



POSGRADOS

MAESTRÍA EN PRODUCTOS FARMACÉUTICOS NATURALES

RPC-SO-09-NO.174-2020

OPCIÓN DE TITULACIÓN:
TESIS

TEMA:

DETERMINACIÓN DE LOS
COMPUESTOS FENÓLICOS
(ANTOCIANINAS) Y EVALUACIÓN
DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DE VACCINIUM
FLORIBUNDUM (MORTIÑO)
PROVENIENTE DE LA PROVINCIA
DE COTOPAXI, EN EL
TRATAMIENTO PREVENTIVO DE
INFECCIONES DE VÍAS URINARIAS.

AUTOR(ES)

JOHANA GABRIELA MENESES MORILLO
STEPHANIE ABIGAIL MONCAYO PICERNO

DIRECTOR:

MARÍA ELENA MALDONADO RODRÍGUEZ

QUITO – ECUADOR
2022

Autor(es):**Johana Gabriela Meneses Morillo.**

Biología de los Recursos Naturales.

Candidata a Magíster en Productos Farmacéuticos Naturales por la Universidad Politécnica Salesiana – Sede Quito.

johame_0505@hotmail.com.

**Stephanie Abigail Moncayo Picerno.**

Biología de los Recursos Naturales.

Candidata a Magíster en Productos Farmacéuticos Naturales por la Universidad Politécnica Salesiana – Sede Quito.

abiimoncayo@gmail.com.

Dirigido por:**María Elena Maldonado Rodríguez.**

Bioquímica Farmacéutica.

Doctora en Bioquímica y Biología Molecular.

mmaldonado@ups.edu.ec.

Todos los derechos reservados.

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

DERECHOS RESERVADOS

2022 © Universidad Politécnica Salesiana.

QUITO– ECUADOR – SUDAMÉRICA

Johana Gabriela Meneses Morillo

Stephanie Abigail Moncayo Picerno

DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS (ANTOCIANINAS) Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE VACCINIUM FLORIBUNDUM (MORTIÑO) PROVENIENTE DE LA PROVINCIA DE COTOPAXI, EN EL TRATAMIENTO PREVENTIVO DE INFECCIONES DE VÍAS URINARIAS.

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso y la Virgencita que me protegieron con su valioso manto en los momentos en donde parecía que todo se desvanecía. A mis bellos Abuelos Ángel e Inés, mi sonriente Madre, mi hermana, mi ahijadito, mis queridos tíos, mi primo y esposo, que fueron quienes me apoyaron de una u otra manera con el fin de que culmine mi propósito planteado.

Johana Meneses

A Dios, que ilumina y guía mi camino en todo momento. A mis padres Marco y Clarita, que son mi más grande ejemplo de amor, superación y constancia. A mis hermanos Marco Ismael y Gustavo Francisco, que siempre han estado para apoyarme incondicionalmente. A mis sobrinas Jahziel y Susan, porque su amor y su ternura me hacen más perseverante.

Stephanie Moncayo

AGRADECIMIENTO

A Dios por otorgarnos vida y salud, para culminar con éxito nuestra Maestría a pesar de las adversidades.

A la Universidad Politécnica Salesiana por permitirnos desarrollar el presente trabajo de investigación, a sus docentes: el Dr. Paco Noriega, MSc. Daniel Acurio por brindarnos los conocimientos y experiencias para desarrollar la tesis con éxito.

Al Grupo de Investigación BIOARN por su apoyo brindado.

A nuestra tutora, Dra. María Elena Maldonado, por su acompañamiento y guía en la ejecución de este proyecto de investigación.

A los Laboratorios de Ciencias de la Vida de la UPS y a su Coordinadora MSc. Laura Huachi, por su granito de arena durante nuestro proyecto.

A todos, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Resumen	8
Abstract	9
1. Introducción	10
2. Determinación del Problema.....	13
3. Marco teórico referencial.....	16
3.1 <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth	16
3.1.1 Localización Mundial y Nacional	16
3.1.2 Hábitat	16
3.1.3 Taxonomía	17
3.1.4 Descripción botánica	17
3.2 METABOLITOS SECUNDARIOS	18
3.2.1 Tipos de Metabolitos Secundarios	19
3.2.2 Composición Química	22
3.2.3 Antocianinas y Antocianidinas.....	24
3.2.4 Usos	25
3.3 EXTRACCIÓN.....	25
3.3.1 Definición.....	25
3.3.2 Factores a considerar en la extracción de bioactivos.....	26
3.3.3 Tipos de Extracción	27
3.3.4 Extractos	28
3.4 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN	29
3.4.1 Método de Folin-Ciocalteu para Cuantificación de Fenoles Totales.....	29
3.4.2 Método de pH Diferencial para Cuantificación de Antocianinas	30
3.5 MICROBIOLOGÍA	31
3.5.1 Infecciones del Tracto Urinario	31
3.5.2 Microorganismos Patógenos del Tracto Urinario	32
3.5.3 Papel que desempeña el Mortiño en la Prevención de Infecciones del Tracto Urinario.....	34
3.6 TÉCNICAS DE DILUCIÓN	35
3.6.1 Microdilución y Concentración Mínima Inhibitoria	35

3.7	ANTIBIÓTICOS	36
3.7.1	Fosfomicina.....	37
3.7.2	Nitrofurantoína.....	38
3.7.3	Fluconazol	38
3.7.4	Timol, Antimicrobiano Natural	38
3.7.5	Resistencia a los Antibióticos	39
3.8	MÉTODOS DE SEPARACIÓN QUÍMICA	42
3.8.1	Reflujo y Acidificación.....	42
3.8.2	Sistemas Cromatográficos	42
4.	Materiales y metodología.....	49
5.	Resultados y discusión.....	66
6.	Conclusiones	91
	Referencias	92

*DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS
FENÓLICOS (ANTOCIANINAS) Y
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE
VACCINIUM FLORIBUNDUM (MORTIÑO)
PROVENIENTE DE LA PROVINCIA DE
COTOPAXI, EN EL TRATAMIENTO
PREVENTIVO DE INFECCIONES DE VÍAS
URINARIAS.*

AUTOR(ES):

JOHANA GABRIELA MENESES MORILLO
STEPHANIE ABIGAIL MONCAYO
PICERNO

RESUMEN

Según Rengifo (2013), aproximadamente 1 de cada 3 mujeres requerirán tratamientos con antibióticos por infecciones IVU (Infecciones de las vías urinarias) antes de los 24 años, y el 50% de féminas sufrirán una IVU alguna vez. Por lo tanto, como una alternativa preventiva, útil y natural a infecciones urinarias, se consideró a *Vaccinium floribundum* (mortiño) de la Familia Ericácea ya que posee alto contenido de antocianinas, lo que le confiere propiedades antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas. Debido a esto el objetivo de la investigación fue determinar la cantidad de antocianinas presentes en el extracto fluido de *Vaccinium floribundum* y evaluar la actividad antimicrobiana frente a microorganismos causantes de infecciones urinarias, estableciendo la concentración mínima inhibitoria (MIC). Así se prepararon los extractos etanólicos al 20 y 50%, con frutos recolectados en la Provincia de Cotopaxi, Cantón Sigchos. En estos extractos se cuantificó la concentración de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu, se obtuvo 537,26 mg AG/100 mL de extracto al 20% y 621,04 mg AG/mL al 50%. En cuantificación de antocianinas totales por pH diferencial, se obtuvo 11,6391 mg/L de extracto al 20% y 43,63mg/L al 50%. Posteriormente, se evaluó la concentración mínima inhibitoria (MIC) y el porcentaje de inhibición de los extractos, en *Escherichia coli* con una MIC de 390,6 µg/mL para ambos extractos, 3,66% de inhibición para el extracto al 20% y 11,77% para el extracto al 50%; en *Staphylococcus saprophyticus* la MIC fue de 390,63 µg/mL para ambos extractos y 88,42% de inhibición para el extracto al 20%; 88,44% para el extracto al 50%; y para *Candida albicans* la MIC fue de 390,63 µg/mL para ambos extractos; 1,63% de inhibición para el extracto al 20% y 37,05% para el extracto al 50%. Finalmente, aplicando cromatografía en capa fina (TLC), los factores de retención (Rf) fueron: 0,42 (cianididina 3-O-glucósido), 0,62 (malvidina) y 0,86 (cianidina). En conclusión, los extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 20 y 50% presentan actividad antimicrobiana.

Palabras clave: infecciones urinarias, mortiño, extractos etanólicos, antocianinas.

ABSTRACT

According to Rengifo (2013), about 1 in 3 women will require antibiotic treatments for UTI (Urinary Tract Infections) before the age of 24, and 50% of women will suffer a UTI at some time. Therefore, as a preventive useful and natural alternative to urinary infections, *Vaccinium floribundum* (mortiño) of the Ericaceae Family was considered for its high content of anthocyanins, antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties. Because of this, the research was based on determining the amount of anthocyanins present in the fluid extract of *Vaccinium floribundum* and to evaluate the antimicrobial activity against microorganisms that cause urinary infections, establishing the minimum inhibitory concentration (MIC). So, the ethanolic extracts at 20 and 50% were prepared, with fruits collected in the Province of Cotopaxi, Canton Sigchos. In these extracts, the concentration of total phenols was quantified by the Folin-Ciocalteu method, obtaining 537,26 mg AG/100 mL of 20% extract and 621,04 mg AG/mL at 50%. In total anthocyanin quantification by differential pH, 11,6391 mg/L of extract at 20% and 43,63mg/L at 50% were obtained. Subsequently, the minimum inhibitory concentration (MIC) and the percentage of inhibition in the extracts were evaluated in *Escherichia coli* with a MIC of 390,6 µg/mL for both extracts, 3,66% inhibition for the 20% extract and 11,77% for the 50% extract; in *Staphylococcus saprophyticus* the MIC was 390,63 µg/mL for both extracts and 88,42% inhibition for the 20% extract; 88,44% for the 50% extract; in *Candida albicans* the MIC was 390,63 µg/mL for both extracts; 1,63% inhibition for the 20% extract and 37,05% for the 50% extract. Finally, applying thin layer chromatography (TLC), the retention factors (Rf) were: 0,42 (cyanididine 3-O-glucoside), 0,62 (malvidin) and 0,86 (cyanidin). In conclusion, 20% and 50% ethanolic extracts of *Vaccinium floribundum* (mortiño) present antimicrobial activity.

Keywords: urinary tract infections, mortiño, ethanolic extracts, anthocyanins.

1. INTRODUCCIÓN

Vaccinium floribundum es un arbusto silvestre, conocido comúnmente como mortiño, “arándano andino”, “baya andina”, “baya silvestre”, “superfruta”. Este fruto es una baya de la Familia Ericacea, perteneciente al género *Vaccinium* que crece de 3400 a 3800 msnm en la región andina con una variedad de compuestos fenólicos. El mortiño posee elevadas concentraciones de compuestos fenólicos, entre ellos las antocianinas en bayas, hojas, flores, frutos, tienen un azúcar y una aglicona. (Pérez, Endara, Garrido, & Ramírez, 2020).

Al mortiño ecuatoriano en el exterior conocido como “Andean Blueberry”, Estados Unidos se destaca como el principal importador, productor y consumidor de blubberies. En segundo lugar, se encuentra Canadá, estos países importan la mayor cantidad de fruta en otoño. Así, entre los principales proveedores de la fruta destacan: Argentina, Nueva Zelanda, México y Chile. En el año 2000 Chile exportó a Estados Unidos 2’347.517 Kg (Muñoz, 2004). El Andean Blueberry en comparación al blueberry es perenne, se cosecha únicamente en los meses de octubre y noviembre. Al Andean blueberry se lo puede encontrar en los páramos del Ecuador como planta silvestre siendo comercializado a nivel local, su ecosistema es considerado sensible por lo que no se cuenta con un método de propagación que aporte con uniformidad vegetal, descartando por el momento la posibilidad del cultivo comercial de la fruta a nivel internacional (Llerena, Samaniego, Ramos, & Brito, 2004).

Dado que el género *Vaccinium sp.* presenta actividad antimicrobiana, antioxidante y anticancerígena, se estima determinar su acción frente a microorganismos que causan infecciones en el tracto urinario (ITU), considerando que en el instante de tratarse a las pacientes de ITU con antibióticos de amplio espectro sin un uso controlado e inapropiado, puede desarrollar resistencia antibacteriana, generando cepas multirresistentes. Entre los microorganismos que infectan las vías urinarias se mencionan a *Pseudomonas aeruginosa*, especies de *Klebsiella*, especies de

Enterobacter, especies de *Acinetobacter*, *Escherichia coli*, especies de *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, especies de *Acinetobacter* y especies de *Citrobacter* pertenecientes al grupo de Gram-negativas. Las especies *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus* y *Staphylococcus coagulasa* negativo se ubican dentro del grupo de las bacterias Gram-positivas (Ahmed, Shariq, Alsalloom, Babikir, & Alhomoud, 2019).

Al enfocar el género *Vaccinium* con la actividad bactericida en la prevención de infecciones del tracto urinario, se conoce que químicamente *Vaccinium floribundum* está relacionada con la presencia de glucósidos de flavonol, polifenoles (proantocianinas, antocianinas y flavan-3-oles) (Baenas, y otros, 2020). Su acción bactericida se puede comprobar mediante la MIC (Concentración mínima Inhibitoria), que consiste en una técnica de diluciones seriadas en una placa estéril las cuales contienen concentraciones definidas de un extracto frente a diversos microorganismos y mediante el crecimiento más bajo del microorganismo se conocerá su respectivo porcentaje de inhibición. Para aplicar esta técnica es importante trabajar con colorantes químicos estables entre éstos destaca el TTC 1% (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio), que forma sales de formazán permitiendo la detección de colonias microbianas a una longitud de onda de 450nm; se manifiesta con un cambio de incoloro a color rojizo (Hemeg, y otros, 2020; Condalab, 2019).

Es necesario cuantificar la cantidad de fenoles totales de las muestras de *Vaccinium floribundum* por lo tanto, de los extractos fluidos de mortiño preparados al 20 y 50% de etanol, se cuantifican colorimétricamente con el reactivo de Folin-Ciocalteu (F-C) con ácido gálico como estándar en una placa. El reactivo de F-C se caracteriza por constituir complejos fosfomolibdicos-fosfotúngsticos debido a la formación de óxidos cromógenos en pH básico con coloración azul, ya que en ese momento ocurre una reducción química. La medición realizada con un espectrofotómetro ultravioleta visible mide la absorbancia de los compuestos azules (fenoles), siendo esta absorbancia directamente proporcional a la concentración (Cortez, Faicán, Pirovani, & Piagentini, 2018). Luego se considera la concentración de antocianinas

monoméricas tomando en cuenta la longitud de onda máxima de las muestras, en este caso 520nm y 700nm por el método de pH diferencial (Zapata, y otros, 2014).

Adicionalmente, para separar fracciones químicas de los extractos crudos del mortiño se utilizó la técnica TLC (Cromatografía de capa fina), considerando al factor de retención Rf como un número fundamental para detectar el tipo de bioactivos que se separaron, en este caso serán derivados glicosilados de antocianinas, entre los cuales figuran la Pelargonidina, Cianidina, Delfinidina, Peonidina, Petunidina y Malvinidina (Zapata, y otros, 2014). La técnica de TLC comprende una fase estacionaria (placa de sílica gel 10x10cm, factor 254nm) con una fase móvil, de solventes de naturaleza medianamente polar en diversas proporciones, estos extractos de mortiño se compararon con un estándar de cianidina 3-O-glucósido con un Rf de 0,44 (Santacruz, 2017).

Este estudio busca determinar componentes químicos en *Vaccinium floribundum* que manifiesten la actividad antimicrobiana mediante técnicas espectrofotométricas, microbiológicas y cromatográficas con el fin de prevenir infecciones de las vías urinarias.

2. DETERMINACIÓN DEL PROBLEMA

Durante décadas, en la medicina tradicional, se han venido utilizando algunos frutos de la familia de las Ericáceas, del género *Vaccinium*, tales como *Vaccinium macrocarpon* Ait (arándano rojo) y *Vaccinium floribundum* (mortiño), en el tratamiento de problemas urinarios, gracias a su contenido de principios activos de interés, llamadas **antocianinas**. Es así como, las tribus nativas norteamericanas, utilizaban el zumo del arándano rojo (atoka) para la prevención de infecciones de vías urinarias (Fernández, 2008). Pues, el efecto en el tracto urinario se debía a su acidez, ya que, al producirse ácido hipúrico, disminuía el pH urinario; sin embargo, el descenso del pH urinario no es suficiente para lograr una disminución de la carga microbiana (De León, Ovadía, Vásquez, & Fainsod, 2009). Recientes estudios demuestran que las sustancias activas presentes en estos frutos: fructuosa y proantocianidinas, actúan impidiendo la adhesión de bacterias, como *Escherichia coli*, al urotelio, principalmente en mujeres, no así en pacientes con vejiga neurogénica. Por lo que se recomienda el uso de esta especie vegetal como preventivo en casos de patologías urológicas (De León, Ovadía, Vásquez, & Fainsod, 2009).

Dentro de las Infecciones del Tracto Urinario (ITU), se clasifica a la Infección de Vías Urinarias (IVU), la cual ocurre entre el 1 y el 3% de adolescentes en edades escolares y se incrementan con el inicio de la actividad sexual, siendo muy común en mujeres de entre los 20 a 50 años. Según estadísticas del Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP), 4 de cada 10 habitantes, reportaron infecciones en vías urinarias durante el año 2009 (Ministerio de Salud Pública, 2013). En 2019, el Instituto Nacional de Estadística y Censos, INEC reportó que hubo 9.916 casos de infecciones de vías genitourinarias en un grupo etario de 18 a 29 años de sexo femenino, de los cuales el 9,0% se presentaron en la Sierra y el 7,2% en la Costa (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2019; Rengifo, 2013).

En la Guía de Práctica Clínica Infección de vías urinarias en el embarazo, del Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP), se afirma que no existen métodos de prevención efectivos para las infecciones de vías urinarias en el embarazo. Sin embargo, se considera que el consumo de jugo de *Vaccinium floribundum* (mortiño) y lactobacilos probióticos podrían contribuir a prevenir Infecciones de Vías Urinarias (IVU) recurrentes; puesto que se ha evidenciado que el mortiño puede disminuir el número de IVU sintomáticas en un período de 12 meses, sobre todo en IVU recurrentes; pero, aún no se ha especificado ni la dosis, ni el método de administración. Por lo que se recomienda análisis fitoquímicos y de actividad biológica de esta especie vegetal (Ministerio de Salud Pública, 2013).

Una de las graves consecuencias de las infecciones bacterianas del tracto urinario, es que pueden extenderse a los riñones causando pielonefritis e infecciones crónicas renales (Imam, 2020). Las infecciones urinarias generan altas tasas de hospitalización en diálisis, presentándose frecuentemente en pacientes con trasplante renal. Los pacientes con el sistema inmunológico débil y diagnosticados con diabetes, son los más propensos a ser atacados por infecciones que causen afecciones crónicas a uno o ambos riñones (García, Panizo, Proy, García, & Fernández, 2020). El no dar un tratamiento adecuado y a tiempo a estas afecciones, puede desencadenar en una insuficiencia renal aguda (IRA), que es el aumento de la concentración de creatinina sérica (Barón, García, & León, 2019).

Por otro lado, el uso de antibióticos en el tratamiento de infecciones de origen viral, que no requieren fármacos antibacterianos, terapias antibióticas inadecuadas (dosis, tiempo de tratamiento, uso del antibiótico equivocado), falta de adherencia por parte del paciente, la automedicación y la venta no autorizada de antibióticos, ha generado la aparición y diseminación de cepas con resistencia a los antibióticos más utilizados (Garza, Treviño, & De la Garza, 2018). Los índices de resistencia bacteriana, en el Ecuador, son elevadas para los principales antibióticos, tales como la ampicilina, ampicilina/sulbactam, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulánico y sulfas (Ministerio de Salud Pública, 2013).

Se ha demostrado, mediante estudios *in vitro*, *in vivo* y ensayos clínicos que las antocianinas poseen propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y anticancerígenas, además de que se les atribuye ciertos beneficios, como la prevención de enfermedades cardiovasculares, neuronales, produciendo el mejoramiento de la visión, actuando contra la arteriosclerosis y una potente actividad antioxidante (Narváez, 2016). Por lo antes mencionado, se pretende demostrar que *Vaccinium floribundum* (mortiño), posee actividades terapéuticas, sin riesgos para la salud, al ser utilizadas en dosis correctas, corroborando con literatura científica y estudios previos, mismos que respalden las aplicaciones tradicionales.

El principal grupo beneficiario en este estudio será el género femenino (mujeres) con edades comprendidas entre 20 y 50 años, que sufren infecciones de vías urinarias (Garza, Treviño, & De la Garza, 2018).

El objetivo principal que se ha establecido en este proyecto de investigación es determinar la concentración de compuestos fenólicos (antocianinas) presentes en el extracto fluido de *Vaccinium floribundum* (mortiño) y evaluar su actividad antimicrobiana en la prevención de infecciones de las vías urinarias. Se busca, además, identificar los metabolitos secundarios presentes en *Vaccinium floribundum* (mortiño) que poseen potencial antimicrobiano de interés en el tratamiento preventivo de infecciones de vías urinarias y determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de las antocianinas (cianidina) de *Vaccinium floribundum* (mortiño) frente a *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus saprophyticus*, principales microorganismos causantes de infecciones urinarias.

Adicionalmente, se ha planteado la interrogante, ¿Se puede separar compuestos fenólicos para cuantificar los compuestos de *Vaccinium Floribundum* (mortiño) y definir la propiedad antimicrobiana?

3. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

3.1 *VACCINIUM FLORIBUNDUM* KUNTH

3.1.1 LOCALIZACIÓN MUNDIAL Y NACIONAL

Fuentes estadísticas indican que el 10 por ciento de las especies de *Vaccinium floribundum* (mortiño) son nativas de América del Sur y América Central, 450 especies se encuentran en el hemisferio norte cerca de Mongolia, 92 especies en China, en mínima cantidad están en Madagascar y África (Cobo, 2014). Éste pequeño arbusto crece en Venezuela con el nombre de “chivacu”, en Perú como “congama”, Bolivia comúnmente llamado “macha-macha” y Ecuador se denomina “arándano andino”. En Ecuador las provincias que tienen la fortuna de contar con esta fruta silvestre son: las provincias de Imbabura (San Pablo, Cashaloma y Cotacachi Cayapas), Pichincha (Cayambe - Parroquia Aloag), Cotopaxi (Cantón Sigchos), Chimborazo (Parroquia San Juan), en general el mortino está distribuido en la Sierra Central donde se comercializa para el resto de las provincias y en mercados locales para consumo de sus pobladores (Roldán, 2012).

3.1.2 HÁBITAT

Esta especie se localiza en un ecosistema arbustal siempre verde y herbazal del páramo de piso climático con bosques de tipo montano alto y montano alto superior. Al norte, la altitud a la que se encuentra es de 3200-3900 msnm, mientras que, al sur se encuentra entre 2800 y 3600 msnm, presentando relieves montañosos, mesorelieves, valles y cordilleras (MAE, 2013). *Vaccinium floribundum* (mortiño) es un fruto exclusivo de los páramos herbáceos a una altitud de 3500 a 3800 msnm. En el bosque se pueden observar especies como *Gynoxys hallii* Hieron, *Myrsine andina* (Mez), *Hesperomeles obtusifolia* (Pers.), *Hesperomeles ferruginea*, *Muehlenbeckia tamnifolia* (Kunth), *Vaccinium floribundum* Kunth siendo este último cosechado en menor cantidad, *Vaccinium floribundum* ha empezado a desaparecer por la escasa información que tienen los pobladores acerca de sus

múltiples aplicaciones y la cosecha exagerada que amenaza a la especie (Coba, y otros, 2012; Caranqui, Erazo, Guilcapi, & Noboa, 2022).

3.1.3 TAXONOMÍA

Vaccinium floribundum Kunth. es conocido vulgarmente como: mortiño, uva de monte agraz, superfruta, abia, arándano andino, las variedades del fruto son color negro, rojo, rosado; esta coloración depende del grado de maduración fisiológica y especie de mortiño (Roldán, 2012).

La taxonomía del mortiño se describe a continuación (Tropicos, 2022):

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	<i>Magnoliidae</i>
Superorden:	<i>Asteranae</i>
Orden:	<i>Ericales</i>
Familia:	<i>Ericaceae</i>
Género:	<i>Vaccinium</i>
Especie:	<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth

3.1.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Vaccinium floribundum (mortiño) es un arbusto ramificado con altura máxima de 2 metros, su hojas poseen margen aserrado con un tamaño de 2cm de largo, nervación pinada, cáliz articulado, flores solitarias o racimos de 6 a 10 flores, hipanto globoso, 5 lóbulos reflexos y lanceolados, dehiscencia apical poricida, corola de color blanco o rosado con forma cilíndrica, ovario ínfero con 5 lóculos, 8

a 10 estambres, túbulos cortos en anteras, tubo de la corola más corta que el estilo, frutos carnosos dentro de la clasificación de bayas esféricas que poseen un color negro azulado con una capa cerosa cuyo diámetro es aproximadamente de 5 a 8 mm (Vilema, 2021; Roldán, 2012).

3.2 METABOLITOS SECUNDARIOS

Es relevante mencionar a compuestos orgánicos resultados de la fotosíntesis de las plantas, que adquieren el nombre de metabolitos primarios, su función vital es intervenir directamente con diversos tipos de carbohidratos, nucleótidos, aminoácidos y lípidos de origen primario (Verdecía, y otros, 2021); además de estos metabolitos existe otra variedad de moléculas que con más de 200000 estructuras químicas que interactúan en diferentes estructuras de la planta: raíz, tallo, tejidos conductores, flores, frutos, entre otros. Estos metabolitos son llamados “metabolitos secundarios” y se manifiestan por atracción de polinizadores al liberar compuestos químicos volátiles, por interacciones dentro de la cadena trófica, al producir compuestos amargos y tóxicos a manera de defensa ante ataque de invasores, también pueden aparecer acumulados en pigmentos de flores (Ojito & Portal, 2017).

Los diferentes grupos en que se clasifican los metabolitos secundarios son: glucósidos cianogénicos y glucosinolatos, terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos. Esta estructura química se debe a modificaciones por reacciones de una molécula con una estructura básica que puede sufrir: metilación, epoxidación, malonilación, esterificación, glucosilación, hidroxilación. Una vez estabilizadas y sintetizadas las moléculas, se accede a una adaptación de manera natural de las especies vegetales (Ojito & Portal, 2017).

3.2.1 TIPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

GLUCÓSIDOS CIANOGENÉICOS

Son cianohidrinas, químicamente llamados β -glucósidos de α -hidroxinitrilos (Figura 1). Estos compuestos pasan por un proceso denominado cianogénesis, proceso en el cual el tejido de la especie vegetal que almacena glucósidos cianogénicos está dañado, porque un animal ha masticado la planta, los glucósidos poseen un sabor amargo y su capacidad de liberar cianuro de hidrógeno (HCN) hace que esta sustancia se convierta en un tóxico, permitiendo la defensa de la planta ante los herbívoros que la puedan asechar. Entre los ejemplos denotan: *Manihot esculenta* (yuca), *Hordeum vulgare* L. (cebada) y *Sorghum bicolor* L. (sorgo) (Ojito & Portal, 2017).

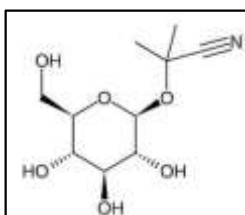


Figura 1. Estructura química de glucósidos cianogénicos.

Fuente: Ojito & Portal (2017).

GLUCOSINOLATOS

Estos compuestos son β -tioglucósidos aniónicos cuyo prefijo “tio” indica la presencia de azufre, está enlazado a una azúcar β -D-tioglucosa, un nitrógeno a una oxima sulfatada y un átomo central de carbono, sus grupos laterales están constituidos por predecesores de aminoácidos como cadenas de metionina, fenilalanina, isoleucina, metionina, valina, tirosina, alanina y triftofano (Figura 2). Su aglicona tiene la capacidad de formar epitionitros, oxazolidin-2-tionas, isotiocianatos, nitrilos, tiocianatos, la bioactividad proteínica está medida por variaciones en el pH e iones ferrosos. Los glucosinolatos se activan en condiciones de estrés por hidrólisis

química de β -tioglucosidas a las cuales llaman mirosinasas, antes de su activación por un herbívoro, se encuentran almacenadas en compartimentos celulares separados. Las especies que forman parte de este grupo corresponden al género *Brassica* por ejemplo: *Brassica oleracea* L. (brócoli) y *Raphanus sativus* L. (rábano) (Ojito & Portal, 2017).

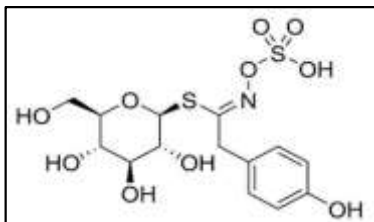


Figura 2. Estructura química de glucosinolatos.

Fuente: Ojito & Portal (2017).

TERPENOIDES O TERPENOS

Se forman a partir de cinco carbonos de isopentano, de acuerdo con las unidades de carbono cuando tiene 10 carbonos toma el nombre de monoterpeno (Figura 3), al terpenoide de 15 carbonos sesquiterpeno y al terpenoide de 20 carbonos se denomina diterpeno. En general, los terpenoides se constituyen fracciones de aceites esenciales, látex, ceras y resinas. Adicional, se pueden localizar en fitohormonas como ácido abscísico, brasinoesteriodes, giberelinas, estrigolactonas. En fin, los terpenoides no aportan con funciones en el desarrollo y crecimiento (Ojito & Portal, 2017).

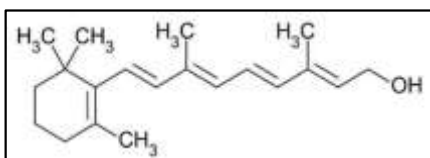


Figura 3. Estructura química de terpenoide de 10 carbonos (monoterpeno)

Fuente: Ojito & Portal (2017).

ALCALOIDES

Compuestos bioactivos básicos nitrogenados en un anillo heterocíclico (Figura 4), son característicos ya que se encuentran como sales de ácido tartárico, acético, oxálico, málico, cítrico y láctico. A nivel celular intervienen en el metabolismo causando mimetismo hormonal en el vegetal, son reguladores de crecimiento y son sustancias protectoras de diferentes estructuras de la planta que sintetizan proteínas. Destacan 4 grupos de alcaloides: purínicos, policétidos, terpenos derivados de aminoácidos (histidina, fenilalanina, ornitina/arginina, tirosina, lisina, del ácido antranílico, triptófano y el ácido nicotínico), terpenos aminados y alcaloides policétidos (González, Cabezas, Pulido, & Celis, 2020; Loyola, y otros, 2004).

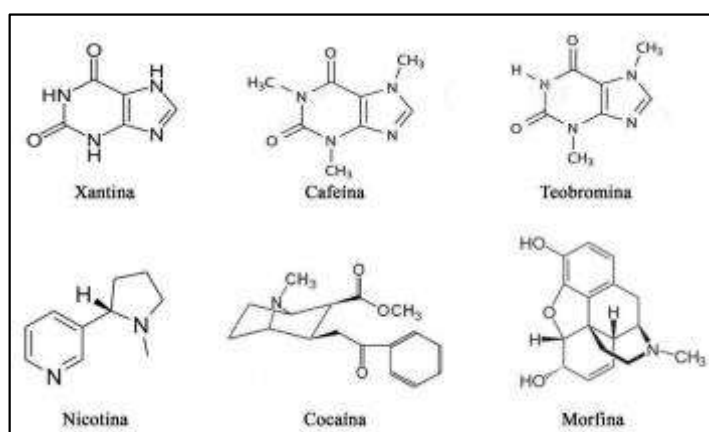


Figura 4. Estructura química de diferentes alcaloides.

Fuente: Ojito & Portal (2017).

COMPUESTOS FENÓLICOS

Son estructuras de tamaños variados y complejos, con un anillo aromático fenilo unido a uno a varios grupos hidroxilos, este anillo fenilo da estabilidad a la molécula facilitando la unión a un oxígeno desprotonado y brinda una característica ácida (Figura 5). Los flavonoides, chalconas, antraquinonas y naftas, estilbenos, isoflavonas, antocianidinas, monolignoles, furanocumarinas y curmarinas, diarilheptanoides están considerados como compuestos fenólicos, representando el

40% del carbono orgánico en especies vegetales; un dato curioso es que sus vías bioquímicas conllevan a la formación de taninos “hidrolizables”. Especies que contienen compuestos fenólicos son: *Raphanus sativus* (rábano), *Vaccinium floribundum* K (mortiño), *Beta vulgaris* (remolacha) y *Rubus glaucus* B (mora silvestre) (Ojito & Portal, 2017; Gordo & Alonso, 2018).

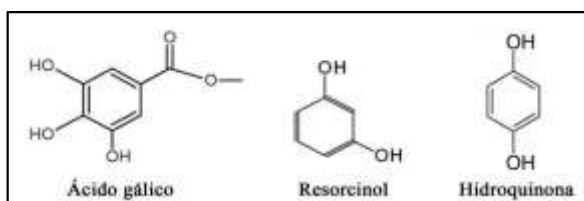


Figura 5. Estructura química de diversos compuestos fenólicos.

Fuente: Ojito & Portal (2017).

3.2.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA

La estructura química de una antocianina tiene dos anillos aromáticos tipo A y B unidos por una cadena de tres carbonos, el cambio de colores de diferentes antocianinas se debe a la variación en su estructura debido a grupos R1 y R2 en el anillo B. Es así como el tono color azul es dada por un aumento en el proceso de hidroxilación y el aumento de metoxilación presenta el color rojo (Pérez, Endara, Garrido, & Ramírez, 2020).

RUTA BIOQUÍMICA DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Para explicar la biosíntesis de los compuestos fenólicos, es necesario recordar los mecanismos químicos, en primer lugar, está la ruta del ácido siquímico que constituyen la parte fundamental de otros compuestos; en esta ruta se obtienen como resultado el ácido aromático gálico, prefénico y corísmico, por otro lado, del ácido cinámico se derivan las chalconas, flavonoides, cumarinas, flavanonas, lignanos, ligninas, entre otras. Pero para formar fenoles simples se requiere seguir la ruta del ácido malónico (Figura 6) (Yáñez, 2022).

3.2.3 ANTOCIANINAS Y ANTOCIANIDINAS

Las antocianinas son compuestos fenólicos con actividad biológica que pertenecen a los flavonoides, autores como Zapata y otros (2014) mencionan que son glucósidos de antocianidinas. Se disuelven en dimetilsulfóxido, agua, alcoholes, acetona porque presenta un comportamiento polar, las antocianinas se encuentran a pH 1 - 3 mediante la presencia de cationes de flavilio rojo, a pH 4 - 5 su presencia no presenta color (incolora) y tautomerizado en solución alcalina el color indicador es amarillo. Uno de los defectos de las antocianinas es que suelen ser inestables con variaciones de factores como solventes, iones metálicos, oxígeno, luz, temperatura y pH (Pérez, Endara, Garrido, & Ramírez, 2020).

La diferencia entre antocianinas y antocianidinas radica en su estructura química, las antocianinas (en la naturaleza) poseen un heterósido que mezcla un aglicón (antocianidina) con azúcar un en la posición 3, en resumen, cuando las antocianinas carecen de azúcar se denominan antocianidinas (Guerra & Ortega, 2006; Ávalos & Pérez, 2009).

TIPOS DE ANTOCIANIDINAS

Las antocianidinas principales son: cianidina, delphinidina, pelargonidina, malvidina, petunidina y peonidina (Pérez, Endara, Garrido, & Ramírez, 2020). El color viene dado por el metóxilo en el anillo B, pH de las vacuolas donde se albergan y el número de hidroxilo, toma el color rojo púrpura cuando se trata de cianidina, azul púrpura para delphinidina y rojo naranja pelargonidina (Ávalos & Pérez, 2009).

FUNCIONES EN EL ÁMBITO DE LA SALUD

Las principales funciones de las antocianinas son: a) Detener el crecimiento de células cancerígenas debido a que las moléculas presentan estudios que previenen el cáncer de colon, b) Intervenir en la síntesis de colesterol optimizando la característica de fragilidad en los vasos sanguíneos evitando así enfermedades del corazón, c) Sustituir pigmentos sintéticos para mejorar la calidad de vida de los

seres humanos. (Guerra & Ortega, 2006), d) Posee un alto potencial antioxidante con efecto protector para prevenir el envejecimiento, e) Mejora la agudeza visual (Zapata, y otros, 2014; Heras, Alvis, & Arrazola, 2013).

3.2.4 USOS

Los colorantes naturales de *Vaccinium floribundum* (mortiño) se utilizan en la agroindustria, industria alimentaria, nutracéutica, industria farmacéutica, industria cosmetológica, en la preparación de vino de mortiño, entre otras (Pérez, Endara, Garrido, & Ramírez, 2020; Velásquez, 2018). Su fruto se degusta en la Colada Morada, que se trata de una bebida consumida el “Día de los difuntos 2 de noviembre” de forma tradicional en la sierra ecuatoriana (Pérez & Valdivieso, 2007).

3.3 EXTRACCIÓN

3.3.1 DEFINICIÓN

Se conoce a este proceso como la técnica de separación para obtener principios bioactivos de las partes de una planta: tallo, hojas, frutos, raíz ya sean secos o frescos, su base es un líquido extractivo que se coloca dependiendo de la naturaleza específica del compuesto a estudiar y del procedimiento establecido para que la característica potencial del componente bioactivo no desaparezca, es importante mencionar que en la extracción se obtiene un coctel de moléculas activas (Carrión & García, 2010; Sasidharan, Chen, Saravanan, Sundram, & Yoga, 2010).

A nivel celular las sustancias son lavadas simultáneamente y disociadas por el proceso de difusión celular, acción que sucede en el momento de interactuar la especie vegetal con el disolvente (Guerra, 2005).

Los extractos de diversas plantas que se adquieren de forma pura o estableciendo protocolos específicos debido a su diversidad química, aportan con información para el descubrimiento de nuevos fármacos, que son distribuidos como productos naturales (Sasidharan, Chen, Saravanan, Sundram, & Yoga, 2010).

3.3.2 FACTORES A CONSIDERAR EN LA EXTRACCIÓN DE BIOACTIVOS

Para la extracción y concentración de sustancias con bioactividad presentes en *Vaccinium floribundum* (mortiño), es importante considerar los siguientes factores:

- pH: está relacionado con la estabilidad química de las moléculas (compuestos resonantes) indicando que estos compuestos son estables cuando se encuentran a pH ácidos, pero a medida que se acercan a un pH neutro o con tendencia básica la molécula se desintegra perdiendo sus propiedades (Guerra & Ortega, 2006).
- Agua: mientras más agua exista en los compartimentos celulares de las especies vegetales mayor es el agotamiento de sus principios activos (Guerra, 2005).
- Solventes: las diversas condiciones de extracción que se emplea para obtener rendimientos óptimos en los compuestos fenólicos son decisivas en el momento de estudiarlos, estos compuestos se disuelven en solventes polares; generalmente para su proceso de extracción se utiliza etanol, metanol y pequeñas cantidades de ácido fórmico u ácido clorhídrico (Ruenroengklin, y otros, 2008).
- Grado de pulverización: mientras más fraccionado sea el material vegetal mejor será su extracción, pero se debe tomar en cuenta que, mediante la pulverización, la muestra podría sufrir canalización, taponamiento y compactación (Guerra, 2005).
- Temperatura: la temperatura es inversamente proporcional a la estabilidad química, en el caso de las antocianinas bajas temperaturas preservan la estabilidad de los bioactivos de interés (Ruenroengklin, y otros, 2008). Es necesario controlar la temperatura para evitar degradar los principios activos ya que algunos favorecen su extracción a los 100 grados Celsius y otros compuestos se extraen fácilmente en agua fría (Guerra, 2005).

- Tiempo: depende del tiempo de interacción entre la planta y el solvente (alcohol etílico o agua) para que la extracción sea favorable (Guerra, 2005).

3.3.3 TIPOS DE EXTRACCIÓN

Se han estudiado diversas técnicas extractivas basándose en la fitoquímica de la planta, la concentración de la muestra, además conocer la parte farmacológica de cada uno de los componentes bioactivos es indispensable por los beneficios terapéuticos que la planta puede aportar, a continuación, se describen los más utilizados (Guerra, 2005):

TISANAS: preparaciones con un vehículo extractivo (agua), el agua al encontrarse en contacto con la planta extrae las sustancias compatibles o solubles en agua por difusión celular (Guerra, 2005).

INFUSIÓN: consiste en dejar caer sobre la planta agua ebuliendo en un recipiente con tapa, la infusión de partes de la planta (hojas, tallos tiernos, flores), se prepara en un lapso de tiempo de 5 a 15 minutos. El agua debe estar a una temperatura igual que el solvente y una concentración del 5% (Guerra, 2005; Carrión & García, 2010).

DECOCCIÓN: colocar planta con agua hirviendo a mayores temperaturas del punto de ebullición por 15 o 20 minutos a fin de producir cocimiento. Esta técnica se utiliza para raíces, tallos fuertes y cortezas (Guerra, 2005).

MACERACIÓN: proceso que consiste en dejar varios días el solvente con la especie vegetal a temperatura afín al bioactivo que se desee extraer, además es imprescindible humectar los compuestos un tiempo determinado con el fin de aumentar la permeabilidad de la pared celular, una vez establecido un punto de equilibrio entre la droga y el solvente el rendimiento aumenta (Urquizo, 2016). Se habla de que el proceso de DIGESTIÓN es una maceración a temperatura tolerable, 50 o 60 °C de la especie vegetal en agua que facilita el obtener un mayor rendimiento, debido a que si disminuye la temperatura la viscosidad también y el

ingreso del solvente a la célula vegetal es mucho más rápido (Carrión & García, 2010).

PERCOLACIÓN: proceso que requiere un implemento metálico cilíndrico llamado percolador, que permite la carga y descarga de droga pulverizada para obtener hasta el 95% de principios activos, el tiempo de contacto entre la droga y el líquido extractivo (etanol, metanol, agua u otro disolvente) es corto y decisivo para conseguir un buen rendimiento (Guerra, 2005; Urquizo, 2016).

3.3.4 EXTRACTOS

EXTRACTO FLUIDO

Son extractos de drogas vegetales que se obtienen por percolación de etanol de 70° en proporciones 1:1, pero en primera instancia se concentra el 85% del extracto al cual se denomina menstuo y después de 24 horas se obtiene el resto de muestra, la muestra será concentrada hasta un total de 15%; en síntesis 85 partes de la droga conciernen a 100 partes de planta fresca.

EXTRACTO BLANDO

Este extracto presenta consistencia semisólida, es difícil de manipular y poco estable. Del extracto fluido que se somete a concentración se debe obtener un 15 a 20% de humedad, la proporción de este extracto es de 2:1; porque la concentración del principio activo es mayor a la droga (Carrión & García, 2010; Guerra, 2005).

EXTRACTO SECO

La droga se encuentra desecada constituyendo un extracto seco que ha pasado por liofilización y se congela a -196°C. Sus proporciones en concentración son 5:1 (de 2:1 a 10:1) (Guerra, 2005).

3.4 MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN

3.4.1 MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU PARA CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES

Para la determinación y cuantificación de Fenoles Totales, el método más empleado es el de Folin-Ciocalteu, mismo que se basa en que el reactivo a pH básico, reacciona con los compuestos fenólicos, generando una coloración azul, que puede ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm (García, Fernández, & Fuentes, 2020). El reactivo de Folin-Ciocalteu, de color amarillo, está compuesto por molibdato y tungstato sódico, que, al reaccionar con los fenoles de la muestra, originan complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico, provocando un color azulado. Se trata de una reacción redox (Figura 7), en la cual se reducen los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, a pH básico, debido a la transferencia de electrones, de tungsteno (W^{6+}) y molibdeno (Mo^{6+}), dando origen al color azul intenso, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez, Ortiz, & Mendoza, 2008).

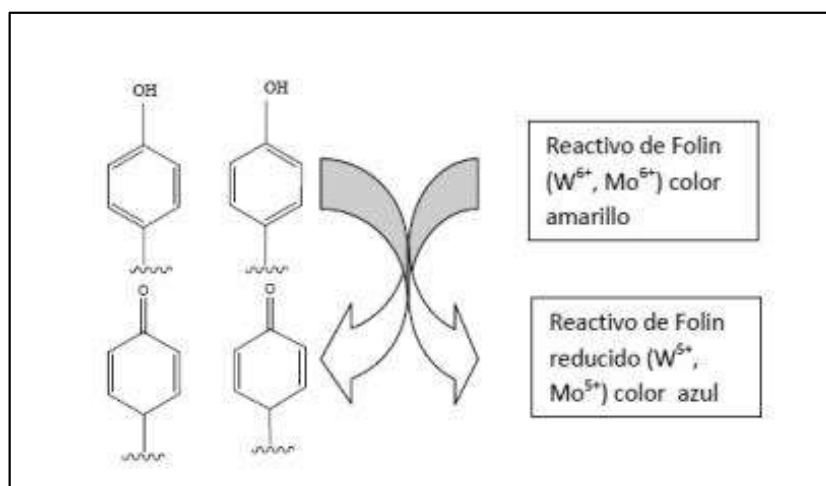


Figura 7. Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu, reacción redox.

Fuente: García, Fernández, & Fuentes (2020).

3.4.2 MÉTODO DE pH DIFERENCIAL PARA CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS

El método de pH diferencial para la cuantificación de antocianinas es un método espectrofotométrico, a través de la aplicación de un sistema tampón, en el que la variación del pH provoca la transformación estructural de las antocianinas (pH 1 coloreadas y pH 4.5 incoloras) (Martínez, y otros, 2011). donde el ion oxonio (hidronio) se colorea a pH 1, mientras que a pH 4,5 la forma hemiacetal será incolora (Giusti & Wrolstad, 2001).

Conociendo que, el pH afecta la estabilidad del color de las antocianinas, los espectros de UV-VIS a distintos pH también varían, identificando si las antocianinas están o no polimerizadas. Entonces, la concentración de antocianinas es posible cuantificar con la absorbancia a un pH diferencial, en donde se presentarán dos bandas de absorción en la región UV, a una longitud de onda entre 260-280 nm y la región visible, entre 490-550 nm (Paredes, 2018). La concentración de antocianinas se expresa en mg cianidina-3-glucósido/100mL de extracto (Zapata, y otros, 2014)

Dependiendo del pH de la solución, las antocianinas se pueden encontrar en varias formas químicas, como se puede apreciar en la Figura 8, debido a que presentan gran susceptibilidad a los cambios de pH. Es así que, en soluciones acuosas ácidas, forman cuatro especies principalmente: la base quinoidal (QB), el catión flavilio (FC), la pseudobase o carbinol (PB) y la chalcona (CH). A pH ácidos, menores a 2, se forma el catión flavilio rojo (FC), mientras que, al aumentar el pH, se pierde un protón, provocando un color azul-violeta, debido a la formación de la base quinoidal (QB). La hidratación del catión flavilio (FC), ocurre al mismo tiempo, originando la pseudobase (PB), obteniendo equilibrio con la chalcona (CH) incolora (Cavalcanti, Santos, & Meirles, 2011).

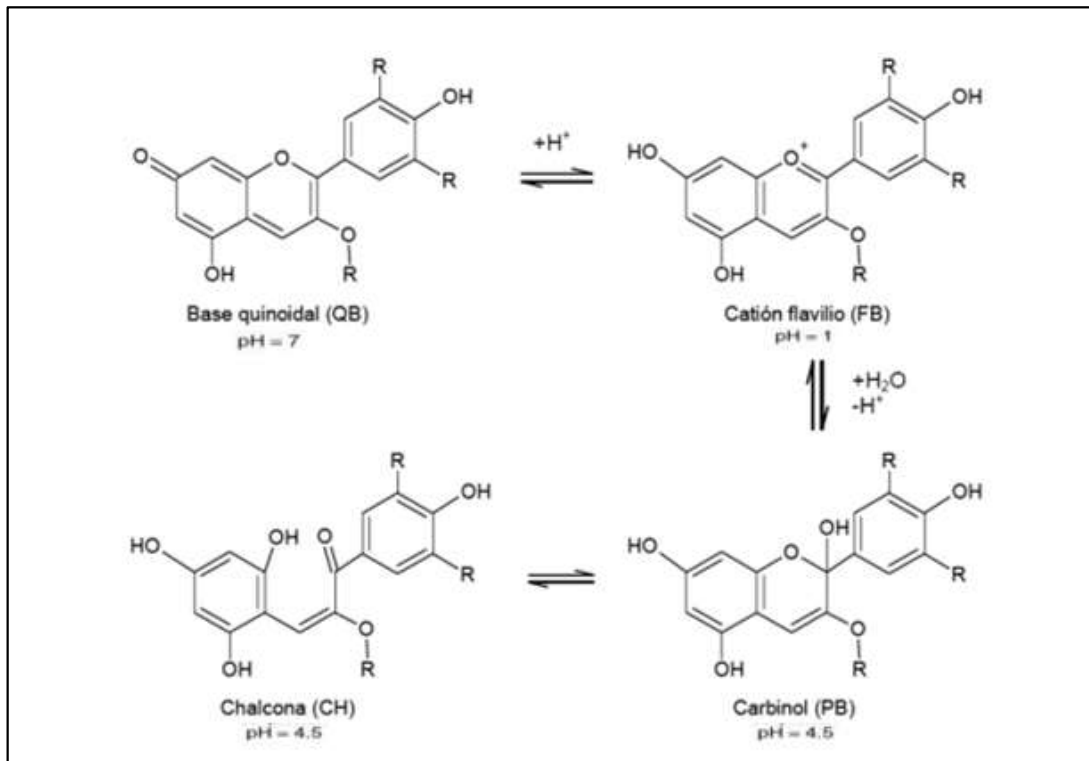


Figura 8. Diferentes formas químicas de las antocianinas, dependiendo del pH de la solución.

Fuente: Cavalcanti, Santos, & Meirles (2011).

3.5 MICROBIOLOGÍA

3.5.1 INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO

La infección del tracto urinario se debe a la presencia y multiplicación de microorganismos patógenos (bacterias, hongos o levaduras) en cualquier parte del sistema urinario: riñones, uréteres, uretra o vejiga, siendo las más afectadas estas dos últimas. Sin embargo, si la infección asciende a los riñones, la afectación sería grave. Los principales tipos de infecciones de vías urinarias son: Pielonefritis aguda, en riñones; Cistitis, en vejiga y Uretritis, en la uretra (de Cueto, 2011).

3.5.2 MICROORGANISMOS PATÓGENOS DEL TRACTO URINARIO

La presencia de microorganismos patógenos en el tracto urinario se debe a infecciones que ocurren con mayor frecuencia y a la vez se ven influenciadas por el sexo, la edad, actividad sexual y algunas enfermedades base (diabetes, vejiga neurógena). Estas infecciones son generalmente causadas por bacterias propias del sistema gastrointestinal, se reporta el 90% de infecciones causadas por *Escherichia coli*, el 10% restante corresponde a microorganismos entéricos, tales como *Enterobacter spp.*, *Enterococcus spp.*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Candida spp.* (Capozzi, Mobili, Kornett, & Perdomo, 2016).

Recientes estudios, han descrito “nuevos uropatógenos”, entre los cuales se puede citar *Aerococcus* (*A. urinae*, *A. urinaehominis*, *A. viridans* y *A. sanguinicola*), *Oligella* (*O. ureolytica* y *O. urethralis*) *Actinobacterias*, como *Gardnerella*, *Actinobaculum* (*A. massiliense*), *Actinotignum* (*A. schaalii* y *A. urinale*), *Corynebacterium* y *Actinomyces* (Zboromyrska, de Cueto López, Alonso-Tarrés, & Sánchez, 2019)

Escherichia coli

Bacteria huésped habitual del intestino, descrita en 1885 por el bacteriólogo alemán *Escherich*, quién la denominó como “bacteria común del colon” (*Bacterium coli commune*) y en 1919 Castellani y Chalmers, denominaron a este microorganismo como *Escherichia coli*, principal representante del género *Escherichia*, de la familia de las Enterobacterias. Se trata de un bacilo Gram negativo, no esporulante, que a partir del triptófano produce indol, no produce acetoina y no utiliza el citrato como fuente de carbono, fermenta la glucosa y la lactosa produciendo dióxido de carbono. Formada por una membrana externa y membrana citoplasmática y entre ambas un espacio constituido de peptidoglucanos. Es una bacteria mesófila, por lo que se considera que la temperatura óptima de crecimiento oscila entre 35 y 43 °C, cuya temperatura límite

de crecimiento es 7 °C y es sensible a temperaturas superiores a 70 °C; el pH óptimo de crecimiento es de 7,0 y 0,94 para la actividad de agua (Canet, 2016).

El mecanismo de adhesión a células blanco está determinado por finos filamentos presentes alrededor de la bacteria, las fimbrias, que le permiten fijarse y colonizar las células epiteliales del huésped (Canet, 2016).

Sensible principalmente a la Fosfomicina (Sánchez, y otros, 2003).

Staphylococcus saprophyticus

Después de *Escherichia coli*, es el segundo microorganismo causante de infecciones del tracto urinario, entre ellas cistitis y pielonefritis. Se trata de un estafilococo Gram positivo, no formador de esporas, coagulasa negativo, catalasa positivo, inmóvil, que se encuentra en el medio ambiente, cuyo desarrollo puede darse entre los 7 y los 47.8 °C, siendo 35 °C su temperatura óptima de crecimiento; respecto al pH, su rango de crecimiento está entre 4,5 y 9,3, su pH idóneo va entre 7,0 y 7,5 (Bertó, 2015).

A diferencia de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* se adhiere de mejor manera a las células uroepiteliales y no a células de la piel o de mucosas bucales. Estos microorganismos son sensibles a oxacilina, gentamicina, norfloxacin, nitrofurantoina y vancomicina (Fariña, Sanabria, Figueredo, Ramos, & Samudio, 2005)

Candida albicans

Candida albicans es una levadura oportunista que habita principalmente en las mucosas de la cavidad oral y vaginal humana, también se encuentra presente en el tracto gastrointestinal (Panizo & Reviákina, 2001) y es causante de candidiasis cutánea (Garrote, 2002).

Se trata de un hongo de la división de Ascomycota, que se reproduce de manera asexual, por gemación. Es un microorganismo dimórfico, que puede desarrollarse

como levadura, a 37 °C formando agrupaciones de células redondas u ovaladas de 3-8 x 2-7 micras de tamaño, o puede crecer como hongo filamentoso a 25 °C en la naturaleza, formando células alargadas con apariencia de filamentos, pseudohifas o pseudomicelio (Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo, 2021).

Entre el 10 y 15% de infecciones causadas por *Candida albicans*, se presenta en pacientes hospitalarios y en mayor incidencia afecta al género femenino con enfermedades crónico-degenerativas, como diabetes mellitus tipo 2, la administración de antibióticos, la obstrucción de las vías urinarias o su instrumentación (Vega, Bernal, Villanueva, & Arenas, 2015).

3.5.3 PAPEL QUE DESEMPEÑA EL MORTIÑO EN LA PREVENCIÓN DE INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO

Un estudio realizado por el Centro de Investigación Traslacional de la Universidad de las Américas, liderado por el médico internista y docente universitario, David Larreátegui, se demostró que el jugo de *Vaccinium floribundum* (mortiño) tiene las mismas propiedades que el *Vaccinium macrocarpon* (arándano rojo), que tiene la capacidad de acidificar la orina, sirviendo como mecanismo de prevención de infecciones del tracto urinario (UDLA, 2014).

El arándano rojo presenta en su composición flavonoides, antocianinas y proantocianidinas, de los cuales se han aislado dos de ellos: un monosacárido de fructosa y una condensación de taninos (proantocianidinas), responsables de evitar la adhesión de microorganismos al urotelio. La estructura bioquímica se trata de un flavonoide y está compuesta por tres anillos aromáticos (Figura 9), también llamados flavanos (A, B y C). El estado de oxidación del anillo C y los enlaces que forma con el anillo B, determinan la capacidad para formar oligómeros. Cuando los monómeros se unen entre sí por un solo enlace en el anillo B, los oligómeros que se forman se conocen como proantocianidinas de tipo B, mientras que cuando se unen entre sí por dos enlaces en el anillo B se llaman proantocianidinas de tipo A. Es así como, a la proantocianidina tipo A se le atribuye la bioactividad de inhibiendo

la adherencia de las bacterias, en especial *Escherichia coli* a las células epiteliales del tracto urinario (Neri, y otros, 2009).

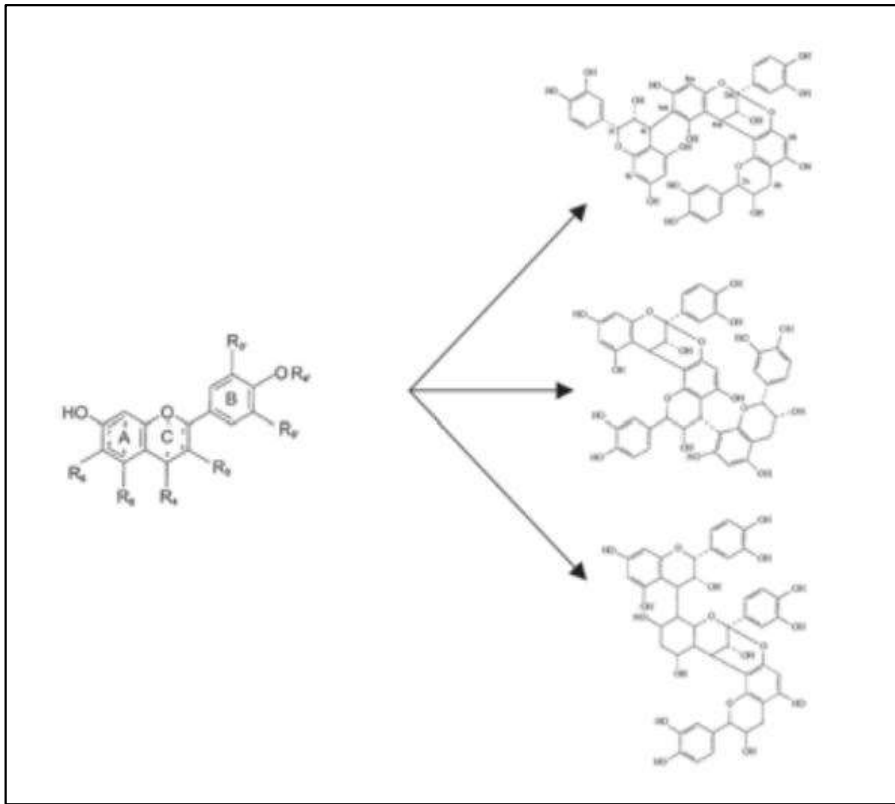


Figura 9. Flavonoide del arándano rojo.

Fuente: Neri, y otros (2009).

3.6 TÉCNICAS DE DILUCIÓN

Son ensayos a nivel de laboratorio, que se realizan para determinar el grado de sensibilidad que presentan los microorganismos a los antimicrobianos (Malbrán, 2012).

3.6.1 MICRODILUCIÓN Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

La técnica de microdilución es un método empleado para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) del antimicrobiano contra el microorganismo en estudio. La microplaca dispone de 96 pocillos, cada uno de ellos

con un fondo en “U” o plano, que representa los tubos del método de macrodilución en caldo y a los cuales se les añade el antibiótico ensayado en distintas concentraciones con la suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Los resultados se examinan después de incubar y se determina la MIC (Malbrán, 2012; García, y otros, 2000).

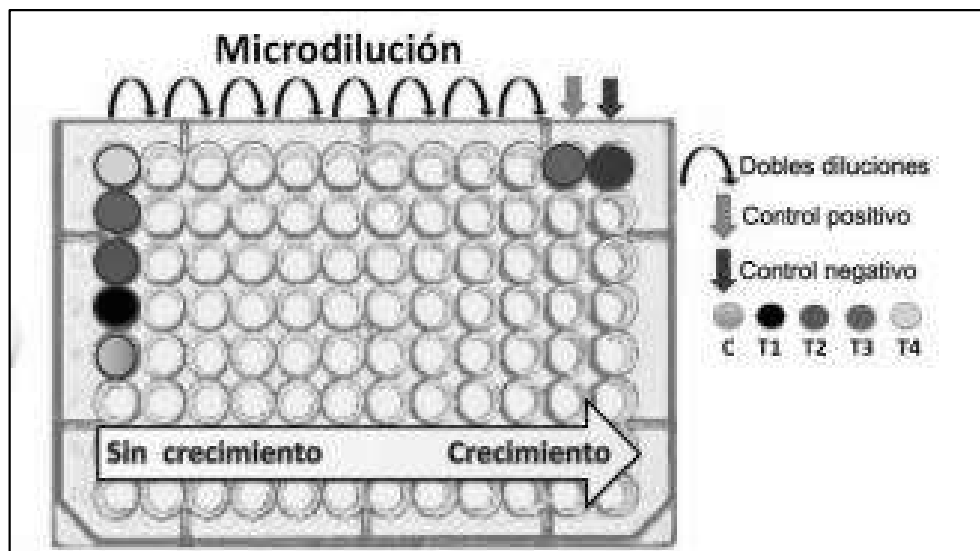


Figura 10. Método de microdilución en caldo.

Fuente: Rodríguez, Mena, Marszalek, & De la Fuente (2019).

La concentración mínima inhibitoria (MIC) es la concentración más baja, en mg/L, que se requiere para inhibir el crecimiento de un microorganismo bajo condiciones específicas *in vitro* durante un tiempo establecido, es decir, la mínima concentración de un antimicrobiano a la que el microorganismo no puede crecer (Malbrán, 2012; Rodríguez, Mena, Marszalek, & De la Fuente, 2019).

3.7 ANTIBIÓTICOS

Se define al antibiótico, como una sustancia química producida por un microorganismo, que posee una actividad antimicrobiana. Las concentraciones del antibiótico a las que los microorganismos patógenos son afectados sin que se les cause toxicidad (Paredes & Roca, 2004).

Según su origen pueden clasificarse en (Paredes & Roca, 2004):

Natural o biológico: se obtiene a partir de microorganismos pudiendo ser estos hongos o bacterias.

Semisintético: obtenido de forma natural, con la modificación de algunas de sus características químicas a fin de mejorar sus propiedades, como, por ejemplo: incrementar su actividad, ampliar su espectro de acción, facilitar su administración o disminuir los efectos secundarios.

3.7.1 FOSFOMICINA

La fosfomicina se descubrió en 1969, y se trata de un antibiótico de amplio espectro de tipo bactericida, que se deriva del ácido fosfónico (cis-1,2- epoxipropyl ácido fosfónico). En los últimos tiempos se ha aumentado su uso clínico, debido a su actividad antimicrobiana frente a enterobacterias multirresistentes. El mecanismo de acción de la fosfomicina se basa en que impide la síntesis de la pared bacteriana, evitando la formación de peptidoglicanos. Mediante un sistema de permeasas, la fosfomicina ingresa a las bacterias por transporte activo e inhibe la enzima piruviltransferasa, encargada de la fase inicial de la biosíntesis del heteropolímero del péptidoglicano. Se menciona como mecanismos adicionales, que impide la adhesión de las bacterias al epitelio, disminuyendo la producción de hemolisina y la hidrofobicidad de *Escherichia coli* a nivel de las células uroteliales, por lo que se considera la mejor alternativa en el tratamiento de infecciones urinarias causada por esta bacteria; además, favorece la fagocitosis, posee un efecto inmunomodulador y ha demostrado una acción protectora a nivel renal, contrarrestando la toxicidad causada por cisplatino, aminoglucósidos, vancomicina, anfotericina, ciclosporina y polimixinas en células tubulares. La fosfomicina presenta bioactividad contra bacterias Gram negativas como *Escherichia coli*, especies de *Proteus*, *Klebsiella pneumoniae*, especies de *Enterobacter*, *Serratia marcescens* y *Salmonella typhi*, y en menor medida para *Pseudomonas aeruginosa* (Nör, Cruz Ferre, Mendy, Raspanti, & Hernández, 2013).

3.7.2 NITROFURANTOÍNA

La nitrofurantoína es un fármaco antimicrobiano bacteriostático, pero en altas concentraciones se considera bactericida; se utiliza principalmente en infecciones urinarias bajas causadas por Gram negativos y en menor incidencia por Gram positivos. Su mecanismo de acción se basa en inhibir la acetil-coenzima A de las bacterias, impidiendo la formación de la pared celular debido a que interfiere en la síntesis de los carbohidratos; mejora su actividad antimicrobiana en pH ácido. Son sensibles a este antibiótico: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Salmonella*, *Shigella*, *Neisseria* y *Staphylococcus epidermidis*, algunas enterobacterias y especies de *Klebsiella* son resistentes o pueden requerir concentraciones más altas. Se consideran sensibles a la nitrofurantoína aquellos microorganismos que a concentraciones de hasta 25 µg/mL son inhibidos, mientras que se consideran resistentes aquellos que requieren concentraciones de 100 µg/mL o más (Paré, 2011).

3.7.3 FLUCONAZOL

El fluconazol es un compuesto antifúngico de la familia de los imidazoles, utilizado en el tratamiento de infecciones sistémicas causadas por hongos. Su principal acción es alterar la membrana celular del hongo, al inhibir de la enzima lanosterol 14- α demetilasa en el complejo citocromo P-450 de los hongos, impidiendo la conversión de lanosterol a ergosterol, por lo que aumenta la permeabilidad celular ocasionando fugas del contenido celular y la pérdida de la integridad de la membrana fúngica. Los microorganismos sensibles al fluconazol son: *Aspergillus flavus*; *Aspergillus fumigatus*; *Blastomyces dermatitidis*; *Candida albicans*; *Candida glabrata*; *Candida kefyr*; *Candida tropicalis*; *Coccidioides immitis*; *Cryptococcus neoformans*; *Histoplasma capsulatum* (Fica, 2004).

3.7.4 TIMOL, ANTIMICROBIANO NATURAL

El timol (o isopropilmetacresol, o 2- isopropil-5-metilfenol), es considerado uno de los antimicrobianos naturales más activos, presente principalmente el aceite

esencial de tomillo (sobre el 50%), de orégano y de mandarina. En su estructura química, presenta un anillo fenólico (figura 11), con capacidad hidrofóbica, cuyo mecanismo de acción se basa en desintegrar la membrana externa de las bacterias, aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática, ocasionando la salida de lipopolisacáridos y la filtración de constituyentes químicos esenciales para el metabolismo, tales como iones, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos. La sensibilidad de los microorganismos al timol depende de factores como el tipo de microorganismo, pH del medio, y temperatura de incubación, sin embargo, se afirma que tiene su mayor efecto inhibitorio a pH 5,5 (García & Palou, 2008).

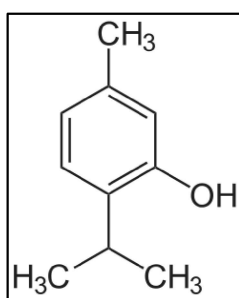


Figura 11. Estructura química del Timol.

Fuente: García & Palou (2008).

3.7.5 RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

Se puede definir como **resistencia**, al mecanismo a través del cual el microorganismo disminuye la acción de los agentes antimicrobianos, es decir, el microorganismo neutraliza al antibiótico (Fernández, López, Ponce, & Machado, 2003).

TIPOS DE RESISTENCIA MICROBIANA

Se pueden categorizar dos tipos de resistencia microbiana (Fernández, López, Ponce, & Machado, 2003):

Natural o intrínseca: los microorganismos productores de antibióticos son por definición resistentes. Usualmente, las bacterias que pertenecen a la misma especie

son resistentes a algunas familias de antibióticos, lo que les permite tener ventajas competitivas respecto a otras cepas, pudiendo así sobrevivir si se emplea ese antibiótico.

Adquirida: la aparición de la resistencia bacteriana se produce debido a cambios en la secuencia de bases de cromosoma (mutaciones) que se transmite de generación en generación y por la trasmisión de material genético extracromosómico de otras bacterias, esta transferencia de genes se realiza a través de plásmidos u otro material genético de transporte como integrones y transposones; esto último no solo permitirá la trasmisión a otras generaciones, sino también a otras especies bacterianas. Por lo antes mencionado la resistencia a uno o varios antibióticos que presenta una bacteria puede ser ocasionada sin la necesidad de haber estado en contacto previo con el antibiótico.

MECANISMOS GENERALES DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

Para resistir a la acción de los antibióticos, los microorganismos han desarrollado varios mecanismos (Paredes & Roca, 2004).

Expulsión del antibiótico por un mecanismo activo de bombeo. Se trata de un sistema de expulsión activa del antimicrobiano, a manera de bomba expulsora utilizada por las bacterias para la excreción de productos tóxicos o residuales, eliminando así, muchos de estos agentes antimicrobianos.

Bloqueo del transporte de antibióticos. Se disminuye la permeabilidad de la pared bacteriana, modificando o bloqueando los canales de entrada por donde los antibacterianos usualmente pasaban (porinas).

Producción de enzimas inactivantes. La producción de una enzima alternativa, que impide la inhibición microbiana (bypass). Por ejemplo: el cloranfenicol inhibido por la acetiltransferasa o las betalactamasas, inhiben al grupo de los betalactámicos.

Modificación enzimática del antibiótico. Algunos antibióticos se unen a una proteína esencial para la supervivencia de las bacterias para poder ejercer su acción sobre

ellas, sin embargo, la resistencia bacteriana se origina cuando el microorganismo modifica la proteína diana, cambiando su función o produciendo otras enzimas distintas.

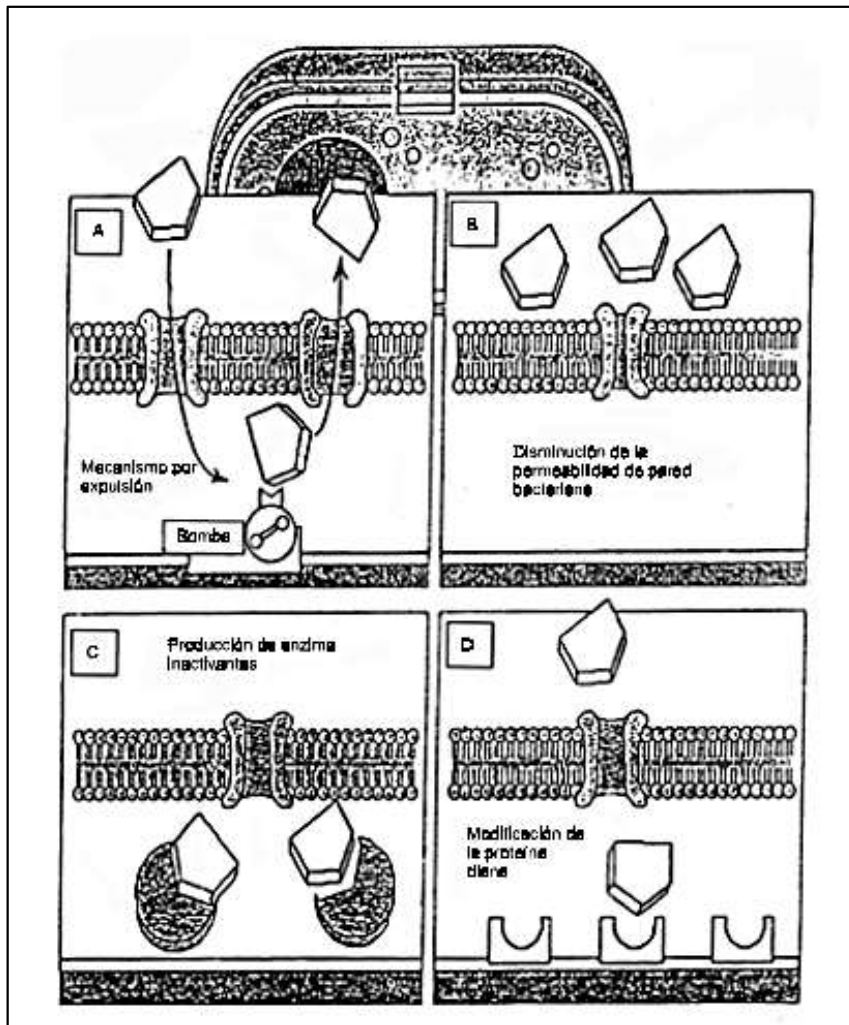


Figura 12. Mecanismos generales de resistencia microbiana.

Fuente: Fernández, López, Ponce, & Machado (2003).

3.8 MÉTODOS DE SEPARACIÓN QUÍMICA

3.8.1 REFLUJO Y ACIDIFICACIÓN

El proceso de reflujo (Figura 13), consiste en la extracción y preservación de los compuestos esenciales presentes en las especies vegetales. Los compuestos volátiles se condensan y se retienen en las paredes internas de un condensador, que se refrigera con el agua que fluye a su alrededor. Sin embargo, debido a la sensibilidad de algunos compuestos al calor, no es posible la desnaturalización (Canales Peña, Carazo Luna, & Centeno, 2011). La acidificación permite la separación de otros compuestos y obtener las fracciones que son de interés (Universitat de Valencia, 2006).

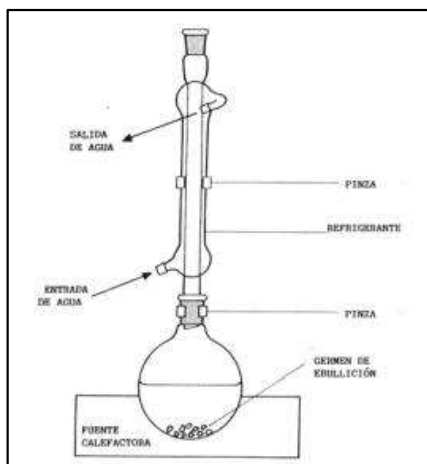


Figura 13. Sistema de reflujo.

Fuente: Universitat de Valencia (2006).

3.8.2 SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS

La cromatografía, tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia, se trata de un método físico descubierto por el botánico Mikhail Tswett en 1906, que permite la separación y caracterización de mezclas complejas; se basa en el principio de retención selectiva, con el fin de separar los diferentes compuestos que conforma una mezcla, de esta manera es posible identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. Las dos funciones básicas que se pueden cumplir en este

método son: separar los componentes de la mezcla y posteriormente purificarlos y medir la proporción de los componentes de la mezcla (Corzo, 2019). Esta técnica determina las propiedades físico químicas de los componentes separados dependiendo de su solubilidad, tamaño, diferencia de cargas, grado de pureza, para su posterior caracterización, mediante manchas o gráficos del cromatograma (Ruiz, 2020).

Este proceso cromatográfico se origina como resultado de repetidos procesos adsorción-desorción, donde los componentes de la mezcla son arrastrados por la fase móvil a lo largo de la fase estacionaria, lo que se conoce como *elución*, que debido a las diferencias en las constantes de distribución de los componentes de la mezcla entre la fase estacionaria y la móvil, se hace posible la separación. Entonces, los datos de esta separación son arrojados en un cromatograma, que define la distribución final sobre el lecho estacionario, o del tiempo en que estos eluyen (Pássaro, y otros, 2016).

Las diferentes técnicas de cromatografía pueden clasificarse de acuerdo con la disposición de la fase estacionaria, siendo estas la cromatografía plana: cromatografía de papel y la de capa fina y la cromatografía en columna: cromatografía de líquidos, de gases y de fluidos supercríticos (Ruiz, 2020).

Para llevar a cabo una buena técnica cromatográfica, es necesario definir varios términos (Corzo, 2019):

SOPORTE: totalmente inerte, puede ser papel u otro elemento físico (vidrio o aluminio) sobre el cual queda impregnada la fase estacionaria.

FASE ESTACIONARIA: sustancia sólida o líquida, sobre un soporte inerte, con la cual interactúan los componentes de la muestra a analizar.

FASE MÓVIL: un líquido o mezcla de líquidos, que atraviesa el sistema cromatográfico (papel, columna o placa) separando los componentes menos

polares de la mezcla. La elución de un compuesto aumenta cuando la polaridad de la fase móvil o eluyente se incrementa.

SIEMBRA: procedimiento en el cual la muestra es depositada sobre una línea (línea de siembra) para ser analizada; en cromatografía en papel o en capa fina. Se utilizan micropipetas (pipetas Pasteur) para asegurar un volumen pequeño de muestra, mientras que, en equipos más modernos y automatizados, la muestra es inyectada usando jeringas, propias del equipo en el dispositivo destinado para la separación.

DESARROLLO O CORRIDA CROMATOGRÁFICA: acción por la cual la fase móvil arrastra y separa los componentes de la muestra.

TIEMPO DE CORRIDA: medida de tiempo que dura la elución. En la cromatografía planar, cuando se observa que el frente del solvente no avanza más, es que ha terminado la corrida. Para la cromatografía en columna, se trabaja con un flujo continuo de la fase móvil, y será el tiempo que toma en que todos los compuestos de la muestra hayan salido de la columna y se detecten para ser arrojados en una gráfica.

FRENTE DEL SOLVENTE: distancia máxima que la fase móvil ha recorrido.

REVELADO: si las sustancias que han sido separadas no son coloreadas y no es posible localizarlas a simple vista, principalmente en cromatografía en papel o en capa fina, es necesario recurrir a métodos físicos como la *fluorescencia* y *reactividad*, lo que consiste en hacer reaccionar algún reactivo químico con las sustancias eluidas formando un compuesto coloreado.

RESOLUCIÓN: se trata de la distancia mínima a la que se distinguen individualmente las manchas producidas por la separación de los componentes de la muestra, en la cromatografía en papel.

TIEMPO DE RETENCIÓN (t_R): es el tiempo que tarda cada componente de la muestra en atravesar y salir del sistema cromatográfico, desde su inyección hasta su salida y detección, es decir, todo el tiempo que el metabolito se encuentra en el sistema

cromatográfico. Este parámetro es utilizado en la cromatografía en columna, en lugar de la distancia recorrida en la cromatografía planar.

CROMATOGRAMA: es un gráfico en el que se visualizan los componentes de la muestra analizada en forma de manchas o picos, dependiendo del tipo de soporte en el cual se ejecuta la corrida (papel, placa o columna): manchas en la cromatografía planar (papel o capa fina) y picos en la cromatografía en columna.

CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN EN CAPA FINA (TLC)

La cromatografía en capa fina o también conocida como TLC por sus siglas en inglés Thin Layer Chromatography, consiste en que la fase móvil asciende por capilaridad a lo largo de la fase estacionaria, generando la separación de los componentes de la muestra en base a su diferente distribución entre la fase estacionaria y la móvil (Pássaro, y otros, 2016). Para la fase estacionaria se puede utilizar gel de sílice (SiO_2), alúmina (Al_2O_3), silicato de magnesio o también celulosa, de material adsorbente sobre un soporte de plástico con un grosor aproximado de 0,1 mm, que interaccionarán con la muestra mediante enlaces de hidrógeno y por interacciones intermoleculares de tipo dipolo-dipolo. Mientras que, la fase móvil, mayormente está compuesta por disolventes como: el hexano, tetraclorometano, cloroformo, diclorometano acetato de etilo y acetona, permitiendo el arrastre de los compuestos de la mezcla. Dependiendo de la fase estacionaria y la naturaleza del disolvente empleados, es posible determinar que los solutos no polares se eluirán con mayor facilidad, mientras que los más polares quedarán retenidos en la fase estacionaria ya que serán adsorbidos por los centros activos de la misma (Ruiz, 2020).

Dentro de las ventajas que presenta esta técnica son su bajo costo, su corto tiempo de aplicación y su sensibilidad (Pássaro, y otros, 2016).

En la figura 14, se observa esquemáticamente el proceso cromatográfico en placa fina, donde la altura máxima que alcanza el disolvente en la placa (frente de

disolvente) se utiliza como referencia para calcular las distancias que han recorrido los componentes de la mezcla en el cromatograma.

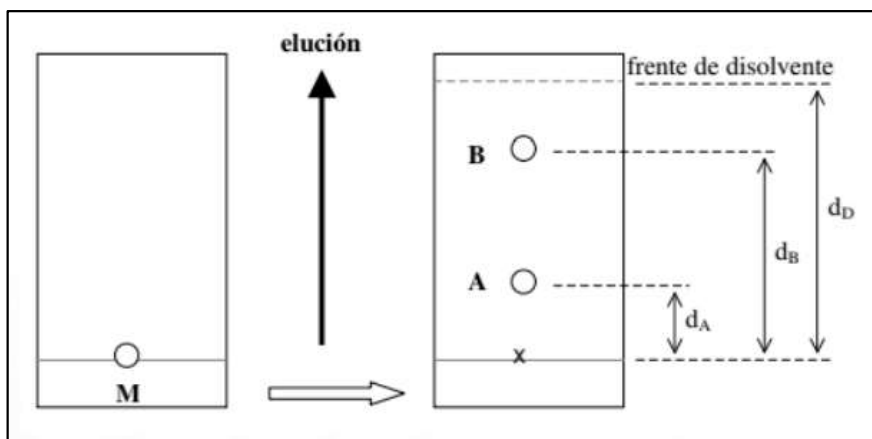


Figura 14. Esquema del proceso cromatográfico en capa fina.

Fuente: Pássaro, y otros (2016).

A la relación que existe entre la distancia recorrida por un compuesto separado (mancha) y la recorrida por el disolvente en el mismo tiempo, se le conoce como Factor de Retención o Factor de Retardo (R_f), mismo que se calcula con la siguiente fórmula (Figura 15):

$$R_f = \frac{\text{distancia recorrida por el compuesto}}{\text{distancia recorrida por el disolvente}} \Rightarrow R_{fA} = \frac{d_A}{d_D} \quad \text{y} \quad R_{fB} = \frac{d_B}{d_D}$$

Figura 15. Fórmula para el cálculo del Factor de Retención.

Fuente: Pássaro, y otros (2016).

Se describen varias etapas para un proceso cromatográfico TLC (Corzo, 2019; Pássaro, y otros, 2016):

Siembra: consiste en la aplicación de la muestra sobre la placa cromatográfica, utilizando micropipetas, pipetas Pasteur o tubos capilares de vidrio, para asegurar

un volumen pequeño de la muestra. Se puede trazar una línea a lápiz de carbono de 1 - 1,5 cm del borde inferior de la placa (línea de aplicación de muestras). La muestra depositada sobre la placa no debe superar los 3 mm de diámetro (Figura 16).

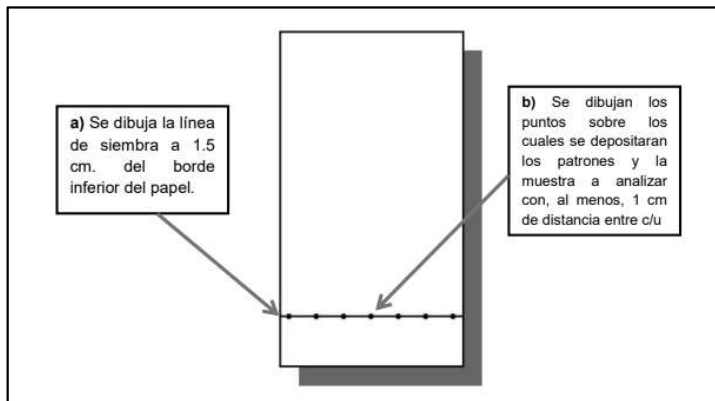


Figura 16. Siembra de la muestra sobre la placa cromatográfica.

Fuente: Corzo (2019).

Saturación de la cámara o cuba cromatográfica: previo a la corrida, es necesario acondicionar la cámara o cuba cromatográfica que son recipientes de vidrio rectangulares, con tapa hermética para impedir el escape de los vapores de la fase móvil; esto con el fin de asegurar uniformemente la distribución de la fase móvil en el interior de esta, hasta alcanzar un equilibrio.

Desarrollo o corrida: una vez que la cámara cromatográfica ha sido saturada con los vapores de la fase móvil se introduce la placa cromatográfica, sin que el disolvente esté en contacto directo con la muestra depositada en la placa, quedando por debajo de la línea de aplicación (Figura 17). Cuando el disolvente haya llegado hasta el frente del disolvente (aproximadamente 1 cm del borde), se retira la placa de la cámara cromatografía.

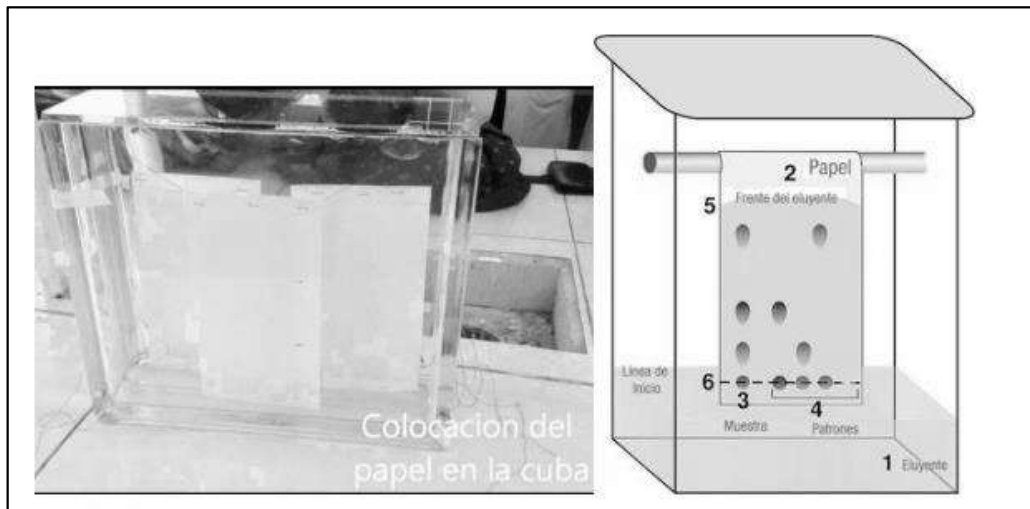


Figura 17. Proceso de corrida del eluyente para la separación de los componentes de una mezcla.

Fuente: Corzo (2019).

Revelado de placa: luego de retirar la cromatoplaqa de la cámara cromatografía, se seca con frío o calor. Si las manchas son incoloras o invisibles a luz ordinaria, es necesario el proceso de revelado, para poder detectarlos. Existen dos métodos: el *químico* en el que se rocía la placa con la solución reveladora dependiendo de las fracciones analizadas; la principal sustancia reveladora es la ninhidrina; y método *físico* en el que muchos compuestos absorben radiaciones de luz ultravioleta que las hace fluorescentes, por lo que se puede utilizar lámparas de UV para su mejor apreciación.

Evaluación de los resultados: finalmente, se evalúa la placa utilizando patrones de referencia para poder identificar los compuestos presentes en la muestra y se miden las distancias recorridas por el eluyente y las manchas y se calculan los R_f , que son valores específicos para cada sustancia.

4. MATERIALES Y METODOLOGÍA

EXTRACCIÓN Y CONCENTRACIÓN DE EXTRACTOS FLUIDOS

El estudio experimental se realizó en la Universidad Politécnica Salesiana en las Instalaciones de los Laboratorios Ciencias de la Vida– Campus Girón- Sede Quito.

Los frutos de la planta de *Vaccinium floribundum* (mortiño) se recolectaron en el Cantón Sigchos de la provincia de Cotopaxi a 3023 msnm, cuyas coordenadas fueron S 00°42'42,6'' - W 078°53'22,1''. Los frutos se clasificaron, limpiaron y pesaron previamente. En bandejas de aluminio se colocaron los frutos y se secaron por 6 días a 40 °C en una estufa Marca ESCO Modelo OFA-54-8.

El material vegetal deshidratado, se trituró en mortero con pistilo de porcelana. Se colocaron 100 g del polvo resultante de la molienda en dos matraces Erlenmeyer de 250 mL y se hidrataron con alcohol al 20% y al 50%, respectivamente, posterior a esto se agregó 200 mL de cada uno de los alcoholes y se llevaron los envases cubiertos con papel aluminio a agitación en un agitador orbital marca Thermoscientific Modelo 4310 por 24 horas. Transcurrido dicho tiempo se filtró y concentró el extracto por 2 horas a 40°C en un rotavapor Marca Buchi Modelo R-100 hasta alcanzar su volumen final. El extracto fluido se recogió en frascos ámbar para sus análisis (Figura 18).

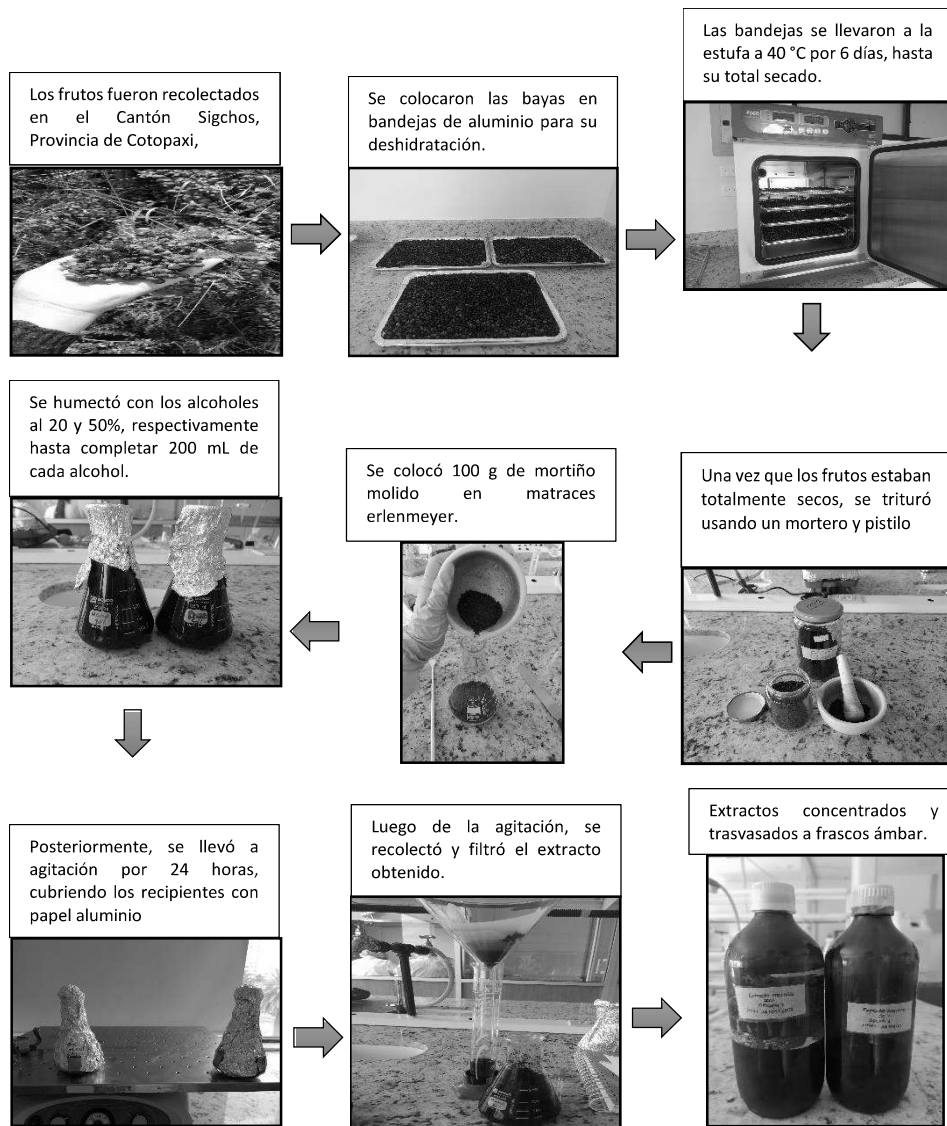


Figura 18. Diagrama del proceso de obtención de extractos fluidos de mortiño.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Balones de aforo de 10 mL se lavaron con alcohol potable al 96%, y se secaron en una estufa Marca Memmert Modelo SM 200 a 100 °C por 1 hora.

La solución madre de ácido gálico se preparó en alcohol al 96%, al pesar 20 mg de ácido gálico y aforar a 10 mL de alcohol al 96%, obteniendo una concentración de 2000 ppm. Y para la preparación de la solución de carbonato de sodio al 20% (p/v) se pesó 3 g de carbonato de sodio y se aforó a 25 mL de agua destilada.

Construcción de la curva de calibración

Para la elaboración de la curva de calibración se preparó 7 estándares a 10, 20, 25, 30, 35, 40,45 ppm.

TABLA 1. Preparación de las soluciones a las concentraciones deseadas, para la construcción de la curva de calibración.

SOLUCIÓN	CONCEN- TRACIÓN (ppm)	PREPARACIÓN
Estándar A	10	0,050 mL sol. Ácido gálico + 9,95 mL alcohol 96%
Estándar B	20	0,100 mL sol. Ácido gálico + 9,90mL alcohol 96%
Estándar C	25	0,125 mL sol. Ácido gálico + 9,87 mL alcohol 96%
Estándar D	30	0,150 mL sol. Ácido gálico + 9,85 mL alcohol 96%
Estándar E	35	0,175 mL sol. Ácido gálico + 9,83 mL alcohol 96%
Estándar F	40	0,200 mL sol. Ácido gálico + 9,80 mL alcohol 96%
Estándar G	45	0,225 mL sol. Ácido gálico + 9,78 mL alcohol 96%

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Una vez preparadas las soluciones de ácido gálico a las concentraciones deseadas, se procedió a tomar 0,05 mL de cada una de las soluciones en un balón de aforo ámbar de 10 mL, a continuación, se añadió 3,95 mL de agua destilada y 0,25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu, en cada uno de los balones. Para el blanco se tomó 4 mL de agua destilada y se agregó 0,25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu.

Se dejó reposar por 2 minutos y se agregó 0,75 mL de carbonato de sodio al 20% (p/v) en cada uno de los balones, se llevó a ultrasonido Marca BRANSON Modelo1510R-MTH por 10 minutos y a continuación, se dejó en reposo por 2 horas en total oscuridad a temperatura ambiente. Luego de las 2 horas de reposo, se trasvaso las muestras de los balones a celdas espectrofotométricas de plástico de 1cm y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm en el espectrofotómetro UV-Vis Marca Jasco Modelo V730.

Con los datos de absorbancia se procedió a graficar la curva de calibración, entre las concentraciones planteadas de ácido gálico versus las absorbancias obtenidas.

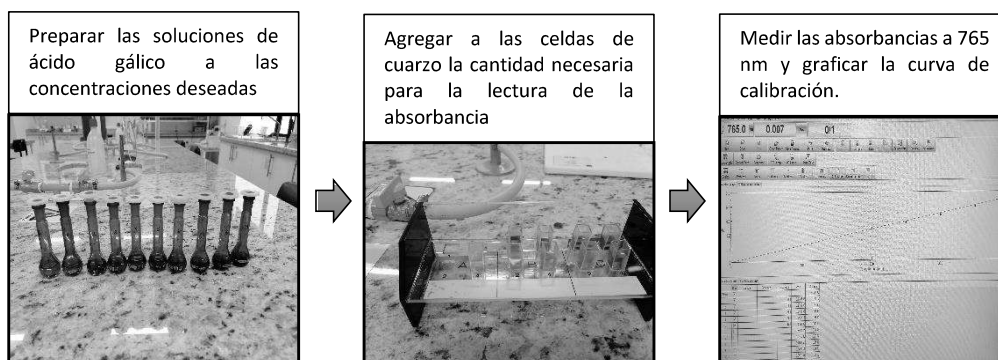


Figura 19. Diagrama del proceso de construcción de la curva de calibración.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Cuantificación de fenoles totales de los extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño).

En un balón de aforo ámbar de 10 mL se tomó 0,05 mL del extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 20 % y en otro balón de aforo ámbar de 10 mL se tomó 0,05 mL del extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 50 %, las muestras pasaron por filtros de jeringa PDVF de 45 μm , este proceso se realizó por triplicado. A cada balón se añadió 3,95 mL de agua destilada y 0,25 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu.

Después de 2 min se agregó 0,75 mL de carbonato de sodio al 20% (p/v) a cada balón. Los balones se llevaron al ultrasonido Marca Thermoscientific Modelo FS60D por 10 minutos, se dejó en reposo por 2 horas en total oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 765 nm en el espectrofotómetro Lector de microplacas marca Biotek modelo EPOCH.

Se cuantificó los fenoles totales presentes en cada uno de los extractos, interpolando las absorbancias medidas utilizando la curva de calibración de ácido gálico previamente construida.



Figura 20. Diagrama del proceso de cuantificación de fenoles totales de los extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño).

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Factores de Estudio

a) Dos concentraciones de etanol: E20 (20%), E50 (50%)

Tratamientos

Para establecer un mejor tratamiento se analizaron las concentraciones de los extractos etanolitos por triplicado con las concentraciones obtenidas en la curva de calibración de ácido gálico, los tratamientos se encuentran codificados en la Tabla 2.

TABLA 2. Preparación de los extractos etanólicos para conocer su concentración.

Tratamiento	Extractos etanólicos	Descripción
T1	E20	0,05 mL del extracto etanólico al 20% + 3,95 mL de agua destilada+0,25 mL del reactivo de Folin + 0,75mL carbonato de sodio 20% (p/v)
T2	E50	0,05 mL del extracto etanólico al 50% + 3,95 mL de agua destilada+0,25 mL del reactivo de Folin+ 0,75mL carbonato de sodio 20% (p/v)

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Cálculo de Fenoles Totales

Se utilizó la ecuación de regresión lineal con la curva de calibración estándar para obtener la ecuación de la recta (véase ecuación 1), luego con esos resultados se realizó análisis de varianza (ANOVA) para determinar la concentración de compuestos fenólicos.

Ecuación 1
$$Abs = mx + b$$

x: valor de polifenoles totales expresado en equivalentes de ácido gálico (en mg/mL). **Abs:** valor de la absorbancia. **m:** pendiente de la recta **b:** intercepto con el eje y (Urbano, 2016).

La x representa la cantidad de polifenoles totales equivalentes máxicos en ácido gálico en mg/mL.

Unidad experimental

La unidad experimental de estudio es cada pocillo de la microplaca.

Análisis estadístico

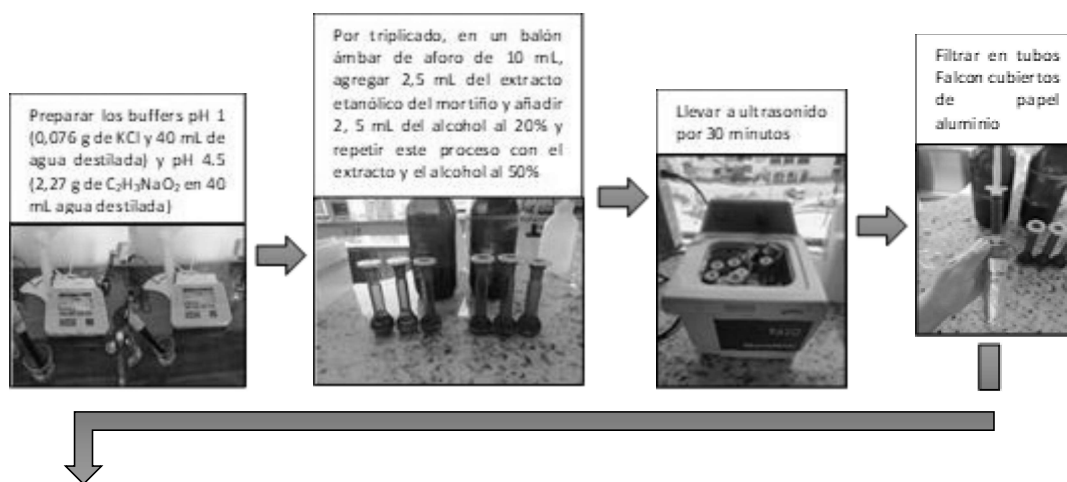
Dentro del análisis de datos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) con el fin de establecer diferencia significativa con variables paramétricas, se utilizó la prueba significativa de Tukey al 0,05% y la prueba de “t” para muestras independientes con el programa INFOSTAT.

CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Vaccinium floribundum* (mortiño).

Se realizó la técnica establecida por Giusti & Wrolstad (2001), con unas ligeras modificaciones. Para preparar el buffer pH 1, se pesó 0,076 g de cloruro de potasio y aforó a 40 mL de agua destilada, y para el buffer pH 4,5 se pesó 2,27 g de acetato de sodio y aforó a 40 mL agua destilada.

Se tomaron 2,5 mL de cada extracto (20-50%) en un balón ámbar de 10 mL y se añadió 2,5 mL de alcohol al 20 y al 50% correspondientemente, por triplicado. Se llevó a ultrasonido Marca Branson Modelo 1510R-MTH por 30 minutos; a continuación, se filtró los extractos etanólicos utilizando filtros PDVF de 45 μm en tubos Falcon cubiertos de papel aluminio, para impedir el paso de luz a los extractos. Se ajustó el pH a 2,3 con HCl (ácido clorhídrico) de concentración 2M agitando en un vórtex Marca Velp Scientifica Modelo F202A0173 por un minuto, se dejó reposar en oscuridad por 4 horas y a medida que pasaron 2 horas se llevó a ultrasonido los extractos por 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 3500 rpm por 30 minutos en una centrifugadora Marca Hermle Modelo Z400.

Se tomó 0,5 mL del sobrenadante de los tubos Falcon previamente centrifugados y fueron colocados en balones ámbar de 10 mL hasta un volumen final de 5 mL con cada uno de los buffers que se prepararon con anterioridad. Posteriormente se dejó en reposo por 45 minutos, y se colocó 100 μL en cada pocillo del lector de placas Marca Biotek Modelo EPOCH, para medir las absorbancias a 510 y 700 nm. Con el blanco y 3 muestras de los extractos se midió la longitud de onda máxima en el espectrofotómetro UV-Vis Marca JASCO Modelo V-730. Finalmente, se aplicó la ecuación 2 y 3 para determinar las concentraciones de antocianinas.



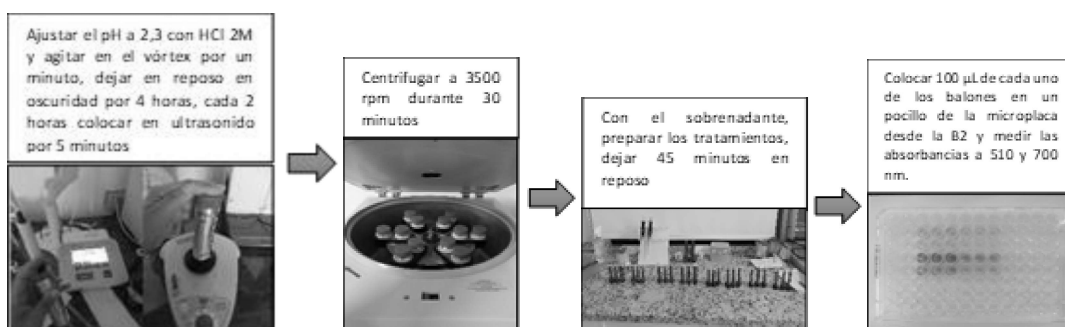


Figura 21. Diagrama del proceso de cuantificación de antocianinas de extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) por el método de pH diferencial.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Factores de Estudio

a) Dos concentraciones de etanol: E20 (20%), E50 (50%)

La medición del buffer a pH 1 y a pH 4,5 con las muestras, son indispensables para determinar la concentración de antocianinas monoméricas totales véase (ecuación 2).

Tratamientos

Para establecer un mejor tratamiento en cuanto a cuantificación de antocianinas totales, se analizaron las concentraciones de los extractos etanólicos obtenidos, la descripción de preparación de los buffers se encuentra detallada en la Tabla 3, se realizaron 3 repeticiones para cada uno de los extractos ensayados.

TABLA 3. Requerimientos para preparar las muestras previo a cuantificación de antocianinas totales en extracto etanólico de mortino al 20% y 50% para pH 1 y pH 4,5.

Muestras	Descripción
E20	0,5 mL sobrenadante Ext. 20% + 4,5 mL buffer pH 1
E20	0,5 mL sobrenadante Ext. 20% + 4,5 mL buffer pH 4,5
E50	0,5 mL sobrenadante Ext. 50% + 4,5 mL buffer pH 1

E50

0,5 mL sobrenadante Ext. 50% + 4,5 mL buffer pH 4,5

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Cálculo de Antocianinas Totales

Se utilizaron las ecuaciones 2 y 3 para cuantificar la concentración de antocianinas monoméricas, además con las concentraciones obtenidas se realizó el análisis de varianza (ANOVA).

$$\text{Ecuación 2} \quad \Delta A = (A_{\lambda_{\max}} - A_{700})_{pH1.0} - (A_{\lambda_{\max}} - A_{700})_{pH4.5}$$

$$\text{Ecuación 3} \quad AT (mg/L) = \frac{\Delta A \times PM \times FD \times 1000}{\epsilon \times l}$$

Dónde: **ΔA** variación de absorbancia; **A_{λ_{max}}** Absorbancia de la longitud de onda máxima, **AT** (antocianinas totales unidades mg/L); **FD** (factor de dilución); **PM** (cianidina-3-glucósido, 449,2 g/mol peso molecular); **1000** (conversión de gramos a miligramos); **E** (coeficiente molar de cianidina-3-glucósido, 26900); **l** (longitud de paso de celda en cm) (Giusti & Wrolstad, 2001).

Unidad experimental

La unidad experimental de estudio es cada pocillo de la microplaca de 96 pocillos.

Análisis estadístico

Dentro del análisis de datos se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) con el fin de establecer diferencia significativa con variables paramétricas, se utilizó la prueba significativa de Tukey al 5% y la prueba de "t" para muestras independientes con el programa INFOSTAT.

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVACIÓN DE CEPAS

Previo a la reactivación de cepas se preparó los medios de cultivo de la siguiente forma: se pesó 4 g de PDA (agar papa dextrosa) y TSA (tripticosa soya agar) en una balanza analítica Marca Mettler toledo Modelo ME204T/00, a continuación, se

agregó 100 mL de agua destilada, el medio se disolvió totalmente en agitación y calentamiento constante. Una vez disuelto, se colocó en la autoclave horizontal Marca Tuttnauer Modelo 3870M a 121 °C y 15 PSI alrededor de 45 minutos. Finalmente, se debe dispensar bajo cámara de flujo Marca ESCO Modelo LHG-4AG-F9, el medio de cultivo estéril en cajas Petri (25 mL/placa).

Para los medios líquidos, se pesaron 0,9 g de TSB (caldo de tripticasa soya) para 30 mL y 0,6 g de SBD (caldo dextrosa Sabouraud) para 20 mL, se esterilizaron en autoclave por 30 minutos a 121 °C y 15 PSI, y dispensaron 5 mL en tubos rosca de 10 mL.

Se preparó asépticamente la cámara de flujo junto con todos los materiales requeridos para la siembra. En un bloque frío, se colocó los tubos de cryobank provenientes del ultracongelador Marca Thermoscientific Modelo REVCO RLE 500. El trabajo se desarrolló junto al mechero, con el asa se tomó una perla del tubo de cryobank y se sembró en estriado sobre el medio de cultivo previamente preparado (PDA para *Candida albicans*, TSA para *Escherichia coli* y *Staphylococcus saprophyticus*), la siembra se realizó por duplicado. La perla se colocó en el medio de cultivo líquido (TSB para *Escherichia coli* y *Staphylococcus saprophyticus* y SBD para *Candida albicans*), se etiquetaron los tubos y las placas con el medio de cultivo, y se llevó a incubación según las condiciones establecidas Tabla 4.

TABLA 4. Condiciones específicas de crecimiento para los microorganismos de estudio.

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	<i>Candida albicans</i>
Medio de cultivo	Caldo/Agar de Tripticasa Soya	Caldo/Agar de Tripticasa Soya	Caldo/agar glucosado de Sabouraud
Temperatura	35 °C	35 °C	26 °C
Humedad	92% o superior	92% o superior	90% o superior

pH	7,3 ± 0,2	7,3 ± 0,2	5,6 ± 0,2
Tiempo de incubación	24 horas	24 horas	72 horas
Necesidad de oxígeno	Aerobiosis	Aerobio-anaerobio facultativo	Aerobiosis

Elaborado por: Las Autoras (2022).

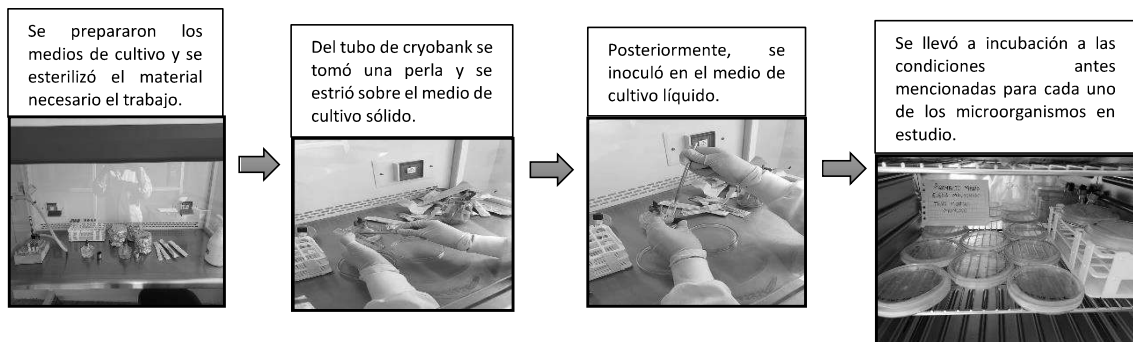


Figura 22. Diagrama del proceso de reactivación de cepas a partir de cryobank.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

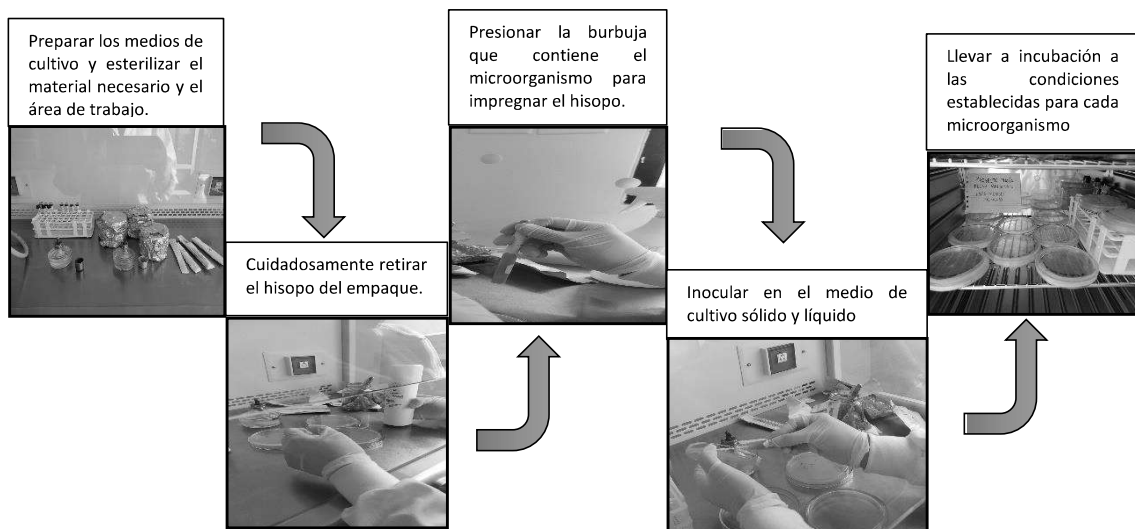


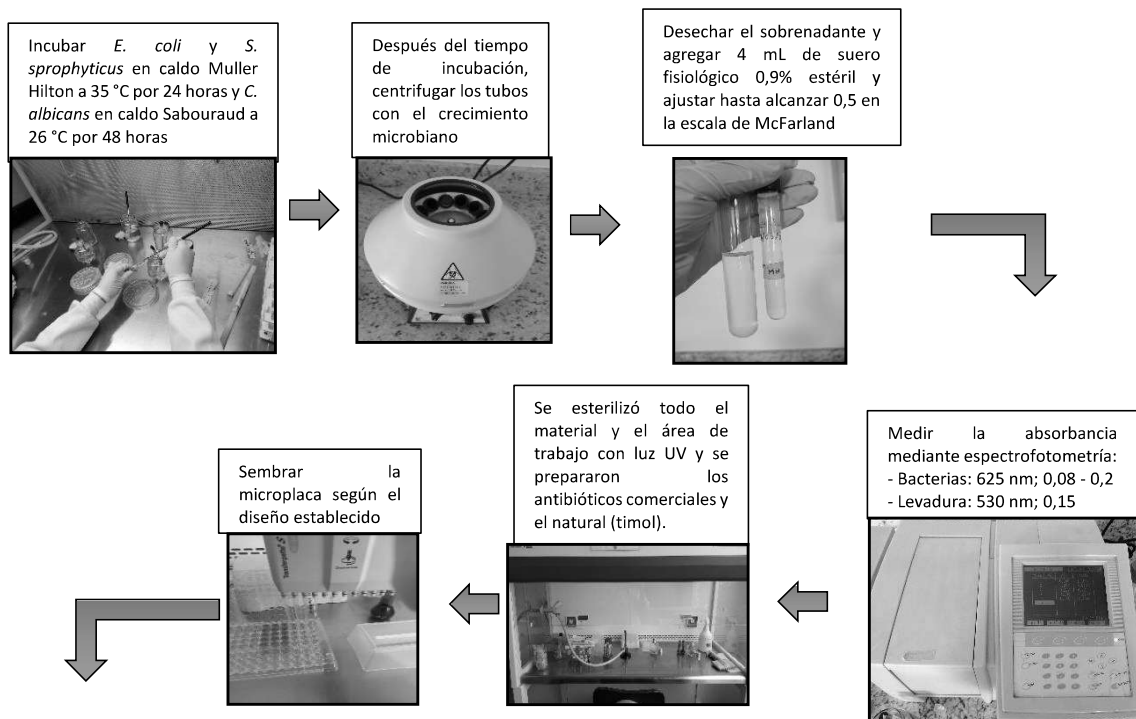
Figura 23. Diagrama del proceso de reactivación de cepas a partir de microorganismos (*Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 15305).

Elaborado por: Las Autoras (2022).

TÉCNICA DE MICRODILUCIÓN

Preparación del inóculo

Se sembró *Escherichia coli* y *Staphylococcus saprophyticus* en caldo Muller Hilton por 24 horas a 35 °C, mientras que *Candida albicans* se sembró en caldo Sabouraud dextrosa por 48 horas a 26 °C. Transcurridos estos tiempos se centrifugó a 3000 rpm por 30 minutos. A continuación, se desechó el líquido (sobrenadante) quedando únicamente el pellet en el tubo, para la resuspensión definitiva se agregó 5 mL de solución fisiológica 0,9 % estéril y se llevó a vortex por 3 minutos. Se añadió poco a poco pequeñas cantidades de solución fisiológica 0,9 % hasta ajustar a escala de McFarland 0,5 con un espectrofotómetro UV-Vis Marca Shimadzu Modelo: UV mini 1240 (Figura 23). Para las bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus saprophyticus*) se midió a una absorbancia de 625 nm con valores entre 0,08 - 0,2 que corresponde a una concentración de 10^8 UFC/mL; y para levaduras (*Candida albicans*) se midió la absorbancia a 530 nm hasta 0,15 de absorbancia, obteniendo una concentración de 10^6 UFC/mL.



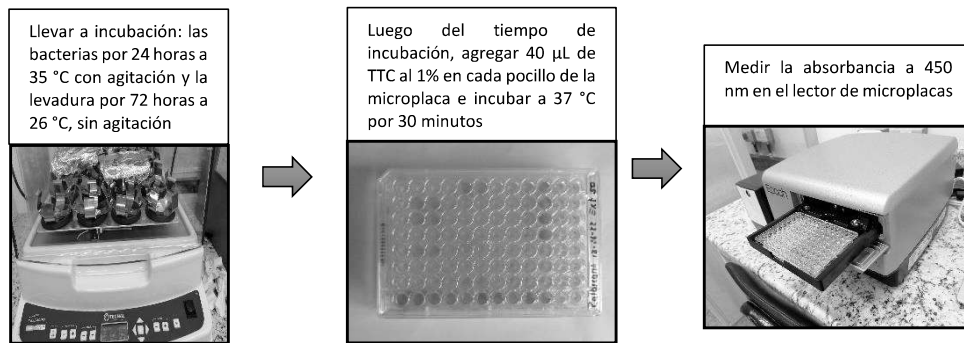


Figura 24. Preparación del inóculo y ajuste a escala McFarland previo a siembra en las microplacas.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Siembra en Microplaca

Las tres microplacas se prepararon con la misma metodología, únicamente cambió el microorganismo para su estudio (*Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Candida albicans*). Se detalla a continuación el diseño aplicado (Figura 24):

Blanco: Columna A12-H12 se añadió 200 µL de medio de cultivo.

Control negativo (C_E): Columna A11-H11 se añadió 200 µL de medio de cultivo.

Control positivo (C_c): Fila H9-H1 se colocó 150 µL de medio de cultivo + 50 µL del inóculo McFarland.

Muestras de extractos etanólicos: Fila A9-B9-C9: se añadió 150 µL medio de cultivo + 50 µL extracto + 50 µL inóculo McFarland. En la fila A8-A1 /B8-B1/C8-C1 que contenía 150 µL medio de cultivo + 50 µL inóculo McFarland, se realizó el proceso de dilución seriada tomando 50 µL del pocillo A9-B9-C9 y se diluyó en la misma cantidad hasta A1-B1-C1 descartando los 50 µL restantes.

Control positivo (antibiótico) Fila D9-E9: se añadió 150 µL medio de cultivo + 50 µL antibiótico + 50 µL inóculo McFarland, a partir de la fila D8-D1 /E8-E1 que contenía 150 µL medio de cultivo + 50 µL inóculo McFarland, se realizó el proceso de dilución

seriada tomando 50 μ L del pocillo D9-E9 y se diluyó en la misma cantidad hasta D1-E1 descartando los 50 μ L restantes.

Control positivo (natural) Fila F9-G9: se añadió 150 μ L medio de cultivo + 50 μ L solución de timol + 50 μ L inóculo McFarland, a partir de la fila F8-F1 /G8-G1 que contenía 150 μ L medio de cultivo + 50 μ L inóculo McFarland, se realizó el proceso de dilución seriada tomando 50 μ L del pocillo F9-G9 y se diluyó en la misma cantidad hasta F1-G1 descartando los 50 μ L restantes.

Los antibióticos comerciales utilizados para este ensayo fueron nitrofurantoína para *Staphylococcus saprophyticus*, fosfomicina para *Escherichia coli* y fluconazol para *Candida albicans*. Se pesó 2 mg de nitrofurantoina previamente pulverizada y aforó a 10 mL de etanol 96%; se pesó 2 mg de fosfomicina y aforó a 10 mL de agua destilada estéril, finalmente se pesó 2 mg de fluconazol y aforó a 10 mL de agua destilada estéril. El timol se utilizó como control natural, se preparó pesando 10 mg y aforó a 10 mL con etanol 96%.

Para los extractos etanólicos de mortiño al 20 y 50% se preparó una dilución 1:10 hasta llegar al aforo de 10mL con alcohol al 20 y al 50%, respectivamente.

Las microplacas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus saprophyticus* se incubaron por 24 horas a 35 °C con agitación, mientras que la microplaca de la levadura *Candida albicans* se incubó por 72 horas a 26 °C, sin agitación.

Posterior al tiempo de incubación, para determinar la presencia de actividad biológica se utilizó cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 1% con agua fría estéril en un balón ámbar de 10 mL y se colocó 30 μ L de esta solución en cada uno de los 96 pocillos de la microplaca y se incubó a 37 °C por 40 minutos en un equipo Marca Memmert Modelo. Después de este tiempo se midió la absorbancia a 450 nm.

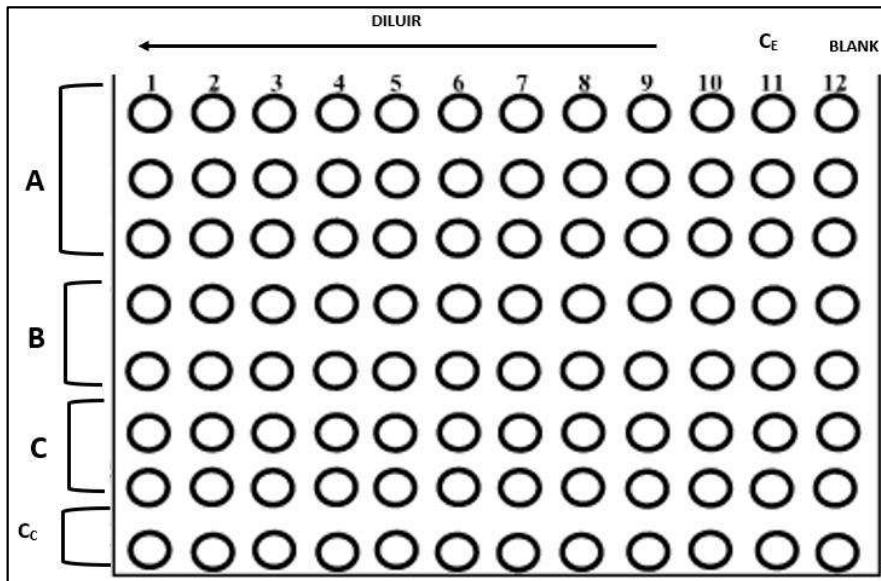


Figura 25. Diseño del contenido de cada uno de los pocillos de la microplaca para determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Análisis de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Una vez que se colocó el colorante cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC), se procedió leer las microplacas con los extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) a concentraciones de 20% y 50%. Los resultados emitidos se interpretarán en $\mu\text{g/mL}$ y porcentaje de inhibición para determinar la actividad antimicrobiana a diferentes concentraciones.

Adicional, es necesario determinar el porcentaje de inhibición con las absorbancias obtenidas véase (ecuación 4):

Ecuación 4

$$\% \text{Inhibición} = 100 - (A \times 100 / B)$$

A: Absorbancia de las tres réplicas

B: Absorbancia del control positivo (Rosales, 2018).

TÉCNICA DE CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Previo a la separación de compuestos por Cromatografía de Capa Fina (TLC) con placas silica gel HP TLC Factor 254, se realizó la concentración de los extractos etanólicos de mortiño al 20 y 50 %, para lo que se utilizó 30 mL de cada extracto y se llevó a rotavapor Marca Buchi Serie R-100 a una temperatura de 35 °C, 175 mbar de presión por un lapso de 2 horas.

Una vez concentrados los extractos de mortiño al 20 y 50%, se empleó un sistema de reflujo para acidificarlos con 10mL de HCL 2M durante una hora (Filip, Vlassa, Copaciu, & Coman, 2012), aplicando la metodología con ligeros cambios. Finalmente, las muestras se filtraron y se trasvasaron a frascos ámbar para su posterior análisis cromatográfico.



Figura 26. Diagrama del proceso de concentración y acidificación de los extractos etanólicos de mortiño.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Se preparó el estándar de cloruro de cianidina 3-glucósido con 2mg de estándar disuelto en 1ml de metanol grado HPLC.

Se acondicionó la cámara cromatográfica con la fase móvil: acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético, agua en proporción (10:1.1:1.1:2.6) (Poole, 2015) por 30 minutos. Adaptar el método en el programa WinCATS del aplicador de TLC Marca CAMAG Modelo Linomat 5. En una placa de vidrio silica gel HP TLC Factor 254 nm

tamaño 10x10 cm se dibujó una línea de 1 cm previo a sembrar en la placa, con ayuda del aplicador TLC se sembró 7 μ L del estándar de cloruro de cianidina 3-glucósido y 10 μ L de los extractos etanólicos del mortiño al 20 y 50%. Una vez que se realizó la siembra, se colocó la placa en el interior de la cámara cromatográfica saturada por aproximadamente una hora 15 minutos para la elución y separación de los componentes. Se retiró la placa y se secó completamente el disolvente con una secadora en frío. Posteriormente se midió los factores de retención (Rf), para determinar los componentes que se encuentran en los extractos de *Vaccinium Floribundum* (mortiño) se utilizó un visualizador UV Marca CAMAG Modelo UV Lamp 4 con luz una longitud de onda de 365 y 254nm.

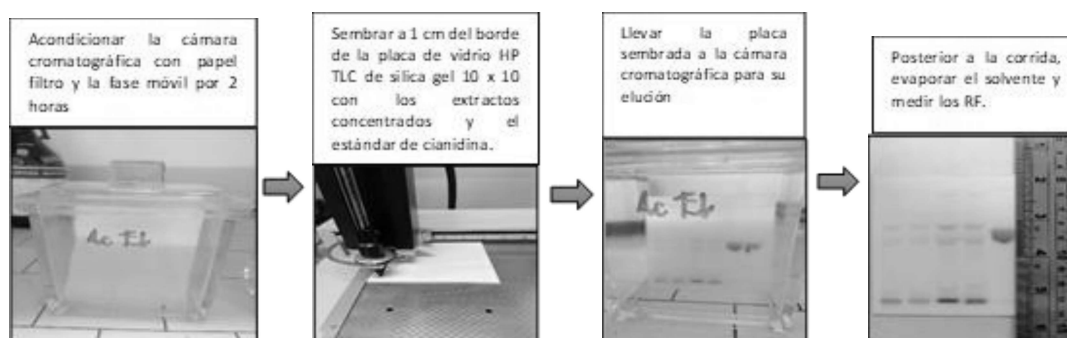


Figura 27. Diagrama del proceso de separación de compuestos por Cromatografía de Capa Fina TLC.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Vaccinium floribundum* (mortiño).

Para la construcción de la curva de calibración, se establecieron siete concentraciones de ácido gálico y se midió la absorbancia a 765 nm de longitud de onda por espectrofotometría, obsérvese la gráfica en la figura 28.

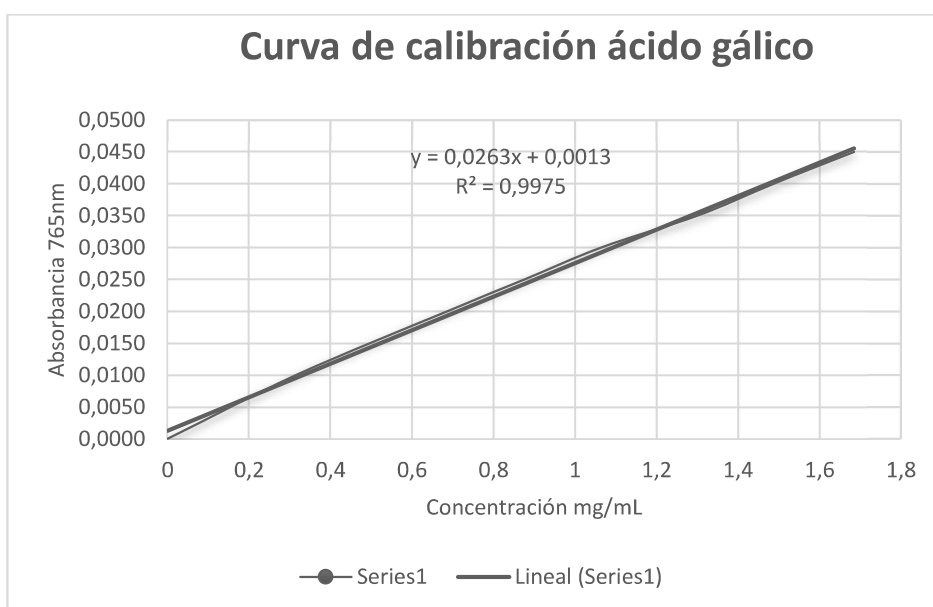


Figura 28. Curva de calibración con ácido gálico mg/mL.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

La ecuación de la recta obtenida en la curva de calibración fue $y = 0,0263x + 0,0013$ y su coeficiente de correlación corresponde a 0,9975, valor que se considera aceptable y nos permitió calcular la concentración de compuestos fenólicos presentes en el extracto *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 20 y al 50% de etanol.

A partir de la lectura de las absorbancias a 765 nm, de cada una de las repeticiones de las muestras de los extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) a la concentración de 20% y 50% y utilizando la fórmula de la recta; se calcularon las

concentraciones de compuestos fenólicos totales, representado en mg de ácido gálico/100 mL extracto, obteniendo un valor de 537,2624 para el extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 20%, y 621,0393 para el extracto al 50%, como se detalla en la Tabla 5.

TABLA 5. Fenoles totales del extracto de *Vaccinium floribundum* (mortiño) a la concentración de 20% y 50%.

FENOLES TOTALES				
Extracto	Absorbancias a 765nm Promedio	mgGA/100 mL extracto	mgGA/mL extracto	Rangos
etanólico				
Mortiño 20%	0,1426	537,2624	5,3726	A
Mortiño 50%	0,1646	621,0393	6,2104	B

Nota: Las letras diferentes en la columna de nombre “Rangos”, indican diferencia significativa según la prueba de Tukey con un p valor $\leq 0,05$.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

En base a las pruebas estadísticas paramétricas, se identificó que hay una diferencia significativa entre el contenido de compuestos fenólicos del extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 20% y el extracto etanólico al 50%, siendo el valor de $p < 0,0001$, que indica que el extracto etanólico al 50% (B) posee mayor contenido de compuestos fenólicos que el extracto etanólico al 20% (A). El contenido de compuestos fenólicos tanto del extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 20 y al 50% de concentración, son similares con el resultado reportado por Aaby, Grimmer, & Holtung (2013) en su estudio con arándano, que presenta 564 mg AG/100 g fruto seco de concentración de fenoles totales. También Grace, Esposito, Dunlap, & Lila (2015) analizaron varias especies del género *Vaccinium*, entre ellas *Vaccinium uliginosum* (arándano negro), en el cual se encontró 504,5 mg AG/100 g de fruto; mientras que Llivisaca y otros (2018) reportaron un contenido de 146,10 mg AG/100 g fruto en muestras recolectadas en

la Provincia de Pichincha y 107,37 mg AG/100 g fruto en muestras provenientes de la Provincia de Chimborazo y mencionan que el contenido de polifenoles totales en hojas de *Vaccinium floribundum* (mortiño) es significativamente mayor al contenido de polifenoles totales presentes en el fruto.

CUANTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Vaccinium floribundum* (mortiño).

Luego de utilizar el método de pH diferencial en las muestras etanólicas de *Vaccinium floribundum* (mortiño) aplicando la ecuación 2 y 3, se pudo obtener diferentes concentraciones de antocianinas en mg/L, se detallan en la Tabla 6:

TABLA 6. Cuantificación de antocianinas totales en los extractos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) a la concentración de 20% y 50%.

MUESTRAS	Lecturas método pH diferencial								
	510nm	700nm	510nm	700nm					
Extracto etanólico	pH1		pH4,5		Abs Prom	mg/L	mg/mL	Desviación Estándar	Rangos
Mortiño 20%	0,1447	0,0383	0,1447	0,0393	0,0697	11,6391	0,0116	0,9641	A
Mortiño 50%	0,4203	0,0413	0,1630	0,0437	0,2613	43,6342	0,0436	1,8318	B

Nota: Las concentraciones corresponden a resultados obtenidos de la ecuación 3, se expresan en mg/L. Las letras diferentes en la columna de nombre "Rangos", indican diferencia significativa según la prueba de Tukey con un p valor $\leq 0,05$. Abs Prom: Promedio de absorbancias.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

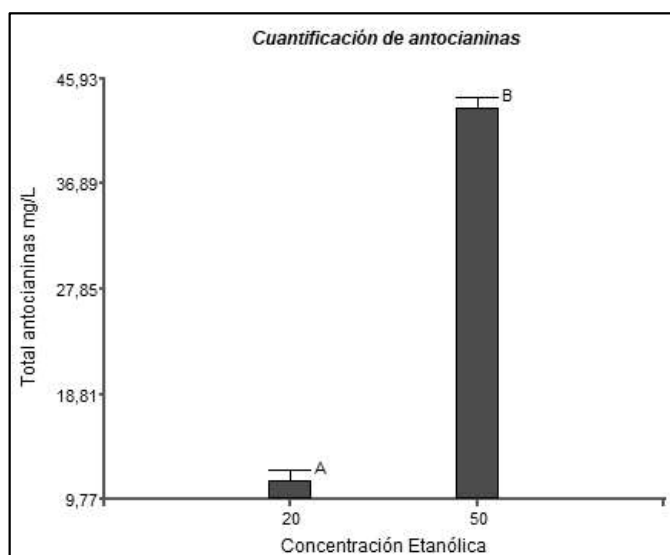


Figura 29. Comparación entre los extractos del 20 y 50% con la cantidad total de antocianinas totales.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

En la Figura 29, se observa la cantidad de antocianinas totales en las muestras de *Vaccinium floribundum* al 20 y 50% de etanol.

De los valores obtenidos con relación a la cuantificación de antocianinas totales, la concentración con extracto etanólico al 20% fue de 11,6391 mg/L (ver la Tabla 6), que es considerada una cantidad similar a la reportada en *Vaccinium myrtillus* (arándano) (Medina, 2016), mientras que estadísticamente fue el extracto etanólico de 50% que presentó diferencia significativa $< 0,05$ y una concentración de 43,63mg/L (Figura 29), este extracto presentó mayor cantidad de antocianinas obtenidas en el mortiño, a la vez que brindó un buen rendimiento. Esto pudo haberse dado, ya que los procesos de extracción se relacionan con el estado de madurez de la baya durante la cosecha y ésta puede cambiar de color por incidencia de la temperatura, oxígeno y luz. Una temperatura alta aumenta el desdoblamiento de ácidos, mientras que la acidez está relacionada con el pH que se encuentran en el fruto de mortiño (Guerrero, 2019).

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA*Escherichia coli* ATCC 25922

A continuación, se exponen los resultados que presentaron los extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) respecto a la concentración mínima inhibitoria (MIC) y el porcentaje de inhibición frente a la bacteria *Escherichia coli*.

TABLA 7. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 20% contra *Escherichia coli*

Concentración extracto (µg/mL)	Absorbancia del Control de Crecimiento (Cc)	Promedio absorbancias a 450 nm	% inhibición	Desviación estándar
390,6*	1,601	1,542	3,664**	0,095
781,3	1,72	1,396	18,837	0,210
1562,5	1,908	1,366	28,424	2,111
3125,0	2,342	1,503	35,838	2,626
6250,0	2,491	1,424	42,848	0,825
12500,0	2,354	1,267	46,191	0,998
25000,0	2,232	1,071	52,031	2,878
50000,0	2,342	1,112	52,533	0,444
100000,0	2,235	1,033	55,280	0,280

Nota: Los asteriscos representan* Concentración Mínima Inhibitoria, ** Porcentaje de inhibición.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

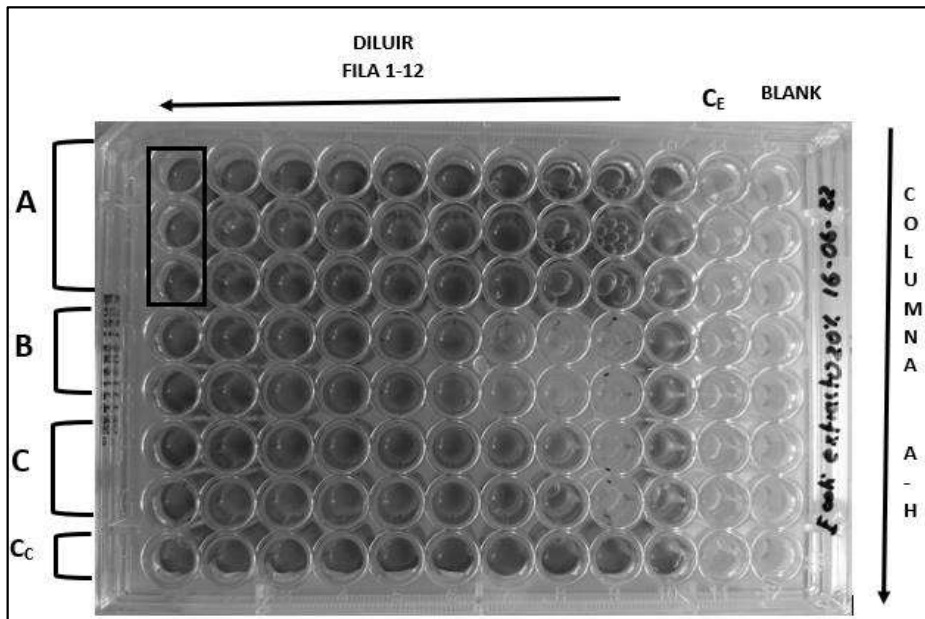


Figura 30. Microplaca de *Escherichia coli* con extracto etanólico 20% con colorante TTC 1% incubada en un lapso de 24 horas. Blank: blanco, (C_E): control negativo, (C_C): control positivo, A: extractos, B: Antibiótico C: control natural.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

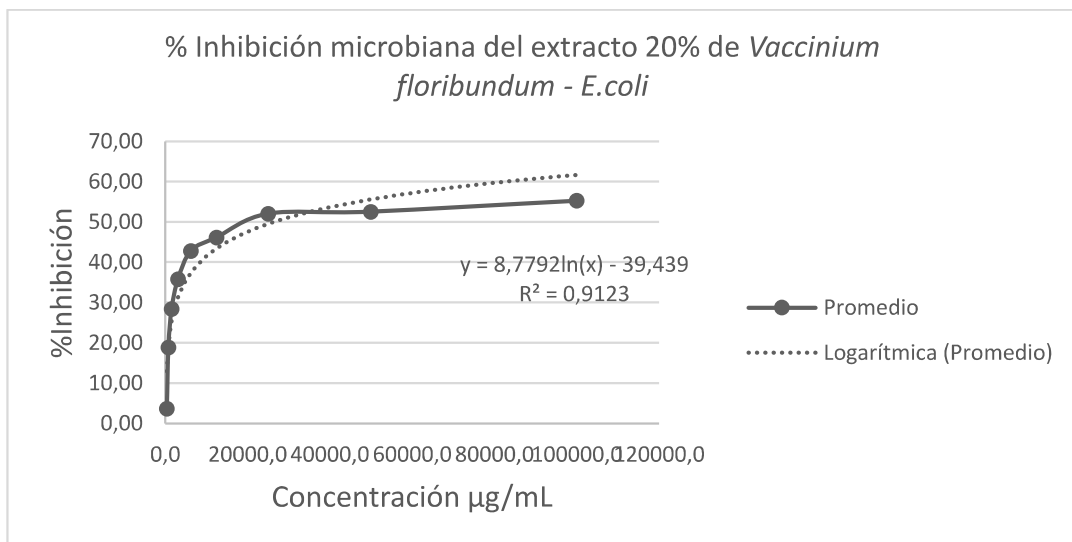


Figura 31. Representa el comportamiento antimicrobiano del extracto alcohólico al 20% de *Vaccinium floribundum* versus *Escherichia coli*.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Como se puede evidenciar en la Tabla 7 que corresponde a la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 20% frente a la bacteria *Escheriria coli*, el dato que se obtuvo para la concentración mínima inhibitoria es de 390,6 µg/mL y el porcentaje de inhibición fue de 3,66%, mientras que en la figura 31 podemos observar el comportamiento del extracto etanólico al 20% frente al microorganismo *Escherichia coli*, afirmando que, a mayor concentración de extracto, será mayor la inhibición del microorganismo.

TABLA 8. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 50% contra *Escherichia coli*.

Concentración extracto (µg/mL)	Absorbancia del Control de Crecimiento (Cc)	Promedio absorbancias a 450 nm	% inhibición	Desviación estándar
390,6*	2,010	1,773	11,774**	0,975
781,3	1,955	1,621	17,067	3,869
1562,5	1,899	1,512	20,379	4,394
3125,0	1,873	1,452	22,477	0,848
6250,0	2,461	1,853	24,719	0,792
12500,0	2,132	1,577	26,032	0,308
25000,0	2,304	1,610	30,122	4,890
50000,0	2,056	1,380	32,896	3,195
100000,0	2,23	1,387	37,818	0,612

Nota: Los asteriscos representan* Concentración Mínima Inhibitoria, ** Porcentaje de inhibición.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

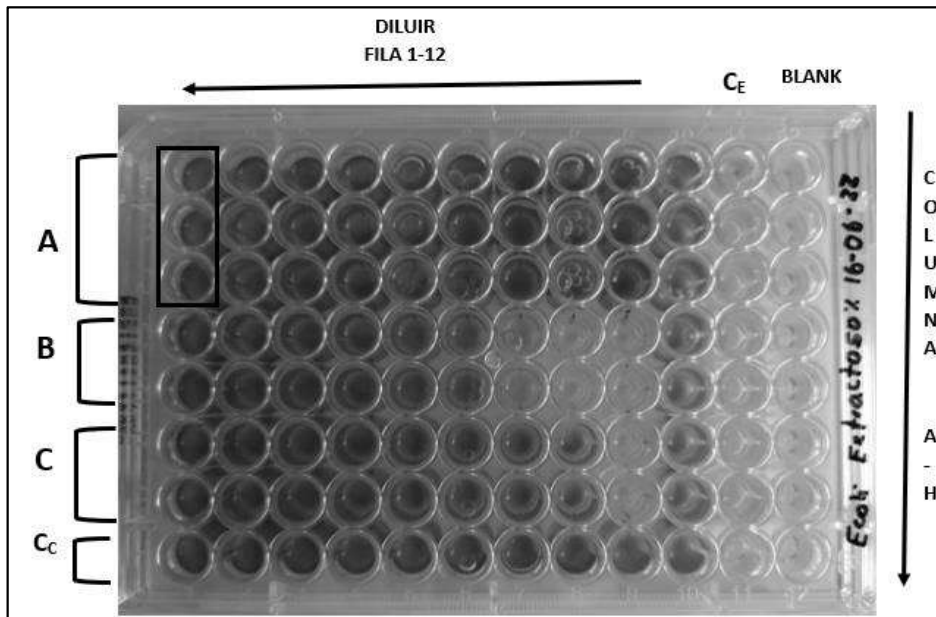


Figura 32. Microplaca de *Escherichia coli* con extracto etanólico 50% con colorante TTC 1% incubada en un lapso de 24 horas. Blank: blanco, (C_E): control negativo, (C_C): control positivo, A: extractos, B: Antibiótico C: control natural.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

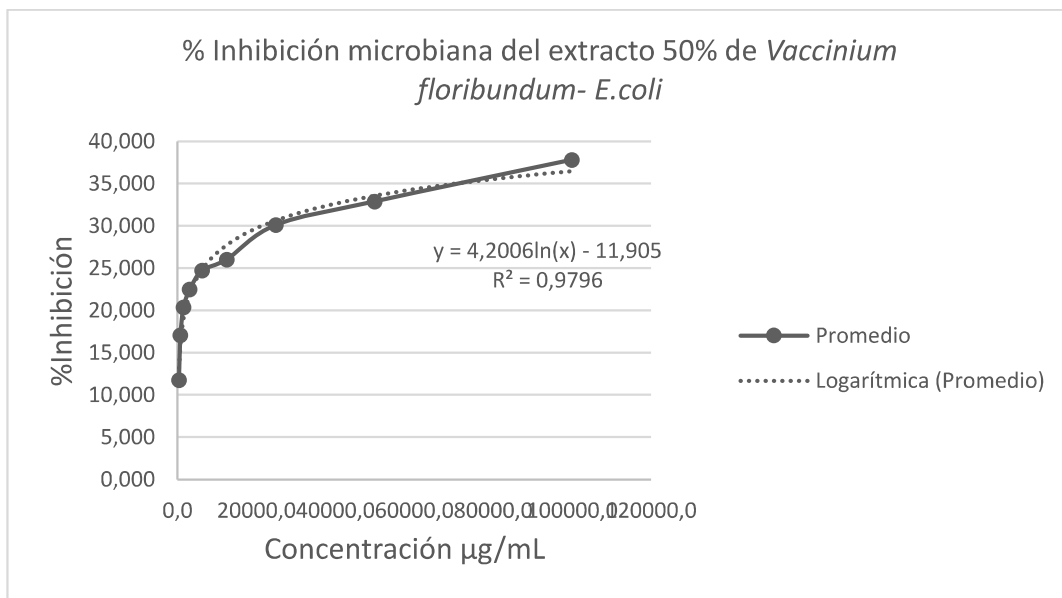


Figura 33. Representa el comportamiento antimicrobiano del extracto alcohólico al 50% de *Vaccinium floribundum* versus *Escherichia coli*.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

En la Tabla 8 se detalla el valor obtenido del extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 50% en la concentración mínima inhibitoria (390,6 µg/mL) y el porcentaje de inhibición (11,77%) que posee sobre *Escheriria coli*. En la figura 33 podemos observar el comportamiento del extracto etanólico al 50% contra *Escherichia coli*, evidenciando que, a mayor concentración de extracto, será mayor la inhibición del microorganismo.

TABLA 9. Porcentaje de inhibición y CMI de los extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) y controles establecidos frente a *Escherichia coli*.

Microorganismos	Extracto 20%		Extracto 50%		Timol			Fosfomicina		
	CMI (µg/mL)	% Inh	CMI (µg/mL)	% Inh	CMI (µg/mL)	% Inh	Desviación estándar	CMI (µg/mL)	% Inh	Desviación estándar
<i>E. coli</i>	390,63	3,66	390,63	11,77	3,91	10,95	0,60	3,13	23,45	1,40

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Comparando los datos obtenidos para la concentración mínima inhibitoria y el porcentaje de inhibición de los extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 20 y 50% frente a *Escherichia coli*, se evidencia que el extracto etanólico de concentración al 50% presenta mayor porcentaje de inhibición respecto al extracto de concentración al 20% de etanol, mientras que el porcentaje de inhibición y la concentración mínima inhibitoria que presenta el control comercial fosfomicina es superior a los demás agentes antimicrobianos ensayados, esto se puede deber principalmente a es un antibiótico de amplio espectro.

En estudios similares, realizados con el extracto hidrometanólico de residuos de *Rubus glaucus Benth* (mora), se menciona que para *Escherichia coli*, se presenta una MIC de 4,0 mg/mL y un porcentaje de inhibición del 76%, esto debido a la gran cantidad de la antocianina cianidina-3-rutinosido (2520 mg/kg) presente en la muestra (Grande, Aranga, Flórez, & Araujo, 2020). Assadian, y otros (2011) estudiaron la actividad microbiana del triclosán y la polihexanida contra *Escherichia*

coli, obteniendo como resultados de la MIC 0,6 µg/mL para triclosán y 0,2 µg/mL para polihexanida, confirmando que hay una baja susceptibilidad hacia estos agentes antimicrobianos. Ahmed, Shariq, Alsalloom, Babikir, & Alhomoud (2019), en su estudio referente a los patrones de resistencia a los antimicrobianos, afirman que *Escherichia coli* es altamente resistente a la ampicilina, mientras que la consideran mayormente susceptible frente a la nitrofurantoína.

Staphylococcus saprophyticus ATCC 15305

A continuación, se muestran los resultados que presentaron los extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) respecto a la concentración mínima inhibitoria (MIC) y el porcentaje de inhibición frente a la bacteria *Staphylococcus saprophyticus*.

TABLA 10. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 20% contra *Staphylococcus saprophyticus*

Concentración extracto (µg/mL)	Absorbancia del Control de Crecimiento (Cc)	Promedio absorbancias a 450 nm	% inhibición	Desviación estándar
390,6*	1,229	0,142	88,419**	0,632
781,3	1,206	0,135	88,778	0,540
1562,5	1,579	0,170	89,234	0,570
3125,0	1,462	0,149	89,831	0,105
6250,0	1,628	0,164	89,947	0,094
12500,0	1,452	0,138	90,519	0,040
25000,0	1,644	0,143	91,322	0,035
50000,0	1,652	0,143	91,344	0,121
100000,0	1,326	0,112	91,554	0,075

Nota: Los asteriscos representan* Concentración Mínima Inhibitoria, ** Porcentaje de inhibición.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

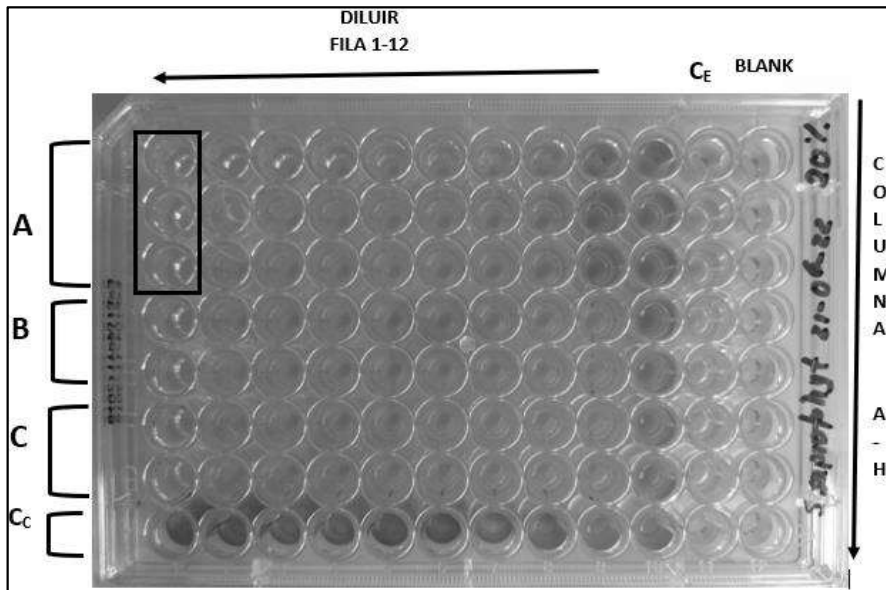


Figura 34. Microplaca de *Staphylococcus saprophyticus* con extracto etanólico 20% con colorante TTC 1% incubada en un lapso de 24 horas. Blank: blanco, (C_E): control negativo, (C_c): control positivo, A: extractos, B: Antibiótico C: control natural.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

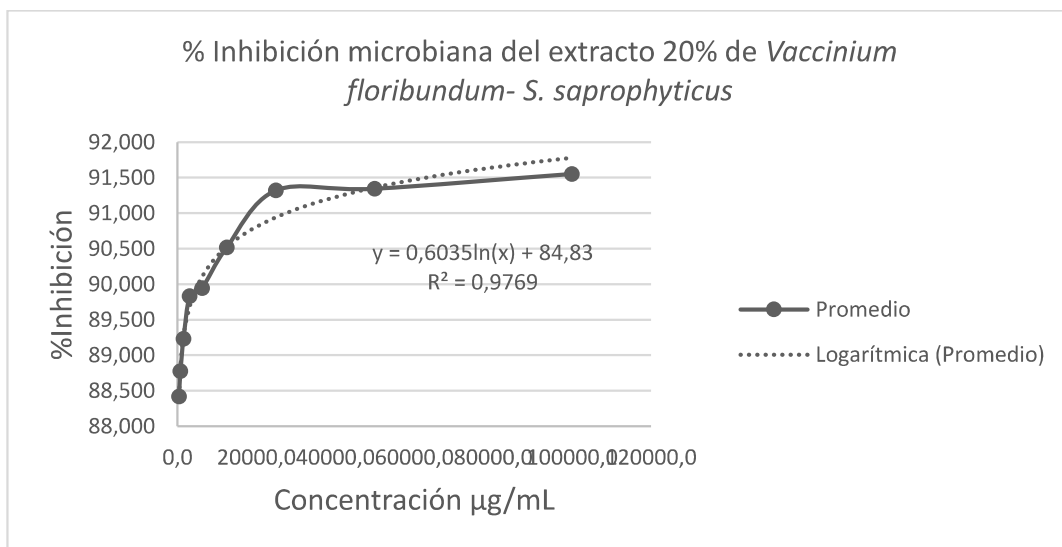


Figura 35. Representa el comportamiento antimicrobiano del extracto alcohólico al 20% de *Vaccinium floribundum* versus *Staphylococcus saprophyticus*.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Como se puede evidenciar en la Tabla 10 que corresponde a la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 20% frente a la bacteria *Staphylococcus saprophyticus*, el dato que se obtuvo para la concentración mínima inhibitoria es de 390,6 µg/mL y el porcentaje de inhibición fue de 88,42 %, mientras que en la figura 35 podemos observar el comportamiento del extracto etanólico al 20% frente al microorganismo *Staphylococcus saprophyticus*, afirmando que, a mayor concentración de extracto, será mayor la inhibición del microorganismo.

TABLA 11. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 50% contra *Staphylococcus saprophyticus*.

Concentración extracto (µg/mL)	Absorbancia del Control de Crecimiento (Cc)	Promedio absorbancias a 450 nm	% inhibición	Desviación estándar
390,6*	1,206	0,143	88,439**	0,124
781,3	1,229	0,137	88,816	0,047
1562,5	1,579	0,153	88,913	0,473
3125,0	1,462	0,153	88,921	0,255
6250,0	1,628	0,123	88,969	0,316
12500,0	1,452	0,133	89,116	0,245
25000,0	1,644	0,145	89,220	0,559
50000,0	1,652	0,116	89,397	0,091
100000,0	1,326	0,117	89,432	0,318

Nota: Los asteriscos representan* Concentración Mínima Inhibitoria, ** Porcentaje de inhibición.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

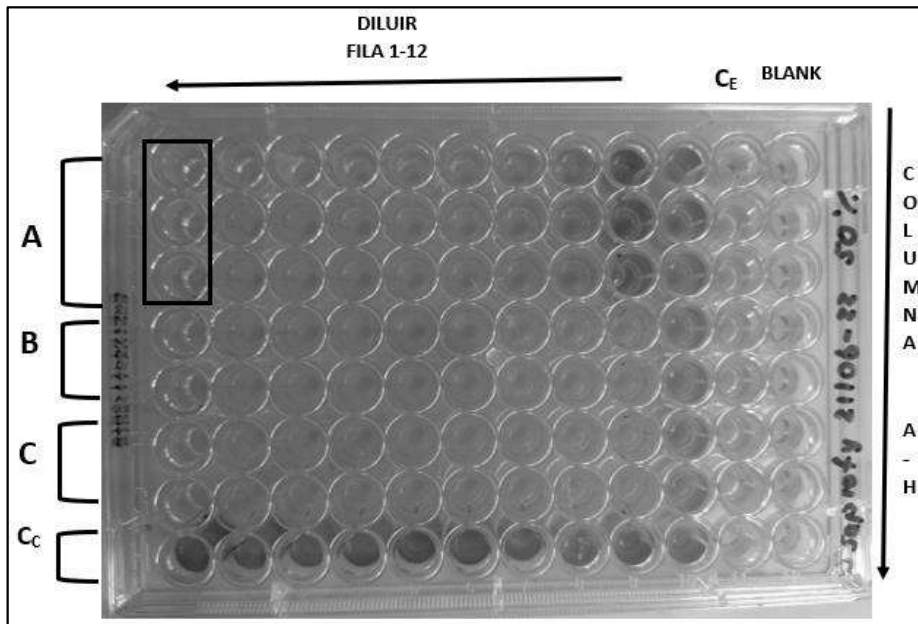


Figura 36. Microplaca de *Staphylococcus saprophyticus* con extracto etanólico 50% con colorante TTC 1% incubada en un lapso de 24 horas. Blank: blanco, (C_E): control negativo, (C_c): control positivo, A: extractos, B: Antibiótico C: control natural.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

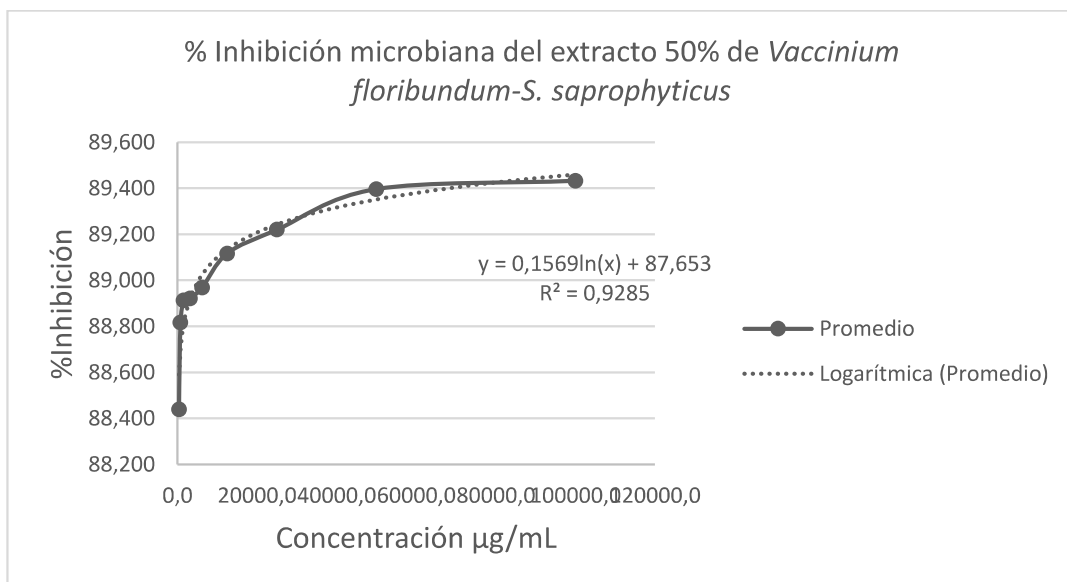


Figura 37. Representa el comportamiento microbiano del extracto alcohólico al 50% de *Vaccinium floribundum* versus *Staphylococcus saprophyticus*.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Como se puede evidenciar en la Tabla 11 que corresponde a la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 50% frente a la bacteria *Staphylococcus saprophyticus*, el dato que se obtuvo para la concentración mínima inhibitoria es de 390,6 µg/mL y el porcentaje de inhibición fue de 88,44%, mientras que en la figura 37 podemos observar el comportamiento del extracto etanólico al 50% frente al microorganismo *Staphylococcus saprophyticus*, aseverando que, a mayor concentración de extracto, será mayor la inhibición del microorganismo.

TABLA 12. Porcentaje de inhibición y CMI de los extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) y controles establecidos frente a *Staphylococcus saprophyticus*.

Microorganismo	Extracto 20%		Extracto 50%		Timol			Nitrofurantoína		
	CMI (µg/mL)	% Inh.	CMI (µg/mL)	% Inh	CMI	% Inh	Desviación estándar	CMI (µg/mL)	% Inh	Desviación estándar
<i>S. saprophyticus</i>	390,63	88,42	390,63	88,44	3,91	87,42	0,79	0,78	87,73	0,50

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Comparando los datos obtenidos para la concentración mínima inhibitoria y el porcentaje de inhibición de los extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 20 y 50% frente a *Staphylococcus saprophyticus*, se evidencia que el extracto etanólico de concentración al 50% presenta mayor porcentaje de inhibición respecto al extracto de concentración al 20% de etanol. En el caso del valor del porcentaje de inhibición y la concentración mínima inhibitoria que presenta el antibiótico comercial nitrofurantoína fue 87,7 % y una MIC de 0,78µg/mL, la cantidad obtenida fue superior al agente natural ensayado, la causa

se debió a que los uropatógenos en gran cantidad, son susceptibles a este fármaco porque sus enzimas nitroreductasas poseen intermediarios electrofílicos reactivos en gran medida que atacan de forma no específica a las proteínas en el ribosoma bacteriano provocando inhibición completa y permitiendo obtener porcentajes de inhibición altos (Komp, Klockars, Malmberg, & Cars, 2014). También es necesario mencionar que la MIC alcanzada experimentalmente se acerca a los valores teóricos en estudios con nitrofurantoína que reportan $\leq 16 \mu\text{g/mL}$ dentro del rango de sensibilidad (IDEX, 2022).

El mejor resultado frente a *Staphylococcus saprophyticus* obtuvo el extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 50% con una MIC de $390,63 \mu\text{g/mL}$ a un porcentaje de inhibición de 88,44%, resultados similares se observaron en el estudio de Varela & Musuña (2020), que trabajaron con granulados de *Vaccinium floribundum* (mortiño) de 150 mg, 200 mg y 250 mg, para el mismo microorganismo sus porcentajes de inhibición fueron: 50,48%; 91,17% y 86,56% respectivamente, datos que corroboran el porcentaje de inhibición del ensayo.

Candida albicans ATCC 10331

A continuación, se exponen los resultados que presentaron los extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) respecto a la concentración mínima inhibitoria (MIC) y el porcentaje de inhibición frente a la levadura *Candida albicans*.

TABLA 13. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 20% contra *Candida albicans*

Concentración extracto ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbancia del Control de Crecimiento (Cc)	Promedio absorbancias a 450 nm	% inhibición	Desviación estándar
390,6*	1,413	1,390	1,628**	2,515
781,3	1,32	1,289	2,374	0,875
1562,5	1,229	1,160	5,587	0,124
3125,0	1,467	1,362	7,135	3,823
6250,0	1,434	1,301	9,298	3,674
12500,0	1,473	1,291	12,333	3,669
25000,0	1,537	1,309	14,856	1,228

50000,0	1,505	1,235	17,918	2,995
100000,0	1,306	1,055	19,193	1,650

Nota: Los asteriscos representan* Concentración Mínima Inhibitoria, ** Porcentaje de inhibición.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

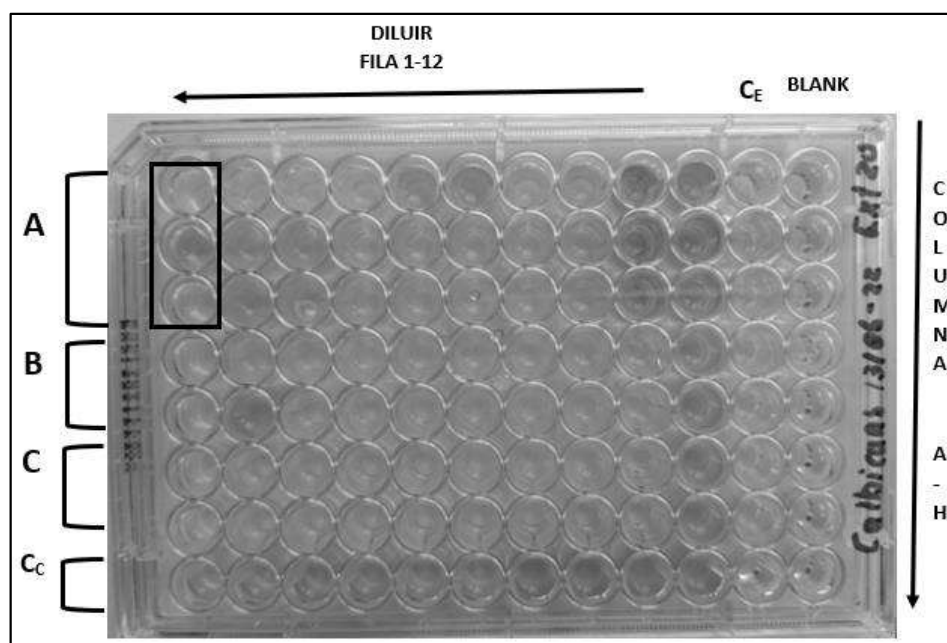


Figura 38. Microplaca de *Candida albicans* con extracto etanólico 20% con colorante TTC 1% incubada en un lapso de 24 horas. Blank: blanco, (C_E): control negativo, (C_C): control positivo, A: extractos, B: Antimicótico, C: control natural.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

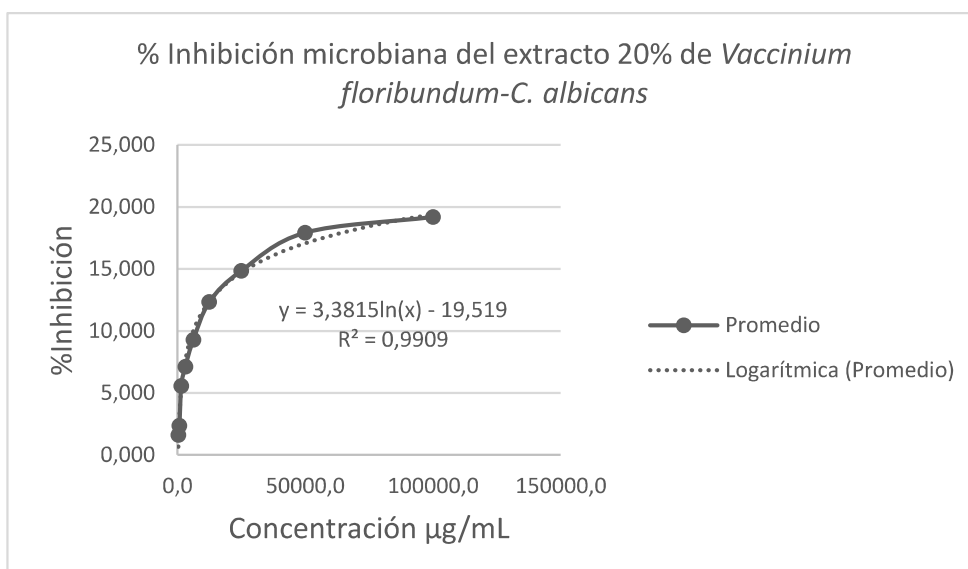


Figura 39. Representa el comportamiento microbiano del extracto alcohólico al 20% de *Vaccinium floribundum* versus *Candida albicans*.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

En la Tabla 13 se detalla el valor obtenido para la concentración mínima inhibitoria y el porcentaje de inhibición del extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 20% que posee sobre *Candida albicans*, siendo 390,6 µg/mL y 1,63%, de inhibición. En la figura 39 podemos observar el comportamiento del extracto etanólico al 20% contra *Candida albicans*, infiriendo que, a mayor concentración de extracto, será mayor la inhibición del microorganismo.

TABLA 14. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 50% contra *Candida albicans*.

Concentración extracto (µg/mL)	Absorbancia del Control de Crecimiento (Cc)	Promedio absorbancias a 450 nm	% inhibición	Desviación estándar
390,6	1,963	1,236	37,052**	0,206
781,3	1,752	1,042	40,525	3,908
1562,5	1,873	1,152	38,494	2,919
3125,0	1,817	0,938	48,376	4,609
6250,0	1,575	0,798	49,312	3,977
12500,0	1,784	0,860	51,775	1,296
25000,0	1,873	0,846	54,832	6,292

50000,0	1,913	0,881	53,947	4,393
100000,0	1,725	0,802	53,488	3,813

Nota: Los asteriscos representan* Concentración Mínima Inhibitoria, ** Porcentaje de inhibición.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

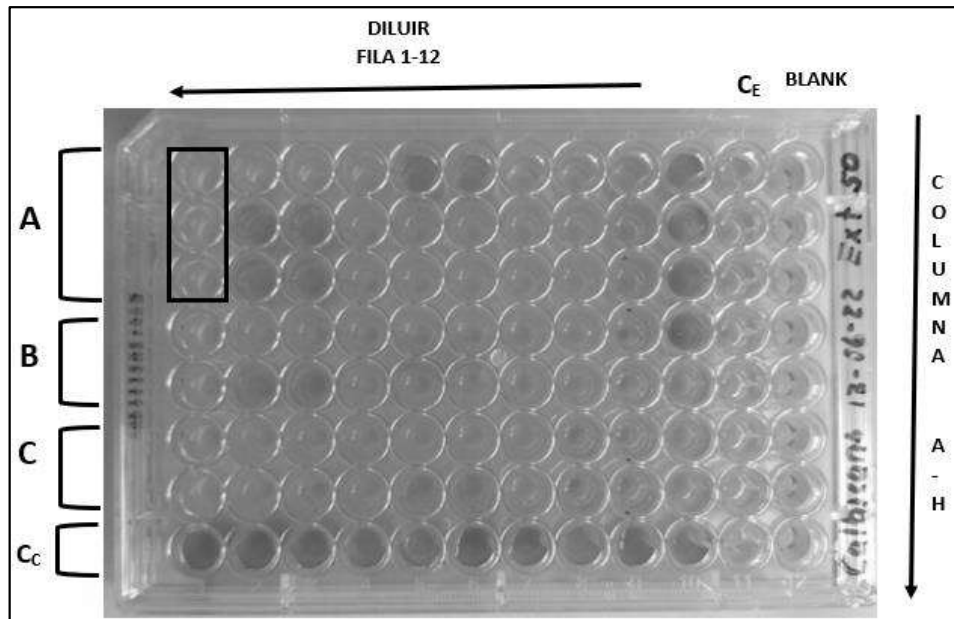


Figura 40. Microplaca de *Candida albicans* con extracto etanólico 50% con colorante TTC 1% incubada en un lapso de 24 horas. Blank: blanco, (C_E): control negativo, (C_C): control positivo, A: extractos, B: Antimicótico, C: control natural.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

TABLA 15. Porcentaje de inhibición y CMI de los extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) y controles establecidos frente a *Candida albicans*.

Microorganismo	Extracto 20%		Extracto 50%		Timol			Fluconazol		
	CMI (µg/mL)	% Inh	CMI (µg/mL)	% Inh	CMI (µg/mL)	% Inh	Desviación estándar	CMI (µg/mL)	% Inh	Desviación estándar
<i>C. albicans</i>	390,63	1,63	390,63	37,05	3,91	21,85	2,24	0,78	23,59	4,43

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Comparando los datos obtenidos para la concentración mínima inhibitoria y el porcentaje de inhibición de los extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 20 y 50% frente a *Candida albicans*, se evidencia que el extracto etanólico de concentración al 50% presenta mayor porcentaje de inhibición respecto al extracto de concentración al 20% de etanol, mientras que el porcentaje de inhibición que presenta el control comercial fluconazol es superior a los demás agentes antimicrobianos ensayados; la concentración mínima inhibitoria a la que fluconazol actúa sobre *Candida albicans*, es a 0,78 µg/mL, es decir que es altamente sensible a este antimicótico.

Wen, y otros (2011), en su estudio con extractos etanólicos de cuatro plantas utilizadas en la medicina tradicional peruana frente a la actividad patógena de hongos en el ser humano, principalmente de *Candida albicans*, se reportan resultados para la MIC entre 16 y 128 µg/mL, atribuyendo la actividad antimicótica al compuesto 3'-formil-2',4',6'- trihidroxidihidrochalcona presente en el extracto etanólico 96° de *Psidium acutangulum*, considerándolo efectivo para el control de crecimiento de este microorganismo. En la investigación realizada por Clancy, Yu, Morris, Snyderman, & Nguyen (2005), para la determinación de la concentración mínima a la que el fluconazol inhibe el crecimiento de *Candida albicans*, se determinó que el tiempo de aplicación del antimicótico juega un papel inicial,

obteniendo 0,25 µg/mL de concentración de fluconazol a las 24 horas y 0,5 µg/mL a las 48 horas. Con base en los estudios antes mencionados, se puede corroborar que el antimicótico utilizado y los extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño), presentan fuerte actividad antimicótica contra *Candida albicans*.

Resumen del Porcentaje de inhibición que presenta cada uno de los extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 20 y 50% frente a diferentes microorganismos tal como se observa en la figura 42.

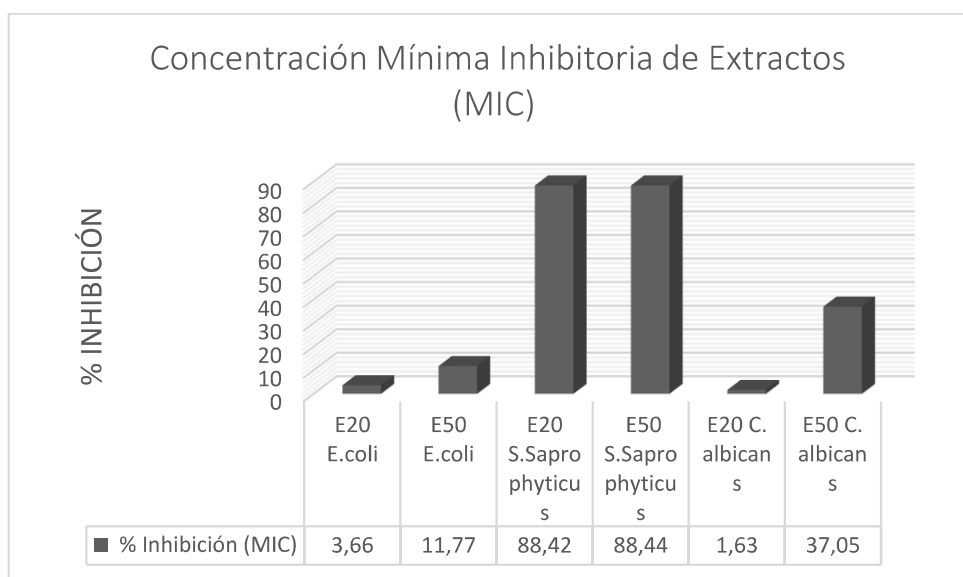


Figura 42. Porcentaje de Inhibición de *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Candida albicans* por extractos etanólicos *Vaccinium floribundum* a concentraciones de 20 y 50%.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Los extractos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) ensayados presentan mayor inhibición para la bacteria gram positiva *Staphylococcus saprophyticus*, es decir, que esta bacteria presenta mayor sensibilidad, como se puede evidenciar en gráfica de barras en figura 42; esto puede deberse a que la formación de su membrana citoplasmática, permite que los agentes antimicrobianos ingresen y destruyan la membrana celular, provocando la salida del citoplasma, por el contrario, la baja susceptibilidad que presenta *Escherichia coli* frente a los extractos etanólicos de

mortiño, se debe a que posee una membrana externa gruesa formada por lipopolisacáridos, cuya función es servir como barrera hidrofóbica, impidiendo el paso de sustancias antibacterianas y, además, posee enzimas en el espacio periplasmático que modifica las sustancias que han ingresado desde el exterior (Grande, Aranga, Flórez, & Araujo, 2020). También se puede inferir que el extracto de concentración al 50% tiene mayor efectividad para inhibir el crecimiento de los microorganismos inoculados en estos ensayos, debido a que la polaridad del etanol utilizado para la obtención de los extractos fluidos, permiten el arrastre de los compuestos bioactivos que presentan la propiedad antimicrobiana (Soto & Rosales, 2016).

El timol, componente principal de *Thymus vulgaris* considerado uno de los antibióticos naturales más representativos, presentó una MIC de 3,91 µg/mL frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus* y *Candida albicans*, mientras que el porcentaje de inhibición que se obtuvo para *Escherichia coli* fue de 10,95%; para *Staphylococcus sparophyticus* fue de 87,42% y para *Candida albicans* fue de 21,85%, como se detalla en la Tabla 9, 12 y 15; concluyendo que el timol posee acción antimicrobiana natural. Esto se debe principalmente a procesos sinérgicos entre componentes químicos que producen inhibición microbiana alrededor de 50 mg/L, 250 mg/L y 1000 mg/L. En el caso de la sinergia entre el carvacrol y el timol contra *Escherichia coli*, ocasiona la desintegración de la membrana externa del microorganismo, a concentraciones cercanas a las mínimas inhibitorias, lo que representa un efecto positivo en la disminución de la propagación bacteriana (García & Palou, 2008). Los resultados de porcentaje de inhibición obtenidos en esta investigación, corroboran también que este componente natural posee actividad antimicrobiana.

SEPARACIÓN DE COMPUESTOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA (TLC)

Para determinar la separación y presencia de los compuestos químicos en el extracto de *Vaccinium floribundum* (mortiño) se siguió la metodología descrita en la Figura 26 y 27. Las placas cromatográficas obtenidas fueron las siguientes:

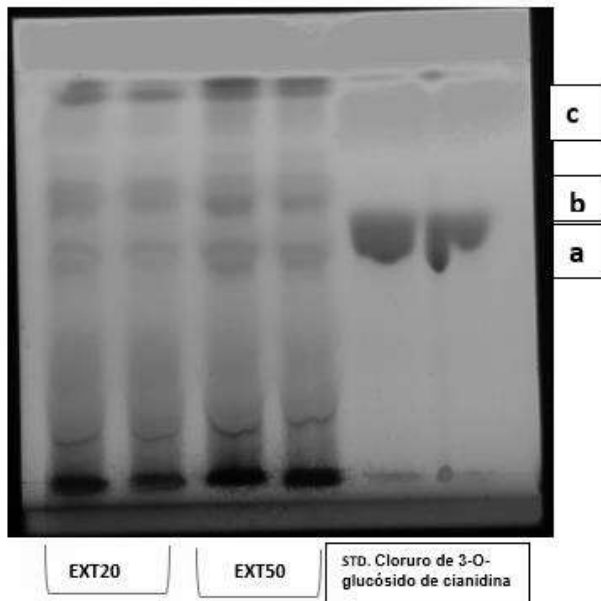


Figura 43. Placa HPTLC factor 254nm 10x10cm con componentes separados de los extractos etanólicos al 20% (EXT 20) y 50% (EXT 50) de *Vaccinium floribundum* (mortiño) respectivamente. Longitud de onda de lectura de placa: 254nm.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

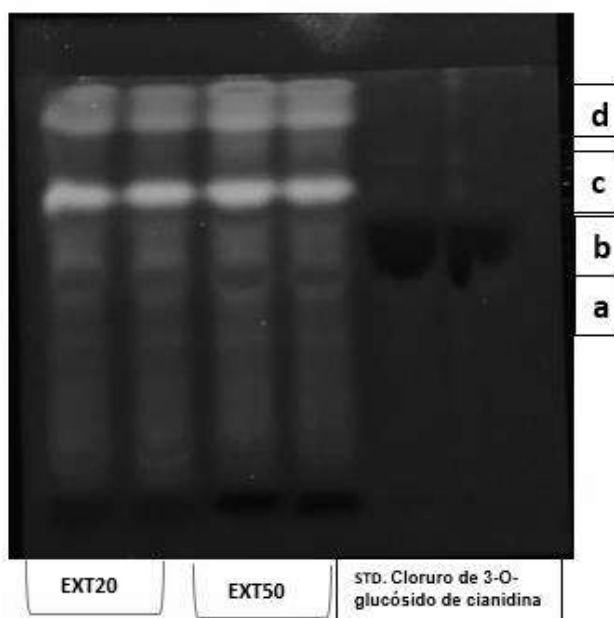


Figura 44. Placa HPTLC factor 254nm 10x10cm con componentes separados de los extractos etanólicos al 20% (EXT 20) y 50% (EXT 50) de *Vaccinium floribundum* (mortiño) respectivamente. Longitud de onda de lectura de placa: 365nm.

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Una vez culminado el proceso se determina los factores de retención relacionando la distancia recorrida por el compuesto y distancia recorrida por el disolvente (Figura 15). Los resultados se reportan en la Tabla 16 y 17:

TABLA 16. Identificación de antocianinas y antocianidinas presentes en los extractos etanólicos al 20% y 50% en *Vaccinium floribundum* (mortiño) a longitud máxima de 254 nm (véase Figura 43).

Fracción	Compuesto	$\lambda_{\text{máx}}$ nm	Rf (Factor de retención)
A	Cianididina 3-O-glucósido	254	0,42
B	Malvidina	254	0,62
C	Cianidina	254	0,86

Elaborado por: Las Autoras (2022).

TABLA 17. Identificación de antocianinas y antocianidinas presentes en los extractos etanólicos al 20% y 50% en *Vaccinium floribundum* (mortiño) a longitud máxima de 365 nm (véase Figura 44).

Fracción	Compuesto	$\lambda_{\text{máx}}$ nm	Rf (Factor de retención)
A	Cianidina 3- galactósido	365	0,39
B	Cianidina 3- arabinósido	365	0,51
C	Malvidina	365	0,67
D	Cianidina	365	0,86

Elaborado por: Las Autoras (2022).

Al respecto de los resultados obtenidos, los factores de retención pueden variar por las diferentes longitudes de onda máxima a las cuales se identifican los compuestos, en el caso de las antocianinas y antocianidinas: Cianidina 3- galactósido, cianidina 3- arabinósido y malvidina de la Tabla 17, éstos tienen valores similares a los

estudios en género *Vaccinium* (arándanos) con extractos metanólicos y compuestos hidrolizados descrito por Filip, Vlassa, Copaciu, & Coman (2012).

Acorde a los resultados de la Tabla 17 los compuestos fueron identificados como: cianidina 3- galactósido, cianidina 3- arabinósido, malvidina y cianidina en la especie *Vaccinium floribundum* (mortiño), tal como corrobora Taco (2017).

Mientras que el estándar cianididina 3-O-glucósido disuelto en metanol 2mg/1mL presentó un factor de retención de 0,42, valores similares reportó (Narvárez, 2016) en la especie *Vaccinium floribundum* (mortiño).

Otros principios bioactivos interesantes no detectados en la placa HPTLC fueron delfinidina y pelargonidina, que se encuentra a longitudes de onda entre 520 - 546 nm, y de 10 a 15 nm de las longitudes de onda descritas se pueden distinguir sus respectivos monoglucósidos. Como factores adicionales que pueden alterar la identificación de las antocianinas son la naturaleza del solvente y pH, entonces la acidificación de los extractos con HCl es importante ya que se dará un cambio sistemático dirigido a obtener longitudes de ondas más altas en comparación a extractos acuosos (Filip, Vlassa, Copaciu, & Coman, 2012), cabe recalcar que la solubilidad de las antocianinas inmersas en alcohol aumenta cuando se añade ácido clorhídrico estables (Eng, Azlan, Teng, & Meng, 2017).

6. CONCLUSIONES

El extracto etanólico de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 50% en un volumen de 100mL, presentó mejores resultados respecto a la cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu de 621,04 mg AG/mL y la determinación de antocianinas por el método de pH diferencial se obtuvo 43,63mg/L.

Ambos extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) presentaron mayor concentración mínima inhibitoria (MIC) y mayor porcentaje de inhibición frente a la bacteria *Staphylococcus saprophyticus*, consiguiendo una MIC de 390,63 µg/mL, y en relación al porcentaje de inhibición, para el extracto al 20 % se obtuvo 88,42% de inhibición, mientras que para el extracto al 50 % se alcanzó un 88,44% de inhibición, resultados que fueron superiores en comparación a los logrados frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

Se separó e identificó compuestos bioactivos antociánicos en el extracto etanólico al 20% y 50% en la especie *Vaccinium floribundum* (mortiño) los cuales fueron: cianidina 3- arabinósido Rf 0,51, cianidina 3- galactósido Rf 0,39, malvidina Rf 0,67 y cianidina Rf 0,86.

En el presente estudio se validó que los extractos etanólicos de *Vaccinium floribundum* (mortiño) al 20 y 50%, sí presentan actividad antimicrobiana con miras a la prevención de enfermedades de las vías urinarias.

Se recomienda continuar con los estudios, utilizando técnicas analíticas, efectivas, sensibles y reproducibles como Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC), con cada uno de los componentes químicos separados e identificados en la presente investigación.

REFERENCIAS

- Aaby, K., Grimmer, S., & Holtung, L. (Noviembre de 2013). Extraction of phenolic compounds from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) press residue: Effects on phenolic composition and cell proliferation. *LWT - Food Science and Technology*, 54(1), 257-264. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4026347/>
- Ahmed, S., Shariq, A., Alsalloom, A., Babikir, I., & Alhomoud, B. (04 de 2019). Uropathogens and their antimicrobial resistance patterns: Relationship with urinary tract infections. *International Journal of Health Sciences*, 13(2), 48-55. doi:ISSN 1658-3639
- Assadian, O., Wehse, K., Hübner, N., Koburger, T., Bagel, S., Jethon, F., & Kramer, A. (15 de Diciembre de 2011). Minimum inhibitory (MIC) and minimum microbicidal concentration (MMC) of polihexanide and triclosan against antibiotic sensitive and resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains. *GMS Krankenhhyg Interdiszip.*, 6(1), 1-7. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3252646/pdf/KHI-06-06.pdf>
- Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Revista Reduca serie Fisiología Vegetal*, 2(3), 119-145. doi:ISSN: 1989-3620
- Baenas, N., Ruales, J., Moreno, D., Barrio, D., Stinco, C., Martínez, G., . . . García, A. (17 de 10 de 2020). Characterization of Andean Blueberry in Bioactive Compounds, Evaluation of Biological Properties, and In Vitro Bioaccessibility. *Journal Foods*, 9, 4-16. doi:<https://doi.org/10.3390/foods9101483>
- Barón, F., García, J., & León, L. (2019). Complicaciones Renales y Urológicas. En *Guía de Práctica Clínica en Cuidados Continuos* (págs. 169-185). Sociedad Española de Oncología Médica. Obtenido de <https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/sociosyprofs/documentacion/manuales/practicaclinica/cap8.pdf>
- Bertó, R. (09 de julio de 2015). *Staphylococcus aureus en la industria alimentaria*. Obtenido de BETELGEUX: <https://www.betelgeux.es/blog/2015/07/09/staphylococcus-aureus-en-la-industria-alimentaria/#:~:text=Su%20crecimiento%20se%20desarrolla%20entre,imposible%20erradicarlo%20del%20medio%20ambiente.>
- Canales Peña, D., Carazo Luna, L., & Centeno, J. (2011). En *DETERMINACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA HOJA SECA DE LA ESPECIE VEGETAL CORDIA INERMIS MEDIANTE TAMIZAJE FITOQUÍMICO* (pág. 21). León, Nicaragua: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA. FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS. ESCUELA DE FARMACIA. Obtenido de <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/01/877161/determinacion-de-los-metabolitos-secundarios-de-la.pdf>
- Canet, J. (19 de enero de 2016). *Escherichia Coli: características, patogenicidad y prevención (I)*. Obtenido de BETELGEUX:

- <https://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>
- Capozzi, E., Mobili Rocaro, D., Kornett, A., & Perdomo, M. (Junio de 2016). Agentes etiológicos de infecciones urinarias en adultos mayores de un centro de salud del estado Carabobo, Venezuela. *KASMER*, 44(1), 35 - 43. Obtenido de <https://ve.scielo.org/pdf/km/v44n1/art06.pdf>
- Caranqui, J., Erazo, N., Guilcapi, E., & Noboa, V. (11 de 05 de 2022). Estudio de vegetación asociada de *Vaccinium floribundum* Kunth en una localidad de páramo y de bosque montano alto perturbado en la provincia de Chimborazo. *Revista Polo de conocimiento*, 7(5), 648-660. doi:10.23857/pc.v7i5.3986
- Carrión, A., & García, C. (2010). En "PREPARACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES: DETERMINACIÓN DE EFICIENCIA DE METÓDICA" (págs. 26-36). Cuenca: Repositorio Universidad de Cuenca. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/2483>
- Cavalcanti, R., Santos, D., & Meirles, M. (marzo de 2011). Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems—An overview. *Food Research International*, 44(2), 499-509. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.007>
- Clancy, C., Yu, V., Morris, A., Snyderman, D., & Nguyen, H. (agosto de 2005). Fluconazole MIC and the Fluconazole Dose/MIC Ratio Correlate with. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, 49(8), 3171–3177. doi:10.1128/AAC.49.8.3171–3177.2005
- Coba, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M., Yugsi, E., & Huachi, L. (14 de 12 de 2012). ESTUDIO ETNOBOTÁNICO DEL MORTIÑO (*Vaccinium floribundum*) COMO ALIMENTO ANCESTRAL Y POTENCIAL ALIMENTO FUNCIONAL. *Revista La Granja*, 16(2), 5-13. doi:ISSN: 1390-3799
- Cobo, M. (2014). En *Estudio de Diversidad Genética de Mortiño (Vaccinium floribundum Kunth.) en tres Provincias de la Sierra Ecuatoriana: Imbabura, Pichincha y Cotopaxi*. (págs. 1-3). Quito, Pichincha, Ecuador : Repositorio Universidad San Francisco de Quito. Obtenido de <http://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/3332>
- Condalab. (22 de 07 de 2019). Recuperado el 23 de 08 de 2022, de [condalab.com](http://www.condalab.com): <http://www.condalab.com>
- Cortez, J., Faicán, M., Pirovani, M., & Piagentini, A. (10 de 12 de 2018). Determinación de polifenoles en frutas con vitamina C incorporada: Metodología para mejorar la especificidad del ensayo de Folin-Ciocalteu. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 19(2), 813-818. doi:ISSN: 1665-0204
- Corzo, A. (2019). En *TÉCNICAS DE ANÁLISIS EN QUÍMICA ORGÁNICA. CROMATOGRAFÍA* (Vol. 1, págs. 9-14). Santiago del Estero, Argentina: Universidad Nacional de Santiago del Estero - UNSE. Facultad de Ciencias Forestales. Obtenido de <https://fcf.unse.edu.ar/archivos/series-didacticas/SD-44-Cromatografia-CORZO.pdf>
- de Cueto, M. (2011). LA MICROBIOLOGÍA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN DEL TRACTO URINARIO. En C. Pigrau (Ed.), *INFECCIÓN DEL TRACTO URINARIO* (pág. 11). Sevilla, España: SALVAT. Obtenido de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/otrosdeinteres/seimc-dc2013-LibroInfecciondeltractoUrinario.pdf>

- De León, J., Ovadía, R., Vásquez, L., & Fainsod, T. (Mayo de 2009). El arándano y su aplicación en urología. *Revista Mexicana de Urología*, 69(3), 104-107. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-mexicana-urologia-302-articulo-el-arandano-su-aplicacion-urologia-X2007408509495333>
- Eng, H., Azlan, A., Teng, S., & Meng, S. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Revista FOOD & NUTRITION RESEARCH*, 61(1), 1-21. doi:10.1080/16546628.2017.1361779
- Fariña, N., Sanabria, R., Figueredo, L., Ramos, L., & Samudio, M. (2005). Staphylococcus saprophyticus como patógeno urinario. *Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de Asunción*, 3(1), 31 - 33. Obtenido de <file:///C:/Users/hp/Downloads/admin,+368-1312-1-PB.pdf>
- Fernández, A. (2008). Aplicaciones fitoterapéuticas del arándano rojo. Prevención de las infecciones del tracto urinario. *ÁMBITO FARMACEUTICO. Fitoterapia*, 27(9), 71-78. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13127385>
- Fernández, F., López, J., Ponce, L., & Machado, C. (2003). RESISTENCIA BACTERIANA. *Rev Cubana Med Militar*, 32(1), 44-48. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/mil/v32n1/mil07103.pdf>
- Fica, A. (2004). Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. *Rev Chil Infect*, 21(1), 26 - 38. Obtenido de <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v21n1/art04.pdf>
- Filip, M., Vlassa, M., Copaciu, F., & Coman, V. (2012). Identification of Anthocyanins and Anthocyanidins from Berry Fruits by Chromatographic and Spectroscopic Techniques to Establish the Juice Authenticity from Market. *Journal of Planar Chromatography*, 25(6), 534–541. doi:DOI: 10.1556/JPC.25.2012.6.8
- García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2020). DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU. Obtenido de UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALENCIA, DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/52056/Garcia%20Mart%C3%ADnez%20et%20al.pdf?sequence=1>
- García, J., Cantón, R., García, J., Gómez, M., Martínez, L., Rodríguez, C., & Vila, J. (2000). MÉTODOS BÁSICOS PARA EL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIMICROBIANOS. (J. Picazo, Ed.) Obtenido de Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- García, R., & Palou, E. (15 de 09 de 2008). Mecanismos de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés alimenticio. *Temas selectos de Ingeniería en alimentos*, 2(2), 41-51. Obtenido de <https://tsia.udlap.mx/mecanismos-de-accion-antimicrobiana-de-timol-y-carvacrol-sobre-microorganismos-de-interes-en-alimentos/>
- García, R., Panizo, N., Proy, B., García, P., & Fernández, A. (2020). Infección del tracto urinario en la enfermedad renal crónica. *Revista Colombiana de Nefrología*, 7(1), 70-83. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcnef/v7n1/2500-5006-rcnef-7-01-70.pdf>
- Garrote, A. (Septiembre de 2002). MICOSIS CUTÁNEA. *OFFARM*, 21(8), 82-90. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13035868>

- Garza, M., Treviño, P., & De la Garza, L. (2018). Resistencia bacteriana y comorbilidades presentes en pacientes urológicos en pacientes ambulatorios con urocultivos positivos. *Revista médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 56(4), 347-353. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2018/im184f.pdf>
- Giusti, M., & Wrolstad, R. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. En *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. Current Protocols. Obtenido de <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471142913.faf0102s00>
- González, C., Cabezas, M., Pulido, V., & Celis, X. (27 de 08 de 2020). Amaryllidaceae: Potential Source of Alkaloids. Biological and Pharmacological Activities. *Revista Ciencia y Agricultura*, 17(3), 78-94. doi:<https://doi.org/10.19053/01228420.v17.n3.2020.11379>
- Gordo, M., & Alonso, D. (2018). Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 81-104. doi:<https://doi.org/10.22490/21456453.1968> |
- Grace, M., Esposito, D., Dunlap, K., & Lila, M. (07 de mayo de 2015). Comparative Analysis of Phenolic Content and Profile, Antioxidant Capacity and Anti-inflammatory Bioactivity in Wild Alaskan and Commercial Vaccinium Berries. *HHS Author Manuscripts*, 62(18), 4007–4017. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4026347/pdf/nihms-542601.pdf>
- Grande, C., Aranga, C., Flórez, E., & Araujo, L. (13 de Noviembre de 2020). Determinación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de residuos de mora (*Rubus glaucus* Benth). *Informador Técnico*, 85(1), 64-82. Obtenido de https://revistas.sena.edu.co/index.php/inf_tec/article/view/2932/3802
- Guerra, A. (2005). En *Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (phlebodium pseudoaureum) a nivel de laboratorio* (págs. 20-70). Guatemala, Guatemala: Repositorio Universidad de San Carlos de Guatemala. Obtenido de http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0951_Q.pdf
- Guerra, M., & Ortega, G. (08 de 2006). Separación, caracterización estructural y cuantificación de antocianinas mediante métodos químicofísicos. Parte I. *Revista Redalyc ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 40(2), 35-44. doi:ISSN: 0138-6204
- Guerrero, A. (2019). En *Caracterización de compuestos bioactivos: Físicos y químicos del fruto (Vaccinium floribundum Kunth) en la Sierra del Ecuador para uso Agroindustrial*. (págs. 7-10). Quito, Ecuador : Repositorio de la Universidad de las Américas. Obtenido de <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/10702>
- Gutiérrez, D., Ortiz, C., & Mendoza, A. (24 de octubre de 2008). *Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal*. Obtenido de Universidad Autónoma de Querétaro, Centro Nacional de Metrología: https://www.cenam.mx/simposio2008/sm_2008/memorias/M2/SM2008-M220-1108.pdf

- Hemeg, H., Moussa, I., Ibrahim, S., Dawoud, T., Alhaji, J., Mubarak, A., . . . Marouf, S. (13 de 08 de 2020). Antimicrobial effect of different herbal plant extracts against different microbial population. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27, 3221-3227. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.08.015>
- Heras, I., Alvis, A., & Arrazola, G. (26 de 05 de 2013). Optimización del Proceso de Extracción de Antocianinas y Evaluación de la Capacidad Antioxidante de Berenjena (Solana melonera L.). *Revista Información Tecnológica*, 24(5), 93-102. doi:10.4067/S0718-07642013000500011
- IDEX. (01 de 06 de 2022). Obtenido de www.idexx.es: <https://www.idexx.es/files/mic-gui%CC%81a-microbiolo%CC%81gica-es.pdf>
- Imam, T. H. (febrero de 2020). *Infección renal (Pielonefritis)*. Obtenido de Manual MSD versión para público general: <https://www.msmanuals.com/es-es/hogar/trastornos-renales-y-del-tracto-urinario/infecciones-urinarias-iu/infecci%C3%B3n-renal>
- Instituto Nacional de Estadística y Censos. (2019). *Ecuadorencifras*. Recuperado el 04 de junio de 2022, de Registro Estadístico de Camas y Egresos Hospitalarios: https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_Sociales/Camas_Egresos_Hospitalarios/Cam_Egre_Hos_2019/Boletin%20tecnico%20ECEH_2019.pdf
- Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. (12 de mayo de 2021). *Candida albicans*. Obtenido de INSST - Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo Madrid: <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/candida-albicans#efectos0>
- Komp, P., Klockars, O., Malmberg, C., & Cars, O. (15 de 12 de 2014). Pharmacodynamic studies of nitrofurantoin against common uropathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1076–1082. doi:10.1093/jac/dku494
- Llerena, W., Samaniego, I., Ramos, M., & Brito, B. (10 de 11 de 2004). Caracterización físicoquímica y funcional de seis frutas tropicales y andinas ecuatorianas. *Revista de Alimentos Ciencia e Ingeniería*, 22(2), 13-22. Obtenido de <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/3279/1/iniapscCD68.pdf>
- Lluisaca, S., Manzano, P., Ruales, J., Flores, J., Mendoza, J., Peralta, E., & Cevallos, J. (Junio de 2018). Chemical, antimicrobial, and molecular characterization of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) fruits and leaves. *Food Science & Nutrition*, 6(4), 934–942. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6021730/>
- Loyola, V., Sánchez, P., Canto-Caché, B., Gutiérrez, L., Galaz, R., & Moreno, O. (01 de 2004). Biosíntesis de los alcaloides indólicos. Una revisión crítica. *Scielo Revista de la Sociedad Química de México*, 48, 67-94. doi:ISSN 0583-7693
- MAE. (2013). En *Sistema de Clasificación del Ecosistemas del Ecuador Continental* (págs. 134-136). Quito: Subsecretaría de Patrimonio Natural. Obtenido de <http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PDOT/NIVEL%20NACIONAL/MAE/ECOSISTEMAS/DOCUMENTOS/Sistema.pdf>
- Malbrán, C. (2012). *METODO DE DETERMINACION DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DILUCION* (Vol. 32). Clinical and Laboratory Standards Institute. Obtenido de <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>

- Martínez, N., Arévalo, K., Verde, M., Rivas, C., Oranday, A., Núñez, M., & Morales, M. (29 de agosto de 2011). Antocianinas y actividad anti radicales libres de *Rubus adenotrichus* Schltdl (zarzamora). *REVISTA MEXICANA DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS*, 42(4), 66-71. Obtenido de <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v42n4/v42n4a7.pdf>
- Medina, L. (2016). En *LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA Y FARMACOBOTANICA DE LA FACULTAD DEFARMACIA Y BIOQUIMICA* (págs. 22-28). Trujillo: Repositorio de la Universidad Nacional de Trujillo. Obtenido de <https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4193/Medina%20Zumaran%20Lorenzo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ministerio de Salud Pública. (2013). *Infección de vías urinarias en el embarazo, guía de práctica clínica*. Quito, Pichincha, Ecuador: El Telégrafo. Obtenido de <https://aplicaciones.msp.gob.ec/salud/archivosdigitales/documentosDirecciones/dnn/archivos/GPC%20IVU%20Y%20TRASTORNOS%20HIPERTENSIVO%20EMBARAZO.pdf>
- Muñoz, V. (2004). En *Determinación de métodos para producción de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth.), con fines de propagación y producción comercial* (págs. 1-3). Quito, Pichincha, Ecuador: Repositorio Universidad San Francisco de Quito. Obtenido de <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/864/1/75820.pdf>
- Narváez, G. (2016). *Estabilización de las antocianinas presentes en el fruto de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) mediante el método de copigmentación intermolecular para la obtención de pigmentos antocianínicos de aplicación en la industria farmacéutica y cosmética*. Quito: Universidad Central del Ecuador. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/13174/1/T-UCE-0008-QF010-2016--.pdf>
- Neri, E., Celis, C., de León, S., Gutiérrez, P., Kunhardt, E., Rosenfield, O., Velázquez, P. (noviembre de 2009). El jugo de arándano y su papel en las infecciones de las vías urinarias. *Ginecología y Obstetricia de México*, 77(11), 512 - 517. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/ginobs/mex/gom-2009/gom0911e.pdf>
- Nör, D., Cruz, J., Mendy, N., Raspanti, G., & Hernández, R. (mayo de 2013). *Fosfomicina, Tratamiento de enfermedades por enterobacterias multiresistentes*. Obtenido de Comisión de Farmacia y Terapéutica del Hospital El Cruce: <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2019/07/1006116/tratamiento-de-enfermedades-por-enterobacterias.pdf>
- Ojito, K., & Portal, O. (2017). En *Metabolitos secundarios de las Plantas, una alternativa para el manejo de enfermedades en cultivos de interés económico* (págs. 1-15). Cuba: Editorial Académica Española. doi:ISBN:978-620-2-25008-5
- Panizo, M., & Reviákina, V. (julio de 2001). Candida albicans y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 21(2), 38 - 45. Obtenido de https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000200011
- Paré, A. (17 de marzo de 2011). *Vademecum Nitrofurantoína*. Obtenido de <https://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/n028.htm>
- Paredes, H. (2018). En *Cuantificación de antocianinas por el método de pH diferencial del fruto de la uva Isabella (Vitis labrusca) procedente del distrito de San*

- Antonio de Cumbaza* (págs. 32-33). Tarapoto, Perú: Repositorio Digital de Ciencia, Tecnología e Innovación de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de San Martín. Obtenido de <https://repositorio.unsm.edu.pe/bitstream/handle/11458/3125/FIAI%20-%20Hanower%20Smith%20Paredes%20Tuanama.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Paredes, F., & Roca, J. (marzo de 2004). Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *OFFARM*, 23(3), 116 - 124. Obtenido de <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-pdf-13059414>
- Pássaro, C., Rivera, C., Román, M., Cardona, L., Muñoz, L., Gómez, D., . . . Rojas, L. (2016). En *GUÍA SOBRE PRINCIPIOS BÁSICOS DE CROMATOGRAFÍA Y SUS APLICACIONES* (págs. 11-19). Antioquia, Colombia: SERVICIO NACIONAL DE APRENDIZAJE - SENA. Obtenido de https://repositorio.sena.edu.co/bitstream/handle/11404/4694/guia_cromatograf%EDa.pdf;jsessionid=C71BF2B079B04C065D8745696B7BBE1C?sequence=1
- Pérez, B., Endara, A., Garrido, J., & Ramírez, L. (23 de 11 de 2020). Extraction of anthocyanins from Mortiño (*Vaccinium floribundum*) and determination of their antioxidant capacity. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 1(74), 9453-9460. doi:10.15446/rfnam.v74n1.89089
- Pérez, S., & Valdivieso, C. (2007). En *COLECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA In situ DEL MORTIÑO (Vaccinium floribundum Kunt) EN LA SIERRA NORTE DE ECUADOR* (págs. 23-43). Quito, Pichincha, Ecuador : Repositorio de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2585/1/T-ESPE-IASA%20I-003248.pdf>
- Poole, C. (2015). En *Instrumental Thin-Layer Chromatography* (1ra ed., págs. 488-489). Detroit USA: Elsevier. doi:ISBN: 9780124172845
- Ramos, C., Telechea, H., Araújo, L., & Vignoli, R. (Diciembre de 2016). *Nitrofurantoína macrocristales para el tratamiento empírico de la cistitis aguda no complicada en mujeres*. Obtenido de Departamento de Farmacología y Terapéutica HOSPITAL DE CLÍNICAS "Dr. Manuel Quintela": https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/11061/1/nitrofurantona_macrocrisales.pdf
- Rengifo, D. E. (2013). *Prevalencia de las Infecciones Genitourinarias en mujeres de 14 a 49 años de edad, en el Hospital Delfina Torres y Área 1 de la Provincia de Esmeraldas, de enero a agosto de 2013 y evaluación de su manejo clínico terapéutico*. Tesis de Pregrado, Esmeraldas. Obtenido de <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/2761/1/108831.pdf>
- Rivas, C., Oranday, M., & Verde, M. (2016). En *Investigación en plantas de importancia médica* (págs. 9-20). Nuevo León, México : Omniscience. Obtenido de <https://books.google.com.ec/books?id=8kgcDQAAQBAJ&lpg=PP1&dq=extracto%20vegetales%20libro&pg=PR3#v=onepage&q=extractos%20vegetales%20libro&f=false>
- Rodriguez, D., Mena, A., Marszalek, J., & De la Fuente, N. (2019). Determinación preliminar del potencial bioterapéutico de nanopartículas de quitosano plus extracto de *Prosopis* contra *Candida albicans*. *Investigación y Desarrollo en*

- Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4, 225 -229. Obtenido de <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume4/4/2/31.pdf>
- Roldán, S. (2012). En *Caracterización Funcional, molecular y estudio del comportamiento Postcosecha del mortiño (Vaccinium Floribundum Kunth) de la Comunidad de Quinticusig del Cantón Sigchos de la Provincia de Cotopaxi*. (págs. 3-13). Quito, Pichincha, Ecuador: Repositorio Escuela Politécnica Nacional. Obtenido de <https://1library.co/document/yj7we35y-caracterizacion-molecular-funcional-comportamiento-vaccinium-floribundum-comunidad-quinticusig.html>
- Rosales, R. (2018). En *Determinación de la capacidad antimicrobiana de extractos de hongos endófitos de la Colección de Endófitos Quito- Católica (CEQCA) sobre cepas multirresistentes de Staphylococcus aureus* (págs. 13-20). Quito, Ecuador: Repositorio Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Obtenido de http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/15834/Tesis%20Katherine%20Rosales_%20FINAL_%202018.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Ruenroengklin, N., Zhong, J., Xuwu, D., Yang, B., Li, J., & Jiang, Y. (22 de 07 de 2008). Effects of Various Temperatures and pH Values on the Extraction Yield of Phenolics from Litchi Fruit Pericarp Tissue and the Antioxidant Activity of the Extracted Anthocyanins. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(7), 1333–1341. doi:10.3390/ijms9071333
- Ruiz, M. L. (agosto de 2020). *UNIVERSIDAD SIMÓN BOLIVAR*. Obtenido de GUIA DE LABORATORIO: CROMATOGRFÍA EN CAPA FINA Y EN COLUMNA: <https://bonga.unisimon.edu.co/bitstream/handle/20.500.12442/7984/Gu%C3%ADa%20de%20Cromatograf%C3%ADa%20en%20capa%20fina%20y%20por%20columna.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sánchez, J., Guillán, C., Fuster, C., Madrid, F., Jiménez, M., & García, J. (2003). SENSIBILIDAD MICROBIANA DE ESCHERICHIA COLI EN INFECCIONES URINARIAS EXTRAHOSPITALARIAS. *ACTAS UROLÓGICAS ESPAÑOLAS*, 27(10), 783 - 787. Obtenido de <https://scielo.isciii.es/pdf/aue/v27n10/783-787.pdf>
- Santacruz, C. (2017). En *Uso de pigmentos naturales de mortiño (Vaccinium floribundum) como sensibilizadores en celdas solares DSSC* (págs. 36-55). Quito, Pichincha, Ecuador: Repositorio Universidad Politécnica Nacional. Obtenido de <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/19011/3/CD-8408.pdf>
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K., & Yoga, L. (02 de 10 de 2010). Extracción, Aislamiento y Caracterización de Compuestos Bioactivos de Extractos de Plantas. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines: AJTCAM*, 8(1), 1-10. doi:PMC3218439
- Soto, M., & Rosales, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de Pinus durangensis y Quercus sideroxylla. *Maderas. Ciencia y tecnología*, 18(4), 701-714. Obtenido de <https://www.scielo.cl/pdf/maderas/v18n4/aop6116.pdf>
- Taco, M. (2017). En *Uso de pigmentos naturales de mortiño (Vaccinium floribundum) como sensibilizadores en celdas solares DSSC* (pág. 61). Quito, Ecuador :

- Repositorio Escuela Politécnica Nacional. Obtenido de <http://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/19011>
- Tropicos. (2022). Obtenido de Trópicos v3.3.2: <https://tropicos.org/name/12300488>
- UDLA. (2014). *CIENTÍFICOS REVELAN PROPIEDADES MÉDICAS DEL CHOCHO Y DEL MORTIÑO*. Obtenido de [udla.com.ec: https://www.udla.edu.ec/2014/11/cientificos-revelan-propiedades-medicas-del-chocho-y-del-mortino/](https://www.udla.edu.ec/2014/11/cientificos-revelan-propiedades-medicas-del-chocho-y-del-mortino/)
- Universitat de Valencia. (2006). *CUADERNILLO DE PRÁCTICAS DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*. Valencia, España: Universitat de Valencia. Obtenido de https://www.uv.es/inedfarm/gdocentesf_archivos/cuadernillo_de_practicas.pdf
- Urbano, C. (2016). En *VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES EN PRODUCTOS ELABORADOS CON TÉ VERDE POR MÉTODO COLORIMÉTRICO FOLIN CIOCALTEU*. (pág. 23). Cali: Repositorio Universidad ICESI. Obtenido de https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/81092/1/TG01524.pdf
- Urquiza, L. (2016). En *INFLUENCIA DE LOS SOLVENTES Y LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN EN LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LA ESPECIE "Disterigma alaternoides (Kunth) Nied." PLANTA NATIVA DEL ECUADOR*. (págs. 9-12). Quito, Pichincha, Ecuador: Repositorio Universidad Central del Ecuador. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/15012>
- Varela, S., & Musuña, A. (2020). En *EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIMICROBIANA IN VITRO DE CÁPSULAS DE EXTRACTO FLUIDO DE Vaccinium floribundum kunth (MORTIÑO); EN INFECCIONES AGUDAS DEL TRACTO URINARIO*. (págs. 13-30). Quito, Pichincha : Repositorio de la Universidad Politécnica Salesiana. Obtenido de <http://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/18427>
- Vega, D., Bernal, L., Villanueva, S., & Arenas, R. (febrero de 2015). Infecciones urinarias por Candida spp. Estudio de 29 pacientes en un hospital general. *Med Int Méx*, 31(1), 19 - 24. Obtenido de <https://www.medigraphic.com/pdfs/medintmex/mim-2015/mim151d.pdf>
- Velásquez, I. (2018). En *Efecto de tres cepas de levadura y dos tipos de mosto sobre las características físicas y químicas del vino a partir de mortiño (Vaccinium floribundum Kunth.)* (págs. 12-22). Quito, Pichincha , Ecuador: Repositorio Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Obtenido de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/15859/1/T-IASA%20I-005467.pdf>
- Verdecía, D., Herrera , R., Torres, E., Sánchez, A., Hernández , L., Herrera, L., . . . López, S. (01 de 03 de 2021). Metabolitos primarios y secundario de seis especies de árboles, arbustos y leguminosas herbáceas. *Journal Cuban Journal of Agricultural Science*, 5(1), 77-93. doi:ISSN 2079-3480
- Vilema, A. (2021). En *CARACTERIZACIÓN DE LOS HONGOS ASOCIADOS A LA RIZÓSFERA DE Vaccinium PÁRAMO DE G floribundum Kunth EN EL PÁRAMO DE G floribundum Kunth EN EL ANQUIS, PROVINCIA DE CHIMBORAZO* (pág. 4). Riobamba: Repositorio de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Obtenido de <http://dspace.espe.edu.ec/handle/123456789/15825>

- Wen, L., Haddad, M., Fernández, I., Espinoza, G., Ruiz, C., Neyra, E., . . . Rojas, R. (septiembre de 2011). Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana. Aislamiento de 3'-formil – 2',4',6' – trihidroxidihidrochalcona, principio activo de *Psidium acutangulum*. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 77(3), 199-204. Obtenido de http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2011000300005
- Yáñez, L. (2022). En *Compuestos fenólicos en plantas del Ecuador, revisión de propiedades y beneficios medicinales* (págs. 13-20). Quito, Pichincha, Ecuador: Repositorio Universidad Central del Ecuador. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/26414>
- Zapata, L., Heredia, A., Quinteros, C., Malleret, A., Clemente, G., & Cárcel, J. (11 de 2014). Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos. *Revista redalyc de Ciencia, Docencia y Tecnología*, 25(49), 166-192. doi:ISSN: 0327-5566
- Zboromyrska, Y., de Cueto López, M., Alonso-Tarrés, C., & Sánchez, V. (2019). ETIOLOGÍA DE LAS INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO. En R. C. Emilia Cercenado (Ed.), *Procedimientos en Microbiología Clínica. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario*. (págs. 6 - 8). Barcelona, España: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Micro-biología Clínica (SEIMC). Obtenido de <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento14a.pdf>