



UNIVERSIDAD DE CUENCA
Facultad de Ciencias Químicas
Carrera de Bioquímica y Farmacia

**Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de
Uncaria tomentosa; *Piper aduncun*; *Artemisa absinthium* frente a *Escherichia
coli* ATCC 25922**

**Trabajo de titulación previo
a la obtención del título de
Bioquímico Farmacéutico**

Autores:

Jonnathan Paul Guayas Guamán C.I. 0105420004

Correo electrónico: jonnathan.guayas94@gmail.com

Patricio Israel Lazo Burga C.I. 1003765094

Correo electrónico: Israel.lazo@outlook.com

Directora:

Dra. Claudia Janneth Carchipulla Sanango

C.I. 0301497780

Cuenca – Ecuador
26 - Febrero - 2020



RESUMEN

Las plantas han sido utilizadas tradicionalmente con fines medicinales y son un recurso valioso para encontrar nuevas moléculas con actividad farmacológica ante afecciones de origen microbiológico, especialmente de tipo bacteriana y que actualmente constituyen un problema de salud pública, principalmente por la resistencia adquirida de los microorganismos a los fármacos usados en su tratamiento habitual y otros factores que contribuyen al surgimiento de cepas resistentes. El objetivo del presente estudio fue la evaluación *in-vitro* de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de las plantas *Uncaria tomentosa* (uña de gato), *Piper aduncum* (matico), y *Artemisa absinthium* (ajeno) frente a la cepa de *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922. Los extractos vegetales fueron obtenidos mediante el método de maceración, usando como solvente el etanol al 96%; se identificaron los principales metabolitos secundarios presentes en los extractos obtenidos mediante reacciones cualitativas específicas para confirmar la presencia de dichos compuestos y posteriormente se evaluó la actividad antibacteriana mediante el método de microdilución en placa estandarizado por: **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100 29th ed.**, para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos alcohólicos frente a *E. coli*. El estudio fue de tipo exploratorio y experimental, obteniéndose los siguientes resultados: *Uncaria tomentosa* presentó una concentración mínima inhibitoria (CMI) a los 625 µg/ml, mientras que para el caso de *Artemisia absinthium* y *Piper aduncum* no se evidenció efecto bactericida, sin embargo, se observó una disminución leve en el crecimiento bacteriano, por lo que podría sugerirse que estas plantas poseen un efecto bacteriostático.

Palabras claves: Actividad antibacteriana. Microdilución. *E. coli*. Maceración. tamizaje fitoquímico. *Uncaria tomentosa*. *Piper aduncum*. *Artemisa absinthium*.



ABSTRACT

The plants have been used traditionally for medicinal purposes and could constitute a valuable resource to find new molecules with pharmacological activity in the face of conditions of microbiological origin, especially with the bacterial type. Those that currently constitute a public health problem, mainly due to the resistance acquired from microorganisms to the drugs used in their usual treatment and other factors that contribute to the emergence of resistant bacteria. The purpose of this research was the *in-vitro* evaluation of the antibacterial activity of ethanol extracts of ethanol plants of *Uncaria tomentosa* (cat's claw), *Piper aduncum* (matico), and *Artemisa absinthium* (wormwood) against the strain of *E Coli* ATCC 25922. The plant extracts were obtained through the maceration method using 96% ethanol as a solvent. The main functional groups present in the extracts obtained were identified by specific qualitative reactions to confirm the species and subsequently, the antibacterial activity was evaluated by the method of microdilution on the plate standardized by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M100 29 to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) of alcoholic extracts against *E. coli*. The research was exploratory and experimental. It shows the following results: *Uncaria tomentosa* had a minimum inhibitory concentration (MIC) at 625 $\mu\text{g/ml}$, while the case of *Artemisia absinthium* and *Piper aduncum* no bactericidal effect was observed; however, a slight decrease was observed in bacterial growth so it could arise to hurt that these plants have a bacteriostatic effect.

Keywords: Antibacterial activity. Microdilution. *E. coli*. Maceration. phytochemical screening. *Uncaria tomentosa*. *Piper aduncum*. *Artemisa absinthium*.



ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 2 |
| ABSTRACT | 3 |
| DEDICATORIA..... | 13 |
| AGRADECIMIENTOS | 15 |
| INTRODUCCIÓN | 17 |
| JUSTIFICACIÓN | 19 |
| OBJETIVOS..... | 19 |
| OBJETIVO GENERAL | 19 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 19 |
| CAPÍTULO I | 20 |
| 1.1 <i>Uncaria tomentosa</i> | 20 |
| 1.2 <i>Piper aduncum</i> | 21 |
| 1.3 <i>Artemisia absinthium</i> | 23 |
| 1.4 Fitomedicina | 25 |
| 1.5 Metabolitos Secundarios..... | 25 |
| 1.5.1 Alcaloides | 25 |
| 1.5.2 Fenoles..... | 26 |
| 1.5.3 Flavonoides | 26 |
| 1.5.4 Catequinas | 27 |
| 1.5.5 Antocianinas | 27 |
| 1.5.6 Triterpenos | 28 |
| 1.5.7 Resinas | 29 |
| 1.5.8 Saponinas | 29 |
| 1.5.9 Lactonas..... | 29 |
| 1.5.10 Cumarinas | 30 |
| 1.5.11 Taninos..... | 30 |
| 1.6 Métodos de Extracción | 31 |
| 1.6.1 Extracción con Fluidos Supercríticos | 31 |
| 1.6.2 Método Soxhlet..... | 31 |
| 1.6.3 Arrastre de Vapor | 32 |
| 1.6.4 Infusión y Decocción..... | 32 |
| 1.6.5 Percolación..... | 32 |
| 1.6.6 Maceración | 32 |
| 1.7 Tamizaje Fitoquímico..... | 34 |



| | |
|---|----|
| 1.8 <i>Escherichia coli</i> -Generalidades..... | 34 |
| 1.9 Ensayos para medir la actividad antibacteriana | 37 |
| CAPÍTULO 2 | 40 |
| METODOLOGÍA | 40 |
| 2.1 Diseño de Investigación..... | 40 |
| 2.2 Análisis experimental..... | 40 |
| 2.2.1 Obtención de muestras..... | 40 |
| 2.2.2 Tratamiento de la Materia Prima..... | 41 |
| 2.2.3 Maceración..... | 41 |
| 2.2.4 Tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos de <i>Uncaria tomentosa</i> , <i>Piper aduncum</i> y <i>Artemisia absinthium</i> | 42 |
| 2.2.5 Preparación de la solución stock de los extractos..... | 42 |
| 2.2.6 Evaluación de la Actividad Antibacteriana <i>in vitro</i> de los extractos etanólicos de <i>Uncaria tomentosa</i> , <i>Piper aduncum</i> y <i>Artemisia absinthium</i> frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922 por el método de Microdilución en Placa | 42 |
| CAPÍTULO 3 | 45 |
| RESULTADOS..... | 45 |
| 3.1 Porcentaje de rendimiento de los extractos vegetales | 45 |
| 3.2 Tamizaje Fitoquímico de <i>Uncaria tomentosa</i> , <i>Piper aduncum</i> y <i>Artemisia absinthium</i> | 46 |
| 3.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de <i>Uncaria tomentosa</i> por el método de microdilución frente a <i>E. coli</i> 25922 | 50 |
| 3.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de <i>Piper aduncum</i> por el método de microdilución frente a <i>E. coli</i> 25922 | 51 |
| 3.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de <i>Artemisia absinthium</i> por el método de microdilución frente a <i>E. coli</i> 25922 | 52 |
| DISCUSIÓN | 53 |
| CONCLUSIONES | 56 |
| RECOMENDACIONES | 57 |
| BIBLIOGRAFÍA | 58 |
| ANEXOS | 67 |



ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Descripción taxonómica de <i>Uncaria tomentosa</i> | 20 |
| Tabla 2. Descripción taxonómica de <i>Piper aduncum</i> | 22 |
| Tabla 3. Descripción taxonómica de <i>Artemisia absinthium</i> | 23 |
| Tabla 4. Ventajas y desventajas de los métodos de extracción..... | 33 |
| Tabla 5. Descripción taxonómica de <i>E. coli</i> | 34 |
| Tabla 6. Variedades de <i>E. coli</i> según sus características y propiedades de virulencia | 36 |
| Tabla 7. Ventajas y desventajas de los diferentes ensayos de actividad antibacteriana. | |
| | 38 |
| Tabla 8. Porcentaje de rendimiento del proceso de maceración del material vegetal. . | 45 |
| Tabla 9. Tamizaje fitoquímico de <i>Uncaria tomentosa</i> | 46 |
| Tabla 10. Tamizaje fitoquímico de <i>Piper aduncum</i> | 47 |
| Tabla 11. Tamizaje fitoquímico de <i>Artemisia absinthium</i> | 48 |
| Tabla 12. Porcentaje de crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 25922 con diferentes concentraciones del extracto de <i>Uncaria tomentosa</i> | 50 |
| Tabla 13. Porcentaje de crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 25922 con diferentes concentraciones del extracto de <i>Piper aduncum</i> | 51 |
| Tabla 14. Porcentaje de crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 25922 con diferentes concentraciones del extracto de <i>Artemisia absinthium</i> | 52 |



ÍNDICE DE IMÁGENES

| | |
|---|----|
| Imagen 1. <i>Uncaria tomentosa</i> . | 20 |
| Imagen 2. <i>Piper aduncum</i> . | 21 |
| Imagen 3. <i>Artemisia absinthium</i> . | 23 |
| Imagen 4. Estructura general de los alcaloides. | 25 |
| Imagen 5. Estructura general de fenoles derivados del ácido cinámico. | 26 |
| Imagen 6. Estructura general de los flavonoides. | 27 |
| Imagen 7. Estructura general de las catequinas. | 27 |
| Imagen 8. Estructura general de las antocianinas. | 28 |
| Imagen 9. Estructura general de los triterpenos. | 28 |
| Imagen 10. Estructura general de las saponinas. | 29 |
| Imagen 11. Estructura general de las Lactonas sesquiterpénicas. | 30 |
| Imagen 12. Estructura general de las Cumáreas. | 30 |
| Imagen 13. Estructura general de los taninos. | 31 |
| Imagen 14. Estructura morfológica de <i>E. coli</i> | 35 |
| Imagen 15. Características macroscópicas de <i>E. coli</i> . | 35 |



ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|---|----|
| Anexo 1. Tratamiento de la materia prima | 67 |
| Anexo 2. Proceso de maceración y agitación con el agitador horizontal “Shaker” | 67 |
| Anexo 3. Esquema del tamizaje fitoquímico a realizar en los extractos etanólicos de las plantas | 67 |
| Anexo 4. Proceso de siembra en placas de microdilución | 69 |
| Anexo 5. Absorbancias obtenidas en el primer ensayo de microdilución con extracto de <i>Uncaria tomentosa</i> | 70 |
| Anexo 6. Absorbancias obtenidas en el segundo ensayo de microdilución con extracto de <i>Uncaria tomentosa</i> | 70 |
| Anexo 7. Absorbancias obtenidas en el tercer ensayo de microdilución con extracto de <i>Uncaria tomentosa</i> | 71 |
| Anexo 8. Absorbancias obtenidas en el primer ensayo de microdilución con extracto de <i>Piper aduncum</i> | 71 |
| Anexo 9. Absorbancias obtenidas en el segundo ensayo de microdilución con extracto de <i>Piper aduncum</i> | 71 |
| Anexo 10. Absorbancias obtenidas en el tercer ensayo de microdilución con extracto de <i>Piper aduncum</i> | 72 |
| Anexo 11. Absorbancias obtenidas en el primer ensayo de microdilución con extracto de <i>Artemisia absinthium</i> | 73 |
| Anexo 12. Absorbancias obtenidas en el segundo ensayo de microdilución ensayo con extracto de <i>Artemisia absinthium</i> | 73 |
| Anexo 13. Absorbancias obtenidas en el tercer ensayo de microdilución con extracto de <i>Artemisia absinthium</i> | 74 |
| Anexo 14. Absorbancias de blancos obtenidas en el ensayo de microdilución. | 74 |



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo Lazo Burga Patricio Israel, autor del trabajo de titulación "Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *Uncaria tomentosa*; *Piper aduncum*; *Artemisa absinthium* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 26 de Febrero de 2020

Lazo Burga Patricio Israel

C.I: 1003765094



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo Guayas Guamán Jonnathan Paul, autor del trabajo de titulación "Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *Uncaria tomentosa*; *Piper aduncum*; *Artemisa absinthium* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 26 de Febrero de 2020

Guayas Guamán Jonnathan Paul

C.I: 0105420004



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Yo Lazo Burga Patricio Israel en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *Uncaria tomentosa*; *Piper aduncum*; *Artemisa absinthium* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 26 de Febrero de 2020

Lazo Burga Patricio Israel

C.I: 1003765094



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Yo Guayas Guamán Jonnathan Paul en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *Uncaria tomentosa*; *Piper aduncum*; *Artemisa absinthium* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 26 de Febrero de 2020

Guayas Guamán Jonnathan Paul

C.I: 0105420004



DEDICATORIA

El presente Trabajo de Titulación va dedicado a mis amados padres: Mauro Guayas y Patricia Guamán, los cuales me han brindado su apoyo incondicional y han hecho posible mi formación académica y sobre todo como ser humano, me han enseñado tantos valores y siempre han estado para ser mi apoyo en las buenas y en las malas, siempre me han impulsado a ser mejor cada día sin olvidarme de la humildad y la cortesía, por esa y mil razones más les dedico este gran paso en mi vida.

También quiero dedicársela a el resto de mi familia quienes de una u otra forma me han brindado su apoyo para poder seguir adelante en mi formación como profesional, a mis amigos y amigas de la universidad por hacer de esta etapa la mejor de mi vida llena de aventuras, risas y sobre todo buenos momentos que vivirán por siempre en mi memoria.

JONNATHAN GUAYAS



DEDICATORIA

Dedico esta tesis:

A mis padres Mercedes Burga y Patricio Lazo quienes me apoyaron todo el tiempo.

A mis hermanos y mi sobrina han estado presentes a lo largo de mi vida.

A mis amigos quienes fueron un gran apoyo emocional durante el transcurso de la carrera.

A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis.

Para ellos es esta dedicatoria de tesis, pues es a ellos a quienes se las debo por su apoyo incondicional.

ISRAEL LAZO



AGRADECIMIENTOS

A mi padre Mauro, quien con su esfuerzo y arduo trabajo ha hecho posible que mi formación académica, siendo ejemplo de padre y ser humano.

A mi madre Patricia, quien con su infinito amor ha sabido sacar adelante y mantener unida a toda mi familia, has sido ejemplo de lucha, perseverancia, paciencia y sobre todo de amor incondicional.

A mis hermanos y sobrinos quienes me han apoyado en mi día a día y han llenado de alegría mi vida con sus locuras y ocurrencias.

Al resto de mi familia quienes han aportado un granito de arena a mi formación, brindándome ayuda y apoyo cuando la necesitaba sin pedirme nada a cambio.

A nuestra directora de tesis Dra. Claudia Carchipulla, quien nos ha formado como profesionales y ha extendió la mano en un momento de necesidad siempre con una sonrisa y con palabras de aliento que nos motivaron a la culminación de este Trabajo de Titulación siendo una guía paciente y bondadosa.

A los distinguidos docentes de la carrera de Bioquímica y Farmacia, quienes han sido los pilares fundamentales en mi formación como profesional ético y responsable.

Finalmente, agradecer a la Dra. Carmen Lucía López, Dra. Lourdes Jerves, Dra. Nancy Cuzco e investigadores del departamento de biociencias quienes contribuyeron a la realización de este Trabajo de Titulación con el uso de sus respectivos equipos y laboratorios.

JONNATHAN GUAYAS



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a mis padres, a mis hermanos y sobrina por el esfuerzo realizado en todos mis años de estudio, así como el apoyo incondicional que me han brindado en cada uno de los problemas suscitados.

A mis amigos de la universidad que han estado en estos años de vida universitaria apoyándonos en cualquier situación.

A la directora de esta tesis, Dra. Claudia Carchipulla por la dedicación y apoyo que ha brindado para que este trabajo se haga posible, así como a los profesores que nos ayudaron y facilitaron con los laboratorios, equipos y reactivos.

ISRAEL LAZO



INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad el ser humano ha utilizado las plantas para fines tanto medicinales, alimenticios y cosméticos. Actualmente algunas plantas son de uso etnofarmacológico, ya que son fuente de información para el descubrimiento de sustancias con posible actividad biológica (Ríos, 2008). Algunas enfermedades infecciosas se producen en respuesta a cambios ecológicos globales, incluyendo aquellas que son consecuencia del desarrollo de las comunidades y uso de la tierra, el comportamiento humano irracional, viajes, comercio internacional, el desarrollo tecnológico e industrial, cambios y adaptaciones bacterianas y a las crisis en las medidas de higiene y saneamiento ambiental (Castillo Pereira, et al, 2017).

Estos cambios y adaptaciones bacterianas han generado resistencia a los antibióticos habituales en algunas cepas bacterianas como *E. coli*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), etc; las cuales según estudios clínicos recopilados tienen facilidad de adquirir mecanismos que inactivan a los antibióticos, por lo cual es considerado un problema de salud a nivel mundial. En la actualidad se observa un incremento marcado de la resistencia de muchas bacterias a la mayoría de antibióticos habitualmente utilizados, incluyendo los de amplio espectro, que existen en el mercado; y la aparición de bacterias multirresistentes así que se prevé que para el año 2050, estos microorganismos provoquen más muertes que cualquier otra enfermedad existente por lo que se han buscado alternativas terapéuticas efectivas, accesibles y seguras para su control (Lázaro, et al, 2006).

El Ecuador, al ser un país mega-biodiverso y de gran variedad climática, presenta abundantes especies de flora con propiedades antibacterianas, pero al no existir estudios adecuados sobre dichos beneficios, son usadas de una manera incorrecta, por lo que se ha propiciado la investigación de nuevas moléculas con propiedades antibacterianas, representando una valiosa herramienta terapéutica en la medicina tradicional, a tal punto, que ha sido de interés para muchos investigadores (Gallegos, 2016). Sin embargo, estas propiedades antibacterianas aún no han sido estudiadas correctamente frente a los agentes etiológicos de las infecciones más frecuentes, como en el caso de *E. coli* que al ser parte de la microbiota humana y en el ecosistema, rompe el equilibrio microbiológico en condiciones favorables volviéndose patógeno y provocando una elevada tasa de morbilidad, por esta razón los productos como las plantas objeto de este estudio son una excelente opción de investigación como posibles fuentes primarias de tratamientos alternativos (Fuentes, et al, 2018).



Actualmente los métodos para determinar las propiedades antibacterianas permiten observar la eficacia o ineficacia de una planta frente a un patógeno, además de ayudar a identificar las estructuras vegetales que presentan dichos efectos farmacológicos. En el presente estudio se ha empleado la técnica de microdilución en placa estandarizada por la Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), documento M100 29th ed; proporcionando una mayor sensibilidad, rapidez y reproducibilidad en sus resultados, dando una metodología ideal para el estudio de las propiedades medicinales de las plantas como inhibidoras del crecimiento bacteriano.



JUSTIFICACIÓN

***Escherichia coli* es uno de los patógenos de mayor interés clínico, ya que, al ser un agente etiológico encontrado en infecciones bacterianas frecuentes, además de poseer la capacidad para desarrollar resistencia frente a algunos fármacos usados en su tratamiento, constituye un problema de salud pública a nivel mundial, (Maya, 2016). Esta investigación analiza el potencial efecto antibacteriano de los extractos alcohólicos de *Uncaria tomentosa*, *Piper aduncum*, *Artemisa absinthium*, para determinar y establecer la concentración mínima inhibitoria frente a *E. coli* cepa ATCC 25922, por el método de microdilución en caldo que al ser una técnica estandarizada por un organismo internacional permite optimizar tiempo y recursos tanto humanos como materiales.**

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de las plantas de *Uncaria tomentosa*; *Piper aduncum*; *Artemisa absinthium* frente a *E. coli* ATCC 25922

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Realizar la extracción de principios activos de *Uncaria tomentosa*; *Piper aduncum*; *Artemisa absinthium* por el método de maceración usando como solvente etanol 96%

Identificar los principales metabolitos secundarios presentes en los extractos vegetales usando reacciones cualitativas específicas



CAPÍTULO I

1.1 *Uncaria tomentosa*

Imagen 1. *Uncaria tomentosa*.



Fuente: Los autores.

La descripción taxonómica de *Uncaria tomentosa* se detalla en la tabla 1.

Tabla 1. Descripción taxonómica de *Uncaria tomentosa*.

| | |
|---------------------|------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Gentianales |
| Familia | Rubiaceae |
| Genero | <i>Uncaria</i> |
| Especie | <i>Tomentosa</i> |
| Nombre común | Uña de gato |

Fuente: Los autores/ (Obregón, 2004; Domínguez, 2010).



Uncaria tomentosa se presenta como un arbusto trepador de hasta 20m de altura, posee tallos en forma cuadrangular, tiene cerca del ápice espinas ganchudas, leñosas y macizas de 2cm de largo que se dirigen hacia abajo, las hojas se presentan de forma oblonga o elíptica, la inflorescencia se encuentra compuesta por racimos. La corteza presenta una textura fibrosa, ligeramente pulverulenta de color oro, la cosecha de la corteza se debe realizar a partir de la edad de 4 años (Obregón, 2004; Domínguez, 2010; Cárdenas, 2004)

Se encuentra en la amazonia ecuatoriana y se pueden identificar al menos 60 especies del genero *Uncaria* que se distribuyen principalmente en Colombia, Perú, Bolivia y Ecuador, presentes en bosques con abundante luz solar a una altura de 400 a 800 m s.n.m (Obregón, 2004; Domínguez, 2010).

En su estructura química *Uncaria tomentosa* presenta metabolitos secundarios como: compuestos polifenólicos, flavonoides, glucósidos del ácido quinovico (triterpenos polioxigenados), esteroides, compuestos del isopentano, siendo sus componentes con mayor actividad antimicrobiana los alcaloides que se encuentran como sales de ácidos orgánicos (especiofilina, uncarina F, mitrafilina, entre otros) y los glucósidos (Vásquez, 2018; Domínguez, 2010; Cárdenas, 2004).

Como propiedades farmacológicas presenta: glucósidos del ácido quinovico o triterpenos polioxigenados cuyas funciones son tanto antiinflamatorias como antivirales (mayormente a virus de ARN encapsulados) (Obregón, 2004; Domínguez, 2010).

Rizzi y Cols en el año 1992 realizaron estudios genotóxicos *in vivo* e *in vitro* sobre la actividad antitumoral, en donde se evidenció probable efecto citotóxico, y antimutagénico. Los extractos hidroalcohólicos han presentado efectos antibacterianos contra *S. aureus*, *E. coli*, siendo ineficaz para otras bacterias como *Fusobacterium nucleatum*. (Obregón, 2004)

1.2 *Piper aduncum*

Imagen 2. *Piper aduncum*.



Fuente: Los autores.

La descripción taxonómica de *Piper aduncum* se detalla en la tabla 2.

Tabla 2. Descripción taxonómica de *Piper aduncum*.

| | |
|---------------------|---------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Piperales |
| Familia | Piperaceae |
| Genero | Piper |
| Especie | Aduncum |
| Nombre común | Matico |

Fuente: Los autores/ (Mendoza, 2019).

Se encuentra en forma de un arbusto perenne que puede alcanzar los 5 metros de altura. Su tallo tiene constitución leñosa, ramificado presentando un color gris pálido a verde, la materia prima a utilizarse son las hojas que presentan una forma alterna y pecioladas, simples con 5 nervaduras. Inflorescencia axial o terminal en espigas de 15 centímetros con flores pequeñas e imperceptibles a la vista. (Mendoza, 2019; Zuta,2014)



Su presenta en la sierra ecuatoriana refiriéndose a la especie *aduncum*, ya que existen diversas especies por toda la región andina de América del sur. Crece entre matorrales, caminos y plantaciones de la región interandina (Mendoza, 2019; Zuta,2014)

Piper aduncum contiene metabolitos secundarios como flavonoides (la queracetina), taninos, saponinas, alcaloides, glucósidos, cumarinas, triterpenos, esteroides, compuestos grasos, fenoles y resinas. Siendo de mayor importancia farmacológica los taninos que se encuentran en una concentración alrededor del 6% (Mendoza, 2019; Zuta,2014).

Las hojas preparadas por el método de infusión son útiles para tratar diarrea, disenterías, náuseas, inflamación, ulceras, trastornos hemorrágicos, además de infecciones bacterianas y fúngicas. Estudios realizados por Mendoza M. en el 2019 dice: “*Piper aduncum* presenta actividad antibacteriana frente a *S. aureus* cepa ATCC 25923”. Diversas propiedades como cicatrizantes y antiulcerantes son atribuidos a la gran cantidad de taninos presentes en las hojas, además de su cantidad de saponinas y el efecto antioxidante, antisecretor y citoprotector a los flavonoides presentes (Mendoza, 2019).

1.3 *Artemisia absinthium*

Imagen 3.*Artemisia absinthium*.



Fuente: Los autores.

La descripción taxonómica de *Artemisia absinthium* se detalla en la tabla 3.

Tabla 3. Descripción taxonómica de *Artemisia absinthium*.



| | |
|---------------------|-------------------|
| Reino | Plantae |
| División | Magnoliophyta |
| Clase | Magnoliopsida |
| Orden | Asterales |
| Familia | Asteraceae |
| Genero | <i>Artemisa</i> |
| Especie | <i>Absinthium</i> |
| Nombre común | Ajenjo |

Fuente: Los autores/ (Quispe, 2011).

Se encuentra como hierba perene de hasta 1m de altura, cubierta con vellosidades de color plata, presenta un tallo erecto y ramificado, flores en forma de cabezuela hemisférica distribuidas a lo largo del tallo, como materia prima se utiliza sus hojas que presentan características como: pinadas, alternas de 5 a 7 cm de largo, divididas en 2 partes triangulares (Quispe, 2011; Valverde, 2015)

Presente en la sierra ecuatoriana, se originó del viejo mundo, pero es cultivada en ambos hemisferios soportando hasta una altura de 4000 m.s.n.m., su ecosistema óptimo se encuentra en el clima templado (Quispe, 2011; Valverde, 2015).

Artemisa absinthium presenta en su composición fitoquímica diversos componentes como son: lactonas sesquiterpénicas o monoterpénicas (tuyona, acetato de trans-sabánico, entre otros), además presenta flavonoides, ácidos fenoles (cafeíco) y taninos (Quispe, 2011; Valverde, 2015).

Su principal uso se basa en las propiedades medicinales en afecciones gastrointestinales (cólico, diarrea, disenterías, gases), presenta también efectos antimicrobianos y antiinflamatorios y cicatrizantes. Posee un efecto anti-espasmódico del cual son responsables los alcaloides y taninos; a las lactonas sesquiterpénicas se les atribuye la capacidad antibacteriana y antiinflamatoria (Quispe, 2011; Valverde, 2015).



1.4 Fitomedicina

La Organización Mundial de la Salud (OMS) la define como “La aplicación de principios activos vegetales para el tratamiento de enfermedades, basado en evidencia científica” (OMS, 2014). La fitomedicina ha sentado las bases para la farmacología y terapéutica moderna a través de estudios clínicos pertinentes aprobados por la comunidad científica (Andrade, 2017).

En la fitomedicina se combina los conocimientos etnobotánicos ancestrales con los conocimientos farmacológicos modernos, de esta forma se consigue el uso racional, seguro y eficaz de las plantas en la medicina moderna con la aprobación de la comunidad científica actual. Además, es importante mencionar que aproximadamente el 30% de los fármacos actualmente comercializados mundialmente, son parcial o totalmente derivados de plantas (Chateauneuf, 2017).

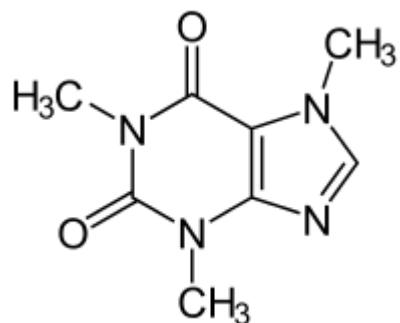
La medicina tradicional, tiene un lugar muy importante en las culturas que habitan los espacios comprendidos por América Latina y particularmente la República del Ecuador, pese al menosprecio que la población mestiza dominante ha demostrado hacia estas culturas y sus tradiciones (Ramírez, 2018). Según datos estadísticos, del total de la población ecuatoriana, el 43% tuvo alguna clase de problema de salud de los cuales solo el 37% utilizó un servicio de salud mientras que el 48% optó por la auto-medicación y se cree que la mayoría de estas personas optaron por el uso de plantas medicinales. Además, la OMS afirma que más del 80% de la población mundial, utiliza la medicina tradicional de alguna forma para tratar su padecimiento a nivel primario (Lozano, 2019).

1.5 Metabolitos Secundarios

1.5.1 Alcaloides

Son compuestos con estructura heterocíclica que presentan nitrógeno conformando su anillo el cual les da características básicas del cual deriva su nombre. Son derivados de aminoácidos y tienen un sabor amargo; se localizan en los tejidos periféricos de las plantas en forma de sales de ácidos orgánicos y su función en la planta no es del todo conocida, pero se cree que cumple función protectora contra invasores externos (Jaramillo, 2016). Son prácticamente insolubles en agua, solubles en sustancias orgánicas como éter, metanol, etanol, cloroformo, hexano, etc. (Bruneton, 2005). La actividad biológica no es conocida totalmente, pero se cree que tiene acción antimicrobiana mediante intercalación entre la pared celular y el ADN microbiano (Nunez, 2018).

Imagen 4. Estructura general de los alcaloides.

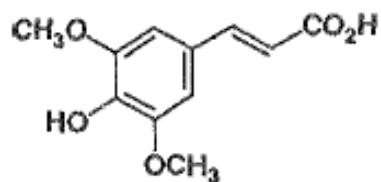


Fuente: (Bruneton, 2005).

1.5.2 Fenoles

Son un amplio grupo de compuestos orgánicos derivados principalmente de los ácidos benzoico y cinámico que tienen al menos una función carboxílica y un hidroxilo fenólico. Los fenoles simples (por ejemplo: catecol, guayacol) son escasos en la naturaleza, mientras que los derivados del ácido benzoico (por ejemplo: ácido gálico) son más frecuentes en la mayoría de las plantas tanto en su forma libre como en forma de ésteres o de heterósidos (Cardeño, 2007). Son solubles en solventes orgánicos polares, disoluciones de hidróxido de sodio y carbonato de sodio; también son solubles en agua y alcoholes como etanol y metanol (Bruneton, 2005). Las propiedades farmacológicas de los fenoles simples son de poco interés terapéutico pues se les atribuyen propiedades antisépticas, el mayor uso que se les ha dado son de antiinflamatorios a los derivados salicílicos. Los ésteres heterósidos presentan gran interés terapéutico, pues se les ha atribuido propiedades inhibidoras de enzimas como la fosfodiesterasa, aldosa reductasa, y la 5-lipooxigenasa (Gordo, 2018).

Imagen 5. Estructura general de fenoles derivados del ácido cinámico.



Fuente: (Bruneton, 2005).

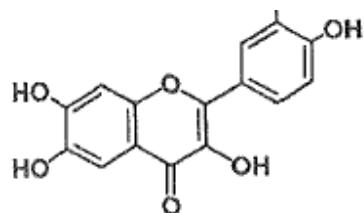
1.5.3 Flavonoides

Son compuestos polifenólicos formados por 2 anillos bencénicos unidos por una cadena lineal de 3 carbonos. En las plantas cumplen la función de ser pigmentos, existe muchos tipos de flavonoides, cada uno otorga un color diferente a la planta, y se encuentran



principalmente en flores, frutos y hojas (Iwashina, 2000). Son poco solubles en agua, solubles en solventes orgánicos apolares, etanol, metanol, diclorometano, etc. (Bruneton, 2005). Se les atribuye propiedades farmacológicas como vasoactivas, es decir, son capaces de disminuir la permeabilidad de capilares sanguíneos y aumentar su resistencia, también se les atribuye propiedades antioxidantes y antimicrobianas, aunque su mecanismo de acción no es conocido (Bratkov, 2016).

Imagen 6. Estructura general de los flavonoides.

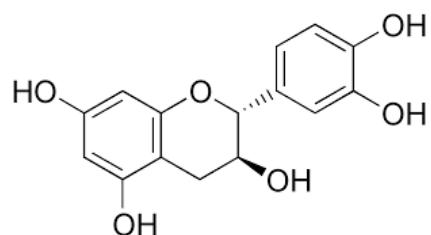


Fuente: (Bruneton, 2005).

1.5.4 Catequinas

Son compuestos polifenólicos pertenecientes al grupo de los flavonoides, específicamente a los flavan-3-oles, aunque sus propiedades físicas y biológicas presentan similitud al de los flavonoides en general (Tzekov, 2018).

Imagen 7. Estructura general de las catequinas.



Fuente: (Bruneton, 2005).

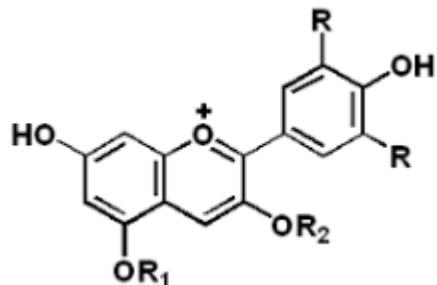
1.5.5 Antocianinas

Son compuestos polifenólicos que en su estructura tienen un glúcido, se encuentran distribuidos en todas las plantas y cumplen la función de ser colorantes y protectores contra la luz ultravioleta, se los encuentra en todos los tejidos, especialmente en hojas, tallos y frutos (Liang, 2018). Son solubles en alcoholes como metanol y etanol, también solubles en agua y su solubilidad en esta aumenta con la temperatura (Bruneton, 2005). Su mayor interés está en su potencial antioxidante contra las especies reactivas del



oxígeno, aunque no se tiene suficiente evidencia, también se les ha atribuido propiedades vaso-activas y antiinflamatorias (Ballistreri, 2019).

Imagen 8. Estructura general de las antocianinas.

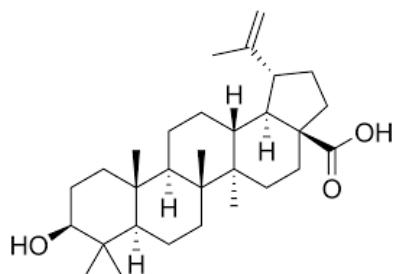


Fuente: (Bruneton, 2005).

1.5.6 Triterpenos

Son un grupo de compuestos químicos con estructura esteroidal, los triterpenos presentan una similitud estructural con los esteroides vegetales. En este grupo se incluyen moléculas como los heterósidos cardiotónicos, saponinas, saponósidos (Ghosh, 2016). Son solubles en solventes orgánicos polares como hexano, triclorometano, éter; poco solubles en alcoholes y prácticamente insolubles en agua (Bruneton, 2005). Los compuestos de mayor importancia son los heterósidos cardiotónicos debido a que ningún producto sintético ha podido reemplazar a los derivados de las plantas; moléculas como el regaliz son usados como edulcorantes hipocalóricos, tienen gran potencial terapéutico en campos como: antivirales; citostáticos, antiinflamatorios y analgésicos (Bahrami, 2016).

Imagen 9. Estructura general de los triterpenos.



Fuente: (Cano-Flores, 2013).



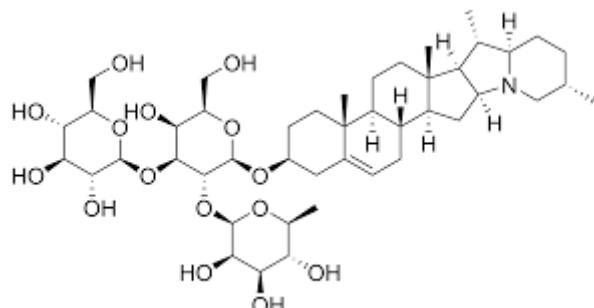
1.5.7 Resinas

Las resinas son compuestos complejos que normalmente son exudados por las plantas, cumplen función protectora y estructural en la planta; prácticamente no tienen actividad biológica y se caracterizan por su gran hidrofobicidad (Bruneton, 2005).

1.5.8 Saponinas

Son moléculas derivados de los esteroides la cual tiene además un radical glucósido, se llaman así debido a sus propiedades que se asemejan a las del jabón común En la planta cumplen la función de defensa contra microorganismos, especialmente de origen fúngico (Khakimov, 2016). Son solubles en agua la cual se ve aumentada con la temperatura, aunque son susceptibles a hidrólisis es por ello que se pueden extraer con etanol o metanol (Bruneton, 2005). Se caracterizan principalmente por ser hemolíticos, debido a su interacción con los esteroles de la membrana del eritrocito lo cual produce un aumento en su permeabilidad y una entrada de sodio y agua, el potasio sale y la célula “explota” (Zhu, 2018).

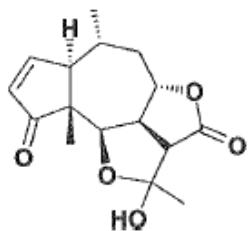
Imagen 10. Estructura general de las saponinas.



Fuente: (Cano-Flores, 2013).

1.5.9 Lactonas

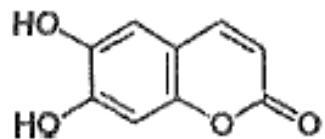
En las plantas, las lactonas son compuestos derivados de los sesquiterpenos los cuales han sufrido una reacción de ciclación. Se encuentran principalmente en pelos secretores situados en las hojas, tallos y raíces (Zhang, 2019). No existe un solvente específico para su extracción, aunque se pueden extraer con solventes orgánicos polares como diclorometano, o mezclas como éter dietílico-éter de petróleo-metanol (Bruneton, 2005). Al poseer potencial de reactividad ha llevado a que plantas con alto contenido de lactonas sesquiterpénicas sean usadas como antiparasitarios, antifúngicos y antibacterianos, no obstante, hay que tener en cuenta que estos metabolitos son tóxicos también para el ser humano (Molina, 2018).

**Imagen 11.** Estructura general de las lactonas sesquiterpénicas.

Fuente: (Bruneton, 2005).

1.5.10 Cumarinas

Son un muy amplio grupo de compuestos químicos derivados del ácido cinámico y el fenilpropano. Se encuentran distribuidas de manera casi universal en las plantas, especialmente las cumarinas más simples (umbeliferona, demetilsuberrosina, etc.) (Stringlis, 2019). Son poco solubles en agua, solubles en alcoholes, solventes orgánicos como dióxido de etilo y en solventes clorados como el cloroformo (Bruneton, 2005). El interés terapéutico de las cumarinas es limitado, pues se usan principalmente como venotónicos y vasoprotectores. También se ha reportado un efecto anti-protozoario frente a especies de *Trypanosoma* (Mandlik, et al, 2016).

Imagen 12. Estructura general de las Cumarinas.

Fuente: (Cano-Flores, 2013).

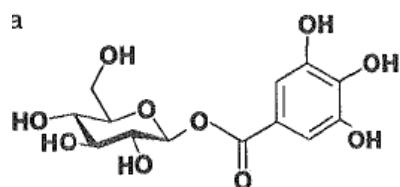
1.5.11 Taninos

Son compuestos polifenólicos derivados del ácido gálico formando ésteres con un azúcar, se encuentran en la mayoría de plantas cumpliendo la función de protectora



contra microorganismos invasores (Ropiak, et al, 2016). Solubles en agua formando coloides, también en alcoholes y acetona; aunque idealmente se extraen con mezclas de agua y acetona (Bruneton, 2005). El interés terapéutico de estos compuestos se debe principalmente a su capacidad de formar complejos con macro-moléculas, especialmente proteínas lo cual le otorga propiedades antimicrobianas, antivirales e inhibidores enzimáticos. También se han usado como antioxidantes evitando especialmente la peroxidación lipídica (Tuominen, A. 2017).

Imagen 13. Estructura general de los taninos.



Fuente: (Bruneton, 2005).

1.6 Métodos de Extracción

Tienen por objetivo extraer total o parcialmente los componentes biológicamente activos a partir de material vegetal o animal, mediante el empleo de solventes adecuados (menstruos). Estos son procesos dinámicos que comprende 3 etapas:

- Difusión del solvente al interior de la célula.
- Solubilización de los componentes activos en el solvente.
- Difusión del solvente y los metabolitos fuera de la célula (Yi, 2016).

1.6.1 Extracción con Fluidos Supercríticos

Es un método que extrae los componentes biológicamente activos empleando sustancias con un punto supercrítico bajo, este punto se logra a una presión y temperatura determinadas en el que la sustancia se encuentre en estado líquido y gaseoso al mismo tiempo. La sustancia más empleada en este método es el CO₂ debido a su baja toxicidad tanto para el humano como para el ambiente, baja inflamabilidad, corrosividad, inactividad química, baja temperatura y presión supercrítica, y disponibilidad comercial (Da Silva, 2016).

1.6.2 Método Soxhlet

Es un procedimiento que se basa en la diferencia de los puntos de ebullición entre el solvente y los metabolitos extraídos, se emplea un solvente orgánico con temperatura de ebullición relativamente baja (comúnmente éter), este solvente se evapora y



condensa continuamente entrando en contacto con la droga vegetal varias veces dando así una extracción continua (Mohammadpour, 2019).

1.6.3 Arrastre de Vapor

Es una técnica que emplea vapor de agua como solvente, este método se usa comúnmente para la extracción de aceites esenciales; el vapor de agua arrastra los aceites esenciales hacia un tubo recolector en el que se separa el agua del aceite por diferencia de densidades y posteriormente se deshidrata el aceite empleando sulfato de sodio anhídrico (González-Marrugo, 2018).

1.6.4 Infusión y Decocción

Se basan en la extracción de metabolitos secundarios solubles en agua usando la temperatura como coadyuvante de la extracción, en la infusión se aplica el agua caliente sobre el material vegetal y se deja reposar por un periodo corto de tiempo mientras que en la decocción se lleva a ebullición el agua conjuntamente con el material vegetal y se mantiene la ebullición por 30 minutos aproximadamente y se deja enfriar. Ambos procesos finalizan con la tamización de los extractos para separar el material vegetal del extracto (Carrión, 2010).

1.6.5 Percolación

Es un procedimiento basado en la continua exposición de la droga vegetal con el solvente debido a la renovación continua hasta obtener un agotamiento de aproximadamente el 95% de los metabolitos. En este método, el solvente pasa a través de la droga en un solo sentido alcanzando concentraciones cada vez mayores de manera que el equilibrio del solvente dentro y fuera de la célula vegetal nunca se alcanza por lo que la droga al estar en contacto siempre con solvente puro, termina cediendo sus componentes solubles de manera progresiva (Stauffer, 2018).

1.6.6 Maceración

Es uno de los métodos más comúnmente empleados para la extracción de principios activos de plantas que se basa en el contacto continuo entre el material vegetal y una cantidad constante de solvente ayudados por la agitación durante periodos muy largos que van desde los 4 hasta los 10 días (5 días en promedio). Este método se realiza a temperatura ambiente y finalizado el macerado se procede a la separación del material vegetal y el extracto mediante la decantación y posterior filtración para finalmente proceder con la evaporación del solvente a una temperatura promedio de 40°C para evitar daños provocados por la temperatura a compuestos termolábiles (Ćujić, 2016).



En este procedimiento hay que tener en cuenta que se puede perder cierta cantidad del solvente durante el proceso, para evitar esto se debe emplear frascos adecuadas que tengan una tapa hermética y en caso de no tener disponibilidad de estos frascos se cubre el envase con una película de parafilm o papel aluminio. También se debe tomar en cuenta la sensibilidad a la luz de los principios activos de interés, para ellos se usan frascos color ámbar o también se debe cubrir totalmente el frasco con papel aluminio (Carrión, 2010).

Cada método de extracción tiene ventajas y desventajas según como se observan en la Tabla 4. La selección del método de extracción dependerá de la investigación y del tipo de principios activos de interés.

Tabla 4. Ventajas y desventajas de los métodos de extracción.

| Método de Extracción | Ventajas | Desventajas |
|-----------------------|--|---|
| Fluidos Supercríticos | Extracción total, sin contaminación, metabolitos químicamente puros | Costo elevado |
| Soxhlet | Extracción total y semiautomática, uso de poco solvente | Uso de equipo sofisticado No aplica para compuestos termolábiles. |
| Arrastre de Vapor | Extracción casi total de principios activos, costo relativamente bajo | Sirve únicamente para compuestos hidrosolubles y termoestables. |
| Infusión y Decocción | Bajo costo, fácil acceso. | |
| Percolación | Agotamiento total de la droga, bajo costo, no se satura el solvente. | Uso de grandes cantidades de solvente. Renovación constante del solvente por parte del investigador |
| Maceración | Bajo costo, fácil acceso, condiciones ambientales de ejecución accesibles, | Extracción parcial del principio activo, saturación del solvente, largo tiempo de ejecución |



| | | |
|--|--|--|
| | aplicación en material vegetal duro (tallos, raíces) | |
|--|--|--|

Fuente: Los autores/ (Carrión, 2016).

1.7 Tamizaje Fitoquímico

Se realiza a un extracto vegetal, con el objetivo de identificar cualitativamente los principales metabolitos secundarios presentes en el extracto mediante el uso de reacciones cualitativas específicas para cada metabolito produciendo un cambio de color o la formación de un precipitado que se puede apreciar a simple vista. Se asumirá la presencia o ausencia de cada metabolito de acuerdo al resultado de cada reacción y su intensidad se expresa en cruces (Hussein, 2016).

1.8 *Escherichia coli*-Generalidades

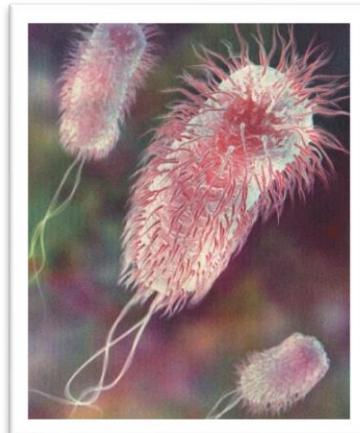
E. coli es una de las especies bacteriana que ha sido objeto de numerosos estudios de diferente naturaleza, ya que cuenta con diversas capacidades patogénicas, además de ser utilizado como fuente para investigaciones metabólicas, poblacionales y genéticas (Ríos, 2016). Las características taxonómicas se detallan en la tabla 5.

Tabla 5. Descripción taxonómica de *E. coli*.

| | |
|----------------|---------------------|
| Dominio | Bacteria |
| Filo | Proteobacteria |
| Clase | Gammaproteobacteria |
| Orden | Enterobacteriales |
| Familia | Enterobacteriaceae |
| Género | <i>Escherichia</i> |
| Especie | <i>coli</i> |

Fuente: Los autores/ (Ríos, 2016)

Se encuentra en forma de bacilo Gram negativo, de rápido crecimiento que mide alrededor de 1 a 3 µm longitud. Se puede presentar solo, en pares o formando grupos, Tiene movilidad gracias a sus flagelos peritricos, aunque existen variantes que no la presentan ya que no contienen flagelos. Es una bacteria no formadora de esporas, además de no poseer cápsula (Jawetz, 2014; Lizcano, 2011).

**Imagen 14.** Estructura morfológica de *E. coli***Fuente:** (Andrade, 2016)

En estadios tempranos de crecimiento este microorganismo se encuentra frecuentemente en forma de cocobacilo, es aerobio y anaerobio facultativo, presenta una temperatura de crecimiento optima de 37°C, resistiendo temperaturas hasta de 40°C lo que lo distingue de otras enterobacterias. Su pH óptimo de crecimiento es de 7. (Jawetz, 2014; Lizcano, 2011).

En cuanto a su macroscopía, se observan en agar sangre colonias circulares de 3 a 5 mm de diámetro, convexas, de borde continuo o también ligeramente onduladas de consistencia mucoide, brillantes con una coloración blanca amarillenta (Jawetz, 2014; Lizcano, 2011).

En el medio eosina-azul de metileno (EMB) sus colonias presentan una coloración característica oscura con un centro rosado, además de tener un brillo metálico cuando se observan en luz reflejada, sin embargo, dicho brillo no es exclusivo de *E. coli* ya que especies como *Klebsiela spp.* y *Citrobacter spp.* también pueden presentar dicha característica. (Jawetz, 2014; Lizcano, 2011).

En agar Mac Conkey sus colonias presentan coloración rojiza con turbiedad en sus bordes. Estas características se observan claramente en la imagen 14. (Jawetz, 2014; Lizcano, 2011).

Imagen 15. Características macroscópicas de *E. coli*.



| | | |
|--|--|---|
| | | |
| a) Se observa colonias grises redondas en agar sangre. | b) Se observa colonias con irradiancia en EMB. | c) Colonias rosas fermentadoras de lactosa en agar MacConkey. |

Fuente: Los autores/ (Reyes, 2011).

Al ser fermentadores de carbohidratos como la glucosa, arabinosa y lactosa producen gas a partir de estos; *E. coli* es capaz de catabolizar el triptófano formando indol, no hidroliza el citrato, es productora de ácido sulfídrico en medios que contienen azufre pudiéndose combinar con hierro presente en el medio formando sulfuro de hierro proporcionando una coloración negruzca; también produce amoníaco a partir de la urea debido a que posee la enzima ureasa alcalinizando al medio (Jawetz, 2014; Lizcano, 2011).

Patogenia

E. coli produce enfermedades a nivel de: vías urinarias (IVUs) constituyendo cerca del 90% en mujeres jóvenes, presentando signos y síntomas como polaquiuria, disuria, hematuria y piuria, cabe recalcar que estas manifestaciones clínicas no son específicas para IVUs causadas por *E. coli*, ya que infecciones con otros microorganismos pueden producir sintomatología similar. Es responsable de septicemias e infecciones en el sistema digestivo pudiendo clasificarse esta última en base a sus características y propiedades de virulencia detalladas en la tabla 6. (Jawetz, 2014)

Tabla 6. Variedades de *E. coli* según sus características y propiedades de virulencia.

| Variedades | Características y propiedades de virulencia |
|--------------------------------------|--|
| <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC) | Productora de diarrea en lactantes. Se adhiere a las paredes de la mucosa del intestino delgado por medio de dos factores que son: factor de adherencia EPEC y el islote de |



| | |
|--|---|
| | patogenia del locus cromosómico de borramiento del enterocito. |
| <i>E. coli</i> enterotoxigenica (ETEC) | Causa frecuente de diarrea del viajero ya que presentan una de las 2 toxinas existentes como son la exotoxina termolábil o la enterotoxina termoestable. |
| <i>E. coli</i> productora de toxina Shiga (STEC) | Relacionada con la colitis hemorrágica y síndrome hemolítico urémico, presenta dos tipos de toxinas la Shiga 1 y la Shiga 2. |
| <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EJEC) | Produce una enfermedad similar a la shigelosis (ulceras superficiales y necrosis de la mucosas), este microorganismo actúa al unirse a la mucosa del intestino delgado. |
| <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC) | Produce diarrea aguda y crónica de duración mayor a 14 días, este grupo al ser muy heterogéneo no se han descifrado sus mecanismos exactos de patogenia. |

Fuente: Los autores/ (Jawetz, 2014; Lizcano, 2011).

En relación a los serotipos *E. coli* se puede clasificar en más de 170 serogrupos “O” según las características antigénicas de sus lipopolisacáridos, y en serotipos por la combinación de antígenos “O” y “H” flagelares, presenta otros tipos de antígenos en diversas cepas como: capsulares y fimbriados, que han sido utilizados para su clasificación e identificación (Ríos, 2016).

1.9 Ensayos para medir la actividad antibacteriana

Permiten la determinación de las propiedades antibacterianas de compuestos a investigar. Estos estudios son de gran importancia tanto a nivel tecnológico como científico, ya que un gran número de extractos vegetales de diferentes familias presentan dicha propiedad gracias a que poseen metabolitos secundarios principalmente los alcaloides, aceites, saponinas, taninos y flavonoides (Ríos, 2016).

Existen diversos métodos para la determinación de la actividad antibacteriana de los cuales los más empleados son: dilución en caldo o agar y difusión en agar



Dilución en caldo

Este método consiste en la preparación de una serie de tubos o pocillos que contendrá una cantidad de caldo a la cual se le agregará distintas concentraciones del antibacteriano a investigar, posteriormente se inoculará con una suspensión estandarizada del microorganismo a estudiar, posterior a la incubación nos permitirá determinar el crecimiento bacteriano mediante lectura por turbidimetría. (Ríos, 2016; Peláez, 2010; Sanchez, 2010). Esta técnica es utilizada para la determinación de la concentración mínima bactericida (MBC) y concentración mínima inhibitoria (MIC) (Peláez, 2010)

Macrodilución

De acuerdo a lo mencionado anteriormente este método es utilizado para determinar la MIC por medio de la observación directa sin ayuda de ningún aparato óptico. Para este método es necesario tubos de dilución con contenido mínimo de 1ml y un medio líquido específico (Ríos, 2016; Peláez, 2010; Sánchez, 2010).

Microdilución

Este ensayo se realiza mediante placas de poliestireno que contienen 96 pocillos de 12 x 8, en donde una columna es utilizada como control de esterilidad (solo medio de cultivo), una columna de control de crecimiento (medio de cultivo + inoculo bacteriano) y los pocillos restantes son utilizados para realizar las diluciones del antibacteriano a investigar (Peláez, 2010; Sánchez, 2010).

Para la lectura de resultados existen dos maneras por medio de un autoanalizador (turbidimetría o fluorescencia) (Sánchez, 2010); así mismo existen ventajas y desventajas de los diferentes métodos los cuales se encuentran detallados en la tabla 7.

Tabla 7. Ventajas y desventajas de los diferentes ensayos de actividad antibacteriana.

| Ensayo | Ventajas | Desventajas |
|--------------------------|---|---|
| Difusión en disco | Los valores se expresan en sensibilidad, resistencia o intermedia. Facilidad de ejecución. | No permite determinar la MIC. Baja sensibilidad. |



| | | |
|----------------------|---|---|
| | Económico. | |
| Microdilución | Trabajar con un gran número de muestras Resultados más rápidos Estandarización y reproducibilidad de resultados. Trabaja con pequeñas cantidades del antibacteriano y medios de cultivo. Mayor sensibilidad a diferencia de otros métodos | Paneles vienen determinados por el fabricante. Discrepancias con los métodos convencionales. Costos elevados en equipos y materiales. |
| Macrodilución | Posibilidad de obtener un cultivo estandarizado de la mayoría de las bacterias. Reproducibilidad de resultados. | Cantidad de material requerido. |

Fuente: Los autores/ (Sánchez, 2010; Ramirez, 2019).



CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA

2.1 Diseño de Investigación

El presente estudio se basó en una investigación de tipo exploratoria y experimental.

Se determinaron los metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos, obtenidos por el método de maceración de las plantas *Uncaria tomentosa*, *Piper aduncum*, *Artemisa absinthium* y posteriormente se estableció la actividad antibacteriana frente a *E. coli* ATCC 25922, a través de la determinación de la concentración mínima inhibitoria utilizando el método de microdilución en caldo.

2.2 Análisis experimental

2.2.1 Obtención de muestras

Para el presente estudio se trabajó con las hojas de *Piper aduncum* y *Artemisa absinthium* y con la corteza de *Uncaria tomentosa*, las cuales fueron adquiridas en el Mercado “10 de Agosto” de la ciudad de Cuenca ubicado en la calle Larga y General Torres; en una sola ocasión y de un único proveedor.

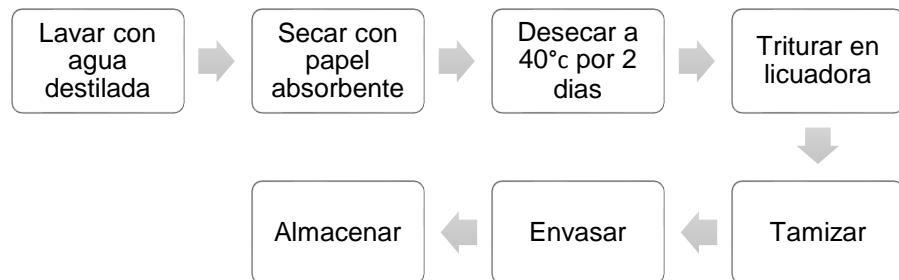
Para la recolección del material vegetal se procedió según las normativas de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) (Santa Fe, 2005), las partes de la planta a recolectarse no deben poseer daños en su integridad física, provocados por calor, insectos, hongos, entre otros, además de presentar sus características específicas como: textura, color y forma; estas plantas fueron elegidas por su actividad antibacteriana frente a *E. coli* según revisión de múltiples fuentes bibliográficas.



2.2.2 Tratamiento de la Materia Prima

Se preparó la materia prima según detalla el esquema 1 (anexo 1).

Esquema 1. Tratamiento del material vegetal.



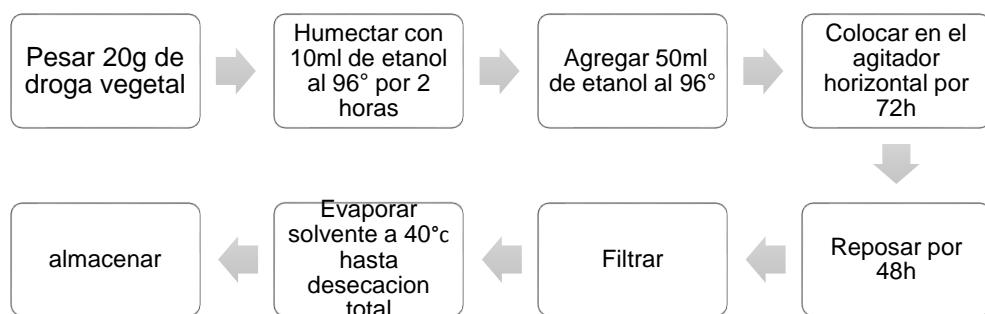
Fuente: Los autores/ (Santa Fe, 2005).

En el caso de *Uncaria tomentosa* se realizó una desecación de la corteza por 4 días debido a la constitución de dicha estructura.

2.2.3 Maceración.

Se procedió a la obtención de los extractos etanólicos por el método de maceración trabajando según el esquema (anexo 2).

Esquema 2. Proceso de maceración de la droga vegetal.



Fuente: Los autores/ (Carrión, 2010; Ordoñez, 2016).

Porcentaje de rendimiento: se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ rendimiento} = \frac{\text{peso del vaso con el extracto seco (g)} - \text{peso vaso vacío (g)}}{\text{Cantidad de droga fresca (g)}} * 100$$



2.2.4 Tamizaje fitoquímico de los extractos etanólicos de *Uncaria tomentosa*, *Piper aduncum* y *Artemisia absinthium*

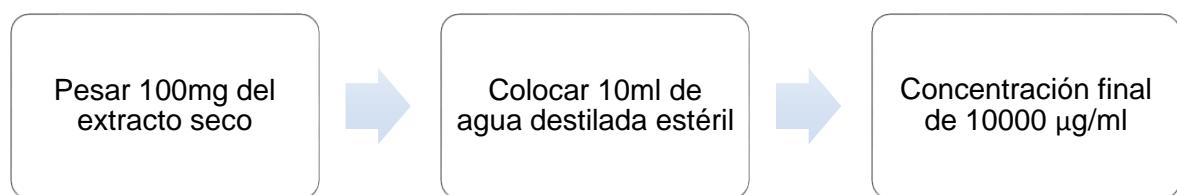
Se realizó el tamizaje fitoquímico para identificar los principales metabolitos secundarios presentes en los extractos etanólicos de las diferentes plantas medicinales mediante reacciones cualitativas específicas para cada metabolito secundario, interpretando los resultados de acuerdo a la intensidad de la reacción la cual fue expresada en cruces. La preparación de los reactivos necesarios se basó en la Guía Metodológica establecida por Guerrero; et al, (2014).

El tamizaje fitoquímico y la interpretación de resultados se realizó según el anexo 3.

2.2.5 Preparación de la solución stock de los extractos

La solución stock de los extractos vegetales se preparó siguiendo el esquema 3.

Esquema 3. Preparación de solución stock de *Piper aduncum* y *Artemisia absinthium*.



Fuente: Los autores/ (Sánchez, 2010; Mendoza, 2019).

Para la solución stock de *Uncaria tomentosa*, se disolvió 500 mg por cada 10 ml de agua destilada estéril, teniendo en cuenta que este al presentar valores MIC que oscilan entre los 6-500 µg/ml se procedió a aumentar la concentración de la solución stock a 50000 µg/ml.

2.2.6 Evaluación de la Actividad Antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos de *Uncaria tomentosa*, *Piper aduncum* y *Artemisia absinthium* frente a *E. coli* ATCC 25922 por el método de Microdilución en Placa

Se trabajó por triplicado, el proceso se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar tipo II A2 marca Labconco. Según especificaciones de la CLSI M100 29th ed.

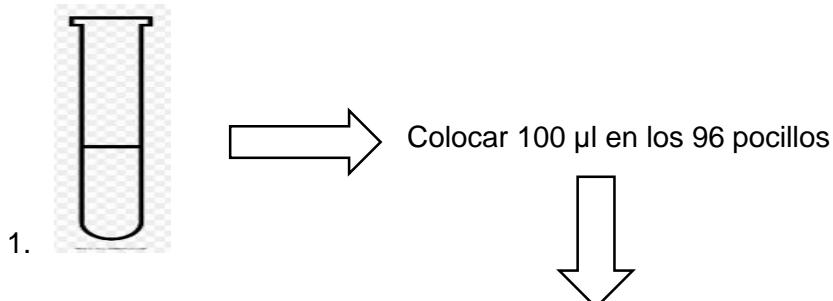
Preparación del inóculo

- Se realizó un cultivo de *E. coli* ATCC 25922 en agar Mueller-Hinton y se incubó por 24 horas a 35±2 °C.



- Se tomó con un asa estéril colonias puras y se diluyó en solución salina 0.9% estéril hasta alcanzar una turbidez de 0.5 en la escala McFarland medida en el densitómetro, equivalente a una concentración de 1.5×10^8 UFC/ml (CLSI M100, 2019).

Técnica de dilución en caldo: susceptibilidad antimicrobiana

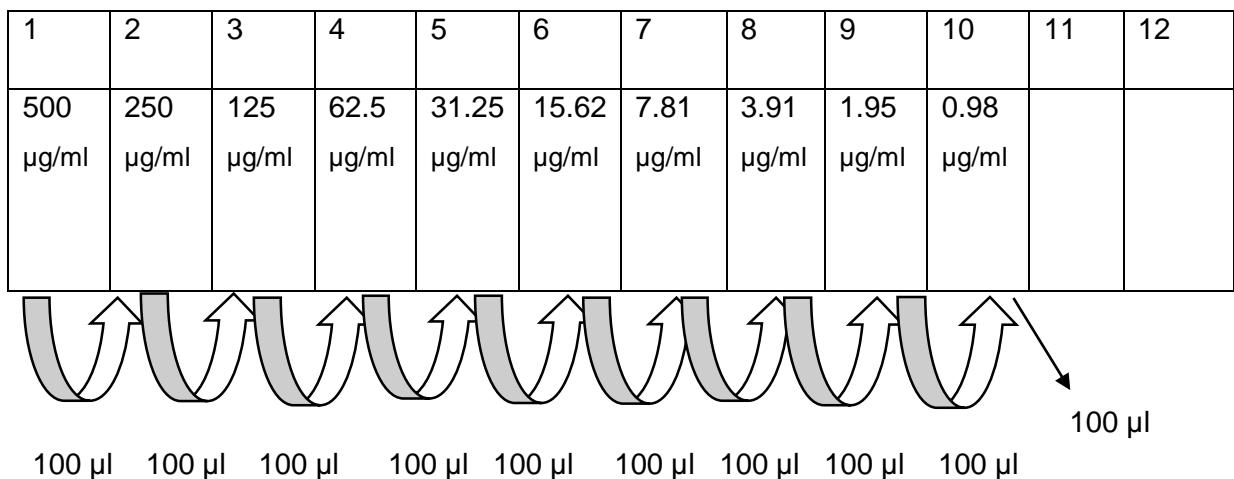


Caldo Mueller Hilton (CMH)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|--|---|---|---|---|---|---|---|---|----|--|---|
| A | | | | | | | | | | | 200 µl de CMH para control esterilidad | 100 µl de CMH + 100 µl Inoculo = control de crecimiento (C.C) |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | 100 µl caldo CMH + 100 µl de diluciones de extractos = Blancos | | | | | | | | | | | |

2. Colocar 100 µl del de la solución madre del extracto etanólico en la columna 1 y homogenizar.

3. Pipetear 100 µl de mezcla de la columna 1, pasar a la columna 2 y homogenizar. Obteniendo una concentración final de:



En el caso de *Uncaria tomentosa* al requerir una concentración inicial mayor y teniendo una solución madre de 500000 µg/ml se obtuvo las siguientes diluciones:

| | | | | | | | | | | | |
|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|------------|----|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| 2500 µg/ml | 1250 µg/ml | 625 µg/ml | 312 µg/ml | 156 µg/ml | 78 µg/ml | 39 µg/ml | 19 µg/ml | 9 µg/ml | 4 µg/ml | | |

4. Repetir el proceso hasta la columna 10 obteniendo las disoluciones sucesivas, eliminando los 100 µl sobrantes.
5. Colocar 100 µl del inóculo bacteriano de la columna 1 a la 10, obteniendo un volumen final de 200 µl y homogenizar (evitando colocar el inóculo bacteriano en la fila H ya que esta contiene los blancos de las disoluciones).
6. Incubar la placa de fondo plano a 35° C +/- 2 °C por 16 a 20h, según lo estipula la CLSI M100 (2019), para el crecimiento de *E. coli*.
7. Leer la absorbancia en el lector de placas de Microdilución a 405 nm (CLSI M100, 2019; Telles, 2017).

Cálculos de resultados

Para el cálculo de los resultados se tomó en cuenta lo siguiente:

Blanco de la dilución: Promedio de los blancos (fila H) de cada columna (1 a la 10)



Control de bacterias: Promedio del control de crecimiento (columna 12) (CLSI M100, 2019; Telles, 2017)

Cálculo del porcentaje de crecimiento:

$$\% \text{ crecimiento} = \frac{x}{\text{Control de bacterias}} * 100$$

X= Valor de la absorbancia menos el blanco de cada dilución.

Calculo del coeficiente de variación

Se determinó el coeficiente de variación de cada ensayo para observar la uniformidad de los datos obtenidos de la siguiente manera.

$$\text{coeficiente de variación} = \frac{\text{desviación estándar}}{\text{media}} * 100$$

Interpretación de resultados

Según la técnica de microdilución en placa detallada por Ramayoni (2007) y Ramirez (2019), se consideró a la concentración mínima inhibitoria (MIC) a la concentración más baja del extracto vegetal que inhibe el crecimiento bacteriano en un 80 %.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Porcentaje de rendimiento de los extractos vegetales

Se determinó el porcentaje de rendimiento de los extractos vegetales, *Uncaria tomentosa* 15.5%; *Artemisia absinthium* 10.01%; y *Piper aduncum* 6.64%, según se encuentra detallado en la tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de rendimiento del proceso de maceración del material vegetal.

| Planta | Cantidad de droga fresca en gramos (g) | Cantidad de extracto seco obtenido (g) | Rendimiento (%) |
|---------------------------------|--|--|-----------------|
| <i>Uncaria tomentosa</i> | 20g | 3.1045 | 15.5 |



| | | | |
|-----------------------------|-----|--------|-------|
| Piper aduncum | 20g | 1.3288 | 6.64 |
| Artemisia absinthium | 10g | 1.0014 | 10.01 |

Fuente: Registros de laboratorio.

3.2 Tamizaje Fitoquímico de *Uncaria tomentosa*, *Piper aduncum* y *Artemisia absinthium*

Los grupos funcionales identificados en *Uncaria tomentosa* fueron catequinas, saponinas, flavonoides, lactonas, antocianinas, alcaloides, taninos y fenoles, sin embargo, no se identificaron resinas y triterpenos, según se encuentran detallados en la tabla 9.

Tabla 9. Tamizaje fitoquímico de *Uncaria tomentosa*.

| | <i>Uncaria tomentosa</i> | | |
|---------------------|--------------------------|-------------|-------------|
| | Ensayo 1 | Ensayo 2 | Ensayo 3 |
| Catequinas | ++ | ++ | ++ |
| Resinas | - | - | - |
| Saponinas | ++ | ++ | ++ |
| Flavonoides | + | + | + |
| Lactonas | + | + | + |
| Antocianinas | + | + | + |
| Alcaloides | +++ | +++ | +++ |
| Triterpenos | - | - | - |
| Taninos | + | + | + |
| Fenoles | + | + | + |

(+) reacción leve, (++) reacción moderada, (+++) reacción intensa.

Fuente: Registro de Laboratorio.



Los grupos funcionales identificados en *Piper aduncum* fueron flavonoides, resinas, lactonas, antocianinas, alcaloides, taninos y fenoles, sin embargo, no se identificaron catequinas, saponinas y triterpenos, según se encuentran detallados en la tabla 10.

Tabla 10. Tamizaje fitoquímico de *Piper aduncum*.

| | <i>Piper aduncum</i> | | |
|---------------------|----------------------|-------------|-------------|
| | Ensayo 1 | Ensayo 2 | Ensayo 3 |
| Catequinas | - | - | - |
| Resinas | +++ | +++ | +++ |
| Saponinas | - | - | - |
| Flavonoides | + | + | + |
| Lactonas | + | + | + |
| Antocianinas | + | + | + |
| Alcaloides | ++ | ++ | ++ |
| Triterpenos | - | - | - |
| Taninos | +++ | +++ | +++ |
| Fenoles | + | + | + |

(+) reacción leve, (++) reacción moderada, (+++) reacción intensa.

Fuente: Registro de Laboratorio.

Los grupos funcionales identificados en *Artemisia absinthium* fueron catequinas, resinas, saponinas, flavonoides, antocianinas, alcaloides, triterpenos, taninos y fenoles, sin embargo, no se identificaron lactonas, según se encuentran detallados en la tabla 11.

**Tabla 11.** Tamizaje fitoquímico de *Artemisia absinthium*.

| | <i>Artemisia absinthium</i> | | |
|---------------------|-----------------------------|-------------|-------------|
| | Ensayo 1 | Ensayo 2 | Ensayo 3 |
| Catequinas | + | + | + |
| Resinas | + | + | + |
| Saponinas | + | + | + |
| Flavonoides | + | + | + |
| Lactonas | - | - | - |
| Antocianinas | + | + | + |
| Alcaloides | ++ | ++ | ++ |
| Triterpenos | + | + | + |
| Taninos | + | + | + |
| Fenoles | + | + | + |

(+) reacción leve, (++) reacción moderada, (+++) reacción intensa.

Fuente: Registro de Laboratorio.





3.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de *Uncaria tomentosa* por el método de microdilución frente a *E. coli* 25922

La media de las absorbancias obtenidas por microdilución en placa se detallan en la tabla 12, se determinó que la concentración inhibitoria mínima de *Uncaria tomentosa* por el método de microdilución frente a *E. coli* 25922 fue de 625 µg/ml, la inhibición del crecimiento bacteriano se ubicó en un 81%, siendo este el punto de corte para la determinación de la concentración mínima inhibitoria. Los valores de cada ensayo obtenidos del lector de placas de microdilución y coeficientes de variación se detallan en los anexos 5, 6 y 7.

Tabla 12. Porcentaje de crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 frente a diferentes concentraciones del extracto de *Uncaria tomentosa*.

| µg/ml | B. | E1 | E2 | E3 | C.C 1 | C.C 2 | C.C 3 | %C.1 | % C.2 | %C.3 |
|-------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|---------|-------|-------|-------|
| 2500 | 1,81 | 1,8116 | 1,8117 | 1,8159 | 0,7603 | 0,761 | 0,75586 | 0,21 | 0,23 | 0,77 |
| 1250 | 1,41 | 1,4989 | 1,5209 | 1,5064 | 0,7603 | 0,761 | 0,75586 | 11,69 | 14,57 | 12,76 |
| 625 | 1,01 | 1,1616 | 1,1604 | 1,1744 | 0,7603 | 0,761 | 0,75586 | 19,94 | 19,77 | 21,75 |
| 312 | 0,538 | 0,9427 | 0,9656 | 0,9807 | 0,7603 | 0,761 | 0,75586 | 53,23 | 56,19 | 58,57 |
| 156 | 0,333 | 0,8771 | 0,9216 | 0,9259 | 0,7603 | 0,761 | 0,75586 | 71,57 | 77,34 | 78,44 |
| 78 | 0,274 | 0,8597 | 0,8886 | 0,8903 | 0,7603 | 0,761 | 0,75586 | 77,04 | 80,76 | 81,53 |
| 39 | 0,216 | 0,8650 | 0,8560 | 0,8463 | 0,7603 | 0,761 | 0,75586 | 85,36 | 84,10 | 83,39 |
| 19 | 0,185 | 0,8641 | 0,8565 | 0,8619 | 0,7603 | 0,761 | 0,75586 | 89,33 | 88,24 | 89,55 |
| 9 | 0,125 | 0,8140 | 0,8127 | 0,8069 | 0,7603 | 0,761 | 0,75586 | 90,62 | 90,37 | 90,21 |
| 4 | 0,122 | 0,8230 | 0,8346 | 0,8237 | 0,7603 | 0,761 | 0,75586 | 92,20 | 93,64 | 92,84 |

B: Blanco; **E:** Ensayo; **C.C:** Control de crecimiento, **%C:** Porcentaje de crecimiento.

Fuente: Registro de Laboratorio



3.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de *Piper aduncum* por el método de microdilución frente a *E. coli* 25922

El promedio de las absorbancias obtenidas por microdilución en placa se detallan en la tabla 13, en donde no se logró determinar una concentración mínima inhibitoria debido a que el porcentaje de crecimiento bacteriano no alcanza el 80%, obteniendo resultados entre el 61% y 71%. Los valores de cada ensayo obtenidos del lector de placas de microdilución y coeficientes de variación se detallan en los anexos 8, 9, 10.

Tabla 13. Porcentaje de crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 frente a diferentes concentraciones del extracto de *Piper aduncum*.

| μg/ml | B | E 1 | E 2 | E 3 | C.C 1 | C.C 2 | C.C 3 | %C 1 | %C 2 | %C 3 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|
| 500 | 0,1464 | 0,6414 | 0,6590 | 0,8989 | 0,7418 | 0,7354 | 1,0493 | 66,73 | 69,70 | 71,71 |
| 250 | 0,1488 | 0,6286 | 0,6316 | 0,8967 | 0,7418 | 0,7354 | 1,0493 | 64,69 | 65,64 | 71,28 |
| 125 | 0,1482 | 0,6278 | 0,6417 | 0,8961 | 0,7418 | 0,7354 | 1,0493 | 64,65 | 67,11 | 71,28 |
| 62,5 | 0,1470 | 0,6011 | 0,6304 | 0,8986 | 0,7418 | 0,7354 | 1,0493 | 61,22 | 65,73 | 71,63 |
| 31,25 | 0,1464 | 0,6234 | 0,6290 | 0,8997 | 0,7418 | 0,7354 | 1,0493 | 64,30 | 65,62 | 71,79 |
| 15,625 | 0,1474 | 0,6160 | 0,6102 | 0,8807 | 0,7418 | 0,7354 | 1,0493 | 63,17 | 62,93 | 69,89 |
| 7,8125 | 0,1456 | 0,6318 | 0,6450 | 0,8527 | 0,7418 | 0,7354 | 1,0493 | 65,54 | 67,91 | 67,39 |
| 3,9063 | 0,1446 | 0,6086 | 0,6249 | 0,8804 | 0,7418 | 0,7354 | 1,0493 | 62,56 | 65,30 | 70,13 |
| 1,9531 | 0,1490 | 0,6253 | 0,6417 | 0,8633 | 0,7418 | 0,7354 | 1,0493 | 64,21 | 67,00 | 68,07 |
| 0,9766 | 0,1464 | 0,6176 | 0,6507 | 0,8840 | 0,7418 | 0,7354 | 1,0493 | 63,53 | 68,57 | 70,30 |

B: Blanco; **E:** Ensayo; **C.C:** Control de crecimiento, **%C:** Porcentaje de crecimiento.

Fuente: Registro de Laboratorio



3.5 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de *Artemisia absinthium* por el método de microdilución frente a *E. coli* 25922

Los promedios de las absorbancias de los 3 ensayos realizados por microdilución se detallan en la tabla 14, donde se observó que ninguna dilución del extracto usado presentó inhibición, ya que el porcentaje de crecimiento bacteriano superó el 20% en todas las concentraciones, obteniéndose rangos entre el 64% al 79%. Los valores de cada ensayo obtenidos del lector de placas de microdilución y coeficientes de variación se detallan en los anexos 11, 12, 13.

Tabla 14. Porcentaje de crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 frente a diferentes concentraciones del extracto de *Artemisia absinthium*.

| μg/ml | B | E 1 | E 2 | E 3 | C.C 1 | C.C 2 | C.C 3 | %C 1 | %C 2 | %C 3 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|
| 500 | 0,2343 | 0,7400 | 0,7588 | 0,6910 | 0,6326 | 0,7158 | 0,5989 | 79,93 | 73,27 | 76,26 |
| 250 | 0,2033 | 0,6578 | 0,7708 | 0,6634 | 0,6326 | 0,7158 | 0,5989 | 71,83 | 79,28 | 76,83 |
| 125 | 0,1823 | 0,6354 | 0,6471 | 0,6497 | 0,6326 | 0,7158 | 0,5989 | 71,61 | 64,94 | 78,05 |
| 62,5 | 0,1717 | 0,6365 | 0,6514 | 0,6381 | 0,6326 | 0,7158 | 0,5989 | 73,48 | 67,02 | 77,89 |
| 31,25 | 0,1673 | 0,6129 | 0,6058 | 0,6439 | 0,6326 | 0,7158 | 0,5989 | 70,43 | 61,25 | 79,57 |
| 15,625 | 0,1590 | 0,6005 | 0,6300 | 0,6210 | 0,6326 | 0,7158 | 0,5989 | 69,79 | 65,81 | 77,15 |
| 7,8125 | 0,1553 | 0,5984 | 0,6081 | 0,5866 | 0,6326 | 0,7158 | 0,5989 | 70,03 | 63,26 | 72,01 |
| 3,9063 | 0,1563 | 0,6074 | 0,6753 | 0,5693 | 0,6326 | 0,7158 | 0,5989 | 71,30 | 72,50 | 68,96 |
| 1,9531 | 0,1550 | 0,5906 | 0,6900 | 0,5867 | 0,6326 | 0,7158 | 0,5989 | 68,86 | 74,75 | 72,09 |
| 0,9766 | 0,1520 | 0,5838 | 0,5955 | 0,5714 | 0,6326 | 0,7158 | 0,5989 | 68,25 | 61,96 | 70,04 |

B: Blanco; **E:** Ensayo; **C.C:** Control de crecimiento, **%C:** Porcentaje de crecimiento.

Fuente: Registro de Laboratorio



DISCUSIÓN

El porcentaje de rendimiento de *Uncaria tomentosa* fue del 15,5%, este resultado es comparable al estudio realizado por Vargas (2000). quien obtuvo un rendimiento de 12,25%, esto se debe que el autor mencionado realizó una maceración por 3 días en medio ácido lo que favorece la extracción de metabolitos como los alcaloides, pero disminuye la extracción de otros principios activos como lo menciona el mismo autor.

El porcentaje de rendimiento de *Piper aduncum* fue del 6,64%, marcando una diferencia significativa con el estudio realizado por Melgarejo (2006) quien obtuvo un rendimiento del 16,9%, lo que puede ser atribuido a diferentes variables, como la distribución geográfica y el tiempo de maceración ya que se la realizó por un periodo de 96 horas. Se concluye que el rendimiento de la extracción está relacionado directamente al método de extracción empleado, la especie vegetal, el suelo, la altitud, el tamaño de partícula, entre otros factores como lo indica Naranjo (2013).

En cuanto al porcentaje de rendimiento de *Artemisia absinthium* fue del 10,01%, este resultado es comparable al estudio Azuero (2014), que obtuvo un rendimiento del 7,6%, el cual realizó una doble maceración de 72h y 48h con metanol, se tomó en cuenta el estudio de Carrión (2010) en el que evidenció que no existen diferencias significativas en la rendimiento del extracto etanólico frente al metanólico a pesar que la diferencia no es significativa el mayor porcentaje de rendimiento se puede atribuir a condiciones climáticas, geográficas.

En el tamizaje fitoquímico de los diferentes extractos, se observó que los metabolitos secundarios de *Uncaria tomentosa* identificados en el macerado son comparables con estudios realizados por Romero (2014) y Domínguez (2010), en los cuales se evidencia la similitud de los resultados, teniendo en cuenta que según la bibliográfica consultada la actividad antibacteriana es atribuida a los alcaloides presentes en dicha planta, confirmando su existencia en este estudio.

En el caso de los metabolitos secundarios de *Piper aduncum* se observó que existe una relación con estudios fitoquímicos realizados en la mayoría de los casos como Arroyo (2010) y Vasquez (2015), en donde los metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides y taninos se confirmaron, demostrando su presencia en esta investigación, sin embargo, para el grupo de saponinas no fueron evidenciadas aplicando el ensayo de la espuma a diferencia de los autores ya mencionados en donde se encontró una cantidad leve de estos compuestos, teniendo importancia ya que estudios como el realizado por Jaramillo (2016) indica que la presencia de saponinas presentan un riesgo



elevado de citotoxicidad. La presencia de resinas al ser compuestos insolubles en agua y solventes polares, se atribuye a que, según Ordoñez (2016) las resinas son susceptibles a ser arrastradas por el solvente durante la maceración a pesar de ser insolubles en este.

En cuanto a los metabolitos secundarios de *Arthemisia absinthium* se comparó con investigaciones realizadas por Sagástegui (2015) y Daza (2018), que la especie de la planta utilizada presenta similitud en cuanto a los metabolitos secundarios, teniendo como discrepancias la presencia de lactonas, que en este estudio no fueron evidenciadas, lo cual podría atribuirse a que las lactonas sesquiterpénicas y triterpenos presentan escasa solubilidad en solventes polares como lo indica Ruiz (2015), mencionando que además estas presentan los mayores efectos farmacológicos como antibacteriano, antiviral, antiinflamatorio entre otros.

En cuanto a la MIC de *Uncaria tomentosa* se determinó que es de 625 µg/ml, dicho valor no corresponde a la bibliografía consultada ya que Fernández (2017) presentó un valor de 50 µg/ml siendo la variante de este, la maceración ya que la realizó en el transcurso de 10 días, mientras que, Floreano (2015), obtuvo un MIC de 300µg/ml con una maceración de 5 días, Se debe tener en cuenta que estos valores pueden ser diversos ya que *Uncaria tomentosa* y específicamente los alcaloides como uncarina F, pteropodina y mitrafilina, que se les atribuye la propiedad antibacteriana detallada en la bibliografía, varían en gran medida dentro de la misma especie, dependiendo del tipo de suelo en donde se cultiven, además de factores como la altitud según lo indica el autor Domínguez (2010), ya que su estudio se basó en la cuantificación de alcaloides modificando las variables de altura y localización, por lo que se puede determinar que *Uncaria tomentosa*, presenta un poder bactericida frente a *E. coli* cepa ATCC 25922 siendo la dosis efectiva variable dependiendo de la localización.

En cuanto a la actividad antibacteriana de *Piper aduncum*, en este estudio no se logró determinar una MIC, ya que el extracto de la planta utilizada presentó un crecimiento bacteriano entre 61-71%, lo cual no concuerda con la bibliografía revisada ya que según Yáñez (2014); indica que el macerado etanólico de *Piper aduncum* inhibe el crecimiento de *E. coli* a una concentración de 5000 µg/ml, sin embargo, hay que tener en cuenta que este estudio se lo realizó utilizando un macerado de 3 días. Otro estudio realizado por Zuta (2014), establece que el macerado etanólico de 3 días y sin agitación no tiene efecto bactericida frente a *E. coli*, por lo que se puede concluir que las variables como el tiempo de maceración y solvente utilizado influye directamente en la cantidad de los metabolitos secundarios presentes del extracto, como se mencionó anteriormente el



efecto antibacteriano de dicha planta se le atribuye principalmente a los flavonoides como hidrochalconas y a cumarinas como cromonas que presentaban efecto antibacteriano frente a *S. aureus* y *E. coli* como lo indica Yanez (2014) y Lents (1998); además de presentar resinas que al ser insolubles y estar presentes en el extracto etanólico seco, no garantizan la fiabilidad de la concentración de la solución stock.

En cuanto a la actividad antibacteriana de *Artemisia absinthium*, se evidenció que no posee un efecto bactericida, ya que el rango de crecimiento bacteriano se encontró entre 64-79%, esto no concuerda con la bibliografía dado que un estudio realizado por Azuero (2014), indica que el extracto etanólico de *Artemisia absinthium* tiene actividad antibacteriana media, pero no detalla la concentración usada; por lo que no es comparable con este estudio. Alvarado (2010) establece que el extracto hidroalcohólico, no posee efecto antibacteriano frente a *E. coli* a concentraciones hasta 8000 mg/ml; haciendo énfasis en la influencia de la latitud sobre la actividad antibacteriana de *Artemisa absinthium* y otras plantas, que si bien, no presentaron actividad frente a *E. coli*; si tuvieron efecto bactericida frente a *S. aureus*, siendo esta mayor en plantas que crecen a una menor latitud, así lo confirma también un estudio realizado por (Zhang, 2017), el cual evidenció la mayor expresión de metabolitos secundarios en plantas del género *Artemisia* que crecen a una latitud menor. Además, Cerón (2018) afirma que los efectos farmacológicos se deben principalmente a los terpenoides como tuyona, terpinen, linalol, lenol, geraniol los cuales se les asocia a propiedades antibacterianas tanto para bacterias Gram positivas y negativas. Se debe tener en cuenta que dicha planta presenta componentes tóxicos, por lo cual no es recomendable su uso en fitomedicina, pero no deben descartarse dado al número de moléculas farmacológicamente activas, por lo que se recomendaría el aislamiento de estas sustancias.

Según los coeficientes de variación incluidos en los anexos 5 al 13 de las absorbancias obtenidas en cada uno de los ensayos se observó una variación menor al 15% que según afirma Gil (2016) el coeficiente de variación comprendido entre el 5 al 15% se denomina como errores menores, esto se debe a la dificultad de trabajar con volúmenes pequeños en la técnica empleada en este estudio.



CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en el presente estudio “Evaluación in vitro de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de *Uncaria tomentosa*; *Piper aduncum*; *Artemisa absinthium* frente a *E. coli* ATCC 25922” es posible plantear las siguientes conclusiones:

- Se realizó la extracción de los principios activos presentes en la corteza de *Uncaria tomentosa* y hojas de *Piper aduncum* y *Artemisa absinthium* por el método de maceración usando como solvente etanol 96% obteniendo un rendimiento de: 15,5%, 6,64% y 10,01% respectivamente.
- Se identificaron los principales metabolitos secundarios presentes en los extractos vegetales de *Uncaria tomentosa* (Catequinas, saponinas, flavonoides, lactonas, antocianinas, alcaloides, taninos y fenoles), *Piper aduncum* (Resinas, flavonoides, lactonas, antocianinas, alcaloides, taninos y fenoles) y *Artemisia absinthium* (Catequinas, resinas, saponinas, flavonoides, antocianinas, alcaloides, triterpenos, taninos y fenoles) usando reacciones cualitativas específicas.
- Se logró evaluar la actividad antibacteriana de los extractos vegetales obtenidos frente a *E. coli* ATCC 25922, aplicando el método de microdilución en placa, obteniendo una MIC de 625 µg/ml para *Uncaria tomentosa*; mientras que *Piper aduncum* y *Artemisa absinthium* presentaron una leve disminución en el crecimiento bacteriano.



RECOMENDACIONES

De acuerdo a la experiencia obtenida en la realización de este Trabajo de Titulación, se sugiere tomar en cuenta las siguientes sugerencias para realizar la técnica de la microdilución.

- Para la extracción se sugiere realizar maceraciones sucesivas o en su defecto, usar métodos de extracción más sofisticados como la extracción con fluidos supercríticos, con el fin de mejorar la eficiencia y el rendimiento de la extracción.
- Se sugiere utilizar extractos libres de clorofila utilizando métodos como filtración con carbón activado o cal, para evitar interferencias entre el color del extracto y el color del medio de cultivo en el momento de utilizar el lector de placas de microdilución.



BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, F., & Rodas, G. (2010). *Influencia de la altitud sobre la actividad antibacteriana de extractos de malva olorosa, ortiga y ajeno mediante el método de dilución seriada en tubo de ensayo* (Doctoral dissertation, Tesis).
- Andrade, J., Carra, M., Silva, G., Campani, G., & Zangirolami, T. (2016). Acompanhamento de mudanças morfológicas em cultivos de Escherichia coli recombinante por análise de imagens utilizando recursos computacionais. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, 1(1), 523-528.
- Arroyo, J., Bonilla, P., tomás Ch, G., & Huamán, J. (2011). Estudio Fitoquímico del extracto etanólico y de las fracciones de las hojas de Piper aduncum “Matico”. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 14(1 y 2), 62-67.
- Azuero, A. (2014). *Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en el Ecuador* (Bachelor's thesis, Machala: Universidad Técnica de Machala).
- Bahrami, Y., & Franco, C. (2016). Acetylated triterpene glycosides and their biological activity from holothuroidea reported in the past six decades. *Marine drugs*, 14(8), 147.
- Ballistreri, G., Fabroni, S., Romeo, F. V., Timpanaro, N., Amenta, M., & Rapisarda, P. (2019). Anthocyanins and Other Polyphenols in Citrus Genus: Biosynthesis, Chemical Profile, and Biological Activity. In *Polyphenols in Plants* (pp. 191-215). Academic Press.
- Blanco, V. M., Maya, J. J., Correa, A., Perenguez, M., Muñoz, J. S., Motoa, G., ... & Garzon, M. (2016). Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por Escherichia coli productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 34(9), 559-565.
- Bratkov, VM, Shkondrov, AM, Zdraveva, PK y Krasteva, IN (2016). Flavonoides del género Astragalus: fitoquímica y actividad biológica. *Comentarios de farmacognosia*, 10 (19), 11.
- Bruneton, J. (2005). *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales*. Cartagena-Colombia: S.A.



Cano-Flores, A. (2013). Biotransformación de triterpenos con diferentes microorganismos. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 44(2), 7-16.

Cárdenas Barrera, J. (2004). Caracterización de Uncaria tomentosa (Will) Ex Roemer & Schultes DC. y Uncaria guianensis (Aubl.) Gmel. en la zona de Tingo María.

Cardeño, Á. V., Molina, M. C., Miranda, I., García, G. T., Morales, J. M., & Stashenko, E. E. (2007). Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de los extractos etanólicos de Salvia aratocensis, Salvia Sochensis, Bidens reptans y Montanoa ovalifolia. *Scientia et technica*, 1(33).

Carmilema Sánchez, C. S., & Delgado Delgado, R. A. (2010). *Validación del método de microdilución para la actividad antimicrobiana de extractos de plantas (ortiga, ajenjo, malva olorosa)* (Bachelor's thesis)

Carrión Jara, A. V., & García Gómez, C. R. (2010). Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica (Bachelor's thesis).

Cerón, C., & Elizabeth, N. (2018). *Efecto antibacteriano del extracto de ajenjo (Artemisia absinthium L.) sobre la cepa de Streptococcus mutans. Estudio in vitro* (Bachelor's thesis, Quito: UCE).

Chan, C. O., Xie, X. J., Wan, S. W., Zhou, G. L., Yuen, A. C. Y., Mok, D. K. W., & Chen, S. B. (2019). Qualitative and quantitative analysis of sesquiterpene lactones in Centipeda minima by UPLC–Orbitrap–MS & UPLC-QQQ-MS. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*.

Chateauneuf, R., & Benavides, M. (2017). Plantas Medicinales y Medicina Natural. R. Chateauneuf, *Plantas Medicinales y Medicina Natural*.

CLSI. Pefomance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.29 th ed. CLSI standard M100, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standars Institute; 2019.

Ćujić, N., Šavikin, K., Janković, T., Pljevljakušić, D., Zdunić, G., & Ibrić, S. (2016). Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. *Food Chemistry*, 194, 135-142.

Da Silva, R. P., Rocha-Santos, T. A., & Duarte, A. C. (2016). Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 76, 40-51.



Daza Macías, M. G. (2018). *Estudio farmacognósico de productos naturales procesados de uso medicinal y del extracto vegetal de Artemisia Absinthium (ajenjo)* (Bachelor's thesis, Quito: UCE).

de Andrade, L., Aparecida, S., da Silva Tristão, M. I., Dallarmi Miguel, M., Dias, G., de Fátima, J., ... & da Silva Paula, C. (2017). Fitomedicina en la Lista Nacional de Medicamentos Escenciales de Brasil. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 22(1), 1-8.

DE SANTA FE, E. L. P., & AIRES, M. Y. B. (2005) GUIA DE BUENAS PRACTICAS DE RECOLECCIÓN Y MANUFACTURA DE PLANTAS MEDICINALES

Domínguez Torrejón, G., García Martín, J. D. J., Guzmán Loayza, D., & Alanoca, R. (2010). Contenido de alcaloides en corteza de Uncaria tomentosa (Wild.) DC procedente de diferentes hábitats de la región Ucayali-Perú. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76(3), 271-278.

Domínguez Torrejón, G., García Martín, J. D. J., Guzmán Loayza, D., & Alanoca, R. (2010). Contenido de alcaloides en corteza de Uncaria tomentosa (Wild.) DC procedente de diferentes hábitats de la región Ucayali-Perú. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76(3), 271-278.

Fernández, M., & Santiago, W. (2017). Efecto de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de uncaria tomentosa en el crecimiento de staphylococcus aureus y escherichia coli.

Ferrer, M., Pedocchi, R., Michelazzo, M., González Neves, G., & Carboneau, A. (2007). Delimitación y descripción de regiones vitícolas del Uruguay en base al método de clasificación climática multicriterio utilizando índices bioclimáticos adaptados a las condiciones del cultivo. *Agrociencia-Sitio en Reparación*, 11(1), 47-56.

Floreano Vega, M. L. (2015). Efecto de diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de Uncaria tomentosa en el crecimiento de Staphylococcus aureus y Escherichia coli.

Flores Palacios, K., & Puente Puente, M. R. (2016). Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de Piper Aduncum "Matico" Sobre Escherichia Coli.

Ghosh, S. (2016). Biosynthesis of structurally diverse triterpenes in plants: the role of oxidosqualene cyclases. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 82(4), 1189-1210.



Gil-Romero, Y., Regodón-Domínguez, M., de Cal, I. W., López-Fabal, F., & Gómez-Garcés, J. L. (2016). Valoración de 2 técnicas automatizadas de microdilución frente a dilución en agar en la determinación de la sensibilidad a fosfomicina en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(7), 406-408.

González-Marrugo, L. B., Granados-Llamas, E. A., Granados-Conde, C., Tejada-Tovar, C. N., & Ortega-Toro, R. (2018). Extraction and Evaluation of the Antioxidant Properties of Coriander (*Coriandrum sativum*) Seed Essential Oil.

Gordo, D. A. M. (2018). Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *RIA*, 9(1), 4.

Guerrero Aleaga, N. D. (2014). *Caracterización fitoquímica y actividad biológica de Oryctanthus Spicatus (Loranthaceae)* (Bachelor's thesis).

Guillarme, D., Casetta, C., Bicchi, C., & Veuthey, J. L. (2010). High throughput qualitative analysis of polyphenols in tea samples by ultra-high pressure liquid chromatography coupled to UV and mass spectrometry detectors. *Journal of Chromatography A*, 1217(44), 6882-6890.

Hussein, A. O., Mohammed, G. J., Hadi, M. Y., & Hameed, I. H. (2016). Phytochemical screening of methanolic dried galls extract of *Quercus infectoria* using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and Fourier transform-infrared (FT-IR). *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 8(3), 49-59.

Iwashina, T. (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, 113(3), 287.

Jaramillo, C. J., Espinoza, A. J., D'Armas, H., Troccoli, L., & de Astudillo, L. R. (2016). Concentraciones de alcaloides, glucósidos cianogénicos, polifenoles y saponinas en plantas medicinales seleccionadas en Ecuador y su relación con la toxicidad aguda contra *Artemia salina*. *Revista de Biología Tropical*, 64(3), 1171-1184.

Khakimov, B., Tseng, L., Godejohann, M., Bak, S., & Engelsen, S. (2016). Screening for triterpenoid saponins in plants using hyphenated analytical platforms. *Molecules*, 21(12), 1614.

Lentz, D. L., Clark, A. M., Hufford, C. D., Meurer-Grimes, B., Passreiter, C. M., Cordero, J., ... & Okunade, A. L. (1998). Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology*, 63(3), 253-263.



Liang, J., & He, J. (2018). Protective role of anthocyanins in plants under low nitrogen stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 498(4), 946-953.

Lizcano Ramón, A. J., Torres Cárcamo, M. E., & Vergara González, J. L. (2011). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos

Lozano, H. G. M., Menendez, R. E. L., & Vardelly, D. G. (2019). Aplicación de la medicina natural y tradicional en odontología. *RECIAMUC*, 3(2), 756-780.

Mandlik, V., Patil, S., Bopanna, R., Basu, S., & Singh, S. (2016). Biological activity of coumarin derivatives as anti-leishmanial agents. *PloS one*, 11(10), e0164585.

Melgarejo, P., Glménez, T., Garcla, R., & Chuqul, R. (2006). Estudio químico biodirigido para la evaluación de actividad antimalárica de la especie vegetal Piper aduncum mediante el test FBIT. *Visión Científica*, 1(1), 3-8.

Mendoza Rodríguez, M. D. P. (2019). Efecto antibacteriano del aceite esencial de piper aduncum "mático" sobre staphylococcus aureus atcc 25923 comparado con oxacilina, estudio invitro

Mohammadpour, H., Sadrameli, S. M., Eslami, F., & Asoodeh, A. (2019). Optimization of ultrasound-assisted extraction of Moringa peregrina oil with response surface methodology and comparison with Soxhlet method. *Industrial Crops and Products*, 131, 106-116.

Molina, L. (2018). *Anti-mitotic activity of six Asteraceae plant extracts and identification of the sesquiterpene lactone hymenoratin from the Canadian plant Hymenoxys richardsonii* (Doctoral dissertation, Lethbridge, Alta.: Universtiyy of Lethbridge, Department of Biological Sciences).

Naranjo, F. L., Almazo, E. M., García, S. N. J., Martínez, M. A., & Marmolejo, J. M. (2013). Métodos de extracción e identificación de los bioactivos de la Lavandula officinalis y su potencial uso como agente sedante. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 44(1), 60-65.

Nankar, A. N., Dungan, B., Paz, N., Sudasinghe, N., Schaub, T., Holguin, F. O., & Pratt, R. C. (2016). Quantitative and qualitative evaluation of kernel anthocyanins from southwestern United States blue corn. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4542-4552.



Nunez, D., Balboa, N., Quilaqueo, N., Alvear, M., & Paredes, M. (2018). Evaluation of the Immunomodulatory Activity of Methanolic Extracts and Alkaloids of Berberis darwinii H.(Berberidaceae)/Evaluacion de la Actividad Inmunomoduladora de Extractos Metanolicos y de Alcaloides de Berberis darwinii H.(Berberidaceae). *International Journal of Morphology*, 36(2), 454-460.

Obregón, L. E. (2004). Estudios sobre la «uña de gato»(Uncaria tomentosa). *Natura Medicatrix: Revista médica para el estudio y difusión de las medicinas alternativas*, (37), 72-79.

Ordóñez Rea, O. L. (2016). Evaluación antibacteriana de extracto de mosquera (Croton elegans.) frente a:(Staphylococcus aureus ATCC: 25923, Streptococcus pyogenes ATCC: 19615, Streptococcus pneumoniae ATCC: 49619 y Streptococcus mutans ATCC: 25175), patógenos de enfermedades respiratorias (Bachelor's thesis).

OMS. (13 de Octubre de 2014). *Organización Mundial de la Salud*. Recuperado el 7 de Enero de 2020, de Organización Mundial de la Salud: https://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/

Ordóñez Rea, O. L. (2016). Evaluación antibacteriana de extracto de mosquera (Croton elegans.) frente a:(Staphylococcus aureus ATCC: 25923, Streptococcus pyogenes ATCC: 19615, Streptococcus pneumoniae ATCC: 49619 y Streptococcus mutans ATCC: 25175), patógenos de enfermedades respiratorias (Bachelor's thesis)

Peláez, L. M. C. (2010). Actividad antibacteriana de plantas medicinales en cepas clínicas de enterobacterias productoras de beta-lactamasas de espectro extendido.

Quispe Quispe, P., Vilca, A., & Mérida, S. (2011). Evaluación del efecto antiespasmódico del extracto hidroalcohólico y del aceite esencial de Artemisia Absinthium L.(Ajenjo) In vivo y Ex vivo

Ramírez, L. I., Rea, A. E., & Karaben, V. E. (2018). Llantén: propiedades y usos medicinales. *Revista de la Facultad de Odontología*, 11(1), 22-26.

Ramirez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et technica*, 15(42), 263-268

Ríos Macedo, M. A., Hernández, F., & Klaussen, J. (2016). Actividad antibacteriana de Chamaesyce thymifolia frente a Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y Escherichia coli; por el método de macrodilución y difusión en agar.



Romero, R. S., Domínguez, G., & Guzmán, D. R. (2014). Cuantificación de polifenoles en hojas de un clon de Uncaria tomentosa (WILLD. EX SCHULT) DC, proveniente de tres localidades de la región Ucayali. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 80(3), 174-182

Ropiak, H. M., Ramsay, A., & Mueller-Harvey, I. (2016). Condensed tannins in extracts from European medicinal plants and herbal products. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 121, 225-231.

Sagástegui, W., Cruzado, L., Cuellar, A., & Silva, C. (2015). Actividad antiplasmodium "in vitro" e "in vivo" de extractos y fracciones a partir de hojas de Artemisia absinthium L.(Asteraceae) que crece en Perú. *Revista Ciencia y Tecnología*, 11(1), 129-139.

Sankhalkar, S., & Vernekar, V. (2016). Quantitative and Qualitative analysis of Phenolic and Flavonoid content in Moringa oleifera Lam and Ocimum tenuiflorum L. *Pharmacognosy research*, 8(1), 16.

Ramayoni, S., & Martín, C. (2007). Estudio de la actividad antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Universitat Autònoma de Barcelona.

Ramirez, R. R. (2019). Efecto antimicrobiano de glicoproteínas de origen animal sobre bacterias patógenas. Avances de Investigación en Inocuidad de Alimentos, 2.

Ruiz-Reyes, E., & Suarez, M. (2015). Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 46(1), 9-24.

Santhi, K., & Sengottuvvel, R. (2016). Qualitative and quantitative phytochemical analysis of Moringa concanensis Nimmo. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 5(1), 633-640.

Stauffer, D., & Aharony, A. (2018). *Introduction to percolation theory*. Taylor & Francis.

Stringlis, I. A., de Jonge, R., & Pieterse, C. M. (2019). The Age of Coumarins in Plant-Microbe Interactions. *Plant and Cell Physiology*.

Tafur, J. D., Torres, J. A., & Villegas, M. V. (2011). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, 12(3).

Tuominen, A. (2017). Tannins and other polyphenols in Geranium sylvaticum: Identification, intraplant distribution and biological activity.



Tzekov, R., Kelly, S., & Hirani, A. (2018). Catechins as Potential Therapeutic Agents for Ocular Diseases. *Antioxidant Nutraceuticals: Preventive and Healthcare Applications*.

Valverde Balladares, P. V. (2015). Composición química, potencial antimicrobiano y letal de los aceites esenciales de las hojas de Hierba Luisa (*Cymbopogon Citratus*), Mastrante (*Ageratum Conyzoides*), Guabiduca (*Piper Carpunya*), Ajenjo (*Artemisia Absinthium*) y Cedrón (*Lippia Citriodora*), cultivados en la República del Ecuador.

Van Dyck, S., Gerbaux, P., & Flammang, P. (2010). Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian Ocean. *Marine Drugs*, 8(1), 173-189.

Vargas Solorzano, J. W. (2000). Obtención de extracto de uña de gato (*Uncaria tomentosa* Willd DC) y su aplicación en una bebida carbonatada.

Vásquez Tejeda, V. H. (2018). Evaluación del efecto antibacteriano del extracto metanólico de uña de gato sobre patógenos orales: *Staphylococcus Aureus* (ATCC® 25923™), *Fusobacterium Nucleatun* (ATCC® 25586™).

Vásquez, M. R. S. (2015). Estudio Fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedente de la región Amazonas. *UCV-SCIENTIA*, 7(2), 135-140.

Villacís-Chiriboga, J. (2017). Etnobotánica y Sistemas Tradicionales de Salud en Ecuador. Enfoque en la Guayusa (*Ilex Guayusa* Loes). *Etnobiología*, 15(3), 79-88.

Yáñez Arcos, G. I. (2014). *Investigación de la Actividad Antimicrobiana y Fitoquímica de Extractos de Plantas Medicinales frente a los Microorganismos Patógenos Escherichia coli y Candida albicans* (Bachelor's thesis).

Zhang, J., Ye, K. P., Zhang, X., Pan, D. D., Sun, Y. Y., & Cao, J. X. (2017). Antibacterial activity and mechanism of action of black pepper essential oil on meat-borne *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 7, 2094.

Zhang, M., Yang, X., Wei, Y., Wall, M., Songsak, T., Wongwiwatthanankit, S., & Chang, L. C. (2019). Bioactive Sesquiterpene Lactones Isolated from the Whole Plants of *Vernonia cinerea*. *Journal of natural products*, 82(8), 2124-2131.

Zhu, Y. D., Hong, J. Y., Bao, F. D., Xing, N., Wang, L. T., Sun, Z. H., ... & Wu, H. F. (2018). Triterpenoid saponins from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze and their biological activity. *Archives of pharmacal research*, 41(12), 1117-1130.



Zuta Arriola, N. (2014). Antividad antibacteriana In vitro de extractos de piper angustifolium (mático) y matricaria chamomilla (manzanilla) en cepas de staphylococcus aureus con resistencia múltiple.

Zuta Arriola, N. (2014). Antividad antibacteriana In vitro de extractos de piper angustifolium (mático) y matricaria chamomilla (manzanilla) en cepas de staphylococcus aureus con resistencia múltiple.



ANEXOS

Anexo 1. Tratamiento de la materia prima.



Fuente: Registro de Laboratorio.

Anexo 2. Proceso de maceración y agitación con el agitador horizontal “Shaker”.



Fuente: Registro de Laboratorio.

Anexo 3. Tamizaje fitoquímico a realizar en los extractos etanólico de las plantas.

Jonnathan Paúl Guayas Guamán
Patricio Israel Lazo Burga



Fuente: Los autores/ (Morón, Et al, 2008).

| Metabolito Secundario | Procedimiento | Interpretación |
|--|---|--|
| Catequinas | Con un capilar de vidrio, tomar una gota del extracto, colocar sobre un pedazo de papel filtro, añadir carbonato de sodio sobre la mancha formada y observar bajo luz UV de onda larga. | La formación de una mancha verde carmelina indicará el ensayo como positivo. |
| Resinas | 2 ml del extracto + 10 ml de agua destilada; agitar y fuertemente. | El ensayo es positivo cuando hay presencia de un precipitado. |
| Saponinas (Ensayo de la espuma) | 1 ml de extracto + 5 ml de agua destilada a 40°C, dejar reposar por 20 minutos y agitar fuertemente durante 5 minutos. | El ensayo es positivo cuando se observa la formación de espuma persistente por más de 15 minutos. |
| Flavonoides (Ensayo de Shinoda) | 1ml del extracto + magnesio en polvo o cinta de magnesio + 1ml de HCl concentrado, dejar reposar 5 minutos y luego agregar 1ml de alcohol amílico. | El ensayo es positivo cuando la fase del alcohol amílico se colorea de amarillo, rojo, naranja o violeta |
| Lactonas (Ensayo de Baljet) | 2 ml del extracto + 1 ml del reactivo de Baljet, | El ensayo es positivo cuando se da un cambio en la coloración o formación de un precipitado. |
| Antocianinas | 2 ml del extracto + 1 ml HCl concentrado, dejar enfriar y añadir 1ml de alcohol amílico + 1ml de agua destilada; dejar reposar hasta que se separen las fases. | El ensayo es positivo cuando la fase amílica se torna de un color rojizo. |
| Alcaloides | 2ml extracto+ 2ml de reactivo de Hager. | El ensayo es positivo cuando se da la |



| | | |
|--|--|---|
| (Ensayo de Hager) | | formación de turbidez o un precipitado |
| Triterpenos (Ensayo de Liebermann-Buchard.) | 2 ml del extracto + 1 ml de anhídrido acético + 1 ml de cloroformo, homogenizar y enfriar a baño de hielo; agregar 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. | El ensayo es positivo cuando se da un cambio de color a azul, rojo o anaranjado. |
| Taninos | 1 ml del extracto vegetal + 1 ml de formaldehido + 3 gotas de HCl concentrado, calentar a baño María a 70°C por 1 minutos. | El ensayo es positivo si se forma un precipitado color rojo. |
| Fenoles (Ensayo del Cloruro Férrico) | 2 ml del extracto + 2 ml de cloruro férrico 5%. | El ensayo es positivo cuando se da un cambio de coloración a rojo vino, azul o negro. |

Anexo 4. Proceso de siembra en placas de microdilución.



Fuente: Registro de Laboratorio.



Anexo 5. Absorbancias obtenidas en el primer ensayo de microdilución con extracto de *Uncaria tomentosa*.

| Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | 2500 | 1250 | 625 | 312,5 | 156,25 | 78,125 | 39,0625 | 19,5313 | 9,7656 | 4,8828 | Control de Esterilidad | Control de Crecimiento |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|------------------------|------------------------|
| A | 1,84 | 1,474 | 1,201 | 1,02 | 0,916 | 0,897 | 0,878 | 0,859 | 0,798 | 0,831 | 0,289 | 0,773 |
| B | 1,843 | 1,464 | 1,193 | 0,981 | 0,909 | 0,885 | 0,853 | 0,854 | 0,824 | 0,843 | 0,29 | 0,749 |
| C | 1,883 | 1,557 | 1,114 | 0,95 | 0,922 | 0,897 | 0,854 | 0,873 | 0,814 | 0,858 | 0,281 | 0,743 |
| D | 1,757 | 1,594 | 1,161 | 0,92 | 0,928 | 0,85 | 0,832 | 0,843 | 0,826 | 0,812 | 0,285 | 0,762 |
| E | 1,798 | 1,452 | 1,147 | 0,959 | 0,916 | 0,874 | 0,834 | 0,856 | 0,799 | 0,823 | 0,292 | 0,772 |
| F | 1,751 | 1,597 | 1,149 | 0,996 | 0,955 | 0,889 | 0,829 | 0,875 | 0,816 | 0,825 | 0,3 | 0,776 |
| G | 1,81 | 1,508 | 1,158 | 0,933 | 0,905 | 0,928 | 0,854 | 0,872 | 0,812 | 0,85 | 0,322 | 0,705 |
| H | 1,85 | 1,4 | 0,993 | 0,533 | 0,341 | 0,274 | 0,211 | 0,18 | 0,129 | 0,124 | 0,309 | 0,929 |
| Media | 1,81 | 1,52 | 1,16 | 0,97 | 0,92 | 0,89 | 0,85 | 0,86 | 0,81 | 0,83 | 0,29 | 0,75 |
| Desviación Estándar | 0,05 | 0,06 | 0,03 | 0,04 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,03 |
| Coeficiente de Variación | 2,64 | 4,05 | 2,53 | 3,67 | 1,80 | 2,68 | 2,05 | 1,39 | 1,35 | 1,96 | 4,63 | 3,33 |

Fuente: Registros de Laboratorio.

Anexo 6. Absorbancias obtenidas en el segundo ensayo de microdilución con extracto de *Uncaria tomentosa*.

| Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | 2500 | 1250 | 625 | 312,5 | 156,25 | 78,125 | 39,0625 | 19,5313 | 9,7656 | 4,8828 | Control de Esterilidad | Control de Crecimiento |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|------------------------|------------------------|
| A | 1,819 | 1,554 | 1,224 | 0,971 | 0,86 | 0,902 | 0,846 | 0,882 | 0,825 | 0,822 | 0,286 | 0,77 |
| B | 1,914 | 1,456 | 1,171 | 0,943 | 0,855 | 0,894 | 0,932 | 0,859 | 0,799 | 0,833 | 0,28 | 0,773 |
| C | 1,83 | 1,599 | 1,172 | 0,929 | 0,846 | 0,882 | 0,856 | 0,873 | 0,812 | 0,796 | 0,28 | 0,736 |
| D | 1,693 | 1,424 | 1,099 | 0,998 | 0,873 | 0,816 | 0,855 | 0,871 | 0,82 | 0,854 | 0,274 | 0,75 |
| E | 1,807 | 1,43 | 1,118 | 0,86 | 0,916 | 0,855 | 0,865 | 0,882 | 0,833 | 0,813 | 0,285 | 0,744 |
| F | 1,89 | 1,48 | 1,161 | 1,033 | 0,907 | 0,816 | 0,853 | 0,853 | 0,795 | 0,802 | 0,294 | 0,745 |
| G | 1,728 | 1,549 | 1,186 | 0,865 | 0,883 | 0,853 | 0,848 | 0,849 | 0,915 | 0,82 | 0,309 | 0,804 |
| H | 1,73 | 1,45 | 1,05 | 0,549 | 0,33 | 0,275 | 0,221 | 0,19 | 0,123 | 0,121 | 0,323 | 1,108 |
| Media | 1,81 | 1,50 | 1,16 | 0,94 | 0,88 | 0,86 | 0,87 | 0,86 | 0,83 | 0,82 | 0,29 | 0,76 |
| Desviación Estándar | 0,08 | 0,07 | 0,04 | 0,06 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,01 | 0,04 | 0,02 | 0,01 | 0,02 |
| Coeficiente de Variación | 4,40 | 4,57 | 3,60 | 6,86 | 3,02 | 4,07 | 3,49 | 1,36 | 4,89 | 2,38 | 4,04 | 3,11 |

Fuente: Registros de Laboratorio.



Anexo 7. Absorbancias obtenidas en el tercer ensayo de microdilución con extracto de *Uncaria tomentosa*.

| Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | 2500 | 1250 | 625 | 312,5 | 156,25 | 78,125 | 39,0625 | 19,5313 | 9,7656 | 4,8828 | Control de Esterilidad | Control de Crecimiento |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|------------------------|------------------------|
| A | 1,84 | 1,474 | 1,201 | 1,02 | 0,916 | 0,897 | 0,878 | 0,859 | 0,798 | 0,831 | 0,289 | 0,773 |
| B | 1,843 | 1,464 | 1,193 | 0,981 | 0,909 | 0,885 | 0,853 | 0,854 | 0,824 | 0,843 | 0,29 | 0,749 |
| C | 1,883 | 1,557 | 1,114 | 0,95 | 0,922 | 0,897 | 0,856 | 0,873 | 0,814 | 0,858 | 0,281 | 0,743 |
| D | 1,757 | 1,594 | 1,161 | 0,92 | 0,928 | 0,85 | 0,832 | 0,843 | 0,826 | 0,812 | 0,285 | 0,762 |
| E | 1,798 | 1,452 | 1,147 | 0,959 | 0,916 | 0,874 | 0,834 | 0,856 | 0,799 | 0,823 | 0,292 | 0,772 |
| F | 1,751 | 1,597 | 1,149 | 0,996 | 0,955 | 0,889 | 0,829 | 0,875 | 0,816 | 0,825 | 0,3 | 0,776 |
| G | 1,81 | 1,508 | 1,158 | 0,933 | 0,905 | 0,928 | 0,854 | 0,872 | 0,812 | 0,85 | 0,322 | 0,705 |
| H | 1,85 | 1,39 | 0,985 | 0,531 | 0,329 | 0,274 | 0,216 | 0,185 | 0,123 | 0,122 | 0,304 | 0,762 |
| Media | 1,81 | 1,52 | 1,16 | 0,97 | 0,92 | 0,89 | 0,85 | 0,86 | 0,81 | 0,83 | 0,29 | 0,75 |
| Desviación Estándar | 0,05 | 0,06 | 0,03 | 0,04 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,03 |
| Coeficiente de Variación | 2,64 | 4,05 | 2,53 | 3,67 | 1,80 | 2,68 | 2,06 | 1,39 | 1,35 | 1,96 | 4,63 | 3,33 |

Fuente: Registros de Laboratorio.

Anexo 8. Absorbancias obtenidas en el primer ensayo de microdilución con extracto de *Piper aduncum*.

| Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | 500 | 250 | 125 | 62,5 | 31,25 | 15,625 | 7,8125 | 3,9063 | 1,9531 | 0,9766 | Control de Esterilidad | Control de Crecimiento |
|------------------------------------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------------|------------------------|
| A | 0,642 | 0,597 | 0,618 | 0,588 | 0,618 | 0,614 | 0,626 | 0,634 | 0,641 | 0,6 | 0,28 | 0,732 |
| B | 0,595 | 0,497 | 0,512 | 0,519 | 0,535 | 0,572 | 0,638 | 0,632 | 0,592 | 0,648 | 0,278 | 0,756 |
| C | 0,643 | 0,622 | 0,619 | 0,628 | 0,644 | 0,564 | 0,627 | 0,608 | 0,603 | 0,617 | 0,289 | 0,768 |
| D | 0,637 | 0,604 | 0,663 | 0,603 | 0,606 | 0,612 | 0,643 | 0,534 | 0,614 | 0,633 | 0,28 | 0,745 |
| E | 0,679 | 0,606 | 0,622 | 0,5625 | 0,572 | 0,615 | 0,625 | 0,602 | 0,617 | 0,619 | 0,275 | 0,732 |
| F | 0,648 | 0,719 | 0,62 | 0,593 | 0,577 | 0,659 | 0,61 | 0,607 | 0,601 | 0,599 | 0,275 | 0,728 |
| G | 0,643 | 0,649 | 0,692 | 0,678 | 0,684 | 0,645 | 0,632 | 0,609 | 0,594 | 0,591 | 0,276 | 0,712 |
| H | 0,644 | 0,735 | 0,676 | 0,637 | 0,751 | 0,647 | 0,653 | 0,643 | 0,74 | 0,634 | 0,282 | 0,761 |
| Media | 0,64 | 0,61 | 0,62 | 0,60 | 0,61 | 0,61 | 0,63 | 0,60 | 0,61 | 0,62 | 0,28 | 0,74 |
| Desviación Estándar | 0,02 | 0,07 | 0,06 | 0,05 | 0,05 | 0,03 | 0,01 | 0,03 | 0,02 | 0,02 | 0,00 | 0,02 |
| Coeficiente de Variación | 3,84 | 10,82 | 8,99 | 8,37 | 8,18 | 5,67 | 1,69 | 5,51 | 2,79 | 3,31 | 1,76 | 2,54 |

Fuente: Registros de Laboratorio.

Anexo 9. Absorbancias obtenidas en el segundo ensayo de microdilución con extracto de *Piper aduncum*.



| Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | 500 | 250 | 125 | 62,5 | 31,25 | 15,625 | 7,8125 | 3,9063 | 1,9531 | 0,9766 | Control de Esterilidad | Control de Crecimiento |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------------|------------------------|
| A | 0,649 | 0,621 | 0,632 | 0,643 | 0,651 | 0,652 | 0,674 | 0,618 | 0,63 | 0,655 | 0,268 | 0,756 405 |
| B | 0,68 | 0,614 | 0,614 | 0,644 | 0,647 | 0,632 | 0,679 | 0,636 | 0,615 | 0,643 | 0,272 | 0,74 405 |
| C | 0,665 | 0,645 | 0,639 | 0,632 | 0,612 | 0,682 | 0,647 | 0,672 | 0,659 | 0,658 | 0,275 | 0,736 405 |
| D | 0,632 | 0,624 | 0,632 | 0,627 | 0,623 | 0,4626 | 0,619 | 0,627 | 0,651 | 0,626 | 0,277 | 0,74 405 |
| E | 0,648 | 0,648 | 0,622 | 0,612 | 0,598 | 0,64 | 0,649 | 0,615 | 0,598 | 0,664 | 0,28 | 0,722 405 |
| F | 0,684 | 0,657 | 0,674 | 0,627 | 0,664 | 0,591 | 0,629 | 0,592 | 0,667 | 0,631 | 0,278 | 0,709 405 |
| G | 0,655 | 0,612 | 0,679 | 0,628 | 0,608 | 0,612 | 0,618 | 0,614 | 0,672 | 0,678 | 0,291 | 0,745 405 |
| H | 0,13 | 0,149 | 0,146 | 0,148 | 0,149 | 0,146 | 0,146 | 0,144 | 0,154 | 0,144 | 0,301 | 0,688 405 |
| Media | 0,66 | 0,63 | 0,64 | 0,63 | 0,63 | 0,61 | 0,65 | 0,62 | 0,64 | 0,65 | 0,28 | 0,74 |
| Desviación Estándar | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,01 | 0,03 | 0,07 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,02 | 0,01 | 0,02 |
| Coeficiente de Variación | 2,82 | 2,86 | 3,91 | 1,73 | 3,98 | 11,67 | 3,84 | 3,97 | 4,36 | 2,84 | 2,61 | 2,10 |

Fuente: Registros de Laboratorio.

Anexo 10. Absorbancias obtenidas en el tercer ensayo de microdilución con extracto de *Piper aduncum*.

| Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | 500 | 250 | 125 | 62,5 | 31,25 | 15,625 | 7,8125 | 3,9063 | 1,9531 | 0,9766 | Control de Esterilidad | Control de Crecimiento |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------------|------------------------|
| A | 0,953 | 0,941 | 0,902 | 0,882 | 0,876 | 0,922 | 0,801 | 0,817 | 0,917 | 0,827 | 0,268 | 0,995 405 |
| B | 0,942 | 0,954 | 0,928 | 0,946 | 0,902 | 0,861 | 0,844 | 0,916 | 0,874 | 0,86 | 0,281 | 1,078 405 |
| C | 0,873 | 0,933 | 0,911 | 0,874 | 0,881 | 0,878 | 0,896 | 0,87 | 0,81 | 0,878 | 0,21 | 1,049 405 |
| D | 0,931 | 0,874 | 0,862 | 0,871 | 0,887 | 0,883 | 0,827 | 0,875 | 0,871 | 0,861 | 0,286 | 1,026 405 |
| E | 0,865 | 0,902 | 0,873 | 0,887 | 0,9 | 0,843 | 0,849 | 0,865 | 0,809 | 0,845 | 0,282 | 1,044 405 |
| F | 0,903 | 0,849 | 0,925 | 0,945 | 0,928 | 0,847 | 0,875 | 0,887 | 0,896 | 0,912 | 0,282 | 1,055 405 |
| G | 0,825 | 0,824 | 0,872 | 0,885 | 0,924 | 0,931 | 0,877 | 0,933 | 0,866 | 1,005 | 0,285 | 1,098 405 |
| H | 0,136 | 0,143 | 0,145 | 0,149 | 0,144 | 0,152 | 0,148 | 0,145 | 0,155 | 0,153 | 0,283 | 1,11 405 |
| Media | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,90 | 0,88 | 0,85 | 0,88 | 0,86 | 0,88 | 0,27 | 1,05 |
| Desviación Estándar | 0,05 | 0,05 | 0,03 | 0,03 | 0,02 | 0,03 | 0,03 | 0,04 | 0,04 | 0,06 | 0,03 | 0,03 |
| Coeficiente de Variación | 5,20 | 5,51 | 3,02 | 3,62 | 2,25 | 3,93 | 3,83 | 4,27 | 4,71 | 6,75 | 10,11 | 3,20 |

Fuente: Registros de Laboratorio.



Anexo 11. Absorbancias obtenidas en el primer ensayo de microdilución con extracto de *Artemisia absinthium*.

| Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | 500 | 250 | 125 | 62,5 | 31,25 | 15,625 | 7,8125 | 3,9063 | 1,9531 | 0,9766 | Control de Esterilidad | Control de Crecimiento |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------------|------------------------|
| A | 0,789 | 0,747 | 0,654 | 0,652 | 0,589 | 0,601 | 0,538 | 0,602 | 0,524 | 0,596 | 0,273 | 0,622 |
| B | 0,759 | 0,552 | 0,54 | 0,541 | 0,484 | 0,529 | 0,559 | 0,518 | 0,545 | 0,624 | 0,281 | 0,466 |
| C | 0,721 | 0,682 | 0,62 | 0,59 | 0,588 | 0,555 | 0,604 | 0,609 | 0,596 | 0,625 | 0,282 | 0,492 |
| D | 0,731 | 0,573 | 0,56 | 0,592 | 0,617 | 0,57 | 0,572 | 0,603 | 0,587 | 0,574 | 0,279 | 0,569 |
| E | 0,717 | 0,689 | 0,642 | 0,69 | 0,61 | 0,622 | 0,583 | 0,584 | 0,584 | 0,539 | 0,282 | 0,472 |
| F | 0,704 | 0,671 | 0,665 | 0,661 | 0,609 | 0,569 | 0,62 | 0,588 | 0,571 | 0,592 | 0,275 | 0,661 |
| G | 0,749 | 0,582 | 0,55 | 0,537 | 0,645 | 0,599 | 0,598 | 0,646 | 0,554 | 0,549 | 0,281 | 0,821 |
| Blanco | 0,75 | 0,766 | 0,852 | 0,829 | 0,761 | 0,759 | 0,713 | 0,709 | 0,764 | 0,571 | 0,279 | 0,958 |
| Media | 0,74 | 0,64 | 0,60 | 0,61 | 0,59 | 0,58 | 0,58 | 0,59 | 0,57 | 0,59 | 0,28 | 0,59 |
| Desviación Estándar | 0,03 | 0,07 | 0,05 | 0,06 | 0,05 | 0,03 | 0,03 | 0,04 | 0,03 | 0,03 | 0,00 | 0,13 |
| Coeficiente de Variación | 3,95 | 11,39 | 8,77 | 9,85 | 8,65 | 5,46 | 4,83 | 6,52 | 4,59 | 5,76 | 1,29 | 21,88 |

Fuente: Registros de Laboratorio.

Anexo 12. Absorbancias obtenidas en el segundo ensayo de microdilución ensayo con extracto de *Artemisia absinthium*.

| Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | 500 | 250 | 125 | 62,5 | 31,25 | 15,625 | 7,8125 | 3,9063 | 1,9531 | 0,9766 | Control de Esterilidad | Control de Crecimiento |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------------|------------------------|
| A | 0,786 | 0,964 | 0,652 | 0,774 | 0,717 | 0,769 | 0,557 | 0,583 | 0,688 | 0,695 | 0,268 | 0,764 |
| B | 0,752 | 0,775 | 0,635 | 0,617 | 0,588 | 0,552 | 0,525 | 0,613 | 0,775 | 0,583 | 0,282 | 0,556 |
| C | 0,824 | 0,873 | 0,702 | 0,624 | 0,569 | 0,629 | 0,602 | 0,794 | 0,792 | 0,68 | 0,286 | 0,46 |
| D | 0,706 | 0,79 | 0,625 | 0,573 | 0,527 | 0,5 | 0,698 | 0,636 | 0,787 | 0,541 | 0,285 | 0,446 |
| E | 0,743 | 0,7 | 0,651 | 0,665 | 0,639 | 0,635 | 0,62 | 0,762 | 0,842 | 0,553 | 0,287 | 0,623 |
| F | 0,774 | 0,732 | 0,811 | 0,758 | 0,653 | 0,825 | 0,624 | 0,701 | 0,603 | 0,609 | 0,283 | 0,636 |
| G | 0,75 | 0,605 | 0,581 | 0,541 | 0,501 | 0,514 | 0,615 | 0,761 | 0,482 | 0,47 | 0,287 | 0,707 |
| Blanco | 0,735 | 0,727 | 0,52 | 0,659 | 0,652 | 0,616 | 0,424 | 0,572 | 0,551 | 0,633 | 0,307 | 0,82 |
| Media | 0,76 | 0,78 | 0,67 | 0,65 | 0,60 | 0,63 | 0,61 | 0,69 | 0,71 | 0,59 | 0,28 | 0,60 |
| Desviación Estándar | 0,04 | 0,12 | 0,07 | 0,09 | 0,08 | 0,13 | 0,05 | 0,08 | 0,13 | 0,08 | 0,01 | 0,12 |
| Coeficiente de Variación | 4,88 | 15,04 | 11,08 | 13,59 | 12,61 | 19,78 | 9,05 | 11,99 | 18,02 | 13,43 | 2,37 | 19,92 |

Fuente: Registros de Laboratorio.



Anexo 13. Absorbancias obtenidas en el tercer ensayo de microdilución con extracto de *Artemisia absinthium*.

| Concentración ($\mu\text{g/ml}$) | 500 | 250 | 125 | 62,5 | 31,25 | 15,625 | 7,8125 | 3,9063 | 1,9531 | 0,9766 | Control de Esterilidad | Control de Crecimiento |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|------------------------|------------------------|
| A | 0,651 | 0,592 | 0,617 | 0,652 | 0,697 | 0,612 | 0,705 | 0,581 | 0,511 | 0,537 | 0,268 | 0,764 |
| B | 0,677 | 0,679 | 0,636 | 0,695 | 0,654 | 0,593 | 0,634 | 0,552 | 0,552 | 0,576 | 0,276 | 0,556 |
| C | 0,695 | 0,723 | 0,612 | 0,711 | 0,617 | 0,638 | 0,567 | 0,604 | 0,542 | 0,593 | 0,276 | 0,46 |
| D | 0,698 | 0,731 | 0,678 | 0,605 | 0,606 | 0,618 | 0,548 | 0,598 | 0,673 | 0,592 | 0,274 | 0,446 |
| E | 0,748 | 0,671 | 0,623 | 0,639 | 0,688 | 0,679 | 0,646 | 0,586 | 0,665 | 0,555 | 0,281 | 0,623 |
| F | 0,669 | 0,646 | 0,653 | 0,601 | 0,682 | 0,666 | 0,521 | 0,579 | 0,616 | 0,578 | 0,285 | 0,636 |
| G | 0,699 | 0,602 | 0,729 | 0,594 | 0,563 | 0,541 | 0,485 | 0,485 | 0,548 | 0,569 | 0,304 | 0,707 |
| Blanco | 0,236 | 0,208 | 0,183 | 0,175 | 0,167 | 0,16 | 0,156 | 0,159 | 0,154 | 0,149 | 0,286 | 0,701 |
| Media | 0,69 | 0,66 | 0,65 | 0,64 | 0,64 | 0,62 | 0,59 | 0,57 | 0,59 | 0,57 | 0,28 | 0,60 |
| Desviación Estándar | 0,03 | 0,05 | 0,04 | 0,05 | 0,05 | 0,05 | 0,08 | 0,04 | 0,06 | 0,02 | 0,01 | 0,12 |
| Coeficiente de Variación | 4,44 | 8,16 | 6,44 | 7,25 | 7,77 | 7,48 | 13,26 | 7,15 | 10,97 | 3,51 | 4,15 | 19,92 |

Fuente: Registros de Laboratorio.

Anexo 14. Absorbancias de blancos obtenidas en el ensayo de microdilución.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A | 2,509 | 1,829 | 0,932 | 0,568 | 0,46 | 0,42 | 0,264 | 0,217 | 0,188 | 0,17 | 0,141 | 0,147 |
| B | 2,744 | 1,743 | 0,904 | 0,544 | 0,433 | 0,363 | 0,274 | 0,216 | 0,185 | 0,165 | 0,147 | 0,152 |
| C | 0,239 | 0,191 | 0,183 | 0,17 | 0,166 | 0,158 | 0,154 | 0,154 | 0,156 | 0,153 | 0,153 | 0,149 |
| D | 0,228 | 0,203 | 0,181 | 0,17 | 0,169 | 0,159 | 0,156 | 0,156 | 0,155 | 0,164 | 0,159 | 0,151 |
| E | 0,216 | 0,195 | 0,18 | 0,171 | 0,165 | 0,155 | 0,155 | 0,151 | 0,157 | 0,154 | 0,151 | 0,15 |
| F | 0,13 | 0,149 | 0,151 | 0,163 | 0,155 | 0,156 | 0,153 | 0,154 | 0,154 | 0,154 | 0,159 | 0,146 |
| G | 0,136 | 0,143 | 0,145 | 0,151 | 0,154 | 0,152 | 0,153 | 0,153 | 0,155 | 0,153 | 0,155 | 0,159 |
| H | 0,131 | 0,143 | 0,146 | 0,143 | 0,15 | 0,146 | 0,146 | 0,146 | 0,145 | 0,147 | 0,149 | 0,147 |

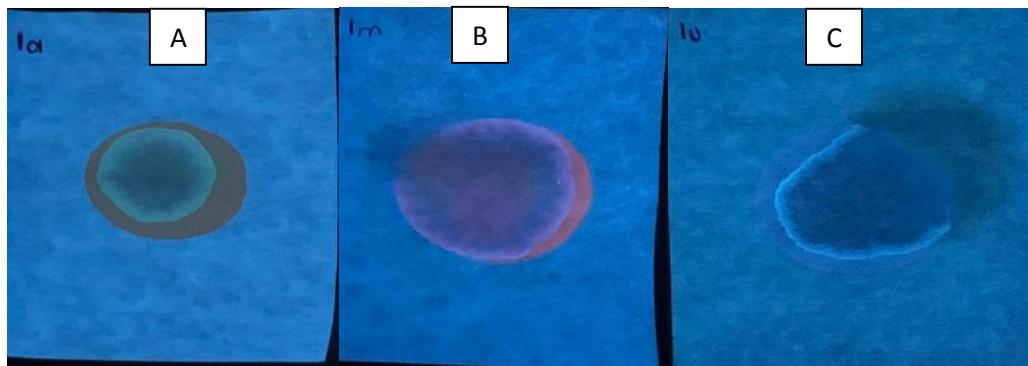
A y B: *Uncaria tomentosa*; **C, D y E:** *Piper aduncum*; **F, G y H:** *Artemisia absinthium*

Fuente: Registros de Laboratorio.



GALERIA DE FOTOS

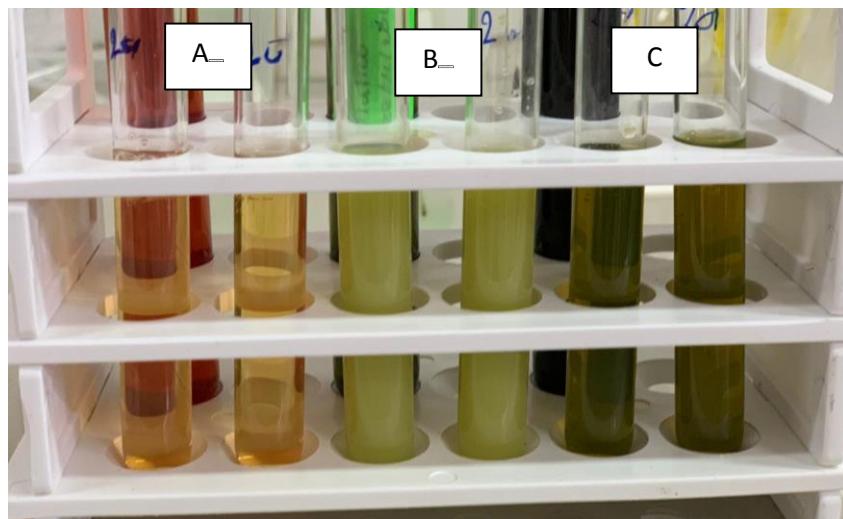
Ensayo para identificar catequinas visto bajo luz UV de onda larga.



A: *Artemisia absinthium*; **B:** *Piper aduncum*; **C:** *Uncaria tomentosa*.

Fuente: Registro de Laboratorio.

Ensayo para identificar resinas.

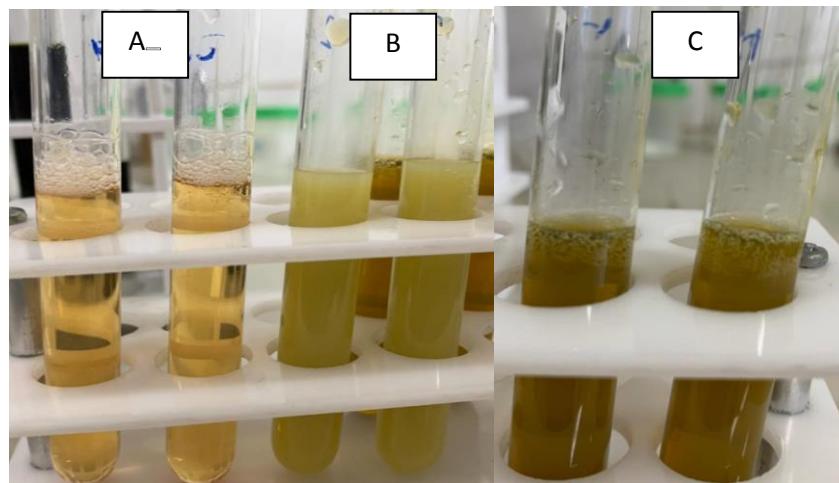


A: *Uncaria tomentosa* (-); **B:** *Piper aduncum* (+++); **C:** *Artemisia absinthium*(-).

Fuente: Registro de Laboratorio.



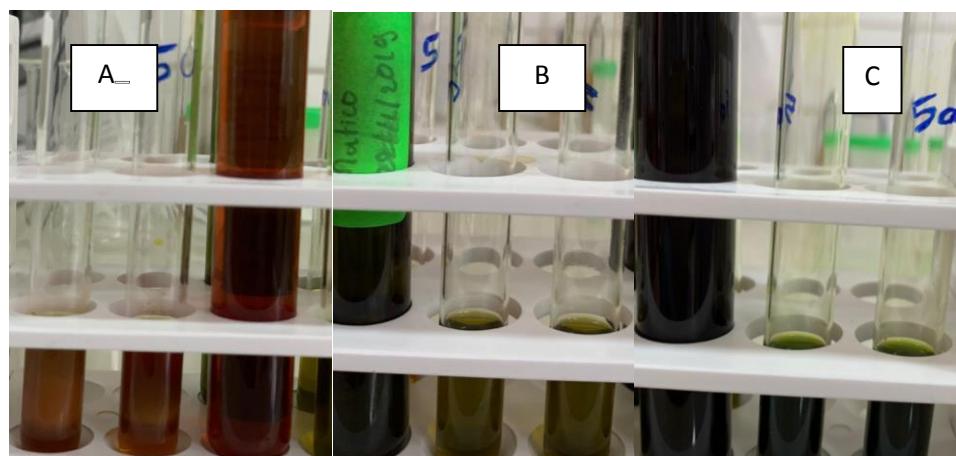
Ensayo para identificar saponinas.



. **A:** *Uncaria tomentosa* (++); **B:** *Piper aduncum* (-); **C:** *Artemisia absinthium* (+).

Fuente: Registro de Laboratorio.

Ensayo para identificar lactonas.

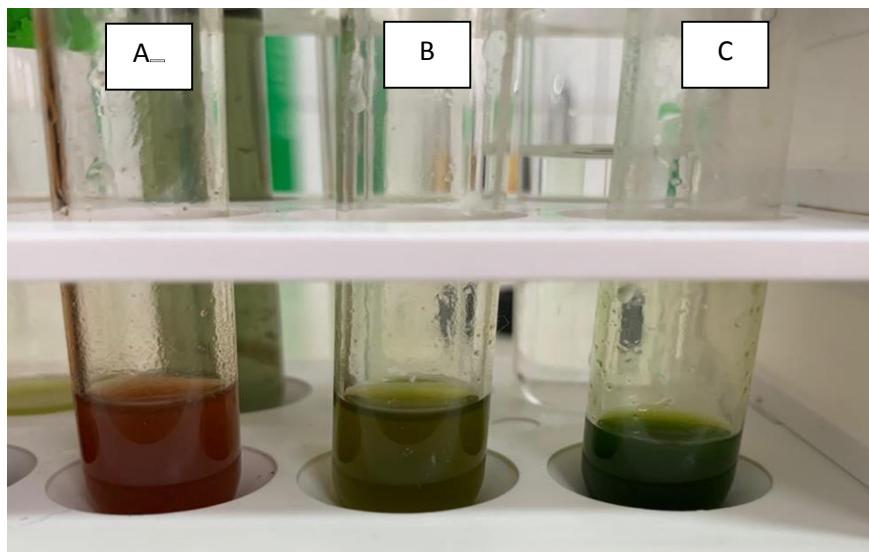


. **A:** *Uncaria tomentosa* (+); **B:** *Piper aduncum* (-); **C:** *Artemisia absinthium* (-).

Fuente: Registro de Laboratorio.



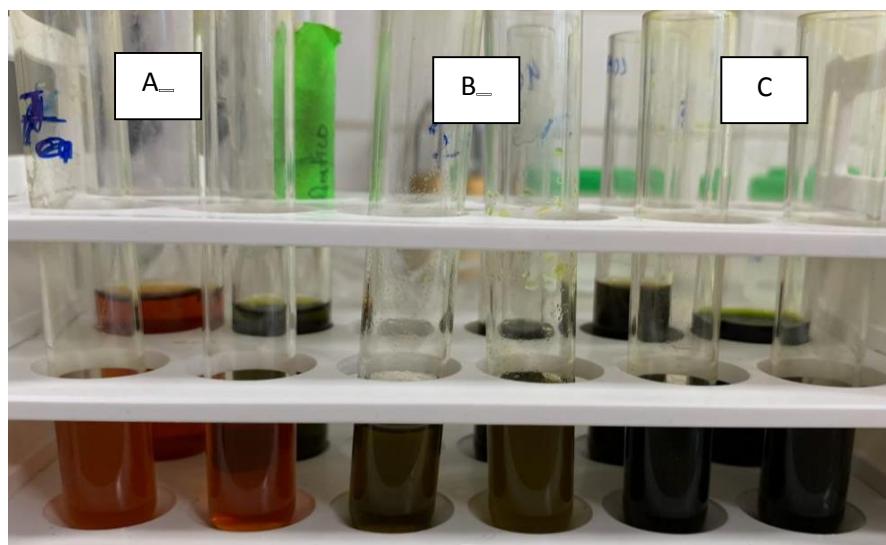
Ensayo para identificar antocianinas.



. **A:** *Uncaria tomentosa* (+); **B:** *Piper aduncum* (-); **C:** *Artemisia absinthium* (-).

Fuente: Registro de Laboratorio.

Ensayo para identificar alcaloides.

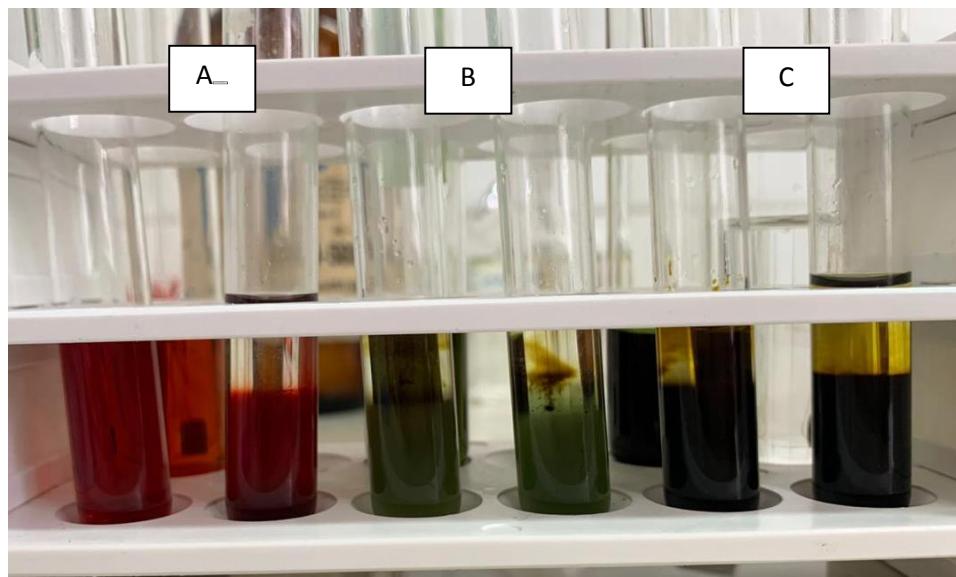


A: *Uncaria tomentosa* (+++); **B:** *Piper aduncum* (++); **C:** *Artemisia absinthium* (++) .

Fuente: Registro de Laboratorio.



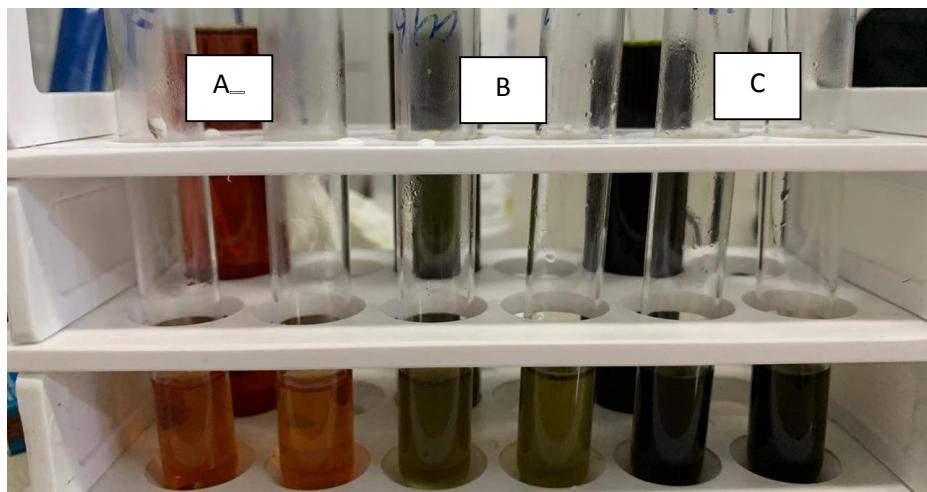
Ensayo para identificar triterpenos.



. **A:** *Uncaria tomentosa* (++); **B:** *Piper aduncum* (-); **C:** *Artemisia absinthium* (+).

Fuente: Registro de Laboratorio.

Ensayo para identificar taninos.

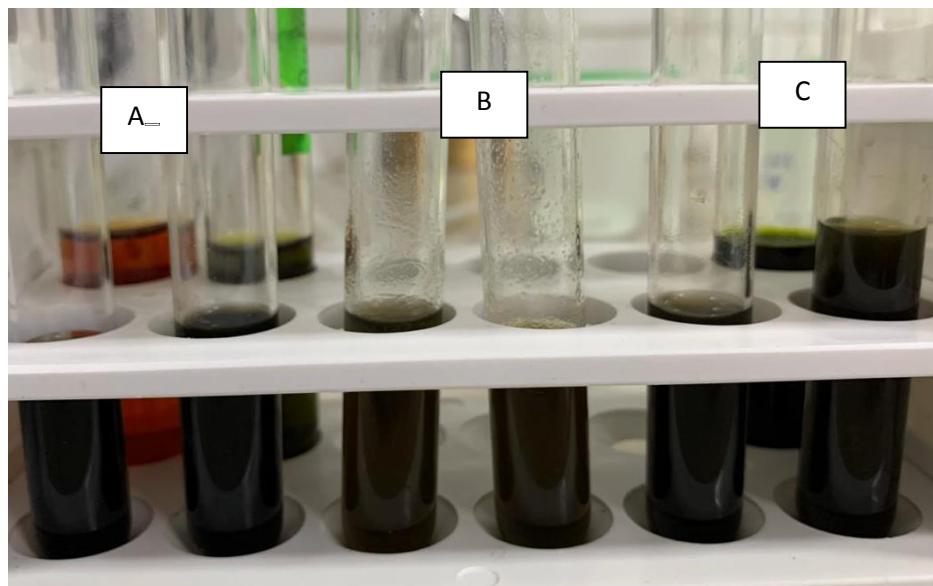


A: *Uncaria tomentosa* (+); **B:** *Piper aduncum* (+++); **C:** *Artemisia absinthium* (+).

Fuente: Registro de Laboratorio.



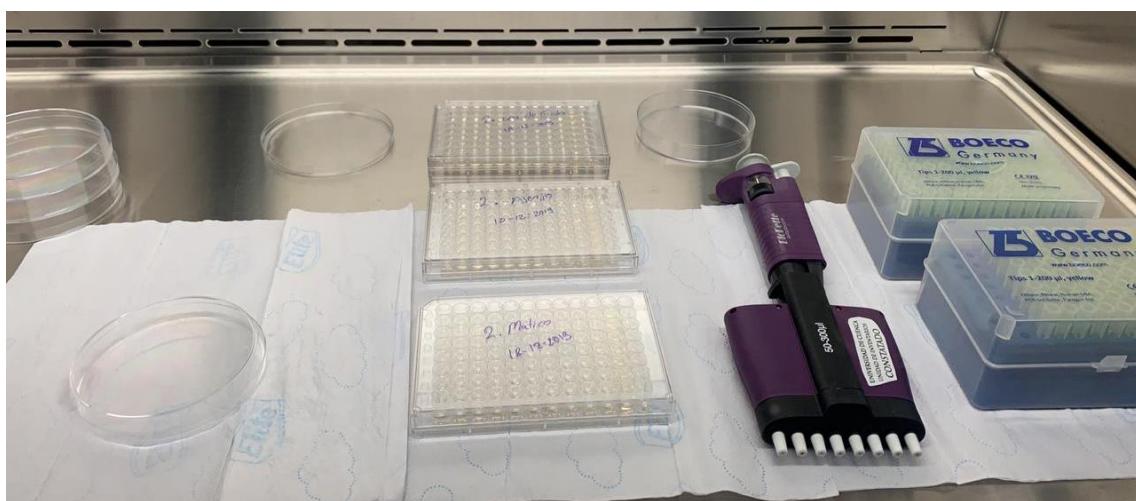
Ensayo para identificar fenoles.



A: *Uncaria tomentosa* (++) ; **B:** *Piper aduncum* (+); **C:** *Artemisia absinthium* (+).

Fuente: Registro de Laboratorio.

Materiales usados para realizar la técnica de microdilución en placa.



Fuente: Registro de Laboratorio.

