

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE QUITO**

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

**Tesis previa a la obtención del título de:**

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:**

**CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD  
ANTIMICROBIANA Y ANTIOXIDANTE DE *Dendrophthora elliptica*  
(Gardner) Krug & Urb. (SANTALACEAE).**

**AUTORA:**

**JOHANA NARCISA CORONEL DÁVALOS**

**DIRECTOR:**

**WILSON FABIAN TAPIA HERNANDEZ.**

**Quito, abril del 2014**

**DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO  
DEL TRABAJO DE GRADO**

Yo, Johana Narcisa Coronel Dávalos, autorizo a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además declaro que los conceptos y análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de la autora.

-----

Johana Narcisa Coronel Dávalos

CC. 172351460-8

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Politécnica Salesiana quienes en el transcurso de mi formación académica proporcionaron los conocimientos necesarios para llevar a cabo mi trabajo de tesis.

Al Q.F. Wilson Tapia H., quien fue un pilar fundamental en mi formación académica y me permitió ser parte del Proyecto de Investigación para de esta forma obtener mi trabajo de titulación, así como su tiempo y dedicación ante la ejecución de la misma.

Al CIVABI y a los auxiliares de laboratorio por su ayuda y respaldo para poder desarrollar las actividades en laboratorio.

A cada uno de los docentes que brindaron su conocimiento, tiempo e interés por formar profesionales de calidad, quienes a la vez fueron el ejemplo de perseverancia y ética.

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I.....	6
MARCO TEÓRICO .....	6
1.1. Familia Santalaceae .....	6
1.2. Dendrophthora.....	7
1.2.1. Generalidades <i>Dendrophthora</i> .....	7
1.3. <i>Dendrophthora elliptica</i> .....	7
1.3.1. Taxonomía de la especie.....	7
1.4. Importancia tradicional.....	8
1.5. Distribución y hábitat .....	9
1.6. Caracterización fitoquímica .....	9
1.6.1. Tamizaje fitoquímico.....	9
1.7. Actividad biológica .....	10
1.7.1. Microorganismos .....	10
1.7.2. Bacterias.....	10
1.7.2.1.2. <i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i> .....	13
1.7.2.2. Bacterias Gram negativas.....	15
1.7.2.2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	15
1.7.2.2.2. <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	17
1.7.3. Levaduras.....	18

1.7.3.1.	<i>Candida albicans</i> .....	18
1.8.	Pruebas de antibiograma .....	20
1.8.1.	Difusión en agar .....	20
1.8.2.	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) .....	20
1.8.2.1.	Dilución doble .....	21
1.9.	Actividad antioxidante .....	21
1.9.1.	Fundamento de la actividad antioxidante .....	21
1.9.2.	Técnicas para determinación de actividad antioxidante .....	22
CAPÍTULO II .....		23
MARCO METODOLÓGICO .....		23
2.1.	Recolección e identificación de la especie vegetal <i>Dendrophthora elliptica</i> .....	23
2.1.1.	Lugar de recolección de muestra vegetal.....	23
2.2.	Identificación taxonómica .....	24
2.3.	Selección, estabilización y conservación de la muestra vegetal.....	24
2.3.1.	Selección, desinfección y secado de muestra vegetal.....	24
2.4.	Preparación de los extractos acuoso, etanólico y etéreo.....	26
2.5.	Screening fitoquímico .....	27
2.5.4.1.	Extracto etéreo .....	29
2.5.4.2.	Extracto etanólico.....	30
2.5.4.3.	Extracto acuoso .....	32
2.5.5.	Proceso de identificación .....	33
2.6.	Evaluación de actividad antibacteriana y antimicótica .....	35

2.6.5.1.	Determinación de sensibilidad de las bacterias frente a extractos .....	36
2.6.5.2.	Preparación de extractos a evaluar .....	37
2.6.5.3.	Preparación de medio de cultivo .....	37
2.6.5.4.	Viabilidad de cepas ATCC .....	39
2.6.5.5.	Preparación de sensidiscos .....	39
2.6.5.6.	Preparación del inóculo bacteriano .....	40
2.6.5.7.	Preparación de sensidiscos con diluciones a evaluar. ....	40
2.6.5.8.	Inoculación de las placas.....	41
2.6.5.9.	Lectura de placas e interpretación de resultados.....	42
2.6.6.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	42
2.6.6.1.	Selección de bacteria y extracto según su sensibilidad.....	42
2.6.6.2.	Concentración de extractos a ensayar .....	42
2.6.6.4.	Preparación de los tubos con extracto.....	43
2.6.6.5.	Inoculación en los tubos.....	44
2.7.	Evaluación de actividad antioxidante.....	44
2.7.1.	Determinación de la actividad antioxidante utilizando 2,2-difenil-1- picrilhidrazilo DPPH .....	44
2.7.1.4.1.	Preparación de solución DPPH .....	46
2.7.1.4.2.	Preparación de estándar de vitamina C .....	46
2.7.1.4.3.	Preparación estándar de extracto etanólico de té verde .....	47
2.7.1.4.4.	Preparación de muestra .....	47
CAPÍTULO III.....		49
RESULTADOS.....		49

3.1.	Identificación taxonómica .....	49
3.2.	Actividad antibacteriana .....	50
3.2.1.	Sensibilidad antibacteriana y antifúngica .....	50
3.2.1.1.	<i>Escherichia coli</i> .....	50
3.2.1.2.	<i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	51
3.2.1.3.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	52
3.2.1.4.	<i>Bacillus subtilissubsp. spizizenii</i> .....	52
3.2.1.5.	<i>Candida albicans</i> .....	53
3.3.	Análisis estadístico .....	55
3.3.1.	Promedio de halo de inhibición según el microorganismo .....	55
3.3.2.	Análisis estadístico “Prueba de Kruskall-Wallis” .....	55
3.3.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) .....	65
3.4.	Evaluación de actividad antioxidante de <i>D. elliptica</i> , mediante método de DPPH .....	69
3.3.2.	Cálculo IC <sub>50</sub> en té verde.....	70
3.4.2.	Cálculo IC <sub>50</sub> en Vitamina C .....	72
3.4.3.	Cálculo IC <sub>50</sub> en <i>Dendrophthora elliptica</i> .....	73
	CONCLUSIONES .....	76
	LISTA DE REFERENCIAS .....	78
	ANEXOS .....	81

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Descripción taxonómica de <i>D. elliptica</i> .....	7
Tabla 2.-Clasificación científica <i>S. aureus</i> .....	12
Tabla 3.- Clasificación científica de <i>B. subtilis subsp. spizizenii</i> .....	13
Tabla 4.- Clasificación científica <i>E. coli</i> .....	16
Tabla 5.- Clasificación científica <i>P.aeruginosa</i> .....	17
Tabla 6.-Clasificación científica, <i>C. albicans</i> .....	19
Tabla 7.- Identificación cualitativa de extractos etéreo, etanólico y acuoso de <i>D. elliptica</i> .....	49
Tabla 8.- Categorización de halos de inhibición .....	50
Tabla 9.-Halos de inhibición en mm de los extractos acuoso, etanólico y etéreo de <i>D. elliptica</i> frente a <i>E. coli</i> .....	51
Tabla 10.- Halos de inhibición en mm de los extractos acuoso, etanólico y etéreo de <i>D. elliptica</i> frente a <i>P .aeruginosa</i> .....	51
Tabla 11.-Halos de inhibición en mm de los extractos acuoso, etanólico y etéreo de <i>D. elliptica</i> frente a <i>S. aureus</i> .....	52
Tabla 12.- Halos de inhibición en mm de los extractos acuoso, etanólico y etéreo de <i>D. elliptica</i> frente a <i>B. subtilis subsp. spizizenii</i> .....	53
Tabla 13.-Halos de inhibición en mm de los extractos acuoso, etanólico y etéreo de <i>D. elliptica</i> frente a <i>C. albicans</i> .....	53
Tabla 14.- Codificación de sensibilidad de los microorganismos .....	54
Tabla 15. Promedio de halos de inhibición correspondiente a cada microorganismo sobre el extracto evaluado .....	55

Tabla 16.- Análisis estadístico “Prueba de Kruskal-Wallis” para sensibilidad antimicrobiana de <i>E. coli</i> frente a concentraciones de extractos de <i>D. elliptica</i> .....	57
Tabla 17.-Test a posteriori, Kruskal- Wallis All- Pairwise Comparisons Test, para concentraciones de extractos ensayados. ....	58
Tabla 18.- Análisis estadístico “Prueba de Kruskal-Wallis” para sensibilidad antimicrobiana de <i>P. aeruginosa</i> frente a concentraciones de extractos de <i>D. elliptica</i> .....	59
Tabla 19.-Test a posteriori, Kruskal- Wallis All- Pairwise Comparisons Test, para concentraciones de extractos ensayados .....	60
Tabla 20.- Análisis estadístico “Prueba de Kruskal-Wallis” para sensibilidad antimicrobiana de <i>S. aureus</i> frente a concentraciones de extractos de <i>D. elliptica</i> ...	61
Tabla 21.-Test a posteriori, Kruskal- Wallis All- Pairwise Comparisons Test, para concentraciones de extractos ensayados .....	62
Tabla 22.- Análisis estadístico “Prueba de Kruskal-Wallis” para sensibilidad antimicrobiana de <i>Bacillus subtilissubsp. spizizenii</i> frente a concentraciones de extractos de <i>D. elliptica</i> .....	63
Tabla 23.-Test a posteriori, Kruskal- Wallis All- Pairwise Comparisons Test, para concentraciones de extractos ensayados. ....	64
Tabla 24.- Concentración mínima inhibitoria por mg de extracto etéreo de <i>D. elliptica</i> ; frente a <i>Escherichia coli</i> .....	65
Tabla 25. Concentración mínima inhibitoria por mg de extracto acuoso de <i>D. elliptica</i> ; frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	66
Tabla 26.-Concentración mínima inhibitoria por mg de extracto acuoso de <i>D. elliptica</i> ; frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	67
Tabla 27.- Concentración mínima inhibitoria por mg de extracto etanólico de <i>D. elliptica</i> ; frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	68

Tabla 28.- Concentración mínima inhibitoria por mg de extracto etéreo de <i>D. elliptica</i> ; frente a <i>Staphylococcus aureus</i> .....	69
Tabla 29.- Absorbancia de DPPH con diferentes concentraciones de extracto etanólico de té verde.....	71
Tabla 30.- ABS de diluciones del estándar de vitamina C con DPPH.....	72
Tabla 31.- ABS de DPPH frente a diluciones del extracto etanólico de <i>D. elliptica</i> .	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- <i>Dendrophthora elliptica</i> .....	6
Figura 2.- <i>Dendrophthora elliptica</i> , montaje para herbario .....	8
Figura 3.- Distribución geográfica <i>Dendrophthora elliptica</i> .....	9
Figura 4.- Tinción microscópica de Bacteria Gram + .....	11
Figura 5.- <i>Staphylococcus aureus</i> .....	12
Figura 6.- <i>B.subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> .....	14
Figura 7.- Bacilos Gram (-) .....	15
Figura 8.- <i>Escherichia coli</i> .....	15
Figura 9.- <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	17
Figura 10.- <i>Candida albicans</i> .....	18
Figura 11.- Lugar de recolección de material vegetal .....	23
Figura 12.- Esquema de las reacciones a realizar en el extracto etéreo .....	29
Figura 13.- Esquema de las reacciones a realizar en el extracto etanólico .....	30
Figura 14.- Esquema de las reacciones a realizar en el extracto acuoso .....	32
Figura 15.- Porcentaje de inhibición del DPPH de extracto etanólico de Té verde, a diferentes concentraciones ug/ml .....	71
Figura 16.- Porcentaje de inhibición del DPPH del estándar sintético Vitamina Ca diferentes concentraciones ug/ml .....	73
Figura 17.- Porcentaje de inhibición del DPPH del estándar sintético de Vitamina C a diferentes concentraciones ug/ml .....	74
Figura 18.- Concentración de los extractos de Vitamina C, Té verde y <i>D. elliptica</i> .	75

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.- Certificado de autenticación botánica.....	81
Anexo 2.- Montaje de la muestra vegetal <i>D. elliptica</i> para herbario U.P.S. ....	82
Anexo 3.- Muestra seca de <i>D. elliptica</i> . ....	83
Anexo 4.- Obtención de extractos de <i>D. elliptica</i> .....	84
Anexo 5.- Preparación de soluciones para actividad antimicrobiana. ....	84
Anexo 6.- Cepas ATCC de microorganismos a ensayar.....	85
Anexo 7.- Siembra de microorganismos en medios de cultivo.....	85
Anexo 8.- Sensibilidad de las cepas ante los extractos de <i>D. elliptica</i> . ....	86
Anexo 9.- Concentración mínima inhibitoria.....	87
Anexo 10.- Lecturas de placas de CMI.....	88
Anexo 11.- Actividad Antioxidante .....	90

## RESUMEN

Se determinó la composición química, actividad antimicrobiana y actividad antioxidante en los extractos obtenidos por maceración de las hojas secas de *Dendrophthora elliptica* con disolventes de polaridad creciente, a través de técnicas comúnmente utilizadas como screening fitoquímico, difusión en placa y DPPH respectivamente.

Se encontró en los extractos: aceites y grasas, triterpenos-esteroides, catequinas, saponinas, azúcares reductores, alcaloides, lactonas y cumarinas, fenoles y taninos, flavonoides aminoácidos y principios amargos.

Se encontró actividad antibacteriana sobre *S. aureus*, con una CMI de 100 mg/ml en extracto acuoso y etéreo y 50 mg/ml en extracto etanólico; sobre *P. aeruginosa*, con un valor de 100 mg/ml de extracto acuoso y *E. coli* con un valor de 400 mg/ml en extracto etéreo.

Se determinó escasa actividad antioxidante en comparación con estándares de Té verde y Vitamina C.

**Palabras clave:** *Dendrophthora elliptica*, caracterización fitoquímica, CMI, actividad antibacteriana, antioxidante.

## ABSTRACT

It was determined the chemical composition, antimicrobial activity and antioxidant activity in the samples extracts that were obtained by maceration of the dried leaves of *Dendrophthora elliptica* with solvents of increasing polarity was determined through techniques commonly used as phytochemical screening, disk diffusion and DPPH respectively.

It was found in the extracts: oils and fats, triterpenes, steroids, catechins, saponins, reducing sugars, alkaloids, lactones and cumarins, phenols and tannins, flavonoids, amino acids and bitter substances.

Antibacterial activity was found for *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *E. coli* with an CMI of 100 mg/ml in aqueous extract and ethereal extract; 50 mg/ml in ethanolic extract; 25 mg/ml in aqueous extract, and 40 mg/ml in ethereal extract, respectively.

It was determined that the antioxidant activity was scant that the comparison standarts of green tea and vitamin C.

**Keywords:** *Dendrophthora elliptica*, phytochemical characterization, CMI, antibacterial, antioxidant.

## INTRODUCCIÓN

El Ecuador es un país con gran riqueza biológica y enorme potencial de vida que constituye su mayor patrimonio. A pesar de su extensión territorial relativamente pequeña, el Ecuador es considerado como uno de los más ricos en cuanto a diversidad de plantas y animales; con un 0,2% de la superficie terrestre del mundo, tiene en su territorio el 10% de todas las especies y plantas del planeta. Se ha calculado que en total posee entre 20 y 25 mil especies de plantas vasculares, estimándose que el 20% de estas son endémicas (INEFAN, 2010).

El género *Dendrophthora* cuenta con especies nativas de las Antillas y América tropical (Liogier, 2000). *Dendrophthora elliptica* es un arbusto hemiparásito que crece entre 1500-2000 metros sobre el nivel del mar (Trópicos, 2009).

El capítulo I describe aspectos generales acerca de la especie vegetal que se investiga entre los que se menciona la descripción botánica y taxonómica de la planta así como su importancia y distribución geográfica. Se describe en teoría el fundamento de las técnicas analíticas empleadas como el screening fitoquímico, la actividad antibacteriana y aspectos de la evaluación de actividad antioxidante.

El capítulo II describe la metodología empleada en la determinación de la composición química, en la determinación de sensibilidad antimicrobiana (Kirby-Bauer y CMI) y en la determinación de la actividad antioxidante (DPPH)

En el capítulo III se presentan los resultados y estadísticos obtenidos de la presente investigación.

## **Planteamiento del problema**

### **Tema**

Caracterización fitoquímica y evaluación de actividad antimicrobiana y antioxidante de *Dendrophthora elliptica* (Gardner) Krug & Urb. (Santalaceae).

### **Justificación**

La utilización de plantas medicinales como fuente terapéutica se desarrolló junto al proceso histórico de la evolución humana, donde los conocimientos populares del cuidado de la salud han pasado de generación en generación (Lorenzi & Matos, 2008).

Martínez (2000), señala que el estudio sobre las plantas medicinales ha entrado en un ámbito de auge, tanto para la industria farmacéutica como cosmética, ya que su investigación sobre los metabolitos secundarios y sus posibles acciones terapéuticas han llegado a ser vistas como una fuente alternativa de potenciar o derivar fórmulas farmacéuticas en beneficio de la humanidad.

*Dendrophthora elliptica*, pertenece la familia Santalaceae; se caracteriza por distribuirse en regiones tropicales, subtropicales y templadas, hábito arbustivo y hemiparásita que se desarrollan sobre las raíces o en el caso de *Dendrophthora* sobre las ramas de otras plantas para complementar su nutrición con sales minerales (López, 2006). No se han encontrado estudios sobre la composición química ni actividad biológica de esta especie, sin embargo la cultura ancestral ecuatoriana define su uso como antipirética y para aliviar lesiones articulares utilizando las hojas preferentemente (Molina, 2012).

Por ello, esta investigación está orientada a la determinación cualitativa de metabolitos secundarios mediante la aplicación de técnicas analíticas como screening fitoquímico; la investigación de la actividad antimicrobiana y antifúngica aplicando la técnica de difusión en agar Kirby- Bauer (Granados, 2002) y la investigación de la actividad antioxidante utilizando la técnica de DPPH (Rincón, 2011), sobre extractos obtenidos de las hojas de esta especie con disolventes de baja, media y alta polaridad (Pabón ,2012).

## **Hipótesis**

### **Hipótesis Alternativa**

- Al menos una concentración del extracto vegetal (etanólico) de las hojas de *Dendrophthora elliptica* presenta actividad antioxidante ante el radical DPPH.
- Existe por lo menos una concentración de los extractos vegetales (etéreo, etanólico y acuoso) de las hojas de *Dendrophthora elliptica* cuya actividad antimicrobiana y antifúngica es diferente de los demás.
- Existe al menos uno de los cinco microorganismos experimentales cuyo desempeño biológico es diferente al de los demás.

## **Hipótesis Nula**

- Ninguna concentración del extracto vegetal (etanólico) de las hojas de *Dendrophthora elliptica* presenta actividad antioxidante ante el radical DPPH.
- Ninguna concentración de los extractos vegetales (etéreo, etanólico y acuoso) de las hojas de *Dendrophthora elliptica* tiene diferente actividad antimicrobiana y antifúngica.
- Ninguno de los cinco microorganismos experimentales tiene un desempeño biológico diferente al de los demás.

## **Objetivos**

### **Objetivo General**

Caracterizar la composición fitoquímica y evaluar la actividad antimicrobiana y antioxidante de *Dendrophthora elliptica* (Krug & Urb) (Santalaceae).

### **Objetivos Específicos**

1. Recolectar, identificar y acondicionar las muestras, de la especie *Dendrophthora elliptica*, provenientes de la ciudad de Macas ubicada en la Provincia de Morona Santiago.

2. Obtener extractos por maceración en éter etílico, metanol y agua, a partir de las hojas de las muestras vegetales recolectadas.
3. Caracterizar la composición química de los extractos mediante screening fitoquímico.
4. Evaluar la actividad antimicrobiana usando el método de difusión en placa y determinar la concentración mínima inhibitoria CMI por dilución doble seriada.
5. Determinar la actividad antioxidante utilizando el método DPPH sobre el extracto etanólico obtenido de las hojas del material vegetal recolectado.

# CAPÍTULO I

## MARCO TEÓRICO

### 1.1. Familia Santalaceae

**Figura 1.-** *Dendrophthora elliptica*



**Elaborado por:** Johana Coronel

Esta familia incluye especies que anteriormente pertenecían a la familia *Viscaceae* y *Eremolepidaceae* (Souza & Lorenzi, 2008). Según Herbario digital INTA Santa Cruz; la familia *Santalaceae* comprende unos 26 géneros y más de 250 especies ampliamente distribuidas en las zonas frías, templadas y subtropicales del mundo. Entre los géneros importantes se encuentra: *Thesium* (325), *Phoradendron* (250), *Dendrophthora* (100), *Viscum* (130), *Arceuthobium* (46).

Son plantas leñosas, arbustivas o arbóreas, perennes o anuales. Se trata de plantas hemiparásitas o semiparásitas, que necesitan desarrollarse sobre las raíces. Las hojas son simples, enteras y sin estípulas. Las flores van en inflorescencias cimosas, suelen ser pequeñas y poco vistosas. Los estambres, en un número igual a los segmentos del perianto. El pistilo está formado por (2)3(-5) carpelos soldados; el estilo es simple. El fruto es seco, en nuez, o se hace carnoso,

drupáceo. Semillas solitarias, con embrión recto y endospermo abundante, oleaginoso o amiláceo. (López, 2006).

## 1.2. *Dendrophthora*

### 1.2.1. Generalidades *Dendrophthora*

El género *Dendrophthora* se caracteriza por ser arbustos parásitos, de coloración más o menos amarillo, cuyas ramas se articulan en los nudos; sus raíces son adventicias, hojas opuestas, pequeñas o reducidas a escamas; flores monoicas o dioicas, trímeras, sésiles, por lo general hundida en las depresiones de las raquis, solitarias o varios a cada lado de una articulación, por lo general superpuesta en 2 filas; perianto 3-lobulado; las anteras sésiles dehiscente transversalmente: granos de polen globosa, flores con un cáliz 3 lóbulos; ovario ínfero y su fruto es una baya, semillas con abundante endospermo y embrión pequeño. El género *Dendrophthora* cuenta con especies nativas de las Antillas y América tropical (Liogier, 2000).

## 1.3. *Dendrophthora elliptica*

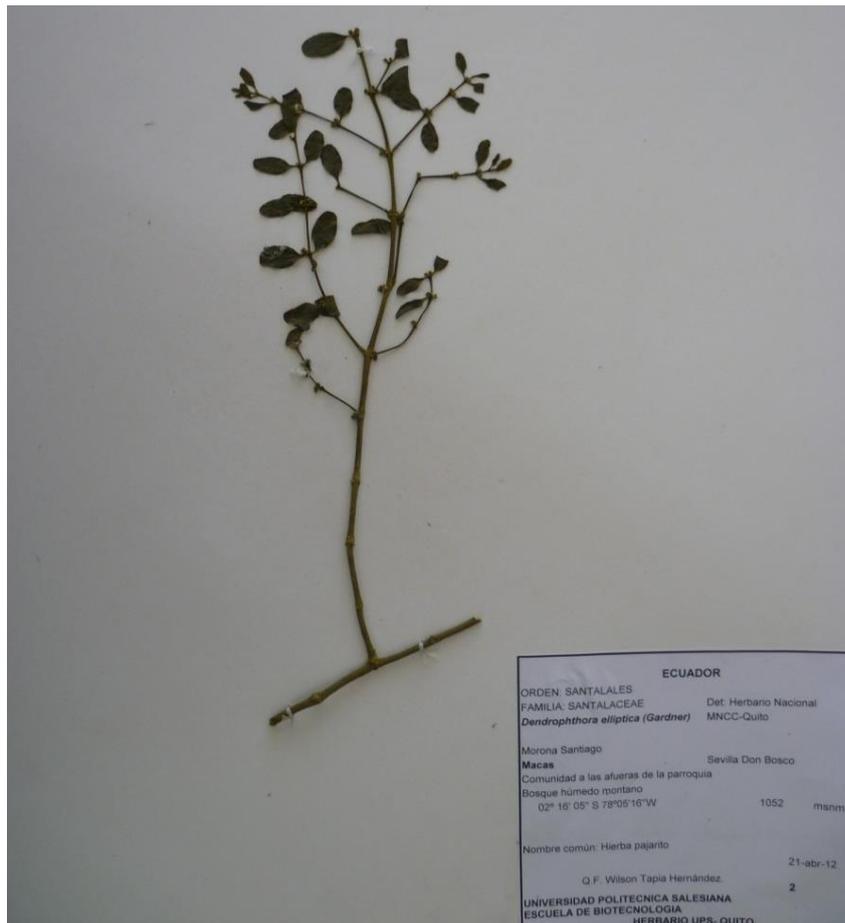
### 1.3.1. Taxonomía de la especie

**Tabla 1.-** Descripción taxonómica de *D. elliptica*

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>Phylum:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Orden:</b>	Santalales
<b>Familia:</b>	Santalaceae
<b>Género:</b>	<i>Dendrophthora</i>
<b>Especie:</b>	<i>Dendrophthora elliptica</i>

**Fuente:** Liogier, 2000.

**Figura 2.-** *Dendrophthora elliptica*, montaje para herbario



**Elaborado por:** Johana Coronel

#### **1.4. Importancia tradicional**

Según Gómez, 2010, *Dendrophthora elliptica*, es conocida como “Hierba pinzón” usada terapéuticamente como antipirética y alivio de lesiones articulares.

## 1.5. Distribución y hábitat

**Figura 3.-** Distribución geográfica *Dendrophthora elliptica*



**Fuente:** Pickering, (2012).

Según Trópicos.org, 2009. *Dendrophthora elliptica* se caracteriza por habitar en:

- **Regiones:** Vertiente oriental de la Cordillera Central
- **Elevación:** 1500-2000
- **Zonas de hábitat:** Bosque pluvial Premontano (bp-PM).
- **Forma de crecimiento:** Arbusto parásito.

## 1.6. Caracterización fitoquímica

### 1.6.1. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.

Se fundamenta en la identificación rápida de metabolitos secundarios de la planta con disolventes apropiados y la aplicación de reacciones de color y precipitación. Los resultados del tamizaje fitoquímico permiten tener una orientación de los

componentes analizados y debe interpretarse en conjunto con posteriores resultados de estudios farmacológicos (Sharapin, 2000).

## **1.7. Actividad biológica**

### **1.7.1. Microorganismos**

Los microorganismos son organismos vivos imperceptibles; entre ellos están las bacterias, algas, hongos, protozoos y los virus. Son responsables de procesos biológicos y enfermedades; pueden categorizarse en beneficiosos, inoocuos, nocivos y mortales (Ville, 1996).

El crecimiento microbiano se lleva a cabo, si se cumplen dos factores determinantes: 1) condiciones ambientales favorables como la temperatura, la humedad, presión osmótica y el pH, entre otras; 2) medio de cultivo apropiado, es decir, que los microorganismos puedan obtener los nutrientes necesarios para su crecimiento y desarrollo (Montoya, 2008).

### **1.7.2. Bacterias**

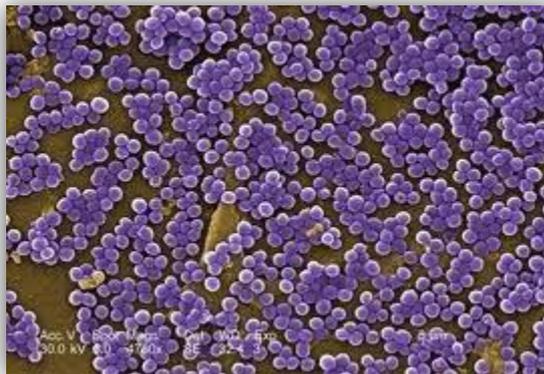
Son seres generalmente unicelulares que pertenecen al grupo de los protistas inferiores. Las bacterias son a frecuentemente nocivas y causantes de enfermedades en los humanos y en animales. Sin embargo, ciertas bacterias, producen antibióticos, otras viven simbióticamente en los intestinos de animales (Ghershman, 2006).

Entre las bacterias, la pared celular varia en su complejidad estructural. Esta diferencia sirve de base para categorizarlas en dos grupos: las bacterias Gram positivas y las Gram negativas. Esta división se basa en las diferencias en la estructura y la composición de la pared celular. Para su identificación microscópica

las bacterias se tiñen de diferente color cuando se utiliza la técnica de tinción desarrollada por Christian Gram en 1884. (Vera, 2005).

### 1.7.2.1. Bacterias Gram positivas

**Figura 4.-** Tinción microscópica de Bacteria Gram +



**Fuente:** Sánchez, (2010).

Las bacterias Gram positivas (retienen el colorante de complejo de yodo), su pared celular es gruesa (25nm) y está formada por múltiples capas de peptidoglicano, dispuestas por fuera de la membrana plasmática y posee un complejo polisacárido-péptido con función protectora. (Garrido & otros, 2006).

### 1.7.2.1.1. *Staphylococcus aureus*

Figura 5.- *Staphylococcus aureus*



Elaborado por: Johana Coronel

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

Tabla 2.-Clasificación científica *S. aureus*

Fuente: Pahissa, (2009).

*Staphylococcus aureus* son bacterias esféricas Gram positivas que se producen en racimos microscópicos. *S. aureus* presenta coloración amarilla. Algunas cepas producen cápsulas y pueden ser aerobias o anaerobias. Comúnmente es parte de la microflora humana, sin embargo, puede producir enfermedades mediante dos mecanismos distintos que son la proliferación y su capacidad para producir toxinas. (Mims et al. 2002).

Coloniza principalmente los pasajes nasales, pero puede encontrarse regularmente en otros lugares anatómicos, incluyendo la piel, cavidad oral y tracto gastrointestinal. *S. aureus* puede crecer en un rango de temperatura de 15 a 45 grados centígrados. Casi todas las cepas de *S. aureus* producen la enzima coagulasa y debe ser considerado como patógeno perjudicial (Pahissa, 2009).

#### 1.7.2.1.2. *Bacillus subtilis subsp. spizizenii*

**Tabla 3.-** Clasificación científica de *B. subtilis subsp. spizizenii*

<b>Dominio</b>	Bacteria
<b>Reino</b>	Prokaryotae
<b>División</b>	Firmicutes
<b>Clase</b>	Bacilli
<b>Orden</b>	Bacillales
<b>Familia</b>	Bacillaceae
<b>Género</b>	Bacillus
<b>Especie</b>	<i>B. subtilis</i>
<b>Subespecie</b>	<i>spizizenii</i>
<b>Nombre binomial</b>	<i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii</i>

**Fuente:** UniProt Consorsio, (2009).

**Figura 6.-** *B.subtilis* subsp. *spizizenii*



**Elaborado por:** Johana Coronel

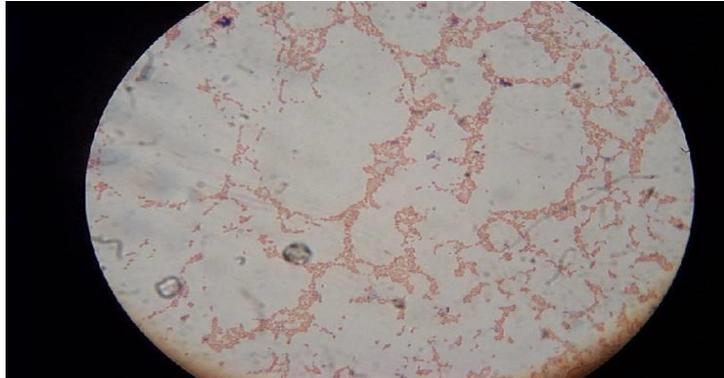
El género *Bacillus* son bacilos Gram positivos aeróbico; con extremos redondeados o cuadrados, dispuestos en pares o en cadenas. (Albrechts, 2010).

*Bacillus subtilis* es un organismo modelo y de gran importancia industrial como fuente de diversas nuevas moléculas funcionales. *B. subtilis* subsp. *spizizenii* gtP20b cepa que fue aislada en el Océano Indico, de los sedimentos a una profundidad de 608 metros y de la capa cercana a la superficie del fondo del océano (Albrechts, 2010).

*B. subtilis* subsp. *spizizenii* no se ha considerado como patógeno humano; sin embargo puede contaminar los alimentos, pero no causa intoxicación alimenticia. Sus esporas pueden sobrevivir a altas temperaturas (Madigan & Martinko, 2005)

### 1.7.2.2. Bacterias Gram negativas

**Figura 7.-** Bacilos Gram (-)



**Fuente:** Sánchez, (2010).

Este tipo de bacterias no retienen el colorante del complejo de yodo y su pared celular es mucho más fina (2-3nm) y contiene una sola capa de peptidoglicano dispuesta entre dos membranas lipídicas, una externa y otra interna (Garrido & otros, 2006).

#### 1.7.2.2.1. *Escherichia coli*

**Figura 8.-** *Escherichia coli*



**Fuente:** Podolak, (2011).

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

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

**Fuente:** Montoya, (2008).

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

Son bacilos Gram negativos no esporulados, móviles con flagelo o inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos. Crece fácilmente en medios de laboratorio habituales y en medios selectivos que contienen bilis a temperatura ambiente y pH óptimo de 6 a 7. *E. coli* provoca infecciones de la vía urinaria, enfermedades diarreicas (asociadas a enterotoxinas), etc. Se transmite por contacto y por ingestión y se la asocia a alimentos (Mims et al. 2002).

### 1.7.2.2.2. *Pseudomona aeruginosa*

**Figura 9.-** *Pseudomona aeruginosa*



**Fuente:** Podolak, (2011).

**Tabla 5.-** Clasificación científica *P.aeruginosa*

<b>Reino</b>	Bacteria
<b>Filo</b>	Proteobacteria
<b>Clase</b>	Gamma Proteobacteria
<b>Orden</b>	Pseudomonadales
<b>Familia</b>	Pseudomonadaceae
<b>Género</b>	Pseudomonas
<b>Especie</b>	<i>P.aeruginosa</i>

**Fuente:** Villafañe, (2008).

*Pseudomona aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa, aeróbica y posee un flagelo para su movimiento. Presenta pigmentación azul verdosa visible en los cultivos de laboratorio. Es un patógeno oportunista de individuos con inmunodeficiencias;

infecta el tracto respiratorio, el urinario, tejidos, heridas y puede causar diferentes infecciones sanguíneas, es patógeno de humanos, plantas y animales (Villafeñe, 2008).

*P. aeruginosa* es productora de una exotoxina. En las plantas produce síntomas de "podrición de raíces" con *Arabidopsisthaliana* y *Lactuca sativa* (lechuga) (Temperante, 2010).

### **1.7.3. Levaduras**

Las levaduras son hongos unicelulares, no filamentosos, con una morfología característica esférica u ovalada. Al igual que los mohos, las levaduras se hallan ampliamente distribuidas en la naturaleza, se encuentran frecuentemente en forma de polvillo blanco que recubre las hojas y los frutos. La mayoría de levaduras forman colonias de organismos unicelulares; este aumento sucede por gemación (Santamarina & otros, 1997).

#### **1.7.3.1. *Candida albicans***

**Figura 10.- *Candida albicans***



**Elaborado por:** Johana Coronel

**Tabla 6.-**Clasificación científica, *C. albicans*

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

**Fuente:** Sosa, (2010).

*Candida albicans* es un hongo dimórfico que aparece como una levadura con 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 albicans*; su temperatura óptima de crecimiento es 37 °C y pH ácido (Mims et al. 2002).

El hombre es el principal reservorio de este tipo de hongo. Se encuentra de forma usual en piel, estómago, colon, recto, boca y garganta de individuos sanos. *Candida albicans* en principio no es patógena, ya que la flora bacteriana beneficiosa del hombre y el sistema inmunitario limitan su crecimiento y frenan su excesiva proliferación, manteniendo así un equilibrio; si dicho equilibrio cambia *Candida albicans* empieza a proliferar dando lugar a un conjunto de enfermedades denominadas Candidiasis o micosis candidiásica, que pueden consistir en leves infecciones de mucosas y piel o desencadenar diseminaciones sistémicas graves, pudiendo afectar órganos vitales (Martin, 2006).

## **1.8. Pruebas de antibiograma**

El antibiograma es un método de estudio *in vitro* del comportamiento de los antimicrobianos frente a los agentes infecciosos. Proporcionar información útil para la iniciación y marcha terapéutica anti infecciosa. A partir de los resultados obtenidos en el antibiograma las bacterias se clasifican en: sensibles, moderadamente sensibles y resistentes, a un determinado antimicrobiano (Garcia & otros, 2005).

### **1.8.1. Difusión en agar**

Consiste en inocular masivamente una placa de agar con el microorganismo de interés y colocar sobre la superficie del medio, discos que contienen determinadas concentraciones de los antimicrobianos a ensayar. El antibiótico se difunde en el agar y después de un tiempo de incubación determinado, el microorganismo se desarrolla en toda la placa excepto alrededor de los disco cuya concentración de antimicrobiano es inhibitoria. El diámetro de halo de inhibición del crecimiento expresa la sensibilidad o resistencia del microorganismo (Garcia & otros, 2005).

### **1.8.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)**

La CMI se define como la menor concentración de una gama de diluciones de antibiótico que provoca una inhibición de cualquier crecimiento bacteriano visible. Es el valor referencial que permite establecer una escala de actividad del antibiótico frente a diferentes especies bacterianas (Gamazo, 2000).

Este método permite cuantificar la sensibilidad del microorganismo a diferentes concentraciones del antibiótico determinando la “Concentración mínima que inhibe el crecimiento bacteriano” (Yaneth, 2011).

### **1.8.2.1. Dilución doble**

Se realiza con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria. Para ello se dispone una serie de diluciones en agar o dilución en caldo, inoculados con un determinado volumen del medio de cultivo que contiene concentraciones progresivas y crecientes del antimicrobiano a ensayar, sobre ello se adiciona el inóculo bacteriano. Tras un periodo de incubación establecido, se considera la primera placa o tubo de la serie donde existe crecimiento; la concentración del antimicrobiano en ese lugar corresponde a la CMI (García & otros, 2005).

## **1.9. Actividad antioxidante**

Los compuestos fenólicos son sustancias orgánicas distribuidas en el reino vegetal que se sintetizan como metabolitos secundarios con funciones de defensa, y son en gran medida responsables de las propiedades del color, la astringencia y el flavor de los vegetales. Tienen en su estructura uno o más anillos aromáticos con al menos un sustituyente hidroxilo. Su estructura química es propicia para secuestrar radicales libres, debido a la facilidad con la que el átomo de hidrógeno desde el grupo hidroxilo aromático puede ser donado a la especie radical, y a la estabilidad de la estructura quinona resultante que soporta un electrón desapareado (Fernández & otros, 2006).

### **1.9.1. Fundamento de la actividad antioxidante**

Los métodos de determinación de la actividad antioxidante total se basan en comprobar cómo un agente oxidante induce daño oxidativo a un sustrato oxidable, daño que es inhibido o reducido en presencia de un antioxidante. Esta inhibición es proporcional a la actividad antioxidante del compuesto o de la muestra (Quintanar & Calderón, 2009).

### **1.9.2. Técnicas para determinación de actividad antioxidante**

Los distintos métodos difieren en el agente oxidante, en el sustrato empleado, en el tiempo de evaluación, en la técnica instrumental utilizada, la sensibilidad y las interacciones de la muestra con el medio de reacción. La mayoría de los métodos de medida de la actividad antioxidante no emplean especies radicales de significado biológico, sino radicales que son oxidantes iniciadores ajenos al organismo, como AAPH (2',2'-azobis-2-methylpropionamida) y DPPH (2,2-difenil-1-Picrilhidrazilo) (Quintanar & Calderón, 2009).

En el método de DPPH, la solución se mezcla con una sustancia que puede donar un átomo de hidrógeno, entonces aparece la forma reducida DPPH-H originándose un cambio en el color de morado a amarillo (Ibarra, 2010).

## CAPÍTULO II

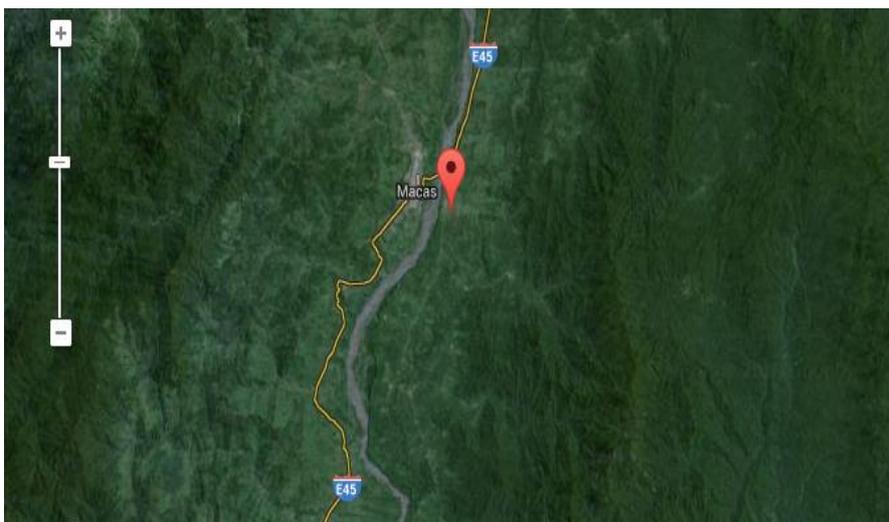
### MARCO METODOLÓGICO

#### 2.1.Recolección e identificación de la especie vegetal *Dendrophthora elliptica*

##### 2.1.1. Lugar de recolección de muestra vegetal

La recolección del material vegetal se realizó en la provincia de Morona Santiago, ciudad Macas, parroquia “Sevilla de Don Bosco” comunidad de San Miguel de Inimquis; en el cantón de Morona.

Figura 11.- Lugar de recolección de material vegetal



Elaborado por: Johana Coronel

##### 2.1.1.1.Materiales

- Muestra vegetal prensada
- Sacos de yute
- Cartón prensado
- Piola

- Machete

### **2.1.1.2.Procedimiento**

Para la recolección de la especie vegetal, se contó con la ayuda de un habitante de la comunidad de San Miguel de Inimquis. La recolección se basó en la búsqueda de árboles que contenían la planta hemiparásita a recolectar. Se procuró la recolección aproximadamente de 1 kilo de *Dendrophthora elliptica* y se tomó una muestra vegetal de la misma con la totalidad de sus partes vegetales intactas para ser prensada e identificada taxonómicamente.

## **2.2.Identificación taxonómica**

### **2.2.1. Materiales**

- Especie vegetal prensada.

### **2.2.2. Procedimiento**

La identificación taxonómica se realizó en el Herbario Nacional ubicado en la Av. Río Coca E6-115 e Isla Fernandina, Quito.

## **2.3. Selección, estabilización y conservación de la muestra vegetal**

Este procedimiento se llevó a cabo en el Laboratorio CIVABI de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede – Quito, Campus – El Girón.

### **2.3.1. Selección, desinfección y secado de muestra vegetal**

#### **2.3.1.1. Materiales**

- Muestra vegetal
- Tijeras

- Recipiente plástico
- Papel aluminio

#### **2.3.1.2. Equipo**

- Estufa
- Molino eléctrico

#### **2.3.1.3. Reactivos**

- Hipoclorito de sodio
- Agua destilada

#### **2.3.1.4. Procedimiento**

La muestra obtenida se seleccionó considerando las hojas que se encontraron en mejores condiciones, es decir que no estén marchitas y sobre todo que no tenga proliferación de algún patógeno visible. Se desinfectó la muestra vegetal con solución acuosa de hipoclorito de sodio y posteriormente con agua destilada.

Posterior al lavado la muestra se llevó a la estufa a temperatura de 40°C para frenar la actividad acuosa y estabilizar la muestra ante daños enzimáticos. La muestra vegetal seca se trituró para obtener partículas de 0.5 mm aproximadamente.

**Figura 9.** Hojas secas de *D. elliptica*



**Elaborado por:** Johana Coronel

## **2.4.Preparación de los extractos acuoso, etanólico y etéreo**

La obtención de extractos se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Analítica del CIVABI de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede – Quito, Campus – El Girón.

Se realizó utilizando la técnica de maceración con disolventes de polaridad creciente por 48 horas a temperatura ambiente según lo descrito en el Manual de Miranda (2000).

### **2.4.1. Materiales**

- Muestra vegetal
- Frascos ámbar de boca ancha
- Probeta
- Papel filtro
- Embudo
- Percolador
- Soporte universal
- Vaso de precipitación

### **2.4.2. Equipos**

- Balanza analítica.

### **2.4.3. Reactivos**

- Éter etílico
- Alcohol
- Agua destilada

### **2.4.4. Procedimiento**

Las hojas secas fueron sometidas a tres extracciones sucesivas con disolventes de polaridad creciente (éter etílico, alcohol y agua destilada). Se pesó 122g de material vegetal seco, se lo depositó en el recipiente de maceración y se colocó el disolvente

respectivo en un volumen de tres veces el peso de la muestra y/o residuo. Con cada disolvente se maceró la muestra vegetal por un período de 48 horas, sin incidencia de luz, a temperatura ambiente y con agitación cada hora. Transcurridas las 48 horas se filtró el contenido sobre algodón hidrofílico obteniendo el extracto correspondiente y el residuo que se seca para determinar su peso; sobre él se agregó disolvente correspondiente para la siguiente maceración repitiéndose el mismo procedimiento.

**Figura 10.** Obtención de extractos por maceración y concentración en baño maría



**Elaborado por:** Johana Coronel

## **2.5. Screening fitoquímico**

El screening fitoquímico se ensayó en el laboratorio de Química Analítica del CIVABI de la Universidad Politécnica Salesiana. Los extractos se ensayaron de acuerdo al Manual de Miranda (2000).

### **2.5.1. Materiales**

- Gradillas
- Tubos de ensayo

- Pipetas
- Papel filtro
- Capilar
- Pinzas.

### 2.5.2. Equipos

- Cámara de flujo laminar
- Cámara U.V

### 2.5.3. 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 n-amílico
- Ácido sulfúrico concentrado
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Baljet
- Reactivo de Kedde
- Reactivo de Fehling
- Solución salina al 0,9%
- Alcohol

## 2.5.4. Procedimiento

### 2.5.4.1.Extracto etéreo

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



Fuente: Miranda, (2000).

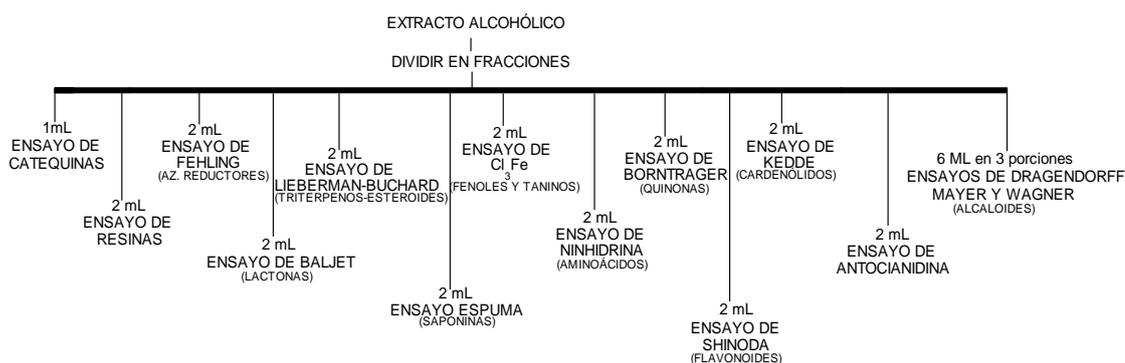
- *Ensayo de Sudan.*- reconoce la presencia de compuestos grasos; a la alícuota del extracto se le añadió 1 ml de una solución diluida en agua del colorante Sudan III . Se calentó en baño de agua hasta la evaporación del disolvente.
- *Ensayo de Dragendorff.*- determina la presencia de alcaloides; si la alícuota del extracto está disuelta en un disolvente orgánico, este debe evaporar en baño maría SHEL-LAB 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.*- reconoce la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular cumarinas. Cuando la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el disolvente 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.*- reconoce la presencia de triterpenos y/o esteroides. Para lo cual si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el disolvente 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.

#### 2.5.4.2.Extracto etanólico

**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 aplicar solución de carbonato de sodio.
- *Ensayo de resinas.*-para la identificación de estos compuestos se añade a 2 ml de la solución alcohólica, 10 ml de agua destilada.

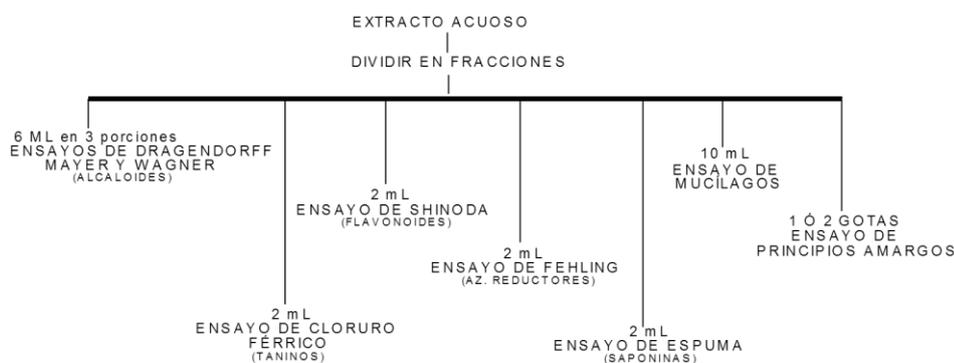
- *Ensayo de Fehling.*- permite reconocer la presencia de azúcares reductores. Si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el disolvente en baño maría SHEL-LAB y el residuo redisolverse en 1-2 ml de agua. Se adicionan 2 ml del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla.
  
- *Ensayo de espuma.*- evalúa 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.*- evalúa 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 etanólico 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.*- determina 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 disolvente 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.*- reconoce la presencia de quinonas. Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en cloroformo, debe evaporarse el disolvente en baño maría SHEL-LAB 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 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 segmento de cinta de magnesio metálico. Posteriormente de la reacción se espera 5 minutos, donde se añade 1 ml de alcohol n-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 de ácido clorhídrico concentrado.
- *Ensayo de Kedde.*- determina 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 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 n-amílico posteriormente se agita y se deja separar las dos fases.

### 2.5.4.3. 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 determina percibiendo 1 gota del extracto acuoso o del vegetal y se reconoce el sabor de cada uno de estos principios, siendo diferenciados al paladar.

### 2.5.5. 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 líquido o en las paredes del tubo de ensayos respectivamente.
- *Ensayo de Dragendorff.*- si al añadir 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 rápido.

- verde oscuro-negro-final de la reacción.

- *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 n-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 violácea, persistente durante 1-2 horas.
- *Ensayo de antocianidinas.*- La aparición de color rojo a marrón en la fase amílica, 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 percibe la muestra y se reconoce el sabor de cada uno de estos principios.

## **2.6. Evaluación de actividad antibacteriana y antimicótica**

La actividad antibacteriana se desarrollara en la Universidad Politécnica Salesiana, campus Girón, en el laboratorio de Proyectos del CIVABI.

### **2.6.1. Materiales**

- |                          |                                |
|--------------------------|--------------------------------|
| - Frasco viales ámbar    | - Pipeta de 5, 10 y 25 ml      |
| - Embudo                 | - Micropipeta de 100 ul        |
| - Papel filtro           | - Vidrio reloj                 |
| - Vasos de precipitación | - Gradilla                     |
| - Probeta                | - Discos en blanco             |
| - Cajas petri            | - Celdas espectrofotométricas. |
| - Tubos de ensayo        | - Espátula                     |
| - Asa bacteriológica     | - Espátula de Dringalsky       |
| - Mechero                | - Frascos Boeco.               |

### 2.6.2. Equipos

- Cámara de flujo laminar
- Espectrofotómetro
- Incubadora
- Refrigeradora
- Autoclave
- Vórtex
- Centrifuga
- Balanza analítica
- Baño maría
- Ultrasonido BRANSONIC

### 2.6.3. Reactivos

- Agua destilada.
- Solución salina estéril 0,9%
- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Agar Mueller Hinton
- Agar tripticasa-soja
- Sabouraud Dextrose Agar
- Caldo tripticasa-soja (TSB)
- Caldo Mueller Hinton.

### 2.6.4. Cepas

- *P. aeruginosa* ATCC 27853
- *E. coli* ATCC 9637
- *Candida albicans* ATCC 10231
- *B. subtilis subsp. spizizenii* ATCC 6633
- *S. aureus* ATCC 6538

### 2.6.5. Procedimiento

#### 2.6.5.1. Determinación de sensibilidad de las bacterias frente a extractos

Para el ensayo de sensibilidad se usó el extracto etanólico, etéreo y acuoso, concentrados. El método de difusión en agar de Kirby- Bauer se llevó a cabo según lo descrito en el Manual de Microbiología de Gamazo (2005). El ensayo se realizó por quintuplicado.

### **2.6.5.2. Preparación de extractos a evaluar**

- Los extractos utilizados fueron obtenidos por maceración y evaporados a sequedad en baño maría SHEL-LAB y en el rotavapor IKA a una temperatura inferior a 40° C.
- Para obtener las concentraciones a ensayar; se pesó 800 mg de cada extracto seco y se disolvió en 4 ml de DMSO respectivamente; se utilizó el ultrasonido BRANSONIC y vórtex para lograr su dilución. La concentración final de los extractos fue de 200.000 ug/ml, siendo denominada C1. Se pesó 400 mg de cada extracto seco y se los disolvió en 4 ml de DMSO respectivamente; se utilizó el ultrasonido BRANSONIC y vórtex para lograr la disolución en su totalidad. La concentración final de estos extractos fue de 100.000 ug/ml, siendo denominada C2. Se pesó 800 mg de cada extracto seco y se disolvió en 2 ml de DMSO respectivamente; se utilizó el ultrasonido BRANSONIC u vórtex para lograr la disolución en su totalidad. La concentración final de estos extractos fue de 400.000 ug/ml, siendo denominada C3.
- Los preparados antes descritos se conservaron en refrigeración en frascos viales ámbar o cubiertos con papel aluminio para conservar sus propiedades físico-químicas.

### **2.6.5.3. Preparación de 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 a punto de ebullición hasta obtener una dilución clara.

Posteriormente se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121° C. Se transfirió 10 ml a cada tubo de ensayo con tapa (estériles) y se mantuvo 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 a punto de ebullición hasta obtener una dilución clara. El pH se chequeó cuando el medio estuvo preparado.

El pH se ajustó entre 7,2 y 7,4. Se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121°C. En la cámara de flujo previamente estéril, se vertió el medio de cultivo fresco y tibio en las placas petri estériles, aproximadamente se dispersó 25 ml de agar por cada caja, se dejó enfriar el medio de cultivo a temperatura ambiente y finalmente las placas selladas y envueltas en papel aluminio fueron almacenadas en el refrigerador hasta el momento de usarlas.

*Tryptic soy agar (TSA).*- se preparó a partir del reactivo comercial deshidratado y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se disolvió 40 g de TSA en un litro de agua destilada, se calentó a punto de ebullición hasta obtener una dilución clara. Se ajustó a un pH de  $7,3 \pm 0,2$  a 25 °C; posteriormente se esterilizó en autoclave por 15 minutos a 121° C.

En la cámara de flujo previamente estéril, se vertió el medio de cultivo fresco y tibio en las placas petri estériles, aproximadamente se dispersó 25 ml de agar por cada caja, se dejó enfriar el medio de cultivo a temperatura ambiente y finalmente las placas selladas y envueltas en papel aluminio fueron almacenadas en el refrigerador hasta el momento de usarlas.

*Agar Sabouraud Dextrosa.*- se suspendió 65 g de medio deshidratado en un litro de agua destilada. Se calentó agitando frecuentemente y dejó hervir durante 1 minuto para disolver completamente los ingredientes. Se ajustó el pH a  $5,6 \pm 0,2$  a temperatura ambiente. Posteriormente se esterilizó a 121°C durante 15 minutos.

En la cámara de flujo previamente estéril, se vertió el medio de cultivo fresco y tibio en las placas petri estériles, aproximadamente se dispersó 25 ml de agar por cada caja, se dejó enfriar el medio de cultivo a temperatura ambiente y finalmente las

placas selladas y envueltas en papel aluminio fueron almacenadas en el refrigerador hasta el momento de usarlas.

*Caldo Mueller Hinton.*- se suspendió 22 g del medio en un litro de agua destilada se calentó con agitación frecuente y se dejó hervir durante 1 minuto. Posteriormente se esterilizó a 121°C por 15 minutos. Se transfirió 1 ml a cada tubo de ensayo con tapa (estériles) y se mantuvo a temperatura ambiente hasta el momento de usarlos.

#### **2.6.5.4. Viabilidad de cepas ATCC**

En medio de cultivo TSA previamente preparado y dispersado en placas petri; se etiquetó las mismas con la cepa a viabilizar. Se realizó 3 siembras respectivamente de cada cepa.

Se rompe las esferas que contiene la cepa liofilizada y con el hisopo se sembró en forma de estriado en las cajas petri. Se dejó incubar de 24 horas a 48 horas para determinar que las cepas crecieron. A estas cepas se las denominó caja madre.

Para conservar las cepas y obtener posteriores colonias para ser evaluadas en la actividad antimicrobiana y antifúngica. Se procedió a realizar en tubos de ensayo estériles, pico de flauta, con aproximadamente 10 ml de agar TSA; una vez solidificado el medio de cultivo; de cada caja madre, se tomó dos colonias para resembrar en los picos de flauta con TSA. Se dejó incubar por 24 horas para proporcionar el crecimiento de los microorganismos y finalmente las cepas fueron conservadas en el refrigerador.

#### **2.6.5.5. Preparación de sensidiscos**

Los discos en blanco estandarizados fueron colocados en una caja petri o tubo de ensayo sellado y se esterilizó en autoclave a 121° C por 15 minutos. Los discos en blanco fueron conservados a temperatura ambiente hasta su uso.

Los discos con antibióticos usados como 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 fluconazol 25mg.

#### **2.6.5.6. Preparación del inóculo bacteriano**

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 18 horas.

Posteriormente los tubos con el inóculo se coloca en la centrifuga por 20 min con el fin de sedimentar la cepa y obtener el pellet. Se conservó el pellet y se eliminó el sobrenadante. Al pellet se le adicionó 4 ml de solución salina estéril al 0.9%, se agitó en el vórtex y posteriormente se añadió 8 ml de solución salina estéril para medir la absorbancia en el espectrofotómetro. Se agregó solución salina estéril al inóculo hasta alcanzar una densidad óptica de 0.2. Å.

#### **2.6.5.7. Preparación de sensidiscos con diluciones a evaluar.**

En la cámara de flujo laminar previamente estéril, se colocó los discos en blanco dentro de cajas petri estériles y etiquetadas las concentraciones; C1, C2, C3. Con una micro pipeta se colocó a cada disco en blanco, 40 ul de las concentraciones de los extractos a ser evaluados, es decir que en cada disco para C1= 8 mg, C2= 4mg y C3=16 mg de extracto seco. Se preparó discos con los extractos para 5 repeticiones respectivamente.

Como blanco negativo se usó discos en blanco embebidos con DMSO para comprobar que dicha sustancia no inhibe el microorganismo; y como blanco positivo para bacterias Gram positivas y Gram negativas se usó discos con antibiótico de gentamicina y claritromicina, , mientras que para blanco positivo en levaduras se usó discos con fluconazol.

#### **2.6.5.8. Inoculación de las placas**

El procedimiento se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar.

Después de ajustar la turbidez de la suspensión bacteriana, se sumerge varias veces un hisopo de algodón estéril y se presiona contra la pared interna del tubo sobre el nivel del líquido para eliminar el exceso de suspensión.

Se inoculó en la superficie de una placa de agar (Mueller Hinton para bacterias Gram positivas y Gram negativas y Agar sabouraud dextrosa para levaduras) con el hisopo pasándolo uniformemente por toda la superficie en tres direcciones y por el contorno externo del agar. Se dejó secar 5 minutos aproximadamente con la tapa de la caja entre cerrada.

Se realizó el mismo procedimiento para todos los microorganismos y los ensayos se realizaron por quintuplicado.

##### **2.6.5.8.1. Colocación de discos a las placas inoculadas**

Se colocó de 6 a 8 discos equidistantes sobre la superficie del agar utilizando pinzas estériles y oprimiendo suavemente para asegurar el contacto pleno con la superficie. Como control positivo se utilizó los discos con antibióticos o antifúngico dependiendo el inóculo 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 colocadas en la incubadora a 37° C por 24 horas. Se realizó el mismo procedimiento para todos los microorganismos y los ensayos se realizaron por quintuplicado.

### **2.6.5.9. Lectura de placas e interpretación de resultados**

Después de las 24 horas de incubación cada placa fue observada. Se midió en milímetros los diámetros de los halos de inhibición con la ayuda de un pie de rey.

Los tamaños de los halos de inhibición fueron interpretados de acuerdo a la técnica de comprobación de actividad terapéutica de las plantas medicinales descrita por Alonso (2006). Donde se consideró con actividad antibacteriana positiva si el diámetro del 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 nula o sin actividad.

### **2.6.6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria**

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

#### **2.6.6.1. Selección de bacteria y extracto según su sensibilidad**

Las bacterias: *E. coli*, presentó sensibilidad frente a la concentración C3 (400.000 ug/ml) del extracto etéreo. *P. aeruginosa* presentó sensibilidad ante la concentración C2 (100.000 ug/ml) del extracto acuoso y *S. aureus* presentó sensibilidad ante la concentración C3 (400.000 ug/ml) de los extractos acuoso, etanólico y etéreo. Dichas bacterias y concentraciones respectivamente fueron seleccionadas para continuar con el ensayo de concentración mínima inhibitoria.

#### **2.6.6.2. Concentración de extractos a ensayar**

Se utilizó los mismos extractos preparados para las pruebas de sensibilidad; se trabajó con las concentraciones C3 y C2 (400.000 ug/ml y 100.000 ug/ml) por cada extracto.

### **2.6.6.3. Preparación del inóculo bacteriano**

Se preparó el inóculo de las bacterias (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*) que presentaron sensibilidad a los extractos de *Dendrophthora elliptica*. Con un asa estéril se tomó 3 colonias aisladas del microorganismo y se transfirió a un tubo de ensayo con 10 ml de caldo TSB estéril. Se incubó a 37° C por tres horas.

Se preparó el inóculo después de ser centrifugado para obtener el pellet del microorganismo, el mismo que se reguló con solución salina estéril 0,9 % la absorbancia se midió en el espectrofotómetro SHIMADZU hasta alcanzar una densidad óptica de 0,2 Å.

Se tomó 0,2 ml de la suspensión bacteriana con la turbidez adecuada y se mezcló en 19,8 ml de caldo Mueller Hinton. El procedimiento se lo lleva a cabo en la cámara de flujo laminar.

### **2.6.6.4. Preparación de los tubos con extracto**

La concentración de la solución madre de los extractos usados como antimicrobianos son: 400.000 ug/ml y 100.000 ug/ml.

Se preparó 10 tubos de ensayo estériles con 1 ml de caldo Mueller Hinton. Se añade 1 ml de la solución madre al primer tubo de ensayo y se mezcla muy bien; a partir de éste se preparan diluciones dobles seriadas tomando 1ml de la solución y transfiriéndolo al segundo tubo con caldo. Inmediatamente al mezclar bien el contenido del segundo tubo se transfieren 1 ml de éste al tercer tubo con caldo y se continuó así sucesivamente hasta el décimo tubo con caldo, del cual se toma 1ml el cual se descartó. El procedimiento se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar; las diluciones se realizaron por cuádruplicado.

#### **2.6.6.5. Inoculación en los tubos**

Se añadió a cada tubo con extracto 1 ml del inóculo bacteriano que se preparó previamente; obteniendo un inóculo final aproximado de  $5 \times 10^5$  ufc/ml.

El procedimiento se llevó a cabo en la cámara de flujo y los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Se incubó los tubos a 37° C durante 18 horas.

#### **2.6.6.6. Inoculación en placas**

Transcurridas las 18 horas de incubación de los tubos con inóculo a través de una micropipeta se tomó 100 ul de la suspensión y se depositó en la superficie de la placa de agar Mueller Hinton, con la ayuda de un asa de Digrafsky se extendió el inóculo.

Dicho procedimiento se llevó a cabo para todos los tubos con diferentes concentraciones de extracto. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado. Las cajas petri invertidas fueron incubadas a 37° C por 18 horas.

Transcurridas las 18 horas de incubación, se reconocieron cuidadosamente todas las placas y se determinó la concentración del extracto a partir del cual se originó el crecimiento bacteriano.

### **2.7. Evaluación de actividad antioxidante**

#### **2.7.1. Determinación de la actividad antioxidante utilizando 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo DPPH**

La actividad antioxidante se desarrolló en la Universidad Politécnica Salesiana, campus Girón, en el laboratorio de Proyectos y Química analítica del CIVABI.

### **2.7.1.1. Materiales**

- Vaso de precipitación
- Embudo
- Probeta
- Celdas espectrofotométricas
- Micropipeta
- Puntas azules
- Espátula
- Percolador
- Frasco ámbar
- Viales ámbar
- Extracto etanólico de té verde.

### **2.7.1.2. Equipos**

- Balanza analítica
- Rotavapor IKA
- Espectrofotómetro
- Vórtex

### **2.7.1.3. Reactivos**

- Etanol 96%
- DPPH
- Ácido ascórbico

### **2.7.1.4. Procedimiento**

La actividad antioxidante se evaluó a partir del extracto etanólico de *Dendrophthora elliptica* frente a la vitamina C como estándar y comparando además con la actividad antioxidante del extracto etanólico de té verde.

#### **2.7.1.4.1. Preparación de solución DPPH**

Se procedió a pesar 4mg de 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH); posteriormente este se mezcló en 100ml de etanol. Se homogeniza la solución y se conserva en un frasco ámbar en la oscuridad.

#### **2.7.1.4.2. Preparación de estándar de vitamina C**

El estándar de vitamina C, se preparó disolviendo 0,1g de vitamina C en 100ml de etanol al 96% y luego se procedió a preparar las siguientes disoluciones:

- 100 µl etanol
- 1 µl de vitamina C diluida 1/100 + 99 µl de etanol
- 2 µl de vitamina C diluida 1/100 + 98 µl de etanol
- 5 µl de vitamina C diluida 1/100 + 95 µl de etanol
- 10 µl de vitamina C diluida 1/100 + 90 µl de etanol
- 20 µl de vitamina C diluida 1/100 + 80 µl de etanol
- 50 µl de vitamina C diluida 1/100 + 50 µl de etanol
- 80 µl de vitamina C diluida 1/100 + 20 µl de etanol

A las soluciones anteriores se añadió 2.9 ml de la solución de DPPH previamente preparada. Se agitó en la oscuridad por 30 minutos en un agitador.

Las soluciones se colocaron en celdas desde la menor a mayor concentración, se leyó en el espectrofotómetro SHIMADZU la absorbancia a una longitud de onda de 517nm, la medición se realizó por triplicado de cada solución.

#### **2.7.1.4.3. Preparación estándar de extracto etanólico de té verde**

El extracto etanólico de té verde se obtuvo a partir de la maceración de 30 g de hojas secas de té verde con 90 ml de etanol al 96% durante 48 horas. Se procedió a filtrar el contenido y posteriormente a concentrar el extracto etanólico a sequedad en el rotavapor IKA.

Se preparó una solución de 0,1g de extracto de té verde en 100 ml de etanol al 96% y luego se procedió a preparar las mismas soluciones que para el estándar de vitamina C. a las soluciones se añadió 2.9 ml de la solución de DPPH previamente preparada se agitó en la oscuridad por 30 minutos en un agitador

Las soluciones se colocaron en celdas desde la menor a mayor concentración, se leyó en el espectrofotómetro SHIMADZU la absorbancia a una longitud de onda de 517nm, la medición se realizó por triplicado de cada solución.

#### **2.7.1.4.4. Preparación de muestra**

Se procedió a pesar 1g de extracto etanólico seco de *Dendrophthora elliptica* y se disolvió en 10 ml de etanol al 96%; se prepararon las disoluciones de la siguiente manera:

- 100 µl de extracto diluido 1/10
- 50 µl de extracto diluido 1/10 + 50 µl de etanol 96%
- 20 µl de extracto diluido 1/10 + 80 µl de etanol 96%
- 10 µl de extracto diluido 1/10 + 90 µl de etanol 96%
- 5 µl de extracto diluido 1/10 + 95 µl de etanol 96%
- 2 µl de extracto diluido 1/10 + 98 µl de etanol 96%
- 1 µl de extracto diluido 1/10 + 99 µl de etanol 96%

- 100 µl de etanol 96%

A las soluciones anteriores se añadió 2.9 ml de la solución de DPPH preparada previamente el día anterior, se agitó en la oscuridad por 30 minutos en un agitador.

Las soluciones se colocaron en celdas desde la menor a mayor concentración, se leyó en el espectrofotómetro SHIMADZU la absorbancia a una longitud de onda de 517nm, la medición se realizó por triplicado de cada solución.

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

#### 3.1. Identificación taxonómica

La identificación taxonómica fue confirmada por personal capacitado del Herbario Nacional ubicado en la Av. Río Coca E6-115 e Isla Fernandina, Quito. Donde detalló que la especie recolectada pertenece a la familia Santalaceae, y corresponde a la especie *Dendrophthora elliptica*.

#### 3.1. Screening fitoquímico de *D. elliptica*

Tabla 7.- Identificación cualitativa de extractos etéreo, etanólico y acuoso de *D. elliptica*

METABOLITO ENSAYADO	TIPO DE EXTRACTO		
	ETEREO	ALCOHOLICO	ACUOSO
Aceites y grasas	+		
Alcaloides (Dragendorff, Mayer y Wagner)	+	++	++
	-	+++	+++
	+++	+++	++
Lactonas y Cumarinas	-	-	+++
Triterpenos y/o esteroides	+	+	
Catequinas	+		
Resinas	-		
Azúcares reductores		+	+
Saponinas		+++	+++
Fenoles y taninos		+	+
Aminoácidos libres		+	
Quimonas		-	
Flavonoides		+	+
Glicósidos cardiotónicos		-	
Antocianidinas		-	
Mucilagos			-
Principios amargos			+

Elaborado por: Johana Coronel

### 3.2.Actividad antibacteriana

#### 3.2.1. Sensibilidad antibacteriana y antifúngica

Según lo descrito en las técnicas de comprobación de actividad terapéutica de las plantas medicinales (Alonso, 2006). Los halos de inhibición para determinar la sensibilidad antibacteriana y antifúngica por difusión en agar se consideraron según los siguientes datos correspondientes al tamaño de halo de inhibición.

**Tabla 8.-** Categorización de halos de inhibición

<b>HALOS DE INHIBICION (SENSIBILIDAD)</b>		
<b>Tamaño</b>	<b>Actividad antimicrobiana</b>	<b>Designación</b>
<b>&gt; 9 mm</b>	Positiva o sensible	<b>(S)</b>
<b>6- 9 mm</b>	Intermedia o moderada	<b>(I)</b>
<b>&lt;6 mm</b>	Negativa o resistente	<b>(R )</b>

**Fuente:** Alonso, (2006).

##### 3.2.1.1. *Escherichia coli*

Se puede observar en la tabla 9, que la concentración C3 (400.000 ug/ml) del extracto etéreo de las hojas de *D. elliptica*, genera un halo de inhibición mayor (8,56 mm) frente a *E. coli*.

**Tabla 9.**-Halos de inhibición en mm de los extractos acuoso, etanólico y etéreo de *D. elliptica* frente a *E. coli*

Repetición			Extracto acuoso			Extracto alcohólico			Extracto etéreo		
	BL -	BL +	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
	DMSO (mm)	Gentamicina 10 ul (mm)	200000 ug/ml	100000 ug/ml	400000 ug/ml	200000 ug/ml	100000 ug/ml	400000 ug/ml	200000 ug/ml	100000 ug/ml	400000 ug/ml
1	-	15.2	0	0	6.4	0	0	0	7.2	6.3	8.3
2	-	14.8	0	0	6.4	0	0	0	8.5	6.3	8.5
3	-	16.2	0	0	6.5	0	0	0	8.2	6.7	8.7
4	-	14	0	0	6.1	0	0	0	7.5	6.6	9
5	-	16	0	0	6.4	0	0	0	8	6.1	8.3
PROMEDIO (mm)		15.24	0	0	6.36	0	0	0	7.88	6.4	8.56

Elaborado por: Johana Coronel

### 3.2.1.2. *Pseudomona aeruginosa*

Se puede observar en la tabla 10, que la concentración C2 (100.000 ug/ml) del extracto acuoso de las hojas de *D. elliptica*, generan un halo de inhibición mayor (9,7 mm) frente a *P. aeruginosa*.

**Tabla 10.**- Halos de inhibición en mm de los extractos acuoso, etanólico y etéreo de *D. elliptica* frente a *P. aeruginosa*

Repetición			Extracto acuoso			Extracto alcohólico			Extracto etéreo		
	BL -	BL +	C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
	DMSO (mm)	Gentamicina 10 ul (mm)	200000 ug/ml	100000 ug/ml	400000 ug/ml	200000 ug/ml	100000 ug/ml	400000 ug/ml	200000 ug/ml	100000 ug/ml	400000 ug/ml
1	-	16	8	10	8.5	0	0	6.1	0	0	0
2	-	16	8.6	9	9	0	0	6	0	0	0
3	-	16	8.6	9.5	8.5	0	0	6	0	0	0
4		16	8.6	10	8.5	0	0	5.8	0	0	0
5		16	8.6	10	9	0	0	6.1	0	0	0
PROMEDIO (mm)		16	8.48	9.7	8.7	0	0	6	0	0	0

Elaborado por: Johana Coronel

### 3.2.1.3. *Staphylococcus aureus*

Se puede observar en la tabla 11, que la concentración C3 (400.000 ug/ml) del extracto etéreo, etanólico y acuoso *D. elliptica*, genera un halo de inhibición mayor (12,7 mm; 18,54 mm y 11,2 mm respectivamente) frente a *S. aureus*.

**Tabla 11.**-Halos de inhibición en mm de los extractos acuoso, etanólico y etéreo de *D. elliptica* frente a *S. aureus*

Repetición	Bl. - DMSO (mm)	Bl. + Gentamicina 10 ul (mm)	Extracto acuoso			Extracto alcohólico			Extracto etéreo		
			C1 200000 ug/ml	C2 100000 ug/ml	C3 400000 ug/ml	C1 200000 ug/ml	C2 100000 ug/ml	C3 400000 ug/ml	C1 200000 ug/ml	C2 100000 ug/ml	C3 400000 ug/ml
1	-	29,1	-	-	11,4	8,2	7,1	18,5	8	7,1	12,7
2	-	29,4	-	-	11	10,4	7,1	18,5	8	7	12,7
3	-	27,5	-	-	11,1	8,8	8	18,4	8,2	7	12,6
4	-	27,5	-	-	11	8,2	7,1	18,8	8,3	6,9	12,8
5	-	27,5	-	-	11,5	8	7,1	18,5	8	7,1	12,7
PROMEDIO (mm)		28,2	0	0	11,2	8,72	7,28	18,54	8,1	7,02	12,7

**Elaborado por:** Johana Coronel

### 3.2.1.4. *Bacillus subtilissubsp. spizizenii*

Se puede observar en la tabla 12, que la concentración (400.000 ug/ml) del extracto etanólico *D. elliptica*, posee un mayor halo de inhibición (7,48 mm) frente a *B. subtilis subsp. spizizenii*.

**Tabla 12.-** Halos de inhibición en mm de los extractos acuoso, etanólico y etéreo de *D. elliptica* frente a *B. subtilis subsp. spizizenii*

Repetición	Bl. -	Bl. +	Extracto acuoso			Extracto alcohólico			Extracto etéreo		
	DMSO (mm)	Gentamicina	C1 200000 ug/ml	C2 100000 ug/ml	C3 400000 ug/ml	C1 200000 ug/ml	C2 100000 ug/ml	C3 400000 ug/ml	C1 200000 ug/ml	C2 100000 ug/ml	C3 400000 ug/ml
1	-	23.7	6.6	7	7.7	6.6	7	7.7	7.6	7.8	8.9
2	-	23.4	6.5	6.2	7.2	6.5	6.2	7.2	7	6	6.4
3	-	23.1	6.5	6.2	7.2	6.0	6.5	7.6	7.7	6	6.4
4	-	23.1	6.5	6.2	7.2	6.5	6.0	7.5	7	6.3	6.4
5	-	23.1	6.5	6.2	7.2	6.6	6.5	7.4	7.3	6.5	6.4
PROMEDIO (mm)		23.28	6.5	6.36	7.3	6.44	6.44	7.48	7.32	6.52	6.9

Elaborado por: Johana Coronel

### 3.2.1.5. *Candida albicans*

Se puede observar en la tabla 13, que ningún extracto de las hojas de *D. elliptica*, genera halo de inhibición frente a *C. albicans*.

**Tabla 13.-** Halos de inhibición en mm de los extractos acuoso, etanólico y etéreo de *D. elliptica* frente a *C. albicans*

Repetición	Bl. - DMSO (mm)	Bl. + Fluconazol 10 uL (mm)	Extracto acuoso			Extracto alcohólico			Extracto etéreo		
			C1 200000 ug/ml	C2 100000 ug/ml	C3 400000 ug/ml	C1 200000 ug/ml	C2 100000 ug/ml	C3 400000 ug/ml	C1 200000 ug/ml	C2 100000 ug/ml	C3 400000 ug/ml
1			-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PROMEDIO (mm)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Elaborado por: Johana Coronel

En la tabla 14, se puede observar la categorización según Alonso, (2000) de los microorganismos frente a las concentraciones de los extractos ensayados.

**Tabla 14.-** Codificación de sensibilidad de los microorganismos

<b>Extracto</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>P. aeruginosa</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>	<b><i>B. subtilis</i> <i>subsp.</i> <i>spizizenii</i></b>	<b><i>C. albicans</i></b>
Ac.C1	R	I	R	R	R
Ac.C2	R	S	R	R	R
Ac.C3	I	I	S	R	R
Al.C1	R	R	I	I	R
Al.C2	R	R	I	I	R
Al.C3	R	I	S	I	R
Et.C1	I	R	I	R	R
Et.C2	R	R	I	R	R
Et.C3	I	R	S	R	R

\* S= sensible o positiva. \*\* I= Intermedio o moderado. \*\*\* R= Resistente o negativo.

**Elaborado por:** Johana Coronel

**Datos de la tabla.**

**Ac.C1**=extracto acuoso concentración 1

**Ac.C2**=extracto acuoso concentración 2

**Ac.C3**=extracto acuoso concentración 3

**Al.C1**=extracto etanólico concentración 1

**Al.C2**=extracto etanólico concentración 2

**Al.C3**=extracto etanólico concentración 3

**Et.C1**=extracto etéreo concentración 1

**Et.C2**=extracto etéreo concentración 2

**Et.C3**=extracto etéreo concentración 3

### 3.3. Análisis estadístico

#### 3.3.1. Promedio de halo de inhibición según el microorganismo

**Tabla 15.** Promedio de halos de inhibición correspondiente a cada microorganismo sobre el extracto evaluado

<b>Extracto</b>	<b>Ec.</b>	<b>Paer.</b>	<b>Sau.</b>	<b>Bsp.</b>	<b>Calb.</b>
Ac.C1	0	8,48	0	6,5	0
Ac.C2	0	9,7	0	6,36	0
Ac.C3	6,36	8,7	11,2	7,3	0
Al.C1	0	0	8,72	6,44	0
Al.C2	0	0	7,28	6,44	0
Al.C3	0	6	18,54	7,48	0
Et.C1	7,88	0	8,1	7,32	0
Et.C2	6,4	0	7,02	6,52	0
Et.C3	8,56	0	12,7	6,9	0

Elaborado por: Johana Coronel

#### Datos de la tabla.

**Ec.** = *Escherichia coli*.

**Paer.** = *Pseudomona aeruginosa*.

**Sau.** = *Staphylococcus aureus*.

**Bsp.** = *Bacillus subtilis subsp. spizizenii*.

**Calb.** = *Candida albicans*.

#### 3.3.2. Análisis estadístico “Prueba de Kruskal-Wallis”

La prueba de Kruskal-Wallis, es un estudio no paramétrico que se realizó mediante el programa estadístico Statistix, para dicho proceso se consideró los datos de cada ensayo

de sensibilidad microbiana. Se evaluó independientemente cada ensayo y los resultados se consideraron con nivel de significancia  $\alpha$ : 0.05.

### **Hipótesis**

En el programa Statistix se realizó la prueba de Kruskal-Wallis con las siguientes hipótesis para cada ensayo antimicrobiano:

- *Hipótesis Nula 1 (HN1)*

Ninguna concentración de los respectivos extractos de *D. elliptica* evaluados para determinar sensibilidad antimicrobiana poseen medianas estadísticamente diferentes.

- *Hipótesis Alternativa 1 (HA1)*

Al menos una concentración de los respectivos extractos de *D. elliptica* evaluados para determinar sensibilidad antimicrobiana es estadísticamente diferente a las demás.

**“Prueba de Kruskal-Wallis”** para sensibilidad antimicrobiana de *E. coli* frente las diferentes concentraciones de los extractos de *D. elliptica*.

**Tabla 16.-** Análisis estadístico “Prueba de Kruskal-Wallis” para sensibilidad antimicrobiana de *E. coli* frente a concentraciones de extractos de *D. elliptica*.

```

Statistix 8.0
Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV

Variable      Mean   Sample
Rank          Size
Ac1000000u   15.5     6
Ac2000000u   36.8     6
Ac4000000u   15.5     6
Al1000000u   15.5     6
Al4000000u   15.5     6
Al 200000    15.5     6
Et1000000u   36.3     6
Et2000000u   51.1     6
Et4000000u   45.9     6
Total        27.5    54

Kruskal-Wallis Statistic      52.0188
P-Value, Using Chi-Squared Approximation  0.0000

Parametric AOV Applied to Ranks
Source  DF    SS      MS      F      P
Between  8  10664.8  1333.10  298  0.0000
Within   45   201.2    4.47
Total    53  10866.0

Total number of values that were tied  41
Max. diff. allowed between ties  0.00001

Cases Included 54      Missing Cases 0
    
```

Elaborado por: Johana Coronel

Se halló en la tabla 16, un valor del estadístico de Kruskal- Wallis (H) de 52.0188 y un valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) de 0.0000. Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es menor al alfa escogido, 0,005; se acepta la hipótesis alternativa, por lo que se concluye que al menos una de las concentraciones de los extractos de *D. elliptica* tiene medianas diferentes.

Para determinar cuál de las concentraciones causa la diferencia de los halos de inhibición, se realizó una prueba a posteriori, Kruskal- Wallis All- Pairwise Comparisons Test, donde se comparan las medianas de todos los pares posibles de concentraciones de *D. elliptica*, de la cual se obtuvo los siguientes resultados que según la tabla 17.

**Tabla 17.**-Test a posteriori, Kruskal- Wallis All- Pairwise Comparisons Test, para concentraciones de extractos ensayados.

Variable	Mean	Homogeneous Groups
Et200000u	51.083	A
Et400000u	45.917	A
Ac200000u	36.750	AB
Et100000u	36.250	AB
Ac100000u	15.500	B
Ac400000u	15.500	B
Al100000u	15.500	B
Al400000u	15.500	B
Al 200000	15.500	B

Alpha 0.05  
 Critical Z Value 3.197      Critical Value for Comparison 29.038  
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

**Elaborado por:** Johana Coronel

Según los resultados obtenidos en la tabla 17, hay dos grupos de concentraciones estadísticamente afines entre sí. Estos grupos son **A**: correspondiente al extracto etéreo concentración 200.000 ug/ml y 400.000 ug/ml respectivamente, los extractos acuoso y etéreo a concentración de 200.000 ug/ml y 100.000 ug/ml correspondientemente, mientras que el grupo **B**: los extractos acuoso y etéreo a concentración de 200.000 ug/ml y 100.000 ug/ml correspondientemente a la vez en el extracto acuoso a concentración de 100.000 ug/ml y 400.000 ug/ml así como en el extracto alcohólico a concentración de 100.000 ug/ml, 400.000 ug/ml, 200.000 ug/ml.

La concentración que sobresale de los dos grupos formados, se observa un rango más grande es de 200.000 ug/ml y 400.000 ug/ml referente al extracto etéreo. Por lo que se asume que presenta mejor halo de inhibición.

**“Prueba de Kruskal-Wallis”** para sensibilidad antimicrobiana de *P. aeruginosa* frente a las diferentes concentraciones de los extractos de *D. elliptica*.

**Tabla 18.-** Análisis estadístico “Prueba de Kruskal-Wallis” para sensibilidad antimicrobiana de *P. aeruginosa* frente a concentraciones de extractos de *D. elliptica*

```

Statistix 8.0

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV

Variable      Mean  Sample
Rank          Size
Ac1000000u   42.8    5
Ac2000000u   35.4    5
Ac4000000u   35.8    5
Al1000000u   13.0    5
Al2000000u   13.0    5
Al4000000u   28.0    5
Et1000000u   13.0    5
Et2000000u   13.0    5
Et4000000u   13.0    5
Total        23.0   45

Kruskal-Wallis Statistic      43.2655
P-Value, Using Chi-Squared Approximation  0.0000

Parametric AOV Applied to Ranks
Source  DF      SS      MS      F      P
Between  8    6173.20  771.650  265  0.0000
Within   36    104.80   2.911
Total   44    6278.00

Total number of values that were tied  42
Max. diff. allowed between ties  0.00001

Cases Included 45      Missing Cases 0
    
```

**Elaborado por:** Johana Coronel

Se halló en la tabla 18, un valor del estadístico de Kruskal- Wallis (H) de 43,2655 y un valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) de 0.0000. Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es menor al alfa escogido, 0,005; se acepta la hipótesis alternativa, por lo que se concluye que al menos una de las concentraciones de los extractos de *D. elliptica* tiene medianas diferentes.

Para determinar cuál de las concentraciones causa la diferencia de los halos de inhibición, se realizó una prueba a posteriori, Kruskal- Wallis All- Pairwise Comparisons Test, donde se comparan las medianas de todos los pares posibles de concentraciones de *D. elliptica*, de la cual se obtuvo los siguientes resultados que según la tabla 19.

**Tabla 19.**-Test a posteriori, Kruskal- Wallis All- Pairwise Comparisons Test, para concentraciones de extractos ensayados

```

Statistix 8.0                                     02/03/2
Kruskal-Wallis All-Pairwise Comparisons Test

Variable      Mean  Homogeneous Groups
Ac100000u    42.800  A
Ac400000u    35.800  AB
Ac200000u    35.400  AB
Al400000u    28.000  AB
Al100000u    13.000  B
Al200000u    13.000  B
Et100000u    13.000  B
Et200000u    13.000  B
Et400000u    13.000  B

Alpha                0.05
Critical Z Value    3.197      Critical Value for Comparison  26.556
There are 2 groups (A and B) in which the means
are not significantly different from one another.
    
```

**Elaborado por:** Johana Coronel

Según los resultados obtenidos en la tabla 19, hay dos grupos de concentraciones estadísticamente afines entre sí. Estos grupos son **A**: correspondiente al extracto acuoso concentración 100.000 ug/ml, 400.000 ug/ml, 200.000 ug/ml respectivamente, y el extracto etanólico a concentración de 400.000 ug/ml, mientras que el grupo **B**: los extractos acuoso a concentración de 400.000 ug/ml, 200.000 ug/ml respectivamente, extracto etanólico a concentración de 400.000 ug/ml, 200.000 ug/ml, 100.000 ug/ml y el extracto etéreo a concentración de 100.000 ug/ml, 200.000 ug/ml y 400.000 ug/ml.

La concentración que sobresale de los dos grupos formados, se observa un rango más grande es de 100.000 ug/ml referente al extracto acuoso. Por lo que se asume que presenta mejor halo de inhibición.

“Prueba de Kruskal-Wallis” para sensibilidad antimicrobiana de *S. aureus* frente las diferentes concentraciones de los extractos de *D. elliptica*.

**Tabla 20.-** Análisis estadístico “Prueba de Kruskal-Wallis” para sensibilidad antimicrobiana de *S. aureus* frente a concentraciones de extractos de *D. elliptica*

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV						
Variable	Mean Rank	Sample Size				
Ac1000000u	5.5	5				
Ac2000000u	5.5	5				
Ac4000000u	33.0	5				
Al1000000u	17.6	5				
Al2000000u	26.6	5				
Al4000000u	43.0	5				
Et1000000u	13.8	5				
Et2000000u	24.0	5				
Et4000000u	38.0	5				
Total	23.0	45				
Kruskal-Wallis Statistic					43.1363	
P-Value, Using Chi-Squared Approximation					0.0000	
Parametric AOV Applied to Ranks						
Source	DF	SS	MS	F	P	
Between	8	7326.30	915.788	225	0.0000	
Within	36	146.70	4.075			
Total	44	7473.00				
Total number of values that were tied					34	
Max. diff. allowed between ties					0.00001	
Cases Included		45	Missing Cases		0	

Elaborado por: Johana Coronel

Se halló en la tabla 20, un valor del estadístico de Kruskal- Wallis (H) de 43,1363 y la probabilidad asociada al estadístico (P) de 0.0000. Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es menor al alfa escogido, 0,005; se acepta la hipótesis alternativa, por lo que se concluye que al menos una de las concentraciones de los extractos de *D. elliptica* tiene medianas diferentes.

Para determinar cuál de las concentraciones causa la diferencia de los halos de inhibición, se realizó una prueba a posteriori, Kruskal- Wallis All- Pairwise Comparisons Test, donde se comparan las medianas de todos los pares posibles de concentraciones de *D. elliptica*, de la cual se obtuvo los siguientes resultados que según la tabla 21.

**Tabla 21.**-Test a posteriori, Kruskal- Wallis All- Pairwise Comparisons Test, para concentraciones de extractos ensayados

Variable	Mean	Homogeneous Groups
Al400000u	43.000	A
Et400000u	38.000	AB
Ac400000u	33.000	AB
Al200000u	26.600	ABC
Et200000u	24.000	ABC
Al100000u	17.600	ABC
Et100000u	13.800	BC
Ac100000u	5.5000	C
Ac200000u	5.5000	C

Alpha 0.05  
 Critical Z Value 3.197 Critical Value for Comparison 26.556  
 There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.

**Elaborado por:** Johana Coronel

Según los resultados obtenidos en la tabla 21, hay tres grupos de concentraciones estadísticamente afines entre sí. Estos grupos son **A**: correspondiente al extracto etanólico, etéreo y acuoso a concentración 400.000 ug/ml respectivamente; extracto etanólico y etéreo concentración de 200.000 ug/ml y extracto etanólico a concentración de 100.000 ug/ml respectivamente, mientras que el grupo **B**: los extracto etéreo y acuoso a concentración 400.000 ug/ml respectivamente, extracto etanólico a concentración de 200.000 ug/ml y 100.000 ug/ml así como el extracto etéreo concentración de 200.000 ug/ml y 100.000 ug/ml. En el grupo **C**: Se halla el extracto etanólico y etéreo a concentración de 200.000 ug/ml, extracto etanólico, etéreo, acuoso a concentración de 100.000 ug/ml y el extracto acuoso a concentración de 200.000 ug/ml.

La concentración que sobresale de los tres grupos formados, se observa un rango más grande es de 400.000 ug/ml referente al extracto etanólico. Por lo que se asume que presenta mejor halo de inhibición.

“Prueba de Kruskal-Wallis” para sensibilidad antimicrobiana de *Bacillus subtilissubsp. Spizizenii* frente las diferentes concentraciones de los extractos de *D. elliptica*.

**Tabla 22.-** Análisis estadístico “Prueba de Kruskal-Wallis” para sensibilidad antimicrobiana de *Bacillus subtilissubsp. spizizenii* frente a concentraciones de extractos de *D. elliptica*

```

Statistix 8.0

Kruskal-Wallis One-Way Nonparametric AOV

Variable      Mean  Sample
              Rank  Size
Ac1000000u   20.2    5
Ac2000000u   11.3    5
Ac4000000u   34.8    5
Al1000000u   15.2    5
Al2000000u   18.1    5
Al4000000u   37.9    5
Et1000000u   15.6    5
Et2000000u   34.9    5
Et4000000u   19.0    5
Total        23.0    45

Kruskal-Wallis Statistic          23.5904
P-Value, Using Chi-Squared Approximation  0.0027

Parametric AOV Applied to Ranks
Source  DF    SS      MS      F      P
Between  8  4016.00  502.000  5.20  0.0002
Within  36  3474.50  96.514
Total   44  7490.50

Total number of values that were tied  39
Max. diff. allowed between ties  0.00001

Cases Included 45    Missing Cases 0
    
```

**Elaborado por:** Johana Coronel

Se halló en la tabla 22, un valor del estadístico de Kruskal- Wallis (H) de 23,5904 y la probabilidad asociada al estadístico (P) de 0.0027. Debido a que el valor de la probabilidad asociada al estadístico (P) es menor al alfa escogido, 0,005; se acepta la hipótesis alternativa, por lo que se concluye que al menos una de las concentraciones de los extractos de *D. elliptica* tiene medianas diferentes.

Para determinar cuál de las concentraciones causa la diferencia de los halos de inhibición, se realizó una prueba a posteriori, Kruskal- Wallis All- Pairwise Comparisons Test, donde se comparan las medianas de todos los pares posibles de

concentraciones de *D. elliptica*, de la cual se obtuvo los siguientes resultados que según la tabla 23.

**Tabla 23.**-Test a posteriori, Kruskal- Wallis All- Pairwise Comparisons Test, para concentraciones de extractos ensayados.

Variable	Mean	Homogeneous Groups
Al400000u	37.900	A
Et200000u	34.900	AB
Ac400000u	34.800	AB
Ac100000u	20.200	AB
Et400000u	19.000	AB
Al200000u	18.100	AB
Et100000u	15.600	AB
Al100000u	15.200	AB
Ac200000u	11.300	B

Alpha 0.05  
 Critical Z Value 3.197      Critical Value for Comparison 26.556  
 There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.

**Elaborado por:** Johana Coronel

Según los resultados obtenidos en la tabla 23, hay dos grupos de concentraciones estadísticamente afines entre sí. Estos grupos son **A**: correspondiente al extracto etanólico, etéreo y acuoso a concentración de 400.000 ug/ml, 200.000 ug/ml, 400.000 ug/ml respectivamente; extracto acuoso, etéreo y etanólico a concentración de 100.000 ug/ml, 400.000 ug/ml, 200.000 ug/ml respectivamente, extracto etanólico y etéreo a concentración de 100.000 ug/ml mientras que el grupo **B**: el extracto etéreo y acuoso a concentración de 200.000 ug/ml, 400.000 ug/ml respectivamente; extracto acuoso, etéreo y etanólico a concentración de 100.000 ug/ml, 400.000 ug/ml, 200.000 ug/ml respectivamente, extracto etanólico y etéreo a concentración de 100.000 ug/ml y extracto acuoso a concentración de 200.000 ug/ml.

La concentración que sobresale de los dos grupos formados, se observa un rango más grande es de 400.000 ug/ml referente al extracto etanólico. Por lo que se asume que presenta mejor halo de inhibición.

### 3.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria se determinó en aquellos microorganismos que presentaron sensibilidad bacteriana intermedio (moderada) o sensible (positiva).

*E. coli*

#### Dilución doble seriada

**Tabla 24.-** Concentración mínima inhibitoria por mg de extracto etéreo de *D. elliptica*; frente a *Escherichia coli*

<b>Extracto etéreo <i>D. elliptica</i> C3 = 400.000 ug/ml</b>	
400.000	Ausencia
100.000	Crecimiento
50000	Crecimiento
25000	Crecimiento
12500	Crecimiento
6250	Crecimiento
3125	Crecimiento
1562,5	Crecimiento
781,25	Crecimiento
390,625	Crecimiento

**Elaborado por:** Johana Coronel

Se puede observar en la tabla 24, donde la bacteria *E. coli* es inhibida por la disolución etérea a concentración de 400.000 ug/ml, mientras que a 100.000 ug/ml se evidenció crecimiento de la bacteria. Los resultados fueron los mismos en las repeticiones realizadas.

## *Pseudomona aeruginosa*

### Dilución doble seriada

**Tabla 25.** Concentración mínima inhibitoria por mg de extracto acuoso de *D. elliptica*; frente a *Pseudomona aeruginosa*

<b>Extracto acuoso <i>D. elliptica</i></b> <b>C2= 100.000 ug/ml</b>	
100.000	Ausencia
25000	Ausencia
12500	Ausencia
6250	Ausencia
3125	Ausencia
1562,5	Ausencia
781,25	Ausencia
390,625	Ausencia
195,3125	Ausencia
97,65625	Ausencia
48,828125	Ausencia

**Elaborado por:** Johana Coronel

Se puede observar en la tabla 25, que las concentraciones acuosas de las disoluciones ensayadas inhiben en su totalidad a la bacteria *P. aeruginosa*. A partir de 100.000 ug/ml. Los resultados fueron los mismos en las repeticiones realizadas.

## *Staphylococcus aureus*

### Dilución doble seriada

**Tabla 26.**-Concentración mínima inhibitoria por mg de extracto acuoso de *D. elliptica*; frente a *Staphylococcus aureus*

<b>Extracto acuoso <i>D. elliptica</i></b>	
<b>Concentración 3 = 400.000 ug/ml</b>	
400.000	Ausencia
100.000	Ausencia
50000	Crecimiento
25000	Crecimiento
12500	Crecimiento
6250	Crecimiento
3125	Crecimiento
1562,5	Crecimiento
781,25	Crecimiento
390,625	Crecimiento
195,3125	Crecimiento

**Elaborado por:** Johana Coronel

Se puede observar en la tabla 26, que *Staphylococcus aureus* es inhibida con la concentración acuosa de 400.000 ug/ml de la disolución ensayada de *D. elliptica* mientras que a partir de 50000 ug ug/ml se evidencia crecimiento de la bacteria. Los resultados fueron los mismos en las repeticiones realizadas.

**Tabla 27.- Concentración mínima inhibitoria por mg de extracto etanólico de *D. elliptica*; frente a *Staphylococcus aureus***

<b>Extracto etanólico <i>D. elliptica</i></b>	
<b>C3 = 400.000 ug/ml</b>	
400.000	Ausencia
100.000	Ausencia
50000	Ausencia
25000	Crecimiento
12500	Crecimiento
6250	Crecimiento
3125	Crecimiento
1562,5	Crecimiento
781,25	Crecimiento
390,625	Crecimiento
195,3125	Crecimiento

**Elaborado por:** Johana Coronel

Se puede observar en la tabla 27, que *Staphylococcus aureus*, es inhibida a partir de la concentración etanólica ensayada de 400.000 ug/ml hasta 50000 ug/ml, mientras que el crecimiento bacteriano es evidente a partir de la concentración ensayada de 25.000 ug/ml del extracto etanólico. Los resultados fueron los mismos en las repeticiones realizadas.

**Tabla 28.- Concentración mínima inhibitoria por mg de extracto etéreo de *D. elliptica*; frente a *Staphylococcus aureus***

<b>Extracto etéreo <i>D. elliptica</i></b>	
<b>Concentración 3 = 400.000 ug/ml</b>	
400.000	Ausencia
100.000	Ausencia
50000	Crecimiento
25000	Crecimiento
12500	Crecimiento
6250	Crecimiento
3125	Crecimiento
1562,5	Crecimiento
781,25	Crecimiento
390,625	Crecimiento
195,3125	Crecimiento

**Elaborado por:** Johana Coronel

Se puede observar en la tabla 28, que *Staphylococcus aureus* es inhibida a concentración entre 400.000 ug/ml y 100.000 ug/ml de las disoluciones ensayadas de extracto etéreo, mientras que a partir de la concentración ensayada de 50000 ug/ml se evidenció crecimiento de la bacteria. Los resultados fueron los mismos en las repeticiones realizadas.

### **3.4. Evaluación de actividad antioxidante de *D. elliptica*, mediante método de DPPH**

La evaluación de actividad antioxidante a través del método de reducción del radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), se llevó a cabo sobre el extracto etanólico total seco al cual se lo redisolvió en etanol para obtener diferentes concentraciones usando como blanco etanol 96% y como estándar la vitamina C y extracto etanólico de té

verde. La actividad antioxidante se expresa como IC<sub>50</sub> que representa la concentración del extracto (mg/l) que reduce la absorbancia de una disolución de DPPH en un 50%. Así, un menor valor de IC<sub>50</sub> indica mayor actividad antioxidante porque se requiere menor cantidad de muestra para disminuir en 50%, la absorbancia de la disolución de DPPH (Hanato, 1988).

Según Quiñonez & otros (2013). El porcentaje de inhibición para los extractos usados como estándares y muestra evaluada de *D. elliptica* es calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% I = \frac{\text{Abs DPPH} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs DPPH}} \times 100\%$$

### 3.3.2. Cálculo IC<sub>50</sub> en té verde

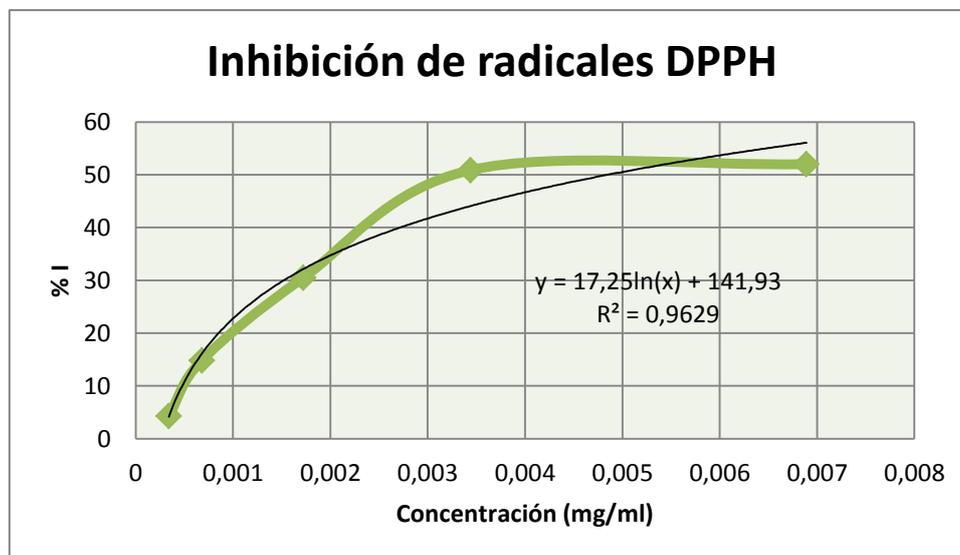
De acuerdo a la tabla 29, se observa una clara reducción de la absorbancia del DPPH contenido en la disolución de ensayo por acción del té verde; valores con los cuales realizamos el cálculo de IC<sub>50</sub> obtenido de la ecuación de regresión logarítmica de la curva % I vs concentración del extracto en la disolución de prueba (mg/ml) de acuerdo a los siguientes datos.

**Tabla 29.- Absorbancia de DPPH con diferentes concentraciones de extracto etanólico de té verde**

<b>Té verde +DPPH</b>			
Té verde (ul)	Abs DPPH	Conc. Té verde (mg/ml)	% I
0,00	0,86		0,00
1,00	0,83	0,00034	4,32
2,00	0,73	0,00068	14,85
5,00	0,60	0,00172	30,47
10,00	0,42	0,00344	50,88
20,00	0,41	0,00689	52,01
50,00	0,41	0,01723	52,61
80,00	0,40	0,02757	53,23

**Elaborado por:** Johana Coronel

**Figura 15.-** Porcentaje de inhibición del DPPH de extracto etanólico de Té verde, a diferentes concentraciones mg/ml



**Elaborado por:** Johana Coronel

Despejando X en la ecuación de regresión lineal del gráfico 1 obtenemos:

$$\ln x = \frac{Y - 141,93}{17,25}$$

Y cuando la absorbancia del DPPH se ha reducido en un 50 % se obtiene:

$$\ln x = \frac{50 - 141.93}{17,25} = -5.33$$

$$x = \text{antiln} - 5.33 = 0,0048 \text{ mg/ml}$$

$$\mathbf{IC50 = 0,0048 \text{ mg/ml}}$$

Lo que significa que a una concentración de 0,0048 mg/ml el extracto etanólico de té verde reduce el 50% de los radicales DPPH.

### 3.4.2. Cálculo IC<sub>50</sub> en Vitamina C

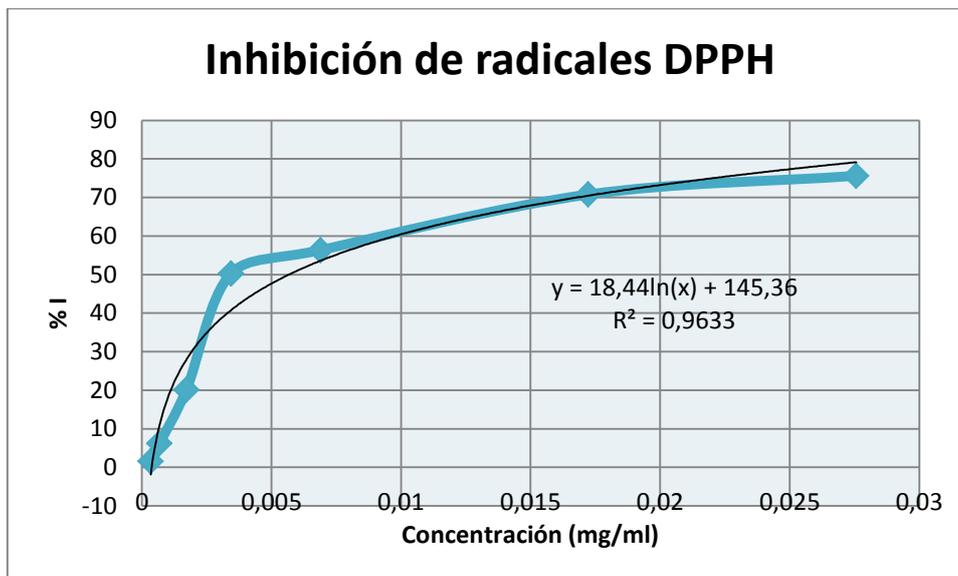
De acuerdo a la tabla 30, se observa una clara reducción de la absorbancia del DPPH contenido en la disolución de ensayo por acción de la vitamina C; valores con los cuales realizamos el cálculo de IC<sub>50</sub> obtenido de la ecuación de regresión logarítmica de la curva % I vs concentración del extracto en la disolución de prueba (mg/l) de acuerdo a los siguientes datos.

**Tabla 30.- ABS de diluciones del estándar de vitamina C con DPPH**

<b>Vitamina C + DPPH</b>			
Vit C (ul)	Abs DPPH	Conc Vit. C (mg/ml)	% I
0	0,8779		0
1	0,8641	0,00034	1,57
2	0,8234	0,00068	6,21
5	0,7012	0,00172	20,13
10	0,4368	0,00344	50,24
20	0,3834	0,00689	56,33
50	0,2566	0,01723	70,77
80	0,214	0,02757	75,62

**Elaborado por:** Johana Coronel

**Figura 16.-** Porcentaje de inhibición del DPPH del estándar sintético Vitamina C a diferentes concentraciones mg / ml



Elaborado por: Johana Coronel

$$\ln x = \frac{Y - 145,36}{18,44}$$

$$\ln x = \frac{50 - 145,36}{18,44} = -5,17$$

$$x = \text{antiln} - 5,17$$

$$\mathbf{IC_{50} = 0,0057 \text{ mg/ml}}$$

Lo que significa que a una concentración de 0,0057 ppm, la disolución de vitamina C reduce el 50 % de los radicales DPPH.

### 3.4.3. Cálculo IC<sub>50</sub> en *Dendrothora elliptica*

De acuerdo a la tabla 31, se observa una clara reducción de la absorbancia del DPPH contenido en la disolución de ensayo por acción del *D. elliptica*; valores con los cuales realizamos el cálculo de IC<sub>50</sub> obtenido de la ecuación de regresión logarítmica de la

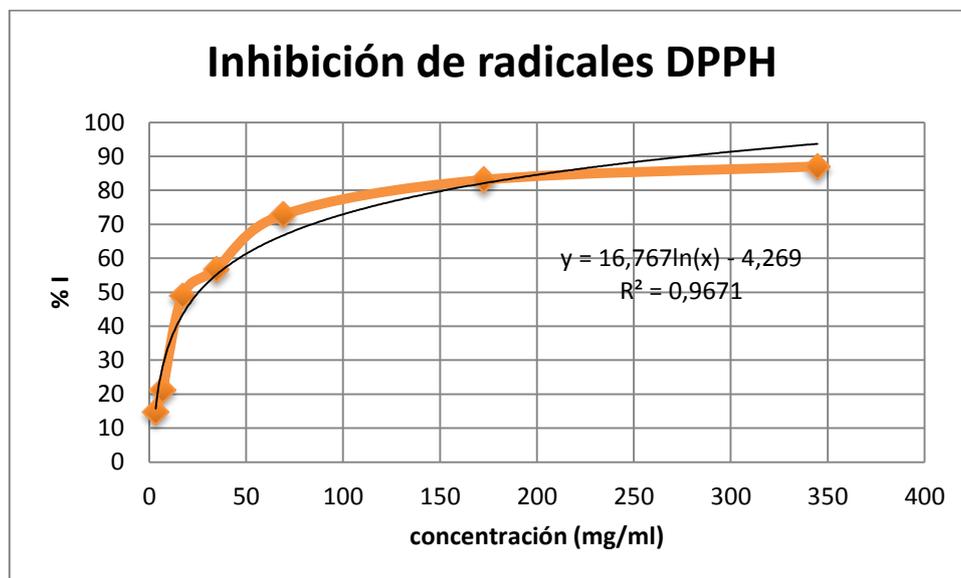
curva % I vs concentración del extracto en la disolución de prueba (mg/l) de acuerdo a los siguientes datos.

**Tabla 31.- ABS de DPPH frente a diluciones del extracto etanólico de *D. elliptica***

<i>D. elliptica</i> + DPPH			
<i>D. elliptica</i> (ul)	Abs DPPH	Conc <i>D. elliptica</i> (ug/ml)	% I
0	0,8759	0	0
1	0,7466	3,3	14,76
2	0,6909	6,8	21,12
5	0,4471	17,2	48,96
10	0,3785	34,4	56,79
20	0,2382	68,9	72,81
50	0,1483	172,3	83,07
100	0,1133	344,7	87,06

Elaborado por: Johana Coronel

**Figura 17.-** Porcentaje de inhibición del DPPH del estándar sintético de Vitamina C a diferentes concentraciones ug/ml



Elaborado por: Johana Coronel

$$\ln x = \frac{Y + 4,269}{16,767}$$

$$\ln x = \frac{50 + 4,269}{16,883} = 3,24$$

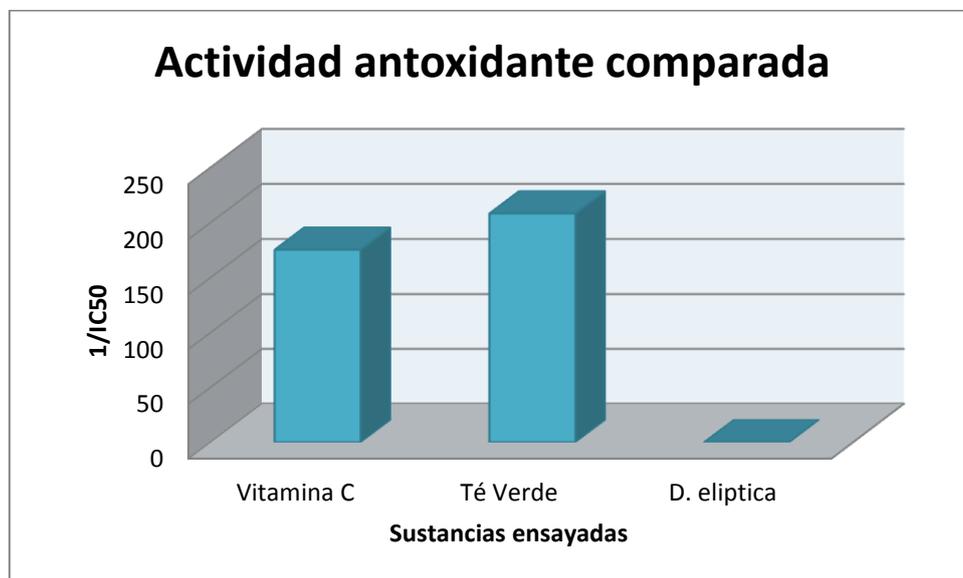
$$x = \text{IC}_{50} = \text{antiln } 3,24 = 25.45 \text{ mg/ml}$$

$$\text{IC}_{50} = 25.45 \text{ mg/ml}$$

Lo que significa que una concentración de la disolución de *D. elliptica* de 25.45 mg/l inhibe el 50 % de radicales DPPH

En la figura 18 se compara el inverso del  $\text{IC}_{50}$  de las tres sustancias ensayadas y nos muestra de forma gráfica las diferencias en actividad antioxidante entre la muestra ensayada y los estándares empleados.

**Figura 18.-** Concentración de los extractos de Vitamina C, Té verde y *D. elliptica*



**Elaborado por:** Johana Coronel

La figura 18, nos muestra claramente que *D. eliptica* no tiene actividad antioxidante.

## CONCLUSIONES

- El análisis cualitativo obtenido a través del screening fitoquímico de los extractos etanólicos, etéreo y acuoso obtenidos a partir de las hojas secas de *D. elliptica*, indicó poseer en cantidades bajas; aceites y grasas, catequinas, esteroides y/o triterpenos así como la reacción positiva de alcaloides. En el extracto etéreo se evidenció en menores cantidades; azúcares reductores, esteroides y/o triterpenos, aminoácidos libres, fenoles y taninos; en mayor cantidad se presenció alcaloides y saponinas. En el extracto acuoso la presencia de alcaloides, fue positiva, se identificó saponinas lactonas y cumarinas mientras que con baja cantidad se comprobó; azúcares reductores, fenoles y taninos.
- Las bacterias que presentaron mayor sensibilidad ante los extractos etanólico, etéreo y acuoso, evaluados son *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* con diámetros de halo de inhibición superiores a 9 mm aclarando que la última (*P. aeruginosa*) solo es sensible frente al extracto acuoso. *Escherichia coli* presentó sensibilidad intermedia con un diámetro de halo de inhibición inferior a 9 mm frente al extracto etéreo. *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* y *Candida albicans*, son resistentes ante los tres tipos de extractos ensayados al no generar halos de inhibición.
- Lo anterior nos permite afirmar que *D. elliptica* tiene actividad antibacteriana de amplio espectro y que carece de actividad antimicótica.
- En la prueba *a posteriori* del análisis estadístico no paramétrica de Kruskal-Wallis para cada una de las bacterias, las concentraciones de los extractos que son más efectivas como antimicrobianos fueron 200.000 ug/ml, 400.000 ug/ml de extracto etéreo frente a *E. coli*; para *P. aeruginosa* 100.000 ug/ml; para *S. aureus* y *B. subtilis subsp. spizizenii* 400.000 ug/ml de extracto etanólico.

- La concentración mínima inhibitoria, CMI, para *E. coli* es de 400 mg/ml de extracto etéreo; el extracto acuoso frente a *P. aeruginosa* se evidenció CMI de 250 mg/ml, el extracto acuoso, etanólico y etéreo de *D. elliptica* ante *S. aureus* presentó CMI de 100 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, respectivamente.
- Los resultados de reducción del radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) demuestran que el extracto etanólico de las hojas de *D. elliptica* no tiene actividad antioxidante en comparación con estándares (Té verde y Vitamina C) con un IC<sub>50</sub> 25.45 mg/ml.

## LISTA DE REFERENCIAS

- Abad, A. (2006). Recuperado el 25 de enero de 2013 de *análisis fitoquímico*:  
<http://www.redalyc.uaemex.mx>
- Albrechts, C. (2010). La secuencia del genoma de *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* gtP20b, aislado del Océano Índico. *American Society for Microbiology*
- Alonso, J. (2006). Técnicas de comprobación de actividad terapéutica de las plantas medicinales. *Concentración mínima inhibitoria*
- Fernández, & otros, &. (2006). Recuperado el 20 de Mayo de 2013, de *Microbiología*:  
<http://www.scielo.org.ve>
- Foster. (2007). *Parasitic plants*. Recuperado el 10 de Octubre de 2013, de *Familia Santalaceae*: <http://www.parasiticplants.siu.edu/Viscaceae/>
- García, & otros, F. &. (2005). *Microbiología Clínica Práctica*. Cadiz: Repeto-Cadiz.
- Garrido, A., & otros, T. &. (2006). *Fundamentos de bioquímica estructural*. Madrid: Tebar, S.L.
- Ghershman, E. (06 de abril de 2006). Galileog. Recuperado el 07 de octubre de 2013, de *Biología de bacterias*: <http://www.galileog.com>
- Gómez, F. (2010). Perquirere. Recuperado el 10 de Octubre de 2013, de *Etnobotánica*:  
<http://perquirere.unipam.edu.br>
- Hanato, T. (1988). *Chem Pharm Bull*, 2090-7.
- Hanato, T. (1988). Two new flavonoids and other constituents in licorice root: their relative astringency and radical scavenging effects. *Chem Pharm Bull*, 2090-7.
- Ibarra, P. (Agosto de 2010). Determinación del contenido fenólico en extractos naturales mediante sensores enzimáticos. *Determinación del contenido fenólico en extractos naturales mediante sensores enzimáticos*. México.
- Infan, (2010). Countdown. Recuperado el 29 de octubre de 2013, *Datos de Biodiversidad en Ecuador*:: <http://www.countdown2010.net>

- Liogier, H. A. (2000). DESCRIPTIVE FLORA OF PUERTO RICO AND ADJACENT ISLANDS. En H. Alain, *DESCRIPTIVE FLORA OF PUERTO RICO AND ADJACENT ISLANDS* (pág. 339). Puerto Rico: Editorial de la Universidad de Puerto Rico.
- Madigan, & Martinko. (2005). *Brock Biology of Microorganisms*. Prentice Hall.
- Martin, M. (2006). Candida albicans, el hongo oportunista . *Mi herbolario*.
- McPrerson, & Pincus. (2006). Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. En M. & Pincus, "*Medically Important Bacteria*".
- Molyneux, P. (2003). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *ASEAN BIODIVERSITY*, 211-219.
- Montoya, H. (2008). *Microbiología Basica para el area de la Salud y Afines*. Medellin: Universidad de Antioquia.
- Muñoz, M., & Gutierrez, M. (2008). *UAQ*. Recuperado el 24 de Octubre de 2013, de *Determinacion de Actividad Antioxidante de diversas partes*: <http://www.uaq.mx>
- Pahissa, A. (2009). *Infecciones producidas por Staphylococcus aureus*. Barcelona: ICG mARGE, SL.
- Pickering, J. (2012). *Discoverlife*. Recuperado el 15 de octubre de 2013, de *Point map de Dendrophthora elliptica*: <http://www.discoverlife.org>
- Podolak. (2011). *Geekosystem*. Recuperado el 29 de Septiembre de 2013, *Bacterias*: <http://www.geekosystem.com>
- Quintanar, & Calderon. (2009). La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *UACJ*, 89-101.
- Quiñonez, (2013). Scielo Cuba. Recuperado el 12 de noviembre de 2013, de *Actividad Antioxidante fundamento*: <http://scielo.sld.cu>
- Rivero, M. (2004). *Escherichia colie enterohemorrágica y síndrome uremico hemolítico en Argentina*. Recuperado el 16 de Octubre de 2013, de *Escherichia coli e*

- enterohemorrágica y síndrome uremico hemolítico en Argentina:  
<http://www.medicinabuenosaires.com>
- Sánchez, J. (2010). *Biología Médica*. Recuperado el 11 de marzo de 2014, de *Bacterias Gram positivas y negativas*: <http://biologiamedica.com>
- Santamarina, & otros, &. (1997). *Biología y Botánica*. Valencia: REPROVAL, S.L.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*. Bogotá: CYTED.
- Sosa. (2010). *Medicina estomatológica*. Recuperado el 13 de Octubre de 2013, de *Revisión de la literatura Candida albicans*: <http://www.odontologiaonline.com>
- Temperante (2010). *Microbiología*. Recuperado el 07 de Octubre de 2013, de *Microorganismos*: <http://es.scribd.com>
- Tropicos. (2009). *Tropicos*. Recuperado el 11 de Octubre de 2013, de *Dendrophthora elliptica*: <http://www.tropicos.org>
- UniProt Consorcio (2009). *UniProt*. Recuperado el 23 de Septiembre de 2013, de *Taxonomía de Bacillus subtilis spizisenii*: <http://www.uniprot.org>
- Velez. (2006). *UPRM*. Recuperado el 10 de Octubre de 2013, *Técnicas de cromatografía*: <http://www.uprm.edu>
- Vera, G. (2005). *Introducción a la microbiología*. EUNED. (págs. 46-48).
- Villafañe. (2008). *Microbiología Básica para el área de la salud y afines*. Colombia: Universidad de Antioquia.
- Yaneth, M. (2011). *Maceya*. Recuperado el 07 de Octubre de 2013, de *Sensibilidad y Resistencia bacteriana*: <http://www.slideshare.net>

## ANEXOS

### Anexo 1.- Certificado de autenticación botánica

Quito, 29 de junio del 2012

#### CERTIFICADO DE AUTENTIFICACIÓN BOTÁNICA

Yo, Marco Fernando Cerna Cevallos; Doctor en Biología con especialidad en Flora del Ecuador, Certifico:

Qué las muestras botánicas colectadas por el Ing. Wilson Tapia Hernandez corresponde a las siguientes especies:

***Dendrophthora elliptica (Gardner) Krug & Urb.***

Estos Bouchers reposan en el Herbario Nacional MNCC-Quito.

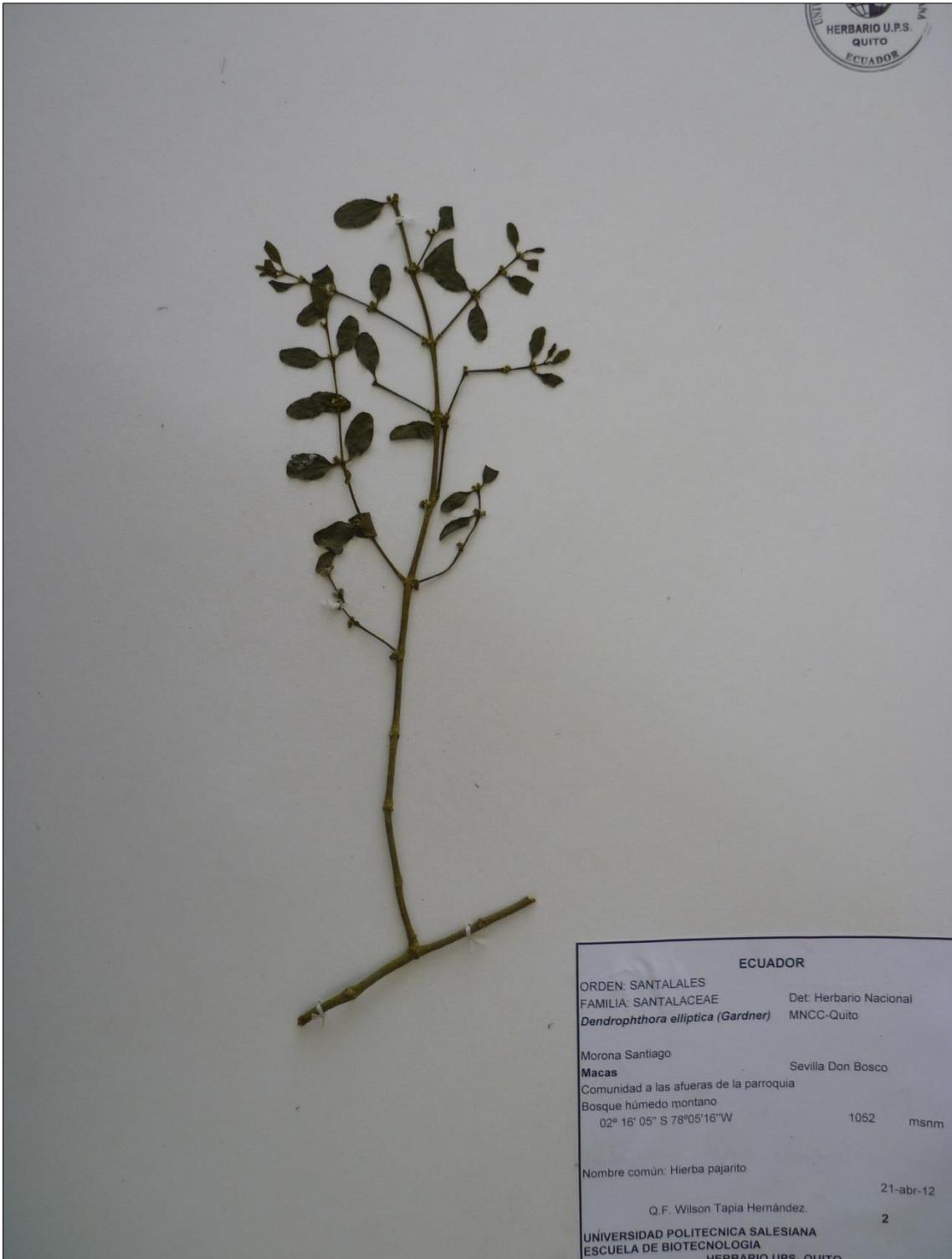
Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad.

Atte.

Marco Cerna

DOCTOR EN BIOLOGÍA

Anexo 2.- Montaje de la muestra vegetal *D. elliptica* para herbario U.P.S.



Anexo 3.- Muestra seca de *D. elliptica*.



**Anexo 4.-** Obtención de extractos de *D. elliptica*



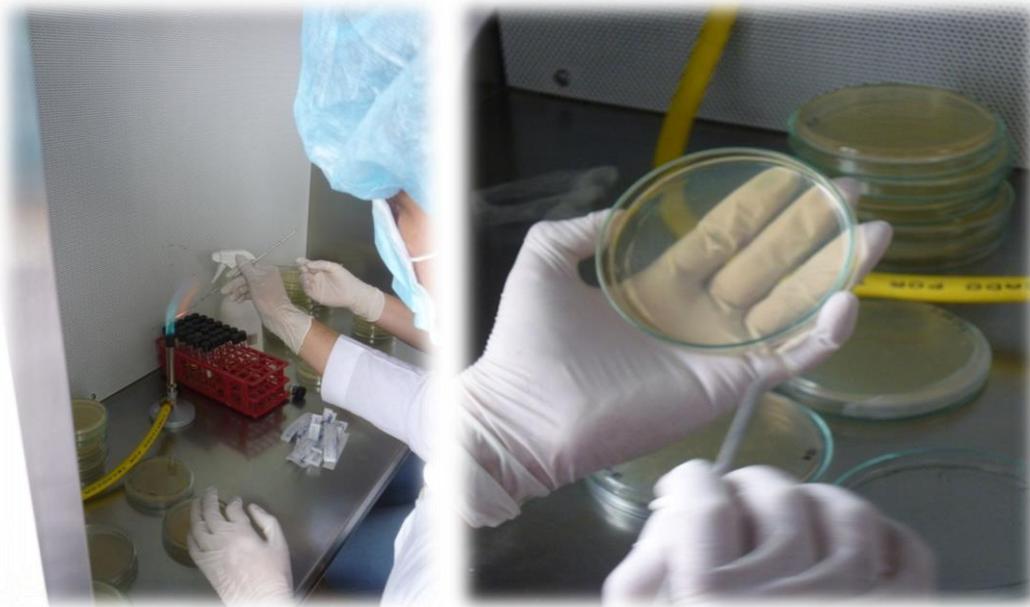
**Anexo 5.-** Preparación de soluciones para actividad antimicrobiana.



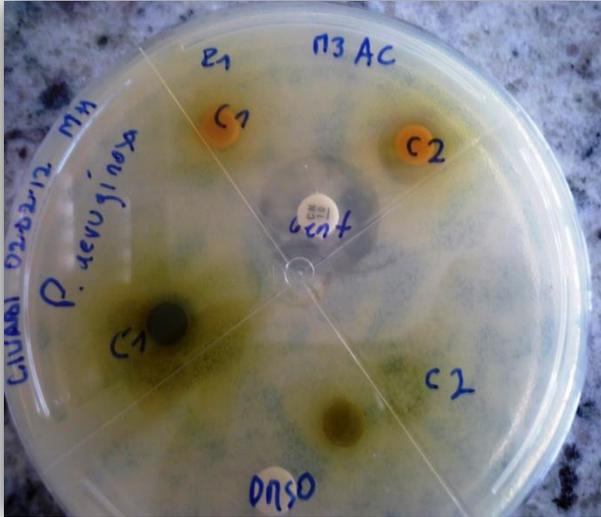
**Anexo 6.- Cepas ATCC de microorganismos a ensayar.**



**Anexo 7.- Siembra de microorganismos en medios de cultivo.**



**Anexo 8.-** Sensibilidad de las cepas ante los extractos de *D. elliptica*.



Blanco positivo presenta inhibición de 16 mm. *P. aeruginosa* presenta sensibilidad las concentraciones acuosas (C1= **200.000** ug/ml y C2= **100.000**ug/ml) de **M3** (*D. elliptica*). Sin embargo no es sensible ante las concentraciones alcohólicas (C1= **200.000** ug/ml y C2= **100.000**ug/ml) de *D. elliptica*



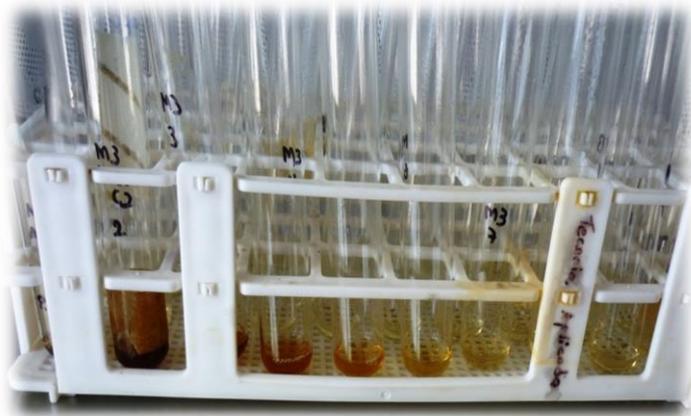
Blanco positivo presenta inhibición de 16,5 mm. *P. aeruginosa* no presenta sensibilidad ante (C1= **200.000** ug/ml y C2= **100.000**ug/ml) de *D. elliptica*.

*C.albicans*



Blanco positivo (fluconazol) presenta inhibición de 0 mm debido a baja concentración. *C.albicans* no presenta sensibilidad ante las concentraciones acuosas, alcohólicas, etéreas (C1= 200.000 ug/ml ; C2= 100.000 ug/ml; C3= 400.000 ug/ml) de *D. elliptica*.

**Anexo 9.-** Concentración mínima inhibitoria.



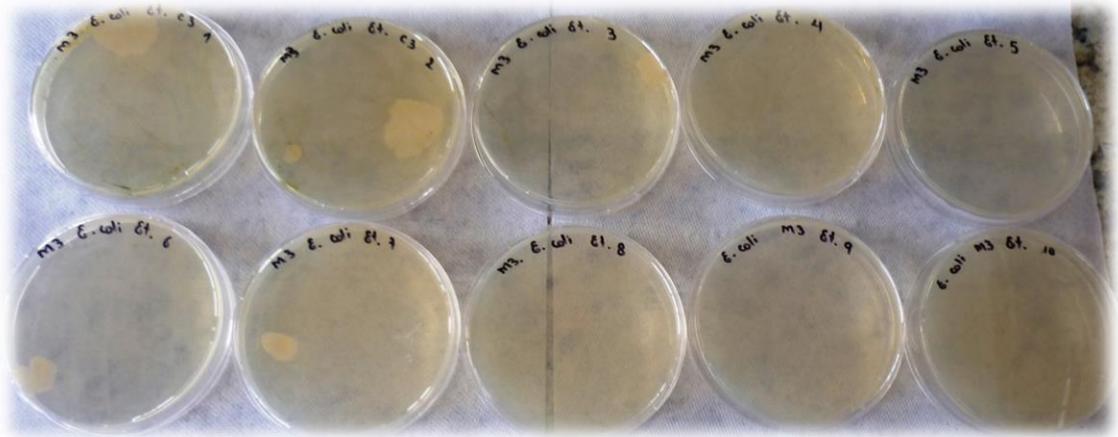
Preparación de dilución doble seriada, cada tubo de ensayo contiene: Caldo Mueller- Hinton, Solución madre diluida e inóculo bacteriano.

Tubo de ensayo del cual parte la dilución doble seriada



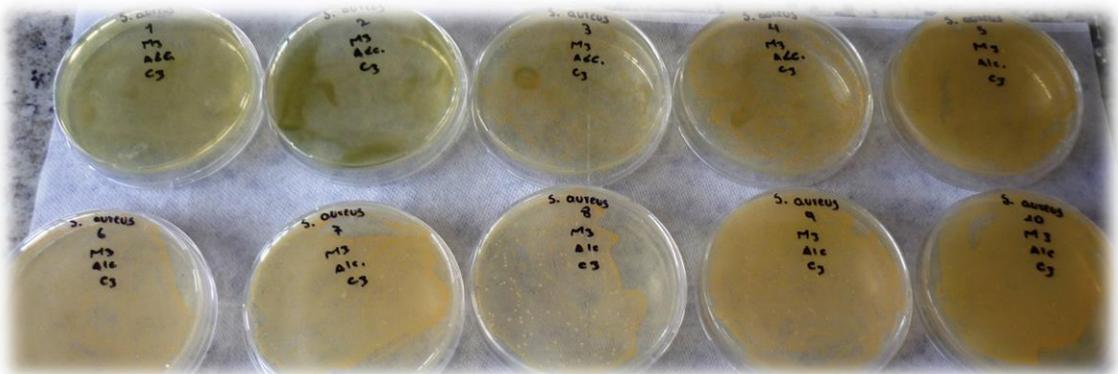
## Anexo 10.- Lecturas de placas de CMI.

### *E. coli*

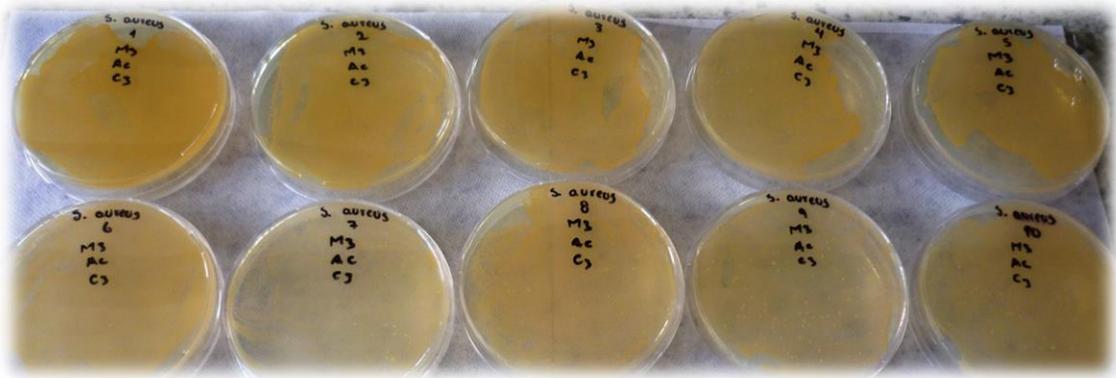


El extracto etéreo de *D. elliptica* a concentración de 400.000 ug/ml presenta CMI.

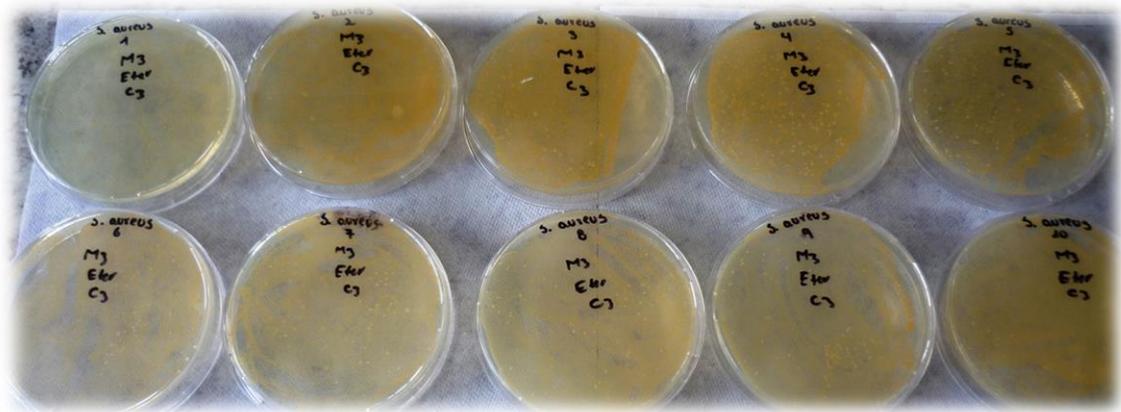
### *S. aureus*



*Staphylococcus aureus*, es inhibida a partir de la concentración etanólica ensayada de 400000 ug/ml hasta 50000 ug/ml, mientras que el crecimiento bacteriano es evidente a partir de la concentración ensayada de 25.000 ug/ml del extracto etanólico.



*Staphylococcus aureus* es inhibida con la concentración acuosa de 400000 ug/ml de la disolución ensayada de *D. elliptica* mientras que a partir de 50000ug ug/ml se evidencia crecimiento de la bacteria.



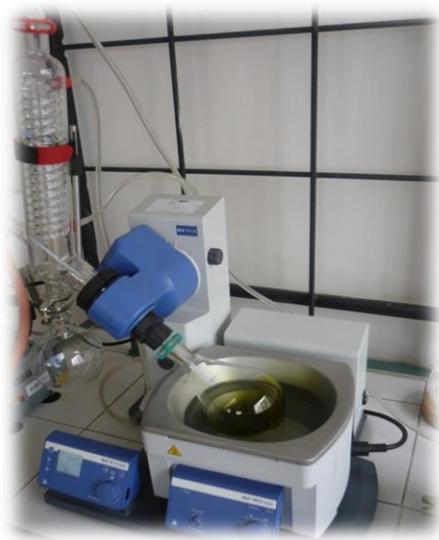
*Staphylococcus aureus* es inhibida a concentración entre 400000 ug/ml y 100000 ug/ml de las disoluciones ensayadas de extracto etéreo, mientras que a partir de la concentración ensayada de 50000 ug/ml se evidenció crecimiento de la bacteria

## Anexo 11.- Actividad Antioxidante



Filtración del extracto etanólico del estándar de Té verde, posterior a 48 horas de maceración.

Concentración del extracto de etanólico del estándar de Té verde.



Reactivo de DPPH, para análisis de actividad antioxidante.

