

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE – QUITO

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS
RECURSOS NATURALES**

Tesis previa a la obtención del título de:

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS
NATURALES**

TEMA:

**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y TÓXICA DEL
KUISHIP (*Jacaranda copaia*)”**

AUTORA:

GABRIELA ALEJANDRA ARMAS ARTEAGA

DIRECTOR:

Q.F. WILSON TAPIA

Quito, mayo de 2012

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD

Excepto cuando es explícitamente indicado en el texto, los conceptos desarrollados, análisis realizados y las conclusiones del presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de la autora como estudiante de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales; bajo la supervisión del profesor Wilson Tapia.

Quito, mayo 2012.

(f)

GABRIELA ARMAS

DEDICATORIA

Para mis padres Edison y Carmita, quienes me brindan su apoyo y amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mis abuelitos y a mis padres por estar junto a mi en todo momento y ser mis guías, a mi hermosa familia porque de una u otra manera llegaron hacer parte de esta aventura.

Mis sinceros agradecimientos a Wilson Tapia por su tiempo y su gran aporte brindado para la elaboración de esta tesis. A Pablo Coba, Christian Larenas, Diana Calero y Marco Cerna por su tiempo y colaboración para la ejecución de la misma.

A mis amigos y compañeros que en muchos momentos de mis estudios alentaron mis ilusiones y apoyaron mis decisiones.

A la Universidad Politécnica Salesiana que en el transcurso de mi carrera me proporcionó los conocimientos necesarios que me han permitido culminar con mi tesis de grado.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN.....	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
Tema.....	3
Hipótesis.....	3
Hipótesis alternativa.....	3
Hipótesis nula.....	3
Objetivos.....	4
Objetivo General.....	4
Objetivos Específicos.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	5
CAPÍTULO I	
1.- Marco Teórico.....	6
1.1- Kuiship (<i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D.Don).....	6
1.1.1.- Taxonomía.....	6
1.1.2.- Nombres comunes.....	7
1.1.3.- Descripción botánica.....	7
1.1.4.- Floración, fructificación y recolección.....	9
1.1.5.- Distribución y hábitat.....	9
1.1.6.- Usos no medicinales.....	10
1.1.7.- Principios activos.....	10
1.1.8.- Propiedades medicinales.....	10
1.1.9.- Indicaciones.....	10
1.2.- Estudios fitoquímicos.....	11
1.2.1.- Screening fitoquímico.....	11
1.3.- Actividad antibacteriana.....	12
1.3.1.- Antibiograma por el método de difusión en agar.....	12
1.3.2.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	13
1.4.- Microorganismos.....	13

1.4.1.-Bacterias	13
1.4.1.1.-Bacterias gram positivas	14
1.4.1.1.1.- <i>Staphylococcus aureus</i>	15
1.4.1.1.2.- <i>Bacillus pumilus</i>	17
1.4.1.2.-Bacterias gram negativas.....	19
1.4.1.2.1.- <i>Escherichia coli</i>	19
1.4.1.2.2.- <i>Salmonella sp.</i>	21
1.4.2.- Levaduras	22
1.4.2.1.- <i>Candida albicans</i>	23
1.5.- Ensayos de toxicidad.....	24
1.5.1.- <i>Artemia salina</i>	25

CAPÍTULO II

2.- Marco metodológico	27
2.1.- Levantamiento de información etnobotánica y recolección de la muestra de Kuiship (<i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D.Don)	27
2.1.1.-Lugar de la recolección e investigación	27
2.1.2.-Levantamiento de información etnobotánica del Kuiship	29
2.1.2.1- Materiales	29
2.1.2.2.- Procedimiento	29
2.1.3.- Recolección de la muestra vegetal	29
2.1.3.1.-Materiales	29
2.1.3.2.-Equipos.....	29
2.1.3.3.-Procedimiento	30
2.1.4.- Comprobación taxonómica e identificación botánica	30
2.2.- Ejecución del screening fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico, acuoso de <i>J. copaia</i>	30
2.2.1.- Lugar de investigación	30
2.2.2.- Preparación de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso	31
2.2.2.1.- Materiales	31
2.2.2.2.- Equipos.....	31

2.2.2.3.-Reactivos	31
2.2.2.4.- Procedimiento	32
2.2.3.-Screening fitoquímico	33
2.2.3.1.- Materiales	33
2.2.3.2.- Equipos.....	33
2.2.3.3.- Reactivos	34
2.2.3.4.- Procedimiento	34
2.2.3.4.1.- Extracto etéreo	35
2.2.3.4.2.- Extracto alcohólico.....	36
2.2.3.4.3.- Extracto acuoso	39
2.2.3.5.- Proceso de identificación	40
2.3.- Ensayos de actividad antibacteriana de los extractos de <i>J. copaia</i>	42
2.3.1.- Lugar de investigación	42
2.3.2.- Materiales	42
2.3.3.- Equipos.....	43
2.3.4.- Reactivos y Medios de cultivo	43
2.3.5.- Cepas	44
2.3.6.-Procedimiento	44
2.3.6.1.- Determinación de sensibilidad de las bacterias frente a los extractos	44
2.3.6.1.1.- Preparación de los extractos a ensayar.....	45
2.3.6.1.2.- Preparación de los medio de cultivo	46
2.3.6.1.3.- Preparación de los sensidiscos	46
2.3.6.1.4.- Preparación del estándar de turbidez 0.5 McFarland	47
2.3.6.1.5.- Preparación del inóculo bacteriano	47
2.3.6.1.6.- Inoculación de las placas.....	48
2.3.6.1.7.- Aplicación de los discos a las placas inoculadas	49
2.3.6.1.8.- Lectura de las placas e interpretación de resultados	50
2.3.6.1.9.- Análisis estadístico.....	51
2.3.6.2.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria	51
2.3.6.2.1.- Selección de bacteria y extracto según su sensibilidad	51
2.3.6.2.2.- Preparación de los extractos a ensayar.....	52

2.3.6.2.3.- Preparación de los medio de cultivo	52
2.3.6.2.4.- Preparación del estándar de turbidez 0.5 McFarland	53
2.3.6.2.5.- Preparación del inóculo bacteriano	53
2.3.6.2.6.- Preparación de los tubos con extracto	54
2.3.6.2.7.- Inoculación de los tubos	54
2.3.6.2.8.- Inoculación en placas	55
2.3.6.2.9.- Microdilución	56
2.3.6.2.10.- Lectura de las placas	57
2.4.- Bioensayo in vitro para evaluar la toxicidad de los extractos frente a <i>Artemia salina</i>	57
2.4.1.- Lugar de investigación	57
2.4.2.-Materiales	57
2.4.3.-Material biológico	57
2.4.4.-Equipos.....	58
2.4.5.-Reactivos	58
2.4.6.-Procedimiento	58
2.4.6.1-Preparación del agua salina.....	58
2.4.6.2- Incubación de los huevos de <i>A. salina</i>	59
2.4.6.3- Preparación de extractos	60
2.4.6.4- Preparación de controles	60
2.4.6.5.- Incorporación de las artemias.....	61
2.4.6.6.- Recuento de artemias vivas y muertas	62
2.4.6.7.- Interpretación de resultados	62
2.4.6.8.- Análisis estadístico.....	63

CAPÍTULO III

3.- Resultados	64
3.1.- Levantamiento de información etnobotánica y recolección de la muestra de Kuiship (<i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D.Don)	64
3.1.1.- Información etnobotánica obtenida.....	64
3.1.2.- Recolección de la muestra de Kuiship	66

3.1.3.- Comprobación taxonómica	69
3.2.- Screening fitoquímico de los extractos etéreo, etanólico y acuoso de <i>J.copaia</i>	70
3.2.1.- Extracto etéreo	70
3.2.1.1.-Maceración en éter etílico	70
3.2.1.2.- Screening fitoquímico y análisis cualitativo	71
3.2.2- Extracto etanólico.....	72
3.2.2.1.-Maceración en etanol	72
3.4.2.2.- Screening fitoquímico y análisis cualitativo	73
3.2.3.- Extracto acuoso	74
3.2.3.1.-Maceración en agua.....	74
3.2.3.2.- Screening fitoquímico y análisis cualitativo	75
3.3.- Actividad antibacteriana.....	76
3.3.1.- Sensibilidad de las bacterias – difusión en agar.....	76
3.3.1.1.- <i>Staphylococcus aureus</i>	77
3.3.1.2.- <i>Bacillus pumilus</i>	78
3.3.1.3.- <i>Escherichia coli</i>	79
3.3.1.4.- <i>Salmonella sp.</i>	80
3.3.1.5.- <i>Candida albicans</i>	81
3.3.1.6.- Análisis estadístico.....	82
3.3.1.6.1.- Promedio de los halos para cada microorganismo	82
3.3.1.6.2.- Análisis de varianza ANOVA de 2 vías.....	83
3.3.1.6.3.- Test a posteriori de Tukey.....	84
3.3.2.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	85
3.3.2.1.- <i>Staphylococcus aureus</i>	85
3.5.2.2.- <i>Escherichia coli</i>	87
3.4.- Bioensayos de toxicidad frente a <i>Artemia salina</i>	88
3.4.1.- Control de agua salina.....	88
3.4.2.- Control de DMSO	89
3.4.3.- Extracto etéreo	90
3.4.3.1- Análisis estadístico.....	91
3.4.3.1.1.- Variables del ensayo	91

3.4.3.1.2.- Curva de mortalidad de <i>A. salina</i>	92
3.4.3.1.3.-Regresión lineal.....	93
3.4.3.1.4.- Dosis letal 50.....	94
3.4.4.- Extracto etanólico.....	95
3.4.4.1- Análisis estadístico.....	96
3.4.4.1.1.- Variables del ensayo	96
3.4.4.1.2.- Curva de mortalidad de <i>A. salina</i>	97
3.4.4.1.3.-Regresión lineal.....	98
3.4.4.1.4.- Dosis letal 50.....	99
3.4.5.- Extracto acuoso	100
3.4.5.1- Análisis estadístico.....	101
3.4.5.1.1.- Variables del ensayo	101
3.6.5.1.2.- Curva de mortalidad de <i>A. salina</i>	102
CAPÍTULO IV	
4.- Discusión.....	103
CONCLUSIONES.....	105
RECOMENDACIONES	107
BIBLIOGRAFÍA	108

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Descripción taxonómica, <i>J. copaia</i>	7
Tabla 2.- Clasificación científica, <i>S.aureus</i>	15
Tabla 3.- Clasificación científica, <i>B. pumilus</i>	17
Tabla 4.- Clasificación científica, <i>E.coli</i>	20
Tabla 5.- Clasificación científica, <i>Salmonella sp</i>	21
Tabla 6.- Clasificación científica, <i>C. albicans</i>	23
Tabla 7.- Clasificación científica, <i>A. salina</i>	26
Tabla 8.- Grado de toxicidad.	62
Tabla 9.- Datos de recolección submuestra 1.	66
Tabla 10.- Datos de recolección submuestra 2.	67
Tabla 11.- Datos de recolección submuestra 3.	68
Tabla 12.- Maceración en éter etílico de <i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D.Don.	70
Tabla 13.- Screening fitoquímico del extracto etéreo de <i>J. copaia</i> para identificación de compuestos..	71
Tabla 14.- Maceración en etanol de <i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D.Don.....	72
Tabla 15.- Screening fitoquímico del extracto etanólico de <i>J. copaia</i> para identificación de compuestos.....	73
Tabla 16.- Maceración en agua de <i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D.Don.....	74
Tabla 17.- Screening fitoquímico del extracto acuoso de <i>J. copaia</i> para identificación de compuestos.....	75
Tabla 18.- <i>Staphylococcus aureus</i> , tamaño del halo de inhibición.....	77
Tabla 19.- <i>Staphylococcus aureus</i> , categorías de sensibilidad.....	77
Tabla 20.- <i>Bacillus pumilus</i> , tamaño del halo de inhibiciónen.....	78
Tabla 21.- <i>Bacillus pumilus</i> , categorías de sensibilidad.....	78
Tabla 22.- <i>Escherichia coli</i> , tamaño del halo de inhibiciónen.....	79
Tabla 23.- <i>Escherichia coli</i> , categorías de sensibilidad	79
Tabla 24.- <i>Salmonella sp</i> , tamaño del halo de inhibiciónen	80
Tabla 25.- <i>Salmonella sp.</i> , categorías de sensibilidad.....	80
Tabla 26.- <i>Candida albicans</i> , tamaño del halo de inhibiciónen	81

<i>Tabla 27.- Candida albicans, categorías de sensibilidad.</i>	81
<i>Tabla 28.- Promedio de halos.</i>	82
<i>Tabla 29.- ANOVA de dos vías.</i>	83
<i>Tabla 30.- Test de Tukey</i>	84
<i>Tabla 31.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por mg de extracto etéreo de J. copaia sobre Staphylococcus aureus</i>	85
<i>Tabla 32.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por mg de extracto etéreo de J. copaia sobre Staphylococcus aureus con microdilución.</i>	86
<i>Tabla 33.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por mg de extracto acuoso de J. copaia sobre Escherichia coli</i>	87
<i>Tabla 34.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por mg de extracto acuoso de J. copaia sobre Escherichia coli con microdilución.</i>	87
<i>Tabla 35.- Conteo de artemias en agua salina.</i>	88
<i>Tabla 36.- Conteo de artemias en DMSO.</i>	89
<i>Tabla 37.- Conteo de artemias en extracto etéreo de J. copaia.</i>	90
<i>Tabla 38.- Variables del ensayo en extracto etéreo de J. copaia</i>	91
<i>Tabla 39.- Regresión lineal, ensayo en el extracto etéreo de J. copaia.</i>	93
<i>Tabla 40.- Variables DL50, extracto etéreo.</i>	94
<i>Tabla 41.- Conteo de artemias en extracto etanólico de J. copaia.</i>	95
<i>Tabla 42.- Variables del ensayo en extracto etanólico de J. copaia.</i>	96
<i>Tabla 43.- Regresión lineal, ensayo en el extracto etanólico de J. copaia</i>	98
<i>Tabla 44.- Variables DL50, extracto etanólico de J. copaia.</i>	99
<i>Tabla 45.- Conteo de artemias en extracto acuoso de J. copaia.</i>	100
<i>Tabla 46.- Variables del ensayo en extracto acuoso de J. copaia.</i>	101

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES, FIGURAS Y DIAGRAMAS

<i>Ilustración 1.- Jacaranda copaia.</i>	6
<i>Ilustración 2.- Candida albicans.</i>	23
<i>Ilustración 3.- Concentración de extractos en baño maría.</i>	45
<i>Ilustración 4.- Preparación de inóculo bacteriano.</i>	47
<i>Ilustración 5.- Inoculación en placas.</i>	48
<i>Ilustración 6.- Aplicación de discos.</i>	49
<i>Ilustración 7.- Preparación del inóculo bacteriano.</i>	53
<i>Ilustración 8.- Inoculación en placas.</i>	55
<i>Ilustración 9.- Incubación de A. salina.</i>	59
<i>Ilustración 10.- Incorporación de artemias a tubos con extractos.</i>	61
<i>Ilustración 11.- Submuestra 1 de J. copaia.</i>	66
<i>Ilustración 12.- Submuestra 2 de J. copaia.</i>	67
<i>Ilustración 13.- Submuestra 3 de J. copaia.</i>	68
<i>Ilustración 14.- Muestra madre del material vegetal recolectado.</i>	69
<i>Figura 1.- Características botánicas sobresalientes de J. copaia.</i>	8
<i>Figura 2.- Bacterias Gram positivas - tinción.</i>	14
<i>Figura 3.- Staphylococcus aureus.</i>	15
<i>Figura 4.- Bacillus pumilus.</i>	17
<i>Figura 5.- Bacterias gram negativas.</i>	19
<i>Figura 6.- Escherichia coli.</i>	19
<i>Figura 7.- Salmonella sp.</i>	21
<i>Figura 8.- Artemia salina – nauplio.</i>	25
<i>Figura 9.- Mapa provincial del Ecuador</i>	27
<i>Figura 10.- Lugar de la investigación.</i>	28
<i>Figura 11.- Extracción sucesiva del material vegetal para el screening fitoquímico. ..</i>	32
<i>Figura 12.- Esquema de las reacciones a realizar en el extracto etéreo.</i>	35
<i>Figura 13.- Esquema de las reacciones a realizar en el extracto etanólico.</i>	36
<i>Figura 14.- Esquema de las reacciones a realizar en el extracto acuoso.</i>	39

<i>Diagrama 1.- Curva de porcentaje de mortalidad vs concentración del extracto etéreo de J. copaia.....</i>	<i>92</i>
<i>Diagrama 2.- Número de artemias muertas vs concentración del extracto etéreo de J. copaia.</i>	<i>94</i>
<i>Diagrama 3.- Curva de porcentaje de mortalidad vs concentración del extracto etanólico de J. copaia.....</i>	<i>97</i>
<i>Diagrama 4.- Número de artemias muertas vs concentración del extracto etanólico de J. copaia.</i>	<i>99</i>
<i>Diagrama 5.- Curva de porcentaje de mortalidad vs concentración del extracto acuoso de J. copaia.....</i>	<i>102</i>

ÍNDICE DE ANEXOS

<i>Anexo 1.- Recopilación etnobotánica – Encuestas.....</i>	<i>119</i>
<i>Anexo 2.- Ficha de Staphylococcus aureus.....</i>	<i>125</i>
<i>Anexo 3.- Ficha de Bacillus pumilus.....</i>	<i>126</i>
<i>Anexo 4.- Ficha de Escherichia coli.....</i>	<i>127</i>
<i>Anexo 5.- Ficha de Salmonella sp.....</i>	<i>128</i>
<i>Anexo 6.- Ficha de Candida albicans.....</i>	<i>129</i>
<i>Anexo 7.- Identificación de la muestra en el Herbario Nacional.....</i>	<i>130</i>
<i>Anexo 8.- Muestra ingresada al Herbario de la Universidad Politécnica Salesiana. .</i>	<i>131</i>
<i>Anexo 9.- Maceración de J. copaia en éter etílico.....</i>	<i>131</i>
<i>Anexo 10.- Ensayo de Sudan, presencia de aceites y grasas.....</i>	<i>132</i>
<i>Anexo 11.- Ensayo de Liebermann-Burchard, presencia de triterpenos y esteroides.</i>	<i>132</i>
<i>Anexo 12.- Maceración de J. copaia en etanol.....</i>	<i>133</i>
<i>Anexo 13.- Ensayo de catequinas, presencia de catequinas.....</i>	<i>133</i>
<i>Anexo 14.- Ensayo de Fehling, presencia de azúcares reductores.....</i>	<i>134</i>
<i>Anexo 15.- Ensayo de Liebermann-Burchard, presencia de triterpenos y esteroides.</i>	<i>134</i>
<i>Anexo 16.- Ensayo de espuma, presencia de saponinas.....</i>	<i>135</i>
<i>Anexo 17.- Ensayo de cloruro férrico, presencia de fenoles y taninos.....</i>	<i>135</i>
<i>Anexo 18.- Ensayo de Borntrager, presencia de quinonas.....</i>	<i>136</i>
<i>Anexo 19.- Ensayo de Dragendorff, presencia de alcaloides.....</i>	<i>136</i>
<i>Anexo 20.- Macerado de J. copaia en agua.....</i>	<i>137</i>
<i>Anexo 21.- Ensayo de cloruro férrico, presencia de fenoles y taninos.....</i>	<i>137</i>
<i>Anexo 22.- Ensayo de Fehling, presencia de azúcares reductores.....</i>	<i>138</i>
<i>Anexo 23.- Halo de inhibición, S. aureus.....</i>	<i>139</i>
<i>Anexo 24.- Halo de inhibición, B. pumilus.....</i>	<i>140</i>
<i>Anexo 25.- Halo de inhibición, E. coli.....</i>	<i>141</i>
<i>Anexo 26.- Halo de inhibición, Salmonella sp.....</i>	<i>142</i>
<i>Anexo 27.- Halo de inhibición, C. albicans.....</i>	<i>143</i>
<i>Anexo 28.- Dilución doble seriada, S. aureus.....</i>	<i>144</i>
<i>Anexo 29.- Microdilución, S. aureus.....</i>	<i>145</i>

<i>Anexo 30.- Dilución doble seriada, E. coli.</i>	<i>146</i>
<i>Anexo 31.- Microdilución, E. coli.</i>	<i>147</i>

RESUMEN

Estudio de la actividad antibacteriana y tóxica del Kuiship (*Jacaranda copaia*)

Wilson Tapia y Gabriela Alejandra Armas Arteaga

Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad – CIVABI, Universidad
Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.

Autor para correspondencia: wtapia@ups.edu.ec

La *Jacaranda copaia* es un árbol nativo de la costa y amazonía ecuatoriana que crece entre los 0 y 1000 metros sobre el nivel del mar (msnm). Se encuentra en las provincias de Esmeraldas, Morona Santiago, Napo, Pastaza, Sucumbios y Zamora Chinchipe. Sus sinónimos son *Jacaranda spectabilis* o *Bignonia copaia*. El objetivo de este estudio fue valorar la actividad antibacteriana frente a patógenos Gram positivos y Gram negativos y evaluar la toxicidad frente a *Artemia salina* en extractos de las hojas del Kuiship (*Jacaranda copaia* (Aubl.) D.Don). Se recolectó el material vegetal en la Comunidad de Capirona y se obtuvo el extracto etéreo, etanólico y acuoso de las hojas de *J. copaia*. Se realizó un screening fitoquímico, antibiogramas y se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) sobre bacterias nativas que presentaron sensibilidad frente a los extractos en los ensayos de difusión en agar. Finalmente se realizó un bioensayo in vitro con *Artemia salina* para determinar la toxicidad de los extractos de *J. copaia*. Se identificó: aceites y grasas, triterpenos-esteroides, catequinas, saponinas, azúcares reductores, alcaloides, quinonas, taninos y principios amargos. En los ensayos antibacterianos las cepas sensibles fueron: *S. aureus* frente al extracto etéreo y *E. coli* frente al extracto acuoso de *J. copaia*; se determinó la CMI para estas dos bacterias nativas. En el bioensayo con *A. salina* se puso de manifiesto que los extractos etéreo y etanólico de *J. copaia* presentan toxicidad moderada a una concentración de 1000 ppm.

Palabras clave: *Jacaranda copaia*, *Artemia salina*, concentración mínima inhibitoria, actividad antibacteriana, toxicidad.

ABSTRACT

Study of antibacterial and toxic Kuiship (*Jacaranda copaia*) activity

Wilson Tapia y Gabriela Alejandra Armas Arteaga

Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad – CIVABI, Universidad
Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.

Author for correspondence: wtapia@ups.edu.ec

The *Jacaranda copaia* is a tree native to the coastal and Amazon regions of Ecuador and grows at altitudes of between 0 and 1,000 meters above sea level (masl). The species is to be found in the provinces of Esmeraldas, Morona Santiago, Napo, Pastaza, Zamora Chinchipe and Sucumbios. Its synonyms are *Jacaranda spectabilis* or *Bignonia copaia*. The purpose of this study was to assess the antibacterial activity with respect to Gram positive and Gram negative pathogens and evaluate the toxicity with respect to *Artemia salina* in extracts of leaves of the Kuiship (*Jacaranda copaia* (Aubl.) D. Don). Plant material was gathered from the Capirona Community and the etheric, ethanolic, aqueous extract was obtained from the *J. copaia* leaves. Then a phytochemical, antimicrobial screening process was undertaken, determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of native bacteria presenting positive or sensitive antibacterial activity when faced with extracts in the agar diffusion assays. Finally, a vitro bioassay with *Artemia salina* was performed to determine the toxicity of the extracts of *J. copaia*. At the end of the phytochemical screening assays, the presence of the following secondary metabolites was identified: oils and fats, triterpenes-steroids, catechins, saponins, reducing sugars, alkaloids, quinones, tannins and bitter constituents. In the antibacterial assays, the sensitive bacterial strains were: *S. aureus* versus the ether extract and *E. coli* versus the aqueous extract *J. copaia*. The MIC was determined for these two native bacteria. The bioassay with *A. salina* revealed that the ethereal and ethanolic extracts of *J. copaia* presented moderate toxicity with a concentration of 1000 ppm.

Key words: *Jacaranda copaia*, *Artemia salina*, minimum inhibitory concentration, antibacterial activity, toxicity.

INTRODUCCIÓN

El Ecuador se ubica como uno de los diez países con mayor biodiversidad en el mundo. Su riqueza biológica está reflejada en su variedad de organismos, el 10% de las especies mundiales de plantas vasculares están localizadas en esta área que comprende apenas el 2 % de la superficie de la tierra. Ecuador tiene 25,000 especies de plantas vasculares, de estas tan solo 2,725 han sido catalogadas y estudiadas lo que representa el 11% del total mundial. En el valle Amazónico y a lo largo de la Costa alrededor de 800 especies han sido recolectadas (Vargas, 2002).

La Amazonía ecuatoriana se extiende sobre un área de 120.000 km², de exuberante vegetación, propia de los bosques húmedo-tropicales. La Cordillera de los Andes forma el límite occidental de esta región, mientras que Perú y Colombia el límite meridional y oriental, respectivamente. La temperatura anual promedio oscila entre los 24° y 25° C (Vallejo, 2010).

Se estima que las 2/3 partes de las selvas tropicales existentes en el mundo se encuentran en la región amazónica; las mismas que albergan más de la mitad de los 30 millones de especies animales y vegetales que se cree existen en la Tierra (Estrella, 1995).

Jorgensen y León, 1999 en su libro Catálogo de las Plantas Vasculares del Ecuador, determina que la *J. copaia* es un árbol nativo de la Costa y Amazonía que crece entre los 0 y 1000 metros sobre el nivel del mar (msnm). Se encuentra en las provincias de Esmeraldas, Morona Santiago, Napo, Pastaza, Sucumbíos y Zamora Chinchipe. Sus sinónimos son *Jacaranda spectabilis* o *Bignonia copaia*.

El capítulo I aborda temas generales sobre la planta en estudio como es su taxonomía, descripción botánica, propiedades medicinales, distribución y hábitat; se detalla también los microorganismos que van a ser utilizados para la presente investigación y se define brevemente screening fitoquímico, actividad antibacteriana y toxicidad.

En el capítulo II se describe el levantamiento de la etnoinformación y las metodologías utilizadas siendo estas: difusión en disco de Kirby – Bauer para determinar la sensibilidad bacteriana frente a los extractos de la planta, dilución doble seriada y microdilución para determinar la concentración mínima inhibitoria y bioensayos in vitro frente a *Artemia salina* para evaluar la toxicidad.

El capítulo III abarca los resultados obtenidos en la presente investigación y la parte estadística de los mismos. En el capítulo IV se presenta una discusión de los resultados obtenidos frente a investigaciones anteriores de plantas del mismo género; seguido de las conclusiones finales de la investigación y las recomendaciones.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tema

Estudio de la actividad antibacteriana y tóxica del Kuiship (*Jacaranda copaia*)

Hipótesis

Hipótesis alternativa

-Los extractos etéreo, etanólico y acuoso de Kuiship (*Jacaranda copaia*) tienen actividad antibacteriana y escasa toxicidad.

Hipótesis nula

-Los extractos etéreo, etanólico y acuoso de Kuiship (*Jacaranda copaia*) no tienen actividad antibacteriana y alta toxicidad.

Objetivos

Objetivo General

Valorar la actividad antibacteriana frente a patógenos nativos Gram positivos y Gram negativos y evaluar la toxicidad frente a *Artemia salina* en extractos de las hojas del Kuiship (*Jacaranda copaia* (Aubl.) D.Don).

Objetivos Específicos

- Levantar información etnobotánica del Kuiship en los sectores aledaños a comunidad de Capirona y recolectar la muestra vegetal de la especie *J. copaia*.
- Realizar el screening fitoquímico de los extractos etéreo, etanólico y acuoso *J. copaia*.
- Comprobar la actividad antibacteriana de los extractos de *J. copaia* frente a cepas nativas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus pumilus*, *Escherichia coli*, *Salmonella sp* y *Candida albicans* por el método Bauer-Kirby.
- Evaluar la toxicidad de los extractos de *J. copaia* mediante el ensayo de letalidad con *Artemia salina*.

JUSTIFICACIÓN

La Región Amazónica presenta una gran diversidad de plantas nativas muchas de las cuales no tienen estudios científicos, pero siempre han sido utilizadas con sabiduría por los aborígenes de la zona. Muchas de estas plantas tienen carácter religioso, ritual y místico pudiendo curar enfermedades no concretas y del alma. Los conocimientos y tradiciones sobre los usos de las plantas están a punto de desaparecer; es necesario emprender tareas de educación ambiental y cultural que contribuyan a mantener vivos estos conocimientos ancestrales (Yépez, 2011).

Es necesario señalar que los estudios químicos, farmacológicos, médicos y toxicológicos sobre las plantas de este sitio geográfico son muy limitados. En una investigación realizada en la zona de Archidona y Tena se registraron el uso medicinal de 78 especies las mismas que fueron sometidas a análisis químicos y de bioactividad; dentro de estas especies no se menciona a la *Jacaranda copaia* (Macía y de la Torre, 2008.).

El conocimiento herbolario es importante porque sintetiza un saber acumulativo que ha sido poco valorado. Mucho de lo cual espera ser investigado y retribuido a la población. No solo se desconocen los principios activos de la mayoría de las plantas que podrían dar luces en el enfrentamiento de las enfermedades, sino que nada se sabe de la cosmovisión que encierra el uso de cada planta el mismo que juega un papel fundamental en la práctica popular (Ríos y Pedersen, 1991).

En la región amazónica específicamente en la Provincia de Napo – Comunidad de Capirona y poblaciones aledañas utilizan el Kuiship (*Jacaranda copiaa* (Aubl.) D. Don) para adelgazar, como cicatrizante y para tratar infecciones de la piel. Al evidenciar el uso de esta planta en las comunidades amazónicas se desarrolla la presente investigación para rescatar los valores ancestrales y validar de forma científica y veraz su uso.

CAPÍTULO I

1.- Marco Teórico

1.1- Kuiship (*Jacaranda copaia* (Aubl.) D.Don)

1.1.1.- Taxonomía



Ilustración 1.- Jacaranda copaia.

Fuente: Boulais, 2008.

Reino:	Plantae
Phylum:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Scrophulariales
Familia:	Bignoniaceae
Género:	Jacaranda
Epíteto Específico:	Copaia
Nombre Científico:	<i>Jacaranda copaia</i>

Tabla 1.- Descripción taxonómica, J. copaia.

Fuente: Cuatrecasas, 2009.

1.1.2.- Nombres comunes

Se la conoce también como: tambor, gualancho, zorra, gallinazo, parapara, capaia (en América Central); izcuandé, chingalé, escobillo, pavito (en Colombia); solimán de monte, palo de buba, huamán, samará, madura plátano (en Perú); kuiship, hoja de canoa y gualundaño (en Ecuador) (Guariguata, 2000).

1.1.3.- Descripción botánica

Árbol grande, siempreverde de hasta 35m de altura, copa cónica con ramas verticiladas horizontales.



Figura 1.- Características botánicas sobresalientes de *J. copaia*.

Fuente: Aguilar, 2011.

- *Tronco.*- recto, bastante ramificado; su madera se utiliza en ebanistería y carpintería y es muy apreciada por sus tonos crema y rosado.
- *Corteza.*- de color gris, con grietas predominantemente verticales, regularmente rugosa y áspera. El grosor de la corteza es de aproximadamente 1,5 cm.
- *Hojas.*- opuestas, parecidas a las de un helecho, bipinnadas, de hasta 30cm. de largo, con más de 15 pares de divisiones, cada una con 12 a 24 pares de folíolos oblongos, de color verde grisáceo. La lámina foliar es elíptica de 2 a 7,5 cm de largo y de 1 a 2 cm de ancho, ápice acuminado, base asimétrico aguda, margen entero, haz y envés verdes oscuros ambos glabros.

- *Flores.*- se encuentran en inflorescencias; flores de color azul-purpura agrupadas en racimos en los extremos de las ramas.
- *Frutos.*- son cápsulas elípticas, leñosas y planas de color marrón oscuro, tienen de 8 a 15 cm de largo y de 1 a 2 cm de ancho; se abren en dos valvas planas con numerosas semillas aladas orbiculares a cada lado de las valvas (Williams, 2007).

1.1.4.- Floración, fructificación y recolección

- *Floración.*- florece de forma irregular según su ámbito de distribución natural.
- *Fructificación.*- la producción de frutos es anual y comienza cuando el árbol tiene tres años de edad.
- *Recolección.*- el período óptimo de recolección de los frutos es cuando la semilla cambia de color verde a marrón y se observa la apertura de los primeros frutos, deben ser colectados directamente del árbol o del suelo (Williams, 2007).

1.1.5.- Distribución y hábitat

Requiere climas suaves en los que no se produzcan heladas y en los que los descensos de temperatura no sean muy fuertes. El Kuiship vive mejor a una altura que varía de 0 a 1000 metros sobre el nivel del mar (msnm) y a una temperatura de 21 a 26 grados centígrados (C°); prefiere suelos de textura franca a arcillosa (Alice, 2004).

1.1.6.- Usos no medicinales

Su crecimiento es rápido por lo que suele ser una especie maderable. La madera es suave, compacta, fácil de trabajar, de baja durabilidad en ambientes externos. Se utiliza para la fabricación de balsas, forros, hormas para calzado y pulpa para papel. También se ha utilizado en Suramérica como ornamental (Estrella, 1995).

1.1.7.- Principios activos

Se ha estudiado la composición química de varias especies de Jacaranda; así, se han identificado cycloexadienos en *J. puberula*; sustancias antibióticas y hexadienyl éster en *J. mimosaeifolia*; taninos en *J. acutifolia*; tetrahydroxyflavona glycócido jaceranona, ácido jacoumarico, quinona jaceranona, carobina, caroba que es una resina balsámica, bálsamo caroba, ácido gálico y aceite de jacaranda en *J. caucana*. La química de la especie *J. copaia* no se la conoce, pero es posible que comparta algunos componentes de las otras especies estudiadas (Secretaría. Pro-Tempore, 1994).

1.1.8.- Propiedades medicinales

Es astringente, cicatrizante, depurativa, diurética, emética, laxante, sudorífera y tónica. La decocción de las hojas del jacarandá tiene uso medicinal, como antiséptico y antibacteriano; mientras que la corteza es astringente (Carhuapoma, 1999).

1.1.9.- Indicaciones

El uso tradicional la indica para enfermedades de la piel, artritis, gonorrea, cáncer, catarro crónico de la vejiga y la uretra (cistitis), inflamación de la mucosa nasal (rinorrea), dispepsia (falta de jugos digestivos), dolor muscular reumático o del

estómago, fiebre, flatulencia, inflamación (próstata, riñón, garganta), mal aliento, sífilis, úlceras de estómago, parásitos (Herrera, 1999).

1.2.- Estudios fitoquímicos

Con los avances en botánica, fitoquímica, farmacología, farmacocinética, farmacodinamia y toxicología, el conocimiento tradicional y popular sobre las propiedades medicinales de las plantas deberá ser constatado y validado para garantizar una terapia adecuada, eficaz y con la menor incidencia de ocasionar riesgos para el paciente.

A nivel popular basta muchas veces con extraer los principios activos de la manera más sencilla; en cambio para analizar las propiedades medicinales de una droga vegetal en muchos casos se recurrirá a métodos de extracción más complejos (Abad, 2006).

1.2.1.- Screening fitoquímico

Según Nikolay Sharapin (2000), el screening fitoquímico permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en la planta.

Esta técnica consiste en la extracción de los principios activos de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración; permitiendo al investigador evaluar la posible acción farmacológica o uso mediante la identificación de la familia fotoquímica y orientar así la extracción o fraccionamiento de los grupos de metabolitos secundarios de mayor interés. Los resultados del tamizaje constituyen únicamente una orientación y deben ser complementados con el estudio farmacológico posterior (Abad, 2006).

1.3.- Actividad antibacteriana

Mediante ensayos antibacterianos se puede conocer la capacidad que tiene una droga vegetal para comprobar una eventual actividad antibacteriana.

Es la capacidad que tiene una sustancia o una molécula de inhibir el crecimiento y desarrollo de microorganismos (Perez y Villaverde, 2002).

1.3.1.- Antibiograma por el método de difusión en agar

Es una prueba en la que se enfrenta la bacteria, inoculada sobre la superficie de un medio con agar, a una solución antibiótica absorbida en discos de papel filtro. Este método fue estandarizado por Bauer en 1966 y dio lugar al conocido método Kirby – Bauer, que es el recomendado por la *Food and Drug Administration (FDA)* y el *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)* (Taroco *et al.* 2010).

Varios factores pueden afectar el tamaño del halo de inhibición entre ellos podemos encontrar: la carga de antibiótico en los discos, la difusión del antibiótico en el medio de cultivo, el tamaño del inóculo bacteriano, la composición y el grosor del medio de cultivo, la velocidad del crecimiento bacteriano y el tiempo de incubación. El medio de cultivo frecuentemente empleado es el Mueller Hinton con un pH entre 7,2 y 7,4, y el grosor entre 4 y 6 mm; el inóculo bacteriano debe tener una turbidez similar al 0,5 de la escala de McFarland aproximadamente 10^8 UFC/ml y las placas se deben incubar a 37° C en la atmósfera adecuada (Gamazo, 2005).

1.3.2.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Los métodos de dilución son los más utilizados para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI); estos pueden realizarse en medio sólido (dilución en agar) o en medio líquido (dilución en caldo).

Las diluciones dobles seriadas de un antibiótico determinado se enfrentan con una suspensión bacteriana donde la menor concentración de antibiótico (ug/ml) que inhibe el desarrollo de la bacteria se conoce como la concentración mínima inhibitoria (Gamazo, 2005).

1.4.- Microorganismos

Los microorganismos son organismos vivos diminutos sólo visibles por microscopio; entre ellos están las bacterias, algas, hongos, protozoos y los virus. Están capacitados para vivir en multitud de ambientes, incluso en los ambientes hostiles (temperaturas próximas a la ebullición o la de congelación, en agua salada o dulce o con aire y en ausencia de él). Son responsables de procesos biológicos y enfermedades; pueden resultar beneficiosos, inocuos, nocivos y mortales (Ville, 1996).

1.4.1.-Bacterias

Las bacterias son seres vivos de organización muy simple; consisten en una sola célula de tipo procariota no poseen núcleo ni organelos internos, la mayor parte del material genético está en forma de una sola molécula larga y circular de DNA a la que se asocian ciertas proteínas específicas; por lo general presentan un tamaño entre 0,5 y 5 micras y diferentes formas tales como: cocos-esféricos, bacilos-bastón, espirilos-espiras. Su reproducción es de forma asexual por fisión binaria. (Curtis, 2003)

Este tipo de microorganismos han colonizado todo tipo de medios tanto terrestres como acuáticos y son los seres vivos más abundantes del planeta (Luna, 2001).

1.4.1.1.-Bacterias gram positivas

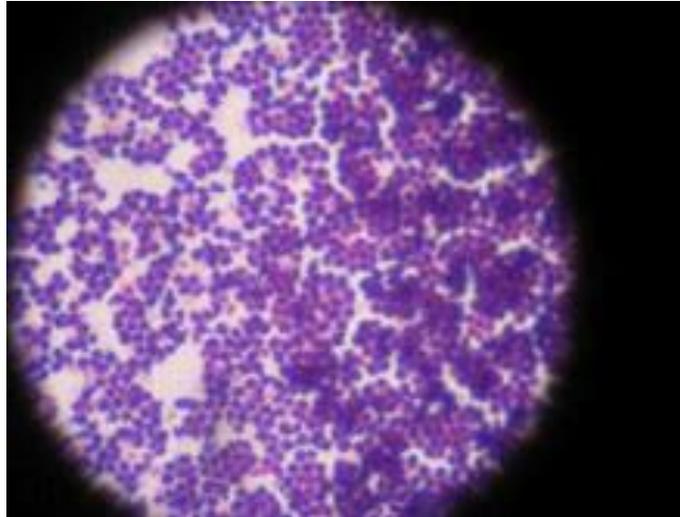


Figura 2.- Bacterias Gram positivas - tinción.

Fuente: López, 2010.

Son bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta al aplicar la tinción de Gram, esta característica está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular; la misma que comprende la membrana celular y la pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglicano constituyendo entre el 80 y 90% de esta; forma así un exoesqueleto. La capa de peptidoclicano confiere una gran resistencia y es la responsable de retener el tinte (Forero, 2008).

1.4.1.1.1.- *Staphylococcus aureus*



Figura 3.- *Staphylococcus aureus*.

Fuente: La autora, 2011.

Dominio	Bacteria
Reino	Prokaryotae
División	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Micrococcaceae
Género	Staphylococcus
Especie	S. aureus
Nombre binomial	<i>Staphylococcus aureus</i>

Tabla 2.- Clasificación científica, *S.aureus*.

Fuente: Cann, 2007.

El *Staphylococcus aureus* es coco gram positivo inmóvil que generalmente se dispone en racimos irregulares semejantes a los de uvas, presentan un diámetro de 1 um. Algunas cepas producen cápsulas y pueden ser aerobias o anaerobias. Aunque forma comúnmente parte de la microflora humana, puede producir enfermedad mediante dos mecanismos distintos la proliferación y su capacidad para producir toxinas. La proliferación en los tejidos puede producir forúnculos, infecciones cutáneas, infecciones postoperatorias de heridas, septicemia, endocarditis, osteomielitis y neumonía (Mims *et al.* 2002).

La infección intestinal o enfermedad gastrointestinal asociada a *S. aureus* está causada por una enterotoxina termoestable y se caracteriza por vómitos explosivos, diarrea, fiebre, cólicos, desequilibrio hidroelectrolítico y deshidratación (Silva, 2011).

La transmisión es por contacto y vía aérea; el microorganismo sobrevive a la desecación, tolera sales minerales y nitritos (Mims *et al.* 2002).

Crece con facilidad sobre casi todos los medios bacteriológicos en condiciones aeróbicas o anaeróbicas facultativas, su temperatura óptima de crecimiento va de 35 a 40° centígrados y el pH óptimo oscila entre 7,0 y 7,5 aunque soportan pH mucho más extremos (Harrison, 2007).

1.4.1.1.2.- *Bacillus pumilus*

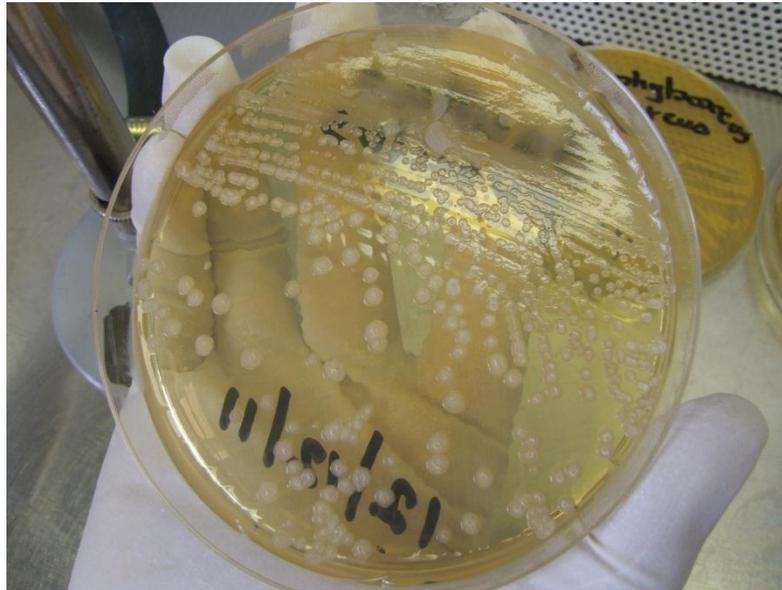


Figura 4.- Bacillus pumilus.

Fuente: La autora, 2011.

Dominio	Bacteria
Reino	Prokaryotae
División	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Género	Bacillus
Especie	<i>B. pumilus</i>
Nombre binomial	<i>Bacillus pumilus</i>

Tabla 3.- Clasificación científica, B. pumilus.

Fuente: Kunkel, 2009.

El *Bacillus pumilus* es una bacterias en forma de bastón sus colonias son de color amarillo, crece en medios habituales en atmósfera aerobia pero no en condiciones de anaerobiosis y presenta movilidad. En la tinción de gram corresponde a bacilos gram positivos de gran tamaño, los cuales en condiciones estresantes forman endosporas (cilíndricas o elipsoidales) localizadas en la parte central del bacilo. Dicha forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes. Estas bacterias crecen con facilidad sobre agar sangre y se incuban a 35° C (Richardson y Shankland, 1995).

La transmisión se produce por contacto directo con ganado enfermo o contaminado. Las lesiones pueden cursar con dolor y aparecen en zonas expuestas de la piel, especialmente en brazos, manos y cara. Dichas lesiones son el resultado de la acción de las toxinas sobre el tejido circundante, que producen necrosis tisular. La forma clínica más frecuente en la que se presenta es la bacteriemia, sobre todo en enfermos inmunodeprimidos con neoplasias; también se ha descrito la posibilidad de que este microorganismo sea el agente causal de infecciones cutáneas similares a las producidas por *Bacillus anthracis* (carbunco cutáneo). Los factores de virulencia de *B. pumilus* no se conocen bien. Se sabe que este microorganismo tiene propiedades tóxicas. Se ha demostrado su efecto citopático en líneas celulares y su actividad hemolítica y proteolítica (Tena *et al.* 2007).

1.4.1.2.-Bacterias gram negativas

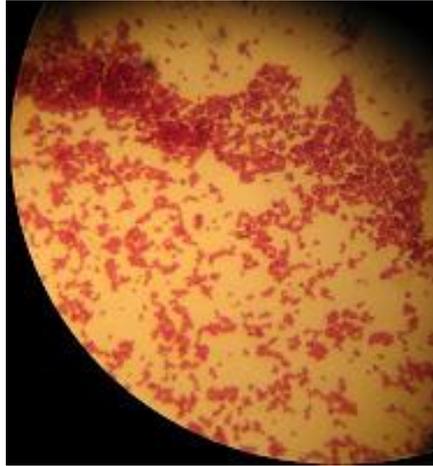


Figura 5.- Bacterias gram negativas.

Fuente: Telmeds.org. 2009.

La pared de la célula gran negativa tiene una capa delgada de peptidoglicano, representando entre el 10% y 20% de la misma, este se encuentra rodeado por una membrana exterior exclusiva de esta clase de bacterias. La delgada capa de peptidoglicano es incapaz de retener el de complejo cristal violeta-yodo y la célula se decolora (Guilarte, 2003).

1.4.1.2.1.- *Escherichia coli*



Figura 6.- Escherichia coli.

Fuente: La autora, 2011.

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	Escherichia
Especie	E. coli
Nombre binomial	<i>Escherichia coli</i>

Tabla 4.- Clasificación científica, *E.coli*.

Fuente: Rivero, 2004.

Son bacilos gram negativos no esporulados, móviles con flagelo o inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos. Crece con facilidad en los medios de laboratorio habituales y en medios selectivos que contienen bilis a temperatura ambiente y pH óptimo de 6 a 7. *E. coli* puede provocar infecciones de la vía urinaria, enfermedades diarreicas (asociadas a enterotoxinas), meningitis del recién nacido y septicemia. Se transmite por contacto y por ingestión (vía fecal-oral) y se la asocia a alimentos (Mims *et al.* 2002).

Se trata de bacterias de rápido crecimiento y amplia distribución en el suelo, el agua, vegetales y gran variedad de animales (Rivero, 2004).

Son pocas las cepas de *E. coli* capaces de causar enfermedades a los humanos; tal es el caso de la *E. coli* O157:H7, es una variedad extraña de esta bacteria que produce grandes cantidades de una o más toxinas, que causan daños severos en el revestimiento del intestino. Generando colitis, esta enfermedad está caracterizada por calambres severo y diarrea, la cual es muy líquida inicialmente y llega a ser sangrienta; ocasionalmente se presentan vómitos y fiebre (Michanie, 2003).

1.4.1.2.2.-*Salmonella sp.*

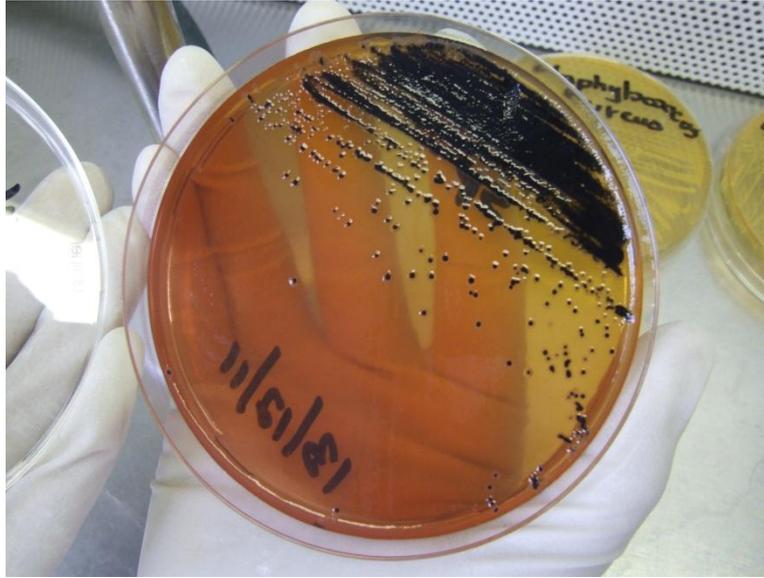


Figura 7.- *Salmonella sp.*

Fuente: La autora, 2011.

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	Salmonella

Tabla 5.- Clasificación científica, *Salmonella sp.*

Fuente: Cisneros, 2005.

Es una bacteria aeróbica o anaeróbica facultativa; estos bacilos no producen esporas y la mayoría de las cepas son móviles debido a que poseen flagelos. Son capaces de crecer en agar MacConkey y en medios simples a temperatura ambiente y en un rango de pH 6,6 a 8,2 (Parker, 1999).

Está presente muy frecuentemente en los animales, entre las fuentes ambientales de este organismo se incluyen el agua, el suelo, los insectos, las superficies de las fábricas, las superficies de las cocinas, las heces fecales de los animales, las carnes crudas, el pollo crudo, los productos marinos crudos, entre otros. (Cisneros, 2005).

La gran mayoría de especies de *Salmonella* producen enfermedades diarreicas, osteomielitis y fiebres entéricas (fiebre tifoidea y paratifoidea). La transmisión es a través de la ingesta de alimentos contaminados o de persona a persona vía fecal-oral (Mims *et al.* 2002).

La salmonelosis es una infección bacteriana que generalmente afecta el tracto intestinal y ocasionalmente, el torrente sanguíneo. Constituye una de las causas más comunes de gastroenteritis y produce cientos de casos cada año. Estas bacterias causan normalmente septicemia y producen el tifo o fiebre tifoidea en los humanos; sus síntomas son: náuseas, vómitos, calambres abdominales, diarrea, fiebre y dolor de cabeza (University of Wisconsin-Madison, 2009).

1.4.2.- Levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares, no filamentosos; la mayoría de estas forman colonias de organismos unicelulares y son capaces de crecer como anaerobios facultativos. Normalmente, son células ovaladas o cilíndricas que se reproducen asexualmente por gemación o brotación y sexualmente mediante ascosporas o basidiosporas. Estos microorganismos prosperan en hábitats con abundante azúcar, tales como frutas, flores e incluso la corteza de los árboles. Las células de levaduras son mucho más grandes que las bacterias y pueden distinguirse no solo por su tamaño sino por la presencia de elementos intracelulares tales como el núcleo (Parker, 1999).

1.4.2.1.- Candida albicans

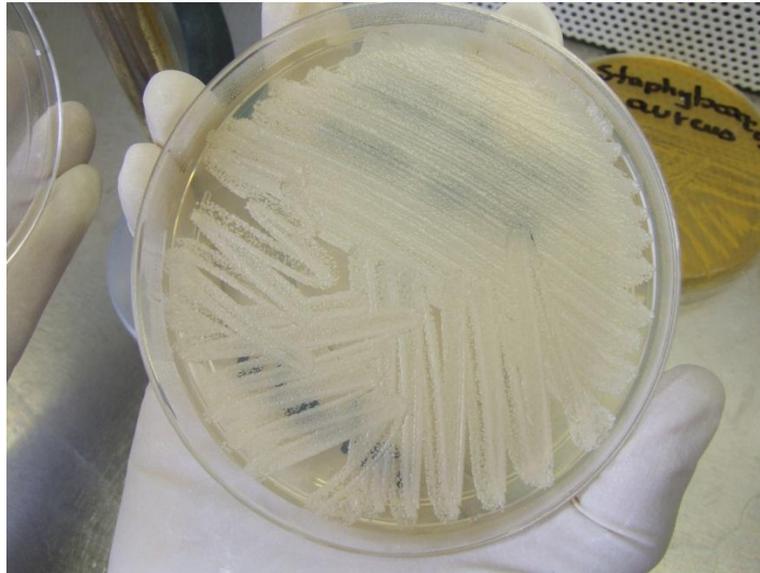


Ilustración 2.- Candida albicans.

Fuente: La autora, 2011.

Reino	Fungi
División	Deuteromycota
Clase	Blastomycetes
Familia	Cryptococcaceae
Género	Candida
Especie	C. albicans
Nombre binomial	<i>Candida albicans</i>

Tabla 6.- Clasificación científica, C. albicans.

Fuente: Sosa, 2010.

La *Candida albicans* es un hongo dimórfico que aparece como una levadura tiene un tamaño medio de 2 a 4 micras, crecimiento rápido, circular, liso, blanco o cremoso, pastoso y blando, de bordes precisos y centro ligeramente prominente. Son capaces de crecer en agar glucosado de Sabouraud o en medios de cultivo apropiados para el aislamiento de *Candida*; su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C y pH ácido (Mims *et al.* 2002).

Está asociada ecológicamente a seres vivos de sangre caliente. Por lo que normalmente vive en simbiosis con nuestro cuerpo; siendo los tractos digestivo y respiratorio, junto con la mucosa genital (vagina) los reservorios más importantes en los seres humanos (Spicer, 2009).

La humedad relativa de la mayor parte de las áreas de la piel limitan el crecimiento de *C. albicans* ya que requiere de bastante humedad; sin embargo coloniza con gran rapidez la piel lesionada y las áreas que a menudo están húmedas o maceradas provocando infecciones en la piel, infecciones pulmonares, candidiasis y muguet. Produce infecciones oportunistas en pacientes estresados, inmunodeprimidos o tratados con antibióticos (Parker, 1999).

1.5.- Ensayos de toxicidad

Son bioensayos que se realizan sobre tejidos vivos, líneas celulares, animales o grupos de organismos empleados para la identificación y cuantificación de los efectos adversos asociados a la exposición a determinados agentes físicos, químicos o de otras sustancias. Los bioensayos *in vitro* se refiere a los procedimientos que se realizan sobre material vivo o componentes de material vivo en placas petri o tubos de ensayo en condiciones definidas y constantes, donde se los expone a determinadas concentraciones del agente a ensayar por un lapso de tiempo determinado; en este tipo de ensayos siempre se cuenta con pruebas control en las cuales no se adiciona el agente

o el tóxico. Finalmente se observan los resultados de cada uno de los grupos y se registran los posibles efectos (Silbergeld, 2010).

Estos ensayos determinan los límites a los cuales los agentes o sustancias no producen ningún tipo de afección sobre el material vivo ensayado. Mientras que la dosis letal media (DL_{50}) es la cantidad de producto o agente que es necesario para eliminar a la mitad de los componentes de una muestra (Bezerra, 2010).

1.5.1.- *Artemia salina*



Figura 8.- Artemia salina – nauplio.

Fuente: Mazza, 2011.

Reino	Metazoa
Phylum	Arthropoda
Clase	Crustacea
Orden	Anostraca
Familia	Artemiidae
Género	Artemia
Especie	A. salina
Nombre binomial	<i>Artemia salina</i>

Tabla 7.- Clasificación científica, *A. salina*.

Fuente: Maceda, 2010.

Para medir la toxicidad de una planta o extracto se recurre con frecuencia a la prueba de *Artemia salina*; se trata de un pequeño camarón de la subclase de los anostráceos; los cuales conforma el plancton de las aguas continentales salobres de todo el mundo, cuyas larvas (nauplios) son sensibles a gran variedad de sustancias. Los huevos de la *A. salina* se venden como alimento de peces. Es un organismo completo en cuanto a sistemas enzimáticos se refiere. Se emplea no solo para evaluar la toxicidad de un vegetal, sino también como método de comprobación de actividad para algunos pesticidas, anestésicos, micotoxinas y toxinas de dinoflagelados. La actividad observada en el test de *A. salina* se expresa como toxicidad a los camarones. No es un ensayo específico sino de toxicidad general, aunque sirve también para el análisis de actividad de muchos pesticidas (Maceda, 2003).

Los bioensayos in vitro con *A. salina* son conciderados un examen preliminar a las fases de desarrollo de una nueva sustancia química para fármacos (Vettorazzi, 2010)

CAPÍTULO II

2.- Marco metodológico

2.1.- Levantamiento de información etnobotánica y recolección de la muestra de Kuiship (*Jacaranda copaia* (Aubl.) D.Don)

2.1.1.-Lugar de la recolección e investigación



Figura 9.- Mapa provincial del Ecuador

Fuente: Expedia, 2011.

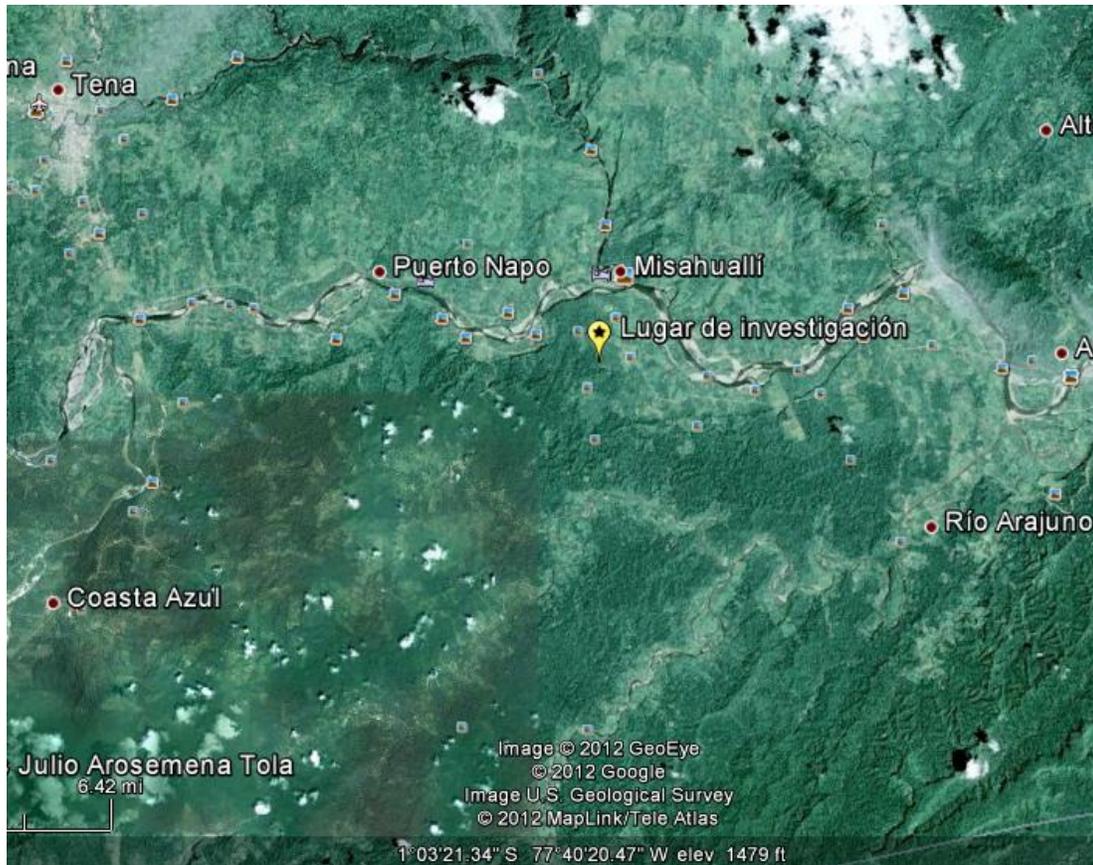


Figura 10.- Lugar de la investigación.

Fuente: Google earth, 2012.

La recolección del material vegetal e investigación etnobotánica se llevó a cabo al sur de la provincia de Napo, cantón Misahualli, comunidad de Capirona ubicada a una altura aproximada de 430 msnm con una presión atmosférica que bordea los 101080 Pa; su clima es cálido-húmedo con temperaturas promedio de 25°C y humedad relativa del 90%; pertenece al bosque muy húmedo tropical (bmhT).

2.1.2.-Levantamiento de información etnobotánica del Kuiship

2.1.2.1- Materiales

- Formularios impresos de la encuesta
- Esferográficos

2.1.2.2.- Procedimiento

Inicialmente se elaboró el perfil de las personas a ser encuestados (edad, sexo, actividad predominante, conocimiento de herbología) y se procedió a realizar las encuesta en la ciudad del Tena y zona de la comunidad Capirona, para conocer los usos ancestrales de dicha planta. (Ver Anexo 1)

2.1.3.- Recolección de la muestra vegetal

2.1.3.1.-Materiales

- Fundas plásticas
- Guantes

2.1.3.2.-Equipos

- Podadora
- Machete
- GPS GARMIN modelo GPSmap 60CSx

2.1.3.3.-Procedimiento

En la Comunidad de Capirona, sitio de la investigación, se procedió a seleccionar tres árboles de *J. copaia* con características similares, de éstos se tomaron tres muestras de hojas, a razón de 2 kilos cada muestra; con las que se conformó la muestra madre de 6 kilos. La recolección se llevó a cabo el día 20 de noviembre del 2011. Adicionalmente se tomaron tres muestras de flores, frutos, semillas y corteza

2.1.4.- Comprobación taxonómica e identificación botánica

Con el fin de comprobar la taxonomía e identificación de la especie objeto de la investigación, se tomaron tres muestras de hojas, flores, frutos, semilla y corteza, mismas que fueron entregadas al Herbario Nacional QCNE, quien certificó el ejemplar.

2.2.- Ejecución del screening fitoquímico de los extractos etéreo, alcohólico, acuoso de *J. copaia*.

2.2.1.- Lugar de investigación

Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Química Analítica del CIVABI en Universidad Politécnica Salesiana, Sede – Quito, Campus – El Girón.

2.2.2.- Preparación de los extractos etéreo, alcohólico y acuoso

2.2.2.1.- Materiales

- Muestra vegetal
- 3 frascos ámbar de boca ancha
- Probeta
- Papel filtro
- Embudo
- Vaso de precipitación

2.2.2.2.- Equipos

- Balanza DHAUS modelo Scout II

2.2.2.3.-Reactivos

- Éter etílico
- Alcohol
- Agua destilada

2.2.2.4.- Procedimiento

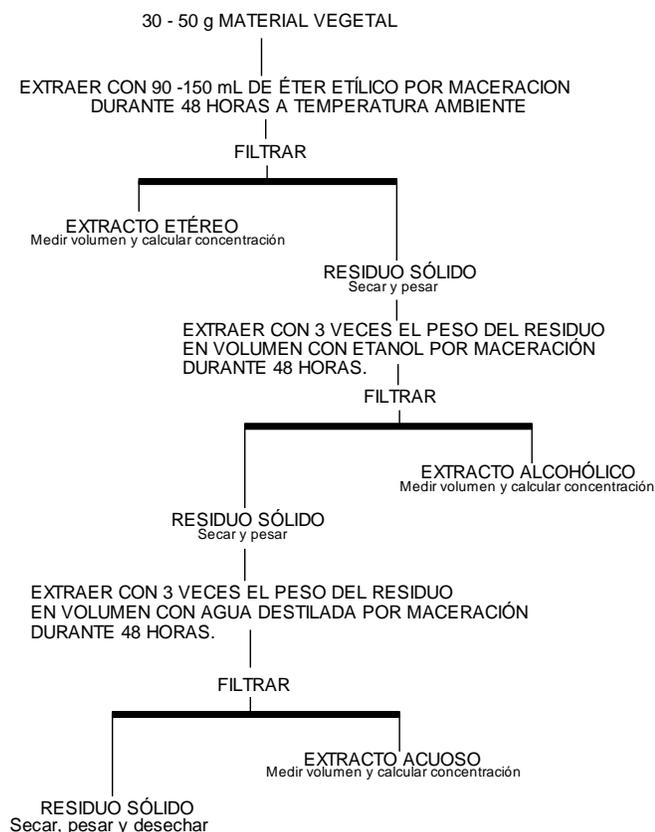


Figura 11.- Extracción sucesiva del material vegetal para el screening fitoquímico.

Fuente: Miranda, 2000.

- de la muestra madre se seleccionó solo hojas en un total de 50 gramos.
- se limpiaron las hojas y se eliminaron los cuerpos extraños.
- se lavó el material vegetal con abundante agua y cepillo.
- se dejó escurrir y secar por aproximadamente dos horas.
- se cortaron las hojas en pedazos pequeños de 1 a 3 cm.
- la planta fresca fue sometida a tres extracciones sucesivas con solventes de polaridad creciente (éter etílico, alcohol y agua destilada).

- se pesó el material vegetal, se lo depositó en un frasco y se colocó el solvente respectivo en un volumen de tres veces el peso del residuo.
- con cada solvente se dejó macerar la muestra vegetal por un período de 48 horas, sin incidencia de luz, a temperatura ambiente y con agitación constante durante 1 hora por día.
- transcurridas las 48 horas se filtró el contenido, se dejó secar el material vegetal y se colocó el siguiente solvente para la próxima maceración.
- todas las maceraciones se realizaron por triplicado.

2.2.3.-Screening fitoquímico

2.2.3.1.- Materiales

- Gradillas
- Tubos de ensayo
- Pipetas
- Papel filtro
- Capilar
- Pinzas

2.2.3.2.- Equipos

- Luz UV

2.2.3.3.- Reactivos

- Colorante Sudan III o IV
- Ácido clorhídrico al 1% y concentrado
- Cloruro de sodio
- Hidróxido de potasio
- Cloroformo
- Anhídrido acético
- Carbonato de sodio
- Cloruro férrico
- Tricloruro férrico al 5%
- Acetato de sodio
- Ninhidrina al 2%
- Cinta de magnesio metálico
- Alcohol amílico
- Ácido sulfúrico concentrado
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Baljet
- Reactivo de Kedde
- Reactivo de Fehling
- Solución salina al 0,9%
- Alcohol
- Agua destilada

2.2.3.4.- Procedimiento

El screening fitoquímico se lo realizó de acuerdo al Manual de Miranda (2000) y los ensayos se efectuaron por triplicado.

2.2.3.4.1.- Extracto etéreo

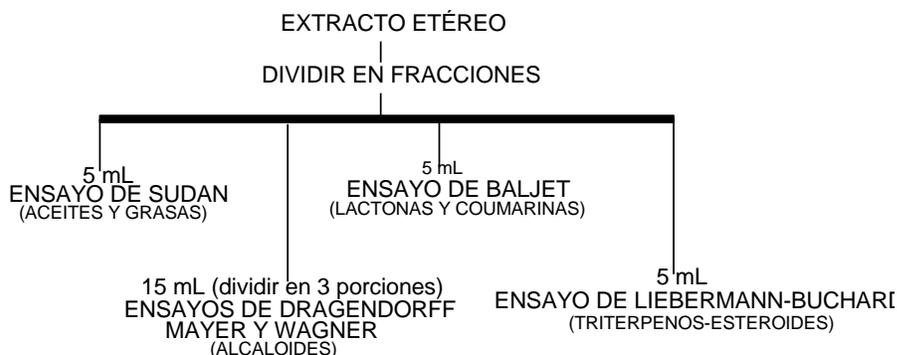


Figura 12.- Esquema de las reacciones a realizar en el extracto etéreo.

Fuente: Miranda, 2000.

- *Ensayo de Sudan.*- permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos grasos; a la alícuota del extracto se le añadió 1 mL de una solución diluida en agua del colorante Sudan III . Se calienta en baño de agua hasta la evaporación del solvente.
- *Ensayo de Dragendorff.*- permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides; si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporar en baño maría y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1 % en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta la acidez). Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo añadiendo 3 gotas del reactivo de Dragendorff.
- *Ensayo de Baljet.*- permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas. Para lo cual si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el

solvente en baño de agua y redisolverse en la menor cantidad de alcohol (1 mL). En estas condiciones se adiciona 1mL del reactivo.

- *Ensayo de Liebermann-Burchard.*- permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroides. Para lo cual si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño maría y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayos se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar.

2.2.3.4.2.- Extracto alcohólico

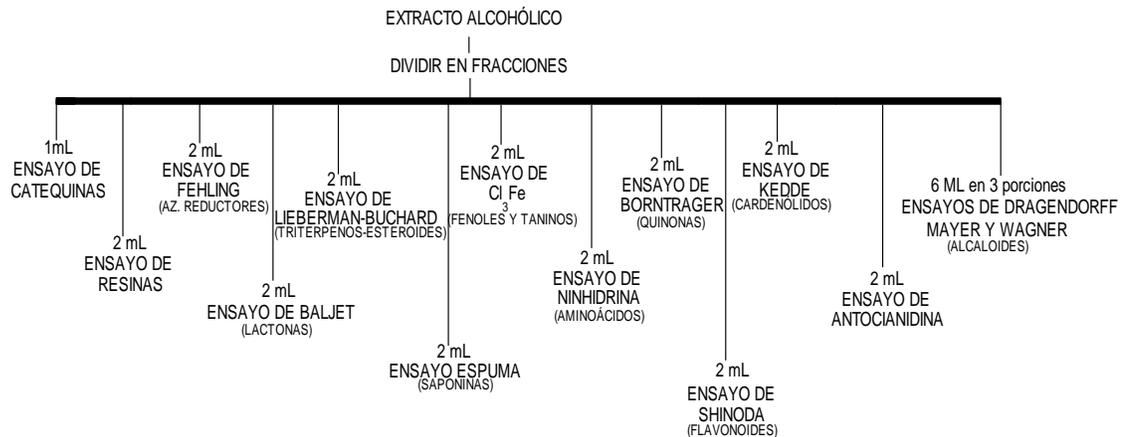


Figura 13.- Esquema de las reacciones a realizar en el extracto etanólico.

Fuente: Miranda, 2000.

- *Ensayo de catequinas.*- se toma una gota de la solución alcohólica obtenida y se la aplica sobre papel de filtro. Sobre la mancha aplique solución de carbonato de sodio.

- *Ensayo de resinas.*- para detectar estos compuestos se adiciona a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada.
- *Ensayo de Fehling.*- permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño maría y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla.
- *Ensayo de espuma.*- permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas. Si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.
- *Ensayo del cloruro férrico.*- permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9 % en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5 % en solución salina fisiológica.
- *Ensayo de la ninhidrina.*- reconoce en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de aminas. Se toma una alícuota del extracto en alcohol, o el residuo de la concentración en baño maría, si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, se mezcla con 2 mL de solución al 2% de ninhidrina en agua. La mezcla se calienta 5-10 minutos en baño de agua.

- *Ensayo de Borntrager.*- permite reconocer en un extracto la presencia de quinonas. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el solvente en baño maría y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio ó amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases y se deja en reposo hasta su posterior separación.
- *Ensayo de Shinoda.*- reconoce la presencia de flavonoides en el extracto. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen. Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.
- *Ensayo de Kedde.*- permite reconocer en un extracto la presencia de glicósidos cardiotónicos. Una alícuota del extracto en etanol se mezcla con 1 mL del reactivo y se deja reposar durante 5-10 minutos.
- *Ensayo de antocianidinas.*- reconoce en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras. Se calientan 2 mL del extracto etanólico 10 min. con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado. Se deja enfriar y se adiciona 1 mL de agua y 2 mL de alcohol amílico. Se agita y se deja separar las dos fases.

2.2.3.4.3.- Extracto acuoso

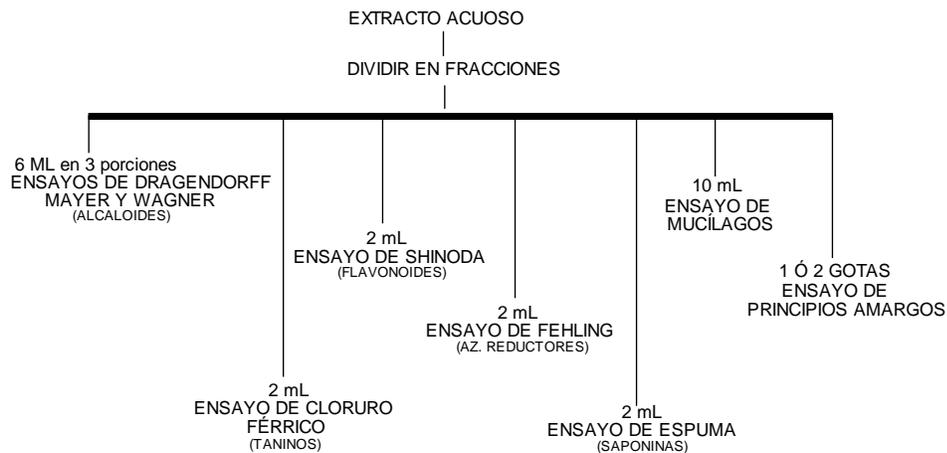


Figura 14.- Esquema de las reacciones a realizar en el extracto acuoso.

Fuente: Miranda, 2000.

- *Ensayo de mucílagos.*- permite reconocer en los extractos de vegetales la presencia de esta estructura tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para ello una alícuota del extracto en agua se enfría a 0-5 °C.
- *Ensayo de principios amargos y astringentes.*- el ensayo se realiza saboreando 1 gota del extracto acuoso o del vegetal y se reconoce el sabor de cada uno de estos principios, bien diferenciados al paladar.

2.2.3.5.- Proceso de identificación

La identificación se realizó de acuerdo al Manual de Miranda (2000).

- *Ensayo de Sudan.*- la presencia de compuestos grasos se considera positiva si aparecen gotas o una película coloreada de rojo en el seno del líquido o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente.
- *Ensayo de Dragendorff.*- si añadiendo 3 gotas del reactivo de Dragendorff, hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++).
- *Ensayo de Beljet.*- una vez puesto el reactivo se considera un ensayo positivo la aparición de coloración o precipitado rojo (++ y +++) respectivamente.
- *Ensayo de Liebermann-Burchard.*- un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración:
 - rosado-azul muy rápido.
 - verde intenso-visible aunque rápido.
 - verde oscuro-negro-final de la reacción.

A veces el ensayo queda en dos fases o desarrollo de color. Muy pocas veces puede observarse el primer cambio; el tercer cambio generalmente ocurre cuando el material evaluado tiene cantidades importantes de estos compuestos.

- *Ensayo de catequinas.*- la aparición de una mancha verde carmelita a la luz UV, indica un ensayo positivo.
- *Ensayo de resinas.*- la aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo.

- *Ensayo de Fehling.*- se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo.
- *Ensayo de la espuma.*- el ensayo se considera positivo si aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2 mm de altura y persistente por mas de 2 minutos.
- *Ensayo del cloruro férrico.*- un ensayo positivo puede dar la siguiente información:
 - Desarrollo de una coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.
 - Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
 - Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.
- *Ensayo de la ninhidrina.*- se considera positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo.
- *Ensayo de Borntrager.*- si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado o rojo, el ensayo se considera positivo. Coloración rosada (++) , coloración roja (+++).
- *Ensayo de Shinoda.*- el ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos.
- *Ensayo de Kedde.*- un ensayo positivo es en el que se desarrolla una coloración violáceo, persistente durante 1-2 horas.
- *Ensayo de antocianidinas.*- La aparición de color rojo a marrón en la fase amfílica, es indicativa de un ensayo positivo.

- *Ensayo de mucílagos.*- si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo.
- *Ensayo de principios amargos y astringentes.*- se saborea la muestra y se reconoce el sabor de cada uno de estos principios.

2.3.- Ensayos de actividad antibacteriana de los extractos de *J. copaia*.

2.3.1.- Lugar de investigación

Los ensayos se llevaron a cabo en los Laboratorios de Microbiología, Análisis proximal y Tecnologías aplicadas del CIVABI en la Universidad Politécnica Salesiana, Sede – Quito, Campus – El Girón.

2.3.2.- Materiales

- Frasco ámbar de boca ancha
- Embudo
- Papel filtro
- Vasos de precipitación
- Probeta
- Cajas petri
- Tubos de ensayo
- Asa bacteriológica
- Mechero
- Pipeta de 5 y 10 ml
- Micropipeta de 1000 y 100 ul
- Vidrio reloj
- Gradilla

- Discos de inhibición
- Celdas de cuarzo

2.3.3.- Equipos

- Balanza analítica MFTTLER TOLEDO modelo ML 204
- Agitador magnético Fisher Scientific modelo FS60D
- Autoclave Tuttnauer modelo 3870M
- Flujo laminar Forma Scientific modelo 1845
- Incubadora SHEL LAB modelo 1525
- Baño maría SHEL LAB modelo W14M-2
- Espectrofotómetro SHIMADZU-UVmini modelo 1240
- Refrigerador INDURAMA modelo R1-405 NO FROST
- Vortex Vortex Mixer – K modelo VM300
- Micropipeta de 10 – 100ul Nichiryo-Nichipet Ex modelo E03010282
- Micropipeta de 100 – 1000ul DROPTEK modelo DX40216

2.3.4.- Reactivos y Medios de cultivo

- Agua destilada
- Ácido sulfúrico
- Cloruro de bario
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Agar Mueller Hinton
- Caldo tripticasa-soja (TSB)
- Caldo Mueller Hinton

2.3.5.- Cepas

La actividad microbiana de los diferentes extractos fue estudiada en cepas nativas provenientes del Laboratorio de Microbiología DISerlab – PUCE.

- *Staphylococcus aureus* (Ver Anexo 2)
- *Bacillus pumilus* (Ver Anexo 3)
- *Escherichia coli* (Ver Anexo 4)
- *Salmonella sp.* (Ver Anexo 5)
- *Candida albicans* (Ver Anexo 6)

2.3.6.-Procedimiento

De acuerdo a los resultados obtenidos en el estudio etnobotánico y en el screening fitoquímico de la planta, se procedió a establecer los siguientes ensayos para comprobar la actividad biológica de inhibición y su concentración mínima inhibitoria de acuerdo a los métodos de Kirby – Bauer y dilución en caldo descritos en el Manual de Microbiología de Gamazo (2005).

2.3.6.1.- Determinación de sensibilidad de las bacterias frente a los extractos

El ensayo de sensibilidad se lo realizó de acuerdo al método de difusión en disco de Kirby – Bauer por triplicado (Gamazo *et al.* 2005).

2.3.6.1.1.- Preparación de los extractos a ensayar



Ilustración 3.- Concentración de extractos en baño maría.

Fuente: La autora, 2011.

- Los extractos utilizados fueron los obtenidos por maceración para el screening fitoquímico.
- Los solventes (éter etílico, etanol y agua) de los extractos fueron evaporados en su totalidad a baño maría a una temperatura inferior a 40° C.
- Se pesó 800 mg de cada extracto seco y se los disolvió en 4 ml de DMSO respectivamente; se utilizó el ultrasonido para lograr una mejor dilución. La concentración final de estos extractos fue de 200000 ug/ml.
- Se pesó 400 mg de cada extracto seco y se los disolvió en 4 ml de DMSO respectivamente; se utilizó el ultrasonido para lograr una mejor disolución. La concentración final de estos extractos fue de 100000 ug/ml.
- Se trabajó con dos concentraciones (200000 ug/ml y 100000 ug/ml) por cada extracto.

2.3.6.1.2.- Preparación de los medio de cultivo

- Tryptic soy broth (TSB) se preparó a partir del reactivo comercial deshidratado y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se disolvió 30 g de TSB en un litro de agua destilada, se calentó hasta obtener una dilución clara, se transfirió 10 ml a cada tubo de ensayo con tapa y posteriormente se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121° C. Los tubos de ensayo estériles y se mantienen a temperatura ambiente hasta el momento de usarlos.
- El agar Mueller Hinton se preparó a partir del reactivo comercial deshidratado y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se disolvió 38 g de agar en un litro de agua destilada, se calentó hasta obtener una dilución clara y se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°C. Después de autoclavar, en la cámara de flujo previamente preparada, se vertió el preparado fresco y tibio en las placas petri estériles de fondo plano, aproximadamente se sirvió 25 ml de agar por cada caja, se dejó enfriar el medio a temperatura ambiente y finalmente las placas selladas y envueltas en papel aluminio fueron almacenadas en el refrigerador hasta el momento de usarlas.

2.3.6.1.3.- Preparación de los sensidiscos

- Los discos que fueron utilizados para los diferentes extractos se los fabricó a partir de papel filtro, marca Whatman con 98% de celulosa, el diámetro de los discos fue de 5,9 mm y 0,6 mm de grosor parámetros que se asemejan a los discos en blanco estandarizados; se los colocó en una caja petri sellada y se esterilizó en autoclave a 121° C por 15 minutos. Los discos de papel fueron conservados a temperatura ambiente hasta su uso.
- Los discos con antibióticos para los controles se los conservó en refrigeración hasta su uso. Se utilizó como control positivo para las bacterias gram positivas y gram negativas discos de gentamicina de 10 ug y para la levadura discos de clotrimazol 200 mg.

2.3.6.1.4.- Preparación del estándar de turbidez 0.5 McFarland

Para estandarizar la densidad del inóculo bacteriano para las pruebas de sensibilidad, se utilizó el estándar de turbidez 0.5 McFarland. Se mezcló 0,25 ml de BaCl_2 (1,175% p/v) con 49,75 ml de H_2SO_4 (1% v/v); la suspensión se agitó en vortex (Malbrán, 2001). Se verificó la densidad del estándar de turbidez en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm. La suspensión de sulfato de bario fue almacenada en tubos con tapa rosca, en la oscuridad y a temperatura ambiente.

2.3.6.1.5.- Preparación del inóculo bacteriano

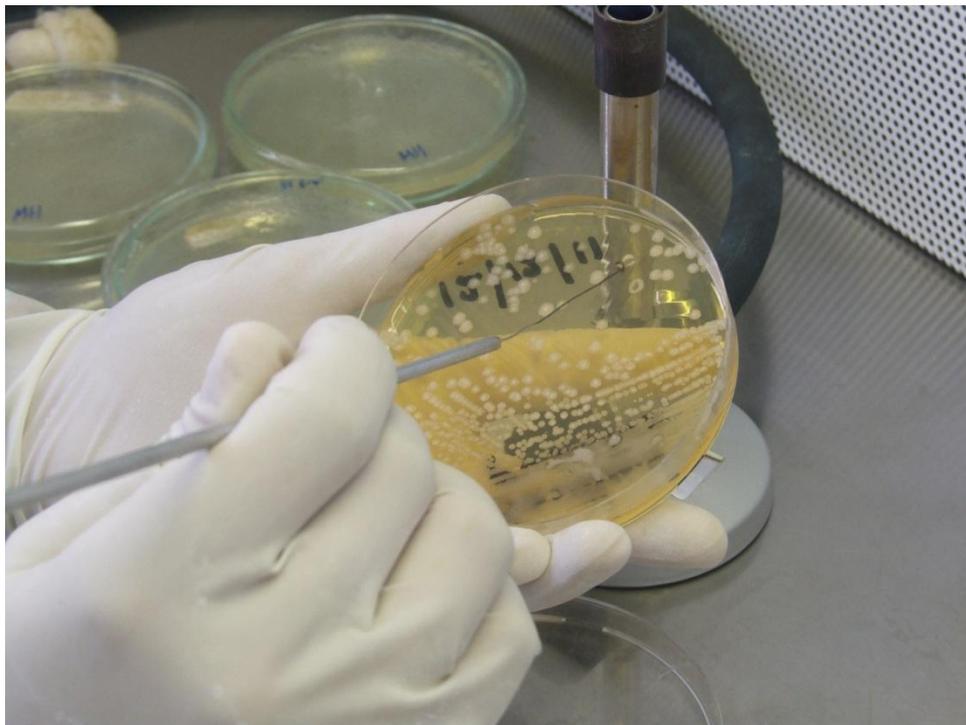


Ilustración 4.- Preparación de inóculo bacteriano.

Fuente: La autora, 2011.

- Con un asa estéril se tomó 3 colonias asiladas del microorganismo y se las transfirió a un tubo de ensayo con 10 ml de TSB estéril.

- Se dejó incubar a 37° C por tres horas.
- Se transfirió 5 ml del tubo de ensayo inoculado a otro tubo estéril; estos se utilizó para determinar la densidad óptica de la muestra en el espectrofotómetro.
- Se ajustó la turbidez de la suspensión bacteriana adicionando agua estéril a los 5 ml restantes, hasta lograr una turbidez equivalente al estándar 0.5 de McFarland.
- El procedimiento se lo llevó a cabo en la cámara de flujo laminar.
- Se realizó el mismo procedimiento para todos los microorganismos por triplicado.

2.3.6.1.6.- Inoculación de las placas



Ilustración 5.- Inoculación en placas.

Fuente: La autora, 2011.

- Después que se ajustó la turbidez de la suspensión bacteriana, un hisopo de algodón estéril se sumerge en ella. El hisopo fue rotado varias veces y presionado contra la pared interna del tubo sobre el nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.
- Se inoculó la superficie de una placa de agar Mueller Hinton con el hisopo pasándolo uniformemente por toda la superficie en tres direcciones y por el perímetro externo del agar. Se dejó secar 5 minutos con la tapa de la caja entreabierta.
- El procedimiento se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar.
- Se realizó el mismo procedimiento para todos los microorganismos y los ensayos se realizaron por triplicado.

2.3.6.1.7.- Aplicación de los discos a las placas inoculadas

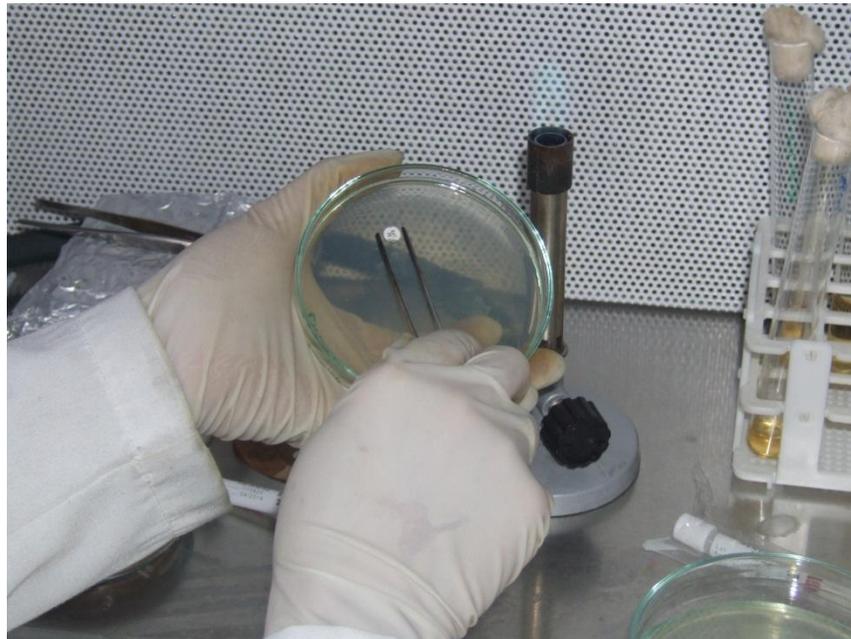


Ilustración 6.- Aplicación de discos.

Fuente: La autora, 2011.

- Se embebió los discos estériles en las concentraciones de cada extracto.
- Se colocó 8 discos equidistantes sobre la superficie del agar utilizando pinzas estériles y apretándolos suavemente para asegurar el contacto pleno con la superficie. Como control positivo se utilizó los discos con antibióticos y como control negativo se utilizó discos impregnados con DMSO.
- Se dejó las placas 15 minutos a temperatura ambiente para que comiencen a difundirse los extractos.
- Las placas selladas e invertidas fueron puestas en la incubadora a 37° C por 24 horas.
- El procedimiento se lo llevó a cabo en la cámara de flujo laminar.
- Se realizó el mismo procedimiento para todos los microorganismos y los ensayos se realizaron por triplicado.

2.3.6.1.8.- Lectura de las placas e interpretación de resultados

- Después de las 24 horas de incubación cada placa fue examinada. Se midió en milímetros los diámetros de los halos de inhibición.
- Los tamaños de los halos fueron interpretados de acuerdo a las técnicas de comprobación de actividad terapéutica de las plantas medicinales (Alonso, 2006). Donde se consideró con actividad antibacteriana positiva si el halo fue mayor a 9 mm; si el halo se encontró entre 6 – 9 mm la actividad se consideró intermedia o moderada y si el halo fue menor a 6 mm se consideró actividad bacteriana negativa o sin actividad.

2.3.6.1.9.- Análisis estadístico

En el programa Statistix se realizó el análisis de varianza ANOVA de 2 vías con las siguientes hipótesis:

- *Hipótesis Nula 1 (HN1)*

No existe diferencia significativa de inhibición por el tipo de extracto.

- *Hipótesis Nula 2 (HN2)*

No existe diferencia significativa de inhibición por el tipo de bacterias.

- *Hipótesis Alternativa 1 (HA1)*

Existe al menos un extracto que inhibe de manera diferente a las bacterias.

- *Hipótesis Alternativa 2 (HA2)*

Existe al menos una bacteria que presenta inhibición diferente con los extractos.

- *Hipótesis Alternativa 3 (HA3)*

Existe alguna interacción extracto-bacteria que inhibe de manera diferente.

Se trabajó con un nivel de significancia de α : 0.05. Y se efectuó un test a posteriori de Tukey con el que se discriminó los grupos de datos que fueron diferentes entre sí.

2.3.6.2.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Se utilizó el método de dilución en caldo de acuerdo al Manual de Microbiología de Gamazo (2005).

2.3.6.2.1.- Selección de bacteria y extracto según su sensibilidad

Las bacterias que presentaron sensibilidad (*S. aureus* y *E. coli*) frente a los extractos (etéreo y acuoso) de *J. copaia* fueron seleccionadas para continuar con el ensayo de concentración mínima inhibitoria.

2.3.6.2.2.- Preparación de los extractos a ensayar

Se utilizó los mismos extractos que fueron preparados para las pruebas de sensibilidad; se trabajó con dos concentraciones (200000 ug/ml y 100000 ug/ml) por cada extracto. (Ver 2.3.6.1.1)

2.3.6.2.3.- Preparación de los medio de cultivo

- Tryptic soy broth (TSB) se preparó a partir del reactivo comercial deshidratado y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se disolvió 30 g de TSB en un litro de agua destilada, se calentó hasta obtener una dilución clara, se transfirió 10 ml a cada tubo de ensayo con tapa y posteriormente se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121° C. Los tubos de ensayo se sacan del autoclave y se mantienen a temperatura ambiente hasta el momento de usarlos.
- El caldo Mueller Hinton se preparó a partir del reactivo comercial deshidratado y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se disolvió 22 g del reactivo en un litro de agua destilada, se calentó hasta obtener una dilución clara, se transfirió 19,8 ml y 1 ml a tubos de ensayo con tapa. Se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121° C; se sacaron los tubos del autoclave y se mantienen a temperatura ambiente hasta el momento de su uso.
- El agar Mueller Hinton se preparó a partir del reactivo comercial deshidratado y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se disolvió 38 g de agar en un litro de agua destilada, se calentó hasta obtener una dilución clara y se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°C. Después de autoclavar, en la cámara de flujo previamente preparada se vertió el preparado fresco y tibio en las placas petri de fondo plano, aproximadamente se sirvió 25 ml de agar por cada caja, se dejó enfriar el medio a temperatura ambiente y finalmente las placas selladas y envueltas en papel aluminio se almacenaron en el refrigerador hasta el momento de usarlas.

2.3.6.2.4.- Preparación del estándar de turbidez 0.5 McFarland

Se trabajó con el mismo estándar preparado para las pruebas de sensibilidad (Ver 2.3.6.1.4)

2.3.6.2.5.- Preparación del inóculo bacteriano

Se preparó el inóculo de las bacterias (*S. aureus* y *E. coli*) que presentaron sensibilidad a los extractos etéreo y acuoso de *J. copaia*.



Ilustración 7.- Preparación del inóculo bacteriano.

Fuente: La autora, 2011.

- Con un asa estéril se toman 3 colonias asiladas del microorganismo y se transfiere a un tubo de ensayo con 10 ml de caldo TSB estéril.
- Se incuba a 37° C por tres horas.
- Se transfiere 5 ml del tubo de ensayo inoculado a otro tubo estéril; estos se utilizó para determinar la densidad óptica de la muestra en el espectrofotómetro.

- Se ajusta la turbidez de la suspensión bacteriana adicionando agua estéril a los 5 ml restantes, hasta lograr una turbidez equivalente al estándar 0.5 de McFarland.
- Se toman 0,2 ml de la suspensión bacteriana con la turbidez adecuada y se mezclan en 19,8 ml de caldo Mueller Hinton.
- El procedimiento se lo lleva a cabo en la cámara de flujo laminar.

2.3.6.2.6.- Preparación de los tubos con extracto

- La solución madre se preparó según lo descrito en el apartado 2.3.6.1.1.
- La solución madre de los extractos usados como antibióticos son: para *S. aureus*, el extracto etéreo de Kuiship a una concentración de 100000 ug/ml y para *E. coli* el extracto acuoso de Kuiship a una concentración de 200000 ug/ml.
- Se preparan 10 tubos con 1 ml de caldo Mueller Hinton estériles.
- Se añade 1 ml de la solución madre al primer tubo de ensayo con caldo Mueller Hinton y a partir de este se preparan diluciones dobles seriadas tomando 1ml del primer tubo y transfiriéndolo al segundo tubo con caldo. Después de mezclar bien el contenido del segundo tubo se transfieren 1 ml de este al tercer tubo con caldo y se continuó así sucesivamente hasta el decimo tubo con caldo, del cual se toma 1 ml y se descartó. De esta manera obtuvimos en el caso del extracto etéreo diluciones dobles desde 50000ug/ml hasta 97,656 ug/ml y en el extracto acuoso desde 100000 ug/ml hasta 195,312 ug/ml.
- El procedimiento se lo llevó a cabo en la cámara de flujo laminar.
- Las diluciones se realizaron por triplicado.

2.3.6.2.7.- Inoculación de los tubos

- Se añadió a cada tubo con extracto 1 ml del inóculo bacteriano que se preparó previamente (Ver 2.3.6.2.4); obteniendo un inóculo final aproximado de 5×10^5 UFC/ml.

- Las concentraciones finales de los extractos tras añadir el inóculo bacteriano fueron: para el etéreo desde 25000 ug/ml hasta 48,828 ug/ml y para el acuoso desde 50000 ug/ml hasta 97,656 ug/ml.
- El procedimiento se llevó a cabo en la cámara de flujo y los ensayos se realizaron por triplicado.
- Se incubó los tubos a 37° C durante 18 horas.

2.3.6.2.8.- Inoculación en placas



Ilustración 8.- Inoculación en placas.

Fuente: La autora, 2011.

- Transcuridas las 18 horas de incubación de los tubos con una micropipeta se tomó 100 ul de la suspensión y se la depositó en la superficie de la placa de agar Mueller Hinton, con la ayuda de una espátula de Dringalsky se extendió el inóculo.

- El procedimiento se llevó a cabo en la cámara de flujo.
- Se realizó el mismo procedimiento para todos los tubos con diferentes concentraciones de extracto. Los ensayos se realizaron por triplicado.
- Las cajas selladas e invertidas fueron incubadas a 37° C por 18 horas.
- Transcurridas las 18 horas de incubación, se examinaron cuidadosamente todas las placas y se determinó la concentración del extracto a partir del cual empezó a existir crecimiento bacteriano.

2.3.6.2.9.- Microdilución

- Se tomó como referencia de la inoculación en placas, la última concentración del extracto en el cual existió inhibición bacteriana y la primera concentración en la cual ya hubo crecimiento bacteriano, dentro de este rango se realizaron 4 microdiluciones.
- De igual manera se preparó los inóculos bacterianos. (Ver 2.3.6.2.4)
- Los tubos con antibiótico se prepararon dentro del rango previamente determinado. Para el extracto etéreo las concentraciones de las micro diluciones son: 10937 ug/ml, 9374 ug/ml, 7811 ug/ml y 6248 ug/ml; para el extracto acuoso las concentraciones de las micro diluciones son: 43630 ug/ml, 37500 ug/ml, 31250 ug/ml y 24800 ug/ml.
- Los tubos se inocularon con 1 ml de la suspensión bacteriana y se incubaron a 37° C durante 18 horas.
- Después del tiempo de incubación de los tubos se tomó con una micropipeta 100 ul de la suspensión y se la depositó en la superficie de la placa de agar Mueller Hinton, con la ayuda de una espátula de Dringalsky se extendió el inóculo. Las placas selladas e invertidas fueron incubadas a 37°C durante 18 horas.
- El procedimiento se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar.
- Se realizó el mismo procedimiento para todos los tubos con diferentes concentraciones de extracto. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado.

2.3.6.2.10.- Lectura de las placas

Después de la incubación se examinan cuidadosamente todas las placas y se identifica la última, que presentó inhibición en el crecimiento; siendo ésta la mínima concentración de extracto que inhibe el desarrollo de la bacteria.

2.4.- Bioensayo in vitro para evaluar la toxicidad de los extractos frente a *Artemia salina*

2.4.1.- Lugar de investigación

Los ensayos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Tecnologías aplicadas del CIVABI en la Universidad Politécnica Salesiana, Sede – Quito, Campus – El Girón.

2.4.2.-Materiales

- Vasos de precipitación
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Caja petri
- Papel filtro
- Botella plástica de 3 litros
- Piedra difusora de oxígeno

2.4.3.-Material biológico

Los huevos de *Artemia salina* fueron adquiridos en el Acuario Pissis en Quito.

2.4.4.-Equipos

- Micropipeta de 10 – 100 ul Nichiryo-Nichipet Ex modelo E03010282
- Micropipeta de 100 – 1000 ul DROPTEK modelo DX40216
- Refrigerador INDURAMA modelo RI-405 NO FROST
- Bomba de aire de doble salida Cole-Palmer modelo 500

2.4.5.-Reactivos

- Agua salina
- Dimetil sulfóxido

2.4.6.-Procedimiento

Se valoró la actividad tóxica in vitro de los extractos de Kuiship mediante el ensayo de letalidad con *Artemia salina* por triplicado.

2.4.6.1-Preparación del agua salina

Se pesó 35 g de sal marina y se disolvió en 1 litro de agua destilada en un vaso de precipitación, se agitó con una varilla de vidrio hasta que toda la sal quedó completamente disuelta y luego se filtró. Se midió el pH y se selló herméticamente; se conservó en refrigeración hasta el momento de su uso.

2.4.6.2- Incubación de los huevos de *A. salina*.

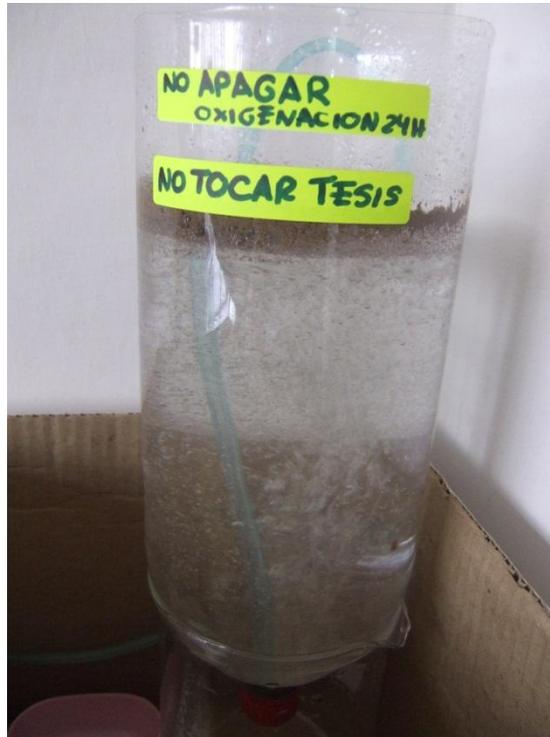


Ilustración 9.- Incubación de A. salina.

Fuente: La autora, 2012.

- Se cortó la base de una botella plástica de tres litros, en el pico se colocó una piedra difusora de oxígeno y se agregó 2 litros agua salina a una temperatura de 24° C.
- Se agregó una cucharada de huevos de *A. salina* y se dejó incubar.
- Las condiciones de incubación fueron: pH del agua salina 8, temperatura de incubación 24°C, tiempo de incubación 36 horas, oxigenación constante y se la colocó en un lugar oscuro.

2.4.6.3- Preparación de extractos

- Los extractos utilizados fueron los obtenidos en las maceraciones para el screening fitoquímico.
- Los solventes (éter etílico, etanol y agua) de los extractos fueron evaporados en su totalidad a baño maría a una temperatura inferior a 40° C.
- Se pesó 30 mg de extracto seco y se disolvió en 300 ul de DMSO; a esta mezcla se añadió 2,7 ml de agua salina y así se obtuvo la solución madre.
- Se tomó 400 ul de la solución madre y se mezcló con 3.6 ml de agua salina para tener una concentración de 1000 ppm. Se tomó 400 ul de la solución de 1000 ppm y se mezcló en 3.6 ml de agua salina para tener una concentración de 100 ppm. Se tomó 400ul de la solución de 100 ppm y se mezcló con 3.6 ml de agua salina para tener una concentración de 10 ppm. Se toman 200 ul de la solución madre y se mezcló con 3.8 ml de agua salina para tener una concentración de 500 ppm. Se tomó 400ul de la solución de 500 ppm y se mezcló con 3.6ml de agua salina para tener una concentración de 50 ppm. Se tomó 100 ul de la solución madre y se mezcló con 3.9 ml de agua salina para tener una concentración de 250 ppm. Finalmente se desechó 400 ul de las soluciones de 10, 50 y 250 ppm para mantener el mismo volumen en todos los tubos.
- Se obtienen de la manera antes indicada, cada una de las diluciones por triplicado

2.4.6.4- Preparación de controles

- Se preparó controles de DMSO en la misma proporción que en los tubos con la sustancia de ensayo. Se mezcló 300 ul de DMSO en 2.7 ml. de agua salina para obtener la solución madre y para el resto de diluciones; se siguió el proceso descrito en la preparación de extractos.
- Para el control de agua salina se tomó 10 tubos de ensayo y se colocó 4 ml de agua salina en cada uno.

2.4.6.5.- Incorporación de las artemias



Ilustración 10.- Incorporación de artemias a tubos con extractos.

Fuente: La autora, 2012.

- Transcurridas las 36 horas de incubación se observó que los huevos habían eclosionado y por tanto un sinnúmero de nauplios aparecieron nadando en el centro de la botella; mientras que los cascarones se depositaron en el fondo.
- Con la ayuda de una pipeta se colocaron 10 nauplios por tubo tanto en las diluciones como en los controles; se taparon los tubos con algodón y se ubicaron en las gradillas.
- Se incubó durante 24 horas, sin luz, a una temperatura de 24° C.
- El ensayo se realizó por triplicado.

2.4.6.6.- Recuento de artemias vivas y muertas

- Transcurridas las 24 horas de incubación se procedió al conteo de nauplios tanto vivos como muertos. Los muertos se depositaron en el fondo del tubo y los vivos se evidenciaron por ser móviles. Se anotó cualquier comportamiento anormal o problemas de la natación.
- Se inició el conteo por el control de agua salina, luego por el de DMSO y finalmente las diluciones.

2.4.6.7.- Interpretación de resultados

La toxicidad se expresa en porcentaje de mortalidad de *A. salina* y se interpreta:

Porcentaje de mortalidad	Grado de toxicidad
0 – 10 %	no tóxico
11 – 50 %	moderadamente tóxico
51 – 90%	altamente tóxico
100%	extremadamente tóxico

Tabla 8.- Grado de toxicidad.

Fuente: Borroto, 2010.

2.4.6.8.- Análisis estadístico

En el programa Statistix se realizó el análisis de regresión lineal con las siguientes hipótesis:

- *Hipotesis Nula* (HN)
La concentración del extracto no es directamente proporcional al porcentaje de mortalidad de las artemias.
- *Hipótesis Alternativa* (HA)
La concentración del extracto es directamente proporcional al porcentaje de mortalidad de las artemias.

Se trabajó con un nivel de significancia de α : 0.05.

Se determinó la dosis letal 50, por el método de mínimos cuadrados.

CAPÍTULO III

3.- Resultados

3.1.- Levantamiento de información etnobotánica y recolección de la muestra de Kuiship (*Jacaranda copaia* (Aubl.) D. Don)

3.1.1.- Información etnobotánica obtenida

La encuesta se realizó a tres personas de diferente comunidad; una del Tena, otra de Capirona y otra de las a fueras de Capirona. Las tres personas son consideradas Uhi Shñu (hombre sabio) en sus respectivas comunidades.

Los informantes involucrados fueron dos del sexo masculino y una del sexo femenino; sus edades fluctúan entre los 50 y 70 años. Las tres personas conocen la planta de estudio y la utilizan con fines maderables y medicinales; entre los etno-usos que le dan a la planta se puede citar para perder peso (30%), como cicatrizante (30%), para tratar infecciones de la piel (30%) y para combatir hongos de los pies (10%). Cabe recalcar que en dos encuestas se mencionó que los antiguos guerreros de las tribus bebían agua de esta planta antes de salir a las batallas y durante estas para no cansarse y evitar el hambre.

Las partes de la planta con fines medicinales que utilizan son las hojas (50 %) y semillas (50 %). Para las infecciones y hongos se lavan la zona afectada con la decocción de las hojas y el emplasto de estas se lo aplica sobre la lesión; como cicatrizante se aplica un emplasto de las hojas sobre la herida y para bajar de peso se toma la decocción de las semillas y el emplasto de estas se lo aplica sobre el abdomen. El uso del material vegetal es del 50% en decocción y el otro 50% en emplasto.

Las hojas como droga vegetal son utilizadas en cualquier momento del crecimiento de la planta; mientras que las semillas se las utiliza cuando estas caen del árbol.

Los nombres vernáculos de la *J. copaia* en el lugar de investigación (provincia de Napo) son: Pikshigua, Kuiship, Kupa, Rabo de ratón y Hoja de canoa. La sabiduría acerca de esta planta al ser un conocimiento ancestral se lo transmite de forma oral y a la misma línea de sangre es decir de padres a hijos o de abuelos a nietos. (Ver Anexo 1)

3.1.2.- Recolección de la muestra de Kuiship

Submuestra 1



Ilustración 11.- Submuestra 1 de J. copaia.

Fuente: La autora, 2011.

Familia	Bignoniaceae
Nombre científico	<i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D.Don.
Forma de vida	Arbol grande siempre verde
Altura de la planta	28 metros
Características	Arbol maduro en etapa de floración
Provincia	Napo
Localidad	Capirona
Coordenadas	S105.601 W7741.812
Altura	423 msnm
Recolector	Gabriela Armas
Fecha de recolección	20 de noviembre de 2011

Tabla 9.- Datos de recolección submuestra 1.

Fuente: La autora, 2011.

Submuestra 2



Ilustración 12.- Submuestra 2 de J. copaia.

Fuente: La autora, 2011.

Familia	Bignoniaceae
Nombre científico	<i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D. Don.
Forma de vida	Arbol grande siempre verde
Altura de la planta	27 metros
Características	Arbol maduro en etapa de floración
Provincia	Napo
Localidad	Capirona
Coordenadas	S105.453 W7741.817
Altura	438 msnm
Recolector	Gabriela Amas
Fecha de recolección	20 de noviembre de 2011

Tabla 10.- Datos de recolección submuestra 2.

Fuente: La autora, 2011.

Submuestra 3



Ilustración 13.- Submuestra 3 de J. copaia.

Fuente: La autora, 2011.

Familia	Bignoniaceae
Nombre científico	<i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D. Don.
Forma de vida	Arbol grande siempre verde
Altura de la planta	28 metros
Características	Arbol maduro en etapa de floración
Provincia	Napo
Localidad	Capirona
Coordenadas	S105.420 W7741.809
Altura	444 msnm
Recolector	Gabriela Amas
Fecha de recolección	20 de noviembre de 2011

Tabla 11.- Datos de recolección submuestra 3.

Fuente: La autora, 2011.

Muestra madre



Ilustración 14.- Muestra madre seca del material vegetal recolectado.

Fuente: La autora, 2011.

Al mezclar las tres submuestras recolectadas se formó una muestra madre de 6 kilos de la cual se tomó tres muestras de 50 g cada una para los posteriores análisis.

3.1.3.- Comprobación taxonómica

La comprobación taxonómica fue realizada por un especialista del Herbario Nacional QCNE, quien comprobó que la planta en estudio pertenece a la familia Bignoniaceae y a la especie *Jacaranda copaia* (Aubl.) D. Don. (Ver Anexo 7)

Las muestras analizadas fueron ingresadas al Herbario de la Universidad Politécnica Salesiana (QUPS) (Ver Anexo 8).

3.2.- Screening fitoquímico de los extractos etéreo, etanólico y acuoso de *J.copaia*.

3.2.1.- Extracto etéreo

3.2.1.1.-Maceración en éter etílico

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Nombre de la especie botánica	<i>J. copaia</i>	<i>J. copaia</i>	<i>J. copaia</i>
Órgano ensayado	Hojas	hojas	hojas
Peso del material	50 g	50 g	50 g
Volumen de éter etílico	150 ml	150 ml	150 ml
Tiempo de maceración	48 horas	48 horas	48 horas
Fecha de realización del ensayo	25 -11-2011	25 -11-2011	25 -11-2011
Fotografía	Anexo 9	Anexo 9	Anexo 9

Tabla 12.- Maceración en éter etílico de Jacaranda copaia (Aubl.) D.Don.

Fuente: La autora, 2011.

3.2.1.2.- Screening fitoquímico y análisis cualitativo

Ensayo	Metabolito	Presencia			Ausencia			Fotografía
		1	2	3	1	2	3	
Ensayo de Sudan	Aceites y grasas	X	X	X				Anexo 10
Ensayo de Dragendorff	Alcaloides				X	X	X	
Ensayo de Baljet	Lactonas Coumarinas				X	X	X	
Ensayo de Liebermann- Buchard	Triterpenos esteroides	X	X	X				Anexo 11

Tabla 13.- Screening fitoquímico del extracto etéreo de *J. copaia* para identificación de compuestos. 1= primer ensayo; 2= segundo ensayo; 3= tercer ensayo.

Fuente: La autora, 2011.

La tabla 13, muestra la composición química del extracto etéreo de *J. copaia* donde se evidencia tanto la presencia de aceites y grasas como la de triterpenos y esteroides en cantidades importantes.

3.2.2- Extracto etanólico

3.2.2.1.-Maceración en etanol

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Nombre de la especie botánica	<i>J. copaia</i>	<i>J. copaia</i>	<i>J. copaia</i>
Órgano ensayado	Hojas	Hojas	Hojas
Peso del material	44 g	43,2 g	43
Volumen de etanol	132 ml	130 ml	129 ml
Tiempo de maceración	48 horas	48 horas	48 horas
Fecha de realización del ensayo	28 -11-2011	28 -11-2011	28 -11-2011
Fotografía	Anexo 12	Anexo 12	Anexo 12

Tabla 14.- Maceración en etanol de Jacaranda copaia (Aubl.) D.Don.

Fuente: La autora, 2011.

3.4.2.2.- Screening fitoquímico y análisis cualitativo

Ensayo	Metabolito	Presencia			Ausencia			Fotografía
		1	2	3	1	2	3	
Ensayo de Catequinas	Catequinas	X	X	X				Anexo 13
Ensayo de Resinas	Resinas				X	X	X	
Ensayo de Fehling	Azúcares reductores	X	X	X				Anexo 14
Ensayo de Baljet	Lactonas Coumarinas				X	X	X	
Ensayo de Liebermann-Buchard	Triterpenos Esteroides	X	X	X				Anexo 15
Ensayo de Espuma	Saponinas	X	X	X				Anexo 16
Ensayo de cloruro férrico	Fenoles Taninos	X	X	X				Anexo 17
Ensayo de ninhidrina	Aminoácidos libres				X	X	X	
Ensayo de Borntrager	Quinonas	X	X	X				Anexo 18
Ensayo de Shinoda	Flavonoides				X	X	X	
Ensayo de Kedde	Cardenólidos				X	X	X	
Ensayo de Antocianidinas	Antocianidinas				X	X	X	
Ensayo de Dragendorff	Alcaloides	X	X	X				Anexo 19

Tabla 15.- Screening fitoquímico del extracto etanólico de *J. copaia* para identificación de compuestos. 1= primer ensayo; 2= segundo ensayo; 3= tercer ensayo.

Fuente: La autora, 2011.

La tabla 15, muestra la composición química del extracto etanólico de *J. copaia* donde se evidencia la presencia de catequinas, saponinas, azúcares reductores, triterpenos, alcaloides, quinonas, fenoles y taninos.

3.2.3.- Extracto acuoso

3.2.3.1.-Maceración en agua

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Nombre de la especie botánica	<i>J. copaia</i>	<i>J. copaia</i>	<i>J. copaia</i>
Órgano ensayado	Hojas	Hojas	hojas
Peso del material	40 g	39 g	39,1
Volumen de agua	120 ml	117 ml	117,3 ml
Tiempo de maceración	48 horas	48 horas	48 horas
Fecha de realización del ensayo	30-11- 2011	30-11- 2011	30-11- 2011
Fotografía	Anexo 20	Anexo 20	Anexo 20

Tabla 16.- Maceración en agua de *Jacaranda copaia* (Aubl.) D.Don.

Fuente: La autora, 2011.

3.2.3.2.- Screening fitoquímico y análisis cualitativo

Ensayo	Metabolito	Presencia			Ausencia			Fotografía
		1	2	3	1	2	3	
Ensayo de Dragendorff	Alcaloides				X	X	X	
Ensayo de cloruro férrico	Taninos	X	X	X				Anexo 21
Ensayo de Shinoda	Flavonoides				X	X	X	
Ensayo de Fehling	Azúcares reductores	X	X	X				Anexo 22
Ensayo de espuma	Saponinas				X	X	X	
Ensayo de mucílagos	Mucílagos				X	X	X	
Ensayo de Pricipios amargos	Pricipios amargos	X	X	X				

Tabla 17.- Screening fitoquímico del extracto acuoso de *J. copaia* para identificación de compuestos.

Fuente: La autora, 2011.

La tabla 17, muestra la composición química del extracto acuoso de *J. copaia* donde se evidencia la presencia de taninos, azúcares reductores y principios amargos.

3.3.- Actividad antibacteriana

3.3.1.- Sensibilidad de las bacterias – difusión en agar

Según el método descrito en el apartado 2.3.6.1 se determinó los tamaños de los halos; los mismos que fueron interpretados de acuerdo a las técnicas de comprobación de actividad terapéutica de las plantas medicinales (Alonso, 2006) donde se consideró con actividad antibacteriana positiva o sensible (S) si el halo fue mayor a 9 mm; si el halo se encontró entre 6 – 9 mm la actividad se consideró intermedia o moderada (I) y si el halo fue menor a 6 mm se consideró actividad bacteriana negativa o resistente (R).

3.3.1.1.- *Staphylococcus aureus*

	Control + Gentamicina 10 ug	E. etéreo 200 mg/ml	E. etéreo 100 mg/ml	E. Etanólico 200 mg/ml	E. Etanólico 100 mg/ml	E. Acuoso 200 mg/ml	E. Acuoso 100 mg/ml
Caja 1	27	14,35	9,0	7,0	6,5	7,1	6,8
Caja 2	27	14,35	8,95	7,1	6,8	7,0	6,8
Caja 3	27	14,50	8,92	7,3	6,8	7,1	6,9

Tabla 18.- *Staphylococcus aureus*, tamaño del halo de inhibición en milímetros.

(Ver Anexo 23)

Fuente: La autora, 2011.

En la tabla 18 se puede observar que *S. aureus* tiene inhibición frente a los tres extractos de *J. copaia* con un halo de mayor tamaño ($x = 14,40$) en el extracto etéreo con concentración de 200 mg/ml.

	Control + Gentamicina 10 ug	E. etéreo 200 mg/ml	E. etéreo 100 mg/ml	E. Etanólico 200 mg/ml	E. Etanólico 100 mg/ml	E. Acuoso 200 mg/ml	E. Acuoso 100 mg/ml
Caja 1	S	S	S	I	I	I	I
Caja 2	S	S	S	I	I	I	I
Caja 3	S	S	S	I	I	I	I

Tabla 19.- *Staphylococcus aureus*, categorías de sensibilidad: Sensible (S);

Intermedio (I).

Fuente: La autora, 2011.

En la tabla 19 se puede observar que *S. aureus* presenta sensibilidad ante el extracto etéreo en sus dos concentraciones (200 mg/ml y 100 mg/ml) y tiene una sensibilidad intermedia frente a los demás extractos.

3.3.1.2.- *Bacillus pumilus*

	Control + Gentamicina 10 ug	E. etéreo 200 mg/ml	E. etéreo 100 mg/ml	E. Etanólico 200 mg/ml	E. Etanólico 100 mg/ml	E. Acuoso 200 mg/ml	E. Acuoso 100 mg/ml
Caja 1	27	----	----	6,9	6,2	7,7	7,0
Caja 2	27	----	----	7,1	6,1	7,6	7,0
Caja 3	27	----	----	6,9	6,1	7,7	7,0

Tabla 20.- *Bacillus pumilus*, tamaño del halo de inhibición en milímetros.

(Ver Anexo 24)

Fuente: La autora, 2011.

En la tabla 20 se puede observar que *B. pumilus* tiene inhibición frente a los extractos etanólico y acuoso de *J. copaia* con un halo de mayor tamaño ($x = 7,66$) en el extracto acuoso, con concentración de 200 mg/ml.

	Control + Gentamicina 10 ug	E. etéreo 200 mg/ml	E. etéreo 100 mg/ml	E. Etanólico 200 mg/ml	E. Etanólico 100 mg/ml	E. Acuoso 200 mg/ml	E. Acuoso 100 mg/ml
Caja 1	S	R	R	I	I	I	I
Caja 2	S	R	R	I	I	I	I
Caja 3	S	R	R	I	I	I	I

Tabla 21.- *Bacillus pumilus*, categorías de sensibilidad: Sensible (S); Intermedio (I);

Resistente (R).

Fuente: La autora, 2011.

En la tabla 21 se puede observar que *B. pumilus* presenta sensibilidad intermedia frente a las dos concentraciones de extractos etanólico y acuoso (200 mg/ml y 100 mg/ml); mientras que es resistente ante el extracto etéreo.

3.3.1.3.- *Escherichia coli*

	Control + Gentamicina 10 ug	E. etéreo 200 mg/ml	E. etéreo 100 mg/ml	E. Etanólico 200 mg/ml	E. Etanólico 100 mg/ml	E. Acuoso 200 mg/ml	E. Acuoso 100 mg/ml
Caja 1	23	----	----	7,1	----	8,9	6,5
Caja 2	23	----	----	7,1	----	8,8	6,5
Caja 3	23	----	----	7,2	----	8,9	6,5

Tabla 22.- *Escherichia coli*, tamaño del halo de inhibición en milímetros.

(Ver Anexo 25)

Fuente: La autora, 2011.

En la tabla 22 se puede observar que *E. coli* tiene inhibición frente a los extractos etanólico y acuoso de *J. copaia* con un halo de mayor tamaño ($x = 8,86$) en el extracto acuoso, con concentración de 200 mg/ml.

	Control + Gentamicina 10 ug	E. etéreo 200 mg/ml	E. etéreo 100 mg/ml	E. Etanólico 200 mg/ml	E. Etanólico 100 mg/ml	E. Acuoso 200 mg/ml	E. Acuoso 100 mg/ml
Caja 1	S	R	R	I	R	S	I
Caja 2	S	R	R	I	R	S	I
Caja 3	S	R	R	I	R	S	I

Tabla 23.- *Escherichia coli*, categorías de sensibilidad: Sensible (S); Intermedio (I); Resistente (R).

Fuente: La autora, 2011.

En la tabla 23 se puede observar que *E. coli* es sensible ante el extracto acuoso con concentración de 200 mg/ml; presenta una sensibilidad intermedia frente a los extractos etanólico (200 mg/ml) y acuoso (100 mg/ml) y es resistente ante el extracto etéreo.

3.3.1.4.- *Salmonella sp.*

	Control + Gentamicina 10 ug	E. etéreo 200 mg/ml	E. etéreo 100 mg/ml	E. Etanólico 200 mg/ml	E. Etanólico 100 mg/ml	E. Acuoso 200 mg/ml	E. Acuoso 100 mg/ml
Caja 1	26	-----	-----	-----	-----	8	6,6
Caja 2	26	-----	-----	-----	-----	8	6,6
Caja 3	26	-----	-----	-----	-----	7.8	6,5

Tabla 24.- *Salmonella sp.*, tamaño del halo de inhibición en milímetros. (Ver Anexo 26)

Fuente: La autora, 2011.

En la tabla 24 se puede observar que *Salmonella sp.* tiene inhibición solo frente al extracto acuoso de *J. copaia*, con un halo de mayor tamaño ($x = 7,93$) en la concentración de 200 mg/ml.

	Control + Gentamicina 10 ug	E. etéreo 200 mg/ml	E. etéreo 100 mg/ml	E. Etanólico 200 mg/ml	E. Etanólico 100 mg/ml	E. Acuoso 200 mg/ml	E. Acuoso 100 mg/ml
Caja 1	S	R	R	R	R	I	I
Caja 2	S	R	R	R	R	I	I
Caja 3	S	R	R	R	R	I	I

Tabla 25.- *Salmonella sp.*, categorías de sensibilidad: Sensible (S); Intermedio (I);

Resistente (R).

Fuente: La autora, 2011.

En la tabla 25 se puede observar que *Salmonella sp.* presenta sensibilidad intermedia frente a las dos concentraciones del extracto acuoso (200 mg/ml y 100 mg/ml); mientras que es resistente ante los demás extractos.

3.3.1.5.- *Candida albicans*

	Control + Clotrimazol 200 mg	E. etéreo 200 mg/ml	E. etéreo 100 mg/ml	E. Etanólico 200 mg/ml	E. Etanólico 100 mg/ml	E. Acuoso 200 mg/ml	E. Acuoso 100 mg/ml
Caja 1	11	----	----	----	----	----	----
Caja 2	11	----	----	----	----	----	----
Caja 3	11	----	----	----	----	----	----

Tabla 26.- *Candida albicans*, tamaño del halo de inhibición en milímetros.

(Ver Anexo 27)

Fuente: La autora, 2011.

En la tabla 26 se puede observar que *C. albicans* no presenta inhibición frente a ningún extracto de *J. copaia*.

	Control + Clotrimazol 200 mg	E. etéreo 200 mg/ml	E. etéreo 100 mg/ml	E. Etanólico 200 mg/ml	E. Etanólico 100 mg/ml	E. Acuoso 200 mg/ml	E. Acuoso 100 mg/ml
Caja 1	S	R	R	R	R	R	R
Caja 2	S	R	R	R	R	R	R
Caja 3	S	R	R	R	R	R	R

Tabla 27.- *Candida albicans*, categorías de sensibilidad: Sensible (S); Resistente (R).

Fuente: La autora, 2011.

En la tabla 27 se puede observar que *C. albicans* es resistente ante los tres extractos de *J. copaia*.

3.3.1.6.- Análisis estadístico

3.3.1.6.1.- Promedio de los halos para cada microorganismo

Extracto	Bacteria	Halo
e1	Sa	14.4
e2	Sa	8.96
et1	Sa	7.13
et2	Sa	6.7
a1	Sa	7.07
a2	Sa	6.83
e1	Bp	0
e2	Bp	0
et1	Bp	6.97
et2	Bp	6.13
a1	Bp	7.67
a2	Bp	7
e1	Ec	0
e2	Ec	0
et1	Ec	7.13
et2	Ec	0
a1	Ec	8.87
a2	Ec	6.50
e1	Ssp	0
e2	Ssp	0
et1	Ssp	0
et2	Ssp	0
a1	Ssp	7.93
a2	Ssp	6.57
e1	Ca	0
e2	Ca	0
et1	Ca	0
et2	Ca	0
a1	Ca	0
a2	Ca	0

Tabla 28.- Promedio de halos, datos que se introducen en el programa Statistix.

Fuente: La autora, 2012.

Datos de la tabla:

- e1 = extracto etéreo a una concentración de 200 mg/ml.
- e2 = extracto etéreo a una concentración de 100 mg/ml.
- et1 = extracto etanólico a una concentración de 200 mg/ml.
- et2 = extracto etanólico a una concentración de 100 mg/ml.
- a1 = extracto acuoso a una concentración de 200 mg/ml.
- a2 = extracto acuoso a una concentración de 100 mg/ml.
- Sa = *Staphylococcus aureus*.
- Bp = *Bacillus pumilus*.
- Ec = *Escherichia coli*.
- Ssp = *Salmonella sp.*
- Ca = *Candida albicans*

3.3.1.6.2.- Análisis de varianza ANOVA de 2 vías

En el programa Statistix se realizó el análisis de varianza ANOVA de 2 vías; se tomó en cuenta solo los microorganismos que presentaron inhibición en alguno de sus extractos para el análisis. Se trabajó con un nivel de significancia de α : 0.05.

Statistix 8.0

Analysis of Variance Table for HALO

Source	DF	SS	MS	F	P
EXTRACTO	5	96.022	19.2044	1.67	0.2031
BACTERIA	3	123.663	41.2209	3.58	0.0394
Error	15	172.804	11.5202		
Total	23	392.488			

Tabla 29.- ANOVA de dos vías; elaborado mediante Statistix.

Fuente: La autora, 2012.

- La variable extracto presenta un P mayor (0,2031) al nivel de significancia α : 0.05 por lo que se acepta la hipótesis nula 1: No existe diferencia significativa de inhibición por el tipo de extracto.
- La variable bacteria presenta un P menor (0,0394) al nivel de significancia α : 0.05 por lo que se acepta la hipótesis alternativa 2: Existe al menos una bacteria que presenta inhibición diferente con los extractos.

Se realizó un test a posteriori de Tukey para discriminar los grupos de datos que son diferentes entre sí.

3.3.1.6.3.- Test a posteriori de Tukey

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HALO for BACTERIA

BACTERIA	Mean	Homogeneous Groups
Sa	8.5150	A
Bp	4.6283	AB
Ec	3.7500	AB
Ssp	2.4167	B

Tabla 30.- Test de Tukey; elaborado mediante Statistix.

Fuente: La autora, 2012.

En la tabla 30 se puede apreciar que existen dos grupos de datos en los cuales sus promedios no son significativamente diferentes unos de otros; el primer grupo con medias similares, conformado por Sa – Bp – Ec, el segundo grupo de datos cuyas medias son similares son Bp – Ec – Ssp. También se puede considerar que Sa (*Staphylococcus aureus*) difiere de Ssp (*Salmonella sp*). Dando como resultado que la bacteria que presenta mayor inhibición frente a los extractos ensayados fue *Staphylococcus aureus*.

3.3.2.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se determinó la CMI únicamente de las bacterias que presentaron actividad antibacteriana positiva o sensible (S) en los ensayos de difusión en agar.

3.3.2.1.- *Staphylococcus aureus*

Dilución doble seriada

Concentración de extracto etéreo de Kuiship (mg/ml)	<i>S. aureus</i>
25	Ausencia
12,5	Ausencia
6,25	Crece
3,125	Crece
1,5625	Crece
0,78125	Crece
0,390625	Crece
0,1953125	Crece
0,09765625	Crece
0,048828125	Crece

Tabla 31.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por mg de extracto etéreo de *J. copaia* sobre *Staphylococcus aureus*. (Ver Anexo 28)

Fuente: La autora, 2012.

Como se puede observar en la tabla 31 dos de las concentraciones ensayadas tienen ausencia total de crecimiento bacteriano de *S. aureus*.

Microdilución

Concentración de extracto etéreo de Kuiship (mg/ml)	<i>S. aureus</i>
12,5	Ausencia
10,937	Crece
9,374	Crece
7,811	Crece
6,248	Crece

Tabla 32.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por mg de extracto etéreo de *J. copaia* sobre *Staphylococcus aureus* con microdilución.

(Ver Anexo 29)

Fuente: La autora, 2012.

El extracto etéreo de Kuiship presentó una concentración mínima inhibitoria de 12,5 mg/ml contra *S. aureus*.

3.5.2.2.- *Escherichia coli*

Dilución doble seriada

Concentración de extracto acuoso de Kuiship (mg/ml)	<i>E. coli</i>
50	Ausencia
25	Crece
12,5	Crece
6,25	Crece
3,125	Crece
1,5625	Crece
0,78125	Crece
0,390625	Crece
0,1953125	Crece
0,09765625	Crece

Tabla 33.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por mg de extracto acuoso de *J. copaia* sobre *Escherichia coli*.(Ver Anexo 30)

Fuente: La autora, 2012.

Como se puede observar en la tabla 33, una de las concentraciones ensayadas tienen ausencia total de crecimiento bacteriano de *E. coli*.

Microdilución

Concentración de extracto etéreo de Kuiship (mg/ml)	<i>S. aureus</i>
50	Ausencia
43,63	Crece
37,5	Crece
31,25	Crece
24,8	Crece

Tabla 34.- Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) por mg de extracto acuoso de *J. copaia* sobre *Escherichia coli* con microdilución.

(Ver Anexo 31)

Fuente: La autora, 2012.

El extracto acuoso de Kuiship presentó una concentración mínima inhibitoria de 50 mg/ml contra *E. coli*.

3.4.- Bioensayos de toxicidad frente a *Artemia salina*.

3.4.1.- Control de agua salina

Concentración ppm	Número de Artemias vivas por tubo				
	1	2	3	T	P
0 (control)	10	10	10	30	0

Tabla 35.- Conteo de artemias en agua salina.

Fuente: La autora, 2012.

Datos de la tabla:

- 1 = primer ensayo.
- 2 = segundo ensayo.
- 3 = tercer ensayo.
- T = total de artemias vivas al final del ensayo
- P = porcentaje de artemias muertas al final del ensayo

En el control de agua salina no existió ninguna artemia muerta de tal manera que se validó el ensayo ya que no existió algún factor “natural” que ocasione la muerte de los nauplios.

3.4.2.- Control de DMSO

Concentración ppm	Número de Artemias vivas por tubo				
	1	2	3	T	P
1000	10	10	10	30	0
500	10	10	10	30	0
250	10	10	10	30	0
100	10	10	10	30	0
50	10	10	10	30	0
10	10	10	10	30	0

Tabla 36.- *Conteo de artemias en DMSO.*

Fuente: La autora, 2012.

Datos de la tabla:

- 1 = primer ensayo.
- 2 = segundo ensayo.
- 3 = tercer ensayo.
- T = total de artemias vivas al final del ensayo
- P = porcentaje de artemias muertas al final del ensayo

En el control de DMSO no existió ninguna artemia muerta confirmando así, que el solvente de los extractos no es un agente tóxico para los nauplios.

3.4.3.- Extracto etéreo

Concentración Ppm	Número de Artemias vivas por tubo					Grado de toxicidad	Observaciones
	1	2	3	T	P		
1000	9	9	8	26	13,33	moderadamente tóxico	
500	9	10	9	28	6,66	no tóxico	2 Artemias con dificultades en la natación
250	10	10	10	30	0	no tóxico	
100	10	10	10	30	0	no tóxico	1 Aretmia con dificultad en la natación
50	10	10	10	30	0	no tóxico	
10	10	10	10	30	0	no tóxico	

Tabla 37.- *Conteo de artemias en extracto etéreo de J. copaia.*

Fuente: *La autora, 2012.*

Datos de la tabla:

- 1 = primer ensayo.
- 2 = segundo ensayo.
- 3 = tercer ensayo.
- T = total de artemias vivas al final del ensayo
- P = porcentaje de artemias muertas al final del ensayo

Como se puede observar en la tabla 37, el extracto etéreo con una concentración de 1000 ppm presenta un grado de toxicidad moderado; mientras que las demás concentraciones del extracto no son tóxicas.

3.4.3.1- Análisis estadístico

3.4.3.1.1.- Variables del ensayo

X Concentración ppm	Y Porcentaje de artemias muertas
1000	13,33
500	6,66
250	0
100	0
50	0
10	0

Tabla 38.- Variables del ensayo en extracto etéreo de J. copaia.

Fuente: La autora, 2012.

Para el presente análisis se estableció como variable independiente la concentración del extracto en ppm y como variable dependiente el porcentaje de artemias muertas.

3.4.3.1.2.- Curva de mortalidad de *A. salina*.

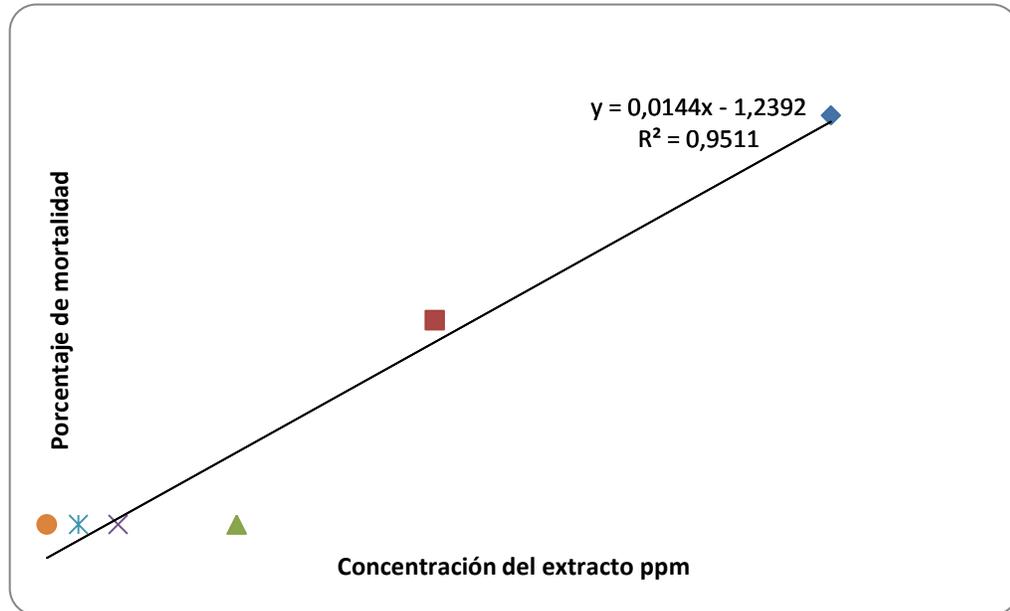


Diagrama 1.- Curva de porcentaje de mortalidad vs concentración del extracto etéreo de *J. copaia*.

Fuente: La autora, 2012.

En el diagrama 1 se puede apreciar que la variable Y tiende a incrementar gradualmente a medida que se incrementa la variable X desde 250 ppm, teniendo así una relación directamente proporcional.

3.4.3.1.3.-Regresión lineal

En el programa Statistix se realizó la regresión lineal; y se trabajó con un nivel de significancia de α : 0.05.

```
Statistix 8.027/02/2012, 12:32:41
Unweighted Least Squares Linear Regression of Y
Predictor
Variables      Coefficient   Std Error      T          P
Constant      -1.23924     0.76486       -1.62     0.1805
X              0.01436     0.00163        8.82     0.0009
R-Squared      0.9511
Adjusted R-Squared 0.9389
Resid. Mean Square (MSE) 1.89950
Standard Deviation 1.37822
Source        DF          SS          MS          F          P
Regression    1          147.846    147.846    77.83    0.0009
Residual      4           7.598      1.899
Total         5          155.444
Cases Included 6      Missing Cases 0
```

Tabla 39.- Regresión lineal, ensayo en el extracto etéreo de J. copaia; elaborado mediante Statistix.

Fuente: La autora, 2012.

En la tabla 39 se puede apreciar que P (0,0009) es menor al nivel de significancia α : 0.05 por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa: La concentración del extracto es directamente proporcional al porcentaje de mortalidad de las artemias.

3.4.3.1.4.- Dosis letal 50

Se determinó la dosis letal 50 (DL50) por el método de mínimos cuadrados.

X Concentración del extracto ppm	Y Número de artemias muertas
1000	4
500	2
250	0
100	0
50	0
10	0

Tabla 40.- Variables DL50, extracto etéreo.

Fuente: La autora, 2012.

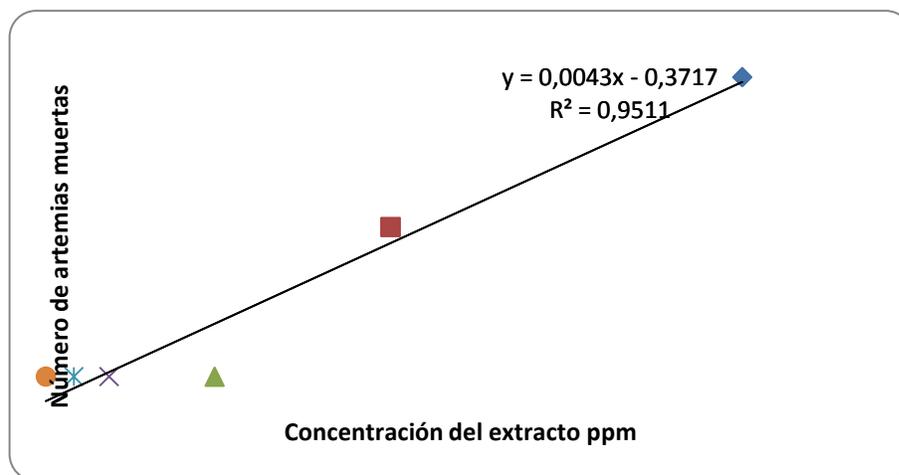


Diagrama 2.- Número de artemias muertas vs concentración del extracto etéreo de J. copaia.

Fuente: La autora, 2012.

Se utilizó los datos obtenidos en el diagrama 2 para despejar la siguiente fórmula y así determinar la dosis letal 50 para el extracto etéreo de *J. copaia*.

$$y = mx + B$$

Reemplazo:

$$15 = 0,0043x + (-0,3717)$$

$$x = (15 - (-0,3717)) / 0,0043$$

$$x = 3574,81$$

La dosis letal 50 para el extracto etéreo de *J. copaia* es de 3574,81 ppm.

3.4.4.- Extracto etanólico

Concentración ppm	Número de Artemias vivas por tubo					Grado de toxicidad	Observaciones
	1	2	3	T	P		
1000	8	8	7	23	23,33	moderadamente tóxico	
500	9	10	9	28	6,66	no tóxico	3 Artemias con dificultades en la natación
250	9	10	10	29	3,33	no tóxico	2 Artemias con dificultades en la natación
100	10	10	10	30	0	no tóxico	
50	10	10	10	30	0	no tóxico	
10	10	10	10	30	0	no tóxico	

Tabla 41.- Conteo de artemias en extracto etanólico de *J. copaia*.

Fuente: La autora, 2012.

Datos de la tabla:

- 1 = primer ensayo.
- 2 = segundo ensayo.
- 3 = tercer ensayo.
- T = total de artemias vivas al final del ensayo
- P = porcentaje de artemias muertas al final del ensayo

Como se puede observar en la tabla 41, el extracto etanólico con una concentración de 1000 ppm presenta un grado de toxicidad moderado; mientras que las demás concentraciones del extracto no son tóxicas.

3.4.4.1- Análisis estadístico

3.4.4.1.1.- Variables del ensayo

X Concentración ppm	Y Porcentaje de artemias muertas
1000	23,33
500	6,66
250	3,33
100	0
50	0
10	0

Tabla 42.- Variables del ensayo en extracto etanólico de J. copaia.

Fuente: La autora, 2012.

Para el presente análisis se estableció como variable independiente la concentración del extracto en ppm y como variable dependiente el porcentaje de artemias muertas.

3.4.4.1.2.- Curva de mortalidad de *A. salina*.

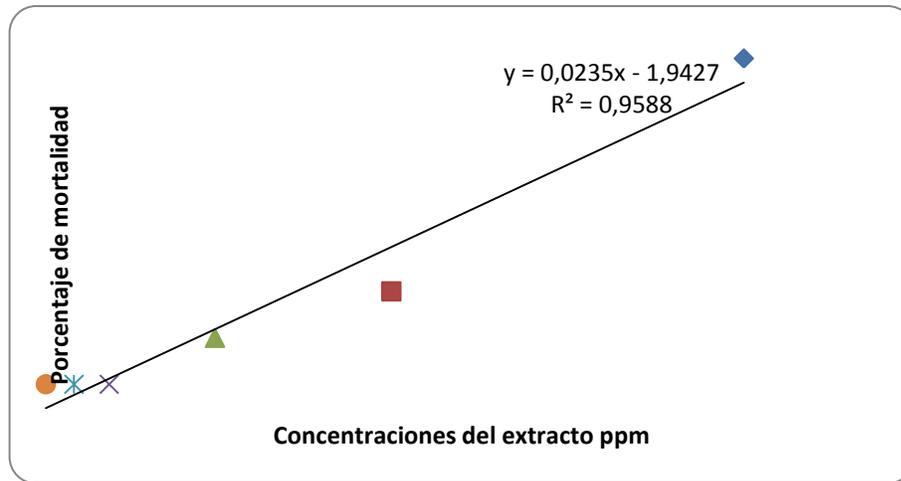


Diagrama 3.- Curva de porcentaje de mortalidad vs concentración del extracto etanólico de *J. copaia*.

Fuente: La autora, 2012.

En el diagrama 3 se puede apreciar que la variable Y tiende a incrementar gradualmente a medida que se incrementa la variable X desde 250 ppm. Teniendo así una relación directamente proporcional.

3.4.4.1.3.-Regresión lineal

En el programa Statistix se realizó la regresión lineal; y se trabajó con un nivel de significancia de α : 0.05.

```
Statistix 8.027/02/2012, 12:49:17
Unweighted Least Squares Linear Regression of Y

Predictor
Variables   Coefficient   Std Error      T          P
Constant   -1.94267      1.14675       -1.69      0.1655
X           0.02355      0.00244        9.65      0.0006

R-Squared          0.9588      Resid. Mean Square (MSE)  4.26980
Adjusted R-Squared 0.9485      Standard Deviation        2.06635

Source      DF      SS      MS      F      P
Regression  1      397.617  397.617  93.12  0.0006
Residual    4       17.079   4.270
Total       5      414.696

Cases Included 6      Missing Cases 0
```

Tabla 43.- Regresión lineal, ensayo en el extracto etanólico de *J. copaia*; elaborado mediante Statistix.

Fuente: La autora, 2012.

En la tabla 43 se puede apreciar que P (0,0006) es menor al nivel de significancia α : 0.05 por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa: La concentración del extracto es directamente proporcional al porcentaje de mortalidad de las artemias.

3.4.4.1.4.- Dosis letal 50

Se determinó la dosis letal 50 (DL50) por el método de mínimos cuadrados.

X	Y
Concentración del extracto ppm	Número de artemias muertas
1000	7
500	2
250	1
100	0
50	0
10	0

Tabla 44.- Variables DL50, extracto etanólico de *J. copaia*.

Fuente: La autora, 2012.

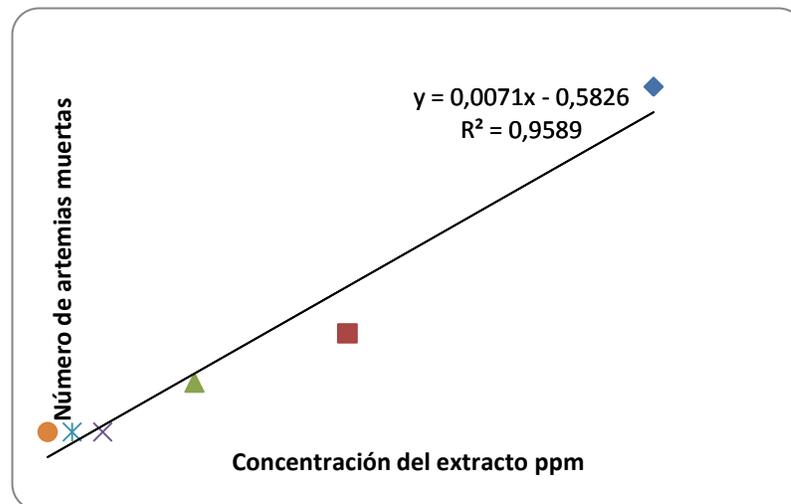


Diagrama 4.- Número de artemias muertas vs concentración del extracto etanólico de *J. copaia*.

Fuente: *La autora, 2012.*

Se utilizó los datos obtenidos en el diagrama 4, para despejar la siguiente fórmula y así poder determinar la dosis letal 50 para el extracto etéreo de *J. copaia*.

$$y = mx + B$$

Reemplazo:

$$15 = 0,0071x + (-0,5826)$$

$$x = (15 - (-0,5926)) / 0,0071$$

$$x = 2196,14$$

La dosis letal 50 para el extracto etanólico es de 2196,14 ppm.

3.4.5.- Extracto acuoso

Concentración Ppm	Número de Artemias vivas por tubo					Grado de toxicidad	Observaciones
	1	2	3	T	P		
1000	10	10	10	30	0	no tóxico	2 Artemias con dificultades en la natación
500	10	10	10	30	0	no tóxico	1 Aretmia con dificultad en la natación
250	10	10	10	30	0	no tóxico	
100	10	10	10	30	0	no tóxico	
50	10	10	10	30	0	no tóxico	
10	10	10	10	30	0	no tóxico	

Tabla 45.- *Conteo de artemias en extracto acuoso de J. copaia.*

Fuente: La autora, 2012.

Datos de la tabla:

- 1 = primer ensayo.
- 2 = segundo ensayo.
- 3 = tercer ensayo.
- T = total de artemias vivas al final del ensayo
- P = porcentaje de artemias muertas al final del ensayo

Como se puede observar en la tabla 45, el extracto acuoso no presenta toxicidad en ninguna concentración ensayada.

3.4.5.1- Análisis estadístico

3.4.5.1.1.- Variables del ensayo

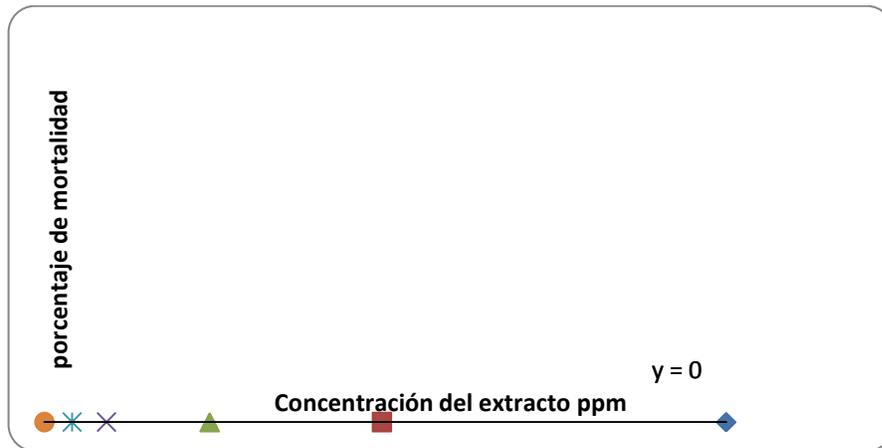
X Concentración ppm	Y Porcentaje de artemias muertas
1000	0
500	0
250	0
100	0
50	0
10	0

Tabla 46.- Variables del ensayo en extracto acuoso de J. copaia.

Fuente: La autora, 2012.

Para el presente análisis se estableció como variable independiente la concentración del extracto en ppm y como variable dependiente el porcentaje de artemias muertas.

3.6.5.1.2.- Curva de mortalidad de *A. salina*.



*Diagrama 5.- Curva de porcentaje de mortalidad vs concentración del extracto acuoso de *J. copaia*.*

Fuente: La autora, 2012.

En el diagrama 5 se puede apreciar que la variable Y se mantiene constante a medida que se incrementa la variable X. No existe mortalidad por lo que no se puede realizar los análisis estadísticos y por tanto se acepta la hipótesis nula: La concentración del extracto no es directamente proporcional al porcentaje de mortalidad de las artemias.

Con los datos obtenidos no se puede determinar la dosis letal 50.

CAPÍTULO IV

4.- Discusión

4.1.- En la segunda parte de Plantas medicinales promisorias de la Amazonía (Secretaría. Pro-Tempore,1994) se presenta una investigación etnobotánica y etnomédica realizada en el Departamento de Váupes – Colombia donde los indígenas utilizan la corteza hervida en agua de *Jacaranda copaia* para resfriados y pulmonías; los indígenas Andoques utilizan las hojas machacadas y cocidas hasta la consistencia de miel como cicatrizantes, la raíz raspada y preparada en infusión fría la usan como antidiarreico. La comunidad Huitos en la Amazonía peruana y colombiana utilizan las hojas maceradas y la corteza de *Jacaranda obtusifolia* para tratar infecciones en la piel, sífilis, como anestésicas, desinfectantes y cicatrizantes. Para la presente investigación, la información etnobotánica fue recopilada en los sectores aledaños de la Comunidad de Capirona, provincia de Napo, donde se evidenció que los indígenas de este sector utilizan la *Jacaranda copaia* como planta medicinal de la cual recolectan las hojas y las semillas para tratar infecciones de la piel, hongos, como cicatrizante y para bajar de peso. Al observar que en la comunidad Huitos y en los sectores aledaños a la Comunidad de Capirona las dos especies de Jacaranda (*Jacaranda obtusifolia* y *Jacaranda copaia*) exhiben similares usos como cicatrizantes y desinfectantes; por lo que es posible deducir que estas especies tienen metabolitos secundarios similares.

4.2.- El estudio fitoquímico y antibacteriano de los extractos de las hojas de *Jacaranda coerulea* L. Griseb (Capote *et al.* 2011) realizado en Cuba; presenta en el tamizaje fitoquímico de la tintura al 20% y del extracto seco de dicha planta tres metabolitos

secundarios adicionales a los identificados en la presente investigación que son: coumarinas, flavonoides y resinas.

En la presente investigación de *Jacaranda copaia* (Aubl.) D. Don, el screening fitoquímico se realizó en solventes de polaridad creciente (éter etílico, etanol y agua) en los que se pudo identificar tres metabolitos secundarios adicionales a los que se encuentran en la investigación antes citada, realizada en Cuba; estos metabolitos son: quinonas, catequinas y aceites – grasas.

Sin embargo estas dos especies de *Jacaranda* comparten metabolitos secundarios similares.

4.3.- El estudio fitoquímico y antibacteriano de los extractos de las hojas de *Jacaranda coerulea* L. Griseb (Capote *et al.* 2011) realizado en Cuba; presenta en los ensayos antibacterianos inhibición de *S. aureus* frente a los extractos de acetato de etilo y acuoso con halos entre 7 y 9 mm de diámetro y *E. coli* que también fue ensayada, es resistente ante todos los extractos. En la presente investigación de *Jacaranda copaia* (Aubl.) D. Don, se determinó que *S. aureus* es sensible frente al extracto etéreo con un halo de inhibición promedio de 14,4 mm y que *E. coli* también presenta sensibilidad frente al extracto acuoso con un halo de inhibición promedio de 8,87 mm. A pesar de que las dos plantas aquí citadas pertenecen a la misma familia y género se puede evidenciar que *J. copaia* presenta una actividad antibacteriana más potente.

4.4.- En el estudio de la actividad antibacteriana contra cepas de *Pseudomona aeruginosa* y la toxicidad aguda de las hojas de *Jacaranda decurrens* (Universidad Nacional de la Plata, 2011) realizado en Brasil, probaron la toxicidad de esta planta de acuerdo a OECD Guideline for Testing of Chemicals, concluyendo que el extracto etanólico de *J. decurrens* no presenta toxicidad aguda. En la presente investigación se determinó el grado de toxicidad de *Jacaranda copaia* a través de bioensayos con *Artemia salina*; el extracto acuoso no presentó toxicidad alguna, mientras que los

extractos etéreo y etanólico no presentan alta toxicidad, pero si moderada, a una concentración de 1000 ppm.

CONCLUSIONES

1.- La población indígena con su experiencia ha identificado la eficacia de la *Jacaranda copaia* frente a infecciones, su poder cicatrizante y su propiedad para bajar de peso; igualmente han desarrollado un saber sobre su dosificación y forma de uso que es a través de emplastos y decocción. La parte vegetal utilizada como droga, depende de la afección a tratar; así para las infecciones y cicatrización utilizan la decocción y emplasto de hojas; mientras que para perder peso utilizan la decocción y emplasto de semillas. El conocimiento de esta planta medicinal es global en la comunidad y es transmitido de generación en generación; sin embargo el Uhi Shñu es la persona con mayor saber que conserva y recrea la sabiduría acerca de la *J. copaia*.

2.- En el screening fitoquímico de las hojas de *J. copaia*, en el extracto etéreo, se identificó la presencia de aceites y grasas en una cantidad considerable; en el extracto etéreo y etanólico se identificó la presencia de triterpenos y esteroides. En el extracto etanólico se identificó: catequinas, quinonas y saponinas. La presencia de alcaloides fue positivo en el extracto etanólico mientras que en el extracto etéreo y acuoso fue negativo. En el extracto etanólico y acuoso se identificó: azúcares reductores y taninos. Finalmente solo en el extracto acuoso se identificó principios amargos.

3.- La bacteria más sensible que tuvo inhibición frente a los tres extractos de *J. copaia* fue el *Staphylococcus aureus* presentando el halo de mayor inhibición (14,4 mm) en el extracto etéreo.

Bacillus pumilus presenta una sensibilidad intermedia frente a los extractos etanólico y acuoso; mientras que es resistente frente al extracto etéreo.

Escherichia coli es sensible frente al extracto acuoso presentando un halo promedio de inhibición de 8,87 mm, frente al extracto etanólico tiene una sensibilidad intermedia y es resistente frente al extracto etéreo.

Salmonella sp. presenta una sensibilidad intermedia frente al extracto acuoso y es resistente ante los demás extractos.

El único microorganismo que fue resistente ante los tres extractos de *J. copaia* es *Candida albicans*.

Al ser *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* bacterias sensibles, se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cada una. El extracto etéreo de *J. copaia* presentó una CMI de 12,5 mg/ml contra *S. aureus* y el extracto acuoso de *J. copaia* presentó una CMI de 50 mg/ml contra *E. coli*.

4.- Hasta la concentración de 1000 ppm, el extracto acuoso de *J. copaia* no presenta toxicidad; los extractos etéreo y etanólico presentan una concentración moderadamente tóxica a los 1000 ppm; siendo las concentraciones de estos extractos directamente proporcional al porcentaje de mortalidad de *Artemia salina*. Las demás concentraciones (500, 250, 100, 50 y 10 ppm) no presentan toxicidad.

Al tener los extractos etéreo y etanólico concentraciones moderadamente tóxicas (porcentaje de mortalidad entre el 11 y 50%) se determinó la dosis letal 50 (DL50); así para el extracto etéreo una DL50 de 3574,81 ppm y para el extracto etanólico una DL50 de 2196,14 ppm

RECOMENDACIONES

- 1.- Con procesos de aculturación y la pérdida de las tradiciones en las comunidades se está atentando gravemente contra los conocimientos ancestrales que han logrado mantenerse a través del tiempo por lo que se recomienda profundizar los trabajos etnobotánicos y etnofarmacológicos en nuestras comunidades.
- 2.- Continuar con el estudio de los grupos fitoquímicos identificados, con el fin de llegar a formular un producto que pueda tener uso medicinal, cosmético o aromático.
- 3.- Realizar el análisis fitoquímico y actividad antibacteriana en el aceite esencial de *Jacaranda copaia*.
- 4.- Para realizar bioensayos in vitro con *Artemia salina* es importante considerar las condiciones ambientales que se les brinda ya que estas son muy sensibles ante cualquier cambio.

BIBLIOGRAFÍA

Abad, A. 2006. **Actividad microbiana y estudio fitoquímico preliminar de Jacaranda**. En línea: <<http://redalyc.uaemex.mx/pdf/933/93310304.pdf>> Consulta: 06 de enero de 2011.

Aguilar, R. 2011. *Jacaranda copaia*. En línea: <<http://www.flickr.com/photos/plantaspinunsulaosa/page101/>> Consulta: 28 de enero de 2011.

Alice, F. 2004. **Productividad en plantaciones puras y mixtas de especies forestales nativas en la estación biológica “La Selva”**. En línea: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/436/43628206.pdf> Consulta: 15 de Marzo del 2010.

Alonso, J. 2006. **Técnicas de comprobación de actividad terapéutica de las plantas medicinales**. En línea: <[http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/comprobacion de la actividad terapeutica de las plantas.pdf/](http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/comprobacion_de_la_actividad_terapeutica_de_las_plantas.pdf/)> Consulta: 27 de Agosto del 2011.

Baudo, R. 1987. **Pruebas ecotoxicológicas con *Daphnia***. en PETERS, R. H. y R. DE BERNARDI (Eds.) *Daphnia*. Mem. Ist. Ital. Idrobiol. Pgs; 461 - 482.

- Bezerra, E. 2010. **Ensayo de toxicidad para la determinación de la DL50 “método in vitro”**. En línea: <<http://www.scribd.com/doc/16420688/ENSAYO-DE-TOXICIDAD>> Consulta: 13 de Septiembre del 2011.
- BIOVIRTUAL. 2010. **Jacaranda copaia**. En línea: <<http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=29678>> Consulta: 30 de diciembre de 2010.
- BIOWEB. 2011. **E. coli schericha**. En línea: <http://bioweb.uwlax.edu/bio203/s2008/moder_just/classification.htm> Consulta: 17 de enero de 2011.
- Boulais, E. 2008. **Jacaranda copaia**. En línea: <<https://picasaweb.google.com/lh/view?q=Jacaranda+copaia&uname=canalpetrobras&psc=G&cuname=canalpetrobras&filter=1#5240277406445415122>> Consulta: 20 de abril de 2011.
- Buikema. A., R. Niederlehner, y J. Cairns. 1982. **Control biológico. Parte IV. Pruebas de toxicidad. Resolución de aguas**. Pgs; 239 – 262
- Books. 2010. **Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos**. En línea: <<http://www.guardabosquesub.site11.com/?cat=7&paged=2>> Consulta: 30 de diciembre de 2010.
- Borroto, J. 2010. **Actividad antimicrobiana y toxicidad frente a *Artemia salina* del extracto diclorometánico de raíces de *Morinda royoc* L.** En línea: <http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol16_1_11/pla04111.htm> Consulta: 23 de junio de 2011.

Cann, J. 2007. *Staphylococcus aureus*. En línea: <<http://www.flickr.com/photos/ajc1/1919750964/>> Consulta: 04 de septiembre de 2011.

Capote. Y., H. Remón., G. Morales. y J. Ramírez. 2011. **Estudio fitoquímico y antibacteriano de los extractos de las hojas de *Jacaranda coerulea* L. Griseb, (Abey macho).** En línea: <<http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EFpZyFFFVYFOoXsgSD.php>> Consulta: 23 de junio de 2011.

Carhuapoma, M. 1999. **Plantas medicinales en atención primaria de salud, agroindustria, fitoquímica y ecoturismo: perspectivas de desarrollo en la región loa libertadores wari.** En línea: <http://books.google.com.ec/books?id=B9gOAQAIAAJ&pg=PA109&lpg=PA109&dq=jacaranda+copaia+propiedades+medicinales&source=bl&ots=dqTyOwksK2&sig=rYEWf5RDWvdE4GoAqeTOaqzVag&hl=es419&ei=PH0dTfaIOoWCIAeN0pTGDA&sa=X&oi=book_result&ct=result&resnum=9&ved=0CEYQ6AEwCA#v=onepage&q=jacaranda%20copaia%20propiedades%20medicinales&f=false> Consulta: 30 de diciembre de 2010.

Cisneros, S. 2005. **Meningitis y absceso subdural por *Salmonella typhi*.** En línea: <http://www.imbiomed.com.mx/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_articulo=36890&id_seccion=1482&id_ejemplar=3813&id_revista=47> Consulta: 23 de abril de 2011.

Cuatrecasas, J.; Herbario Nacional Colombiano. 2009. **COL000211910 - *Jacaranda copaia* (Aubl.) D. Don – Bignoniaceae.** En línea: <<http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=16591>> Consulta: 20 de abril de 2011.

- Curtis, H. 2003. **Biología**. sexta edición, Editorial Médica Panamericana S.A. Madrid – España. Pgs; 736 – 759.
- Davis. W. y J. Yost. 1983. **La etnobotánica de los Waorani en el este del Ecuador**. Botanical Museum Leaflets S.A. Pgs; 159 – 217.
- Escobar. L. y M. Chávez. 2008. **Efecto in vitro de diferentes concentraciones de extracto alcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, sobre la viabilidad de *Corynebacterium diphtheriae***. En línea: <<http://revistas.concytec.gob.pe/pdf/rmv/v5n1/a04v5n1.pdf>> Consulta: 18 de junio de 2011.
- Expedia. 2011. **Mapa vial del Ecuador**. En línea: <http://www.google.com.ec/imgres?q=mapa+provincial+y+vial+del+ecuador&um=1&hl=es&sa=N&rlz=1R2SNNT_enEC398&biw=1366&bih=535&tbm=isch&tbnid=qdX5mPmNUD65M:&imgrefurl=http://aniltameryilmaz.com/guayaquilmapa%26page%3D2&docid=PALqaRDF2UIe7M&imgurl=http://viajeaecuador.es/wpcontent/uploads/2009/01/ecuador_mapa.jpg&w=1019&h=1245&ei=e0qvT9iLAZSk8gStirXLCg&zoom=1> Consulta: 13 de abril de 2012.
- Secretaría. Pro-Tempore. 1994 **Plantas medicinales amazónicas: realidad y perspectivas. Tratado de cooperación amazónica**. COMPUGRAFIS S.A. Lima-Per. Pgs; 300 - 310.
- Forero, A. 2008. **Represión catabólica por carbono de bacterias gram-positivas: Inteligencia alimenticia**. En línea: <http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_2008_2/Represion_catabolica.pdf> Consulta: 15 de noviembre de 2010.
- Gamazo. C., I. López-Goñi, y R. Díaz. 2005. **Manual práctico de microbiología**. tercera edición, MASSON S. A. Barcelona – España. Pgs: 39 - 132.

Google earth. 2012.

Guariguata, M. 2000. **Biología de semillas y plántulas de nueve especies arbóreas comunes en bosques secundarios de jacaranda.** En línea: <<http://www.catie.ac.cr/magazin.asp?CodIdioma=ESP>> Consulta: 17 de enero de 2011.

Guilarte, C. 2003, **Bacterias periodontopatógenas: bacilos anaerobios gram negativos como agentes etiológicos de la enfermedad periodontal.** En línea: <http://www.actaodontologica.com/ediciones/2005/2/bacterias_periodontopatogenas_enfermedad_periodontal.asp> Consulta: 05 de mayo de 2011.

Harrison, P. 2007. **Enfermedades infecciosas; Sección 5. Enfermedades causadas por bacterias grampositivas.** En línea: <<http://www.harrisonmedicina.com/resourceToc.aspx?resourceID=106>> Consulta: 27 de febrero de 2011.

Hernandes, L. 1997. **Enciclopedia médica de la salud.** primera edición, Editorial ART BLUME S.L. Barcelona – España. Pgs: 262, 263, 269, 270, 533.

Herrera, B. 1999. **Efecto de la variación del sustrato y concentraciones foliares de nutrimentos en la distribución espacial y la productividad de jacaranda en bosques tropicales secundarios de Costa Rica.** En línea: <http://www.mag.go.cr/congreso_agronomico_xi/a50-6907-III_147.pdf> Consulta: 28 de diciembre de 2010.

INBIO. 2010. **Jacaranda copaia.** En línea: < <http://darnis.inbio.ac.cr/FMPro?-DB=UBIpub.fp3&-lay=WebAll&-Format=/ubi/detail.html&-Op=bw&id=178&-Find>> Consulta: 30 de diciembre de 2010.

Jørgensen Moller. P. y S. Leon- Yanez. 1999. **Catálogo de las plantas vasculares del Ecuador**. Volumen 75 Missouri Botanical Garden Prss. St Louis-U.S.A. Pag:323

Kohn, E. 1992. **La cultura médica de los runas de la amazonia ecuatoriana hombre y ambiente**. Quito – Ecuador. Pgs: 1 – 143.

Kunkel, D. 2009. **Bacillus pumilus** bacteria. En línea: <http://www.google.com/imgres?imgurl=http://cachens.corbis.com/CorbisImage/thumb/19/88/04/19880479/4219880479.jpg&imgrefurl=http://www.corbis.co.in/searchresults.php%3Fs%3DBacillus%2Bpumilus%26rm%3D%26rf%3D%26mr%3D%26loc%3D%26col%3D%26listRF%3D%26orient%3D%26view%3D%26people%3D%26pht%3D%26max%3D%26p%3D1&usq=__8CQIFofPhqoqW2aBPsc4H1pdo5Y=&h=128&w=109&sz=7&hl=es&start=9&zoom=1&tbnid=nqLCmlaqJIovGM:&tbnh=91&tbnw=77&ei=6_4TcfHLojBtgf2_LDXCg&prev=/images%3Fq%3Dbacillus%2Bpumilus%26hl%3Des%26lr%3D%26sa%3DX%26tbn%3Disch&itbs=1> Consulta: 01 de junio de 2011.

López, L. 2010. **Microbiología** sena. En línea: <http://2.bp.blogspot.com/_QgapG25zzW4/S_v3datfOqI/AAAAAAAAAAc/BiiixbvroXk/S220-h/microbiologia+033.jpg> Consulta: 15 de noviembre de 2011.

Luna, C. 2001. **Resistencia bacteriana y antibioticoterapia en medicina respiratoria Y terapia intensiva**. En línea: <http://www.medicinabuenaosaires.com/revistas/vol6101/5/v61_5_1_p603_613.pdf> Consulta: 03 de diciembre de 2010.

- Maceda, A. 2003. *Artemia Salina*. En línea: <http://www.alaquairum.net/artemia_salina.htm> Consulta: 25 de febrero de 2011.
- Macía, M. y L. de la Torre. 2008. **La etnobotánica del Ecuador**. Aarthus Editores. Quito – España. Pgs: 13-27.
- Malbrán, C. 2001. **Métodos estandarizados para la determinación de la sensibilidad antimicrobiana en bacterias aisladas de animales: test de difusión por discos y test de dilución**. En línea: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/gss/publications/documents/Argentina-LevelII/CIM_ATB_ANIMALES.pdf> Consulta: 13 de agosto de 2011.
- Mazza, G. 2011. **Crustacea**. En línea: < <http://www.photomazza.com/?Crostacei-archivo-fotografico-di>> Consulta: 28 de noviembre de 2011.
- Michanie, S. 2003. *Escherichia coli* O157:H7. En línea: < http://bpm-haccp.com.ar/index_archivos/pdf/Escherichia-coli-O157-H7.pdf> Consulta: 11 de agosto de 2011.
- Microinmuno. 2011. **Técnicas de tinción. Fundamentos**. En línea: <<http://www.microinmuno.qb.fcen.uba.ar/SeminarioTinciones.htm>> Consulta: 17 de enero de 2011.
- Mims, C, B. Walkelin, J. Playfair, R. Williams y I. Roitt. 2002. **Microbiología médica**. segunda edición, Harcourt S.A. Madrid – España. Pgs: 513-533.
- Miranda, M. 2000. **Farmacognosia y productos naturales**. Manual de Práctica, Facultad de Farmacia, Universidad de la Habana. Habana - Cuba.Pgs:41 – 57.

- Murray, R. 1969. **Estadística**. quinta edición, Carvajal & CIA. Bogotá – Colombia.
Pgs: 241 – 268.
- Parker, M. 1999. **Biología de los microorganismos**. segunda edición, GRAFILLES.
Madrid – España. Pgs: 707-784.
- Pérez. R. y Ma. Villaverde. 2002. **Microbiología**. segunda edición, Thomsom Editores
Spain. Madrid – España. Pgs: 151-176.
- Richardson. M. y G. Shankland. 1995. **Manual de microbiología clínica**. 6th ed.
Edited by P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Phaller, F. C. Tenover & R. H.
Yolken. Washington, DC: ASM Press. Pgs: 809–846
- Ríos. M. y H. Pedersen. 1997, **Uso y manejo de recursos vegetales**. primera edición,
Ed. Abya-Yala. Quito – Ecuador. Pgs: 294 – 329.
- Ríos. M. y H. Pedersen. 1991; **Las plantas y el hombre**. primera edición, Ed. Abya-
Yala. Cayambe – Ecuador. Pgs: 199 – 207.
- Rivero, M. 2004. ***Escherichia colie* enterohemorrágica y síndrome uremico
hemolítico en Argentina**. En línea:
<[http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol6404/4/ESCHERICHIA%
20COLI%20ENTEROHEMORRAGICA.pdf](http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol6404/4/ESCHERICHIA%20COLI%20ENTEROHEMORRAGICA.pdf)> Consulta: 12 de febrero de
2011.
- Santamarina, P. 1997. **Biología y botánica**. tomo II, Camino de Vera S.L. Valencia –
España. Pgs: 97 – 103.
- Sauvin. M, J. Dedet, Kunesch, J. Poissonn, C. GantierJ, P. Gayral y G. Kunesch. 1993.
Actividades leishmanicidas naturales y sintéticas in vitro e in vivo.
Fitoterapia – Investigación. Pgs:71 – 167.

- Schultes. R. y R. Raffaut. 1991. **Las plantas medicinales y tóxicas en el noroeste de la amazonía.** Portland, Oregón – Estados Unidos. Pgs; 240 - 299.
- Secretaría. Pro-Tempore. 1994 **Plantas medicinales amazónicas: realidad y perspectivas. Tratado de cooperación amazónica.** COMPUGRAFIS S.A. Lima-Per. Pgs; 300 - 310.
- Sharapin, N. 2000. **Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéutico.** primera edición, Quebecor-Impreandes. Santafe de Bogotá-Colombia. Pgs: 198,199.
- Silbergeld, E. 2010. **Toxicología.** En línea:<<http://www.librostonic.com/pdf/TOXICOLOGIA/>> Consulta: 03 de mayo de 2011.
- Silva, M. 2011. *Staphylococcus aureus.* En línea:< <http://staphylococcus-aureus.blogspot.com/>> Consulta: 26 de octubre de 2011.
- SLD. 2010. **Técnicas de comprobación de actividad terapéutica de las plantas medicinales.** En línea: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/comprobacion_de_la_actividad_terapeutica_de_las_plantas.pdf> Consulta: 30 de diciembre de 2010.
- Sosa, M. 2010. **Medicina estomatológica - Candida albicans.** En línea: <http://www.odontologiaonline.com/verarticulo/Candida_albicans.Revision_de_la_literatura.html> Consulta: 13 de febrero de 2012.
- Spicer, J. 2009. **Microbiología clínica y enfermedades infecciosas.** segunda edición en español, Elsevier España S.L. Barcelona – España. Pgs: 145 – 160
- Taroco. R, V. Seija y R. Vignoli. 2010. **Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica.** En línea: <<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>> Consulta: 24 de agosto de 2011.

- Telmeds.org. 2009. **Métodos de difusión en agar según Kirby Bauer.** En línea: <<http://www.telmeds.org/atlas/bacteriologia/microorganismos-transmitidos-sexualmente/neisseria-gonorrhoeae/tincion-de-gram/>> Consulta: 19 de julio de 2011.
- Tena. D, J. Martínez-Torres y M. Pérez-Pomata. 2007. **Infecciones cutáneas por *Bacillus pumilus*: informe de 3 casos.** Soria Melguizo S.A. Madrid – España. Pgs: 2 - 40.
- Udlap. 2010. **Métodos de difusión en agar según Kirby Bauer.** En línea: <http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lcf/aguiar_g_ae/apendice_B.pdf> Consulta: 17 de enero de 2011.
- Universidad Nacional de la Plata. 2011. **Estudo da atividade antibacteriana contra cepas de pseudomonas aeruginosa e da toxicidade aguda das folhas da *Jacaranda decurrens*.** En línea: <http://biblioteca.universia.net/html_bura/ficha/params/title/estudo-da-atividade-antibacteriana-cepas-pseudomonas-aeruginosa-da-toxicidade-aguda/id/48299817.html> Consulta: 29 de noviembre de 2011.
- University of Wisconsin-Madison. 2009. **Salmonella y salmonelosis.** En línea: <<http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/Salmonella.html>> Consulta: 05 de julio de 2011.
- Vallejo, M. 2010. **Diversidad biológica del Ecuador.** En línea:<<http://www.monografias.com/trabajos-pdf4/diversidad-biologica-del-ecuador/diversidad-biologica-del-ecuador.pdf>> Consulta: 18 de julio de 2011.
- Vargas, M. 2002. **Ecología y biodiversidad del Ecuador.** primera edición, E.P. Centro de Impresión. Quito – Ecuador. Pgs: 27- 78.

- Vettorazzi, G. 2010. **Ensayos necesarios para la valoración toxicológica de las sustancias químicas.** En línea: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/eco/040067/040067-026.pdf>> Consulta: 26 de enero de 2012.
- Ville Claude A. 1996. **Biología.** octava edición, McGraw-Interamerica Editores S.A. Distrito Federal de México – México. Pgs: 147- 154.
- Williams, J. 2007. **Anatomía de la especie de la familia Bignoniaceae de Venezuela.** En línea: <<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=86230207>> Consulta: 30 de marzo de 2011.
- Yáñez, P. 2007. **Biometría y bioestadística fundamentales.** Pgs: 54 – 65.
- Yépez, P. 2011. **Las plantas en las creencias y mitos del Ecuador.** En línea: <<http://www.biologia.puce.edu.ec/natura.php?c=350>> Consulta: 02 de junio de 2011.

ANEXOS

Anexo 1.- Recopilación etnobotánica – Encuestas.

Primera encuesta



Ilustración .- Encuestado en la Comunidad Quisacocha.

Fuente: La autora, 2011.

Sexo: M F

Edad: 63 años

Nombre: José Tanguila

¿Conoce la planta?

Si No

¿Con qué nombres la conoce?

pikshigua, kuiship, kupa, rabo de ratón

¿Utilizan la planta?

Si No

¿Para qué la utiliza?

Como madera y medicina. Para hongos de los pies, infecciones y lastimados - cortes de la piel para bajar de peso. Los guerreros antiguos tomaban agua de pikshigua para aguantar días sin comer y no cansarse.

¿Qué parte de la planta usa?

El tronco para madera y para medicina las hojas y las semillas.

¿Cómo la usa?

Se hierve dos semillas en medio litro de agua se toma todo el día para bajar la barriga.

Se hierve dos puñados de hojas en un litro de agua por 10 minutos; con el agua se lavan los cortes o lastimados y las hojas se machacan y se ponen sobre la herida o en los hongos de los pies.

¿Quién le informó sobre el uso de la planta?

Abuelos y padres

¿Cuándo es el mejor tiempo para utilizarla?

Todo el tiempo desde que la planta es pequeña.

Segunda encuesta



Ilustración.- Encuestado en la Comunidad de Capirona.

Fuente: La autora, 2011.

Sexo: M F

Edad: 57 años

Nombre: Pascual Cerda

¿Conoce la planta?

Si No

¿Con qué nombres la conoce?

kuiship, kupa, pikshigua, rabo de ratón y hoja de canoa.

¿Utilizan la planta?

Si No

¿Para qué la utiliza?

Para quitar el hambre, bajar la barriga, curar las heridas de la piel, curar infecciones. Antiguamente los guerreros tomaban agua de estas hojas antes de las peleas.

¿Qué parte de la planta usa?

Para medicina las hojas y las semillas. Para madera el tronco.

¿Cómo la usa?

Se hierve por 15 minutos un litro de agua con dos puñados llenos de hojas; con el agua se lavan las heridas varias veces y las hojas se las machaca con una piedra y se pone sobre la herida o la piel infectada amarrada con un trapo.

Se hierve dos semillas en medio litro de agua se toma todo el día para bajar la barriga; las semillas se machacan con una piedra y se ponen sobre la barriga (se amarra con un trapo).

¿Quién le informó sobre el uso de la planta?

Abuelos y padres

¿Cuándo es el mejor tiempo para utilizarla?

Las hojas todo el tiempo desde que la planta es pequeña y la semilla se utiliza cuando cae del árbol.

Tercera encuesta



Ilustración.- Encuestada en el Tena

Fuente: La autora, 2011.

Sexo: M F

Edad: 54 años

Nombre: Rosa Chongo

¿Conoce la planta?

Si No

¿Con qué nombres la conoce?

hoja de canoa, rabo de ratón y pikshigua.

¿Utilizan la planta?

Si No

¿Para qué la utiliza?

Para bajar de peso, bajar la barriga, lavarse las heridas- desinfectante, curar lastimados (cicatrizan) y como madera.

¿Qué parte de la planta usa?

Las semillas y hojas.

¿Cómo la usa?

Se hierven cuatro semillas en un litro de agua por 15 minutos; se toma el agua durante todo el día para bajar de peso y las semillas se machan y se ponen sobre el estómago amarradas con un trapo para tener una barriga plana.

Dos puñados llenos de hojas se hierven en un litro de agua por 10 minutos; con el agua se limpian los lastimados o infecciones y las hojas machacadas se ponen sobre los cortes amarradas con trapos.

¿Quién le informo sobre el uso de la planta?

Los abuelos y padres ya la sabían utilizar

¿Cuándo es el mejor tiempo para utilizarla?

Cuando el árbol tiene flor.

Anexo 2.- Ficha de Staphylococcus aureus.

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
COLECCIÓN DE CULTIVOS MICROBIANOS**

Av. 12 de Octubre 1076 y Roca. Laboratorio de Microbiología DISerlab – PUCE. Telf: (593)22991677.
E-mail:

Registro de cepas preservadas.

Tipo de microorganismo				Uso exclusivo de CCEB	
Bacteria	x	Arquea		CCEB # de acceso: 1	
Hongo		Levadura		Fecha de recepción: 4/V/2009	
				Fecha de acceso: 6/V/2009	

Código: **EB-I-1** Especie: *Staphylococcus aureus*.

Depósito interno: Depósito externo:

Depósito para acceso público: Depósito con acceso restringido:

Designación de la cepa utilizada por el depositante: Cepa 6
¿Es cepa tipo? No # de Acceso en otras colecciones: Cepa 6

Estado en que se recibe la cepa

Metabólicamente activa		Preservada	x	Medio y condiciones para recuperar la cepa: Se recibe liofilizado al que se añade 2 ml de BHI caldo y se incuba por dos horas a 35°C para inocularse en TSA.
------------------------	--	------------	---	---

Origen de la cepa.

Fuente de aislamiento: Indefinido
Laboratorio /Institución: Indefinido
Origen geográfico (Ciudad/Provincia/País): Indefinido

Identificación

Medios de cultivo en que se aísla a partir de la muestra.	Aislado por: Indefinido
	Fecha aislamiento: Indefinido
	Identificado por: Personal DISerlab - PUCE
	Método identificación: Pruebas bioquímicas convencionales
	Fecha identificación: indefinido
Nivel Bioseguridad: 2	Medios y condiciones adecuadas para cultivo: 35° C, TSA, Agar nutritivo, o medios de cultivo semejantes.

Caracterización:

Preservación (Uso exclusivo CCEB)

Fecha de preservación: 6/V/2009		
Cepa de reserva	Método: leche descremada 12%, glucosa 2%, -70°C	# viales: 4 viales
		Ubicación: CR1 (naranja) A1- A4
Cepa de distribución	Método: BHI caldo con 20% Glicerol	# viales: 9 viales
		Ubicación: CT1 (amarilla) A1 – A9
Medios de cultivo utilizados antes de preservación: TSA		
Preservado por: Martín Marcial		

Fuente: DISerlab – PUCE, 2011.

Anexo 3.- Ficha de *Bacillus pumilus*.

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
COLECCIÓN DE CULTIVOS MICROBIANOS**

Av. 12 de Octubre 1076 y Roca. Laboratorio de Microbiología DISerlab – PUCE. Telf: (593)22991677.
E-mail:

Registro de cepas preservadas.

Tipo de microorganismo				Uso exclusivo de CCEB	
Bacteria	x	Arquea		CCEB # de acceso: 93	
Hongo		Levadura		Fecha de recepción: 23/XII/2009	
				Fecha de acceso: 28/II/2010	

Código: EB-I-93	Especie: <i>Bacillus pumilus</i>
------------------------	----------------------------------

Depósito interno: Depósito externo:

Depósito para acceso público: Depósito con acceso restringido:

Designación de la cepa utilizada por el depositante:		
¿Es cepa tipo?	No	# de Acceso en otras colecciones:

Estado en que se recibe la cepa		
Metabólicamente activa	x	Preservada
Medio y condiciones para recuperar la cepa:		

Origen de la cepa.	
Fuente de aislamiento: Desechos hospitalarios no tratados del relleno sanitario de Quito	
Laboratorio /Institución: DISerLab - PUCE	
Origen geográfico (Ciudad/Provincia/País): Quito /Pichincha / Ecuador	

Identificación	
Medios de cultivo en que se aísla a partir de la muestra.	Aislado por: Marco Gudiño
	Fecha aislamiento: 20/XII/2009
enriquecimiento selectivo en TSB y Agar sangre de cordero	Identificado por: Marco Gudiño
	Método identificación: API 50CH + API 20E
	Fecha identificación: 23/XII/2009
Nivel Bioseguridad: 1	Medios y condiciones adecuadas para cultivo: 30° C, TSA, agar nutritivo o medios de cultivo semejantes

Caracterización:

Preservación (Uso exclusivo CCEB)		
Fecha de preservación: 29/ I /2010		
Cepa de reserva	Método: leche descremada 10%, glucosa 1%, Ext de levadura 0.5%, Glicerol 10% -70°C	# viales: 5 viales Ubicación: CR4 (rosa) G8 – H3
Cepa de distribución	Método: BHI caldo con 20% de Glicerol -20°C	# viales: 9 viales Ubicación: CT8 (azul) B2 – C1
Medios de cultivo utilizados antes de preservación: TSA		
Preservado por: Martín Marcial		



Fuente: DISerlab – PUCE, 2011.

Anexo 4.- Ficha de *Escherichia coli*.

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
COLECCIÓN DE CULTIVOS MICROBIANOS**

Av. 12 de Octubre 1076 y Roca. Laboratorio de Microbiología DISerlab – PUCE. Telf: (593)22991677.
E-mail:

Registro de cepas preservadas.

Tipo de microorganismo				Uso exclusivo de CCEB	
Bacteria	x	Arquea		CCEB # de acceso: No Aplica	
Hongo		Levadura		Fecha de recepción: 18/V/2008	
				Fecha de acceso: 18/V/2009	

Código: No Aplica Especie: *Escherichia coli*.

Depósito interno: Depósito externo:

Depósito para acceso público: Depósito con acceso restringido:

Designación de la cepa utilizada por el depositante:

¿Es cepa tipo? # de Acceso en otras colecciones:

Estado en que se recibe la cepa

Metabólicamente activa	x	Preservada		Medio y condiciones para recuperar la cepa:

Origen de la cepa.

Fuente de aislamiento: Laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos
Laboratorio /Institución: DISerLAB-PUCE
Origen geográfico (Ciudad/Provincia/País): Quito/Pichincha/Ecuador

Identificación

Medios de cultivo en que se aísla a partir de la muestra.	Aislado por: María L. Almeida		
	Fecha aislamiento: IV / 2009		
Agar Chocolate, sangre de cordero y Mc Conkey	Identificado por: María L. Almeida		
	Método identificación: Bioquímica convencional y Sistema API 20E. Fecha identificación: IV / 2009		
Nivel Bioseguridad: 2	Medios y condiciones adecuadas para cultivo: 35° C, TSA, Agar nutritivo, Agar Sangre/MacConkey o medios de cultivo semejantes.		

Caracterización:
Sensible a: Ampicilina sulbactam, Cefalotina, Cefazolina, Cefuroxima

Preservación (Uso exclusivo CCEB)

Fecha de preservación: 19/V/2009			
Cepa de reserva		No Aplica	
Cepa de distribución	x	Método: BHI caldo con 20% Glicerol -20°C	# viales: 5 viales Ubicación: Laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos
Medios de cultivo utilizados antes de preservación: TSA + 0,6g /L de Cefalotina.			
Preservado por: María L. Almeida			

PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATOLICA DEL ECUADOR

Fuente: DISerlab – PUCE, 2011.

Anexo 5.- Ficha de Salmonella sp.

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
COLECCIÓN DE CULTIVOS MICROBIANOS**

Av. 12 de Octubre 1076 y Roca. Laboratorio de Microbiología DISerlab – PUCE. Telf: (593)22991677.
E-mail:

Registro de cepas preservadas.

Tipo de microorganismo				Uso exclusivo de CCEB	
Bacteria	x	Arquea		CCEB # de acceso: 56	
Hongo		Levadura		Fecha de recepción: 1/VII/2009	
				Fecha de acceso: 12/XI/2009	

Código: EB-I-56	Especie: <i>Salmonella sp</i>
Depósito interno: <input checked="" type="checkbox"/>	Depósito externo: <input type="checkbox"/>
Depósito para acceso público: <input checked="" type="checkbox"/>	Depósito con acceso restringido: <input type="checkbox"/>

Designación de la cepa utilizada por el depositante:		
¿Es cepa tipo?	No	# de Acceso en otras colecciones:

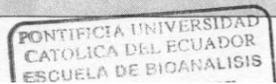
Estado en que se recibe la cepa			
Metabólicamente activa		Preservada	x
Medio y condiciones para recuperar la cepa: Cepa congelada en leche, se incuba 10 minutos para inocularse en TSA 35°C			

Origen de la cepa.	
Fuente de aislamiento: indefinido	
Laboratorio /Institución: DISerLAB - PUCE	
Origen geográfico (Ciudad/Provincia/País): Quito / Pichincha / Ecuador	

Identificación	
Medios de cultivo en que se aísla a partir de la muestra.	Aislado por: Martín Marcial
	Fecha aislamiento: indefinido
	Identificado por: Martín Marcial
	Método identificación: Bioquímica convencional + API 20E
	Fecha identificación: 1/ VII /2009
Nivel Bioseguridad: 2	Medios y condiciones adecuadas para cultivo: 35° C, TSA, agar nutritivo o medios semejantes

Caracterización: <i>Salmonella sp.</i> Subgrupo 3	
---	--

Preservación (Uso exclusivo CCEB)			
Fecha de preservación: 13/XI/2009			
Cepa de reserva	X	Método: leche descremada 10%, glucosa 1%, Extracto de levadura 0,5%, Glicerol 10% -70°C	# viales: 3 viales Ubicación: CR3 (celeste) 50 - 53
Cepa de distribución	X	Método: BHI caldo con 20% de Glicerol -20°C	# viales: 6 viales Ubicación: CT5 (naranja) 14 - 19
Medios de cultivo utilizados antes de preservación: TSA			
Preservado por: Martín Marcial – Daniela Vásquez			



Fuente: DISerlab – PUCE, 2011.

Anexo 6.- Ficha de *Candida albicans*.

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
COLECCIÓN DE CULTIVOS MICROBIANOS**

Av. 12 de Octubre 1076 y Roca. Laboratorio de Microbiología DISerlab – PUCE. Telf: (593)22991677.
E-mail:

Registro de cepas preservadas.

Tipo de microorganismo				Uso exclusivo de CCEB	
Bacteria	<input type="checkbox"/>	Arquea	<input type="checkbox"/>	CCEB # de acceso: No Aplica	
Hongo	<input type="checkbox"/>	Levadura	<input checked="" type="checkbox"/>	Fecha de recepción: 18/V/2008	
				Fecha de acceso: 18/V/2009	

Código: No Aplica Especie: *Candida albicans*

Depósito interno: Depósito externo:

Depósito para acceso público: Depósito con acceso restringido:

Designación de la cepa utilizada por el depositante:

¿Es cepa tipo? # de Acceso en otras colecciones:

Estado en que se recibe la cepa

Metabólicamente activa	<input checked="" type="checkbox"/>	Preservada	<input type="checkbox"/>	Medio y condiciones para recuperar la cepa:

Origen de la cepa.

Fuente de aislamiento: Laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos
Laboratorio /Institución: DISerLAB-PUCE
Origen geográfico (Ciudad/Provincia/País): Quito/Pichincha/Ecuador

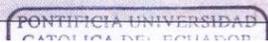
Identificación

Medios de cultivo en que se aísla a partir de la muestra.	Aislado por: María L. Almeida
	Fecha aislamiento: IV / 2009
Agar Sangre, Agar Mycosel	Identificado por: María L. Almeida
	Método identificación: Gram y crecimiento de colonias color verde en CHROMagar <i>Candida</i>
	Fecha identificación: IV / 2009
Nivel Bioseguridad: 2	Medios y condiciones adecuadas para cultivo: 35° C, TSA, Agar nutritivo, Agar Mycosel o medios de cultivo semejantes.

Caracterización:
Blastoconidias

Preservación (Uso exclusivo CCEB)

Fecha de preservación: 19/V/2009			
Cepa de reserva	<input type="checkbox"/>	No Aplica	
Cepa de distribución	<input checked="" type="checkbox"/>	Método: BHI caldo con 20% Glicerol -20°C	# viales: 5 viales Ubicación: Laboratorio de Microbiología de Aguas y Alimentos
Medios de cultivo utilizados antes de preservación: TSA			
Preservado por: María L. Almeida			



Fuente: DISerlab – PUCE, 2011.

Anexo 7.- Identificación de la muestra en el Herbario Nacional.

**Sección Botánica
Museo Ecuatoriano de Ciencias
Naturales**

“Herbario Nacional QCNE”
Avenida Río Coca, Casilla Postal 17-07-8976
Tel/Fax (593-2) 2441-592, 2449 824
Quito, Ecuador

INSTITUCION: Gabriela Armas (Universidad Politécnica Salesiana).
FECHA: 1-12-2011

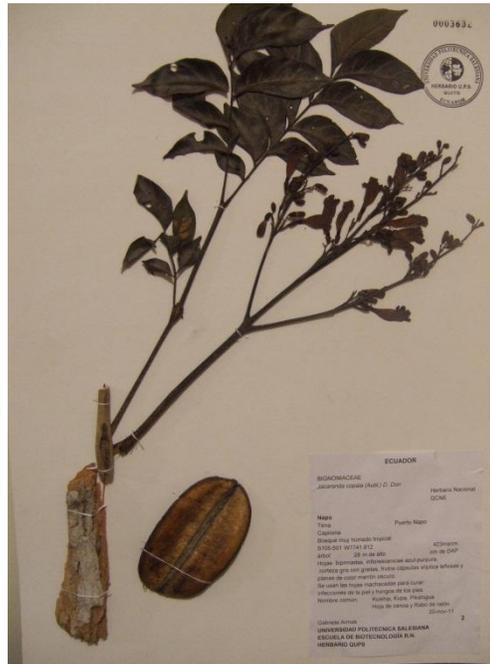
Nº	FAMILIA	Especie
1	BIGNONIACEAE	<i>Jacaranda copaia</i> (Aubl.) D. Don

TOTAL DE ESPECIES: 1



Fuente: QCNE, 2011.

Anexo 8.- Muestra ingresada al Herbario de la Universidad Politécnica Salesiana.



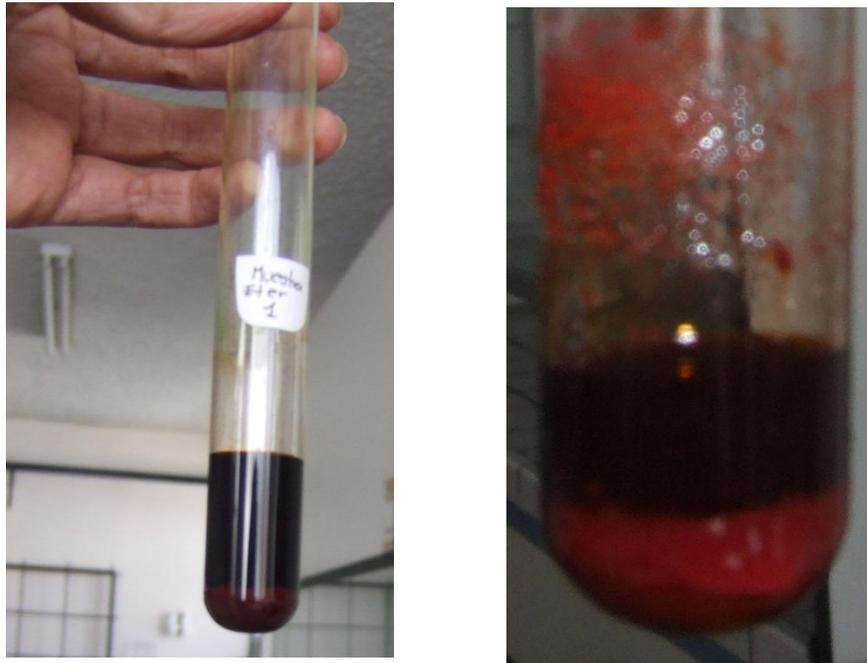
Fuente: La autora, 2011.

Anexo 9.- Maceración de *J. copaia* en éter etílico.



Fuente: La autora, 2011.

Anexo 10.- Ensayo de Sudan, presencia de aceites y grasas.



Fuente: La autora, 2011.

Anexo 11.- Ensayo de Liebermann-Burchard, presencia de triterpenos y esteroides.



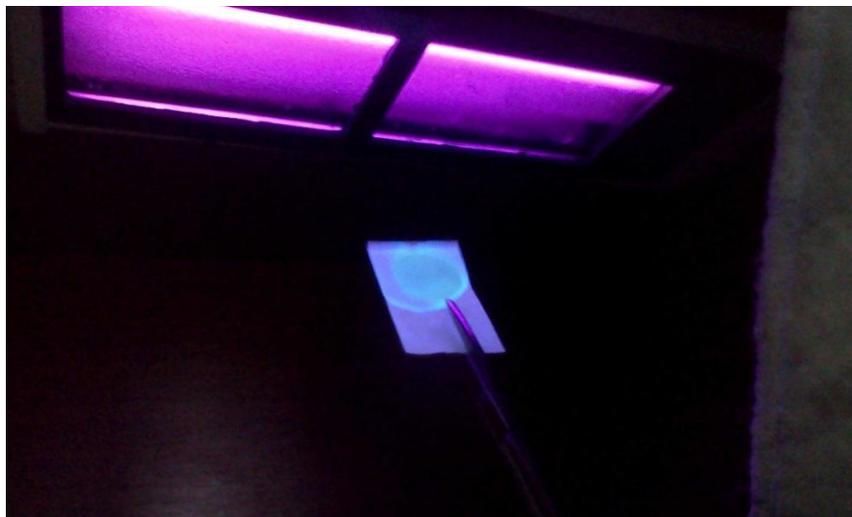
Fuente: La autora, 2011.

Anexo 12.- Maceración de J. copaia en etanol.



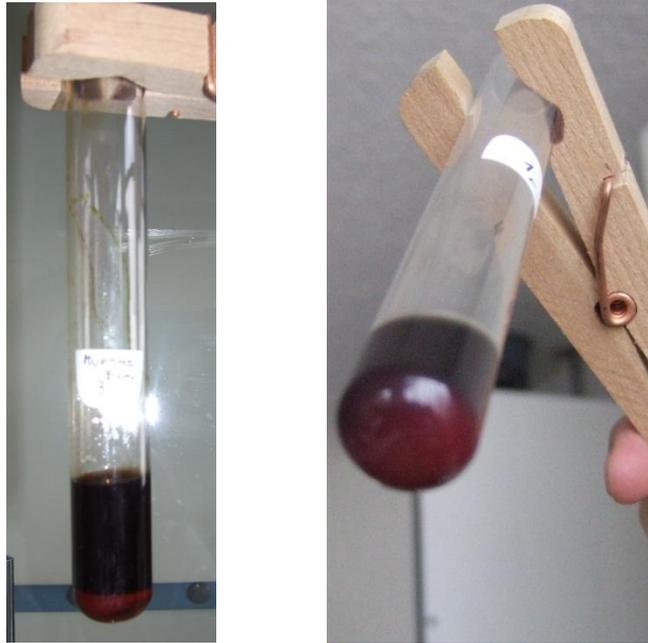
Fuente: La autora, 2011.

Anexo 13.- Ensayo de catequinas, presencia de catequinas.



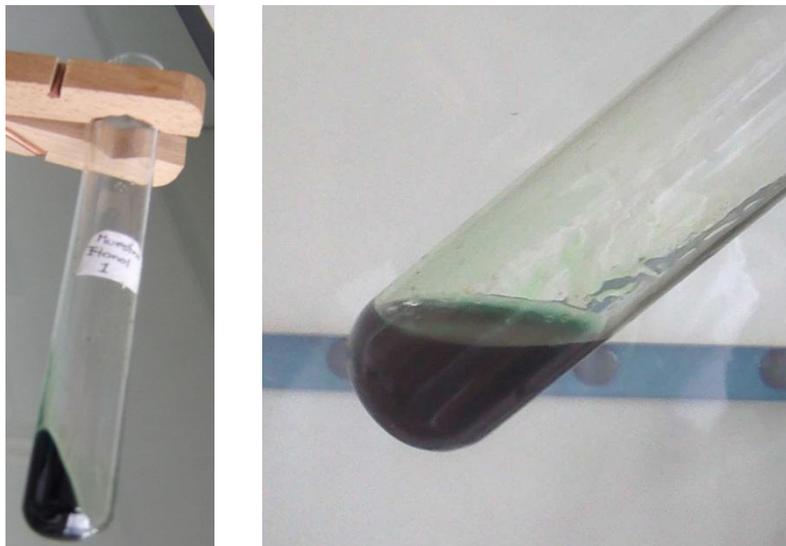
Fuente: La autora, 2011.

Anexo 14.- Ensayo de Fehling, presencia de azúcares reductores.



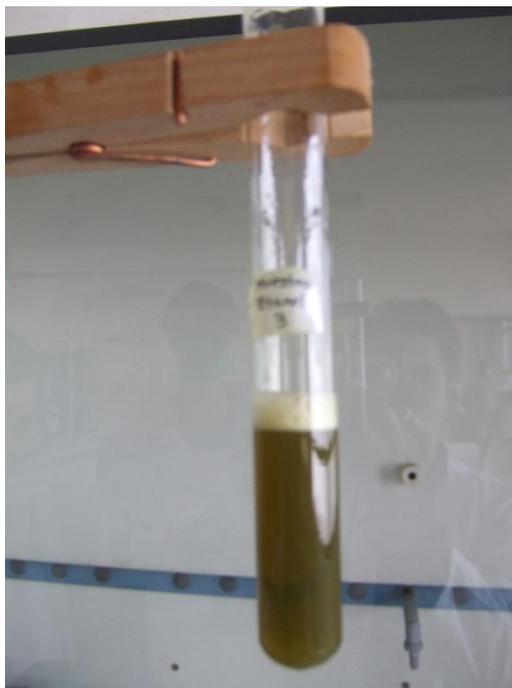
Fuente: La autora, 2011.

Anexo 15.- Ensayo de Liebermann-Burchard, presencia de triterpenos y esteroides.



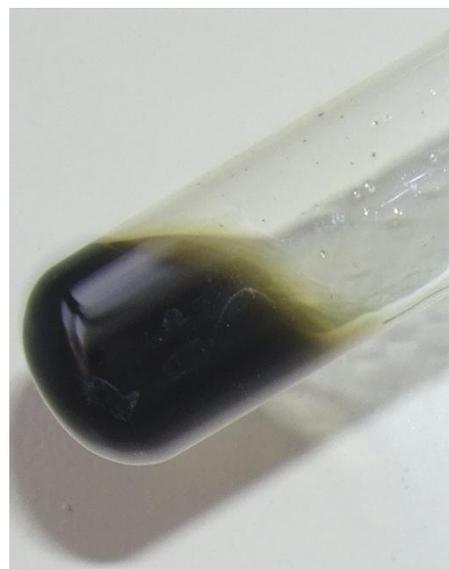
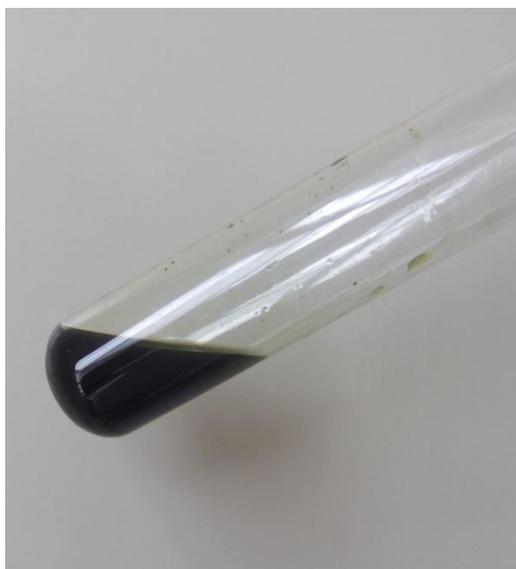
Fuente: La autora, 2011.

Anexo 16.- Ensayo de espuma, presencia de saponinas.



Fuente: La autora, 2011.

Anexo 17.- Ensayo de cloruro férrico, presencia de fenoles y taninos.



Fuente: La autora, 2011.

Anexo 18.- Ensayo de Borntrager, presencia de quinonas.



Fuente: La autora, 2011.

Anexo 19.- Ensayo de Dragendorff, presencia de alcaloides.



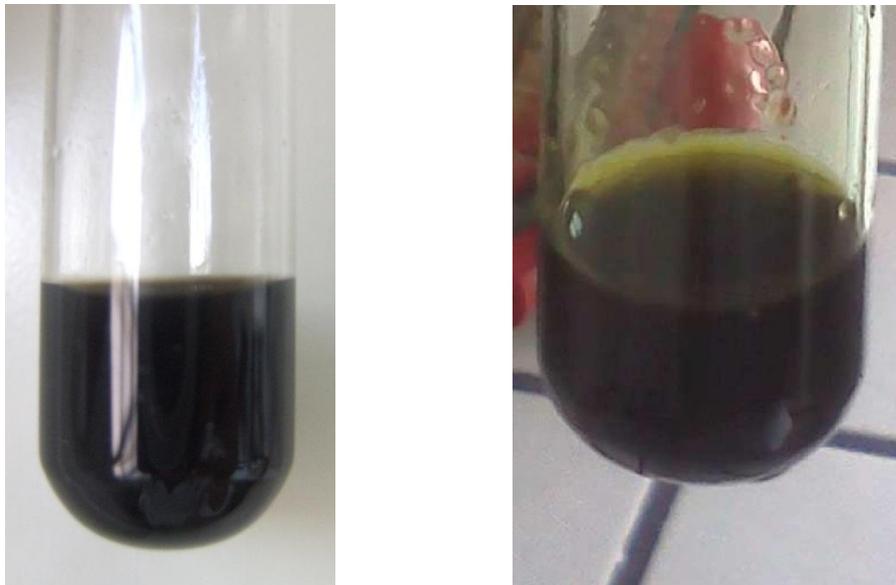
Fuente: La autora, 2011.

Anexo 20.- Macerado de J. copaia en agua.



Fuente: La autora, 2011.

Anexo 21.- Ensayo de cloruro férrico, presencia de fenoles y taninos.



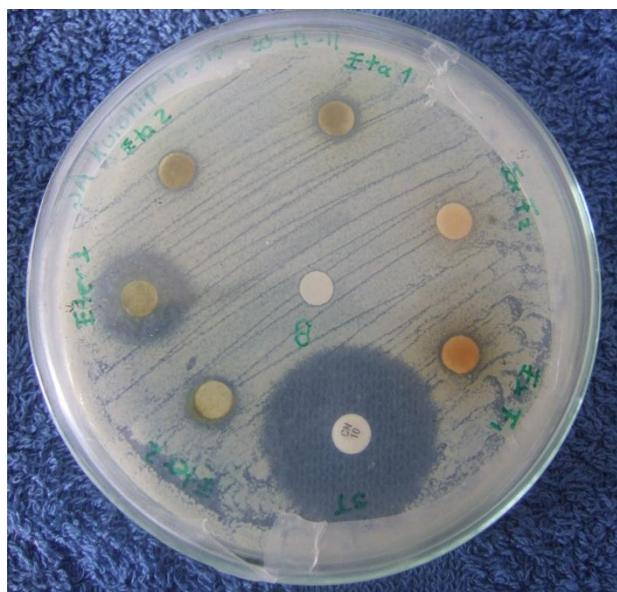
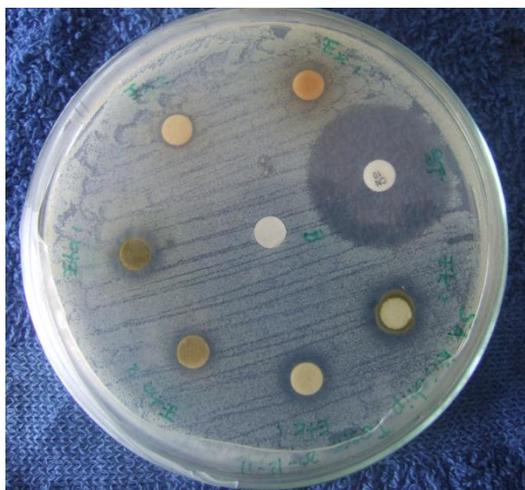
Fuente: La autora, 2011.

Anexo 22.- Ensayo de Fehling, presencia de azúcares reductores.



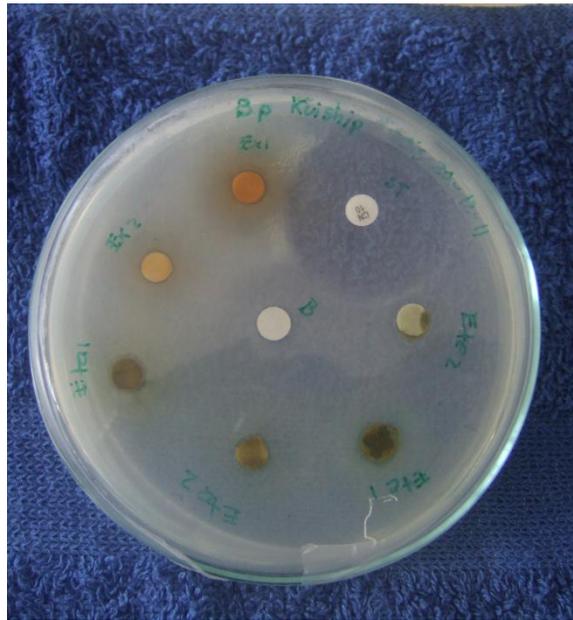
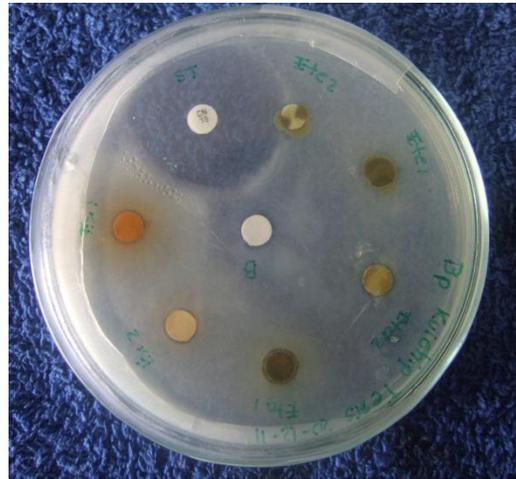
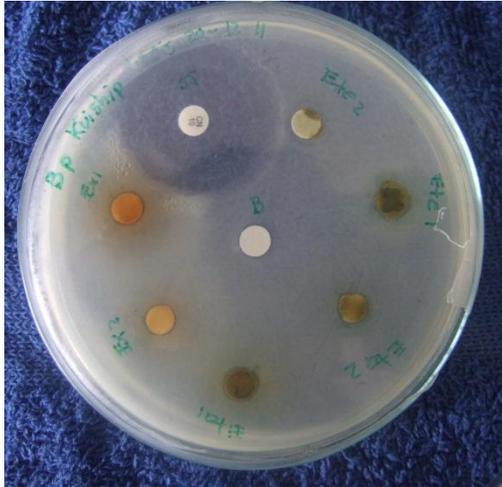
Fuente: La autora, 2011.

Anexo 23.- Halo de inhibición, S. aureus.



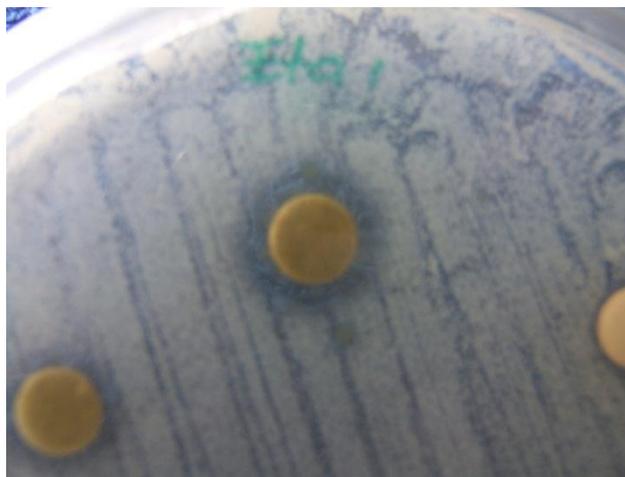
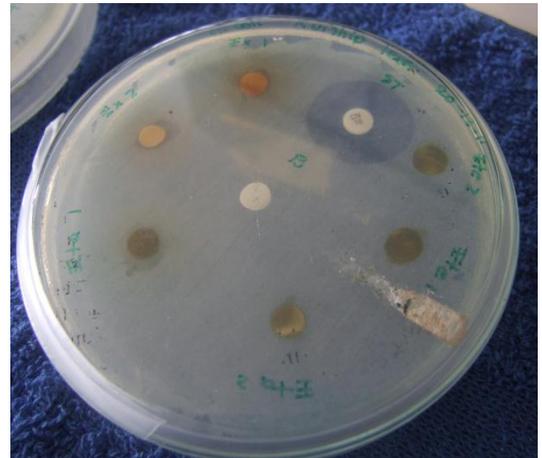
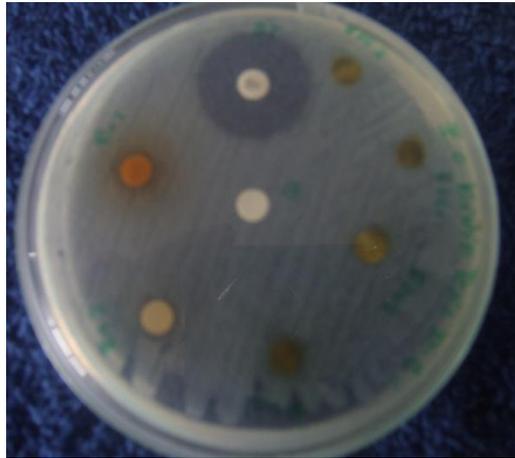
Fuente: La autora, 2011.

Anexo 24.- Halo de inhibición, B. pumilus.



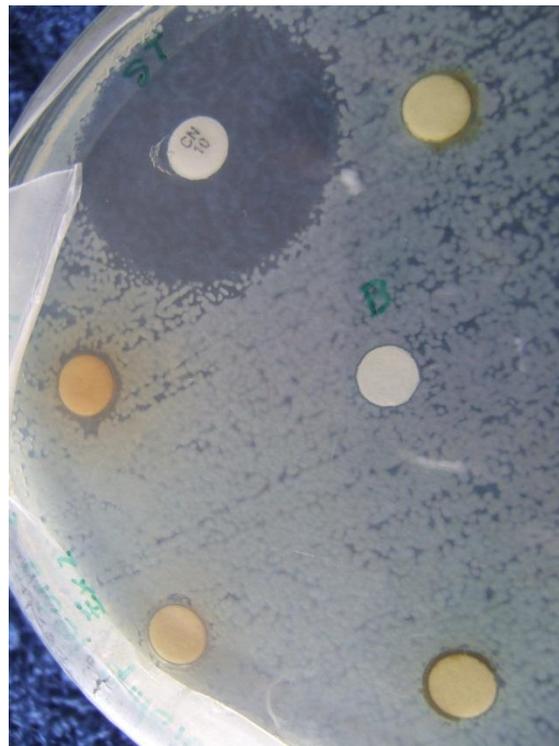
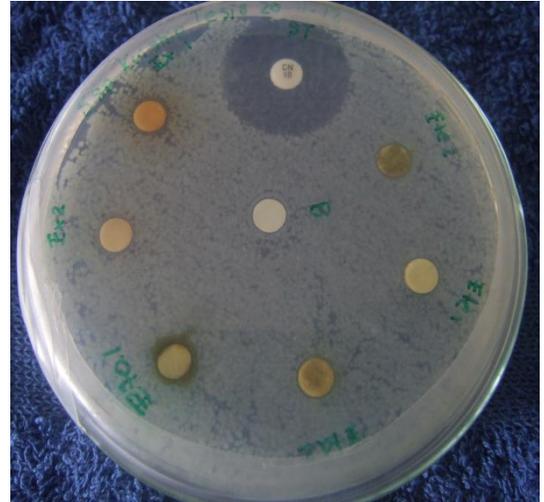
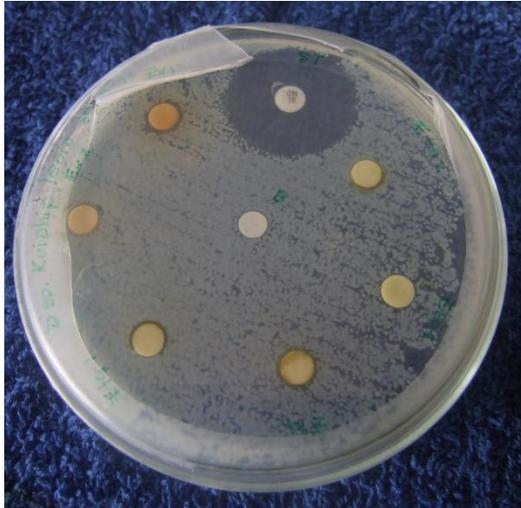
Fuente: La autora, 2011.

Anexo 25.- Halo de inhibición, E. coli.



Fuente: La autora, 2011.

Anexo 26.- Halo de inhibición, Salmonella sp.



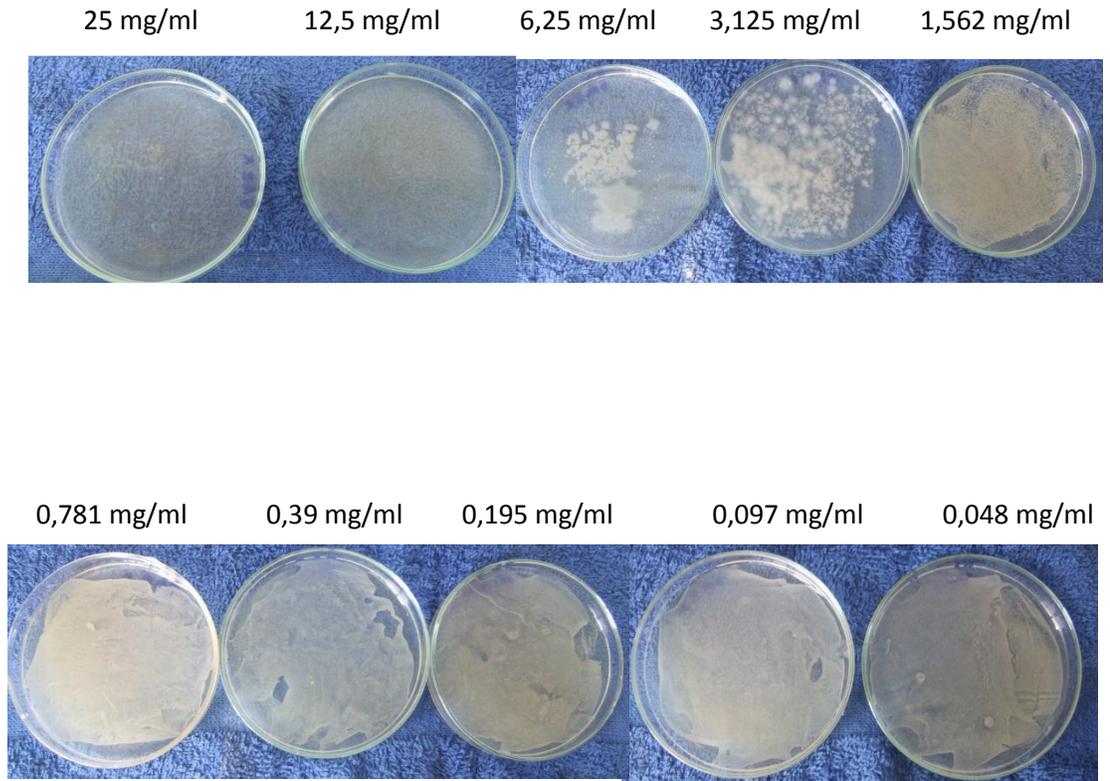
Fuente: La autora, 2011.

Anexo 27.- Halo de inhibición, C. albicans.



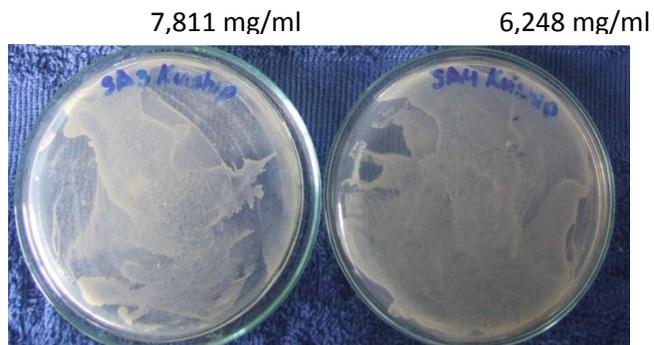
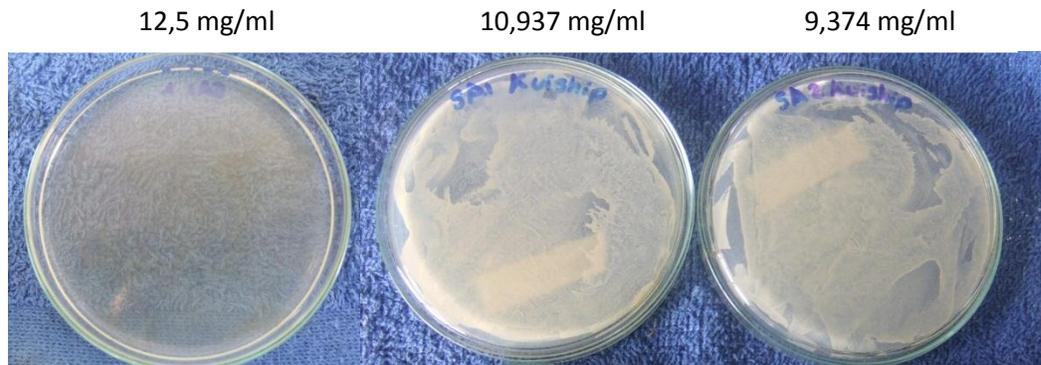
Fuente: La autora, 2011.

Anexo 28.- Dilución doble seriada, S. aureus.



Fuente: La autora, 2012.

Anexo 29.- Microdilución, *S. aureus*.



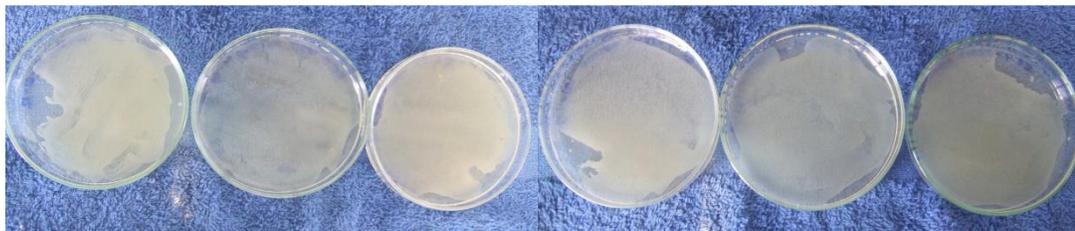
Fuente: La autora, 2012.

Anexo 30.- Dilución doble seriada, E. coli.

50 mg/ml 25 mg/ml 12,5 mg/ml 6,25 mg/ml

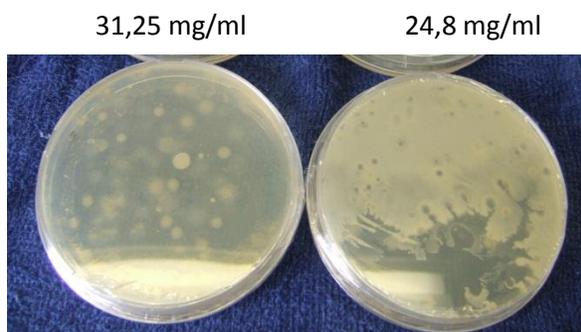
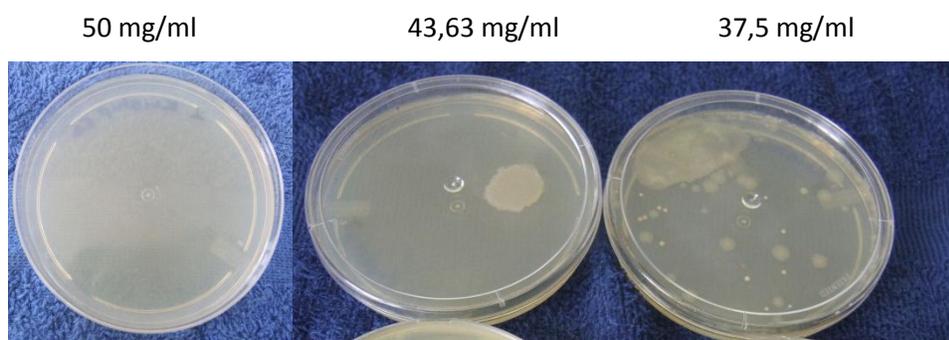


3,125 mg/ml 1,562 mg/ml 0,781 mg/ml 0,39 mg/ml 0,195 mg/ml 0,097 mg/ml



Fuente: La autora, 2012.

Anexo 31.- Microdilución, E. coli.



Fuente: La autora, 2012.