LSD. Obteniéndose los siguientes resultados.

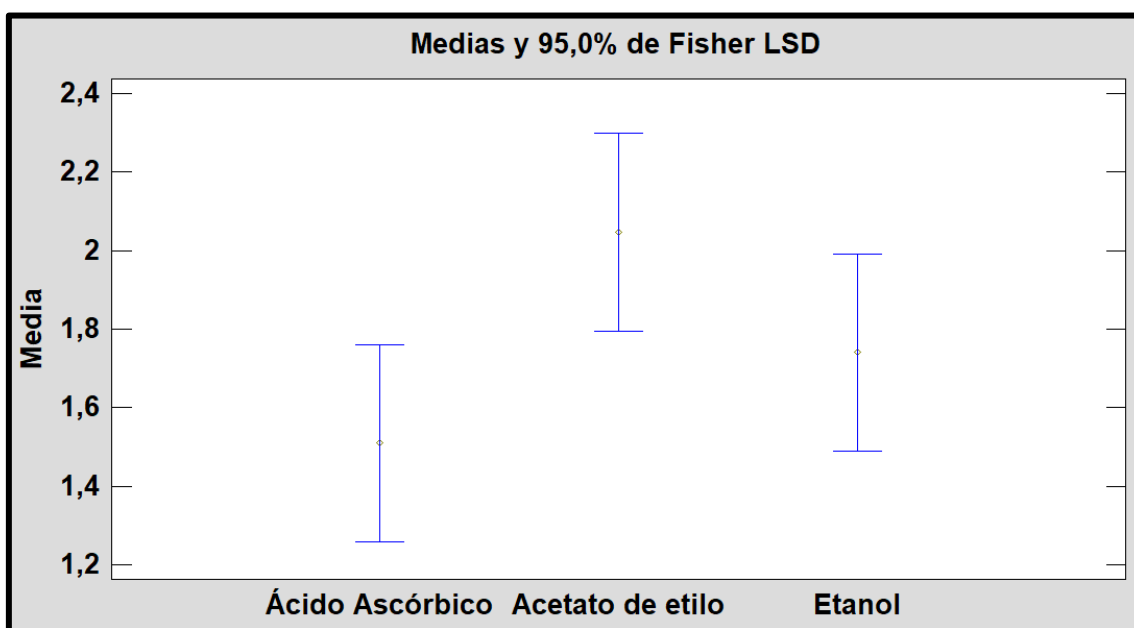
Tabla 21. Prueba estadística de Múltiples Rangos LSD

	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Ácido Ascórbico	24	1,50971	X
Etanol	24	1,74042	X
Acetato de etilo	24	2,04663	X
Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
Ácido Ascórbico - Acetato de etilo	*	-0,536917	0,503416
Ácido Ascórbico - Etanol		-0,230708	0,503416
Acetato de etilo - Etanol		0,306208	0,503416

Fuente: G. Diaz (2023)

Estableciéndose que, al comparar las medias de la capacidad antioxidante de los extractos de Trinitaria con los solventes acetato de etilo y etanol al 96% no presentan diferencias significativas entre ellos en términos de sus promedios poblacionales. Sin embargo, al comparar la diferencias entre medias de los grupos de los solventes con el ácido ascórbico, siendo el menor valor de las medias ( $u=1,50$ ).

Gráfico 12: Distribución de capacidad antioxidante de ácido ascórbico, extracto D1 y extracto D2



Fuente: G. Diaz (2023)

En el Gráfico 12, se puede evidenciar que el extracto de Trinitaria D1, tiene una mejor actividad antioxidante que el extracto D2, en comparación con el ácido ascórbico.

A la fecha no se cuenta con una referencia bibliográfica robusta, con respecto a la capacidad antioxidante de la especie *Otholobium mexicanum*. Sin embargo, Rios, A (2016), al trabajar con *Otholobium pubescens*, reporta una actividad antioxidante máxima del 98,57% y mínima del 92,67% del aceite esencial de Culen. Porcentajes que de acuerdo al ANOVA, son estadísticamente significativos, comparados a la actividad antioxidante del ácido ascórbico, Considerando a esta especie de la familia de las Fabaceas con una buena actividad antioxidante [61]. Estos resultados son similares a los reportados en el presente estudio ya que en los extractos D1 y D2 a una concentración de 150  $\mu$ L se alcanzaron porcentajes de actividad antioxidante sobre el 50%. Siendo para el extracto D1 del 58,7% y para el extracto D2 del 73,9%.

En el trabajo de investigación, sobre la actividad antioxidante y citotóxica de 35 plantas medicinales de la Cordillera Negra, realizada por Alvarado, B (2017). La especie *Otholobium pubescens*, se encuentra en lugar número 17 de entre las 35 especies

analizadas, reportando una actividad antioxidante del 92,57% de captación de radicales libres por el método de DPPH a una concentración de 100  $\mu\text{g/mL}$  y del 25,72% a 50  $\mu\text{g/mL}$ , ubicándose en el lugar número 21 de entre 35 especies [59].

Además, es importante mencionar que se han realizado estudios del  $\text{IC}_{50}$  para determinados metabolitos secundarios de los extractos de Trinitaria, entre los que se puede mencionar al bakuchiol con un porcentaje menor al 25%.

## 6. CONCLUSIONES

En el presente estudio de investigación, se evaluaron 3 extractos de las hojas de Trinitaria (*Otholobium mexicanum* J.W. Grimes) en diferentes solventes: acetato de etilo (D1), etanol 96% (D2) y etanol: agua (D3).

Los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico, utilizando reacciones químicas, determinaron que los extractos de Trinitaria D1 y D2 mostraron una variedad de compuestos, como: azúcares reductores, saponinas, triterpenoides y esteroides, naftoquinonas, antroquinonas, flavonoides y taninos. En ninguno de los extractos la prueba de Dragendorff, fue positiva. Con lo cual, se descarta la presencia del grupo de alcaloides en Trinitaria.

Con el uso de la técnica de cromatografía en capa fina (TLC), para los extractos D1 y D2 utilizando diluciones en proporción 1: 1 y 1:4 (extracto: solvente). Permitted la identificación de 11 bandas o fragmentos cromatográficos, logrando la identificación de compuestos en comparación de sus factores de retención ( $R_f$ ). Así, El valor promedio de  $R_f$  fue de 0,55. Con valores individuales de 0,15; 0,24; 0,31; 0,36; 0,42; 0,54; 0,59; 0,67; 0,70; 0,75; 0,93. Indicando la presencia de compuestos poco polares y de polaridad media, como grupos éteres, aldehidos/cetonas, ésteres, aminas, fenoles y ácidos carboxílicos respectivamente. Los extractos a una dilución 1:1 mostraron una adecuada elución de los compuestos así como una mejor resolución en las bandas.

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de Trinitaria D1 y D2 a una dilución 1:1, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 8739 y *Escherichia coli* ATCC 65380, empleando la técnica de bioautografía, demostró que existen zonas de inhibición de crecimiento para las dos bacterias. Las cuales presentaron factores de retención ( $R_f$ ) con valores de 0,70 y 0,75. Las bandas restantes, presentes en la placa TLC, no evidenciaron actividad biológica frente a las bacterias utilizadas en este estudio.

A través del análisis de GC-MS, se identificaron perfiles cromatográficos del aceite esencial de Trinitaria, en los fragmentos que presentaron inhibición para el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 8739 y *Escherichia coli* ATCC 65380 identificados en la técnica de Bioautografía. Reportándose los siguientes resultados en el extracto D1, los compuestos con mayor porcentaje fueron el metil isoeugenol y Cinnamato de metil con el 22,74% y 16,75%. Los otros compuestos identificados tuvieron una presencia menor al 10%, distribuidos de la siguiente manera: benzaldehido (3,41%), cinnamato de etil (2,08%), Benzoato de benzil (5,46%), Óxido de Cariofileno (5,28%) y Humuleno (4,83%). En el extracto D2, se identificó cis-p-menta-2,8-dien-1-ol con el 24,99%, cyclocolorenona (16,13%), 6,7-Dimetil-3,5,8,8a-tetrahydro-1H-isochromeno (10,79%), Z-dimetoxi-citral (9%), beta-pineno (7,04%), Timol (4,71%), metil nerolato (2,43%). Todos estos compuestos tienen la característica de actuar como sustancias antibacterianas.

Con el ensayo de microdilución en caldo, se determinó la concentración mínima bactericida (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB). Así para *Staphylococcus aureus* ATCC 8739, resultó un CMI de 30 µg/mL, tanto para extracto D1 como D2. Para *Escherichia coli* ATCC 65380, se identificó un CMI de 15 µg/mL y 7,5 µg/mL para los extractos D1 y D2 respectivamente. La CMB fue de 60 µg/mL para *Staphylococcus aureus* ATCC 8739 y *Escherichia coli* ATCC 65380 en los extractos ensayados. Para validar los datos se realizó la prueba estadística ANOVA multifactorial obteniendo un valor  $p < 0,05$  demostrando que los extractos de Trinitaria D1 y D2 tienen capacidad inhibitoria para el crecimiento bacteriano con un nivel de confianza del 95%. Para establecer que solvente tiene mejor efecto inhibitorio se aplicó la prueba de comparación LSD, determinando que el solvente acetato de etilo presenta una mejor actividad antimicrobiana frente al solvente etanol.

Los extractos de Trinitaria D1 y D2 presentaron una significativa capacidad antioxidante por provocar la reducción de radicales en el ensayo de DPPH. Así, se obtuvieron valores de  $IC_{50}$  40,158 para el extracto D1 y un  $IC_{50}$  28,332 para el extracto D2. Esto sugiere que la especie *Otholobium mexicanum*, tiene compuestos con propiedades antioxidantes como los fenoles, terpenoides, saponinas, entre otros. Además, los compuestos identificados en los perfiles cromatográficos del aceite esencial indican la presencia de

moléculas como el limoneno, timol, citral que son conocidos por su capacidad para neutralizar los radicales libres y proteger contra el estrés oxidativo del entorno.

## REFERENCIAS

- [1] C. M., Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023, Hong Kong: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95008/9789243506098\\_spa.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/95008/9789243506098_spa.pdf), 2013.
- [2] Z. Y. C. & M. B. Aguirre, Plantas medicinales de la zona andina de la Provincia de Loja, Loja, Ecuador. 193 p: Herbario y jardín botánico "Reinaldo Espinosa", 2014.
- [3] A. P. V. Ramírez, «Evaluación del halo de inhibición de la planta *Otholobium mexicanum* frente a *Sthaphylococcus aureus* ATCC 25923,» Tesis de grado, Bogotá D.C. 2019, 2019.
- [4] I. Cosme Pérez, «El uso de las plantas medicinales,» *Revista Intercultural*, vol. I, nº I, p. 4 pg, 2008.
- [5] O.-G. D. I. R.-T. C. Camacho-Romero, «Extracción y evaluación de los metabolitos secundarios de extractos etéreos del fruto *Syzygium cumini* (Jambol),» Tecnología en Marcha, Bogotá-Colombia, 2017.
- [6] D. C. L. C. G. Canales Peña, «Determinación de los metabolitos secundarios de la hoja seca de la especie vegetal *Cordia Inermis* mediante tamizaje fitoquímico.,» Universidad Nacional autónoma de Nicaragua UNAN-LEÓN. Facultad de ciencias químicas Escuela de Farmacia, Nicaragua, 2011.
- [7] L. B.-A. M.-R. N. J.-R. E. Zambrano-Intriago, «Estudio Etnobotánico de plantas medicinales utilizadas por los habitantes del área rural de la parroquia San Carlos, Quevedo, Ecuador,» Universidad y Salud- Sección artículos originales, Quevedo, Ecuador, 2015.
- [8] D. León López, «Evaluación antimicrobiana y aislamiento de metabolitos secundarios de la especie vegetal *Otholobium mexicanum* J.W.Grimes,» Universidad Técnica Particular de Loja, Loja-Ecuador, 2014.
- [9] J. Berdonces, «Historia de la Fitoterapia,» *Natura Medicatrix*, Barcelona-España, 2003.
- [10] M. Gallegos Zurita, «Las plantas medicinales: usos y efectos en el estado de salud de la población rural de Babahoyo-Ecuador.,» Universidad Nacional Mayor de San Marcos , Babahoyo-Ecuador, 2017.
- [11] F. Llamas, «Las leguminosas (Leguminosae o Fabaceae): una síntesis de las clasificaciones, taxonomía y filogenia de la familia a lo largo del tiempo.,» *Ambiociencias. Universidad de León.*, vol. I, nº I, pp. 30-45, 2016.
- [12] E. Solgorré, «Efecto del extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Otholobium pubescens* en la hiperglicemia experimental en *Rattus norvegicus* var. *Albinus*,» Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de farmacia y Bioquímica Unidad de Post Grado, Lima- Perú, 2005.
- [13] Z. U. H. Aguilar, «Guía de plantas útiles de los páramos de Zuleta, Ecuador,» Proderena-Ecociencia, Imbabura-Ecuador, 2009.

- [14 A. Verdugo, «Herbario Azuay. Descripción botánica,» Universidad del Azuay, Loja, Azuay-Ecuador, 1998.
- [15 J. N. D. V. Hirzl, «Efecto de la nutrición mineral sobre la producción de Cúlen (Otholobium glandulosum) Grimes). Agric. Téc,» Agric.Téc., Lima- Perú, 2004.
- [16 J. S. L. A. Piñero, *Bloque II: Desde el extracto crudo al compuesto puro*, Barcelona-España: Universidad de la Laguna, 2019.
- [17 A. Pérez, «Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro,» Instituto de Biotecnología de las plantas. Universidad central Marta Abreu de las Villas, Cuba, 2011.
- [18 N. M. A. Carreras, «Propiedades beneficiosas de los terpenos iridoides sobre la salud,» Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid, Madrid-España, 2012.
- [19 J. & G. A. Porto Pérez, «Definición de alcaloides,» Definición.DE, Bogota-Colombia , 2022.
- [20 L. S. Liu, «Determination of polyphenolic content and antioxidant activity of Kudingcha made from Ilex Kudingcha C.J. Tseng,» Food chemistry, ELSEVIER, China, 2009.
- [21 E. Química, «Lumitos Leads to success,» 2017. [En línea]. Available: <https://www.quimica.es/enciclopedia/Gluc%C3%B3sido.html>. [Último acceso: 9 septiembre 2022].
- [22 J. Osorio, «Aspectos básicos de Farmacognosia,» Facultad de Química Farmacéutica, Colombia - Antioquia , 2009.
- [23 K. Rodriguez, «Extracción y caracterización de metabolitos secundarios (polifenoles y flavonoides) obtenidos a partir de Pujin Hesperomeles ferruginea planta nativa del cerro Teligote,» Universidad Técnica de Ambato. Facultad de ciencia e ingeniería en alimentos y biotecnología, Tungurahua-Ecuador., 2018.
- [24 M. A. Rodríguez, «Procedimiento para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas,» Centro de investigaciones biológicas del Noroeste, S.C. Instituto Politécnico Nacional., México, 2012.
- [25 D. i. Rodas, «Conozca los principales procesos de fabricación de extractos vegetales para la industria alimentaria,» Dwas Rodas, Madrid-España, 2020.
- [26 T. F.-L. E. G. M.-J. . A. Rojas, «Extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de la cáscara de Sanky (Corryocactus brevistylus),» Departamento de Química, Facultad de ciencias, Lima- Perú, 2019.
- [27 C. P. J. C. S. Coy Barrera, «Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie Raputia heptaphylla (Rutacea),» Revista elementos No.4, Colombia, 2014.
- [28 A. PanReac, «Reactivo de Fehling,» Panreac Química S.L.U, Barcelona-España, 2017.
- [29 L. T. P. Valdés, «Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de Sapindus saponaria L. (jaboncillo),» *SciELO*, vol. 20, nº 1, p. 15, 2015.
- [30 T. López, «Saponósidos,» *Elsevier*, vol. 20, nº 6, pp. 124-129, 2001.

- [31] V. G. D. I. R. R. Martínez, «Características farmacognósticas de las hojas de Capparis avicennifolia,» *Mepdica.Vallejian*, vol. 4, nº 2, pp. 120-129, 2007.
- [32] Y. Vallejo-Rosero y L. Correa, «La cromatografía en capa fina: una alternativa vigente en la industria farmacéutica,» Grupo de investigación de productos naturales, facultad de ciencias Farmacéuticas, Colombia-Cartagena, 2019.
- [33] F. Zamora, «Estandarización de metodología de cromatografía de columna para el aislamiento de metabolitos activos a partir de extractos vegetales,» Universidad de Cuenca. Facultad de Bioquímica y Farmacia, Cuenca, 2017.
- [34] M. S. J. T. Waksmundzka, *Thin layer chromatography in phytochemistry, United States: Environment&agriculture,physical sciences*, 2008.
- [35] M. Roca, «Técnica de separación afines: Cromatografía de Gases,» HRS4R-UPTC, Cartagena-Colombia, 2020.
- [36] M. G. A. Valcárcel, *Técnicas analíticas de separación*, Barcelona- España: REVERTÉ,S.A., 2021.
- [37] M. I. Ozores, «Cromatografía de gases,» Campus de Valladolid, Valladolid-España, 2021.
- [38] G. Fernández, *Determinación estructural de compuestos orgánicos: Vis-Uv, IR,RMN y espectrometría de masas*, Oviedo-España: Academia Minas Centro Universitario, 2014.
- [39] D. Harris, *Análisis químico cuantitativo*, España: Reverté, 2003.
- [40] T. S. Martín, «Espectrómetro de masas,» Universidad Politécnica de Madrid, Madrid - España , 2018.
- [41] J. T. Moon, «Antioxidant assays for plant and food components,» *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. I, nº 57, pp. 1655-1666, 2009.
- [42] I. B. M. M. Korn, «Radicales libres. Bioquímica y sistemas antioxidantes. Implicancia en la patología neonatal,» *Med Uruguay*, vol. 11, nº 11, pp. 121-135, 1995.
- [43] M. K. M. T. J. L. Roy, «ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: Relationship between total polyphenol and individual catechin content,» *International Journal of food sciences and nutrition*, vol. 61, nº 2, pp. 109-124, 2010.
- [44] I. C. Munteanu, «Analytical Methods used in determining antioxidant activity: a review,» *International Journal Molecular Sciences*, vol. I, nº I, pp. 1-30, 2021.
- [45] K. Sirivibulkovit, «Paper-bases DPPH assay for antioxidant activity,» *Analityl sciences*, vol. 34, nº 1, p. 6, 2018.
- [46] M. L. Y. F. C. I. O. M. Díaz, «Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos frescos de hojas de Morus Alba L.,» *Scielo*, vol. 40, nº 1, p. 20, 2017.
- [47] B. A. A. U. Modak, «Actividad antibacteriana de flavonoides aislados del exudado resinoso de Heliotropium sinuatum: Efectodel tipo de estructura,» *Bol.Soc.Chil.Quim*, vol. 47, nº 1, p. 20, 2001.
- [48] L. P. L. H. P. Hernández, «Estudio fitoquímico y actividad antimicrobiana de plantas medicinales empleadas para el control de infecciones urinarias,» Facultad de Ciencias Básicas, Madrid-España, 2021.

- [49] J. M. C. G. M. González, «La resistencia a los antióticos: un problema muy serio,»  
] *AMP Acta médica Peruana*, vol. 2, nº 36, pp. 145-151, 2019.
- [50] L. M. D. Ramírez, «Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana  
] de compuestos de origen vegetal,» Universidad Tecnología de Pereira, Pereira-  
Colombia, 2009.
- [51] P. B.-J. S. F. T. J. R. W. R. McDermott, «Broth microdilution susceptibility testing  
] of *Campylobacter jejuni* and the determination of quality ranges for fourteen  
antimicrobial agents,» *Journal of clinical microbiology*, vol. 43, nº 12, pp. 6136-  
6138, 2005.
- [52] T. M. T. T. A. I. A. Z. Q. Luangtongkum, «Comparison of antimicrobial  
] susceptibility testing of *Campylobacter* spp. by the agar dilution and the agar disk  
diffusion methods,» *Journal of clinical microbiology*, vol. 45, nº 2, pp. 590-594,  
2006.
- [53] H. S. M. T. W. O. T. Quintana, «Concentración mínima inhibitoria y concentración  
] mínima bactericida de la ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el  
instituto nacional de enfermedades neoplásicas,» *Revista médica herediana  
Scielo*, vol. 16, nº 1, pp. 1729-1750, 2005.
- [54] B. D. O. S. Legerská, «The TLC-bioautography as a tool for rapid enzyme inhibitors  
] detection-A review,» *Critical Reviews in analytical chemistry*, vol. 1, nº 1, pp. 1-20,  
2020.
- [55] S. A. B. C. R. Purkait, «TLC bioautography-guided isolation of essential oil  
] components of cinnamon and clove and assessment of the antimicrobial and  
antioxidant potential in combination,» *Environmental science and pollution  
research*, vol. 1, nº 1, pp. 1-10, 2020.
- [56] C. Núñez, «Solventes y solubilidades,» IHMC, Buenos Aires- Argentina, 2008.  
]
- [57] P. M.-S. A. S.-C. A. F.-G. A. Garcia-Salas, «Phenolic-Compound-Extraction Systems  
] for fruit and vegetable samples,» OPEN ACCESS Molecules, Granada-Spain, 2010.
- [58] Z. Z. Y. J.-J. Y. P. L.-S. L.-S. He, «Chemical constituents from the aerial parts of  
] *Artemisia minor*,» *National Engineering research center for natural medicines*,  
vol. 72, nº 1, pp. 1198-1201, 2009.
- [59] B. Alvarado, «Actividad antioxidante y citotóxica de 35 plantas medicinales de la  
] cordillera Negra,» Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de  
farmacia y Bioquímica, Perú, 2017.
- [60] I. M. U. R. Z. Hussain, «Phytochemicals screening and antimicrobial activities of  
] selected medicinal plants of Khyberpakhtunkhwa Pakistan,» *African Journal of  
Pharmacy and Pharmacology*, Pakistan, 2011.
- [61] A. Rios, «Determinación in vitro del efecto antioxidante y antibacteriano del  
] aceite esencial de *Otholobium pubescens* (Poir.) Grimes "Culén",» Universidad  
Privada Antonio Guillermo Urrelo, Perú, 2016.
- [62] G. Volynets, M. Tukalo, V. Bdzholo, N. Derkach y e. all., «Benzaldehyde  
] thiosemicarbazone derivatives against replicating and nonreplicating  
*Mycobacterium tuberculosis*,» *The journal of antibiotics*, vol. 1, nº 1, pp. 1-7, 2019.

- [63] J. Lawless, *The encyclopedia of essential oils*, Reino Unido: American aromatherapy association, 2013.
- [64] B. Zhang, C. Lv, W. Li, Z. Cui, D. Chen, F. Cao, F. Miao y L. Zhou, «Ethy cinnamate derivatives as promising high-efficient acaricides against *Psoroptes cuniculi*: synthesis, bioactivity and structure-activity relationship,» *Chem. Pharm*, vol. 63, nº 1, pp. 255-262, 2015.
- [65] R. Shastry, S. Kanekar, A. Suzna Pandial y P. Rekha, «Isoeugenol suppresses multiple quorum sensing regulated phenotypes and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1,» Taylor&Francis, India, 2021.
- [66] D. Yeo, S. Hwang, Y. Song y H. Lee, «Humkene inhibites acute gastric mucosal injury by enhancing mucosal integrity,» *Antioxidants MDPI*, vol. 10, nº 1, pp. 78-84, 2021.
- [67] S. B. J. P. G. Kpoviessi, «Chemical composition, citotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin,» *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 1, nº 1, pp. 1-8, 2013.
- [68] Y. Cabrera, «Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de,» UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA, Loja-Ecuador, 2017.
- [69] J. P. D. L. L. J. e. Monteiro, «Absolute configuration and antileishmanial activity of (-)-cyclocolorone isolated from *Duguetia lanceolata* (Annonaceae),» *Bentham Science publishers*, vol. 1, nº 1, pp. 30-45, 2022.
- [70] F. K.-A. M. De la Torre, «Antiinflammatory and immunomodulatory effects of *Critonia aromatisans* leaves: downregulation of pro-inflammatory cytokines,» *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 190, nº 1, pp. 174-182, 2016.
- [71] V. Nesterov, «Organic compounds,» de *Crystal structure communications*, Las Vegas, USA, Institute of organic Chemistry, 2005, pp. 1-4.
- [72] C. F. Y. H. C. C. L. Y. H. Chun Li, «Effects of lemongrass oil and citral on hepatic drug-metabolizing enzymes, oxidative stress, and acetaminophen toxicity in rats,» *FDA journal*, vol. 1, nº 1, pp. 1-7, 2017.
- [73] W. Qian, «Antimicrobial and antibiofilm activities of citral against carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae*,» *Foodborne Pathogens and disease*, vol. XX, nº XX, pp. 1-6, 2020.
- [74] B. E. Salehi, «Therapeutic Potencial of The antimicrobial activity of  $\alpha$ - and  $\beta$ -pinene: A Miracle Gift of Nature.,» *Biomolecules*, vol. 1, nº 1, pp. 1-34, 2019.
- [75] H. Schmeda, «Traditional medicines and gastroprotectives crude drugs,» *J. Ethnopharmacol*, vol. 1, nº 1, pp. 61-66, 2005.
- [76] H.-F. Falcao, «Plants of the American continent with antiulcer activity,» *Phytomedicine*, vol. 15, nº 1, pp. 132-146, 2008.
- [77] L. Téllez, F. Arévalo, H. Juárez, P. Altamirano, K. Ccapa, J. Chávez y L. Visitación, «Determinación de Timol y Carvacrol en Hojas de Orpegano por HPLC FL.,» Centro de Investigación en Química, Toxicología y Biotecnología Ambiental del Departamento, Lima-Perú, 2014.

- [78 M. Erazo, «Efecto inhibitorio del timol sobre cepas de *Estreptococos mutans*: estudio in vitro,» Universidad Central del Ecuador. Facultad de Odontología, Quito, 2017.
- [79 F. S. J. T. M. P. J. H. A. D. J. Argote, «Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*,» Biotecnología em el sector agropecuario y agroindustrial, Nariño-Colombia, 2017.
- [80 V. Ramirez y A. Prieto, «EVALUACIÓN DEL HALO DE INHIBICIÓN DE LA PLANTA *Otholobium mexicanum* FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,» UNIVERSIDAD DE CIENCIAS APLICADAS Y AMBIENTALES U.D.C.A, Colombia , 2019.
- [81 Vera y M., «Evaluación de capacidad antioxidante del hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*),» Carrera de Ing. en Biotecnología de los recursos naturales. Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca-Ecuador , 2021.
- [82 J. Tovar del Rio, «DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR DPPH Y ABTS,» UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA.FACULTAD DE TECNOLOGÍA.ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA, Pereira-Colombia, 2013.
- [83 J. Matulevich y W. Castrillón, «Phytochemical study and evaluation of antioxidant capacity of leaves of *Senna reticulata* obtained in the Colombian Andean region,» *SCielo*, vol. I, nº 0124, p. 2344, 2017.
- [84  
]
- [85 M. García, «Apuntes para espectrometría de radiación ultravioleta visible (UV/Vis),» Universidad Autonoma de México, Mexico, 2016.
- [86 E. Carballido, «Propiedades de las Antraquinonas,» Equipo de Botanical-online encargado de la redacción de contenidos, México, 2021.
- [87 M. González, «Cumarinas,» La Guía-Química, México, 2011.  
]
- [88 A. Almazan, «Actividad cumarinas,» Universidad autónoma de Guerrero, México, 2022.  
]
- [89 J. V. L. C. Isaza, «Estimación espectrofotométrica de taninos hidrolizables y condensados en plantas melastomáceas,» Escuela de Química- Universidad Tecnológica de Pereira., Colombia, 2007.
- [90 A. T. Rojas, «Cuantificación por espectrofotometría UV/Vis de las saponinas contenidas en el episperma de la especie *Chenopodium quinoa* Willd "quinua" procedente de la provincia de Santiago de Chuco-La Libertad.,» Universidad Nacional de Trujillo, Perú, 2011.
- [91 J. Gaete, «Identificación de estructuras de naturaleza Flavónica mediante espectroscopia UV-VIS a partir de estándares de Flavonoides. Aplicación de la metodología a un extracto vegetal comercial.,» Universidad Andrés Bello. Facultad de Medicina ., Viña del Mar- Chile , 2018.
- [92 J. Correa, «Acción Biológica de las Furanocumarinas,» Universidad Nacional, Seccional de Medellin, Colombia, 1994.
- [93 E. S. Ruiz, «Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus propiedades biológicas,» *CENIC*, vol. 46, nº 1, pp. 9-24, 2015.

[94 P. Quiroga, «Cromatografía en capa fina (TLC),» SEDICI, Buenos Aires-Argentina , ] 2013.

ANEXO 1 :

Datos absorvancias a 517 nm para ensayo DPPH

LAS ABSORVANCIAS DE LAS MUESTRAS				
Concentración		Ácido Ascórbico	Acetato de etilo D1	Etanol D2
blanco	1	2,908	2,908	2,908
blanco	2	2,908	2,908	2,908
blanco	3	2,909	2,909	2,909
15	4	2,868	2,645	2,439
15	5	2,882	2,598	2,769
15	6	2,875	2,621	2,547
20	7	2,782	2,425	2,246
20	8	2,752	2,542	2,28
20	9	2,767	2,276	2,256
50	10	1,796	2,399	1,736
50	11	1,787	2,239	1,911
50	12	1,792	2,238	1,962
80	13	0,662	1,905	1,574
80	14	0,675	1,881	1,684
80	15	0,668	1,95	1,754
100	16	0,485	1,587	0,986
100	17	0,498	1,662	1,125
100	18	0,492	1,683	1,135
120	19	0,382	1,348	0,724
120	20	0,373	1,38	0,817
120	21	0,378	1,413	0,826
150	22	0,199	1,152	0,68
150	23	0,197	1,247	0,783
150	24	0,198	1,203	0,811

## ANEXO 2

Valores absorbancias ensayo microdilución en caldo

PA	D1b_16	D2c_32	D3d_64	D4e_128	Control	S. aureus
ETILO	0,289	0,409	0,648	0,735	0,786	
ETILO	0,205	0,276	0,719	0,734	0,805	
ETILO	0,245	0,647	0,75	0,766	0,809	
ETILO	0,229	0,323	0,695	0,736	0,759	
ETILO	0,267	0,312	0,775	0,71	0,854	
ETILO	0,248	0,412	0,761	0,776	0,821	
ETILO	0,155	0,32	0,595	0,742	0,784	
ETILO	0,441	0,542	0,76	0,888	0,824	
ETILO	0,251	0,637	0,723	0,959	0,741	
ETILO	0,517	0,666	0,972	1,228	0,732	
ETILO	0,444	0,895	1,004	1,203	0,811	
ETILO	0,523	0,686	1,109	1,034	0,752	
METANOL	0,895	1,195	1,369	1,585	1,587	
METANOL	0,433	1,374	1,043	1,319	1,469	
METANOL	1,007	1,194	1,495	1,641	1,771	
METANOL	0,565	0,985	1,625	1,933	1,527	
METANOL	0,58	1,071	1,786	1,621	1,973	
METANOL	0,477	0,753	1,39	1,946	0,939	
METANOL	0,887	1,01	1,788	1,702	1,844	
METANOL	0,937	1,024	0,972	1,332	1,719	
METANOL	0,661	1,071	1,366	1,781	0,781	
METANOL	0,521	0,98	1,288	1,486	1,222	
METANOL	1,07	1,349	1,392	1,847	1,767	
METANOL	0,551	1,7	1,953	2,634	1,158	

PA	D1b_16	D2c_32	D3d_64	D4e_128	Control	E. Coli
ETILO	0,518	0,876	1,112	1,102	1,323	
ETILO	0,453	0,956	1,098	1,087	1,245	
ETILO	0,566	0,979	1,103	1,143	1,348	
ETILO	0,454	0,889	1,121	1,201	1,284	
ETILO	0,738	0,894	1,107	1,114	1,253	
ETILO	0,671	0,998	1,121	1,337	1,34	
ETILO	0,56	0,954	1,249	1,342	1,331	
ETILO	0,775	0,932	1,126	1,29	1,342	
ETILO	0,542	0,987	1,274	1,338	1,262	
ETILO	0,785	0,899	1,193	1,434	1,258	
ETILO	0,748	0,966	1,213	1,308	1,249	
ETILO	0,42	0,982	1,296	1,453	1,256	
METANOL	0,698	0,892	1,522	1,963	1,435	
METANOL	0,654	0,898	1,587	1,89	1,428	
METANOL	0,69	0,892	1,649	1,934	1,372	
METANOL	0,584	0,893	1,534	1,964	1,314	
METANOL	0,543	0,884	1,543	1,945	1,387	
METANOL	0,629	0,843	1,577	1,914	1,398	
METANOL	0,634	0,902	1,611	1,785	1,369	
METANOL	0,598	0,887	1,515	1,956	1,402	
METANOL	0,543	0,833	1,535	1,883	1,432	
METANOL	0,632	0,845	1,54	1,867	1,359	
METANOL	0,543	0,834	1,543	1,776	1,498	
METANOL	0,623	0,876	1,562	1,798	1,397	