



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE GUAYAQUIL**

**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE  
ESENCIAL DE MEMBRILLO (*GUSTAVIA ANGUSTIFOLIA*) MEDIANTE LA  
TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN PARA SU APROVECHAMIENTO  
BIOTECNOLÓGICO**

*Trabajo de titulación previo a la obtención del  
Título de Ingeniero/a en Biotecnología*

**AUTORES:**

DIEGO ALEJANDRO ARELLANO VILLACÍS  
PAULETTE STEPHANY SALAZAR SÁNCHEZ

**TUTORA:**

ING. ANGELA VANESSA PACHECO FLORES DE VALGAZ MSc.

**GUAYAQUIL - ECUADOR  
2026**

## CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, **Diego Alejandro Arellano Villacís** con documento de identificación N° 0929846822 y **Paulette Stephany Salazar Sánchez** con documento de identificación N° 0952752913; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 28 de enero del año 2026

Atentamente,



---

Diego Alejandro Arellano Villacís

CI: 0929846822



---

Paulette Stephany Salazar Sánchez

CI: 0952752913

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

Nosotros, **Diego Alejandro Arellano Villacís** con documento de identificación N° 0929846822 y **Paulette Stephany Salazar Sánchez** con documento de identificación N° 0952752913, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo experimental: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE MEMBRILLO (GUSTAVIA ANGUSTIFOLIA) MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN PARA SU APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

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

Guayaquil, 28 de enero del año 2026

Atentamente,



---

Diego Alejandro Arellano Villacís

CI: 0929846822



---

Paulette Stephany Salazar Sánchez

CI: 0952752913

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Ángela Pacheco Flores De Valgaz** con documento de identificación N° 0930726112, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE MEMBRILLO (GUSTAVIA ANGUSTIFOLIA) MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN PARA SU APROVECHAMIENTO BIOTECNOLÓGICO**, realizado por **Diego Alejandro Arellano Villacís** con documento de identificación N° 0929846822 y **Paulette Stephany Salazar Sánchez** con documento de identificación N° 0952752913, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 28 de enero del año 2026

Atentamente,



Ángela Pacheco Flores De Valgaz

CI: 0930726112

## **Dedicatoria**

A mi papá Jose Fabricio Arellano Regalado, por las enseñanzas y el apoyo que me ha dado a lo largo de toda mi etapa estudiantil, tanto en la universidad, como en el colegio. Su apoyo tanto emocional como económico a lo largo de todo este viaje me han mantenido motivado, y con ganas de superarme.

A mi mamá Doris Cumandá Villacís Guillén, por ser un pilar fundamental en mi vida y que con carácter fuerte pero lleno de amor me enseñó valores tan importantes como son la responsabilidad, el respeto, y la resiliencia, y que a día de hoy me definen como persona.

A mis hermanos menores Martina y Matías que, aunque no hablamos mucho siguen siendo parte importante de mi vida, y me animan a seguir adelante y ser mejor persona, para ser un ejemplo a seguir en sus vidas.

A mi pareja Nicole Yoza, por siempre apoyarme en todo el proceso de la tesis, y enseñarme que, entre todo el agobio y el estrés, un instante de amor y cariño sincero puede alegrarte el día.

A mis amigos, los cuales me han ayudado a que todo este camino sea más llevadero, y me ayudaron a recordar que por más estresado u ocupado que pueda estar, siempre hay un espacio para reír y pasarlo bien.

Este logro no es solo mío, sino también de todos ellos, y espero que puedan seguir formando parte de mi vida por muchos años más.

Diego Alejandro Arellano Villacís

## **Dedicatoria**

A Dios, por ser mi guía y fortaleza en cada etapa de mi vida, por brindarme sabiduría, paciencia y la oportunidad de culminar este proceso académico.

Este trabajo de titulación está dedicado a mi madre, Ana María, quien con su esfuerzo, amor y sacrificio ha sido la razón principal por la que hoy me encuentro culminando esta etapa. Gracias por ser mi apoyo incondicional, mi fortaleza y mi pilar fundamental a lo largo de mi vida, y por estar siempre presente.

A mis abuelos, quienes en vida me cuidaron, protegieron y velaron por mi bienestar, dejándome enseñanzas que permanecerán para siempre en mi corazón. Su amor, ejemplo y valores han sido una guía constante en mi camino, y su recuerdo vive en cada logro alcanzado.

A mis amigos de la universidad, Gianella Robelli, Andrea Chango, Paola Rivera, José Huyamave y Juan Valencia, Gracias por ser luz en los días más pesados y calma en medio del estrés. Sus risas, su compañía y sus palabras transformó este proceso en una experiencia más cálida y llena de recuerdos. Este logro no solo representa un esfuerzo académico, sino también todo lo compartido juntos, gracias por el apoyo, paciencia y cariño con el que me acompañaron hasta el final. Los llevo en el corazón, hoy y siempre.

A mis amigas, Ashley y Abigail, por su cariño sincero, su apoyo constante y por estar presente incluso en los silencios. Gracias por acompañarme siempre.

A mi amigo Abid Arteaga, por estar siempre presente con palabras de aliento y paciencia en cada etapa de este proceso. Gracias por sostenerme cuando el cansancio pesaba más que la motivación y por recordarme que incluso en los días más difíciles, no estaba sola.

Paulette Stephany Salazar Sánchez

## **Agradecimiento**

Expresamos nuestro sincero agradecimiento a la Universidad Politécnica Salesiana por el apoyo institucional y la formación académica brindada durante nuestra trayectoria universitaria, los cuales hicieron posible la realización del presente trabajo de titulación.

De manera especial, agradecemos a nuestra tutora, Mgtr. Angela Vanessa Pacheco Flores De Valgaz, por su guía constante, dedicación y valiosos aportes a lo largo del desarrollo de esta investigación, así como por compartir su experiencia y conocimientos profesionales.

De igual manera, expresamos nuestro agradecimiento al Mgtr. Jairo Joel Jaime Carvajal por su valiosa colaboración, disposición y acompañamiento académico, así como por compartir sus conocimientos y brindar orientación oportuna durante el desarrollo de esta investigación.

Así mismo, agradecemos al Ing. Kevin Gabriel Cedeño Vinces por su apoyo y apertura, al facilitar las condiciones necesarias y el acceso a recursos complementarios que contribuyeron de manera significativa a la ejecución de parte del trabajo experimental.

Agradecemos también a los laboratorios de Ciencias de la Vida y a su personal técnico de la sede Guayaquil por facilitar el uso de equipos, materiales e instalaciones.

De igual manera, expresamos nuestro agradecimiento al Mgtr. Jaime Naranjo Morán por su motivación constante, enseñanzas y aporte a nuestra formación académica y profesional.

Finalmente, expresamos nuestro agradecimiento a Fernando Torres y Joshua Zaruma por su colaboración y disposición brindada durante las etapas iniciales de esta investigación.

## Resumen

La presente investigación evaluó la composición química y la actividad antimicrobiana del aceite esencial y extractos de las hojas de *Gustavia angustifolia*, una especie poco estudiada del litoral ecuatoriano, con el fin de determinar su potencial aprovechamiento biotecnológico. El material vegetal fue recolectado en el Bosque Protector Prosperina durante la época invernal. La obtención del aceite esencial se realizó mediante hidrodestilación con un aparato Clevenger, mientras que los extractos (alcohólico, hidroalcohólico y acuoso) se obtuvieron por maceración asistida por ultrasonido. La caracterización química mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) reveló un perfil predominantemente sesquiterpénico, identificándose al Caryophyllene <(Z)-> como compuesto mayoritario, junto con una fracción relevante de Nonano y Pineno. El tamizaje fitoquímico de los extractos (acuoso, hidroalcohólico, y alcohólico) evidenció la presencia de grupos complementarios como alcaloides, fenoles, saponinas, terpenoides, cumarinas, y lactonas sesquiterpénicas, donde el extracto alcohólico presentó la mayor disponibilidad de metabolitos. La actividad antimicrobiana fue evaluada mediante la técnica de microdilución en caldo frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Los resultados demostraron una selectividad marcada del aceite esencial hacia la bacteria Gram-negativa, alcanzando una inhibición del 69.54% a una concentración del 5% v/v ( $IC_{50} < 5\%$ ), superando la actividad fungistática observada frente a la levadura (46.89% de inhibición;  $IC_{50} \approx 5\%$ ). Aunque no se determinó una concentración mínima inhibitoria absoluta (< 5%) comparable a los controles positivos, la capacidad del aceite para reducir significativamente la carga microbiana sugiere su viabilidad como agente bacteriostático en formulaciones desinfectantes o conservantes naturales, aportando valor agregado a la bioeconomía local.

**Palabras claves:** *Gustavia angustifolia*, aceite esencial, GC-MS, microdilución, tamizaje fitoquímico, extractos, actividad antimicrobiana, *Escherichia coli*, *Candida albicans*

## Abstract

This research evaluated the chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil and leaf extracts of *Gustavia angustifolia*, a little-studied species of the Ecuadorian coast, to determine its potential biotechnological applications. Plant material was collected in the Bosque Protector Prosperina during the rainy season. The essential oil was obtained by hydrodistillation using a Clevenger apparatus, while the extracts (alcoholic, hydroalcoholic, and aqueous) were obtained by ultrasound-assisted maceration. Chemical characterization by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) revealed a predominantly sesquiterpene profile, with Caryophyllene <(Z)-> identified as the major compound, along with significant amounts of Nonane and Pinene. Phytochemical screening of the extracts (aqueous, hydroalcoholic, and alcoholic) revealed the presence of complementary groups such as alkaloids, phenols, saponins, terpenoids, coumarins, and sesquiterpene lactones, with the alcoholic extract exhibiting the highest metabolite availability. Antimicrobial activity was evaluated using the broth microdilution technique against *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The results demonstrated marked selectivity of the essential oil towards the Gram-negative bacteria, achieving 69.54% inhibition at a concentration of 5% v/v (IC<sub>50</sub> < 5%), surpassing the fungistatic activity observed against the yeast (46.89% inhibition; IC<sub>50</sub> ≈ 5%). Although an absolute Minimum Inhibitory Concentration (MIC) (< 5%) comparable to positive controls was not determined, the oil's ability to significantly reduce the microbial load suggests its viability as a bacteriostatic agent in disinfectant formulations or natural preservatives, adding value to the local bioeconomy.

**Keywords:** *Gustavia angustifolia*, essential oil, GC-MS, microdilution, phytochemical screening, extracts, antimicrobial activity, *Escherichia coli*, *Candida albicans*

## Índice de contenidos

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Objetivos .....	4
<b>1.1.2. Objetivo General</b> .....	4
<b>1.1.3. Objetivos específicos</b> .....	4
1.2. Hipótesis .....	5
2. MARCO TEÓRICO .....	6
2.1. Plantas medicinales y Productos naturales .....	6
<b>2.1.1. Uso tradicional y científico de las plantas medicinales</b> .....	6
<b>2.1.2. Productos naturales en Biotecnología</b> .....	7
<b>2.1.3. Relevancia etnobotánica de las plantas medicinales en el Ecuador</b> .....	9
2.2. <i>Gustavia angustifolia</i> (Membrillo de monte) .....	10
<b>2.2.1. Distribución geográfica y ecología</b> .....	10
<b>2.2.2. Descripción botánica de <i>Gustavia angustifolia</i></b> .....	11
<b>2.2.3. Estudios fitoquímicos reportados</b> .....	13
2.3. Aceites esenciales .....	14
<b>2.3.1. Definición y características fisicoquímicas</b> .....	14
<b>2.3.2. Extracción de aceites esenciales por destilación</b> .....	16
<b>2.3.3. Composición química de los aceites esenciales</b> .....	18
<b>2.3.4. Mecanismos de acción antimicrobiana de los metabolitos secundarios en <i>Lecythidaceae</i>.</b> .....	19
2.4. Extractos vegetales y tamizaje fitoquímicos .....	20

2.4.1. Extractos vegetales: concepto e importancia .....	20
2.4.1.1. Clasificación según el solvente de extracción .....	22
2.4.2. Tamizaje fitoquímico .....	24
2.4.2.1. Metabolitos primarios .....	24
2.4.2.2. Metabolitos Secundarios .....	25
2.5. Actividad antimicrobiana.....	27
2.5.1. Concepto de actividad antimicrobiana.....	27
2.5.2. Microorganismos de interés clínico y ambiental.....	27
2.5.2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	27
2.5.2.2. <i>Candida albicans</i> .....	28
2.5.3. Técnica de microdilución para evaluar la actividad antimicrobiana.....	29
2.5.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1. Localización e identificación de material vegetal.....	32
3.2. Revisión del estado de las muestras.....	32
3.3. Análisis fisicoquímico de las hojas.....	33
3.3.1. Determinación de humedad .....	33
3.4. Tratamiento de las muestras.....	34
3.5. Obtención de aceite esencial.....	34
3.6. Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS).....	35
3.7. Elaboración de extractos mediante lixiviación asistida por ultrasonido (EAU) a partir de hojas de <i>Gustavia angustifolia</i> . .....	36

<b>3.7.1. Obtención del extracto acuoso</b> .....	36
<b>3.7.2. Obtención del extracto hidroalcohólico</b> .....	36
<b>3.7.3. Obtención del extracto alcohólico</b> .....	37
<b>3.8. Tamizaje fitoquímico</b> .....	38
<b>3.8.1. Metabolitos primarios</b> .....	40
<b>3.8.1.1. Determinación cualitativa de Carbohidratos</b> .....	40
<b>3.8.1.2. Determinación cualitativa de Proteínas</b> .....	41
<b>3.8.1.3. Determinación cualitativa de lípidos</b> .....	42
<b>3.8.2. Metabolitos secundarios</b> .....	43
<b>3.8.2.1. Determinación cualitativa de alcaloides</b> .....	43
<b>3.8.2.2. Determinación cualitativa de Fenoles</b> .....	44
<b>3.8.2.3. Determinación cualitativa de Saponinas</b> .....	45
<b>3.8.2.4. Determinación cualitativa de Terpenoides</b> .....	46
<b>3.8.2.5. Determinación cualitativa de Cumarinas</b> .....	46
<b>3.8.2.6. Determinación cualitativa de lactonas sesquiterpénicas</b> .....	47
<b>3.9. Actividad biológica</b> .....	48
<b>3.9.1. Actividad antimicrobiana</b> .....	48
<b>3.8.2. Cultivo de cepas microbianas</b> .....	48
<b>3.8.3. Preparación de las concentraciones de aceite esencial, terpineol,     ampicilina y gentamicina</b> .....	48
<b>3.8.4. Preparación del extracto alcohólico seco</b> .....	49
<b>3.8.5. Estandarización del inóculo microbiano</b> .....	49

<b>3.8.6. Inoculación en placas de 96 pocillos</b> .....	50
<b>3.8.7. Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC)</b> .....	51
<b>3.8.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)</b> .....	51
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	53
4.1. Identificación de la especie vegetal .....	53
4.2. Determinación de humedad .....	54
4.3. Rendimiento de extracción de aceite esencial .....	55
4.4. Obtención de extractos.....	56
<b>4.4.1. Extracto acuoso</b> .....	56
<b>4.4.2. Extracto hidroalcohólico</b> .....	56
<b>4.4.3. Extracto alcohólico</b> .....	56
4.5. Tamizaje fitoquímico .....	57
<b>4.5.1. Metabolitos Primarios</b> .....	60
.....	63
<b>4.5.2. Metabolitos Secundarios</b> .....	63
4.6. Composición química del aceite esencial (GC-MS).....	70
4.7. Actividad antimicrobiana frente a <i>C. albicans</i> .....	73
<b>4.7.1. Resultados cuantitativos de inhibición</b> .....	74
4.8. Actividad antimicrobiana frente a <i>E. coli</i> .....	76
<b>4.8.1. Resultados cuantitativos de inhibición</b> .....	76
4.9. Discusión general de resultados.....	78
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	81

5.1. Conclusiones .....	81
5.2. Recomendaciones .....	82
Referencias bibliográficas .....	84
Anexos .....	99

## Abreviaturas

AE	Aceite esencial
CMI	Concentración mínima inhibitoria
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
GC-MS	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
IC <sub>50</sub>	Concentración de inhibición media
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
EAU	Extracción asistida por ultrasonido

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Mapa de distribución geográfica de <i>Gustavia angustifolia</i> en Sudamérica ...	11
<b>Figura 2.</b> Hojas de <i>G. angustifolia</i> .....	13
<b>Figura 3.</b> Esquema del proceso de destilación por arrastre con vapor para la obtención de aceites esenciales. ....	16
<b>Figura 4.</b> Comparación estructural entre <i>Escherichia coli</i> y <i>Candida albicans</i> . ....	29
<b>Figura 5.</b> Procedimiento gráfico de microdilución en placas multipocillo. ....	30
<b>Figura 6.</b> Localización de la zona de recolección de las hojas de <i>Gustavia angustifolia</i> . .....	32
<b>Figura 7.</b> Hojas sanas de <i>G. angustifolia</i> seleccionadas .....	33
<b>Figura 8.</b> Secado del material vegetal en estufa. ....	34
<b>Figura 9.</b> Equipo Clevenger utilizado para la obtención de aceite esencial. ....	35
<b>Figura 10.</b> Extracto en baño ultrasónico.....	37
<b>Figura 11.</b> Filtración de los extractos acuosos, hidroalcohólico y alcohólico.....	38
<b>Figura 12.</b> Diagrama secuencial general para la identificación de Carbohidratos en hojas de <i>Gustavia angustifolia</i> .....	41
<b>Figura 13.</b> Representación esquemática de las reacciones obtenidas en los ensayos de Biuret y Peroxidasa para la identificación de proteínas. ....	42
<b>Figura 14.</b> Representación esquemática de las reacciones colorimétricas obtenidas en los ensayos de Mayer, Wagner y Dragendorff para la identificación de Alcaloides.....	44
<b>Figura 15.</b> Representación esquemática de las reacciones colorimétricas obtenidas del ensayo de Cloruro férrico para la identificación de Fenoles. ....	45
<b>Figura 16.</b> Representación esquemática de las reacciones colorimétricas obtenidas de los ensayos de Espuma y Peróxido para la identificación de Saponinas.....	46

<b>Figura 17.</b> Representación esquemática de las reacciones colorimétricas obtenidas del ensayo de Salkowski para la identificación de Terpenoides. ....	46
<b>Figura 18.</b> Representación esquemática de las reacciones colorimétricas obtenidas del ensayo de KOH para la identificación de Cumarinas.....	47
<b>Figura 19.</b> Representación esquemática de las reacciones colorimétricas obtenidas del ensayo de Baljet para la identificación de Lactonas sesquiterpénicas.....	47
<b>Figura 20.</b> Absorbancia de la solución salina con E.coli constatando la escala McFarland.....	50
<b>Figura 21.</b> Distribución de aceite, extractos, y controles en la placa de 96 pocillos.....	50
<b>Figura 22.</b> Equipo Multiskan™ FC 96 and 384-well Plate Microplate Photometers. ...	52
<b>Figura 23.</b> Comparación de las hojas de <i>G. angustifolia</i> en la aplicación INaturalist...	53
<b>Figura 24.</b> Extractos acuoso, hidroalcohólico y alcohólico obtenidos a partir del material vegetal, donde se observan diferencias en la coloración según el solvente empleado.....	57
<b>Figura 25.</b> Resultados obtenidos de la prueba de carbohidratos correspondiente a cada ensayo realizado. ....	61
<b>Figura 26.</b> Resultados obtenidos de la prueba de Proteínas correspondiente a cada ensayo realizado. ....	62
<b>Figura 27.</b> Resultados obtenidos de la prueba de Lípidos correspondiente a cada ensayo realizado. ....	63
<b>Figura 28.</b> Resultados obtenidos de la prueba de Alcaloides correspondiente a los ensayos realizados. ....	64
<b>Figura 29.</b> Resultados obtenidos de la prueba de Fenoles correspondiente al ensayo realizado. ....	65

<b>Figura 30.</b> Resultados obtenidos de la prueba de Saponinas correspondiente a los ensayos realizados. ....	66
<b>Figura 31.</b> Resultados obtenidos de la prueba de Terpenos correspondiente a los ensayos realizados. ....	67
<b>Figura 32.</b> Resultados obtenidos de la prueba de Cumarinas correspondiente al ensayo realizado. ....	68
<b>Figura 33.</b> Resultados obtenidos de la prueba de Cumarinas correspondiente al ensayo realizado. ....	69
<b>Figura 34.</b> Cromatograma de iones totales (TIC) del aceite esencial de hojas de <i>G. angustifolia</i> .....	71

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> División taxonómica de <i>G. angustifolia</i> .....	12
<b>Tabla 2.</b> Solubilidad y Polaridad de los diferentes grupos metabolitos primarios. ....	21
<b>Tabla 3.</b> Solubilidad y Polaridad de los diferentes grupos de metabolitos secundarios	21
<b>Tabla 4.</b> Ensayos realizados para la identificación de distintos metabolitos primarios y secundarios. ....	38
<b>Tabla 5.</b> Criterio de observación de la prueba de solubilidad .....	42
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de crecimiento de los microorganismos .....	48
<b>Tabla 7.</b> Características morfológicas de las hojas de <i>G. angustifolia</i> . ....	53
<b>Tabla 8.</b> Resultados de los ensayos para detectar metabolitos primarios .....	57
<b>Tabla 9.</b> Resultados de los ensayos para detectar metabolitos secundarios. ....	59
<b>Tabla 10.</b> Perfil fitoquímico semi-cuantitativo del aceite esencial de <i>G. angustifolia</i> ..	72
<b>Tabla 11.</b> Efecto inhibitorio de <i>G. angustifolia</i> frente a <i>Candida albicans</i> .....	75
<b>Tabla 12.</b> Efecto inhibitorio de <i>G. angustifolia</i> frente a <i>E. coli</i> .....	77

## Índice de anexos

<b>Anexo 1.</b> Resultados de la placa de 96 pocillos de <i>C. albicans</i> .....	99
<b>Anexo 2.</b> Resultados de la placa de 96 pocillos de <i>E. coli</i> .....	99
<b>Anexo 3.</b> Absorbancias de la placa de <i>C. albicans</i> .....	99
<b>Anexo 4.</b> Absorbancias de la placa de <i>E. coli</i> .....	100

## 1. INTRODUCCIÓN

La familia Lecythidaceae cuenta con unos 25 géneros y 400 especies identificadas, distribuidas en la región pantropical, en los trópicos de América Central y del Sur, el Sudeste Asiático y África. Las especies de esta familia son ricas en compuestos bioactivos como triterpenoides, flavonoides, esteroides y alcaloides. Estos compuestos contribuyen a diversas actividades farmacológicas, incluyendo propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatorias y antioxidantes (Leandro de França Ferreira et al., 2021).

La diversa gama de metabolitos secundarios presentes en las plantas Lecythidaceae es prometedora para el desarrollo de nuevos fármacos. Un ejemplo de ello es el extracto metanólico de *Cariniana rubra*, el cual es una especie de esta familia, y ha mostrado una importante actividad antiinflamatoria relacionada con la presencia de ácido gálico y terpenos (Silva et al., 2021).

De manera similar, *Couroupita guianensis* exhibe una amplia gama de actividades terapéuticas, incluyendo propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y antitumorales, atribuidas a compuestos como la isatina, la triptantrina y la indirrubina (Sheba & Anuradha, 2020)

En otro estudio, se consideró la especie *Napoleonaea imperialis* (Lecythidaceae) de la cual se logró extraer aceite esencial a partir del epicarpo del fruto, alcanzando un rendimiento del 0.4% mediante la técnica de hidrodestilación con un aparato Clevenger, demostrando la presencia de compuestos volátiles en las plantas de esta familia (Jack et al., 2020). Por otro lado, los aceites esenciales han demostrado eficacia contra cepas microbianas resistentes a los medicamentos, que a menudo son difíciles de tratar con antibióticos convencionales (Tariq et al., 2019).

A pesar de su importancia y de la cantidad de metabolitos presentes, muchas especies de Lecythidaceae siguen siendo poco estudiadas, en particular su potencial farmacológico y sus funciones ecológicas (Catenacci & Simon, 2017).

En este contexto, encontramos a la especie *Gustavia angustifolia*, una especie nativa del bosque seco tropical que se distribuye por varias provincias de la costa ecuatoriana, y del sur de Colombia (Horstman et al., 2018).

Existe un único estudio que evalúa la actividad antimicrobiana de *G. angustifolia*, donde se identificó varios metabolitos secundarios en los extractos acuoso, hidroalcohólico y alcohólico de esta especie, incluidos alcaloides, taninos y terpenoides, que son conocidos por sus posibles propiedades antimicrobianas (María et al., 2018).

En vista de la poca exploración que posee esta especie, y visto su gran potencial, se decide abordar el estudio de *Gustavia angustifolia* extrayendo su aceite esencial, identificando sus metabolitos secundarios, y poniendo a prueba su actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

*E. coli* es un patógeno común que puede causar infecciones graves en humanos y animales. Su prevalencia en diversos entornos, como el alimentario y el clínico, la convierte en un objetivo relevante para los estudios antimicrobianos (López Engracia & Rodríguez Andaluz, 2022).

La capacidad de *E. coli* para desarrollar resistencia a múltiples fármacos resalta la necesidad de tratamientos alternativos, como los aceites esenciales, que han demostrado prometedoras propiedades antibacterianas (Jain et al., 2024)

Por su parte, *C. albicans* es un patógeno oportunista importante responsable de la mayoría de las infecciones fúngicas en humanos, en especial en individuos inmunodeprimidos (Zadeh et al., 2022). Su capacidad para formar biopelículas y desarrollar resistencia a los

tratamientos antimicóticos convencionales lo convierte en un objetivo crítico para probar nuevos agentes antimicrobianos (Olaifa et al., 2021).

A diferencia de los extractos polares ya estudiados en *G. angustifolia* (María et al., 2018), los aceites esenciales ofrecen una alternativa biotecnológica debido a su capacidad para atravesar membranas lipídicas de patógenos resistentes (Tariq et al., 2019). Sin embargo, surge la interrogante de si la potencia antimicrobiana de esta especie reside tan solo en su fracción volátil o si depende de la sinergia con otros metabolitos secundarios no volátiles.

### **Pregunta de investigación**

¿Posee el aceite esencial de *Gustavia angustifolia* actividad antimicrobiana?

## 1.1. Objetivos

### 1.1.2. Objetivo General

Evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Membrillo (*Gustavia angustifolia*) mediante la técnica de microdilución para su aprovechamiento biotecnológico.

### 1.1.3. Objetivos específicos

1. Caracterizar los metabolitos secundarios del aceite esencial a través de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).
2. Identificar los grupos de metabolitos secundarios adicionales a la composición de aceites esenciales de *Gustavia angustifolia* mediante un tamizaje fitoquímico cualitativo de sus extractos.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Gustavia angustifolia* mediante el método de microdilución en placa frente *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

## 1.2. Hipótesis

Hipótesis nula: El aceite esencial obtenido de *Gustavia angustifolia* posee actividad antimicrobiana.

Hipótesis alternativa: El aceite esencial obtenido de *Gustavia angustifolia* no posee actividad antimicrobiana.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Plantas medicinales y Productos naturales**

#### **2.1.1. Uso tradicional y científico de las plantas medicinales**

Aunque no se ha determinado con exactitud cuando comenzó la utilización de las plantas como recursos terapéuticos natural, varios documentos históricos muestran que su uso se remonta a épocas muy antiguas. Estas plantas fueron empleadas con propósitos curativos y medicinales, orientados tanto a la prevención como al tratamiento de diversas afecciones que afectaban al ser humano, entre ellas enfermedades gastrointestinales, respiratorias y urinarias, entre otras (Miranda & Marin, 2022).

La medicina natural se fundamenta principalmente en las comunidades rurales a nivel mundial, especialmente en países en desarrollo, donde los saberes y prácticas tradicionales con fines curativos o paliativos desempeñan un rol fundamental en el cuidado de la salud humana (Miranda & Marin, 2022).

En este contexto, la Organización mundial de la Salud (OMS) señala que aproximadamente el 80% de la población de los países en desarrollo recurren principalmente a la medicina tradicional basada en plantas medicinales para cubrir sus necesidades de bienestar y atención primaria de salud. Según la OMS, los medicamentos herbarios incluyen materiales vegetales, preparaciones y productos finales que contienen como principios activos un conjunto de metabolitos secundarios obtenidos de distintas partes de las plantas. Su uso se encuentra ampliamente respaldado por la literatura científica, reconociéndose su seguridad y eficacia en múltiples contextos terapéuticos (Bermúdez-del Sol et al., 2025).

### **2.1.2. Productos naturales en Biotecnología**

Los fitofármacos se fundamentan en el uso de plantas medicinales a las que se les han aplicado procesos tecnológicos estandarizados con el fin de garantizar su calidad, eficacia y comercialización. El empleo terapéutico de estas plantas se sustenta en tres pilares fundamentales: la eficacia demostrada, el conocimiento tradicional y la evidencia proveniente de investigaciones preclínicas. En cuanto a seguridad, estos productos deben cumplir múltiples exigencias mediante ensayos y estudios preclínicos que garanticen su inocuidad. Asimismo, es indispensable que se ajusten a normas internacionales de calidad, de modo que el producto final llegue a la población de forma segura y confiable, estos aspectos constituyen la base científica sobre la cual debe establecerse el uso de un producto de origen vegetal destinado a una indicación médica específica (Alarcón et al., 2022).

De manera general, la biotecnología puede definirse como la aplicación de conocimientos y técnicas que implican el uso de organismos vivos o de sus componentes para la obtención de una amplia gama de productos. Esta disciplina integra saberes provenientes de áreas como la biología, química, bioquímica, microbiología y genética, entre otras ciencias. En la actualidad, la industria emplea la biotecnología para desarrollar nuevos productos, optimizar procesos productivos y ofrecer servicios más eficientes (Vazquez, 2020).

Un producto natural puede definirse como una sustancia química presente en plantas, hongos, bacterias u otros organismos, utilizada en beneficio del ser humano en diferentes sectores. La mayoría de los productos naturales de uso cotidiano provienen principalmente de plantas empleadas en la medicina tradicional, las cuales suelen consumirse en forma de infusiones o té con el propósito de obtener efectos favorables sobre la salud (Vazquez, 2020).

No obstante, muchos de los compuestos naturales presentes en las plantas se encuentran en concentraciones muy bajas, por lo que, cuando un producto natural muestra potencial terapéutico, su extracción y la producción de la fuente vegetal a gran escala representan un desafío para satisfacer la demanda (Vazquez, 2020), este crecimiento del sector se ha visto impulsado por una mayor inversión en investigación y desarrollo dentro del campo de la farmacognosia, toxicología y los estudios de farmacología preclínica y clínica. Estos avances permiten identificar y cuantificar compuestos químicos en las plantas haciendo posible la obtención de fitofármacos seguros y eficaces (Alarcón et al., 2022).

Por otro lado, la biodiversidad y los recursos naturales se han convertido en elementos estratégicos para el desarrollo de los países, ya que constituyen fuentes de materias primas esenciales para la vida humana y desempeñan un papel determinante en el equilibrio de los ecosistemas. Estos recursos aportan servicios ambientales fundamentales, como la descomposición de suelos, el control de plagas, la regulación de la contaminación, el mantenimiento del ciclo hidrológico, la degradación de materia orgánica, la absorción de carbono y la mitigación de inundaciones, entre otros. A pesar de su importancia, en los últimos años se ha registrado una disminución drástica de la biodiversidad, como consecuencia del deterioro ambiental y del cambio climático (Alarcón et al., 2022).

En este escenario, la biotecnología aplicada a los productos naturales adquiere especial relevancia, debido a que se identifica un compuesto de interés, se buscan alternativas para incrementar y acelerar su producción. Esta rama de las ciencias puede explicar estrategias orientadas a promover el crecimiento vegetal, optimizar la producción y concentración de compuestos químico deseado o emplear microorganismos para la síntesis de productos naturales o de sus derivados, con propiedades similares o incluso mejoradas respecto al compuesto original (Vazquez, 2020).

Los procesos biotecnológicos aplicados a la obtención de productos naturales tienen como objetivo perfeccionar los métodos de producción y extracción de sustancias químicas mediante el uso de estrategias sostenibles y respetuosas con el medio ambiente (Vazquez, 2020).

### **2.1.3. Relevancia etnobotánica de las plantas medicinales en el Ecuador**

En el Ecuador, el estado ha impulsado políticas orientadas al fortalecimiento de la salud intercultural, promoviendo la integración progresiva de la medicina ancestral y alternativa dentro del sistema nacional de salud. Estas políticas contemplan la formulación e implementación de protocolos con un enfoque integral, aplicables tanto en el ámbito público como privado (Bermúdez-del Sol et al., 2025).

Particularmente en las zonas rurales del país, el uso de plantas medicinales continúa siendo una práctica terapéutica predominante. Factores como la escasa disponibilidad de medicamentos industrializados, los elevados costos y la distancia a los centros de atención sanitaria han favorecido la permanencia de la medicina herbaria en estas comunidades (Bermúdez-del Sol et al., 2025). En este contexto, la evaluación científica de especies vegetales con potencial bioactivo representa una alternativa viable para fortalecer estrategias de salud local y promover el aprovechamiento sostenible de biodiversidad.

No obstante, las investigaciones etnobotánicas desarrolladas en Ecuador se han concentrado mayoritariamente en la región andina central y en la Amazonía. En general, estos estudios se han enfocado en la identificación de especies utilizadas por comunidades locales o en la descripción de sistemas de salud tradicional en contextos indígenas (Cocarico et al., 2025). Gracias a su notable biodiversidad, Ecuador se posiciona como un territorio estratégico para el desarrollo de investigaciones y aplicaciones fitoterapéuticas. El país alberga cerca de 432 especies medicinales, de las cuales 273 se

comercializan en hierberías de mercados locales, 255 son de origen silvestre y 92 se encuentran tanto en entornos comerciales como naturales (Bermúdez-del Sol et al., 2025).

El interés por las plantas medicinales ha traspasado el ámbito de los países en vías de desarrollo y se ha extendido a naciones con sistemas sanitarios consolidados. Por ejemplo, en Europa se calcula que alrededor de un tercio de las personas que viven en países como Alemania, España y Francia emplean plantas para fines terapéuticos; esto demuestra una tendencia constante hacia la revalorización del saber tradicional (Bermúdez-del Sol et al., 2025).

## **2.2. *Gustavia angustifolia* (Membrillo de monte)**

### **2.2.1. Distribución geográfica y ecología**

De acuerdo con Bosque y Vegetación Protector Prosperina – ESPOL (s. f.), *Gustavia angustifolia* presenta una distribución principalmente restringida al occidente del Ecuador (Figura 1) y se localiza de forma natural en ecosistemas de bosque seco. Ha sido registrada especialmente en las provincias de Guayas y Manabí. De igual manera, se ha reportado su presencia en otras provincias del país como Esmeraldas y Los Ríos (Morán del Pozo et al., 2023, p. 107), esto sugiere una distribución regional más amplia dentro de la franja costera ecuatoriana.

Fuera del territorio ecuatoriano, existen antecedentes de su registro en Colombia (Figura 1), específicamente en el departamento del Valle del Cauca en 1979 y posteriormente en Antioquia en 2011 (Morán del Pozo et al., 2023, p. 107). Esta distribución geográfica resalta la importancia de la especie tanto desde el punto de vista ecológico como biogeográfico, especialmente en el contexto de la conservación de la flora endémica y el aprovechamiento sostenible de sus recursos naturales.



**Figura 1.** Mapa de distribución geográfica de *Gustavia angustifolia* en Sudamérica

### **2.2.2. Descripción botánica de *Gustavia angustifolia***

*Gustavia angustifolia* pertenece a la familia Lecythidaceae y es conocida comúnmente como membrillo, membrillo de monte o membrillo de montaña cuya taxonomía se describe en la Tabla 1. Se trata de un arbusto o árbol que puede alcanzar hasta los 8 metros de altura, caracterizado por presentar flores conspicuas, generalmente de color rosado y en ocasiones, blancas; así como frutos indehiscentes (Cornejo, 2015).

**Tabla 1.** *División taxonómica de G. angustifolia*

<i>Nombre Científico</i>	<i>Gustavia angustifolia</i>
<i>Reino</i>	Plantae
<i>Filo</i>	Tracheophyta
<i>Subfilo</i>	Angiospermae
<i>Clase</i>	Magnoliopsida
<i>Orden</i>	Ericales
<i>Familia</i>	Lecythidaceae
<i>Género</i>	<i>Gustavia</i>
<i>Especie</i>	<i>Gustavia angustifolia</i>

Se considera una de las primeras plantas vasculares colectadas tanto en Guayaquil como en el Ecuador. Su descubrimiento se remonta a octubre de 1790, cuando el naturalista checo Taddaeus Haenke exploró la ciudad. En el herbario del jardín botánico de Nueva York se conserva un duplicado de la colección realizada por Haenke en Guayaquil con dicha fecha. En la actualidad, las poblaciones de *Gustavia angustifolia* se encuentran distribuidas en áreas de conservación como el Bosque Protector Cerro Blanco y el Bosque Protector Prosperina, así como en zonas aledañas como Cerro Azul y Cerro Colorado, donde persisten poblaciones naturales de la especie. La madera de su fuste es utilizada para la elaboración de mangos de herramientas, principalmente palas, mientras que sus frutos forman parte de la dieta de la ardilla de Guayaquil, lo que evidencia su importancia en las interacciones tróficas locales (Cornejo, 2015).

*Gustavia angustifolia* presenta hojas simples de disposición alterna, generalmente de forma elíptica a oblarga, con márgenes enteros y ápice agudo a ligeramente acuminado como se observa en la **Figura 2**. Estas hojas poseen una textura coriácea a subcoriácea y

una coloración verde intenso, características que contribuyen a su adaptación a las condiciones del bosque seco costero ecuatoriano. La morfología foliar y su resistencia fisiológica resaltan el potencial de la especie para programas de restauración ecológica y conservación de la biodiversidad.



**Figura 2.** Hojas de *G. angustifolia*

### **2.2.3. Estudios fitoquímicos reportados**

Los estudios fitoquímicos sobre *Gustavia angustifolia* en el Ecuador son aún limitados; sin embargo, algunas investigaciones recientes aportan información relevante acerca del género *Gustavia*, como es el caso de *Gustavia macarenensis*. Uno de los trabajos más representativos tuvo como objetivo estudiar a nivel botánico y fitoquímicos, el fruto de esta especie procedente de la provincia de Orellana (Elizabeth, 2020).

A pesar de la escasez de antecedentes nacionales, se reporta un estudio previo realizado en la provincia de Pastaza por la Universidad Estatal Amazónica, en el cual se evidencio

que los frutos de *G. macarenensis* constituye una buena fuente de aceite vegetal (Elizabeth, 2020).

Desde el punto de vista fitoquímicos, los frutos de *G. macarenensis* presentan una composición lipídica relevante, destacando el ácido graso palmítico, así como la presencia de ácidos grasos omega 6 y 9. Estos compuestos se asocian con beneficios para la salud, especialmente en la prevención de enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico y diabetes tipo II (Elizabeth, 2020).

El género *Gustavia* presenta un uso etnomedicinal importante. Se ha reportado que las hojas jóvenes son utilizadas en forma de emplastos por la tribu Palikur, en la Guayana Francesa, para el tratamiento de trastorno de la piel, leishmaniosis y malaria (Elizabeth, 2020).

En conjunto, los estudios disponibles evidencia que *G. macarenensis* posee un perfil fitoquímico dominado por lípidos y ácidos grasos de interés biológico, así como un uso tradicional relevante; no obstante, la limitada cantidad de investigaciones resalta la necesidad de profundizar en la caracterización fitoquímica y en la evaluación de las actividades biológicas de este género (Elizabeth, 2020).

## **2.3. Aceites esenciales**

### **2.3.1. Definición y características fisicoquímicas**

Las fragancias constituyen un componente relevante en el atractivo de numerosos productos de uso cotidiano, ya que los aromas influyen directamente en la percepción, eficacia y aceptación por parte del usuario. El aroma representa una de las principales características sensoriales consideradas al momento de seleccionar diversos bienes de consumo (Sharmeen et al., 2021).

Entre las fragancias de origen natural, los aceites esenciales (AE) destacan por su elevada aceptación y valor funcional. Los AE corresponden a mezclas aromáticas complejas obtenida a partir de diversas especies vegetales, cuya composición puede incluir más de 200 compuestos químicos diferentes. Sus principales constituyentes bioactivos son los terpenos y terpenoides, responsables de múltiples propiedades biológicas como la actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante (Pezantes-Orellana et al., 2024). Su popularidad ha aumentado en sectores como la industria alimentaria, la farmacología natural, la aromaterapia y otras aplicaciones industriales respondiendo a una preferencia cada vez mayor por ingredientes botánicos naturales, posicionando a los aceites esenciales entre los productos vegetales de mayor valor en el mercado actual (Etheridge & Mason, 2021).

Desde el punto de vista ecológico, las plantas sintetizan AE como parte de sus mecanismos de defensa y comunicación, actuando estos compuestos como repelentes o atractivos de insectos, inhibidores del crecimiento de especies competidoras y agentes antimicrobianos, además de intervenir en procesos de señalización química y respuesta inmunitaria vegetal (Sharmeen et al., 2021). Estas funciones naturales explican en gran medida su eficacia biológica cuando son aplicados en productos destinados al cuidado de la salud y al bienestar humano.

Los AE se obtienen mediante diversas técnicas de extracción, entre las que se incluyen la destilación por arrastre de vapor. Debido a su complejidad química, fragancia y origen natural, se integran en formulaciones biotecnológicas, donde destacan como conservantes gracias a su actividad antimicrobiana individual o sinérgica frente a bacterias y hongos (Sharmeen et al., 2021).

El creciente interés por los aceites esenciales se refleja en su demanda global, que en 2020 alcanzó las 247 kt. Se proyecta un crecimiento anual del 7,5% hasta 2027, impulsado por la tendencia hacia productos naturales de salud y bienestar (Etheridge & Mason, 2021).

### 2.3.2. Extracción de aceites esenciales por destilación

La destilación constituye un método físico de separación ampliamente empleado para aislar compuestos volátiles, como los aceites esenciales a partir de material vegetal. Este proceso se basa en el calentamiento de una mezcla líquida hasta que uno o varios de sus componentes más volátiles pasan a la fase de vapor y posteriormente, en la condensación de dichos vapores para lograr su recuperación (**Figura 3**). Dentro de este contexto, la destilación por arrastre de vapor de agua representa una de las técnicas más utilizadas tanto a nivel de laboratorio como a nivel industrial para la obtención de aceites esenciales (Cedeño et al., 2019).



**Figura 3.** Esquema del proceso de destilación por arrastre con vapor para la obtención de aceites esenciales.

**Fuente:** Breitenfeld (2020)

En este tipo de destilación intervienen dos líquidos inmiscibles: el agua y el aceite esencial, los cuales no se disuelven entre sí, por lo que la presión de vapor de uno no se ve afectada por la presencia del otro. El principio fundamental del proceso radica en que la mezcla entra en ebullición cuando la suma de las presiones de vapor de ambos

componentes alcanza la presión atmosférica. Como consecuencia, el punto de ebullición de la mezcla es inferior al del compuesto con menor punto de ebullición considerado de manera aislada, lo que permite volatilizar sustancias que normalmente requerirían temperaturas elevadas (Reyes Deloso et al., 2024).

Durante la destilación, el material vegetal es expuesto al agua hirviendo o al vapor, lo que provoca la liberación de los aceites esenciales por evaporación. Estos vapores son conducidos hacia un sistema de enfriamiento, donde se condensan y forman una mezcla líquida de agua y AE. Debido a la diferencia de densidades y a su inmiscibilidad, el aceite esencial es generalmente más ligero, este se separa y se suspende sobre la fase acuosa, facilitando su recolección (BÜCHI Labortechnik AG, s. f.).

La eficiencia y el rendimiento del proceso de destilación por arrastre de vapor dependen de varios factores operativos y de calidad, entre los que destacan la duración del tiempo de destilación, la temperatura, la presión de funcionamiento y de manera determinante, el rendimiento y calidad del material vegetal empleado. Los compuestos que conforman los aceites esenciales suelen presentar puntos de ebullición elevados en el rango de 200 a 300 °C; sin embargo, gracias al principio de las presiones de vapor combinadas, es posible su extracción a temperaturas más bajas, evitando su degradación térmica. Por estas razones, la destilación por arrastre de vapor de agua se ha consolidado como uno de los principales métodos industriales para la obtención de aceites esenciales de origen vegetal (Reyes Deloso et al., 2024; Chemat & Boutekedjiret, 2015; Cedeño et al., 2019).

### 2.3.3. Composición química de los aceites esenciales

Los AE también denominados esencias o aceites volátiles, son mezclas naturales y complejas de compuestos orgánicos volátiles, lipofílicos y aromáticos presentes principalmente en plantas aromáticas como parte de su metabolismo secundario. A diferencia de los aceites fijos, los aceites esenciales no son grasas, sino concentrados fitoquímicos responsables del aroma y de diversas propiedades biológicas de las plantas (De Sousa et al., 2023; Liang et al., 2022).

Estas propiedades no dependen exclusivamente del componente presente en mayor proporción. Aunque los compuestos mayoritarios suelen ser los principales responsables de la actividad biológicas, los componentes minoritarios también cumplen un papel relevante, ya sea potenciando la acción de los compuestos dominantes o generando efectos aditivos o incluso antagonistas (De Sousa et al., 2023; Liang et al., 2022).

La mayoría de los AE son líquidos a temperatura ambiente, incoloros o de tonalidad amarillenta y generalmente menos densos que el agua, con excepciones de algunos aceites que sus componentes presentan bajo peso molecular inferior a 300 g/mol, algunos son ópticamente activos, solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos, como el éter, alcohol o acetona, e insolubles en agua, lo que condiciona tanto sus métodos de extracción como sus aplicaciones (Alex.Ramon, 2023; De Sousa et al., 2023).

Cada AE está constituido por un conjunto único de decenas a cientos de compuestos fitoquímicos naturales. Estos se originan a partir de distintos precursores metabólicos primarios y se forman mediante diversas rutas biosintéticas. Se agrupan en dos grandes categorías: terpenoides, que constituyen el grupo predominante y compuestos no terpenos, entre los que destacan los fenilpropanoides. Estructuralmente, estos compuestos incluyen hidrocarburos y sus derivados oxigenados y pueden presentarse como aldehídos,

cetonas, alcoholes, óxidos, ésteres, etc (Alex.Ramon, 2023; De Sousa et al., 2023; Liang et al., 2022).

La composición química de un AE varía en función de la parte de la planta de la que se obtenga, sea flores, hojas, raíces, corteza, frutos o semillas, lo que explica porque el aceite extraído de distintos órganos vegetales de una misma especie puede presentar perfiles químicos y propiedades diferentes. Por ello, el perfil químico completo de cada aceite esencial ofrece información clave para comprender su posible aplicación terapéutica y su utilidad en el tratamiento de estados o dolencias específicas (Reyes Deloso et al., 2024).

#### **2.3.4. Mecanismos de acción antimicrobiana de los metabolitos secundarios en Lecythidaceae.**

Las plantas que pertenecen a la familia Lecythidaceae son conocidas por generar una gran diversidad de metabolitos secundarios. Estos compuestos desempeñan roles ecológicos esenciales en la defensa contra patógenos y al mismo tiempo, muestran un notable potencial en el ámbito farmacológico. Dentro de los grupos destacados de metabolitos secundarios identificados en esta familia se incluyen los flavonoides, compuestos fenólicos, triterpenos, esteroides, sesquiterpenos y alcaloides, los cuales han sido vinculados con la actividad antimicrobiana en estudios fitoquímicos y farmacológicos (De França Ferreira et al., 2021).

La actividad antimicrobiana de estos metabolitos secundarios se debe a diversos mecanismos que alteran procesos vitales del microorganismo, destacando principalmente la pérdida de integridad en la membrana celular. Compuestos como triterpenos, esteroides y ciertos flavonoides poseen una naturaleza lipofílica que les permite interactuar con las bicapas lipídicas de bacterias y hongos. Esta interacción altera la permeabilidad de la membrana, provocando la pérdida de componentes intracelulares y, finalmente, la lisis o muerte celular (Cushnie & Lamb, 2011).

Otro mecanismo relevante se relaciona con la inhibición de enzimas fundamentales que participan en procesos metabólicos esenciales, como la creación de la pared celular, la generación de energía y la duplicación del ADN. Los flavonoides, alcaloides y otros compuestos fenólicos pueden asociarse con proteínas de los microorganismos, alterarlas o interferir con su función catalítica, lo que resulta en la inhibición del crecimiento y reproducción de los microorganismos (Daglia, 2011).

Asimismo, se ha reportado que compuestos fenólicos y flavonoides en especies como las Lecythidaceae interfieren con el quorum sensing, el sistema de comunicación celular microbiana. Esta interferencia inhibe la formación de biopelículas, estructuras que confieren resistencia a los microorganismos, potenciando así la eficacia antimicrobiana de los extractos vegetales (Vandeputte et al., 2011).

## **2.4. Extractos vegetales y tamizaje fitoquímicos**

### **2.4.1. Extractos vegetales: concepto e importancia**

Los extractos vegetales son complejos químicos obtenidas a partir de partes de las plantas como hojas, tallos, raíces, frutos y semillas, mediante procesos separación de fases. El objetivo principal es la desorción de metabolitos primarios y secundarios desde la matriz sólida hacia un solvente líquido. La eficiencia de este proceso depende de la afinidad química y la polaridad, factores que determinan la selectividad del extracto final (Angel, 2023; Biorizon Biotech, 2025).

La obtención de estos compuestos implica el uso de disolventes con diferentes constantes dieléctricas (agua, alcoholes, aceites o mezclas), permitiendo aislar principios activos mediante técnicas como maceración, infusión, decocción o fermentación (**Tabla 2**) (**Tabla 3**). La elección del método y el solvente define no solo el rendimiento, sino

también la bioactividad del producto, impactando directamente en sus aplicaciones terapéuticas e industriales (Biorizon Biotech, 2025; Kapiszka, 2024)

**Tabla 2.** Solubilidad y Polaridad de los diferentes grupos metabolitos primarios.

<b>Grupo Metabólico</b>	<b>Solubilidad/Polaridad</b>	<b>Técnica de obtención</b>
<b>Carbohidratos</b>	Muy polar (hidrofílicos)	Maceración
<b>Proteínas</b>	Polar (anfóteras)	Maceración
<b>Lípidos</b>	No polar (lipofílicos)	Maceración

**Tabla 3.** Solubilidad y Polaridad de los diferentes grupos de metabolitos secundarios

<b>Grupo Metabólico</b>	<b>Solubilidad/Polaridad</b>	<b>Técnica de obtención</b>
<b>Alcaloides</b>	Polaridad media-alta	Maceración
<b>Fenoles</b>	Polaridad media	Maceración
<b>Saponinas</b>	Polaridad intermedia	Maceración
<b>Terpenos</b>	No polar (lipofílicos)	Hidrodestilación
<b>Cumarinas</b>	Polaridad media	Maceración
<b>Lactonas sesquiterpénicas</b>	Baja a media polaridad	Maceración/Hidrodestilación

Entre las propiedades más relevantes de los extractos naturales se destacan su actividad antimicrobiana y antioxidante, convirtiéndolos en una alternativa de interés frente a compuestos sintéticos (Shahbaz et al., 2022; Kapiszka, 2024).

#### **2.4.1.1. Clasificación según el solvente de extracción**

##### **Extracto acuoso**

El agua, debido a su alta constante dieléctrica, es el solvente de elección para recuperar compuestos de alta polaridad. Aunque presenta rendimientos elevados en biomasa total, es selectivo para sustancias hidrosolubles como azúcares, algunos fenoles y glucósidos. Su uso es fundamental en estudios donde se busca evitar la toxicidad de solventes orgánicos, siendo ideal para aplicaciones alimentarias (Arya et al., 2025).

La extracción acuosa es fundamental para recuperar metabolitos de alta polaridad que han quedado confinados en la matriz celular tras el proceso de secado. El agua actúa mediante un mecanismo de difusión por hinchamiento; al rehidratar las fibras de la hoja seca, expande los poros de la pared celular, facilitando la desorción de carbohidratos solubles y glucósidos. Sin embargo, debido a la naturaleza coriácea de las hojas de algunas especies de la familia Lecythidaceae, el uso de agua puede extraer una carga elevada de polisacáridos estructurales y gomas, lo que genera extractos de alta viscosidad. Es crucial considerar que la ausencia de alcohol limita la capacidad de este solvente para solubilizar metabolitos secundarios que se encuentran en forma de agliconas, restringiendo el perfil fitoquímico a compuestos estrictamente hidrosolubles (Ngcobo & Mbuyisa, 2024).

##### **Extracto hidroalcohólico**

La mezcla de agua y etanol permite modular la polaridad del sistema, facilitando la extracción simultánea de compuestos polares y medianamente polares. La fracción

acuosa del solvente garantiza la rehidratación del tejido vegetal, mientras que la fracción etanólica reduce la constante dieléctrica del sistema, permitiendo la solvatación simultánea de metabolitos de polaridad intermedia como flavonoides, saponinas y taninos. En material seco tal como hojas, este solvente es particularmente eficiente para romper las interacciones de Van der Waals entre los metabolitos y la matriz de la hoja, logrando un mayor rendimiento de polifenoles totales en comparación con los solventes puros. Además, el etanol facilita la estabilidad del extracto al precipitar proteínas celulares remanentes que podrían interferir con las pruebas colorimétricas posteriores (Molina et al., 2022)

Es el estándar en fitoterapia por su capacidad de romper membranas celulares y estabilizar los solutos.

### **Extracto alcohólico**

Los alcoholes de cadena corta, como el etanol y el metanol, actúan como solventes orgánicos próticos que presentan una afinidad selectiva por compuestos de baja polaridad y estructuras lipofílicas. Su mecanismo de acción se centra en la capacidad de disrupción de las membranas lipídicas y la solubilización de agliconas (metabolitos secundarios sin fracciones de azúcar). A diferencia del agua, los solventes alcohólicos tienen una menor tensión superficial, lo que permite una penetración más profunda en los capilares de la biomasa seca. Desde el punto de vista teórico, la extracción alcohólica es esencial para el estudio de terpenos, esteroides, pigmentos fotosintéticos y compuestos fenólicos de bajo peso molecular, los cuales poseen una estructura química predominantemente hidrofóbica que impide su disolución en medios estrictamente acuosos (Kabra et al., 2019)

## **2.4.2. Tamizaje fitoquímico**

El tamizaje fitoquímico constituye el análisis cualitativo preliminar orientado a la determinación de las familias de metabolitos secundarios presentes en un tejido vegetal. En especies de la familia Lecythidaceae, este proceso es fundamental para caracterizar la diversidad química que sustenta su actividad biológica (Gupta et al., 2019). A diferencia de un análisis cuantitativo, el tamizaje fundamenta el estudio de la relación entre la polaridad de los solventes de extracción y la solubilidad de los principios activos, permitiendo predecir el potencial farmacológico de las hojas de *Gustavia angustifolia* basándose en la presencia de grupos funcionales específicos que reaccionan ante reactivos colorimétricos o de precipitación (De França Ferreira et al., 2021)

### **2.4.2.1. Metabolitos primarios**

Los extractos vegetales analizados evidenciaron la presencia de metabolitos primarios y secundarios, los cuales desempeñan funciones metabólicas esenciales en las plantas y están asociados a diversas actividades biológicas, incluyendo la actividad antimicrobiana.

#### **Carbohidratos**

Son metabolitos primarios formados por carbono, hidrogeno y oxígeno, responsables del almacenamiento emergentico y funciones estructurales en la célula vegetal. Los carbohidratos no son solo nutrientes; los polisacáridos complejos pueden actuar como agentes de adhesión que modifican la superficie celular de los patógenos o, en el caso de los glucósidos, facilitan la entrada de metabolitos secundarios al interior del microorganismo mediante transportadores de membrana específicos. (Taiz et al., 2023).

#### **Proteínas**

Las proteínas son macromoléculas constituidas por aminoácidos que cumplen funciones catalíticas, estructurales y regulatorias. Su comportamiento en los solventes de extracción

es crítico: en el extracto acuoso, es posible extraer proteínas globulares y enzimas hidrosolubles que mantienen su conformación nativa, lo que podría permitir una actividad catalítica residual. Los extractos hidroalcohólicos favorecen la solubilización de péptidos de bajo peso molecular que poseen un carácter anfipático, los cuales son de especial interés por su capacidad de interactuar con membranas biológicas. En el extracto alcohólico, la mayoría de las proteínas de gran tamaño sufren desnaturalización y precipitación, aunque se pueden recuperar péptidos hidrofóbicos específicos. La relevancia biológica radica en que ciertos péptidos actúan formando poros en la pared celular bacteriana o interfiriendo con la síntesis de proteínas del patógeno, complementando la acción de los metabolitos secundarios mediante mecanismos de citotoxicidad selectiva (Alzain et al., 2025).

### **Lípidos**

Su comportamiento en los solventes de extracción es crítico: en el extracto acuoso, se obtienen proteínas globulares y enzimas hidrosolubles que mantienen su conformación nativa, lo que podría permitir una actividad catalítica residual. En el extracto hidroalcohólico, se favorece la solubilización de péptidos de bajo peso molecular que poseen un carácter anfipático, los cuales son de especial interés por su capacidad de interactuar con membranas biológicas. En el extracto alcohólico, la mayoría de las proteínas de gran tamaño sufren desnaturalización y precipitación, aunque se pueden recuperar péptidos hidrofóbicos específicos. La relevancia biológica radica en que ciertos péptidos actúan formando poros en la pared celular bacteriana o interfiriendo con la síntesis de proteínas del patógeno, complementando la acción de los metabolitos secundarios mediante mecanismos de citotoxicidad selectiva (Yoon et al., 2018).

#### **2.4.2.2. Metabolitos Secundarios**

### **Alcaloides**

Son compuestos orgánicos nitrogenados de estructura cíclica, caracterizados por su elevada actividad biológica incluso en dosis bajas (Sulaiman et al., 2022). Actúan principalmente a nivel del ADN o de enzimas clave, inhibiendo la replicación celular o procesos metabólicos esenciales en los microorganismos (Yan et al., 2021).

### **Fenoles**

Incluyen un amplio grupo de compuestos caracterizados por la presencia de grupos hidroxilo unidos a anillos aromáticos. Ejercen su actividad mediante la desnaturalización de proteínas, inhibición enzimática y alteración de la membrana celular, además de su efecto antioxidante (Takó et al., 2020).

### **Saponinas**

Son glucósidos anfipáticos compuestos por una fracción hidrofílica y otra lipofílica. Interactúan con esteroides de la membrana celular, incrementando su permeabilidad y provocando lisis celular, especialmente en hongos y bacterias (Podolak et al., 2022).

### **Terpenos**

Son metabolitos secundarios derivados del isopreno y constituye componentes mayoritarios de aceites esenciales. Debido a su carácter lipofílico, se insertan en la bicapa lipídica de la membrana celular, aumentando su permeabilidad y provocando la fuga de iones y metabolitos esenciales, lo que conduce a la muerte celular (Fabio et al., 2024).

### **Cumarinas**

Son metabolitos fenólicos derivados de la vía del Shikimato y del ácido cinámico. Presenta actividad antimicrobiana al interferir con enzimas celulares y afectar la síntesis de ácidos nucleicos (Patil et al., 2023).

## **Lactonas sesquiterpénicas**

Son metabolitos secundarios derivados de terpenos que contienen un anillo lactónico altamente reactivo. Reaccionan con grupos sulfhídrico de proteínas y enzimas microbianas, alterando procesos celulares esenciales y generando efecto antimicrobiano (Amen et al., 2025).

### **2.5. Actividad antimicrobiana**

#### **2.5.1. Concepto de actividad antimicrobiana**

Se puede describir a un agente antimicrobiano como cualquier sustancia que tenga la capacidad de inhibir el crecimiento de los microorganismos o de destruirlos, impidiendo así la multiplicación de bacterias, hongos o mohos y la aparición de enfermedades, de acuerdo con la definición del National Cancer Institute (s.f.).

Esta capacidad de afectar la supervivencia y el aumento de poblaciones microbianas es fundamental para su relevancia en diversas áreas, que van desde la salud humana y la industria farmacéutica hasta la preservación de alimentos y la creación de nuevas formas de tratamiento (World Health Organization: WHO, 2023).

#### **2.5.2. Microorganismos de interés clínico y ambiental**

##### **2.5.2.1. *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es una bacteria que se encuentra comúnmente en el intestino de los seres humanos y otros animales, y tiene un carácter Gram-negativo. Sin embargo, algunos serotipos de esta bacteria pueden causar infecciones tanto en el sistema gastrointestinal como en otras partes del cuerpo. Estas infecciones pueden presentarse con diarrea, fiebre y, en casos graves, complicaciones sistémicas que constituyen un problema clínico significativo y común en grupos vulnerables. Asimismo, ciertas cepas han creado formas de resistencia a los antibióticos, como la generación de enzimas  $\beta$ -lactamasas de espectro

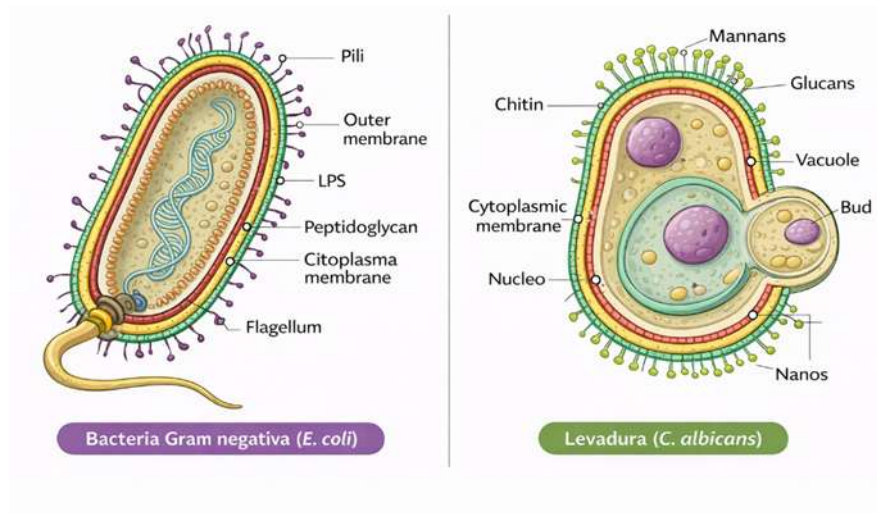
ampliado, lo que complica su tratamiento en contextos clínicos y ambientales (Yugsi et al., 2022).

#### **2.5.2.2. *Candida albicans***

*Candida albicans* es una levadura que aprovecha oportunidades y forma parte de los hongos comestibles que se establece en la piel y las membranas mucosas de los seres humanos. Aunque es parte del microbiota habitual, puede provocar desde candidiasis en mucosas hasta infecciones sistémicas en individuos con un sistema inmunológico debilitado. *C. albicans* se identifica con mayor frecuencia en infecciones fúngicas clínicas, y su habilidad para formar biofilms complejos les otorga una mayor resistencia a los tratamientos convencionales (Alvarez et al., 2024).

Ambos microorganismos son importantes no solo en el ámbito clínico, sino también en el medio ambiente, ya que su presencia en agua, alimentos o superficies puede señalar contaminación y un riesgo de transmisión. En ciertas situaciones relacionadas con el medio ambiente, *E. Coli* y *C. albicans* pueden unirse en biofilms mixtos que incrementan la resistencia a los antimicrobianos en comparación con cultivos individuales, lo que dificulta las estrategias de tratamiento convencionales (Eshima et al., 2022).

Las diferencias estructurales entre *Escherichia coli* y *Candida albicans* influyen directamente en su respuesta frente a agentes antimicrobianos. *E. coli* presenta una pared celular delgada de peptidoglicanos y una membrana externa rica en lipopolisacáridos, mientras que *C. albicans* posee una pared celular más compleja compuesta principalmente por quitina, glucanos y mananos. Estas diferencias se pueden observar en la **Figura 4**.



**Figura 4.** Comparación estructural entre *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

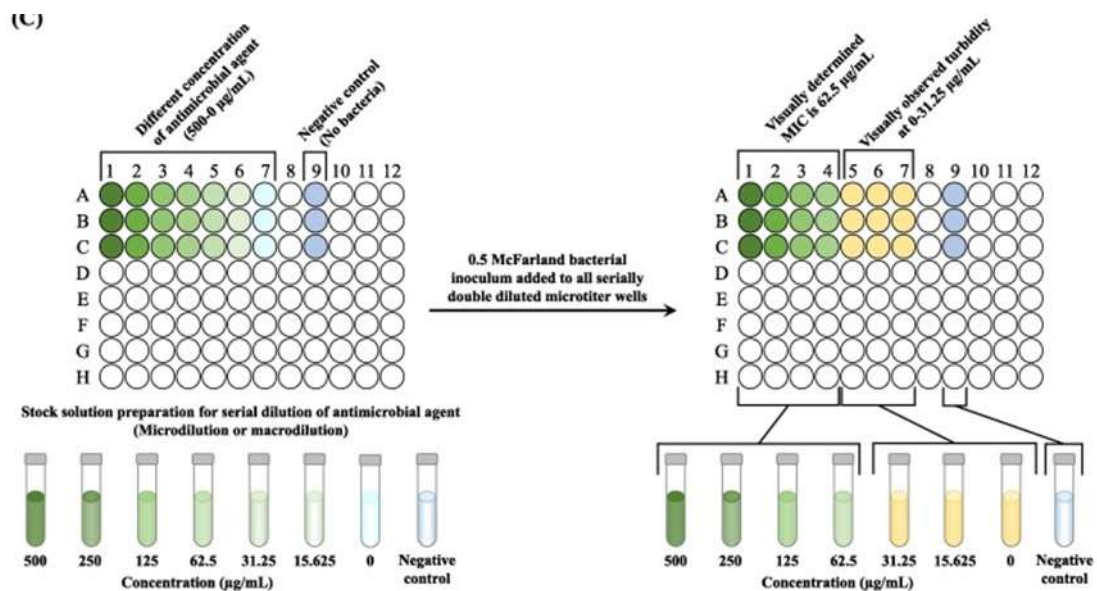
**Fuente:** Adaptado de Yahav et al. (2023) para *Escherichia coli* y en ScienceSource (s. f.) para *Candida albicans*.

### 2.5.3. Técnica de microdilución para evaluar la actividad antimicrobiana

La técnica de microdilución es un método estándar y cuantitativo utilizado para medir la actividad antimicrobiana de compuestos, extractos de plantas o aceites esenciales contra microorganismos como *E. coli* y *C. albicans*. Este método permite establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual se define como la menor cantidad de un agente que impide de manera visible el crecimiento microbiano después de la incubación en un medio líquido regulado. La medición de la CMI es esencial para evaluar la efectividad de varios agentes antimicrobianos y para fijar criterios cuantificables de actividad en condiciones de laboratorio (Balouiri et al., 2015).

En la práctica, la técnica se lleva a cabo en microplacas de 96 pozos, donde se colocan diluciones en serie del extracto u otro agente que se desea evaluar, en un medio de cultivo adecuado (Figura 5). Cada pozo se inocula con una suspensión estandarizada del microorganismo relevante y se mantiene en condiciones controladas (con temperatura y tiempo específicos). Después de esto, se examina el crecimiento o la falta de este. La

interpretación de los resultados se puede llevar a cabo mediante la observación visual de la turbidez o a través del empleo de indicadores colorimétricos cuando se necesita una mayor exactitud (Balouiri et al., 2015; Hulankova, 2024).



**Figura 5.** Procedimiento gráfico de microdilución en placas multipocillo.

Fuente: (Salam et al., 2023)

Este procedimiento es comúnmente empleado en investigaciones fitoquímicas por su alta reproducibilidad y capacidad de estandarización. Es aconsejado por entidades internacionales como el Clinical and Laboratory Standards Institute y el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing para pruebas de sensibilidad antimicrobiana en bacterias y levaduras. La microdilución facilita la comparación directa de los valores de la CMI entre sustancias puras, extractos y controles positivos de referencia. Esto simplifica la interpretación de los resultados y la comparación entre diferentes estudios (Balouiri et al., 2015).

Investigaciones recientes indican que el procedimiento de microdilución se ha utilizado de manera efectiva para medir la actividad antimicrobiana de extractos de plantas contra

bacterias Gram-negativas, como *E. Coli* y hongos como *C. albicans*, indicando que este método es apropiado tanto para sustancias hidrofílicas como para fracciones complejas de plantas (Hulankova, 2024).

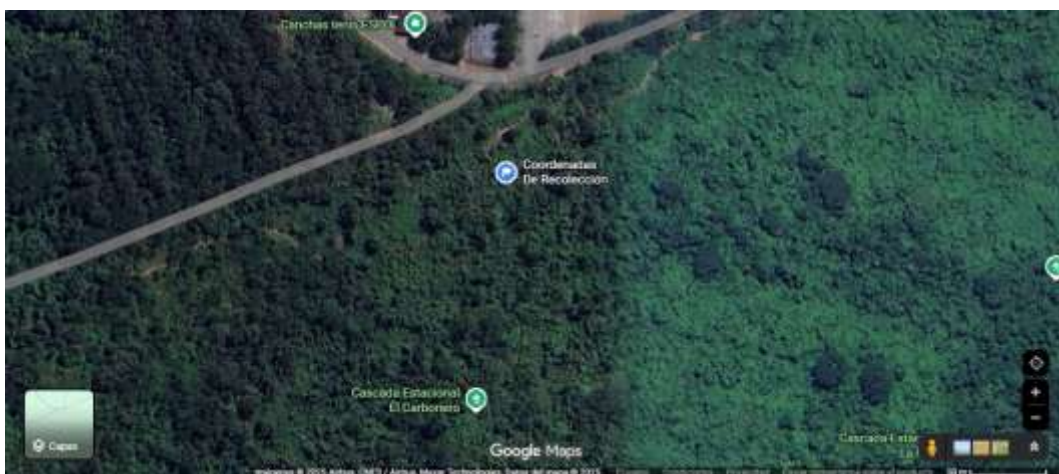
#### **2.5.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

La CMI se refiere a la menor cantidad de AE que puede detener el crecimiento de un microorganismo en un entorno de laboratorio. Este parámetro facilita la medición de la actividad antimicrobiana y es útil para guiar aplicaciones en la práctica; no obstante, en situaciones reales generalmente se necesitan concentraciones más altas que las establecidas en el laboratorio. Se establece al exponer al microorganismo a diversas diluciones del AE, las cuales se preparan en medios tanto líquidos como sólidos, junto con un inóculo que tenga un estándar definido. El ensayo abarca controles de crecimientos sin el uso de aceite esencial, así como controles positivos que incluyen antibióticos de referencia. En el caso de los métodos líquidos, se emplean controles negativos para descartar la posibilidad de contaminación (Hulankova, 2024).

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Localización e identificación de material vegetal

Las hojas de *G. angustifolia* fueron recolectadas en el Bosque Protector Prosperina ubicado en la parroquia Tarqui de la ciudad de Guayaquil, con las siguientes coordenadas geográficas: 2°09'18.5"S 79°57'32.0"W entre los meses de noviembre y enero del 2025-2026, correspondientes a la época de invierno (Fig. 4).



**Figura 6.** Localización de la zona de recolección de las hojas de *Gustavia angustifolia*.

**Fuente:** (Google Maps, 2025).

La identificación taxonómica se realizó mediante la plataforma de libre acceso iNaturalist, la cual permitió corroborar, a través de registros fotográficos, la identidad de los especímenes recolectados. El procedimiento experimental se desarrolló en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Guayaquil, Campus María Auxiliadora.

#### 3.2. Revisión del estado de las muestras

El control macroscópico de las muestras consistió en la selección de hojas sanas de *G. angustifolia*. Se establecieron como criterios de inclusión la ausencia de fitopatógenos y

de imperfecciones morfológicas visibles, garantizando la integridad del material biológico (Fig. 5).



*Figura 7. Hojas sanas de G. angustifolia seleccionadas*

### **3.3. Análisis fisicoquímico de las hojas**

#### **3.3.1. Determinación de humedad**

Para determinar el contenido de humedad de las hojas, se pesaron 450 g de las hojas frescas. Las muestras se sometieron a secado en estufa a 40 °C y fueron pasadas cada 24 horas hasta alcanzar el peso constante, lo cual ocurrió a las 48 horas, cuando permanecieron a un peso constante de 223.15 g. Para calcular la humedad de las hojas se empleó la siguiente formula:

$$\%Humedad = \frac{P_{húmedo} - P_{seco}}{P_{húmedo}} * 100$$

### 3.4. Tratamiento de las muestras

Las hojas recolectadas se lavaron con agua destilada para eliminar polvo e impurezas, y posterior se secaron en una estufa a 40 °C por 48 horas, con el fin de preservar los compuestos volátiles y evitar su degradación térmica (Fig.6).



*Figura 8. Secado del material vegetal en estufa.*

Una vez secas, las hojas fueron trituradas en licuadora hasta obtener un tamaño de partícula homogéneo. El material pulverizado se almacenó en frascos de vidrio ámbar herméticamente cerrados, en un lugar fresco y seco hasta su utilización.

### 3.5. Obtención de aceite esencial

La extracción del aceite esencial se realizó mediante el método de hidrodestilación empleando un aparato tipo Clevenger. Esta técnica se seleccionó por su capacidad para aislar compuestos volátiles sin la intervención de solventes orgánicos (Sareriya et al., 2023).

Para el proceso, se introdujeron 100 g de material vegetal seco y pulverizado en un matraz de fondo redondo con 1 L de agua destilada, sometiéndose a ebullición. Los vapores

generados arrastran los metabolitos volátiles, que se condensan y separan por diferencia de densidad en el brazo lateral del Clevenger (Fig. 7).

Los vapores resultantes arrastraron los metabolitos secundarios volátiles, los cuales, tras su condensación, fueron separados por diferencia de densidad en la columna lateral del equipo. El proceso se repitió varias veces hasta obtener suficiente cantidad de aceite esencial.



**Figura 9.** *Equipo Clevenger utilizado para la obtención de aceite esencial.*

La hidrodestilación se realizó durante 3 a 4 horas, o hasta que no se percibió un incremento en el volumen del aceite esencial, de acuerdo con los protocolos estandarizados de Barros et al. (2022). El aceite fue recolectado con pipetas Pasteur, y conservado en viales de vidrio ámbar a 4 °C para garantizar su estabilidad química hasta su análisis, y utilización.

### **3.6. Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC-MS)**

La caracterización de la composición química del aceite esencial se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Esta técnica

analítica permitió la identificación de los metabolitos volátiles mediante comparación de los espectros de masas obtenidos con los registros de bases de datos de referencia (El-Din et al., 2022), asegurando la precisión en la asignación estructural de los componentes.

Los parámetros de análisis (tipo de columna, temperatura del horno y flujo del gas portador) se ajustaron de acuerdo con las condiciones del laboratorio.

### **3.7. Elaboración de extractos mediante lixiviación asistida por ultrasonido (EAU) a partir de hojas de *Gustavia angustifolia*.**

#### **3.7.1. Obtención del extracto acuoso**

Se pesaron 20 g del material vegetal tratado de manera previa y se adicionaron 200 mL de agua destilada. La mezcla se sometió a extracción asistida por ultrasonido (EAU) en un baño ultrasónico marca Digital Pro a una temperatura de 40 °C, con una frecuencia de 40 kHz durante 40 minutos como se muestra en la **Figura 10**. Luego, el extracto se filtró al vacío mediante succión utilizando papel filtro y una bomba de vacío conectada al matraz a través de una manguera, para la remoción de impurezas como se muestra en la **Figura 11**. El extracto filtrado se almacenó en frascos ámbar y se mantuvo a 4°C durante 24 horas para su posterior uso.

#### **3.7.2. Obtención del extracto hidroalcohólico**

Se pesaron 20 g del material vegetal tratado de forma previa y se adicionaron 200 mL de una mezcla hidroalcohólica compuesta por 100 mL de agua destilada y 100 mL de etanol al 96%. La mezcla se sometió a EAU en un baño ultrasónico marca Digital Pro a 40 °C con una frecuencia de 40 kHz, durante 40 minutos como se muestra en la **Figura 10**. Posterior, el extracto fue filtrado al vacío mediante succión, empleando papel filtro y una bomba de vacío conectada al matraz a través de una manguera como se muestra en la

**Figura 11.** Por último, el extracto fue almacenado en un frasco ámbar a 4 °C durante 24 horas hasta su uso.

### 3.7.3. Obtención del extracto alcohólico

Se pesaron 20 g del material vegetal tratado y se adicionaron 200 mL de etanol al 96%. La mezcla fue sometida a EAU en un baño ultrasónico marca Digital Pro a 40 °C con una frecuencia de 40 kHz, durante 40 minutos como se muestra en la **Figura 10**. El extracto se filtró al vacío mediante succión, utilizando papel filtro y una bomba de vacío conectada al matraz a través de una manguera como se muestra en la **Figura 11**. El extracto obtenido se almacenó en un frasco ámbar, manteniéndose a 4°C durante 24 horas para su posterior análisis.

La metodología descrita se fundamenta en los protocolos para la obtención de compuestos bioactivos propuestos por Hernández-Rodríguez et al. (2020), aplicando ajustes menores en los tiempos de exposición y temperaturas para optimizar el rendimiento en función de las propiedades fisicoquímicas de *G. angustifolia*.



**Figura 10.** Extracto en baño ultrasónico.



**Figura 11.** Filtración de los extractos acuosos, hidroalcohólico y alcohólico.

### 3.8. Tamizaje fitoquímico

Con el propósito de determinar el perfil fitoquímico de los extractos (acuoso, hidroalcohólico y alcohólico), se llevaron a cabo diversos ensayos colorimétricos orientados a la identificación cualitativa de metabolitos secundarios y primarios. Para la interpretación de los resultados, se emplearon alícuotas de control de cada extracto con el fin de contrastar las variaciones cromáticas derivadas de las reacciones químicas. Todos los análisis se ejecutaron por triplicado, utilizando el extracto base como control negativo para asegurar la validez de las observaciones (**Tabla 4**).

### Clasificación de metabolitos y ensayos cualitativos realizados

**Tabla 4.** Ensayos realizados para la identificación de distintos metabolitos primarios y secundarios.

Tipo de metabolito	Grupo de metabolitos	Ensayos realizados	Reactivo utilizado	Resultado Positivo	Resultado Negativo
		Ensayo de Molisch	$\alpha$ -naftol al 1%+ $H_2SO_4$	Aparición de un anillo violeta en la interfase.	Ausencia de color o coloración café/amarillo.
		Ensayo de Lugol	Reactivo Lugol	Coloración azul oscuro o negro.	Color marrón o amarillo, sin cambio

Carbohidratos	Ensayo de Benedict	Reactivo de Benedict	Precipitado de color verde, naranja, amarillo o rojo	Azul intenso, mismo color del reactivo.
	Ensayo de Seliwanoff	Resorcinol + HCL	Color rojo intenso	Ausencia del color rojo, Incoloro
Proteínas	Ensayo de Biuret	NaOH 20% + Reactivo de Biuret	Coloración violeta o púrpura	Color azul, color original del reactivo
	Ensayo de Peróxido de hidrogeno	Peróxido de Hidrogeno.	Aparición inmediata de espuma intensa	Ausencia de espuma
Metabolitos primarios	Ensayo de Solubilidad	Agua, Etanol, Cloroformo	Disolución total o parcial del extracto con el solvente	Extracto insoluble, se forma dos fases
Lípidos	Ensayo de Jabones solubles	Hidróxido de Potasio al 10% + Etanol	Formación de solución jabonosa o pastosa estable	Ausencia de solución jabonosa, estado liquido
	Ensayo de Mayer	Reactivo de Mayer	Precipitado de color blanco o crema	Ausencia de precipitado, solución trasparente
Alcaloides	Ensayo de Wagner	Reactivo de Wagner	Formación de precipitado marrón o rojizo	Ausencia de precipitado
	Ensayo de Dragendorff	Reactivo de Dragendorff	Precipitado naranja/amarillo o rojizo	Ausencia de precipitado
Fenoles	Ensayo de Cloruro férrico	Solución de cloruro férrico al 5%	Coloración azul, verde o negro	Sin cambio de color o color amarillo pálido.
	Ensayo de peróxido	Peróxido de hidrogeno	Formación de espuma persistente	Ausencia de espuma o espuma inestable
Metabolitos secundarios	Ensayo de espuma	Agua destilada estéril	Espuma persistente (> 1 cm, estable)	Espuma ausente o inestable
Terpenoides	Ensayo de Salkowski	Cloroformo + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Color rojo, anillo rojo en la interfase	Ausencia de color característico
Cumarinas	Ensayo de KOH	Solución de KOH al 5%	Color amarillo intenso a rojizo	Sin cambio de coloración apreciable
Lactonas sesquiterpénicas	Ensayo de Baljet	Acido pícrico + Hidróxido de sodio	Coloración naranja o rojo intenso	Sin cambio de color en el extracto

Este procedimiento se realizó a partir de la metodología reportada por Kancherla et al. (2019), adaptándola a las condiciones experimentales del presente trabajo.

### 3.8.1. Metabolitos primarios

#### 3.8.1.1. Determinación cualitativa de Carbohidratos

**Ensayo de Molisch:** Se agregó 2 mL de cada extracto en un tubo de ensayo diferente y 10 gotas de  $\alpha$ -naftol al 1% en cada uno, agitándoles de forma manual hasta su completa homogeneización. Con ayuda de una pipeta se incorpora lentamente 2 mL de ácido sulfúrico concentrado por la pared interna del tubo de ensayo, evitando la agitación del tubo con el fin de impedir la mezcla de las fases.

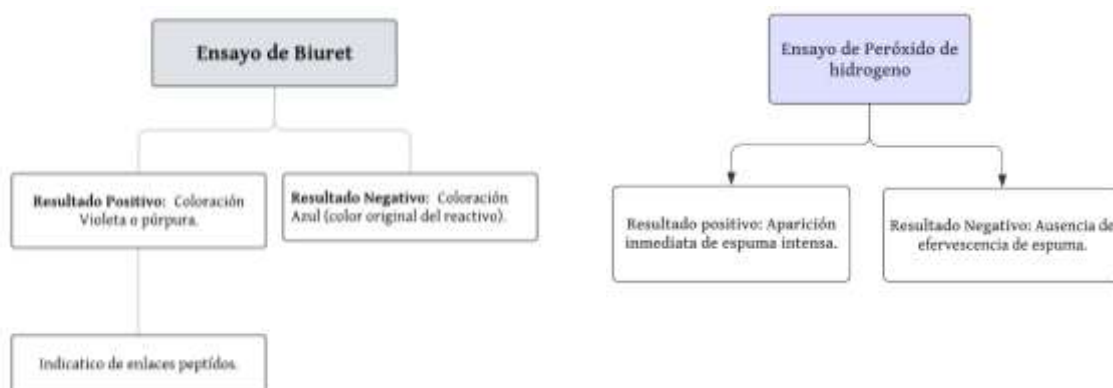
**Ensayo de Lugol:** Para la detección de polisacáridos, se transfirió una alícuota de 1 mL de cada extracto a tubos de ensayo, adicionando posteriormente 5 gotas del reactivo de Lugol. La mezcla se homogeneizó de forma manual con el fin de observar la formación de complejos de inclusión coloreados, característicos de la interacción del yodo con estructuras de almidón.

**Ensayo de Benedict:** La determinación de carbohidratos reductores se realizó mediante la adición de 20 gotas del reactivo de Benedict a 1 mL de extracto. Las muestras resultantes se sometieron a calentamiento en baño maría a temperatura de ebullición durante un periodo de 3 a 5 minutos. La presencia de azúcares se verificó mediante la reducción del ion cúprico, evidenciada por un cambio de coloración o la formación de un precipitado ladrillo.

**Ensayo de Seliwanoff:** Para la diferenciación de carbohidratos, se adicionaron 10 gotas del reactivo de Seliwanoff (resorcinol en  $\text{HCl}$  concentrado) a una alícuota de 1 mL de cada extracto. Las muestras se sometieron a calentamiento en baño maría a temperatura de ebullición durante un periodo controlado de 1 minuto. La formación de una coloración roja o guinda se consideró indicativa de la presencia de cetosas, debido a su rápida deshidratación en medio ácido.



Se observó los distintos cambios de cada ensayo, de acuerdo con lo descrito en la **Figura 13**.



*Figura 13. Representación esquemática de las reacciones obtenidas en los ensayos de Biuret y Peroxidasa para la identificación de proteínas.*

### 3.8.1.3. Determinación cualitativa de lípidos

Con el objetivo de evaluar la afinidad química y la polaridad de los componentes presentes en los extractos de *G. angustifolia*, se determinó su comportamiento frente a solventes de distinta naturaleza. Para ello, se depositaron alícuotas de 2 mL de cada extracto en tubos de ensayo rotulados, adicionando posteriormente 2 mL del solvente evaluado (agua destilada, etanol y cloroformo) en una relación 1:1 (v/v).

Tras una agitación manual y un periodo de reposo de 5 minutos, se procedió a la inspección visual para determinar el grado de miscibilidad. La solubilidad se categorizó mediante la escala cualitativa descrita en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.** *Criterio de observación de la prueba de solubilidad*

Clasificación	Simbología	Criterio de Observación
Insoluble	-	Separación de fases nítida y evidente.

Parcialmente soluble	+	Presencia de turbidez o formación de emulsión inestable.
Totalmente soluble	++	Formación de una solución homogénea y translúcida.

**Ensayo de Saponificación:** Para la identificación de lípidos saponificables, se empleó una cápsula de porcelana dispuesta sobre una placa calefactora. Se adicionaron 2 mL del extracto correspondiente junto con 15 mL de una solución alcalina de hidróxido de potasio (KOH) al 10% en etanol.

La mezcla se sometió a calentamiento controlado hasta alcanzar el punto de ebullición, manteniendo el proceso hasta la evaporación parcial del solvente y la obtención de un residuo de consistencia pastosa. Este procedimiento asegura la hidrólisis alcalina de los ésteres de ácidos grasos, resultando en la formación de jabones.

### 3.8.2. Metabolitos secundarios

#### 3.8.2.1. Determinación cualitativa de alcaloides

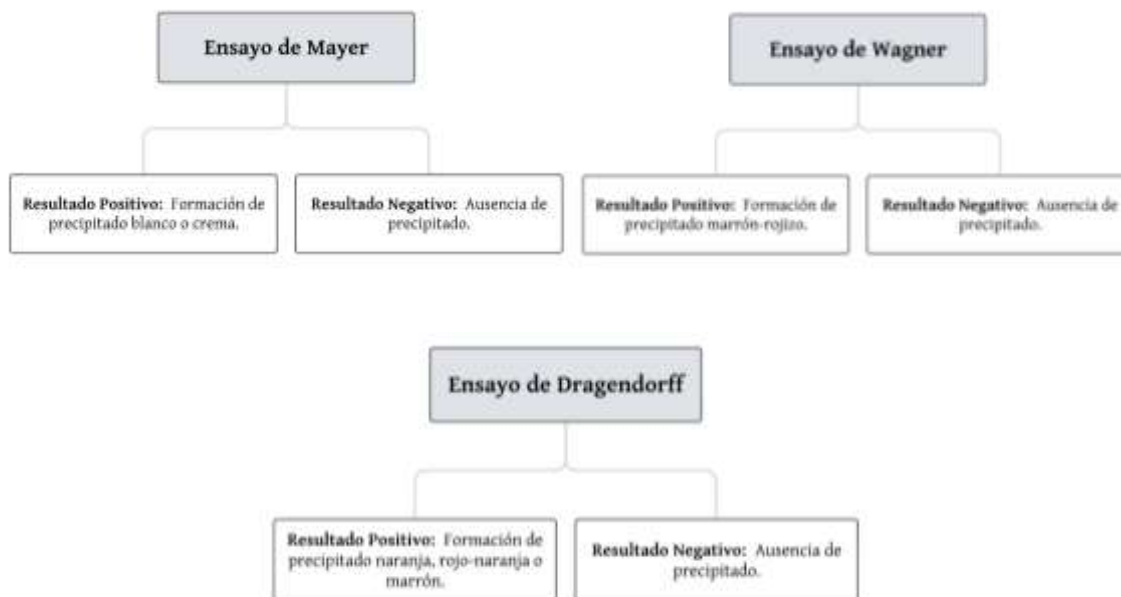
Para la identificación de alcaloides, se emplearon tres ensayos de precipitación basados en la formación de complejos de coordinación insolubles.

**Ensayo de Mayer:** En cada tubo de ensayo se agregó 1 mL de extracto y 10 gotas del reactivo. Para saber si la prueba es positiva se debe de formar un precipitado de color blanco o amarillento.

**Ensayo de Wagner:** En cada tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto y 10 gotas del reactivo de Wagner, el ensayo se considera positivo si se llega a formar un precipitado color marrón.

**Ensayo de Dragendorff:** Se agregó 1 ml del extracto en cada tubo de ensayo y 10 gotas del reactivo de Dragendorff. El extracto se considera positivo si se forma un precipitado de color naranja-marrón.

Se observó los distintos cambios de coloración de cada uno de los ensayos, de acuerdo con lo descrito en la **Figura 14**.



**Figura 14.** Representación esquemática de las reacciones colorimétricas obtenidas en los ensayos de Mayer, Wagner y Dragendorff para la identificación de Alcaloides.

### 3.8.2.2. Determinación cualitativa de Fenoles

**Ensayo de Cloruro Férrico ( $\text{FeCl}_3$ ):** En cada tubo de ensayo se colocaron 2 mL del extracto vegetal y se añadieron 3 gotas de una solución de cloruro férrico al 5%. La mezcla se agitó de manera suave y se observó la presencia de cambios de coloración, de acuerdo con lo descrito en la **Figura 15**.

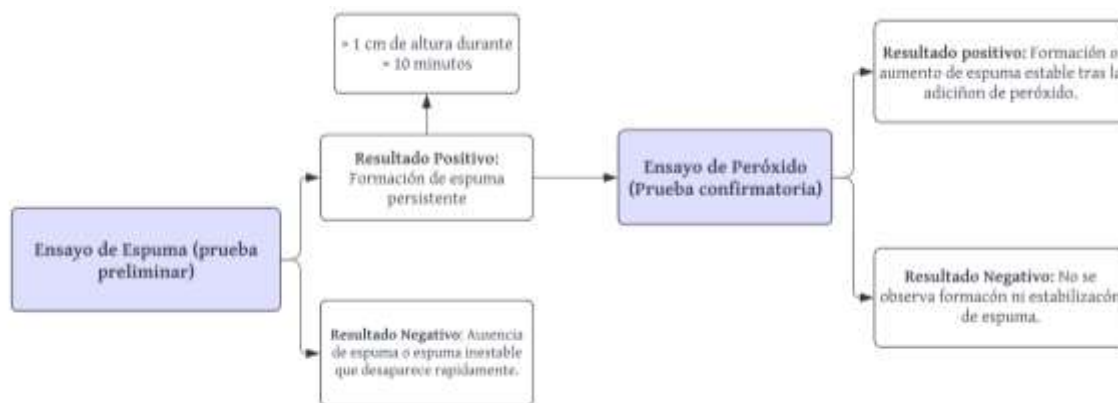


**Figura 15.** Representación esquemática de las reacciones colorimétricas obtenidas del ensayo de Cloruro férrico para la identificación de Fenoles.

### 3.8.2.3. Determinación cualitativa de Saponinas

**Ensayo de Espuma:** Se transfirió una alícuota de cada extracto a tubos de ensayo y se diluyó con agua destilada. La mezcla se sometió a una agitación mecánica vigorosa y constante por un periodo de 15 a 30 segundos. La prueba se registró como positiva tras la formación de una espuma densa y persistente (con una duración mayor a 15 minutos), característica de la presencia de glucósidos triterpénicos o esteroidales, tal como se ilustra en la **Figura 16**.

**Ensayo de Peróxido:** Se agregaron 2 mL de extracto en cada tubo de ensayo y 10 gotas de peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), se agitaron los tubos de ensayos y luego se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos. Transcurrido el tiempo de reacción, la prueba se considera positiva cuando se evidencia la formación de espuma durante 10 minutos con una altura igual o mayor a 1 cm en el tubo de ensayo, de acuerdo con lo descrito en la **Figura 16**.



**Figura 16.** Representación esquemática de las reacciones colorimétricas obtenidas de los ensayos de Espuma y Peróxido para la identificación de Saponinas.

#### 3.8.2.4. Determinación cualitativa de Terpenoides

**Ensayo de Salkowski:** A 1 mL de extracto se le adicionó 10 gotas del reactivo de Salkowski, permitiendo la formación de dos fases. La presencia de terpenos se evidenció por la aparición de una coloración característica en la interfase, de acuerdo con lo descrito en la **Figura 17**.



**Figura 17.** Representación esquemática de las reacciones colorimétricas obtenidas del ensayo de Salkowski para la identificación de Terpenoides.

#### 3.8.2.5. Determinación cualitativa de Cumarinas

**Ensayo de KOH:** Se agregó 1 mL de extracto en cada tubo de ensayo y 10 gotas de KOH al 5%. Transcurrido el tiempo de reacción, la prueba se considera positiva cuando se

visualiza el cambio de tonalidad de rojo a amarillo, de acuerdo con lo descrito en la **Figura 18**.



**Figura 18.** Representación esquemática de las reacciones colorimétricas obtenidas del ensayo de KOH para la identificación de Cumarinas.

### 3.8.2.6. Determinación cualitativa de lactonas sesquiterpénicas

**Ensayo de Baljet:** Se transfirieron 3 mL de cada extracto a sus respectivos tubos de ensayo, adicionando 20 gotas del reactivo de Baljet (mezcla de ácido pícrico y una solución de hidróxido de sodio). Las muestras se homogeneizaron y se sometieron a una inspección visual para detectar variaciones cromáticas. La aparición de una coloración que oscila entre el naranja y el rojo oscuro se registró como indicativo positivo de la presencia de compuestos con anillos lactónicos, conforme a los registros presentados en la **Figura 19**.



**Figura 19.** Representación esquemática de las reacciones colorimétricas obtenidas del ensayo de Baljet para la identificación de Lactonas sesquiterpénicas.

### 3.9. Actividad biológica

#### 3.9.1. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana del aceite esencial fue evaluado frente a una bacteria (*Escherichia coli*) y a una levadura (*Candida albicans*). Las cepas de cada microorganismo fueron facilitadas por los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede Guayaquil Campus María Auxiliadora.

Se utilizó como control natural terpineol al 20% debido a su alto potencial antimicrobiano ya conocido, como control sintético ampicilina al 5% en el caso de *E. coli*, gentamicina al 5% en caso de *C. albicans*, y como blanco se utilizó DMSO.

#### 3.8.2. Cultivo de cepas microbianas

Las cepas de *E. coli*, y de *C. albicans* proporcionadas por los laboratorios fueron reactivadas y cultivadas bajo los parámetros observados en la **Tabla 6**:

**Tabla 6.** Condiciones de crecimiento de los microorganismos

Microorganismo	Medio de cultivo	Temperatura	Tiempo	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	Tripteína Soya Agar (TSA)	37 °C	24 h	(Dogan et al., 2003)
<i>Candida albicans</i>	Agar YPD	35 °C	48 h	(Abe et al., 2009)

#### 3.8.3. Preparación de las concentraciones de aceite esencial, terpineol, ampicilina y gentamicina

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana, se preparó una solución de aceite esencial de *G. angustifolia* al 5% (v/v), siguiendo los protocolos de Thielmann et al. (2019). Para ello, se solubilizaron 271  $\mu$ L del aceite esencial en 4.729 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Bajo este mismo solvente, se prepararon soluciones de

ampicilina y gentamicina al 5% (m/v) como controles positivos, disolviendo 250 mg de cada antibiótico en 5 mL de DMSO. Por último, se preparó una solución de terpineol al 20% (v/v) mediante la dilución de 1 mL del compuesto en 4 mL de DMSO. Todas las mezclas fueron sometidas a agitación mecánica en vortex durante 5 minutos para asegurar su completa homogeneización.

#### **3.8.4. Preparación del extracto alcohólico seco**

Para poder utilizar el extracto alcohólico en las microdiluciones, se procedió a la eliminación total del solvente del extracto alcohólico para la obtención de una masa seca, conforme a las recomendaciones de Kulikova et al. (2023). Se colocó el extracto en un rotavapor, a una temperatura de 40 °C, a un vacío de 150 mbar, y a una velocidad de rotación de 80 rpm.

Se obtuvo un rendimiento final de 1.5 g de extracto seco, el cual fue resuspendido en 15 mL de DMSO para alcanzar una concentración madre de 100 mg/mL.

#### **3.8.5. Estandarización del inóculo microbiano**

Se sembraron los microorganismos siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 3, y se dejó crecer 24 horas en caso de *E. coli*, y 48 horas en el caso de *C. albicans*. Para la estandarización del inóculo, se tomó con un asa colonias aisladas y se colocaron en 5 mL de solución salina estéril al 0.9%, y se mandó a vortex para ajustar la turbidez hasta obtener el estándar 0.5 de la escala de McFarland (Teramura et al., 2019).

Para validar la densidad celular, se realizó una lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 625 nm (**Fig. 20**). Se consideraron óptimos los valores de absorbancia comprendidos entre 0.08 y 0.13, confirmando así una concentración microbiana aproximada según los criterios de Mahesh et al. (2025).



**Figura 20.** Absorbancia de la solución salina con *E.coli* constatando la escala McFarland.

### 3.8.6. Inoculación en placas de 96 pocillos

Las placas de 96 pocillos se autoclavaron, y antes de su uso se dejaron reposar por 15 minutos bajo luz UV para asegurar esterilidad. En la fila A de la **figura 21** se agregaron 180  $\mu$ L del medio YPD/TSB, y en las filas B a la H se agregaron 100  $\mu$ L del medio. Posteriormente en la fila A se añadió 20  $\mu$ L del aceite esencial de *G. angustifolia* al 5%, del extracto alcohólico, del control natural, y del control sintético, todos diluidos en DMSO.



**Figura 21.** Distribución de aceite, extractos, y controles en la placa de 96 pocillos.

Utilizando la micropipeta se homogenizaron las soluciones de la fila A, para luego tomar 100  $\mu\text{L}$  y mezclarlo con la fila B. Se repite este paso de forma consecutiva hasta la fila H de la cual se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se descartaron para mantener los 100  $\mu\text{L}$  en cada pocillo.

Luego de realizar las diluciones, se agregaron 30  $\mu\text{L}$  de la solución salina con *E. coli*, y 50  $\mu\text{L}$  de la solución salina con *C. albicans*. Una vez agregados los microorganismos en cada pocillo, se envolvió la placa en papel aluminio, y se incubó con agitación a 50 rpm por 24 horas para *E. coli*, y 48 horas para *C. albicans*.

### **3.8.7. Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC)**

Se preparó TTC al 1% diluyendo 50 mg del TTC puro, en 5 ml de agua destilada estéril y colocado en un vial ámbar de 10 ml. El colorante fue almacenado en refrigeración a 4°C hasta su uso dentro de las 24 horas posterior a su preparación (Wortmann et al., 2022).

Pasado el tiempo de incubación de cada microorganismo, se adicionó 20  $\mu\text{L}$  del TTC para *E. coli*, y 40  $\mu\text{L}$  para *C. albicans*. Se dejaron incubar las placas por 10 minutos selladas en papel aluminio, y se procedió para realizar la lectura.

### **3.8.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)**

La lectura de las placas se realizó de forma cuantitativa mediante un espectrofotómetro de microplacas Multiskan™ FC (**Fig. 22**). Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 450 nm para evaluar la turbidez resultante del crecimiento microbiano. La CMI se definió como la concentración más baja del agente antimicrobiano que inhibió el crecimiento de forma visible (ausencia de viraje de color del TTC y valores de absorbancia basales), comparando los resultados con el control positivo (medio inoculado sin agente inhibidor).



**Figura 22.** *Equipo Multiskan™ FC 96 and 384-well Plate Microplate Photometers.*

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 4.1. Identificación de la especie vegetal

La recolección del material vegetal se llevó a cabo en el Bosque Protector Prosperina durante la época invernal, comprendida entre noviembre de 2025 y enero de 2026. La identificación taxonómica preliminar, realizada mediante la plataforma iNaturalist, confirmó que los especímenes recolectados correspondían a *Gustavia angustifolia*, presentando características morfológicas consistentes de la especie (**Fig. 23** y Tabla 7).



**Figura 23.** Comparación de las hojas de *G. angustifolia* en la aplicación iNaturalist.

**Tabla 7.** Características morfológicas de las hojas de *G. angustifolia*.

Característica	Descripción Botánica Detallada
Disposición (Filotaxia)	Alternas, agrupadas apretadamente en verticilos (rosetas) al final de las ramas.
Forma del limbo	Estrechamente oblonga a estrechamente oblanceolada (forma de lanza invertida, más ancha cerca de la punta).
Dimensiones	Largo: 13 a 30 cm. Ancho: 3 a 7 cm.

Pecíolo	Ausente (sésiles).
Ápice (Punta)	Agudo a corto-acuminado.
Base	Atenuada a aguda.
Margen (Borde)	Variable: Entero (liso) a aserrado (con dientes), especialmente hacia la mitad superior (hacia el ápice).
Textura	Coriácea (dura, similar al cuero).
Indumento (Superficie)	Velutina (aterciopelada o con pelos finos) en el envés (cara inferior).

En el lapso de 2 meses se recolectó un total de 2105,34 g de hojas frescas de *G. angustifolia*, las cuales se lavarían con agua destilada, y se someterían a un secado hasta alcanzar peso constante, asegurando la eliminación de humedad residual para los análisis fitoquímicos posteriores.

#### 4.2. Determinación de humedad

Respecto al proceso de acondicionamiento, se partió de una masa fresca de 450 g. Tras el secado en estufa a 40 °C durante 48 horas, se obtuvo un peso constante de 223,15 g. Aplicando la ecuación de determinación de humedad, se estableció que las hojas frescas poseían un contenido de humedad del 50,41%.

$$\%Humedad = \frac{450g - 223.15g}{450} * 100 = 50,41\%$$

Este porcentaje de pérdida de agua indica una deshidratación eficiente del tejido vegetal. La elección de la temperatura de 40 °C fue determinante para este proceso. Temperaturas superiores podrían haber acelerado el secado, pero con el riesgo de volatilizar los

compuestos termolábiles de interés o degradar los metabolitos secundarios antes de la extracción.

### 4.3. Rendimiento de extracción de aceite esencial

La extracción del AE se llevó a cabo mediante hidrodestilación asistida por equipo Clevenger, procesando un total de 1009.87 g de hojas secas de *G. angustifolia* a lo largo de 1 mes entero de extracción. Al finalizar el proceso de destilación, se obtuvo un volumen acumulado de 1.1 mL de aceite esencial, presentando una coloración amarilla pálida y un intenso olor característico herbáceo.

El rendimiento de extracción fue calculado en base al volumen de aceite obtenido por peso de materia seca (v/p), resultando en un 0.11%, tal como se detalla a continuación:

$$\%Rendimiento = \frac{\text{Volumen de aceite (mL)}}{\text{Masa de materia seca (g)}} * 100$$

$$\%Rendimiento = \frac{1,1 \text{ mL}}{1009,87 \text{ g}} * 100 = 0,11\%$$

El rendimiento obtenido (0,11 % v/w) constituye un indicador clave para determinar la viabilidad biotecnológica de *G. angustifolia*. Aunque este valor es inferior al de especies aromáticas comerciales, resulta consistente con los reportes para la familia Lecythidaceae. Al contrastar este hallazgo con los resultados de Jack et al. (2020), quienes reportaron un rendimiento del 0,4 % en el epicarpio de *Napoleonaea imperialis*, se observa una relación proporcional esperada, considerando que los órganos reproductivos (frutos) suelen concentrar una mayor densidad de metabolitos volátiles en comparación con el tejido foliar estudiado en esta investigación.

Desde una perspectiva de aprovechamiento industrial, este rendimiento implica que *G. angustifolia* podría no ser rentable como fuente primaria de aceite esencial a granel, pero su valor podría residir en la bioactividad específica y la calidad química de sus componentes, más que en la cantidad bruta extraída.

#### **4.4. Obtención de extractos**

##### **4.4.1. Extracto acuoso**

La obtención del extracto acuoso se realizó empleando una proporción de 1:10 (material vegetal-solvente). Como resultado, se obtuvo un extracto con una coloración amarillo ámbar como se observa en la **Figura 24**. Este color es característica de la solubilidad de metabolitos hidrofílicos presentes en el material vegetal.

##### **4.4.2. Extracto hidroalcohólico**

El extracto hidroalcohólico se preparó utilizando la misma proporción de 1:10. El extracto obtenido presento una coloración predominante amarilla con tonalidades café (**Figura 24**), lo que sugiere la extracción de una mayor diversidad de compuestos de polaridad intermedia.

##### **4.4.3. Extracto alcohólico**

Para la obtención del extracto alcohólico se empleó una proporción de 1:10 seguida del tratamiento por ultrasonido y filtración al vacío. El extracto resultante mostro una coloración verde oscuro intenso como se muestra en la **Figura 24**, indicativa de la presencia de compuestos menos polares, como pigmentos y otros metabolitos secundarios solubles en alcohol.



**Figura 24.** Extractos acuoso, hidroalcohólico y alcohólico obtenidos a partir del material vegetal, donde se observan diferencias en la coloración según el solvente empleado.

#### 4.5. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico permitió identificar la diversidad de metabolitos primarios y secundarios presentes en las hojas de *G. angustifolia*. La Tabla 8 detalla la composición de los extractos acuoso, hidroalcohólico y alcohólico, evidenciando una distribución diferencial de los grupos químicos en función de la polaridad del solvente empleado.

**Tabla 8.** Resultados de los ensayos para detectar metabolitos primarios

Metabolitos	Ensayos realizados	Extractos		
		Acuoso	Hidroalcohólico	Alcohólico
<b>Primarios</b>				
	Ensayo de Molisch	+	+	+
	Ensayo de Lugol	-	-	-
<b>Carbohidratos</b>	Ensayo de Benedict	+	+++	+++

	Ensayo de Seliwanoff		+	++	++
	Ensayo de Biuret		-	-	-
<b>Proteínas</b>	Ensayo de Peróxido de hidrogeno		-	-	-
<b>Lípidos</b>	Ensayo de Solubilidad	Agua	-	-	-
		Etanol	+	+	+
		Cloroformo	-	-	+
	Ensayo de jabones solubles		+	+	+

**Nota:** La intensidad de las reacciones cualitativas se expresa mediante una escala semicuantitativa: (+++) reacción positiva intensa, indicativa de una elevada concentración relativa; (++) reacción positiva moderada; (+) reacción positiva débil o trazas; (-) reacción negativa o ausencia de detección bajo las condiciones experimentales empleadas.

Los resultados presentados en la Tabla 8 revelan un perfil dominado por carbohidratos, con una ausencia notable de proteínas y polisacáridos de reserva. La aplicación de ultrasonido fue determinante para romper la matriz coriácea de la hoja, facilitando la liberación de estos componentes en el medio líquido.

Un factor crítico durante la lectura de estos ensayos fue la alta densidad cromática de los extractos; el extracto acuoso presentó una coloración amarilla intensa, mientras que el hidroalcohólico y alcohólico exhibieron un verde oscuro profundo, característico de una alta concentración de clorofilas. Para mitigar esta interferencia visual y asegurar la

fidelidad de la escala semicuantitativa, se empleó iluminación dirigida para contrastar los cambios de color y la formación de precipitados frente a sus respectivos controles.

Los perfiles fitoquímicos detallados en la Tabla 9 reflejan la eficacia de la extracción asistida por ultrasonido en la liberación de metabolitos secundarios desde la matriz coriácea de *G. angustifolia*. El uso de ultrasonido facilitó la ruptura de las paredes celulares, permitiendo que solventes de distinta polaridad capturaran una diversidad de grupos químicos que se analizan a continuación.

**Tabla 9.** Resultados de los ensayos para detectar metabolitos secundarios.

Metabolitos Secundarios	Ensayos realizados	Extractos		
		Acuoso	Hidroalcohólico	Alcohólico
Alcaloides	Ensayo de Mayer	++	+	++
	Ensayo de Wagner	+	+	+++
	Ensayo de Dragendorff	++	+	++
Fenoles	Ensayo de Cloruro férrico	+++	+++	++
Saponinas	Ensayo de Espuma	++	+	-
	Ensayo de Peróxido	++	+	-
Terpenoides	Ensayo de Salkowski	+++	++	+
Cumarinas	Ensayo de KOH	+	++	+++

Lactonas sesquiterpénicas	Ensayo de Baljet	++	+++	+++
------------------------------	------------------	----	-----	-----

**Nota:** La intensidad de las reacciones cualitativas se expresa mediante una escala semicuantitativa: (+++) reacción positiva intensa, indicativa de una elevada concentración relativa; (++) reacción positiva moderada; (+) reacción positiva débil o trazas; (-) reacción negativa o ausencia de detección bajo las condiciones experimentales empleadas.

#### 4.5.1. Metabolitos Primarios

##### Carbohidratos

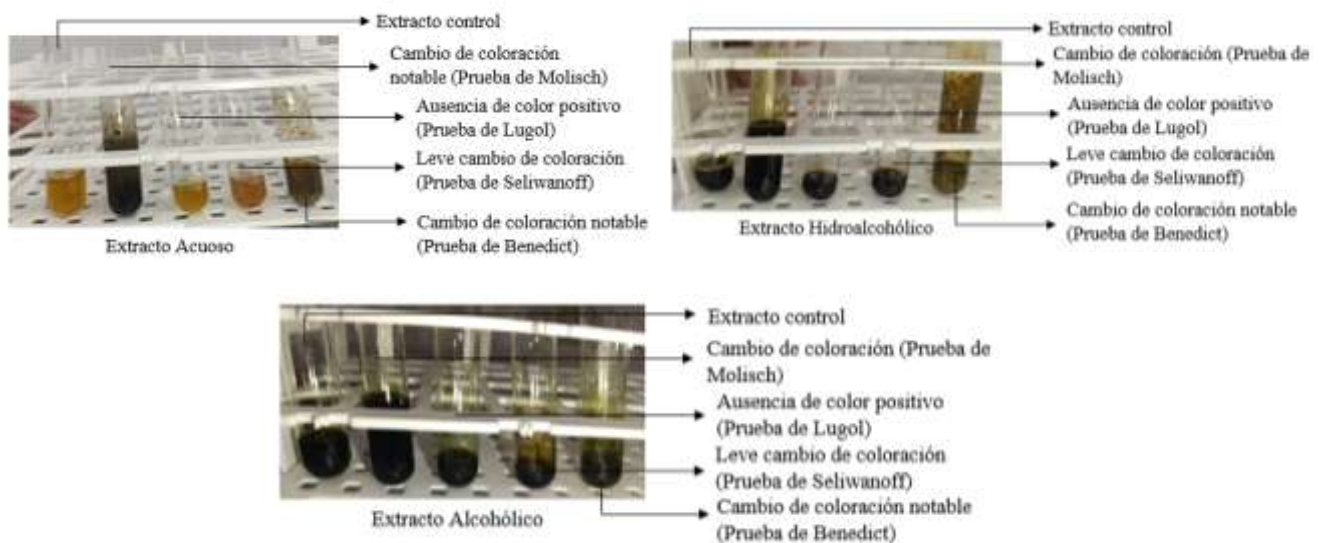
El análisis fitoquímico cualitativo para la detección de carbohidratos evidenció respuestas positivas en todos los extractos, con positividad confirmada en el Ensayo de Molisch, lo que indica la presencia general de glúcidos. La mayor intensidad se observó en los extractos acuoso e hidroalcohólico, particularmente en las pruebas de Benedict (+++) y Seliwanoff (++) , como se demuestra en la **Figura 25**. Esto ratifica la presencia de azúcares reductores y cetosas solubles.

Por otro lado, en la prueba de Lugol no se registraron cambios de coloración en ninguno de los extractos evaluados como se muestra en la **Figura 25**, lo que sugiere la ausencia o una concentración no detectable de polisacáridos complejos, como el almidón. Este resultado es congruente dado que el secado prolongado y el procesamiento suelen hidrolizar polisacáridos complejos en monómeros más simples.

El extracto alcohólico presentó una respuesta menos intensa, atribuible en parte a su coloración verde oscuro intenso, que interfirió en la apreciación visual de los cambios cromáticos característicos de las pruebas. No obstante, este mismo extracto, junto con el

hidroalcohólico, exhibió la máxima intensidad (+++) en el ensayo de Benedict, lo que sugiere que los azúcares reductores en *G. angustifolia* predominan en formas menos polares o asociados a agliconas, cuya extracción se ve favorecida por la mezcla solvente y el efecto de cavitación ultrasonido.

La mayor reactividad observada en los extractos acuoso e hidroalcohólico se explica por la alta solubilidad de los carbohidratos simples en solventes polares, tales como el agua y las mezclas hidroalcohólicas, que optimizan su liberación. Por el contrario, los solventes alcohólicos puros resultan menos eficaces para estos metabolitos polares, agravado por la interferencia visual derivada de la coextracción de pigmentos clorofílicos (Hernández-López et al., 2020).



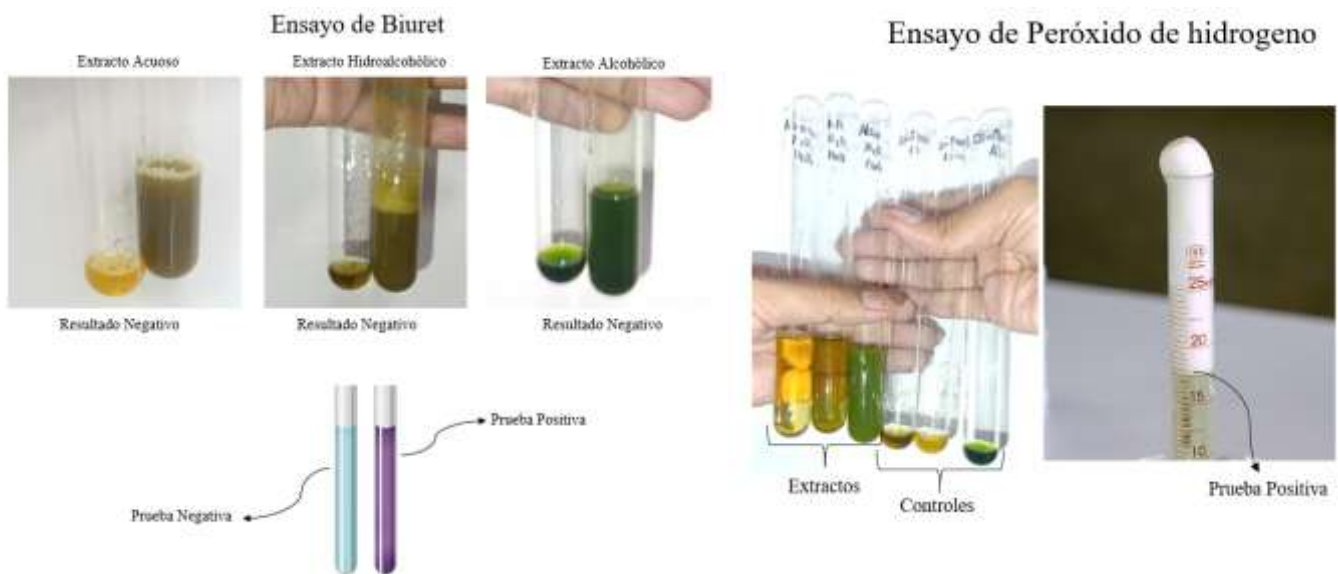
**Figura 25.** Resultados obtenidos de la prueba de carbohidratos correspondiente a cada ensayo realizado.

## Proteínas

La ausencia de detección en el Ensayo de Biuret y la prueba de Peróxido de Hidrógeno sugiere que las proteínas enzimáticas y estructurales no fueron solubilizadas en concentraciones detectables, posiblemente debido a la desnaturalización proteica

inducida por el tiempo de exposición al ultrasonido o la selectividad de los solventes, tal como se muestra en la **Figura 26**.

Las proteínas generalmente están presentes en menor cantidad en los extractos crudos de origen vegetal al utilizar solventes orgánicos, puesto que su extracción efectiva necesita condiciones particulares que mantengan su estructura.



**Figura 26.** Resultados obtenidos de la prueba de Proteínas correspondiente a cada ensayo realizado.

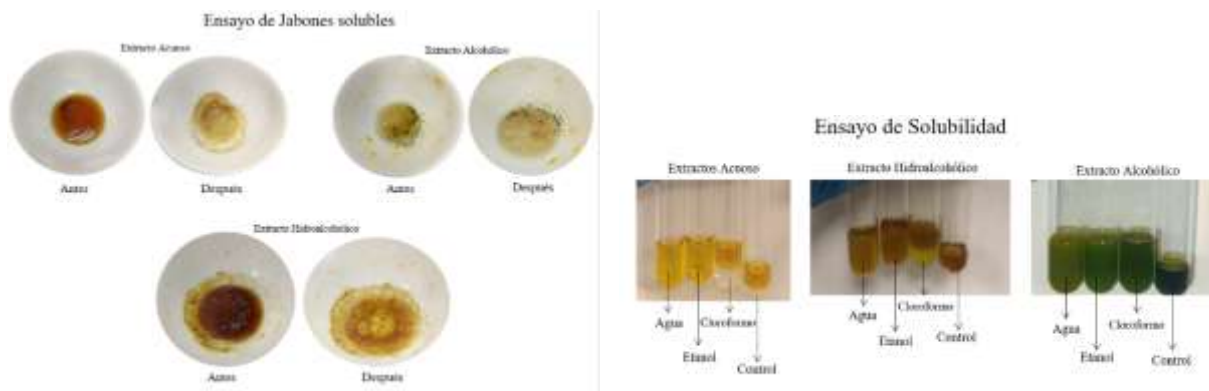
## Lípidos

Los ensayos de lípidos muestran que el material vegetal posee componentes de baja polaridad, detectados principalmente en el extracto alcohólico mediante la prueba de Cloroformo. La observación de una respuesta débil (+) en agua para la solubilidad lipídica no indica solubilidad real, sino posiblemente la formación de una emulsión facilitada por otros metabolitos secundarios anfipáticos presentes en la planta, como las saponinas.

La prueba de Jabones Solubles positiva (+) en todos los extractos refuerza la teoría de que *G. angustifolia* posee ácidos grasos o compuestos con propiedades tensoactivas que

permiten cierta dispersión en medios de distinta polaridad, tal como se muestra en la **Figura 27**.

Estos hallazgos implican que el disolvente utilizado tiene un impacto considerable en la extracción de distintos tipos de lípidos, favoreciendo la recuperación de fracciones lipídicas con variadas polaridades.



**Figura 27.** Resultados obtenidos de la prueba de Lípidos correspondiente a cada ensayo realizado.

#### 4.5.2. Metabolitos Secundarios

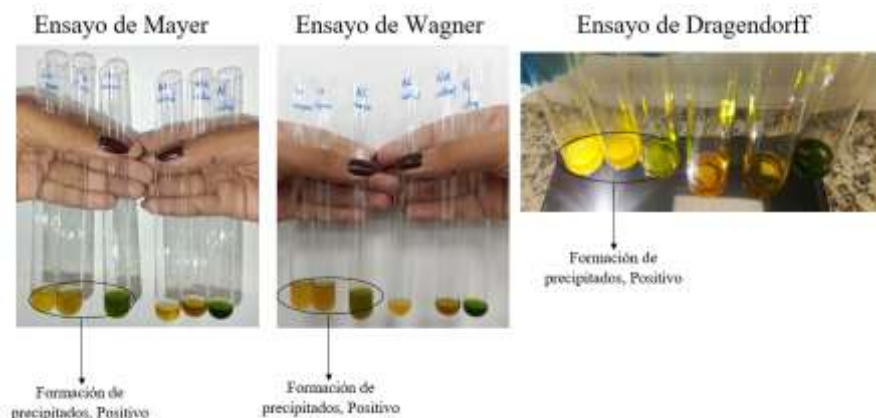
##### Alcaloides

La detección de alcaloides resultó consistente en los tres ensayos cualitativos empleados (Mayer, Wagner y Dragendorff), con una respuesta intensa (+++) destacada en el extracto alcohólico mediante el reactivo de Wagner (**Figura 28**). Las respuestas moderadas (++) en los extractos acuoso e hidroalcohólico indican una distribución variable de estos metabolitos según la polaridad del solvente. El ensayo cualitativo para identificar alcaloides se llevó a cabo utilizando las pruebas de Mayer, Wagner y Dragendorff. Los resultados demostraron la existencia de estos compuestos en los extractos acuoso, hidroalcohólico y alcohólico, notándose una respuesta más intensa en el extracto

alcohólico, particularmente en la prueba de Wagner. El extracto acuoso mostró una reacción moderada, mientras que el extracto hidroalcohólico presentó una menor intensidad. Esta variabilidad confirma la presencia de núcleos nitrogenados con distinta capacidad de precipitación química, incluyendo bases libres extraídas eficientemente por cavitación ultrasónica en solventes orgánicos y sales de alcaloides hidrosolubles. La mayor detección en el extracto alcohólico se explica por la afinidad química de las estructuras nitrogenadas de los alcaloides hacia solventes de polaridad intermedia, como el etanol, que optimiza su solubilización frente a métodos convencionales.

La reactividad en extractos acuosos e hidroalcohólicos, por su parte, evidencia alcaloides de mayor polaridad, lo que denota un perfil fitoquímico diverso en *G. angustifolia*.

Estos hallazgos concuerdan con reportes previos para *G. angustifolia*, donde se identificó una abundancia de alcaloides en extractos etanólicos obtenidos por maceración convencional (María et al., 2017), reforzando la eficiencia del ultrasonido para potenciar la biodisponibilidad de estos compuestos bioactivos.



**Figura 28.** Resultados obtenidos de la prueba de Alcaloides correspondiente a los ensayos realizados.

## Fenoles

Se llevó a cabo una evaluación de la presencia de compuestos fenólicos utilizando el ensayo con cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ ). Los resultados mostraron una respuesta significativa en los extractos acuoso e hidroalcohólico, mientras que el extracto alcohólico mostró una reacción menos pronunciada, como se observa en la **Figura 29**. Este comportamiento indica que los fenoles, gracias a la inclusión de grupos hidroxilo en su estructura, son obtenidos de manera más efectiva a través de disolventes polares y combinaciones de agua y alcohol.

Estos resultados son coherentes con estudios previos, donde se reportó la presencia de compuestos fenólicos y taninos en extractos alcohólicos, aunque con variaciones en la intensidad según el método de extracción y el tipo de tejido vegetal analizado (María et al., 2017). La mayor respuesta observada en los extractos acuoso e hidroalcohólico puede atribuirse a la alta polaridad de los grupos hidroxilo presentes en los fenoles, lo que favorece su solubilización en medios acuosos y mixtos.



**Figura 29.** Resultados obtenidos de la prueba de Fenoles correspondiente al ensayo realizado.

## Saponinas

La identificación de saponinas se llevó a cabo a través de las pruebas de espuma y de peróxido de hidrogeno. Los resultados indicaron una reacción favorable, especialmente en el extracto acuoso, una respuesta menos clara en el extracto hidroalcohólico (**Figura 30**), y una falta de respuesta en el extracto alcohólico. Estos hallazgos coinciden con la característica anfipática de las saponinas, que muestran una solubilidad superior en disolventes muy polares, particularmente en agua.

La detección predominante de saponinas en el extracto acuoso concuerda con la naturaleza anfipática de estos compuestos, los cuales presentan mayor solubilidad en solventes altamente polares. Reportaron la presencia de saponinas en menor proporción en extractos etanólicos de *Gustavia angustifolia* (María et al., 2017). Lo que respalda que la extracción acuosa empleada en este estudio resulto más eficiente para este grupo de metabolitos.



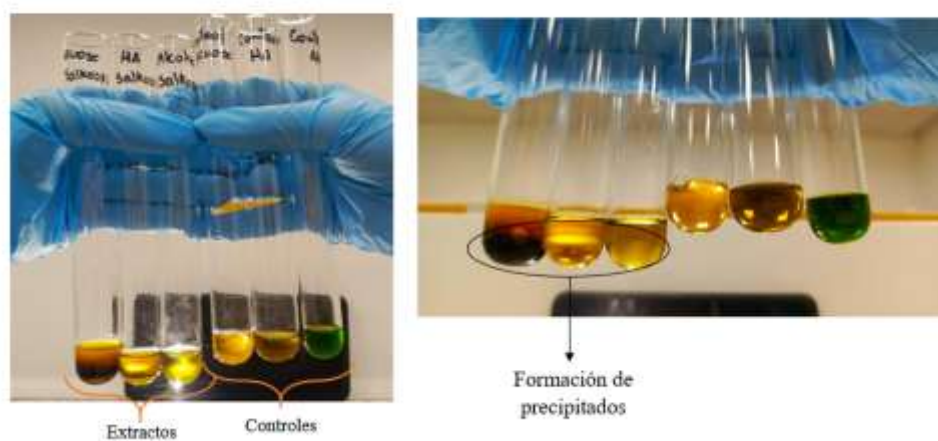
**Figura 30.** Resultados obtenidos de la prueba de Saponinas correspondiente a los ensayos realizados.

## Terpenoides

El ensayo cualitativo de terpenoides se llevó a cabo usando la prueba de Salkowski. Los resultados mostraron una respuesta más significativa en el extracto acuoso, seguido del extracto hidroalcohólico, mientras que el extracto alcohólico mostró una reacción menos clara (**Figura 31**). Esto indica la preferencia por la extracción de terpenoides que son más oxigenados o que tienen una mayor polaridad, cuando se utilizan solventes acuosos y mixtos.

En estudios previos del género *Gustavia* se ha reportado la presencia de triterpenos y esteroides, principalmente en extractos alcohólicos (María et al., 2017). Sin embargo, la mayor respuesta observada en extractos acuosos en este estudio podrá indicar la presencia de terpenos oxigenados o compuestos terpénicos de mayor polaridad, los cuales presentan mejor solubilidad en medios acuosos e hidroalcohólicos, esto sugiere que la especie estudiada puede contener una diversidad estructural de terpenoides.

### Ensayo de Salkowski

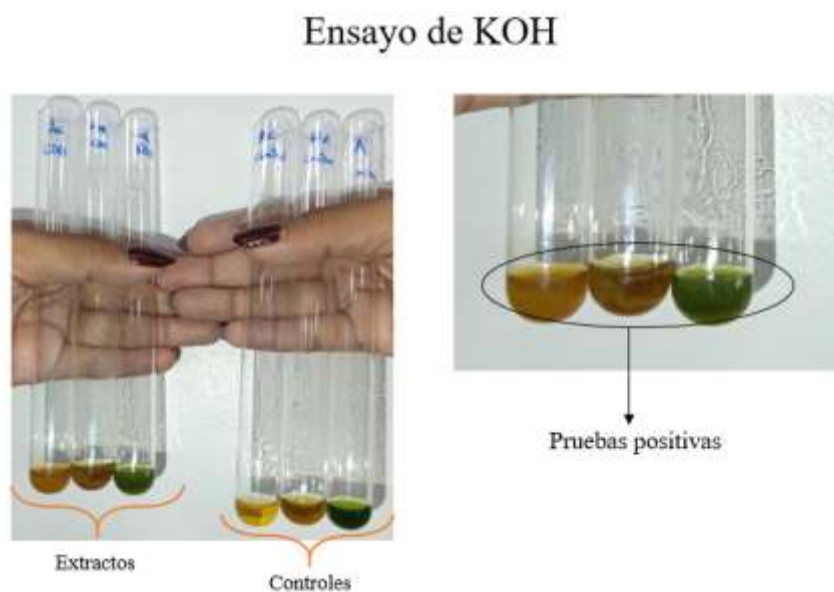


**Figura 31.** Resultados obtenidos de la prueba de Terpenos correspondiente a los ensayos realizados.

## Cumarinas

La identificación de cumarinas se llevó a cabo utilizando la prueba de KOH. Los resultados mostraron una respuesta gradual desde el extracto acuoso hasta el extracto alcohólico (**Figura 32**), lo que sugiere que estos compuestos tienen una mayor preferencia por los disolventes alcohólicos, lo que facilita su extracción y concentración en este tipo de extractos.

Este comportamiento sugiere que las cumarinas tienen una mayor preferencia por los solventes alcohólicos, lo que concuerda con lo que se ha informado para especies nativas de Ecuador estudiadas a través de extractos etanólicos (María et al., 2017). La cantidad de cumarinas en el extracto alcohólico indica que estos compuestos podrían tener un papel importante en las actividades biológicas relacionadas con este tipo de extractos.



**Figura 32.** Resultados obtenidos de la prueba de Cumarinas correspondiente al ensayo realizado.

## Lactonas sesquiterpénicas

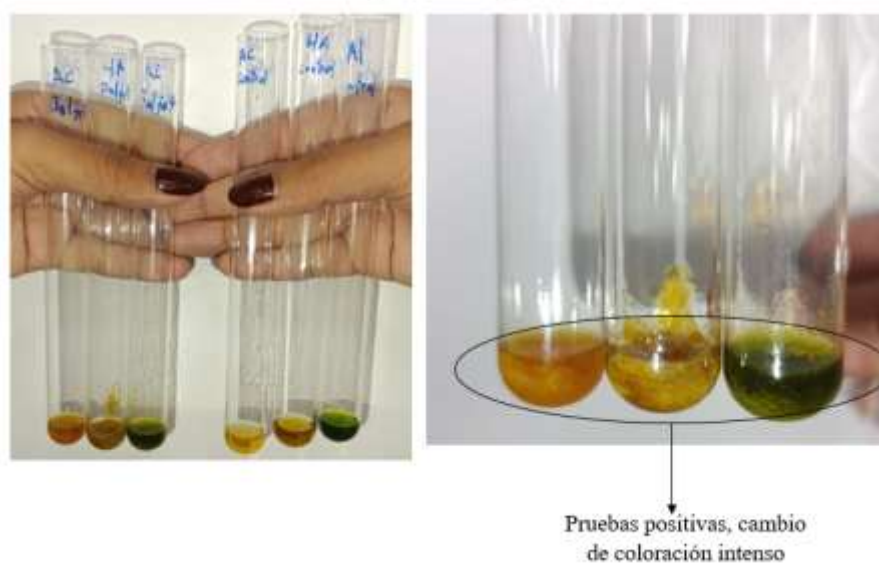
Los resultados de la prueba de Baljet mostraron su presencia en los extractos acuoso, hidroalcohólico y alcohólico, notándose una mayor respuesta en los extractos

hidroalcohólico y alcohólico en relación con el extracto acuoso (**Figura 33**). Esto indica que estos metabolitos tienen una solubilidad superior en solventes con polaridad media y baja.

La identificación de lactonas sesquiterpénicas en solventes de polaridad media y baja coincide con investigaciones anteriores llevadas a cabo en especies del género *Gustavia*, en las cuales se ha documentado la existencia de compuestos terpénicos complejos y metabolitos bioactivos vinculados (María et al., 2017).

La intensidad más alta que se ha observado en los extractos alcohólicos indica una mayor solubilidad de esos compuestos en esos solventes, lo cual refuerza su posible relevancia biológica.

#### Ensayo de Baljet



**Figura 33.** Resultados obtenidos de la prueba de Cumarinas correspondiente al ensayo realizado.

La caracterización cualitativa realizada permite identificar que la metodología de extracción asistida por ultrasonido fue exitosa en la ruptura de la matriz foliar, logrando un fraccionamiento químico diferencial según la polaridad de los solventes. Esta diversidad de metabolitos sugiere que la actividad antimicrobiana de *G. angustifolia* no

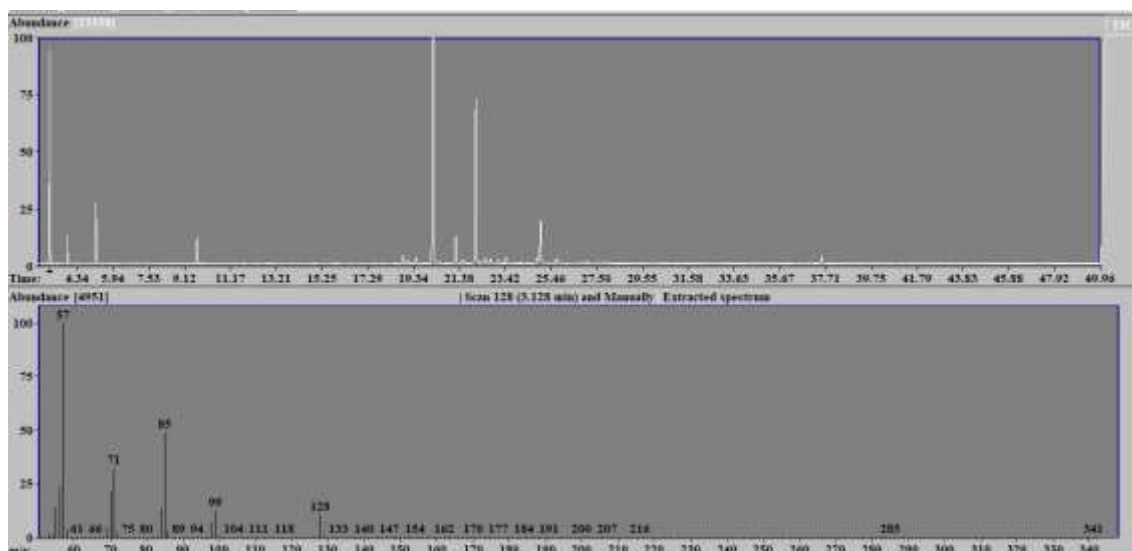
dependerá de un solo compuesto, sino de un efecto sinérgico entre grupos funcionales. Mientras que la elevada presencia de fenoles y saponinas en el extracto acuoso apunta a mecanismos de acción basados en la desnaturalización de proteínas superficiales y lisis por desequilibrio osmótico, la concentración de alcaloides y lactonas sesquiterpénicas en las fracciones alcohólicas sugiere una mayor afinidad por la disrupción de la bicapa lipídica y la interferencia con procesos metabólicos internos del patógeno.

Asimismo, es imperativo considerar el rol de las clorofilas y pigmentos carotenoides, cuya presencia fue manifiesta en la intensa coloración verde y amarilla de los extractos. Más allá de su interferencia óptica durante el tamizaje, la literatura científica sugiere que estos pigmentos pueden actuar como fotosensibilizadores, incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan las estructuras celulares de bacterias y hongos. Por lo tanto, la robusta presencia de estos componentes lipofílicos, potenciada por la sonicación, podría actuar como un coadyuvante crítico, incrementando la eficacia inhibitoria de los extractos frente a cepas resistentes

#### **4.6. Composición química del aceite esencial (GC-MS)**

La caracterización química del aceite esencial de hojas de *G. angustifolia* se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Dado que el reporte instrumental no proporcionó los porcentajes de integración de área, se realizó un análisis semi-cuantitativo basado en la abundancia relativa de la señal de los iones totales (TIC) visualizada en el perfil cromatográfico.

En la Figura 34 se presenta el cromatograma obtenido, el cual revela un perfil fitoquímico complejo con una distribución de metabolitos volátiles que eluyen principalmente entre los 3 y 28 minutos.



**Figura 34.** Cromatograma de iones totales (TIC) del aceite esencial de hojas de *G. angustifolia*

El análisis del aceite esencial de *G. angustifolia* mediante GC-MS (**Figura 34**) confirma la presencia de una mezcla heterogénea de metabolitos volátiles. El cromatograma de iones totales (TIC) muestra una resolución óptima, permitiendo identificar al menos cinco componentes mayoritarios que destacan por su abundancia relativa, además de una serie de componentes minoritarios distribuidos a lo largo de la corrida.

Para confirmar la identidad de los compuestos, se procedió al cálculo de los Índices de Retención Aritméticos ( $RI_{calc}$ ). Este cálculo se realizó utilizando una serie homóloga de n-alcenos estándar ( $C_9 - C_{24}$ ) inyectados bajo las mismas condiciones cromatográficas, empleando la ecuación de regresión lineal derivada de sus tiempos de retención. Los índices experimentales obtenidos fueron contrastados con los reportados en la literatura especializada de Adams (2017), aceptando una tolerancia de variación de  $\pm 10$  unidades para considerar la identificación como positiva.

La Tabla 10 detalla los constituyentes identificados, clasificándolos según su abundancia relativa visual en el cromatograma.

**Tabla 10.** Perfil fitoquímico semi-cuantitativo del aceite esencial de *G. angustifolia*

Tiempos de retención (DB5)	Índice de retención calculado	Fórmula molecular (MF)	Nombre común	Abundancia relativa
3,128	898	C9 H20	Nonane <n->	+++
3,911	923	C10 H16	Artemisia triene	+
5,179	964	C10 H16	Pinene < $\beta$ ->	++
9,687	1093	C10 H18 O	Linalool	+
18,876	1359	C15 H24	Cubebene < $\alpha$ ->	+
19,130	1367	C15 H24	Bourbonene < $\beta$ ->	+
19,388	1375	C15 H24	Sibirene	+
19,464	1377	C15 H24	Elemene < $\beta$ ->	+
20,225	1401	C15 H24	Caryophyllene <(Z)->	+++
20,517	1410	C15 H24	Copaene< $\beta$ ->	+
21,223	1433	C15 H24	Humulene < $\alpha$ ->	+
21,532	1443	C15 H24	Prenyl limonene <cis->	+
22,124	1463	C15 H24	Cadina-1(6),4-diene<cis->	++
22,564	1477	C15 H24	Macrocarpene < $\beta$ ->	+
22,783	1484	C15 H24	Selinene < $\beta$ ->	+
23,147	1496	C15 H24	Valencene	+
23,456	1506	C15 H24	Amorphene < $\delta$ ->	+
24,872	1555	C15 H26 O	Murol-5-en-4- $\beta$ -ol <cis->	+
25,008	1560	C15 H24 O	Caryophyllene oxide	+
25,743	1585	C15 H24 O	Caryophyllene oxide	+
26,750	1621	C15 H26 O	Cubenol <1,10-di-epi->	+
27,008	1630	C15 H24 O	Aromadendrene epoxide <allo->	+
27,904	1663	C15 H24 O	Eudesma-4(15),7-dien-1 $\beta$ -ol (impure)	+
37,55	2093	C22 H36 O3	Incensole acetate	+

El análisis del perfil cromatográfico indica que el aceite esencial de *G. angustifolia* es predominantemente sesquiterpénico, con el Caryophyllene <(Z)-> (TR 20.225 min) como compuesto mayoritario dominante. Este perfil contrasta notablemente con lo reportado para otras especies de la familia Lecythidaceae. Por ejemplo, Jack et al. (2020), al analizar el aceite esencial de las hojas de *Napoleonaea imperialis* (una especie emparentada), encontraron un perfil dominado principalmente por hidrocarburos saturados (70.95%) y

diterpenos como el fitol (16.91%), reportando la presencia de sesquiterpenos únicamente en los tallos y no en las hojas.

El Caryophyllene <(Z)-> es un sesquiterpeno bicíclico ampliamente presente en aceites esenciales de diversas plantas. Es conocido por su distintivo aroma especiado y se utiliza ampliamente en las industrias alimentaria, cosmética y de perfumería (Tsigoriyna et al., 2024). Al ser el compuesto mayoritario, se espera que, como reporta Pacheco et al. (2020), el Caryophyllene dote de una buena actividad antimicrobiana al aceite esencial de *G. angustifolia*, principalmente frente a *C. albicans*, el cual quedó documentado que es muy efectivo frente a este microorganismo.

Es relevante destacar la presencia considerable de Nonano, un alcano de cadena lineal identificado a los 3.20 min. Como menciona Tavakkoli et al. (2023), los aceites esenciales que contienen n-nonano han demostrado actividades antimicrobianas, como en el caso del aceite esencial de *Ferula xylorhachis*, que contiene un alto porcentaje de n-nonano, y que exhibió actividad antifúngica contra *C. albicans*. La combinación de estos agentes bioactivos proporciona el fundamento que respalda la actividad inhibitoria frente a *E. coli* y *C. albicans* reportada posteriormente.

#### **4.7. Actividad antimicrobiana frente a *C. albicans***

La evaluación de la susceptibilidad de la levadura *Candida albicans* frente al aceite esencial y extracto alcohólico de *G. angustifolia* se realizó mediante el método de microdilución en caldo (Anexo 1). La validación del ensayo se confirmó mediante el comportamiento de los controles internos, donde el control de crecimiento presentó una absorbancia media de  $1.740 \pm 0.08$ , indicando una proliferación celular óptima, mientras

que el control negativo (medio estéril) mantuvo una absorbancia basal de  $0.100 \pm 0.09$ , descartando contaminación cruzada.

La selección exclusiva del extracto alcohólico para los ensayos de microdilución se fundamenta en la naturaleza química de los metabolitos secundarios de interés (como compuestos fenólicos, flavonoides y terpenos), los cuales exhiben una mayor afinidad y solubilidad en solventes orgánicos polares como el etanol, en comparación con el agua. Se descartaron los extractos acuosos e hidroalcohólicos debido a que el agua tiende a solubilizar polisacáridos, proteínas y azúcares que, lejos de inhibir, pueden actuar como sustrato nutritivo para los microorganismos, generando falsos negativos o interferencias en la lectura de la actividad antimicrobiana. Desde una perspectiva de aprovechamiento biotecnológico, el extracto etanólico ofrece una mayor estabilidad y facilidad de concentración para su potencial formulación como conservante industrial.

#### **4.7.1. Resultados cuantitativos de inhibición**

El análisis espectrofotométrico a 450 nm demostró que el aceite esencial ejerce un efecto inhibitorio dependiente de la concentración (Anexo 3). Como se detalla en la Tabla 11, a la concentración máxima evaluada de 5% v/v, el aceite logró inhibir el crecimiento micelial en un 46.89%. Se observó una correlación directa entre la dosis y la respuesta biológica, disminuyendo el porcentaje de inhibición proporcionalmente al aumentar la dilución.

Por su parte, el extracto alcohólico alcanzó una inhibición del 51.61% a su máxima concentración de 100 mg/mL. Sin embargo, su actividad biológica descendió drásticamente en las diluciones subsiguientes (< 10% a 25 mg/mL), sugiriendo una menor estabilidad o potencia de sus compuestos activos en comparación con la matriz lipídica del aceite esencial.

**Tabla 11.** Efecto inhibitorio de *G. angustifolia* frente a *Candida albicans*.

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración</b>	<b>Absorbancia (Media ± DE)</b>	<b>% Inhibición</b>
<b>Aceite Esencial</b>	5 %	0.971±0.016	46.89 %
	2.5 %	1.050±0.011	42.07 %
	1.25 %	1.330±0.013	24.99 %
	0.625 %	1.514±0.058	13.80 %
<b>Ext. Alcohólico</b>	100 mg/mL	0.894±0.021	51.61 %
	50 mg/mL	1.115±0.004	38.12 %
	25 mg/mL	1.612±0.219	7.79 %
<b>Control (+) Gentamicina</b>	5 %	0.084±0.002	99.9 %
<b>Control (+) Terpeneol</b>	20 %	0.064±0.001	100.0 %
<b>Control Crecimiento</b>	-	1.740±0.080	0.0 %

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la fórmula descrita por Senem et al. (2020):

$$\%Inhibición = \frac{Abs_{cc} - Abs_{muestra}}{Abs_{cc} - Abs_{cn}} * 100$$

Bajo las condiciones experimentales evaluadas, no fue posible determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) absoluta para el aceite esencial de *G. angustifolia*, dado que en la máxima concentración ensayada de 5% v/v no se observó una inhibición completa del crecimiento micelial. Por consiguiente, se establece que la MIC > 5%.

El aceite esencial de *G. angustifolia* actúa como un agente fungistático moderado, capaz de reducir la carga microbiana a la mitad, aunque no logra la erradicación total del inóculo observado en los controles positivos (Gentamicina y Terpineol).

Esta actividad parcial puede explicarse por la naturaleza química del aceite discutida en la sección 4.3. Si bien se identificaron moléculas con reconocida actividad antimicrobiana como el Caryophyllene, es probable que su biodisponibilidad frente a *C. albicans* se vea limitada por la complejidad estructural de la pared celular de la levadura, compuesta por capas rígidas de quitina y glucanos que actúan como barrera física, como describe Ibe et al. (2017).

#### **4.8. Actividad antimicrobiana frente a *E. coli***

La susceptibilidad de la bacteria Gram-negativa *E. coli* fue evaluada bajo las mismas condiciones experimentales (Anexo 2). La validación del ensayo mostró una absorbancia media del control de crecimiento de  $0.827 \pm 0.08$ , mientras que el control negativo (medio estéril) se mantuvo en  $0.110 \pm 0.05$ , garantizando un rango dinámico adecuado para la cuantificación de la inhibición.

##### **4.8.1. Resultados cuantitativos de inhibición**

A diferencia de lo observado en levaduras, el aceite esencial de *G. angustifolia* mostró una actividad inhibitoria superior frente a la bacteria (Anexo 4). Como se presenta en la Tabla 12, a la concentración de 5% (v/v), se alcanzó una inhibición del 69.54%, un valor significativamente más alto que el 46% obtenido frente a *C. albicans*.

Sin embargo, se observó un descenso abrupto en la actividad al diluir la muestra, al pasar de 5% a 2.5%, la inhibición cayó drásticamente al 21.70%, lo que sugiere que la

concentración efectiva mínima para desestabilizar la membrana bacteriana se encuentra en un rango estrecho cercano al 5%.

El extracto alcohólico presentó un comportamiento similar, con una inhibición máxima del 61.53% a 100 mg/mL, la cual se mantuvo moderada (47.97%) en la segunda dilución (50 mg/mL) antes de perder efectividad.

**Tabla 12.** Efecto inhibitorio de *G. angustifolia* frente a *E. coli*

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración</b>	<b>Absorbancia (Media <math>\pm</math> DE)</b>	<b>% Inhibición</b>
<b>Aceite Esencial</b>	5 %	0.328 $\pm$ 0.038	69.54 %
	2.5 %	0.671 $\pm$ 0.034	21.70 %
	1.25 %	0.733 $\pm$ 0.018	13.05 %
<b>Ext. Alcohólico</b>	100 mg/mL	0.386 $\pm$ 0.010	61.53 %
	50 mg/mL	0.483 $\pm$ 0.109	47.97 %
	25 mg/mL	0.892 $\pm$ 0.091	0.00 %
<b>Control (+) Ampicilina</b>	5 %	0.053 $\pm$ 0.002	100.0 %
<b>Control (+) Terpeneol</b>	20 %	0.050 $\pm$ 0.003	100.0 %
<b>Control Crecimiento</b>	-	0.827 $\pm$ 0.080	0.0 %

Aunque no se alcanzó una erradicación total del inóculo ( $MIC > 5\%$ ), los datos permiten establecer que la Concentración Inhibitoria Media ( $IC_{50}$ ) del aceite esencial frente a *E. coli* es teóricamente inferior al 5% (ya que a 5% se inhibió el ~70%).

Este 69.54 % y 61.53 % de inhibición del aceite y el extracto sugiere un efecto bacteriostático (retarda el crecimiento) en lugar de bactericida. Esto es valioso en terapias en las que se busca modular la carga bacteriana más que eliminarla drásticamente.

#### **4.9. Discusión general de resultados**

La presente investigación constituye uno de los primeros reportes exhaustivos sobre la composición volátil y la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *G. angustifolia* recolectada en el litoral ecuatoriano. Los resultados obtenidos validan parcialmente la hipótesis de estudio, demostrando que esta especie posee metabolitos secundarios con capacidad biotecnológica para inhibir el crecimiento microbiano, con una selectividad marcada hacia bacterias Gram-negativas.

El análisis GC-MS reveló un perfil químico distintivo dominado por sesquiterpenos, específicamente Caryophyllene <(Z)-> y Humulene < $\alpha$ ->, diferenciándose quimiotaxonómicamente de otras especies de la familia Lecythidaceae como *Napoleonaea imperialis*, las cuales suelen ser ricas en hidrocarburos saturados o diterpenos (Jack et al., 2020). Esta predominancia de sesquiterpenos es un indicador de calidad bioactiva, ya que estos compuestos son conocidos por su alta lipofilia y capacidad de interacción con membranas celulares (Ahmed, 2025).

Un hallazgo crucial para explicar la actividad observada es la presencia de Linalool y Nonano. Aunque el nonano es un alcano con baja actividad intrínseca, su abundancia en la muestra actúa probablemente como un vehículo lipofílico que facilita la solubilidad y

el transporte de los terpenos bioactivos (efecto sinérgico) a través del medio acuoso de cultivo hasta la superficie microbiana (Kaspute et al., 2025).

Al contrastar la respuesta de los dos microorganismos evaluados, se observó una mayor sensibilidad en la bacteria Gram-negativa *E. coli* ( $IC_{50} < 5\%$ , inhibición máx. ~70%) en comparación con la levadura *C. albicans* ( $IC_{50} \approx 5\%$ , inhibición máx. ~47%).

Esta diferencia puede atribuirse a la arquitectura de la envoltura celular. Las bacterias Gram-negativas poseen una membrana externa rica en lipopolisacáridos (LPS) que, si bien actúa como barrera para antibióticos hidrofílicos, es permeable a moléculas hidrofóbicas pequeñas como el Linalool y el Cariofileno (Hummels, 2025). Se ha descrito que el Linalool altera el orden de los ácidos grasos en la membrana, aumentando la permeabilidad y provocando la fuga de contenido citoplasmático en *E. coli* (Guo et al., 2020).

Por el contrario, *C. albicans* posee una pared celular compleja y rígida compuesta por quitina, glucanos y manoproteínas, la cual presenta una mayor resistencia física a la penetración de aceites esenciales emulsificados, requiriendo concentraciones superiores para lograr un efecto fungicida letal (Bhattacharya et al., 2021).

Los resultados comparativos entre el aceite esencial y el extracto alcohólico revelaron un comportamiento dependiente de la matriz. Si bien el extracto alcohólico mostró una alta inhibición inicial (>50% a 100 mg/mL), su actividad se perdió drásticamente al diluirse. Esto sugiere que sus principios activos podrían ser menos estables o requerir altas concentraciones de solvente (etanol) para mantenerse solubles y activos.

En contraste, el aceite esencial mantuvo una actividad más sostenida en las diluciones intermedias (especialmente frente a *E. coli*), lo que resalta su potencial para aplicaciones en la bioeconomía. Aunque no se determinó una CMI absoluta (<5%) que lo clasifique

como un antibiótico clínico potente, su capacidad para reducir la carga microbiana en un 50-70% lo posiciona como un candidato prometedor para el desarrollo de conservantes naturales.

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

Se caracterizó el perfil volátil del aceite esencial de *Gustavia angustifolia* mediante GC-MS, determinándose que es una matriz predominantemente sesquiterpénica. Se identificaron al Caryophyllene <(Z)-> y al Humulene < $\alpha$ -> como los marcadores químicos mayoritarios, junto con una fracción relevante de alcanos (Nonano) y monoterpenos bioactivos (Linalool). Este perfil químico distingue a la especie de otras Lecythidaceae y valida su potencial bioactivo debido a la naturaleza lipofílica de sus componentes.

El análisis cualitativo de los extractos permitió identificar grupos de metabolitos secundarios adicionales a la fracción volátil, evidenciando la presencia de alcaloides, fenoles, saponinas, terpenoides, cumarinas, y lactonas sesquiterpénicas. Estos hallazgos confirman que la especie es una fuente rica en metabolitos diversos, donde el extracto alcohólico concentra compuestos polares que complementan la actividad biológica de la fase etérea.

Se determinó la actividad inhibitoria del aceite esencial frente a cepas de interés clínico. Aunque no se estableció una CMI absoluta menor al 5%, el aceite demostró una selectividad marcada frente a bacterias Gram-negativas. Se obtuvo una inhibición superior en *Escherichia coli* ( $IC_{50} < 5\%$ , inhibición máx. ~70%) en comparación con la levadura *Candida albicans* ( $IC_{50} \approx 5\%$ , inhibición máx. ~47%), lo cual sugiere un mecanismo de acción bacteriolítico facilitado por la interacción de los terpenos con la membrana externa bacteriana. Este hallazgo categoriza a los extractos de *G. angustifolia* como agentes con potencial bacteriostático.

La persistencia del porcentaje de crecimiento residual sugiere que los metabolitos volátiles y el residuo del extracto alcohólico requieren de un umbral de concentración superior para comprometer la viabilidad total de la cepa, o bien, que actúan mediante mecanismos de interferencia metabólica de progresión lenta.

## 5.2. Recomendaciones

- Extender la evaluación microbiológica incluyendo un panel más amplio de microorganismos, específicamente cepas Gram-positivas (como *Staphylococcus aureus*) y otras bacterias Gram-negativas de importancia clínica (como *Pseudomonas aeruginosa*), para confirmar la selectividad del aceite.
- El tamizaje realizado fue de carácter cualitativo (presencia/ausencia). Para futuras investigaciones, se recomienda realizar la cuantificación espectrofotométrica de los metabolitos detectados en los tres extractos (acuoso, hidroalcohólico y alcohólico)
- Dado que el análisis GC-MS reveló una alta presencia de alcanos (como el Nonano) que diluyen la actividad biológica, se recomienda someter al aceite esencial a un proceso de destilación fraccionada al vacío. Esto permitirá separar los hidrocarburos cerosos de los sesquiterpenos bioactivos (Cariofileno y Humuleno), obteniendo un producto de mayor pureza y potencia antimicrobiana.
- Antes de proponer su uso en productos de consumo humano o animal, es imperativo realizar ensayos de citotoxicidad en líneas celulares o modelos *in*

*vivo*, para garantizar que las concentraciones efectivas contra las bacterias sean seguras para los tejidos del huésped.

- Se recomienda probar el aceite esencial en combinación con el extracto alcohólico o con antibióticos comerciales (efecto tablero o checkerboard). Es posible que el extracto de *G. angustifolia* potencie la acción de la ampicilina, permitiendo usar dosis menores de fármacos.
- Se recomienda purificar las fracciones de terpenos dado que la clorofila o los lípidos mayoritarios diluyen la potencia de los principios activos; al aislarlos, la CMI podría bajar drásticamente.
- Finalmente, se recomienda iniciar con una concentración del 10% o 20% (100 a 200 mg/mL) para el aceite esencial y los extractos. Ya que los porcentajes obtenidos con el 5% son prometedores es muy probable que la CMI se encuentre cerca del 8% o 10%.

### Referencias bibliográficas

- Abe, M., Ogawa, Z., Tanuma, H., & Kume, H. (2009). Study of Mycological Examination Methods in Clinical Laboratories--Specimen Pretreatment and Isolation. *Japanese Journal of Medical Mycology*, 50(4). <https://doi.org/10.3314/jjmm.50.235>
- Adams, R. P. (2017). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (ed. 4.1). Allured Publ Crop Carol Steam, IL.
- Ahmed, E. A. (2025). The Potential Therapeutic Role of Beta-Caryophyllene as a Chemosensitizer and an Inhibitor of Angiogenesis in Cancer. *Molecules*, 30(8), 1751. <https://doi.org/10.3390/molecules30081751>
- Alarcón, L. D. G., Vizcaíno, L. P. C., & Tayupanta, T. M. (2022). Productos naturales en Ecuador: revisión fitoquímica y análisis. En *Productos naturales: investigación y perspectivas en Ecuador* (pp. 191-215). <https://doi.org/10.7476/9789978108260.0010>
- Alex.Ramon. (2023, 22 diciembre). *Composición química de los aceites esenciales*. Smellme - Tienda Online. <https://smellme.es/es/aromaterapia/composicion-quimica-aceites-esenciales>
- Alvarez, L., Kumaran, K. S., Nitha, B., & Sivasubramani, K. (2024). Evaluation of biofilm formation and antimicrobial susceptibility (drug resistance) of *Candida albicans* isolates. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 56(1), 353-364. <https://doi.org/10.1007/s42770-024-01558-w>
- Alzain, M., Daghistani, H., Shamrani, T., Almoghrabi, Y., Daghistani, Y., Alharbi, O., Sait, A., Mufrih, M., Alhazmi, W., Alqarni, M., Saleh, B., Zubair, M., Juma, N., Niyazi, H., Niyazi, H., Halabi, W., Altalhi, R., Kazmi, I., Altayb, H., . . . Alfadil, A. (2025). Antimicrobial Peptides: Mechanisms, Applications, and Therapeutic

- Potential. *Infection And Drug Resistance*, Volume 18, 4385-4426. <https://doi.org/10.2147/idr.s514825>
- Amen, Y., Abdelwahab, G., Heraiz, A. A., Sallam, M., & Othman, A. (2025). Exploring sesquiterpene lactones: structural diversity and antiviral therapeutic insights. *RSC Advances*, 15(3), 1970-1988. <https://doi.org/10.1039/d4ra08125k>
- Angel. (2023, 6 abril). *Descubre qué son los extractos vegetales y por qué son tan necesarios*. José Morera S.L. <https://morera.com/descubre-que-son-los-extractos-vegetales-y-por-que-son-tan-necesarios/#:~:text=Los%20extractos%20vegetales%20son%20sustancias,extractos%20bot%C3%A1nicos%20o%20extractos%20vegetales>.
- Arya, P., Vaidya, D., Kaushal, M., Devi, S., Gupta, A., & Chand, S. (2025). Effects of different solvents on phytochemical constituents, in-vitro antimicrobial activity, and volatile components of *Boehmeria rugulosa* Wedd. wood extract. *Scientific Reports*, 15(1), 29135. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-14506-x>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2015). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal Of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barros, M., Redondo, L., Rego, D., Serra, C., & Miloudi, K. (2022). Extraction of essential oils from plants by hydrodistillation with pulsed electric fields (PEF) pre-treatment. *Applied Sciences*, 12(16), 8107. <https://doi.org/10.3390/app12168107>
- Bermúdez-del Sol, A., Viteri-Rodríguez, J. A., Bravo-Sánchez, L. R., & Ceballos Villarreal, N. C. (2025). Plantas medicinales como recurso terapéutico en el cantón Riobamba. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 8(3), 63-72.

- Bhattacharya, R., Rolta, R., Dev, K., & Sourirajan, A. (2021). Synergistic potential of essential oils with antibiotics to combat fungal pathogens: Present status and future perspectives. *Phytotherapy research*, 35(11), 6089-6100. <https://doi.org/10.1002/ptr.7218>
- Biorizon Biotech. (2025, 21 abril). *Extractos vegetales* | Biorizon Biotech. <https://www.biorizon.es/extractos-vegetales/>
- Bosque y Vegetación Protector Prosperina – ESPOL. (s. f.). *Biodiversidad*. Recuperado el **12 de enero de 2026**, de <https://www.bosqueprotector.espol.edu.ec/biodiversidad/>
- Breitenfeld, R. (2020). *Informe del Inventario Interactivo de Plantas Medicinales Naturalizadas y Silvestres con Recomendaciones para Transformación de Productos con fines Medicinales, Farmacéuticos y Cosméticos en el Sector “La Paradita”, Vereda Centro Rural, Municipio de Mutiscua, Norte de Santander, Colombia*. GIZ/CIM.
- BÜCHI Labortechnik AG. (s. f.). *Steam distillation*. <https://www.buchi.com/en/knowledge/technologies/steam-distillation>
- Candida albicans Yeast Cell - Science Source Images. (s. f.). Science Source Images. <https://www.sciencesource.com/1609136-candida-albicans-yeast-cell-stock-image-rights-managed.html>
- Catenacci, F. S., & Simon, M. F. (2017). A checklist of Lecythidaceae in the upper Madeira River, Rondônia, Brazil with comments on diversity and conservation. *Brittonia*, 69(4), 447–456. <https://doi.org/10.1007/s12228-017-9482-4>

- Cedeño, A., Moreira, C., Muñoz, J., Muñoz, A., Pillasaguay, S., & Riera, M. A. (2019). *Comparación de métodos de destilación para la obtención de aceite esencial de eucalipto*. *Revista Colón Ciencias, Tecnología y Negocios*, 6(1), 1–13. <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/215/2151021002/index.html>
- Chemat, F., & Boutekedjiret, C. (2015). Extraction // steam distillation☆. En *Elsevier eBooks*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.11557-4>
- Cocarico, S., Rivera, D., Beck, S., & Obón, C. (2025). Agrobiodiversity as a Reservoir of Medicinal Resources: Ethnobotanical Insights from Aymara Communities in the Bolivian Andean Altiplano. *Horticulturae*, 11(1), 50. <https://doi.org/10.3390/horticulturae11010050>
- Cornejo, X. (2015). Las especies emblemáticas de flora y fauna de la ciudad de Guayaquil y de la provincia del Guayas, Ecuador. *Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales*, 9(2), 16. <https://doi.org/10.53591/cna.v9i2.239>
- Cristancho Cruz, L. M., & Monroy Soler, R. A. (2014). *Manual de métodos generales para determinación de carbohidratos* [Presentación]. SlideShare. <https://www.slideshare.net/slideshow/manual-de-mtodos-generales-para-determinacin-de-carbohidratos/41229887>
- Cushnie, T. T., & Lamb, A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal Of Antimicrobial Agents*, 38(2), 99-107. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014>
- Daglia, M. (2011). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion In Biotechnology*, 23(2), 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>

- De Sousa, D. P., Damasceno, R. o. S., Amorati, R., Elshabrawy, H. A., De Castro, R. D., Bezerra, D. P., Nunes, V. R. V., Gomes, R. C., & Lima, T. C. (2023). Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities. *Biomolecules*, 13(7), 1144. <https://doi.org/10.3390/biom13071144>
- Dogan, H. B., Kuleasan, H., Cakir, I., & Halkman, A. K. (2003). Evaluation of increased incubation temperature and cefixime–tellurite treatment for the isolation of Escherichia coli O157: H7 from minced beef. *International journal of food microbiology*, 87(1-2), 29-34. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00045-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00045-X)
- El-Din, M. I. G., Anwar, F., & Ali, M. (2022). GC/MS analyses of the essential oils obtained from the leaves of the three Jatropha species: J. integrifolia, J. gossypifolia and J. roseae. *Plants*, 11(9), 1268. <https://doi.org/10.3390/plants11091268>
- Elizabeth, H. E. L. (2020, 1 febrero). *Estudio botánico y fitoquímico del fruto de gustavia macarenensis, de la Provincia de Orellana, Ecuador*. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18465>
- Engracia, J. R. L., & Andaluz, M. J. R. (2022). Evaluación antimicrobiana de dos aceites esenciales de Vaccinium corymbosum y las hojas de Moringa oleífera frente a la bacteria Escherichia coli. *Sapienza: International Journal of Interdisciplinary Studies*, 3(2), 273-280. <https://doi.org/10.51798/sijis.v3i2.332>
- Eshima, S., Kurakado, S., Matsumoto, Y., Kudo, T., & Sugita, T. (2022). Candida albicans Promotes the Antimicrobial Tolerance of Escherichia coli in a Cross-Kingdom Dual-Species Biofilm. *Microorganisms*, 10(11), 2179. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10112179>

- Fabio, S., Elisa, L., Giulia, A., Valerio, G., Alessandro, Z., & Sara, S. (2024). Antimicrobial effect of essential oils and terpenes coupled with supercritical carbon dioxide for chicken meat preservation. *LWT*, *215*, 117270. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.117270>
- Guo, F. Y., Chen, W. X., Chen, H. M., Yun, Y. H., Chen, W. J., & Zhong, Q. P. (2020). Antibacterial mechanism of linalool against *Escherichia coli*. *Mod. Food Sci. Technol*, *36*(04), 113-118. <https://doi.org/10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.4.015>
- Gupta, P., Patil, D., & Patil, A. (2019). Qualitative HPTLC phytochemical profiling of *Careya arborea* Roxb. bark, leaves and seeds. *3 Biotech*, *9*(8), 311. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1846-x>
- Hernández-López, A., Félix, D. A. S., Sierra, Z. Z., Bravo, I. G., Dinkova, T. D., & Avila-Alejandre, A. X. (2020). Quantification of Reducing Sugars Based on the Qualitative Technique of Benedict. *ACS Omega*, *5*(50), 32403-32410. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c04467>
- Hernández-Rodríguez, S., Quiroz-Reyes, C. N., Ramírez-Ortiz, M. E., Jesús, E. R., & Aguilar-Méndez, M. Á. (2020). Optimización del proceso de extracción asistida por ultrasonido de compuestos fenólicos de *Justicia spicigera* Schldl. mediante la metodología de superficie de respuesta. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, *23*. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.246>
- Horstman, E., Ayón, J., & Griscom, H. (2018). Growth, survival, carbon rates for some dry tropical forest trees used in enrichment planting in the Cerro Blanco protected forest on the Ecuadorian coast. *Journal of Sustainable Forestry*, *37*(2), 82–96. <https://doi.org/10.1080/10549811.2017.1387153;JOURNAL:JOURNAL:WJSF20;WGROU:STRING:PUBLICATION>

- Hossain, T. J. (2024). Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. *European Journal Of Microbiology And Immunology*, 14(2), 97-115. <https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035>
- Hummels, K. R. (2025). The regulation of lipid A biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 301(9). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2025.110556>
- Ibe, C., Walker, L. A., Gow, N. A., & Munro, C. A. (2017). Unlocking the therapeutic potential of the fungal cell wall: clinical implications and drug resistance. In *Candida albicans: Cellular and molecular biology* (pp. 313-346). Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-50409-4\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-50409-4_16)
- Jack, I. R., Ekong, R. E., & Ndukwe, G. I. (2020). Phytochemical constituents of dichloromethane fraction and essential oil of *Napoleonaea imperialis* rind. ~ 59 ~ *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(5), 59–66. <https://doi.org/10.22271/phyto.2020.v9.i5a.12664>
- Jain, S., Shukla, A. K., Panwar, S., Kumar, R., & Kumar, A. (2024). In vitro antibacterial activity of antibiotics and plant essential oils against *Escherichia coli* MTCC443 supported through the molecular docking and pharmacokinetics study. *Biotechnology and applied biochemistry*, 71(4), 868-880. <https://doi.org/10.1002/bab.2583>
- Kabra, A., Sharma, R., Hano, C., Kabra, R., Martins, N., & Baghel, U. S. (2019). Phytochemical Composition, Antioxidant, and Antimicrobial Attributes of Different Solvent Extracts from *Myrica esculenta* Buch.-Ham. ex. D. Don Leaves. *Biomolecules*, 9(8), 357. <https://doi.org/10.3390/biom9080357>

- Kamiloglu S, Sari G, Ozdal T, Capanoglu E. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*. 2020; 1: 332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
- Kancherla, N., Dhakshinamoothi, A., Chitra, K., & Komaram, R. B. (2019). Preliminary Analysis of Phytoconstituents and Evaluation of Anthelmintic Property of *Cayratia auriculata* (In Vitro). *MAEDICA – A Journal Of Clinical Medicine*, 14(4). <https://doi.org/10.26574/maedica.2019.14.4.350>
- Kapiszka, A. (2024, 4 junio). *Extractos vegetales - Propiedades y aplicaciones en cosmética e industria* / Foodcom S.A. Foodcom S.A. <https://foodcom.pl/es/propiedades-de-los-extractos-vegetales-y-sus-aplicaciones-en-la-industria/>
- Kaspute, G., Ivaskiene, T., Ramanavicius, A., Ramanavicius, S., & Prentice, U. (2025). Terpenes and Essential Oils in Pharmaceuticals: Applications as Therapeutic Agents and Penetration Enhancers with Advanced Delivery Systems for Improved Stability and Bioavailability. *Pharmaceutics*, 17(6), 793. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17060793>
- Khan, A., Kanwal, F., Ullah, S., Fahad, M., Tariq, L., Altaf, M. T., Riaz, A., & Zhang, G. (2025). Plant Secondary Metabolites—Central Regulators Against Abiotic and Biotic Stresses. *Metabolites*, 15(4), 276. <https://doi.org/10.3390/metabo15040276>
- Kulikova, N. E., Chernobrovina, A. G., Roeva, N. N., & Popova, O. Y. (2023). Evaporation as a method for obtaining plant concentrates. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20230276545>
- Leandro de França Ferreira, É., Pereira de Carvalho Oliveira, J., Silva de Araújo, M. R., Rai, M., & Chaves, M. H. (2021). Phytochemical profile and

ethnopharmacological applications of Lecythidaceae: An overview. *Journal of Ethnopharmacology*, 274. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114049>

Liang, J., Zhang, Y., Chi, P., Liu, H., Jing, Z., Cao, H., Du, Y., Zhao, Y., Qin, X., Zhang, W., & Kong, D. (2022). Essential oils: Chemical constituents, potential neuropharmacological effects and aromatherapy - A review. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 6, 100210. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2022.100210>

Mahesh, P. P., Kolape, J., Sultana, H., & Neelakanta, G. (2025). McFarland standards-based spectrophotometry method for calculating approximate multiplicity of infection for an obligate intracellular bacterium *Anaplasma phagocytophilum*. *Microorganisms*, 13(3), 662. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13030662>

María, R., Shirley, M., Xavier, C., Jaime, S., David, V., Rosa, S., & Jodie, D. (2017). Preliminary phytochemical screening, total phenolic content and antibacterial activity of thirteen native species from Guayas province Ecuador. *Journal Of King Saud University - Science*, 30(4), 500-505. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.03.009>

Miranda, J. C., & Marin, M. R. (2022). Uso de plantas medicinales que se comercializan en Guayaquil, Ecuador. *Manglar*, 19(4). <https://doi.org/10.57188/manglar.2022.039>

Molina, J. o. R., Castellano, A. M. T., Carvajal, E. R. C., & Toapanta, N. M. M. (2022, 31 julio). *Extracción Hidroalcohólica de Polifenoles a partir de las hojas de Cedrón (Aloysia citrodorae Paláu), como ingrediente alimentario natural*. <https://investigacion.utc.edu.ec/index.php/RENPPYS/article/view/449>

- Morán del Pozo, N., Molina Moreira, M. N., & Fabara Suárez, M. G. (2023). *Árboles del Bosque Seco del Parque Histórico de Guayaquil* (PDF). Universidad de Especialidades Espíritu Santo. <https://uees.edu.ec/descargas/libros/2023/arboles-del-bosque-seco-del-parque-historico-guayaquil.pdf>
- National Cancer Institute. (s. f.). *Antimicrobiano*. En *Diccionario de cáncer del NCI*. Recuperado el 26 de enero de 2026, de <https://npic.orst.edu/factsheets/antimicrobials.es.html>
- Ngcobo, B., & Mbuyisa, S. (2024). Recent developments in environmentally friendly techniques for extracting bioactive compounds from moringa plant parts. *Acta Horticulturae*, 1394, 93-98. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2024.1394.12>
- Olaifa, K., Nikodinovic-Runic, J., Glišić, B., Boschetto, F., Marin, E., Segreto, F., & Marsili, E. (2021). Electroanalysis of *Candida albicans* biofilms: A suitable real-time tool for antifungal testing. *Electrochimica Acta*, 389, 138757. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.138757>
- Pacheco-Hernández, Y., Sánchez-Hernández, G. R., Reyes-Cervantes, E., Romero-Arenas, O., Pérez-Xochipa, I., & Villa-Ruano, N. (2020). Chemical variation and pharmacological properties of *Dyssodia decipiens* essential oil. *Chemistry & Biodiversity*, 17(10), e2000487. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000487>
- Patil, S. A., Nesaragi, A. R., Rodríguez-Berrios, R. R., Hampton, S. M., Bugarin, A., & Patil, S. A. (2023). Coumarin Triazoles as Potential Antimicrobial Agents. *Antibiotics*, 12(1), 160. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010160>
- Pinguil Yugsi, M. E., Estevez Montalvo, E., Andrade Campoverde, D., & Fernanda Alvarado, M. (2022). *Escherichia coli* productora de BLEE de origen comunitario

e intrahospitalario. *Revista Vive*, 5(14), 518–528.  
<https://doi.org/10.33996/revistavive.v5i14.165>

Podolak, I., Grabowska, K., Sobolewska, D. *et al.* Saponins as cytotoxic agents: an update (2010–2021). Part II—Triterpene saponins. *Phytochem Rev* **22**, 113–167 (2023).  
<https://doi.org/10.1007/s11101-022-09830-3>

Reyes Deloso, Alberto, Penieres Carrillo, José Guillermo y Ortega Jiménez, Fernando (agosto 2024). Destilación por arrastre de vapor (monografía). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.  
[https://ru.cuautitlan.unam.mx/bitstream/123456789/409/141/FESC\\_Q\\_2023\\_12\\_Final.pdf](https://ru.cuautitlan.unam.mx/bitstream/123456789/409/141/FESC_Q_2023_12_Final.pdf)

Salam, M. A., Al-Amin, M. Y., Pawar, J. S., Akhter, N., & Lucy, I. B. (2023). Conventional methods and future trends in antimicrobial susceptibility testing. *Saudi Journal Of Biological Sciences*, 30(3), 103582.  
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103582>

Sareriya, K. J., Vanzara, P. B., & Upadhyay, D. (2023). Methodology for extraction of essential oils: A review. *International Journal for Multidisciplinary Research*, 5(4), Article 5442. <https://doi.org/10.36948/ijfmr.2023.v05i04.5442>

Shahbaz, M. U., Arshad, M., Mukhtar, K., Nabi, B. G., Goksen, G., Starowicz, M., Nawaz, A., Ahmad, I., Walayat, N., Manzoor, M. F., & Aadil, R. M. (2022). Natural Plant Extracts: An Update about Novel Spraying as an Alternative of Chemical Pesticides to Extend the Postharvest Shelf Life of Fruits and Vegetables. *Molecules*, 27(16), 5152. <https://doi.org/10.3390/molecules27165152>

- Sheba, L. A., & Anuradha, V. (2020). An updated review on *Couroupita guianensis* Aubl: A sacred plant of India with myriad medicinal properties. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.15171/JHP.2020.01>
- Silva, D. N. P. B., Adriana, F., Martins, D. T. de O., Borges, Q. I., Lindote, M. V. N., Zoratti, M. T. R., Oliveira, R. G. de, Torquato, H. F. V., Gazoni, V. F., Costa, L. A. M. A. da, Souza, E. C. A. de, Silva, F. M. A. da, Arunachalam, K., & Damazo, A. S. (2021). Methanolic extract of *Cariniana rubra* Gardner ex Miers stem bark negatively regulate the leukocyte migration and TNF- $\alpha$  and up-regulate the annexin-A1 expression. *Journal of Ethnopharmacology*, 270. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113778>
- Sulaiman, M., Jannat, K., Nissapatorn, V., Rahmatullah, M., Paul, A. K., De Lourdes Pereira, M., Rajagopal, M., Suleiman, M., Butler, M. S., Break, M. K. B., Weber, J., Wilairatana, P., & Wiart, C. (2022). Antibacterial and Antifungal Alkaloids from Asian Angiosperms: Distribution, Mechanisms of Action, Structure-Activity, and Clinical Potentials. *Antibiotics*, 11(9), 1146. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091146>
- Taiz, L., Møller, I. M., Murphy, A., & Zeiger, E. (2023). *Plant Physiology and Development*. En *Oxford University Press eBooks*. <https://doi.org/10.1093/hesc/9780197614204.001.0001>
- Takó, M., Kerekes, E. B., Zambrano, C., Kotogán, A., Papp, T., Krisch, J., & Vágvölgyi, C. (2020). Plant Phenolics and Phenolic-Enriched Extracts as Antimicrobial Agents against Food-Contaminating Microorganisms. *Antioxidants*, 9(2), 165. <https://doi.org/10.3390/antiox9020165>

- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 134. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
- Tavakkoli, A., Asili, J., Soheili, V., Iranshahy, M., Saiar, M., Najafzadeh, M. J., & Iranshahi, M. (2023). GC/MS profiling of the essential oils from *Ferula xylorrhachis* Rech. f. roots and aerial parts and assaying their antimicrobial activity against human skin pathogens. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 26(5), 1236-1244. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2023.2280140>
- Teramura, H., Ogura, A., Everis, L., & Betts, G. (2019). MC-Media pad ec for enumeration of *Escherichia coli* and coliforms in a variety of foods: Aoac performance tested method sm 011902. *Journal of AOAC International*, 102(5), 1502-1515. <https://doi.org/10.1093/jaoac/102.5.1502>
- Thielmann, J., Muranyi, P., & Kazman, P. (2019). Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon*, 5(6). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01860>
- Tsigoriyna, L., Sango, C., & Batovska, D. (2024). An update on microbial biosynthesis of  $\beta$ -caryophyllene, a sesquiterpene with multi-pharmacological properties. *Fermentation*, 10(1), 60. <https://doi.org/10.3390/fermentation10010060>
- Vandeputte, O. M., Kiendrebeogo, M., Rasamiravaka, T., Stévigny, C., Duez, P., Rajaonson, S., Diallo, B., Mol, A., Baucher, M., & Jaziri, M. E. (2011). The flavanone naringenin reduces the production of quorum sensing-controlled

virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*, 157(7), 2120-2132. <https://doi.org/10.1099/mic.0.049338-0>

Vazquez, A. (2020, 8 junio). *Biotecnología aplicada a productos naturales* -. <https://invdes.com.mx/los-investigadores/biotecnologia-aplicada-a-productos-naturales/#:~:text=Y%20en%20este%20punto%20es,amigables%20con%20el%20medio%20ambiente.&text=Amarakoon%2C%20I.%20I.%2C%20Hamilton%2C%20C.%20L.,Biotecnolog%C3%ADa%20en%20M%C3%A9xico>.

World Health Organization: WHO. (2023, 21 noviembre). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Wortmann, S., Kutta, R. J., & Nuernberger, P. (2022). Monitoring the photochemistry of a formazan over 15 orders of magnitude in time. *Frontiers in Chemistry*, 10, 983342. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.983342>

Yahav, G., Pawar, S., Lipovsky, A., Gupta, A., Gedanken, A., Duadi, H., & Fixler, D. (2023). Probing Polarity and pH Sensitivity of Carbon Dots in *Escherichia coli* through Time-Resolved Fluorescence Analyses. *Nanomaterials*, 13(14), 2068. <https://doi.org/10.3390/nano13142068>

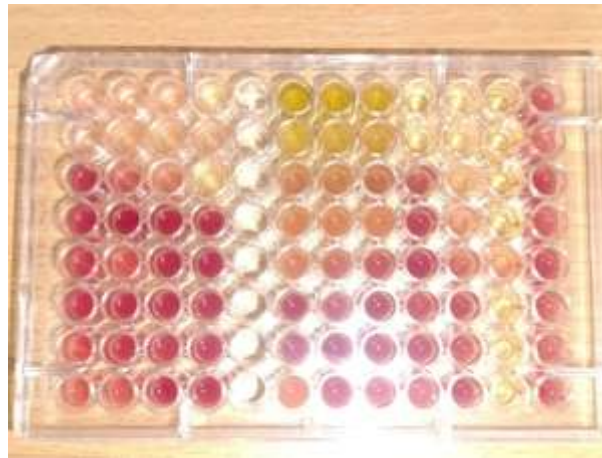
Yan, Y., Li, X., Zhang, C., Lv, L., Gao, B., & Li, M. (2021). Research Progress on Antibacterial Activities and Mechanisms of Natural Alkaloids: A Review. *Antibiotics*, 10(3), 318. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030318>

Yoon, B., Jackman, J., Valle-González, E., & Cho, N. (2018). Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing, and Therapeutic Applications. *International Journal Of Molecular Sciences*, 19(4), 1114. <https://doi.org/10.3390/ijms19041114>

Zadeh, S. F. H., Gharaghani, M., Nouripour-Sisakht, S., & Razmjoue, D. (2022). Chemical composition of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl., and *Prangos uloptera* DC. essential oils and their antifungal activities. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 11(4), 585-591. <https://doi.org/10.34172/jhp.2022.67>

## Anexos

Anexo 1. Resultados de la placa de 96 pocillos de *C. albicans*



Anexo 2. Resultados de la placa de 96 pocillos de *E. coli*



Anexo 3. Absorbancias de la placa de *C. albicans*

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1	Resultados de medición														
2	TEST LECTURA C. ALBICANS vs														
3	TUBOS 140.20 PH														
4															
5	Mediación I														
6	Longitud de onda 490nm														
7															
8	Rango 1														
9															
10	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
11	0.002	0.046	0.007	0.042	0.004	0.046	0.076	0.007	0.044	0.009	0.044	0.029	0.042	0.002	0.042
12	0.076	0.046	0.017	0.008	0.007	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
13	0.008	0.007	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
14	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
15	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
16	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
17	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
18	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
19	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008	0.008
20	Asesoría														
21	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
22	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría
23	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría
24	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría
25	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría
26	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría
27	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría
28	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría
29	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría	Asesoría
30	Longitud de onda 490 nm														

