



**REPÚBLICA DEL ECUADOR**  
**UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO**  
**VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DEL  
TÍTULO DE MAGISTER EN QUÍMICA APLICADA**

**TÍTULO:**

Caracterización fitoquímica y actividad antimicrobiana del aceite esencial de la planta Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui* J.F. GME)

**AUTOR**

Luis Salvador Moncayo Molina

**TUTOR**

Dr. Manuel Alejandro Fiallos Cárdenas, Mgs.

**MILAGRO, marzo de 2022**

**ECUADOR**

## ACEPTACIÓN DE LA AUTORÍA

Es una carta elaborada por el/a tutor/a en la que debe constar la revisión del proyecto de Tesis y la aceptación de la tutoría. La carta debe estar firmada por el/a tutor/a.

Ejemplo:

Por la presente hago constar que he analizado el proyecto de grado presentado por el maestrante **Luis Salvador Moncayo Molina**, para optar el título de **MAGISTER EN QUÍMICA APLICADA** y que acepto tutoriar al maestrante durante la etapa del desarrollo del trabajo hasta su presentación, evaluación y sustentación.

Milagro, a los 04 días del mes de octubre del 2021.

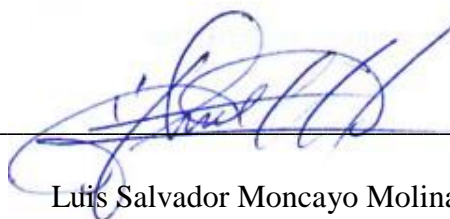


**Manuel Alejandro Fallos Cárdenas.**  
C.I. 0919525337

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

El autor de esta investigación declara ante el Comité Académico del Programa de Maestría en Química Aplicada de la Universidad Estatal de Milagro, que el trabajo presentado es de mi propia autoría, no contiene material escrito por otra persona, salvo el que está referenciado debidamente en el texto; parte del presente documento o en su totalidad no ha sido aceptado para el otorgamiento de cualquier otro Título de una institución nacional o extranjera.

Milagro, a los 17 días del mes de marzo de 2022



Luis Salvador Moncayo Molina

CI: 0300885670

## CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

EL TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de **MAGÍSTER EN QUÍMICA APLICADA**, otorga al presente trabajo de titulación las siguientes calificaciones:

MEMORIA CIENTÍFICA	[ 60 ]	
DEFENSA ORAL	[ 40 ]	
TOTAL	[ 100 ]	
EQUIVALENTE	[ EXCELENTE ]	



**PRESIDENTE/A DEL TRIBUNAL**  
Freddy Espinoza Carrasco, MSc.



**DIRECTOR/A TFM**  
Manuel Flallos Cárdenas, MSc.



**SECRETARIO/A DEL TRIBUNA**  
Juan Valenzuela Cobos, PhD

## **DEDICATORIA**

A mis hijos, motivos de mi inpercedero esfuerzo.

A ms padres, autores de mi existencia y ejemplo de mi proceder.

A mi esposa, por su ánimo y paciencia. Por estar siempre a mi lado....

Luis.

## **AGRADECIMIENTO**

Empiezo expresando mi eterna gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre mi vida.

A la Universidad Nacional de Milagro (UNEMI), Programa de Maestría en Química Aplicada, en la persona del Doctor Manuel Angel Fiallos Cárdenas, tutor y hombre de ciencia; por su dedicación, apoyo y predisposición incondicional en el desarrollo de la presente investigación. Al personal docente y a todas las personas e instituciones que contribuyeron directa e indirectamente en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Muchas gracias

## CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Ingeniero.  
Fabricio Guevara Viejó, PhD.  
**RECTOR**  
**Universidad Estatal de Milagro**  
Presente.

Mediante el presente documento, libre y voluntariamente procedo a hacer entrega de la Cesión de Derecho del Autor del Trabajo realizado como requisito previo para la obtención de mi Título de Cuarto Nivel, en la Maestría de Química Aplicada cuyo tema fue: Caracterización fitoquímica y actividad antimicrobiana del aceite esencial de la planta Chuquiragua (*Chuquiraga jussieui* y que corresponde a al Departamento de Investigación y Postgrado.

Milagro, 17 de.marzo de 2022



Luis Salvador Moncayo Molina

CI: 0300885670

## ÍNDICE GENERAL

ACEPTACIÓN DE LA AUTORÍA.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	iii
CERTIFICADO DE LA DEFENSA.....	iv
DEDICATORIA .....	v
AGRADECIMIENTO .....	vi
CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR .....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	2
EL PROBLEMA.....	2
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	2
1.1.1. Delimitación del problema.....	3
2. OBJETIVOS .....	6
1.1.2.1, Objetivo General .....	6
1.2. JUSTIFICACIÓN .....	6
CAPÍTULO II.....	9
2.1. MARCO TEÓRICO.....	9
CAPÍTULO III.....	56
MATERIALES Y MÉTODOS .....	56
CAPÍTULO IV .....	65
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	65
CAPITULO V.....	82
5.1. CONCLUSIONES .....	82
5.2. RECOMENADCIONES .....	83
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	84
ANEXOS .....	100



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de Barnadesioideae (Chuquiraga) y su distribución geográfica. ....	14
Tabla 2. Componentes químicos reportados en miembros de Barnadesioideae. ....	15
Tabla 3. Nombres comunes y usos medicinales de especies del género Chuquiraga.....	19
Tabla 4. Actividades biológicas reportadas para especies del género Chuquiraga.....	21
Tabla 5. Propiedades biológicas de algunos metabolitos secundarios aislados de plantas. .....	32
Tabla 6. Principales disolventes utilizados para extraer una amplia variedad de compuestos químicos activos (metabolitos secundarios) de las plantas. ....	36
Tabla 7. Principales clases de compuestos con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas.....	46
Tabla 8. Rendimiento por destilación y general del aceite esencial de la parte arearea (hojas y flores) de la especie Chuquiraga Jussieui. ....	65
Tabla 9. Composición química del aceite esencial de la parte arearea (hojas y flores) de la especie Chuquiraga Jussieui. ....	67
Tabla 10. Resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana en el control negativo DMSO, frente a diferentes cepas bacterianas .....	71
Tabla 11. Halos de inhibición de la actividad antimicrobiana de la Ciprofloxacino y Ketoconazol a una concentración de 3.0 mg/mL.....	72
Tabla 12. Resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Chuquiragua jussieui, frente a diferentes cepas bacterianas. ....	73
Tabla 13. Halo de inhibición del aceite esencial de Chuquiragua jussieui frente a diferentes cepas bacterianas.....	74
Tabla 14. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial de la Chuquiragua jussieui y el patrón positivo (Ciprofloxacino y Ketoconazol) .....	75
Tabla 15. Gráfico de la Bandeja de Microdilución.....	77
Tabla 16. Resultados de las pruebas para determinar la MIC del aceite esencial de Chuquiragua jussieui, frente a las cepas de microorganismos.....	78
Tabla 17. Actividad antimicrobiana del aceite esencia de Chuquiragua Jussieui .....	79
Tabla 18. Clasificación de la actividad antimicroniana de acuerdo a la MIC (Paredes et al., 2016) .....	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Hábitos vegetales utilizados con fines médicos en Ecuador .....	11
Figura 2. Componentes químicos más frecuentes de la subfamilia Barnadesioideae.....	16
Figura 3. Foto de la especie <i>Chuquiraga jussieui</i> .....	17
Figura 4. Muestras comerciales de la especie <i>Chuquiraga</i> : A) Flores de <i>Chuquiraga jussieui</i> (Mercados de la ciudad de Azogues y Bibliàn, Ecuador); B) Partes aéreas de <i>Chuquiraga jussieui</i> y <i>Chuquiraga spinosa</i> (Mercado de la Ciudad de Puno y La Oroya, Perú); C) Cápsulas que contienen <i>Chuquiraga jussieui</i> y <i>Chuquiraga spinosa</i> en polvo (Comercializado en Austria y Alemania) .....	24
Figura 5. Cálculo del factor de retención de TLC (Fr) .....	27
Figura 6. Procedimiento para analizar las propiedades químicas y actividad biológica de productos naturales .....	33
Figura 7. Principales disolventes ordenados de menor a mayor polaridad.....	36
Figura 8. Sitios y mecanismos de acción que pueden ser sitios para la acción de compuestos naturales en la célula bacteriana .....	44
Figura 9. Diagrama que ilustra el método de difusión en disco de Kirby-Bauer utilizando 5 antibióticos diferentes (A, B, C, D, E). Las flechas indican la zona de inhibición.....	49
Figura 10. Parroquia Chorocopte y laguna de Patococha, cantón Cañar.....	56
Figura 11. Comunidades de Absul y Romerillom, cantón El Tambo.....	57
Figura 12. Localización satelital de los lugares de muestreo.....	57
Figura 13. Extractor de aceite esencial Clevenger (modificado).....	59
Figura 14. Esquema de la determinación de MIC y CMM.....	64

## RESUMEN

El desarrollo de mecanismos de resistencia antimicrobianos vienen siendo un problema mundial, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), esto podría provocar 10 millones de muertes para 2050. Además, impacta en el cumplimiento de algunas de las metas establecidas en los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). En este sentido, la búsqueda de sustancias bioactivas, principalmente derivadas de plantas es una alternativa viable en las últimas décadas. La presente investigación tiene como objetivo conocer el rendimiento, la composición fitoquímica y la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de especie la *Chuquiraga jussieui*. Los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación utilizando un aparato tipo Clevenger. El rendimiento de 0,0074%. (p/v), se obtuvo de la relación peso del aceite esencial obtenido y peso de la materia prima fresca utilizada. Los compuestos fitoquímicos se identificaron por Cromatografía Gasosa acoplada a Espectrometría de Masas (CG-SM), encontrándose 73 componentes con más del 76% de compuestos oxigenados, además compuestos carbonilos, sesquiterpenos y fenilpropanoides. La evaluación de la actividad antibacteriana se realizó adaptando el método de difusión en medio sólido, estableciendo la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima Microbiana (CMM). Los microorganismos utilizados fueron las cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Pseudomona aeruginosa*; identificándose halos de inhibición significativos de 27,2 mm., y 24,2 mm., que demuestra sensibilidad frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida Albicans* (MIC > 30 µl/mL y CMM > 2400).

**Palabras claves:** rendimiento, composición fitoquímica, actividad antimicrobiana,

## ABSTRACT

The development of antimicrobial resistance mechanisms has been a global problem, according to the World Health Organization (WHO), this could cause 10 million deaths by 2050. In addition, it impacts the fulfillment of some of the goals established in the Objectives of Sustainable Development (SDG). In this sense, the search for bioactive substances, mainly derived from plants, is a viable alternative in recent decades. The objective of this research is to know the yield, the phytochemical composition and the antimicrobial activity of the essential oils of the *Chuquiraga jussieui* species. Essential oils were obtained by hydrodistillation using a Clevenger type apparatus. The yield of 0.0074%. (w/v), was obtained from the weight ratio of the essential oil obtained and the weight of the fresh raw material used. The phytochemical compounds were identified by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-SM), finding 73 components with more than 76% oxygenated compounds, as well as carbonyl compounds, sesquiterpenes and phenylpropanoids. The evaluation of the antibacterial activity was carried out adapting the diffusion method in solid medium, establishing the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Microbial Concentration (CMM). The microorganisms used were the strains of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*; Significant inhibition halos of 27.2 mm and 24.2 mm were identified, demonstrating sensitivity against *Staphylococcus aureus* and *Candida Albicans* (MIC > 30  $\mu$ l/mL and CMM > 2400).

**Keywords:** performance, phytochemical composition, antimicrobial activity.

## INTRODUCCIÓN

En Ecuador, la utilización de plantas medicinales es una experiencia muy habitual, especialmente entre los habitantes de las zonas rurales que suelen encontrar una amplia variedad de estas plantas en los mercados populares, práctica que proviene de conocimientos ancestrales. Se estima que se utilizan aproximadamente 5.100 especies de plantas vegetales por diferentes motivos; sin embargo 3.188 se utilizan con fines medicinales como infecciones, heridas, afecciones respiratorias, trastornos digestivos e inflamaciones, entre otros (Rondón et al., 2015). De acuerdo a Fisher y Phillips (2008), el 75,1% de estas especies medicinales son nativas, el 11% son especies introducidas y endémicas el 5%; pertenecientes a las familias: *Solanaceae*, *Fabaceae*, *Rubiaceae* y *Araceae* como las más utilizadas.

Algunos miembros de los géneros *Barnadesia*, *Dasyphyllum* como la especie *Chuquiraga jussieui*, se informan en la medicina tradicional de Chile, Argentina, Brasil, Bolivia, Perú, Colombia y Ecuador, donde son conocidos por sus propiedades antitusivas, expectorantes, antiinflamatorias y muchas otras (*Chuquiraga jussieui*, *Chuquiraga spinosa* y *Chuquiraga weberbaueri*), son especies que se venden con frecuencia en los mercados de plantas medicinales, donde se recomiendan comúnmente para el alivio de trastornos genitourinarios y reproductivos en mujeres y hombres (Rondón et al., 2015). Según la medicina popular, el té de Chuquiragua podría usarse como diurético, tónico para el hígado y el estómago, tos, para tratar la malaria, fiebre, dolores molares, inflamaciones e incluso como antiséptico para el tracto urinario y la próstata (Dueñas-Rivadeneira et al., 2017). La *Chuquiraga jussieui*, perteneciente a la familia de las Asteraceae, subfamilia Barnadesioidea, es conocida localmente como Chuquiragua, una especie andina que crece a más de 3.000 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m.), siendo utilizada silvestremente como alimento por los colibríes y como insumo fundamental en la práctica de los rituales y la medicina tradicional por ser una planta endémica utilizada ancestralmente de la provincia del Cañar, Chimborazo y Azuay (León-Yáñez et al, 2011). La presente investigación tiene como objetivos obtener el rendimiento, caracterizar fitoquímicamente y analizar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de la especie *Chuquiraga jussieui*, para ofrecer al lector información científica útil y actualizada como insumo para alternativa terapéutica y líneas de investigación.

## CAPITULO I

### EL PROBLEMA

#### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

##### 1.1.1. Problematización

Las enfermedades infecciosas y no infecciosas como las producidas en las vías urinarias, prostatitis, ulcera péptica, amigdalitis, candidiasis, hipercolesterolemia entre otras; representan una amenaza continua y creciente para la salud y el bienestar humano. Son las causas de una gran morbilidad y mortalidad mundial, aunque son los países en desarrollo cargan con la mayor parte del problema (Tariq et al., 2019). Las infecciones causadas por patógenos nuevos y resistentes a los antibióticos aumenta a diario, y el aumento de la proporción de pacientes con inmunodeficiencia ha dado lugar a un aumento de las infecciones graves e invasivas (OMS, 2017) situación más evidenciable en los países en desarrollo como Ecuador (Gallegos-Zurita, 2019)

El rápido desarrollo de la resistencia antimicrobiana ha generado un alto riesgo para la salud pública a nivel del mundo. La resistencia de las bacterias a los antibióticos ha aumentado hasta tal punto que la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2017); advierte sobre una era posterior a los antibióticos (Vanegas-Múnera y Jiménez-Quiceno, 2020). Esta amenaza global se genera cuando microorganismos como hongos, bacterias, virus y parásitos sufren cambios que hacen que medicamentos como fungicidas, antibióticos, antivirales y antiparasitarios sean ineficaces (OMS, 2020). Las principales razones por las que se facilita la resistencia a los antimicrobianos son el uso inadecuado de medicamentos, la prescripción médica débil y la deficiencia en la prevención y control de diferentes infecciones (Ayukekbong et al., 2017). Este problema ha provocado que los medicamentos que se encuentran disponibles actualmente no cumplan su función como antimicrobiano de manera eficiente, sugiriendo nuevas alternativas como el uso de plantas medicinales para tratar estas infecciones (Marasini et al., 2015). A pesar del éxito del descubrimiento de antibióticos, las enfermedades infecciosas siguen siendo la segunda fuente principal de muerte en todo el mundo, mientras que la resistencia a los antibióticos es uno de los problemas importantes del siglo XXI. Por lo tanto, existe una necesidad

urgente de encontrar agentes antimicrobianos alternativos para el tratamiento de microorganismos patógenos resistentes (OMS, 2017)

En un intento por controlar la resistencia bacteriana, la OMS recomienda investigaciones apropiadas considerando estrategias que ataquen y controlen factores de riesgo específicas de cada región e intervenciones sostenibles que consideren las necesidades de todos los países y aumentar la inversión en el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas (OMS, 2018). El descubrimiento, al igual que la aprobación de nuevos agentes antibacterianos ha ido disminuyendo, provocando altos costos de los fármacos cada vez más inaccesibles para la mayoría de países (Fondo, 2020; Boudreau, 2021)

Según (Hossain et al., 2018), las estructuras antibióticas tradicionales casi se han agotado hasta el punto de que la investigación antibacteriana está literalmente pidiendo a gritos nuevas entidades químicas que se puedan encontrar mediante el uso de enfoques de investigación nuevos y diferentes. Las plantas medicinales tienen la capacidad de sintetizar una fascinante variedad de moléculas de bajo peso molecular con estructuras completamente ajenas a los antibióticos. Según la (OMS, 2020), en los países en desarrollo, el 80% de la población mundial aplica a diario diferentes extractos e infusiones de plantas o sus principios activos como tratamiento tradicional para dolencias de variados orígenes y complicaciones

### **1.1.1. Delimitación del problema**

Dado que el Ecuador es un país con alta biodiversidad, tiene un gran potencial de estudio relacionado con sus plantas medicinales, poniendo un interés significativo en las plantas endémicas de la región de las cuales el campo de investigación en base a sus propiedades terapéuticas, es mínimo (Molina-Brito, 2018)

Como alternativa preventiva y curativa derivada de las plantas muchos aceites esenciales se han utilizado en la medicina popular y aun se continúan investigando sus propiedades medicinales en todo el mundo como la medicina herbolaria (Ambrosio et al., 2017; Tariq et al., 2019; Wang et al., 2020). La medicina herbolaria como alternativa y/o complemento de la medicina tradicional utiliza drogas, extractos, infusiones y aceites

esenciales o combinaciones de esos elementos de diferentes parte vegetativas de distintas especies de pantas, para mejorar la salud o como aditamento alimenticio en repostería, reconocidos como eficaces e inocuos (Gallegos-Zurita, 2019)

En Ecuador, la chuquiragua (*Chuquiraga jussieui*), de la familia Asterácea, subfamilia Barnadesioidea, conocida generalmente como Chuquiragua o flor nacional del Ecuador, es una planta que tiene un sinúmero de usos y aplicaciones a nivel comunitario, como medicina ancestral o ingrediente infaltable de los rituales de purificación como el Inti Raymi. Junto con etanol, las hojas y tallos se utilizan para aliviar la fiebre, inflamación y reumas. Para tratar las heridas y aliviar de dolores de fractura y luxación de miembros. En infusión de sus flores para tratar la inflamación de la próstata e infección del estómago, quemaduras, heridas superficiales, úlceras, entre otras. (Aguiza Quizpilema et al., 2021). Sin embargo, hay pocas evidencias científicas sobre la composición química del aceite esencial puro que justifique la eficiencia terapéutica para lo cual es usado desde tiempos ancestrales por la población nativa ecuatoriana y de otros países de la región (Villagrán et al., 2003).

La nformación que se encuentra en la bibliografía científica de la especie de *Chuquiraga* refleja la presencia de componentes químicos como: alcaloides, esteroides, taninos pirocatecólicos, saponinas, triterpenos y especialmente compuestos flavonoides,, fenólicos aislados en extractos alcoholicos, identificándose igualmente una correlación significativa entre los fenoles totales y su respectiva actividad antioxidante (Orellana et al., 2020).

Sin embargo, se reconoce que estos componentes químicos de las plantas (metabolitos secundarios) no permanecen cosntanes y estabilizados. Los factores de influencia responsables de esas fluctuaciones se pueden dividir en factores genéticos, ontogénicos, morfogenéticos y ambientales. Todos estos cuatro factores principales son importantes en la presencia acumulada de los metabolitos secundarios al interior de cada planta y son las razones de las fluctuaciones en la composición química y las actividades biológicas (Verma y Shukla, 2015).

Por otra parte, varias especies de bacterias son patógenas y causan enfermedades infecciosas, como la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, principal



responsable de la infección de la herida posoperatoria, el síndrome de choque tóxico y la intoxicación alimentaria. La *Escherichia coli*, es una bacteria Gram-negativa, que está presente en los intestinos humanos y causa infección del tracto urinario, colecistitis o septicemia. La bacteria Gram-positiva *Streptococcus pyogenes* causa una variedad de enfermedades como faringitis estreptocócica, fiebre reumática, cardiopatía reumática y escarlatina. Infecciones recurrentes que conllevan a patologías morales por falta de un tratamiento efectivo y resistencia a los antibióticos convencionales (Reddy et al., 2012).

**Variable dependiente:** Actividad antimicrobiana (*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Candida Albicans* (ATCC 25933)). Rendimiento del aceite esencial obtenido.

**Variables independientes:** Composición químicas (metabolitos secundarios) del aceite esencial de la especie *Chuquiraga jussieui*, órganos vegetales frescos de la especie (hojas y flores), método de extracción (hidrodestilación), método de evaluación microbiológica frente a diferentes patógenos (MIC, CMM)

### **Formulación del problema**

¿Cuál es el rendimiento de aceite esencial obtenido por hidrodestilación a partir de las hojas y flores frescas de la *Chuquiraga jussieui*?

¿Los aceite esencial de la plata endémica Chuquiragua, producen actividad antimicrobiana frente a cepas activas de (*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Candida Albicans* (ATCC 25933)).?

¿Los metabolitos secundarios identificados mediante la técnica de Cromatografía Gasosa acoplada a Espectrometría de Masas (CG-SM), como la composición fitoquímica del aceite esencial de la plata endémica *Chuquiragua jussieui*, son sustancias conocidas por su actividad antimicrobiana?

## 2. OBJETIVOS

### 1.1.2.1, Objetivo General

Analizar el rendimiento, la composición fitoquímica y la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la planta *Chuquiraga jussieui*, cultivada silvestremente en las regiones de alturas de los cantones Cañar y El Tambo.

### 1.1.2.2. Objetivos Específicos:

- Analizar el rendimiento de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación de las hojas y flores frescas de la planta *Chuquiraga jussieui*.
- Identificar por Cromatografía Gasosa acoplada a Espectrometría de Masas (CG-SM), los principales componentes fitoquímicos del aceite esencial de la planta *Chuquiraga jussieui*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de la *Chuquiraga jussieui* frente a cepas activas de los microorganismos: (*Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) y *Candida Albicans* (ATCC 25933).

## 1.2. JUSTIFICACIÓN

La medicina alternativa, la medicina ancestral a nivel artesanal o como industrial, podrán contar con estas sustancias químicas así como entender el procedimiento tecnológico para obtenerlas y reconocer su eficiencia inhibitoria de microorganismos patógenos. Se sabe que los aceites esenciales de plantas aromáticas y medicinales poseen una amplia gama de actividades biológicas, siendo antimicrobiano una de sus principales propiedades medicinales reportadas (Viuda-Martos et al., 2008). Estas actividades están fuertemente asociadas por su composición química la cual está determinada por las condiciones ambientales y agronómicas así como por el genotipo de cada planta (Marotti et al., 1999; Contreras, 2019).

El interés en la aplicación de aceites esenciales para el control de microorganismos patógenos se ha incrementado en los últimos años (Rojas-Graü et al., 2006; Gutierrez et al., 2018). El aceite esencial es parte de los metabolitos de las plantas y generalmente están compuestos por terpenos volátiles. Estos compuestos se pueden ubicar en diferentes partes de la planta como flores, semillas, hojas y frutos. Se considera que del 0,1% al 1% del peso de la planta esta formado por aceite esencial, el que suelen ser menos densos que el agua, con un índice de refracción elevado (Montoya-Cadavid, 2010). La concentración y composición de los metabolitos del aceite esencial varía debido a factores ambientales (Gazim et al., 2018), nutrientes del suelo, la parte de la planta utilizada (Delgado Ospina et al., 2018) las condiciones de secado (Sánchez et al., 2017), el método de extracción (Delgado Ospina et al., 2018; Quintero-Chacón et al., 2014), entre otros factores.

En el Ecuador desde la antigüedad se veía usando las plantas medicinales como principal alternativa de curación de una gran mayoría de la población. A pesar de ello, la escasa investigación de los principios activos de estas alternativas terapéuticas que posibiliten evidenciar científicamente su efectiva utilidad. especialmente en la medicina ancestral ha limitado su firme avance en el tratamiento farmacológico tradicional (Molina y Rivera, 2020). El contenido de metabolitos de diferente naturaleza son responsables de sus propiedades terapéuticas, constituyendo la fitoterapia una herramienta terapéutica que utiliza medicamentos a base de plantas medicinales. La particularidad fitoquímica de cada metabolito de la especie *Chuquiraga jussieui* presenta diversas actividades entre las ellas: antioxidantes, sedantes, diurética, hipotensoras, antimicrobianas, entre otras; propiedades atribuidas a esta especie ancestralmente en los lugares de recolección.(Quintero-Chacón et al., 2014).

La *Chuquiraga jussieui* posee propiedades beneficiosas para la salud humana y es una planta en peligro de extinción en el Ecuador, encontrándose en cantidades limitadas en las estribaciones frías del callejón interandino, razón por la que hay poco conocimiento sobre las propiedades que presenta (León-yáñez et al., 2019). Los resultados obtenidos en la presente investigación servirán de mucha utilidad como insumo para futuras investigaciones que ayuden a perfeccionar proceso de obtención del aceite esencial de esta especie en peligro de extinción y al mismo tiempo la identificación de otros principios activos para mejorar su aplicación terapéutica en otras patologías asociadas cuyas evidencias garanticen su utilidad terapéutica, formulando productos de origen

natural con principio activo certificados científicamente. Estos productos seguramente tendrán doble impacto en la sociedad, su eficiente actividad medicamentosa y su bajo costo de obtención y aplicación, sin considerar el impacto socioeconómico que generaría en el cuidado de las personas y en las comunidades dedicadas a recolectar y vender de esta especie de planta (León-Yáñez et al., 2012).

Aunque existen reportes de uso medicinal tradicional de estas especies, no existen informes científicos válidos sobre los estudios previos de la composición química y de su actividad antimicrobiana usando aceite esencial de la planta estudiada. Con estos antecedentes se cuenta con el apoyo de los laboratorios de microbiología y bioquímica de la carrera de Enfermería de la Universidad Católica de Cuenca para el análisis microbiológico y el laboratorio de análisis y procesamiento fitoquímico de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), querido para evaluar la química del perfil obtenido por CG-SM. De igual forma, se cuenta con los conocimientos, materiales, equipos, sepsas microbiológicas, materia prima vegetal y el aceite esencial previamente obtenido para los requerimientos que demandan los ensayos, actividades y pruebas a desarrollar para cumplir los objetivos propuestos.

La información y la tecnología obtenidas de la presente investigación se pondrá a consideración de la comunidad científica e instituciones de servicios de salud, locales y nacionales, un compendio de resultados y evidencias validadas y analizadas como insumos para el desarrollo de estudios específicas relacionadas que posibiliten estrategias de prevención y control de infecciones producidas por microorganismos en las comunidades rurales con características similares a las del cantón Cañar. Se valida también el método de obtención del aceite esencial por como forma rápida, menos traumatizante y alto porcentaje de confiabilidad

## CAPÍTULO II

### 2.1. MARCO TEÓRICO

#### 2.1.1. Plantas medicinales

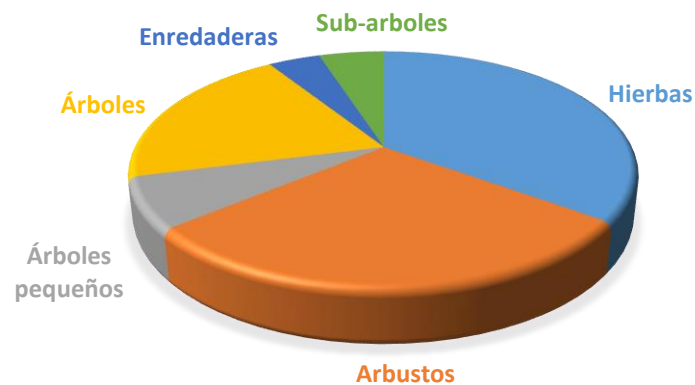
A nivel mundial, aproximadamente el 80% de la población mundial usa plantas medicinales para satisfacer sus necesidades básicas de salud (Scuteri et al., 2019). El uso de estas plantas en el tratamiento de enfermedades se practica desde la antigüedad, donde el hombre, por su necesidad y falta de otras fuentes, buscaba en la naturaleza soluciones para mejorar su propia condición de vida, logrando una mayor longevidad (Schuhladen, Roether, y Boccaccini, 2019). En Brasil, existen iniciativas gubernamentales que buscan incentivar el uso del conocimiento etnobotánico para la atención básica de la salud. El Programa Nacional de Plantas Medicinales y Herbolarios es un ejemplo, basado en los fundamentos de la Política Nacional de Plantas Medicinales y Herbolarios, que busca ampliar las opciones terapéuticas y mejorar la salud de los usuarios del Sistema Único de Salud - SUS, así como la preservación del conocimiento de las comunidades tradicionales y la valorización del uso sostenible de la biodiversidad. Las plantas tradicionalmente utilizadas para la preservación de la salud son una fuente importante para la obtención de nuevos compuestos biológicamente activos, así como para la producción de una gran cantidad de fármacos, directa o indirectamente a partir de plantas. Los compuestos biológicamente activos producidos por las plantas se denominan metabolitos secundarios, muchos de los cuales se utilizan como productos farmacéuticos. Según la Organización Mundial de la Salud, de los medicamentos reconocidos como básicos y esenciales, el 11% son de origen vegetal (Gurib-Fakim, 2006). De los productos biológicamente activos obtenidos de plantas, los aceites esenciales son un ejemplo, que presentan una constitución química compleja. Los aceites esenciales realizan varias actividades esenciales para la supervivencia de la planta, una de ellas es la defensa frente a la acción de microorganismos patógenos (De Oliveira et al., 2019). Las evaluaciones del efecto insecticida, bactericida, fungicida y antioxidante de los aceites esenciales han mostrado resultados importantes, entonces la caracterización botánica de las especies vegetales es de suma importancia, mediante estudios de bioprospección, encaminados a determinar su composición química y propiedades farmacológicas (Nascimento et al., 2018).

### **2.1.1.1. Plantas medicinales de Ecuador**

Los etnobotánicos se han centrado en los últimos años en el estudio de las plantas vendidas por los mercados locales, ya que se consideran lugares donde existe un intercambio cultural a través del comercio de recursos naturales y sus derivados (Tinitana et al., 2016; Rios et al., 2017). Los comerciantes venden plantas medicinales y brindan información sobre qué parte de la planta debe usarse, la dosis necesaria para calmar la afección y el método utilizado para su administración (León-yáñez et al., 2019; Nguyen et al., 2019). Los mercados tradicionales logran así brindar una visión más profunda y enriquecedora del conocimiento ancestral y el uso que se le da a las diferentes especies vegetales de la región, además de permitir el desarrollo de las comunidades rurales y la conservación biológica (Santiago y Tinoco, 2020) Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la salud y el bienestar del 80% de la población de los países en desarrollo dependen principalmente de la medicina tradicional, basada en el uso de una diversa gama de plantas utilizadas con fines curativos cuando no hay acceso a una mejor atención de la salud o cuando sea el único recurso médico (Rios et al., 2017; Nguyen et al., 2019). La importancia de conocer la medicina tradicional y estudiar los conocimientos ancestrales radica en todo el mundo, especialmente en América Latina, donde los estudios de la etnobotánica y su historia son necesarios para atender la alta demanda (Tinitana et al., 2016). En nuestro país las especies vegetales que se comercializan entre los mercados locales de las capitales de las provincias andinas corresponden a una gran cantidad de dolencias (Torre et al., 2006) La “Enciclopedia de Plantas útiles del Ecuador”, ha documentado el uso de 5,172 especies de plantas y ha agrupado las plantas medicinales (60% = 3,118 especies) en 24 categorías de enfermedades. Entre las categorías que presentan mayor uso de especies medicinales se encuentran los síntomas (47%), que se basa en el tratamiento de las percepciones patológicas del paciente (fiebre, dolor de estómago, diarrea) (De la Torre et al., 2018). Seguido de infecciones (26%), que es la categoría que se enfoca en el tratamiento de enfermedades causadas por bacterias, virus, hongos y parásitos. Sin embargo, las infecciones bacterianas son las principales responsables de un gran número de muertes a nivel mundial (Bussmann, 2019). El tratamiento de heridas y lesiones representa el 17% de todas las plantas medicinales, mientras que los trastornos del sistema digestivo representan el 15%. El uso de plantas medicinales como antivenenos (14%) se utiliza principalmente para tratar las mordeduras de serpientes. Sin embargo, los recursos vegetales también se utilizan ampliamente para

tratar inflamaciones (13%), problemas dermatológicos (13%) y trastornos del sistema respiratorio (12%). El resto de las categorías representan un porcentaje menor al 8% del total de plantas medicinales, aunque hay un 30% de plantas útiles que no han sido reportadas con ningún uso terapéutico (Lima et al., 2016; De la Torre et al., 2018)

La fitoterapia estudia el uso de plantas medicinales y sus derivados para prevenir o tratar enfermedades de todo tipo. Más tradicionalmente, la medicina herbal utiliza toda la planta para tratar afecciones principalmente a través de infusiones o té (Falzon y Balabanova, 2017). Sin embargo, también utiliza diferentes partes de la planta, como la raíz, la corteza, las hojas, las flores, las semillas y el aceite esencial en las que existe una gran cantidad de compuestos activos que poseen propiedades biológicas que brindan efectos terapéuticos en los organismos vivos (Jamshidi-Kia et al., 2018). En Ecuador, la mayoría de las plantas medicinales que se utilizan con fines curativos son: hierbas (35%), arbustos (29%), árboles (20%), y la que menos usos tiene son las enredaderas (4%), como se puede observar en la Figura 1 (Weckmüller et al., 2019)



**Figura 1. Hábitos vegetales utilizados con fines médicos en Ecuador**

**Fuente:** El autor, 2021

De estos, las estructuras morfológicas de la planta como las hojas (30%) son las que se utilizan más abundantemente, seguidas del uso de la planta entera (10%) y flores (6%) según los registros de plantas medicinales útiles (Ayukekbong et al., 2017)

### **2.1.1.2. Plantas endémicas de Ecuador**

Entre las especies medicinales que se registran en el libro “Botánica Económica de Los Andes Centrales” y en el libro rojo de las plantas endemnicas se encuentran 5

plantas endémicas en Ecuador: floripondio (*Brugmansia*) , matico (*Aristeguetia glutinosa*), salverreal (*Lepechinia rufocampii*), pumamaqui (*Oreopanax ecuadorense*), mosquera (*Croton elegans*) y chuquiragua *Chuquiraga jussieui* (León-yáñez et al., 2019); plantas que reflejan también su importancia cultural en concordancia con su utilidad farmacológica (Durant-Archibold et al., 2018) y su posible utilidad económica al ser industrializadas (Huayta-Arapa et al., 2018). Según la Revista Tecnológica ESPOL (2018), en Ecuador, cerca del 80% de las comunidades y la población urbana utilizan la medicina tradicional como primer recurso para tratar cualquier tipo de dolencia.

Ecuador, como país megadiverso, tiene un potencial de estudio crítico en el descubrimiento de diversas actividades biológicas de las plantas presentes en la región, especialmente aquellas que solo crecen en el país (endémicas) (Valdez, 2019; Moran-Bolaños, 2017). Sin embargo, la mayoría de estas especies no han sido evaluadas científicamente y la información sobre ellas es muy reducida (Huayta-Arapa et al., 2018). En el siguiente capítulo se presenta la taxonomía (Tabla 3), una descripción geográfica y terapéutica de las tres especies endémicas más utilizadas y que se encuentran ampliamente distribuidas en los mercados locales del país. Además de una lista de los estudios fitoquímicos y biológicos que se han desarrollado hasta la fecha. (León-yáñez et al., 2019)

### **2.1.2. *Astereaceae***

La familia *Astereaceae* (*Compositae*), es una de las familias más grandes y diversas que comprende alrededor de 1.600 géneros y más de 23.000 especies en el mundo (Kenny et al., 2018; Kriplani et al., 2019) Es la familia de plantas angiospermas que registra la mayor abundancia de plantas útiles en Ecuador (Silveira-Rabelo y Caldeira-Costa, 2018). Por ser tan diversos, especialmente en las regiones andinas, en los últimos 25 años se han llevado a cabo una gran cantidad de investigaciones para conocer más sobre estas especies, enfocándose en aspectos como su morfología, ecología, anatomía y ontogenia también como análisis fitoquímicos y toxicológicos (Carrillo-Hormaza, 2015). Las plantas que pertenecen a esta familia se han caracterizado por estudios extensos sobre sus compuestos y actividades biológicas (Chaib et al., 2019).



La familia de las Astereaceae son conocidos por sus propiedades terapéuticas como agentes antibacterianos, antiinflamatorios, antitumorales, insecticidas, antifúngicos y antioxidantes (Fernandez-Sanzhe, 2020).. Al ser especies que suelen estar sometidas a condiciones extremas y factores de estrés ambiental como las bajas temperaturas, altitud, la infección microbiana y la luz ultravioleta, los compuestos responsables de las actividades farmacológicas pueden variar, presentando una alta diversidad de metabolitos secundarios (Carrillo-Hormaza et al., 2015). Entre los compuestos más abundantes en esta familia se encuentran los fenol, flavonoides y dipernoides (Koc et al., 2015). La familia Astereaceae incluye algunas de las especies medicinales más antiguas y estudiadas del planeta (Kenny et al., 2018). Su especie más representativa por ser ampliamente utilizada, estudiada y distribuida por los mercados son *Cynara scolimus* L. (alcachofa), *Baccharis trimera* (Less), *Matricaria chamomilla* L. (manzanilla), *Arnica montana* L. *Vernonia condensata* Baker (necroton), (árnica verdadera) y la *Chuquiragua jussieui*(chuquiragua, flor del camino) de la subfamilia *Barnadesioideae* (Antonio et al., 2019).

#### 2.1.2.1. La subfamilia *Barnadesioideae*

La *Barnadesioideae* es una subfamilia de las *Astereaceae*, comprende más de 90 especies distribuidas en nueve géneros completamente restringidos a América del Sur. Los miembros de *Barnadesioideae* como la *Chuquiragua Juissieui*, comparten una serie de características morfológicas y moleculares que apoyan su posición en una subfamilia separada. La presencia de espinas axilares y tricomas barnadesioides (pubescencias de pelos tricelulares no ramificados) en estructuras florales y vegetativas constituyen características morfológicas únicas dentro de *Asteraceae* que distinguen a *Barnadesioideae* del resto de la familia (Ccana-Ccapatinta et al., 2018). Además, otra característica de *Barnadesioideae* es la falta de dos alteraciones de ADN en su genoma de cloroplasto, que están presentes en todas las demás *Asteraceae* (Kim et al., 2005; Jansen y Palmer, 2018). Filogenéticamente, *Barnadesioideae* tiene una posición bien respaldada como grupo hermano de todas las demás *Asteraceae* (Perez-Chauca et al., 2020).

##### 2.1.2.1.1. Distribución

A pesar del pequeño número de especies, los géneros de *Barnadesioideae* muestran una amplia gama de hábitos y distribuciones geográficas distintas. Los géneros

monotípicos *Dusenilla* K.Schum., *Huarpea* Cabrera y *Schlechtendalia* Less, son plantas herbáceas subarbustos distribuidas en áreas aisladas de Argentina, Bolivia, Brasil, Ecuador y Uruguay (Aguirre-Mendoza, 2018). De las cuales, la especie arbustiva *Chuquiragua jussieui*, tienen una distribución estrecha en el sur de Ecuador y el norte de Perú y crecen en hábitats más o menos similares. La Tabla 1 resume los taxones reconocidos actualmente del género *Chuquiraga* (*Barnadesioideae*) y su distribución geográfica correspondiente (Pinto et al., 2018).

**Tabla 1. Especies de *Barnadesioideae* (*Chuquiraga*) y su distribución geográfica.**

Género	Especies	Distribución*
<i>Chuquiraga</i>	<i>C. acanthophylla</i> Wedd.	ARG, BOL
	<i>C. atacamensis</i> Kuntze	ARR, BOL, CHI
	<i>C. arcuata</i> Harling	ECU
	<i>C. aurea</i> Skottsbo.	ARG
	<i>C. avellanadae</i> Lorentz	ARG
	<i>C. calchaquinae</i> Cabrera	ARG
	<i>C. echeagarayii</i> Hieron.	ARG
	<i>C. erinacea</i> subsp. <i>erinacea</i> D.Don	ARG
	<i>C. erinacea</i> subsp. <i>hystrix</i> (D.Don) C.Ezcurra	ARG
	<i>C. jussieui</i> J.F.Gmel.	BOL, COL, ECU, PER
	<i>C. kuscheii</i> Acevedo	CHI
	<i>C. longiflora</i> (Griseb.) Hieron.	ARG, BOL
	<i>C. oblongifolia</i> Sagást. y Sánchez Vega	PER
	<i>C. raimondiana</i> A. Granda	PER
	<i>C. morenonis</i> (Kuntze) C.Ezcurra	ARG
	<i>C. oppositifolia</i> D.Don	ARG, BOL, CHI
	<i>C. parviflora</i> (Griseb.) Hieron.	ARG, BOL
	<i>C. rosulata</i> Gaspar	ARG
	<i>C. ruscifolia</i> D.Don	ARG
	<i>C. spinosa</i> subsp. <i>spinosa</i> Less.	PER
	<i>C. spinosa</i> subsp. <i>australis</i> C.Ezcurra	ARG, BOL, CHI
	<i>C. spinosa</i> subsp. <i>huamanpinta</i> CEzcurra	PER
	<i>C. spinosa</i> subsp. <i>rotundifolia</i> (Wedd.) C.Ezcurra	CHI, PER
	<i>C. straminea</i> Sandwith	ARG
	<i>C. ulicina</i> subsp. <i>acicularis</i> (D.Don) C.Ezcurra	CHI
	<i>C. weberbaueri</i> Tovar	PER

**Taxonomía según (Fernández et al., 2017);** (León-yáñez et al., 2019); (Castro y Silvana, 2020) (Rodríguez-Segovia et al., 2020); (Arnelas et al., 2020); para *Chuquiraga*. Abreviaturas: ARG = Argentina, BOL = Bolivia, BRA = Brasil, CHI = Chile, COL = Colombia, ECU = Ecuador, PER = Perú

\* Los datos de distribución actualizados se consultaron en la base de datos TROPICOS ([www.tropicos.org](http://www.tropicos.org)) (Estrella et al., 2017)

Fuente: El Autor, 2021

### 2.1.2.1.2. Química

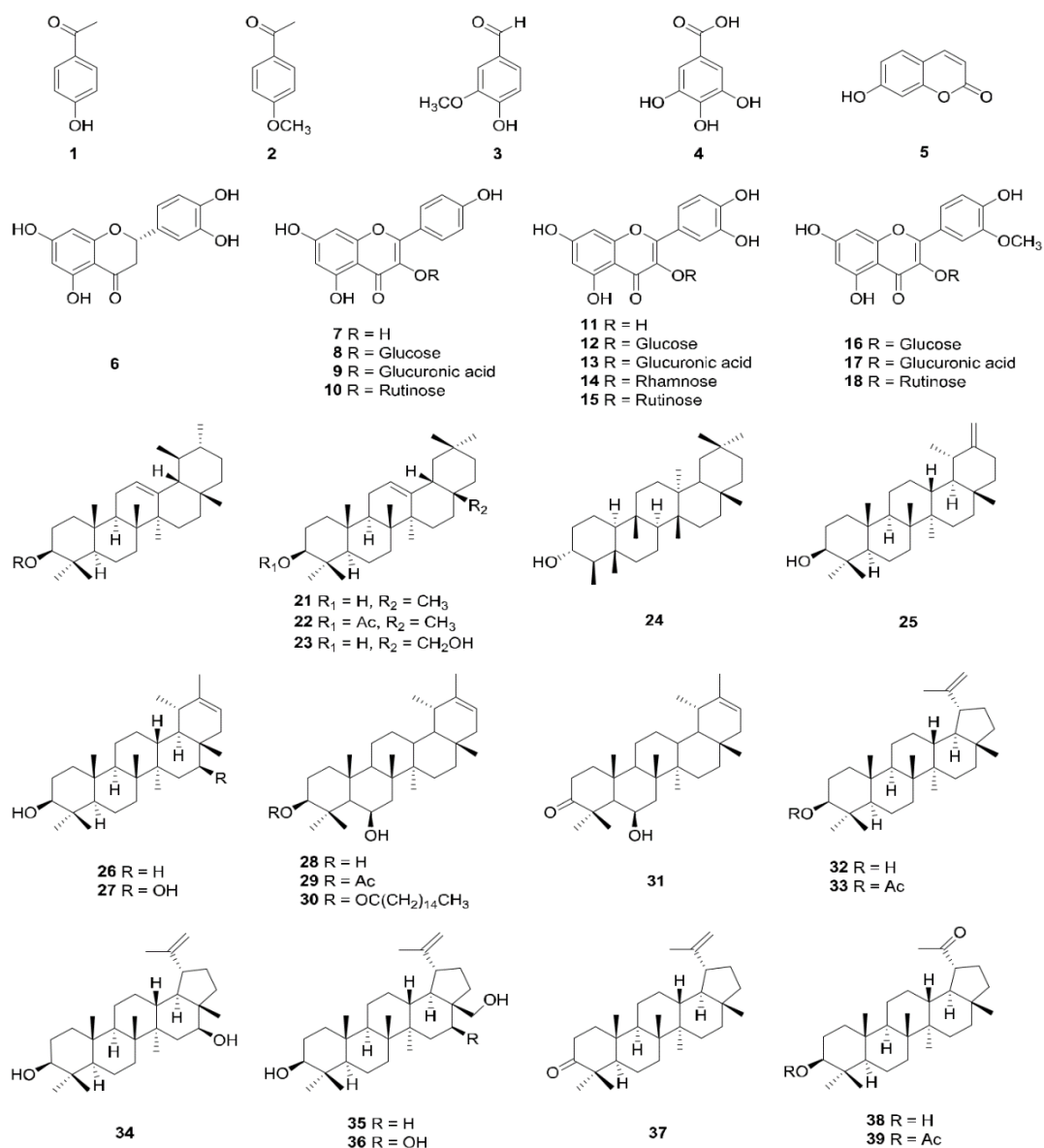
La química de los metabolitos secundarios de la subfamilia Barnadesioideae se ha descrito siguiendo un perfil según la posición basal de las hojas y flores en la familia Asteraceae (Ccana-Ccapatinta et al., 2018). En total, dos acetofenonas (1 y 2), vainillina (3), ácido gálico (4), umbeliferona (5) (Senatore et al., 2008), 13 flavonoides (kaempferol, quercetina, isorhammetina y sus 3-O-glucósidos, 6-18) (Juárez y Mendiando, 2018) y 21 triterpenoides (triterpenoides pentacíclicos de tipo taraxastano, lupano, ursano y oleanano, 19-39), se han descrito hasta la fecha en Barnadesioideae, subfamilia del género *Chuquiraga jussieui* (Gurovic et al., 2017). Los nombres triviales correspondientes y las estructuras químicas se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2. Componentes químicos reportados en miembros de Barnadesioideae.**

No	Clase química	Nombre trivial
1	<b>Fenoles</b>	p-hidroxiacetofenona
2		p-metoxiacetofenona
3		Vainillina
4		Acido gálico
5		Umbeliferona
6	<b>Flavonoides</b>	Eriodictyol
7		Kaempferol
8		Kaempferol-3 – O - glucósido
9		Kaempferol-3 – O – glucurónido.
10		Kaempferol-3 – O – rutinósido.
11		Quercetina.
12		Quercetina-3-O-glucósido.
13		Quercetina-3-O-glucurónido.
14		Quercetina 3-O-ramnosido.
15		Quercetina-3-O-rutinósido.
16		Isorhamnetina-3-O-glucósido.
17		Isorhamnetina-3-O-glucurónido.
18		Isorhamnetina-3-O-rutinósido.
19	<b>Triterpenoides</b>	$\alpha$ -amirina
20		Acetato de $\alpha$ -amirina
21		$\beta$ -amirina
22		Acetato de $\beta$ -amirina
23		Eritrodiol
24		Friedelinol
25		Taraxasterol
26		Pseudotaraxasterol
27		Faradio
28		3 $\beta$ , 6 $\beta$ -Dihidroxitaraxasta-20-eno
29		3 $\beta$ -acetoxi-6 $\beta$ -hidroxitaraxasta-20-eno
30		6 $\beta$ -Dhidroxitaraxasta-20-eno 3 $\beta$ -palmitato
31		6 $\beta$ -Dydroxytaraxasta-20-en-3-ona

<b>32</b>	Lupeol
<b>33</b>	Acetato de lupeilo
<b>34</b>	Calenduladiol
<b>35</b>	Betulin
<b>36</b>	Heliantriol B2
<b>37</b>	Lupenona
<b>38</b>	30-Nor-lupan-3 $\beta$ -ol-20-ona
<b>39</b>	3 $\beta$ -Acetoxi-30-nor-lupan-20-ona

Fuente: El autor, 2021.



**Figura 2.** Componentes químicos más frecuentes de la subfamilia *Barnadesioideae*

Fuente: Metabolitos secundarios - composición molecular (Gurovic et al., 2017)



**Figura 3.** Foto de la especie *Chuquiraga jussieui*

**Fuente:** El autor, 2021 (Laguna de Patococha - Cañar)

*Chuquiraga* es un género de veinte y dos arbustos de hoja perenne endémica de las regiones áridas y semiáridas de los Andes y el sur de América del Sur. Es la más variable morfológicamente de la subfamilia Barnadesioideae y presenta una gran diversidad de tipos de hojas (Arroyo-Acevedo et al., 2017; León-yáñez et al., 2019).

La *Chuquiraga* es un género de 22 arbustos espinosos de hoja perenne que crecen a lo largo de los Andes y la Patagonia en hábitats de gran altitud; sin embargo, algunas especies se encuentran a nivel del mar en el centro de Chile y Argentina (Martínez et al., 2020). En Ecuador, la especie *Chuquiraga jussieui* ha sido descrita entre las plantas endémicas de la región andina ecuatoriana, y se ha reportado su ubicación en algunas provincias de la Sierra como Azuay, Cañar, Tungurahua, Cotopaxi, Chimborazo, Pichincha e Imbabura y Oriente, en Napo (León-yáñez et al., 2019).

#### **2.1.2.1.3. Usos medicinales**

Varias especies del género *Chuquiraga jussieui* es descrita como de uso ansetral en la medicina de Bolivia, Colombia, Argentina, Chile, Ecuador y Perú. Los usos medicinales de *Chuquiraga* se remontan a la época de las culturas sudamericanas precolombinas como los incas (León-yáñez et al., 2019; Cáceres-Ortiz, 2019), aymaras (Britto, 2017). Como tendencia general, las especies medicinales de *Chuquiraga* se utilizan en infusiones, solas o en mezcla con otras plantas (Bussmann, 2019), para el tratamiento de trastornos respiratorios, gastrointestinales, genitourinarios y

reproductivos. Los nombres comunes y usos medicinales de las especies del género *Chuquiraga* se muestran en la Tabla 3.

*Chuquiraga jussieui* y *Chuquiraga Spinosa* se utilizan muy frecuentemente en la curación y tratamiento de prostatitis y del cáncer de próstata. En este contexto se describe por primera vez el efecto protector del uso y aplicación del extracto hidroalcohólico de *C. spinosa* sobre el cáncer de próstata y el cáncer gástrico inducidos por N-metil nitrosourea (NMU) en ratas. El mismo extracto mostró Citotoxicidad en la línea la línea celular DU-145 (carcinoma de próstata) con una CI50 de 2,98  $\mu\text{g} / \text{ml}$  (Arroyo - Acevedo et al., 2017). Además, Arroyo - Acevedo et al., (2017), investigaron la citotoxicidad del extracto etanólico de *C. spinosa* en MCF-7 (adenocarcinoma de mama), K-562 (leucemia mielógena crónica), HT-29 (adenocarcinoma de colon), H-460 (carcinoma de células grandes de pulmón), M-14 (amelanótico melanoma), HUTU-80 (adenocarcinoma del duodeno) y líneas celulares DU-145, obteniendo valores de IC50 de 5,32-9,25  $\mu\text{g} / \text{ml}$ . Curiosamente, las fracciones lipofílicas (cloroformo , hexano, gasolina, y acetato de etilo) obtenidos del extracto , mostrando valores de CI50 de 24, 19-54, 12  $\mu\text{g} / \text{ml}$ , lo que sugiere que los componentes activos pueden permanecer a las fracciones polares. Las actividades biológicas actualizadas de las especies de *Chuquiraga* se resumen en la Tabla 4.

Tabla 3. Nombres comunes y usos medicinales de especies del género Chuquiraga

ESPECIES	PAÍS	NOMBRE COMÚN	INDICACIONES *	REFERENCIA
<i>C. acanthophylla</i>	ARG	Espina amarilla.	Resfriado, tos y fiebre. Dolor de estómago. Infecciones del tracto urinario.	(Duke, 2008) (de Lima Ferreira et al., 2021)
<i>C. atacamensis</i>	ARG	Hierba de san Pedro, san Pedro, kishka tola.	Conjuntivitis, para la cual la planta se usa para hacer un humo medicinal. Dolor reumático, donde la infusión de la planta se usa para lavar las piernas reumáticas para aliviar el dolor.	(Arroyo-Acevedo et al., 2017)
	BOL	San Gerónimo, fundición, kutu kutu, chajllampa.	Resfriado, tos, fiebre. Infecciones del tracto urinario, cistitis, prostatitis. Alivio de los síntomas posparto. No recomendado en mujeres embarazadas.	(Ccana-Ccpatinta et al., 2018)
	CHI	Lengua de gallo, quebrolla, killokisca, chana chaklamba.	La infusión se utiliza como baños calientes contra los resfriados. Tos productiva e improductiva, fiebre. Trastornos genitourinarios y reproductivos en mujeres.	(Paniagua-Zambrana et al., 2020)
<i>C. avellanadae</i>	ARG	Quilimbay-trayao, tratrakcha trayau.	Tos. Dolor de cabeza y fiebre, las hojas hervidas se mastican en una mezcla con azúcar.	(Ccana-Ccpatinta et al., 2018)
<i>C. erinacea</i>	ARG	Romerillo, falsa uña de gato, trifrif mamull.	Dolor de estómago y enfermedad hepática. Enfermedad del riñón. Fortalece el cerebro y los nervios.	(Hurtado-Huarcaya et al., 2021)
<i>C. jussieui</i>	COL	Chuquiragua, vela de páramo.	Febrífuga, diurético, cálculos renales.	(Duke, 2008)
	ECU	Chuquiragua, Flor del camino, Chuquirira.	Enfermedad hepática, diabetes. Alergias y trastornos cutáneos. Dolor de huesos, reumatismo y otras inflamaciones. Dolor de muelas, dolor de estómago y trastornos gastrointestinales. Resfriado, fiebre, tos y trastornos respiratorios. Paludismo, fiebre, palúdica, viruela, infecciones internas. Trastornos urogenitales, diuréticos. Alivio de los síntomas posparto.	(Zambrano & Tonato, 2020), (Aguaiza Quizpilema et al., 2021) (De la Torre et al., 2018) (León-yáñez et al., 2019)
	PER	Chiquiragua (norte de Perú). Inca llauilli.	Dolor de estómago y enfermedad hepática. Dolor musculoesquelético. Erupciones cutáneas, inflamaciones.	(Ccana-Ccpatinta et al., 2018)
		Kentayllaulli, quishuara, kiswara, kiswara.	Resfriado común, tos, dolor de garganta, fiebre, trastornos respiratorios. Vaginitis e infecciones vaginales, como lavado	(Chuctaya & Roque, 2018).

		externo. Infecciones del tracto urinario, enfermedad renal, cálculos, prostatitis	
	Ttiutumpi, qharisirviy (sur de Perú).	Síntomas posparto. Endoparasiticida (gusanos intestinales) y ectoparasiticida (piojos).	(Perez-Chauca et al., 2020)
<i>C. longiflora</i>	ARG Azafrán de la puna	La planta se agrega al agua para el lavado personal.	(Navas, 2019)
<i>C. oppositifolia</i>	ARG Azafrán del campo	Hipoglucemiante, hipocolesterolemiante. Antifúngico.	(Torres, 2018)
<i>C. parviflora</i>	BOL Chiñi michi michi	Contra la maldición.	(Ccana-Ccapatinta et al., 2018)
<i>C. spinosa</i>	ARG Charkoma	Regulación del ciclo menstrual.	Oyarzabal et al, 2018
	BOL Huamanpinta	Cistitis y cálculos renales recurrentes.	Ccana-Ccapatinta et al, 2021
	ECU Chuquiragua	Malaria, Dolor de huesos, resfriado, tos y fiebre. Dolor de huesos.	(Orellana et al., 2020)
	Huamanpinta, huancapita, huancaspita.	Afecciones respiratorias. Antiblenorrágico y vermífugo. Conjuntivitis. Gonorrea.	(Cristobal & Paredes, 2019)
	Laulinco, pazpapamaquin. cjari sirvi.	Trastornos del sistema urinario en mujeres y hombres. Vaginitis e infección vaginal, la infusión de la planta se utiliza para lavado externo. Inflammaciones de riñón y próstata. Cáncer de próstata. Diurético. Impotencia sexual	(Puente y Vilcayauri, 2018).
<i>C. weberbaueri</i>	PER Amaro, amaro	Tos, bronquitis, asma. Enfermedad del hígado. Diurético y depurativo.	(Profesional & Biologicas, 2021)

\* Comúnmente, las partes aéreas se utilizan para hacer infusiones o decocciones en agua y otros modos de uso se detallan en el texto. Abreviaturas: ARG = Argentina, BOL = Bolivia, CHI = Chile, COL = Colombia, ECU = Ecuador, PER = Perú.

Fuente: El autor, 2021.



Tabla 4. Actividades biológicas reportadas para especies del género *Chuquiraga*

PLANTA	EXTRACCIÓN DE SOLVENTE, ESTANDARIZACIÓN	BIOACTIVIDAD	RESULTADOS	REFERENCIA
<i>C. atacamensis</i>	Etanol al 80% (5 g / 100 ml) *, 500 µg de EAG / ml.	<i>In vitro</i> COX-1 inhibition	IC50 = 2 µg / ml	(Ccana-Ccapatinta et al., 2018)
		<i>In vitro</i> COX-2 inhibition	IC50 = 4,7 µg / ml	
		Antioxidante, DPPH, ABTS <sup>+</sup> , O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	IC = 3.5 - 20 µg/ml	
	Etanol al 80% (5 g / 100 ml) *, 500 µg de GAE / ml	<i>Cepas de Staphylococcus aureus</i>	MIC = 80–600 µg/ml	(Carrizo et al., 2020)
		<i>Enterococcus faecalis</i> strains	MIC = 150–300 µg/ml	
		<i>Escherichia coli</i> strain	MIC = 600 µg/ml	
		Other Gram-negative bacteria	MIC = 300–600 µg/ml	
	Etanol (extracto seco)	Antioxidante, ABTS <sup>++</sup> assay	SC50 = 1.5 µg/ml	(Ccana-Ccapatinta et al., 2018)
<i>C. erinacea</i>	Extracto etanólico (extracto seco)	Actividad inhibidora de AChE in vitro	IC50 = 7.26 mg/ml	(Gurovic et al., 2017)
<i>C. jussieui</i>	Agua (2 g / 100 ml) *	Antioxidante	IC50 = 64.9 mg/L	(Dueñas-Rivadeneira et al., 2017); (Carrizo et al., 2019).
<i>C. spinosa</i>	Agua (extracto seco), 5,4 mg EAG / mg	Antioxidante, DPPH <sup>·</sup> , ABTS <sup>++</sup>	IC = 9.6 - 30.5 µg/ml	(Carrizo et al., 2019)
		<i>Candida albicans</i>	MIC = 2,5 µg en placa TCL	
		<i>Cladosporium cucumerinum</i>	MIC = 2,5 µg en placa TCL	
		<i>Rhizopus stolonifer</i>	MIC = 4,6 µg en placa TCL	
	50% Methanol (dry extract), 6.3 mg EAG/mg	Antioxidante: DPPH <sup>·</sup> , ABTS <sup>·</sup>	IC = 8.5 - 21.7 µg/ml	(Casado et al., 2011)
		Antiinflamatorio, edema de patas en ratas	Inhibición máxima = 52,5%	
		Antiinflamatorio, edema de oído en ratones.	Inhibición = 88,1%	

	<i>Candida albicans</i>	MIC = 6,3 µg en placa TCL	
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	MIC = 13,5 µg en placa TCL	
Metanol (extracto seco), 12,6 mg GAE / mgr	Antioxidante, DPPH <sup>·</sup> , ABTS <sup>+</sup>	IC = 10.5 – 36.5 µg/ml	(Casado et al., 2011)
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	MIC = 18,5 µg en placa TCL	
Agua (5g / 500 ml) *	Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>	13 mm, prueba de difusión en agar	(Paniagua-Zambrana et al., 2020)(Busmann y Sharon, 2014)
Etanol al 96% (extracto seco)	Citotoxicidad en la línea DU-145	IC50 = 2.98 µg/ml	(Arroyo-Acevedo et al., 2017)
Etanol al 96% (extracto seco)	Citotoxicidad en la línea MCF-7	IC50 = 9.25 µg/ml	(Arroyo-Acevedo et al., 2017)
	Citotoxicidad en la línea K-562	IC50 = 7.34 µg/ml	
	Citotoxicidad en la línea HT-29	IC50 = 8.52 µg/ml	
	Citotoxicidad en la línea H-460	IC50 = 5.32 µg/ml	
	Citotoxicidad en la línea M-14	IC50 = 8.30 µg/ml	
	Citotoxicidad en la línea HUTU-80	IC50 = 6.20 µg/ml	
	Citotoxicidad en la línea DU-145	IC50 = 7.09 µg/ml	
Fracción de hexano (extracto seco)	Citotoxicidad en la línea DU-145	IC50 = 27.03 µg/ml	
Fracción de éter de petróleo (extracto seco)	Citotoxicidad en la línea DU-145	IC50 = 33.10 µg/ml	
Fracción de cloroformo (extracto seco)	Citotoxicidad en la línea DU-145	IC50 = 24.19 µg/ml	
Fracción de acetato de etilo (extracto seco)	Citotoxicidad en la línea DU-145	IC50 = 54.12 µg/ml	
<i>C. straminea</i> 80% de metanol (extracto seco)	Antioxidante, DPPH <sup>·</sup> , ABTS <sup>+</sup>	SC50 = 14.5 - 34.9 µg/ml	(Juárez & Mendiondo, 2018)
	<i>Cepas de Staphylococcus aureus</i>	MIC = 200 - 800 µg/ml	

\* Relación planta / disolvente. EAG (Equivalentes de Àcido Gálico), MIC (Concentración Mínima Inhibitoria, IC50 (Concentración Inhibitoria 50)

Fuente: El autor, 2021.

#### 2.1.2.1.4. Toxicidad

Existen pocos datos sobre la toxicidad o efectos secundarios de especies del género *Chuquiraga*. Los extractos acuosos de, *Chuquiraga. Spinosa* y *Chuquiraga. Weberbaueri* mostraron dosis letales medianas (LD50) > 10,000 µg / mL en el ensayo de letalidad del camarón en salmuera, mientras que los extractos etanólicos mostraron valores de LC50 de 1.1 y 0.25 µg / mL, respectivamente (Bussmann, 2019). Aunque existe un informe que prohíbe la administración de infusiones de *Chuquiraga. atacamensis* en mujeres embarazadas porque podría causar un aborto espontáneo (Maldonado-Coello & Naula-Orrala, 2020), se necesitan estudios adicionales para revelar los posibles efectos secundarios y toxicidad de otras especies como la *Chuquiraga jussieui* y otros representantes de la subfamilia Barnadesioideae.

#### 2.1.2.1.5. Comercialización

Las especies medicinales de *Chuquiraga* son elementos importantes y evidentes en los mercados de plantas medicinales de las ciudades tradicionales de Ecuador y Perú pero también en ciudades modernas como Quito, Guayaquil, Cuenca y Lima, y al menos una especie ha sido introducida en el mercado internacional. A diferencia de los mercados de Bolivia y Perú, donde la comercialización de especies de *Chuquiraga* es frecuente, la comercialización en Mercados de Ecuatorianos parece ser muy limitada (De la Torre et al., 2018), incluso se encuentra incluida en el libro rojo de las plantas en peligro de extinción (Martínez et al., 2020). No así en Perú en donde diferentes especies de *Chuquiraga* son observadas con un prometedor potencial de industrialización (Durant-Archibold et al., 2018) Las partes investigadas (hojas y flores) de esta especie también se encuentran en los mercados de las zonas del norte de Perú junto con la *Chuquiraga jussieui. weberbaueri* (Bussmann y Sharon, 2014). En los mercados del sur del Ecuador, las inflorescencias de *Chuquiraga jussieui* se comercializan con frecuencia por separado de las hojas y los vapores (Figura 4A). Las partes aéreas de la *Chuquiraga. spinosa* se comercializan a lo largo de las principales ciudades de Perú (Martínez, 2018; Bussmann, 2019). Estas especies también se distribuyen como suplemento dietético en Europa (Huamanpinta, Esparta GmH y Norteamérica (Huamanpinta, Alpha Omega Labs). También se pueden encontrar productos que contienen *Chuquiraga* mezclados con otras

plantas, por ejemplo, Women's Care Blend (Amazon, [www.amazon.com](http://www.amazon.com)), Prostate Care Blend y Kidney Cleanser Blend

(Fito Global Inc., 2021).



**Figura 4.** Muestras comerciales de la especie *Chuquiraga*: A) Flores de *Chuquiraga jussieui* (Mercados de la ciudad de Azogues y Bibliàn, Ecuador); B) Partes aéreas de *Chuquiraga jussieui* y *Chuquiraga spinosa* (Mercado de la Ciudad de Puno y La Oroya, Perú); C) Cápsulas que contienen *Chuquiraga jussieui* y *Chuquiraga spinosa* en polvo (Comercializado en Austria y Alemania)

**Fuente:** El autor, 2021

### 2.1.3. Identificación de fármacos de productos vegetales naturales

Los productos naturales se definen como sustancias o compuestos obtenidos de organismos vivos como plantas, animales, hongos e incluso de una amplia variedad de microorganismos. También puede referirse al propio organismo (planta, animal) o diferentes partes de él, como hojas, tallos, raíces, órganos de animales o glándulas (Orhan, 2019). El descubrimiento de nuevos fármacos está vinculado a una tarea desafiante para los científicos, ya que requiere buscar un candidato que sea lo suficientemente viable y sólido para ser considerado como un posible agente terapéutico (Lahlou, 2017). De esta forma, los productos naturales y sus derivados han sido una de las fuentes primarias y de gran importancia en el desarrollo de nuevos fármacos por ser el principal ingrediente activo (Harvey, 2018). Se estima que alrededor del 40% de las drogas en el mundo corresponden a productos de origen natural o semisintético de sus derivados (Martinez et

al., 2020). Cuando nos referimos a los productos naturales de las plantas, estos corresponden a los metabolitos secundarios producidos por todos estos organismos como consecuencia de su adaptación a diferentes ambientes (factores abióticos y bióticos) o como mecanismo de defensa frente a los depredadores. Por estas razones, existe una amplia variedad de metabolitos secundarios en la estructura de la planta y, por lo tanto, representan un candidato potencial en el descubrimiento de fármacos (Mamadalieva et al., 2018).

Según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Agencia Médica Europea (EMA), alrededor de una cuarta parte de los medicamentos aprobados son de origen vegetal (Thomford et al., 2018). Entre 1981-2019, la FDA aprobó 1.881 medicamentos, de los cuales el 19% fueron derivados de productos naturales, el 7.4% fueron una mezcla de medicamentos botánicos, el 3.8% pertenecían a los productos naturales que no han sido alterados, otro 3,5% correspondió a medicamentos sintetizados a partir de productos farmacóforos naturales y el resto a medicamentos sintéticos, sin embargo, del total de especies de plantas en la Tierra, solo el 10% ha sido registrado con usos en medicina popular, y de estas, el 5% ha sido sometido a estudios fitoquímicos que prueban sus propiedades medicinales (Bernardini et al, 2018). Hasta 2015, la cantidad de medicamentos conocidos que se desarrollaron a partir de exámenes de plantas fue de 135, y se estima que se descubrirán 700 nuevos medicamentos con estudios fitoquímicos de las especies de plantas restantes (Hussein y El-Anssary, 2018). Esto significa que existe un amplio campo de investigación farmacológica en plantas terrestres que conduce a un posible desarrollo de medicamentos a base de hierbas

Los compuestos bioactivos de los fármacos interactúan con macromoléculas del cuerpo humano, como proteínas o ácidos nucleicos, para producir un efecto terapéutico frente a un tipo de dolencia o enfermedad. Este proceso ha llevado a los científicos a pensar en la importancia de identificar los compuestos químicos de las plantas, utilizando componentes aislados como ingrediente principal de los medicamentos, lo que promete un mejor tratamiento médico. Sin embargo, en la medicina ansetral, los extractos de plantas se utilizan para tratar cualquier tipo de dolencia en una combinación de compuestos químicos, ya que los compuestos aislados pueden no tener una actividad biológica específica, por lo que se requiere una actividad sinérgica para cumplir esta

función en algunas ocasiones (Thomford et al., 2018). Debido a la complejidad de las enfermedades, los medicamentos que existen deben ser capaces de tratar las dolencias de manera eficaz y segura. Es por eso que algunos de los medicamentos que se basan en un solo compuesto han fallado en su proceso para ser un medicamento eficaz para tratar enfermedades. Dado que puede ser un proceso muy complicado y que requiere mucho tiempo, buscar una mezcla de compuestos químicos en extractos o aceites esenciales de plantas, en lugar de compuestos únicos, es una de las nuevas metodologías utilizadas para mostrar una alta actividad biológica (Harvey, 2018).

#### **2.1.6. Técnicas de aislamiento y caracterización fitoquímica de las plantas medicinales**

Una vez obtenido el extracto de la planta se presenta una mezcla compleja de productos naturales (metabolitos secundarios) que es necesario aislar y depurar para obtener el producto puramente natural. Los compuestos tienen diferentes polaridades y características físicas que deben tenerse en cuenta ya que pueden dificultar el proceso de identificación y caracterización (Sasidharan et al., 2017). Se utilizan dos tipos de técnicas para aislar y detectar metabolitos secundarios: 1) Técnicas cromatográficas como la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía en columna (CC), la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y la cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) y 2) técnicas no cromatográficas como la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), (NMR) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS) (Hussein y El-Anssary, 2018).

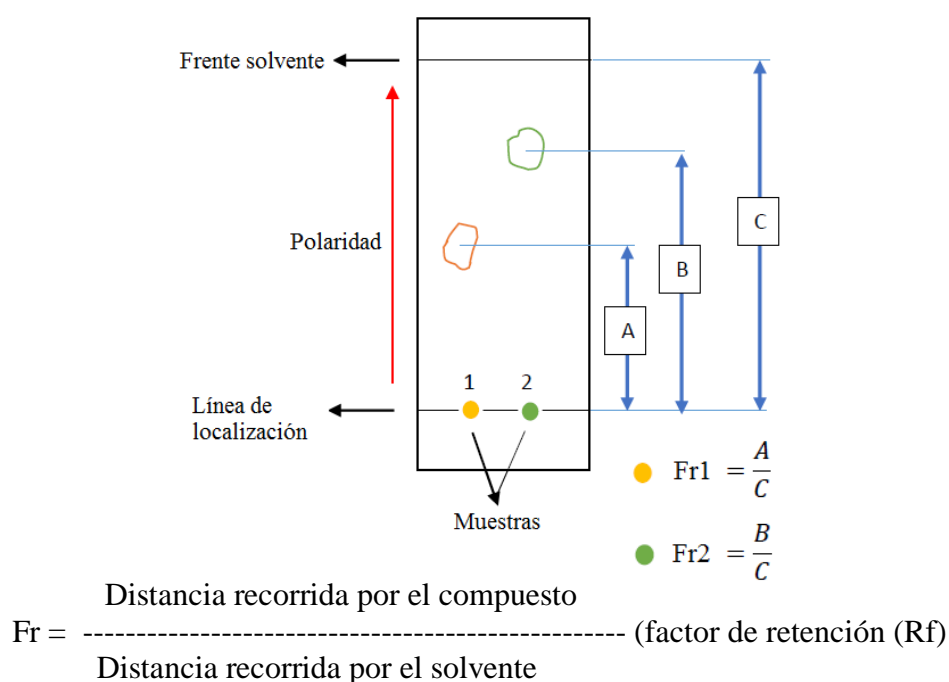
##### **2.1.6.1. Técnicas cromatográficas**

Son métodos que separan los diferentes compuestos químicos según su polaridad, forma, tamaño y carga (Hussein & El-Anssary, 2018). Existen 2 fases esenciales en estas técnicas: a) fase estacionaria es aquella que tiene una sustancia o adsorbente con diferentes afinidades a los compuestos que tiene la muestra, puede ser una confiable, gel o líquida (si es líquida, es unido a un sólido). Como adherentes de la fase estacionaria se utilizan habitualmente gel de sílice, celulosa en polvo, aluminio, almidón, etc. Y también tenemos la b) fase móvil, que puede ser líquido o gas que se mueve en una dirección junto

con la fase estacionaria (solventes). Su principal se centra en la aplicación de la muestra (extracto) sobre una superficie o un sólido donde la fase estacionaria permite la separación de productos naturales ayudada por la fase móvil (Tinoco y Vispo, 2020).

### 2.1.6.1.1. Cromatografía de capa fina (CCF)

La técnica CCF se aplica principalmente para compuestos de bajo peso molecular y utiliza un compuesto adsorbente adherido a una placa como fase estacionaria (Hussein & El-Anssary, 2018). La literatura informa que alrededor del 90% de los análisis fitoquímicos se realizan con gel de sílice. En este método, la fase móvil (solvente) viaja hacia arriba a través de la fase estacionaria por acción capilar, logrando así que los anualitos se separen según su polaridad respecto al solvente elegido (Rengifo-Zevallos, 2018). En el caso de que las moléculas sean incoloras, es necesario utilizar inflorescencia, radiactividad o cualquier sustancia química que les permita emitir un color que indique su posición en la placa. La reacción se puede observar visualmente o bajo luz ultravioleta. La TLC también nos permite calcular la posición del anualito usando la relación de la distancia recorrida por el compuesto y la fase móvil (Tinoco y Vispo, 2020). Este valor es el factor de retención (Rf) y cómo calcularlo se muestra en la Figura 5.



**Figura 5.** Cálculo del factor de retención de TLC (Fr)

**Fuente:** Cromatografía (CCF) (Hussein y El-Anssary, 2018)

#### **2.1.6.1.2. Cromatografía de columna (CC)**

La cromatografía en columna se aplica para separar compuestos con características más complejas como tener un mayor peso molecular y concentración, así como diferencias entre su estructura y carga neta. La columna se recubre por la fase estacionaria (cualquier tipo de adsorbente) y el extracto se deposita en la parte superior de la columna para ser absorbido en la fase estacionaria. Luego, se agrega la fase móvil y se deja pasar por la fase estacionaria, llevando consigo los analitos a diferentes velocidades y separando así los compuestos químicos de la muestra. La velocidad a la que transcurre la fase móvil depende de la polaridad y afinidad de los productos naturales hacia el disolvente (Mammer, 2019).

#### **2.1.6.1.3. Cromatografía líquida de alta presión (CLAP)**

La CLAP es una técnica que separa de manera eficiente moléculas en muestras biológicas, ambientales y farmacéuticas. La principal característica de la HPLC es que utiliza la presión para aumentar la velocidad a la que los compuestos de la muestra viajan a través de la columna (fase estacionaria) transportada por la fase móvil, aumentando el poder de separación de este método. La presión aplicada debe ser alta y estar entre 250-400 bar, por lo que es mejor aplicarla para muestras que contengan compuestos termolábiles (Grosser y van Dam, 2017). En esta técnica se utiliza un detector (habitualmente de luz ultravioleta por su alta sensibilidad), que permite detectar aquellos componentes capaces de absorber luz ultravioleta en un amplio rango de longitudes de onda, incluso cuando se encuentran en cantidades mínimas en la muestra. También se necesita un registrador que permita representar gráficamente la composición química de la muestra a través de un cromatograma (Díaz-Santana et al., 2017).

#### **2.1.6.1.4. Cromatografía de capa fina de alto rendimiento (CCFAR)**

La cromatografía de capa fina de alto rendimiento es una técnica mejorada basada en los mismos principios de CCF. Este método utiliza placas mucho más pequeñas y capas de recubrimiento más gruesas que en la CCF, lo que mejora el rendimiento de la separación de analitos. La ventaja de la HPTLC es la presencia de un densitómetro, que



registra la composición química de la muestra según su absorbancia de luz UV, mostrando el análisis cuantitativo de los diferentes metabolitos encontrados en un cromatograma. Es un método cromatográfico rápido, eficaz y eficaz capaz de analizar una amplia variedad de muestras (Attimarad et al., 2011).

#### **2.1.6.1.5. Cromatografía de gases (GC)**

El GC utiliza una columna, donde se observa la fase estacionaria y a diferencia de otras técnicas de cromatografía, la fase móvil (gas inerte) solo ayuda a transportar los compuestos a través de la columna pero no interactúa con ellos. Debido a la afinidad de los compuestos químicos en la muestra con la fase estacionaria, las moléculas se separan y luego salen a diferentes velocidades (Sparkman et al., 2018).

#### **2.1.6.2. Técnicas no cromatográficas**

##### **2.1.6.2.1. Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR)**

FT-IR es una técnica que utiliza luz en el rango infrarrojo del espectro electromagnético para que los componentes de una muestra desconocida puedan capturarlos y medirlos en función de una longitud de onda. Los enlaces químicos de las moléculas son los principales grupos funcionales identificados por este método y son tan específicos que se les conoce como “huella dactilar” molecular (Soares et al., 2017). Al ser una técnica informatizada, a diferencia de otras, es más sensible y rápida en su detección e identificación de compuestos. Su principal ventaja es registrar toda la información de la muestra en un espectro simultáneamente. Se pueden preparar muestras para FT-IR dependiendo de si es sólido o líquido. En el caso de muestras sólidas, deben triturarse hasta que las partículas sean uniformes y mezclarse con bromuro de potasio (KBr) para formar un gránulo homogéneo que se utilizará para el análisis. Por otro lado, si tienes una muestra líquida, se coloca una pequeña gota entre dos placas de cloruro de sodio (NaCl), formando una película que te permitirá realizar el análisis (Gomez y Murillo, 2017).

#### **2.1.6.2.2. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)**

La RMN fue informada por primera vez por Shuker en 1996 cuando logró describir e identificar moléculas de fármacos utilizando esta técnica, y su uso ha aumentado rápidamente desde entonces. Es un método utilizado para determinar los marcos estructurales en cuanto a la posición y tipo de diferentes isótopos de carbono ( $C-13$  NMR) o los hidrógenos (H-NMR) presentes en las moléculas de la muestra a estudiar. Para el análisis de RMN, la cantidad de muestra requerida es pequeña y la ventaja es que se puede reutilizar para estudios posteriores (Koparde, 2017)

#### **2.1.6.2.3. Espectrometría de masas (MS)**

El MS captura los compuestos separados y los descompone en fragmentos ionizados, lo que permite detectar e identificar las moléculas teniendo en cuenta la relación masa / carga. Al usar ambas técnicas juntas, el rendimiento y la sensibilidad de detección aumentan e incluso son perfectos para aquellas muestras con compuestos volátiles, ya que es un requisito específico de GC (Sparkman et al., 2018)

#### **2.1.6.2.4. La cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)**

Es una de las técnicas analíticas con guiones. En realidad, se trata de dos técnicas que se combinan para formar un único método para analizar mezclas de productos químicos orgánicos. La cromatografía de gases separa los componentes de una mezcla y la espectrometría de masas caracteriza cada uno de los componentes individualmente. La combinación de las dos técnicas permite evaluaciones tanto cualitativas como cuantitativas de una muestra que contiene varios compuestos orgánicos. Los usos de GC-MS son numerosos, incluida la investigación química, geológica, ambiental y forense (Sparkman et al., 2018)

### **2.1.7. Proceso para analizar las propiedades fitoquímicas y la actividad biológica de los productos naturales.**

Las plantas han tenido un papel fundamental como parte de la medicina moderna y el desarrollo de la industria farmacéutica, principalmente por la cuarta razón crítica. La primera es que las plantas se utilizan en la medicina tradicional como agentes terapéuticos directos. La segunda se utiliza como materia prima para la obtención algunos otros componentes químicos semisintéticos. El tercero se basa en su compleja y diversa estructura química que se ha utilizado como base para la creación de nuevos compuestos sintéticos, y el cuarto es que sirven como guías para el descubrimiento de nuevos agentes medicinales de acuerdo con el conocimiento que existe sobre su taxonomía (Anjo et al., 2021)

La investigación que conduce al descubrimiento de fármacos se basa en el estudio de la fitoquímica. La fitoquímica o fitoanálisis es una disciplina científica que tiene como objetivo definir la composición química de los recursos vegetales y estudiar estos componentes para descubrir potenciales agentes terapéuticos (Hussein y El-Anssary, 2018). El metabolismo secundario de las plantas produce compuestos biológicamente activos que se forman como mecanismo de defensa y adaptación al medio. Estos compuestos químicos también se conocen como metabolitos secundarios o fitoquímicos. Entre los fitoquímicos más comunes se encuentran los fenoles, alcaloides, terpenos, flavonoides, saponinas, esteroides y otros (A. Martínez, 2018) Según la literatura, se ha demostrado que los compuestos fenólicos son los más abundantes entre las plantas (45%) y producen la mayor cantidad de actividades biológicas (Houghton, 2017) Se estima que se han descrito aproximadamente 50k metabolitos secundarios en plantas, y con aquellos para los que aún no se dispone de un cribado fitoquímico, podría llegar a más de 200k. Entre las propiedades asignadas a estos componentes activos se encuentran las antimicrobianas, anticancerígenas, antioxidantes, antifúngicas, antivirales y algunas otras (Soares et al., 2017). La Tabla 5 describe las diversas propiedades biológicas atribuidas a los diferentes metabolitos secundarios con base en la información de estudios previos en la literatura.

**Tabla 5. Propiedades biológicas de algunos metabolitos secundarios aislados de plantas.**

<b>Metabolitos secundarios</b>	<b>Actividad biológica</b>	<b>Referencias</b>
Alcaloides	Anticancerígenos, antivirales, antifúngicos.	antibacterianos, antioxidantes, (Thawabteh et al., 2019)
Compuestos fenólicos	Antibacterianos, antioxidantes, antivirales, antiinflamatorios.	antifúngicos, anticancerígenos, antitumorales, (Vega, 2013)
Terpenoides	Antibacteriano, antiinflamatorio, antihipertensivo.	antifúngico, (Martin-Smith y Sneader, 2018)
Flavonoides	Antioxidante, antiulceroso, anticancerígeno	antiinflamatorio, antiviral, (Karak, 2019)
Taninos	Antibacteriano, antioxidante (133), antioxidantes	antiviral, antifúngico, antivirales, (Karak, 2019)
Saponinas	Analgésicas, antimicrobianas	antifúngicas, (Desai et al., 2009)
Cumarinas	Antiinflamatorio, anticoagulante, antiviral, antibacteriano.	anticanceroso, antioxidante, (Durant-Archibold et al., 2018)

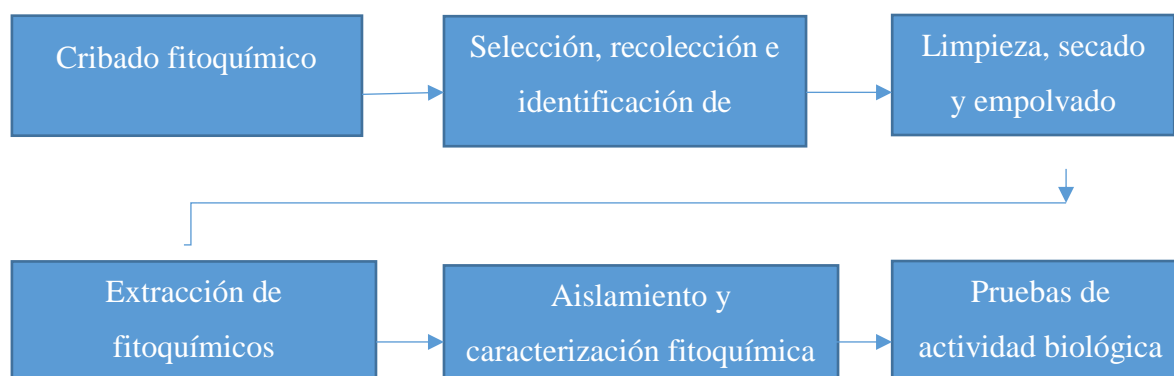
**Fuente:** El autor, 2021.

Para lograr un proceso exitoso en el desarrollo de nuevos fármacos, primero es necesario extraer, aislar, purificar y caracterizar los fitoquímicos y luego realizar pruebas in vitro para conocer su actividad biológica (Hussein & El-Anssary, 2018) (Hussein y El-Anssary, 2018) Una vez finalizados estos estudios y si se pueden verificar sus propiedades medicinales, entra en la fase de pruebas clínicas para desarrollar y lanzar el fármaco al mercado (Siddiqui et al., 2017)

### **2.1.7.1. Aceites esenciales**

El aceite esencial es básicamente extractos de plantas. Se extraen con la aplicación de vapor de agua (destilación hídrica y destilación por arrastre de vapor) o al presionar las partes vegetativas de la planta (flores, hojas, corteza, frutos) para obtener los compuestos que generan la fragancia. Se pueden necesitar varios kilos de una planta para producir una pequeña cantidad o una pequeña botella de aceite esencial. Investigadores opinan que el aceite esencial puede realizar también otras funciones en las plantas (Orchard y Van Vuuren, 2017).

En el siguiente apartado se describe el procedimiento para recolectar, extraer y aislar los principios activos de los aceites esenciales de las plantas, además de las diferentes técnicas que más se utilizan en la actualidad para identificarlas y luego probar su actividad biológica (Figura 6)



**Figura 6.** Procedimiento para analizar las propiedades químicas y actividad biológica de productos naturales

**Fuente:** El autor, 2021.

### 2.1.7.2. Selección, recolección e identificación de plantas

El desarrollo de nuevos fármacos tiene una base fundamental en el conocimiento previo que se conoce sobre la planta de interés. La selección del material vegetal es un paso crucial ya que de él depende el valor científico otorgado a la investigación, por ello se debe realizar una investigación bibliográfica en profundidad para conocer y comprender sus usos medicinales a partir de la etnobotánica, la etnogeografía, su composición química, la importancia y usos de la taxonomía, la toxicología y otras áreas, que nos permitan comprender mejor la especie vegetal y su posible uso como agente farmacológico (Mtewa et al., 2018). Los bosques silvestres tienen una gran diversidad de plantas medicinales, por lo que la mayoría de los materiales vegetales se recolectan en estos lugares. Sin embargo, al tener tanta variedad, un error de identificación taxonómica está muy extendido y puede haber incluso rastros de pesticidas en las muestras. Por esta razón, los herbarios también juegan un importante lugar de reunión de especies vegetales donde hay un mejor control de los recursos y donde las especies vegetales ya han sido identificadas previamente. Una vez recolectada e identificada la planta, se coloca en una bolsa plástica seca para mantener la humedad y en buen estado para su posterior análisis (Divya et al., 2018).

### **2.1.7.3. Limpiar, secar y desempolvar**

Una vez recolectadas las especies vegetales, es necesario ingresar a un proceso de limpieza y secado para evitar que la composición química de la planta se vea afectada (Medeo et al., 2015). Primero se debe definir qué parte de la planta es la que se va a estudiar y luego proceder a retirar aquellas partes que estén dañadas o comidas por insectos, como en el caso de las hojas, por ejemplo. Una vez hecho esto, el material se puede lavar con agua o con hipoclorito de sodio al 1%, como se registra en algunos estudios, para eliminar trazas de tierra u otros microorganismos (Guayasamin-López, 2018).

Generalmente es mejor lavar el material vegetal con las manos para obtener mejores resultados y evitar dañar la muestra (Anjo et al., 2021). Una vez limpiado el material de estudio, se seca. Es fundamental secar la planta lo antes posible después de la cosecha para evitar daños y poder deshidratarla para almacenarla sin problema en caso de que se necesite más adelante (Medeo et al., 2015).

Además, se recomienda evitar que la planta entre en contacto con la luz solar porque los componentes volátiles pueden sufrir reacciones químicas como consecuencia de la exposición a la luz ultravioleta. La temperatura adecuada está entre 40 - 70 oC según el método utilizado, aunque los más habituales son los hornos ventilados (Romanik, et al, 2017). Sin embargo, no debe superar los 300 oC ya que los compuestos termolábiles (compuestos que se destruyen cuando alcanzan su punto de ebullición) pueden descomponerse (Velavan, 2015).

El secado del material vegetal se puede realizar a través de la luz solar, aunque es un método que requiere mucho espacio y tiempo dependiendo de la cantidad de material y la humedad de la planta, además de que puede sufrir cambios químicos que puede afectar el estudio como se mencionó anteriormente. Otro método es utilizar secadores artificiales (el secado en caliente es el más común) como cámaras u hornos, aunque el espacio es más pequeño y puede ser un poco más caro, este equipo es más rápido porque reducen el tiempo de secado a unas horas o minutos. , son eficientes y menos laboriosos (Anjo et al., 2021).

Cuando el material se deshidrata, se debe moler o reducir a polvo para aumentar la superficie de la planta, y así cuando se utilizan diferentes solventes para obtener los fitoquímicos (metabolitos secundarios), estos pueden ingresar rápidamente a las células y extraerlos (Guayasamin-López, 2018). La pulverización del material vegetal nos permite obtener pequeñas partículas y una muestra homogénea, de tal forma que mejora el proceso de extracción. Según varios estudios, el tamaño de partícula ideal debería ser de 0,5 mm para que pueda entrar en contacto con el disolvente con éxito. En el caso de que la partícula sea diminuta, puede causar problemas ya que, al ser tan fina, es capaz de absorber el soluto en exceso y afectar el proceso de filtración (Siddiqui et al., 2017).

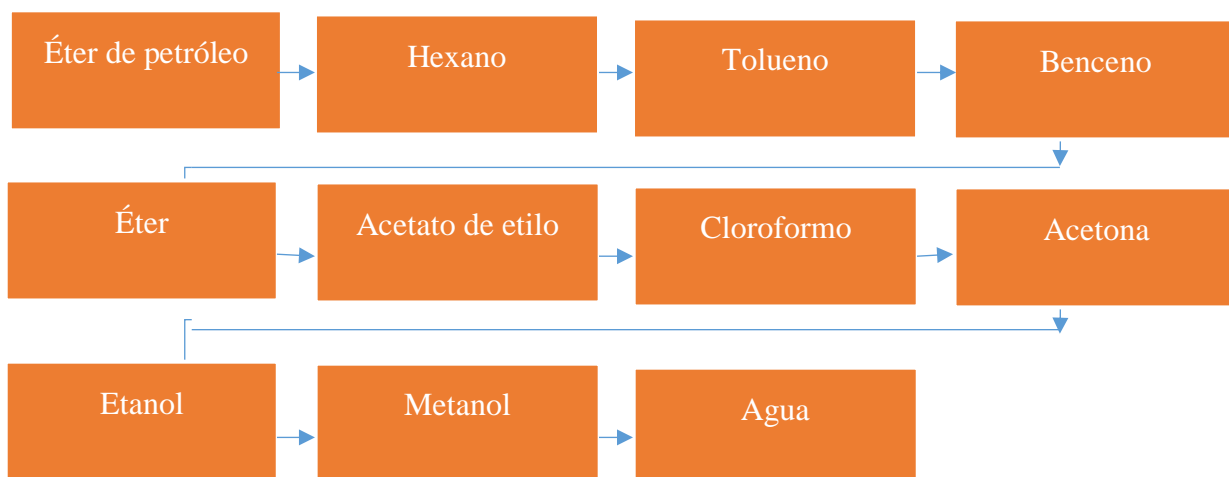
#### **2.1.7.4. Extracción**

La extracción es el primer **paso** para el análisis fitoquímico de la planta y se realiza mediante varios procedimientos estándar. Se basa principalmente en la extracción de compuestos químicos (fitoquímicos) del material vegetal que luego debe ser aislado y caracterizado (Sasidharan et al., 2017) Para obtener los componentes bioactivos de la planta se utilizan diferentes disolventes (Anjo et al., 2021).

Antes de iniciar el proceso de extracción, es necesario conocer si existen estudios fitoquímicos previamente publicados en la literatura. Esto es importante ya que si se conocen los componentes objetivo y el método de extracción, así como los disolventes utilizados para obtenerlos, simplificarán el estudio. Pero si no se conocen los componentes objetivo, entonces es mejor usar diferentes disolventes y extracciones repetidas para poder eliminar cada componente químico del material vegetal tanto como sea posible, pues la forma en que el solvente actúa sobre la materia prima es penetrando la matriz sólida (células), luego el soluto (metabolito) logra disolverse en el solvente, luego el soluto se difunde fuera de la célula, y finalmente, los solutos son extraídos y recolectados (Siddiqui et al., 2017).

Un tipo de extracto puede contener analitos o compuestos diferentes a los obtenidos en otros extractos. Esto significa que, dependiendo del tipo de disolvente utilizado, se pueden obtener diferentes metabolitos secundarios. Por este motivo, para la elección de los disolventes, se recomienda partir de los menos polares (éter de petróleo, hexano,

acetato de etilo o cloroformo) hacia los de polaridad creciente (etanol y agua) (Figura 7) (Sasidharan et al., 2017).



**Figura 7.** Principales disolventes ordenados de menor a mayor polaridad

**Fuente:** Disolvente orgánicos – fitoquímicos (Sasidharan et al., 2017).

Sin embargo, el disolvente se elige de acuerdo con la naturaleza del compuesto bioactivo a extraer, ya que los disolventes con una polaridad similar a la del compuesto mejoran los resultados de la extracción (Hussein y El-Anssary, 2018). El etanol (EtOH) y el metanol (MeOH) se consideran los disolventes universales para extraer la mayoría de los fitoquímicos (Siddiqui et al., 2017). En la Tabla 6 se puede ver algunos de los metabolitos secundarios que más abundan en las plantas y los disolventes utilizados para extraerlos.

**Tabla 6.** Principales disolventes utilizados para extraer una amplia variedad de compuestos químicos activos (metabolitos secundarios) de las plantas.

Disolventes	Metabolitos secundarios
Acuoso (H <sub>2</sub> O)	Taninos, terpenoides, saponinas, lectinas
Etanol (EtOH)	Terpenoides, polifenoles, alcaloides, flavonoides, esteroides
Metanol (MeOH)	Saponinas, taninos, lactonas, flavonoides, polifenoles, antocianinas, terpenoides, alcaloides
Cloroformo	Flavonoides, terpenoides
Éter	Terpenoides, cumarinas, alcaloides
Acetona	Fenoles, flavonoides

**Fuente:** El Autor, 2021

Aumentar el tiempo de extracción no afecta en absoluto la eficacia del método aplicado, aunque sí la mejora. A medida que la relación disolvente-soluto es mayor, la



eficiencia de extracción aumentará a medida que se alcance el equilibrio del soluto dentro y fuera del material sólido (Siddiqui et al., 2017). Pero si la relación disolvente-soluto es demasiado alta, se producirá un exceso de extracción y la concentración de los solutos será menor, por lo que se necesitará más tiempo para alcanzar una concentración adecuada para el análisis fitoquímico (Siddiqui et al., 2017).

Entre los métodos de extracción más utilizados se encuentran: 1) los más simples y convencionales como maceración, infusión, percolación, decocción, extracción Soxhlet y destilación al vapor; y 2) aquellos un poco más complicados y modernos como la extracción asistida por microondas (MAE), la extracción de fluidos supercríticos (SFC), la extracción o sonicación asistida por ultrasonido (UAE) y la extracción asistida por enzimas (EAE) (Thawabteh et al., 2019).

#### **2.1.7.5. Métodos de extracción de los aceites esenciales**

##### **2.1.7.5.1. Maceración**

Este método se basa en tomar el polvo o partes de la planta y colocarlas en un recipiente con tapa junto con el solvente. El material se mantiene sumergido a temperatura ambiente y con agitación constante durante al menos 3 días, y luego con un colador o papel de filtro se separa el solvente de los residuos vegetales. El tipo de disolvente elegido determina los compuestos obtenidos en el extracto (Swami et al., 2018).

##### **2.1.7.5.2. Decocción**

Este método se usa a menudo para las estructuras más duras de la planta, como raíces y cortezas. Se basa en poner el extracto crudo en agua hasta que hierva y dejarlo por 15 minutos. Pasado este tiempo, se reducirá el volumen de agua, se enfría y se filtra el extracto concentrado. Este proceso es aplicable a compuestos termoendurecibles y solubles en agua y no se aplica a la extracción de componentes termolábiles (Siddiqui et al., 2017; Mtewa et al., 2018).

### **2.1.7.5.3. Filtración**

Es un procedimiento en el que se utiliza un percolador, en el que se introduce el material crudo y una cierta cantidad de disolvente, se cierra y se deja reposar durante unas 4 horas. A medida que pasa el tiempo y el solvente se satura, se agrega más solvente para formar una capa poco profunda sobre el material vegetal (agregar solvente fresco permite que la hierba se extraiga continuamente), y se deja macerar en la cafetera durante 24 horas. Luego se agrega más solvente hasta que el percolado alcanza el volumen requerido y finalmente se procede al proceso de filtración o decantación (Siddiqui et al., 2017).

### **2.1.7.5.4. Extracción de Soxhlet**

El método consiste en colocar la muestra en el equipo Soxhlet y hervir el solvente en el matraz. Los vapores de disolvente ascienden por el extractor y se condensan en el refrigerante, cayendo poco a poco sobre el lugar donde se encuentra el extracto crudo. La ventaja que ofrece este método es realizar varias extracciones de forma continua con el mismo disolvente, lo que significa que lo recicla, lo que lo convierte en un método más rentable. Los compuestos termolábiles no son óptimos para extraer con este método ya que, debido a la alta temperatura, puede degradarlos (Mtewa et al., 2018).

### **2.1.7.5.5. Extracción asistida por microondas (EAM)**

EAM, utiliza la energía emitida por las microondas para facilitar la extracción de analitos. Se utiliza una cantidad de disolvente y se mezcla con la muestra mientras se calienta en el microondas. En ese momento, la energía de las microondas aumenta la presión, rompiendo las células de la planta, liberando los compuestos químicos (Mtewa et al., 2018) La interacción de radiación y dipolo de las moléculas inducidas por ondas electromagnéticas permite una mejor y rápida penetración del solvente en las partículas del vegetal en estudio. Sin embargo, MAE favorece la generación de compuestos polares y los solventes con una constante dieléctrica alta ya que capturan mejor la radiación de microondas (Romanik et al., 2007).

#### **2.1.7.5.6. Extracción de fluidos supercríticos (SFC)**

La técnica SFC utiliza una sustancia (fluido supercrítico) capaz de soportar una temperatura y una presión superiores a su punto crítico termodinámico, lo que le permite difundirse a través de sólidos como lo hace un gas o disolver materiales como hace un líquido (López-García et al., 2017). Esto significa que un fluido supercrítico (SF) se comporta más como un gas, pero tiene una solubilidad similar a un líquido, lo que permite la extracción de una amplia variedad de fitoquímicos. El CO<sub>2</sub> se utiliza generalmente como fluido de extracción debido a su bajo costo y toxicidad, alta abundancia y eficiencia. El CO<sub>2</sub> puede convertirse en SF cuando la temperatura supera los 31,1 ° C y los 7380 kPa y tiene una mayor solubilidad con analitos no polares (Siddiqui et al., 2017).

#### **2.1.7.5.7. Extracción asistida por ultrasonido (EAU)**

Este método utiliza ultrasonidos para facilitar el proceso de extracción. Los ultrasonidos son ondas que tienen frecuencias que van desde 16kHz a 1Ghz, imperceptibles para el oído humano. Estas vibraciones sirven como fuente de energía para causar cavitación acústica, lo que facilita la liberación de metabolitos de la muestra al aumentar la permeabilidad de las paredes celulares y permitir que el solvente se difunda rápidamente. La ventaja de esta técnica es que se realiza a temperatura ambiente y que al someter la muestra a un baño de ultrasonidos durante un tiempo determinado (normalmente 30-70 min) se pueden extraer muchas muestras al mismo tiempo (Romanik et al., 2007).

#### **2.1.7.5.8. Extracción asistida por enzimas (EAE)**

El procedimiento EAE se basa en el uso de enzimas específicas (generalmente celulasas, hemicelulasas y pectinasas) para romper, mediante acciones hidráulicas, la estructura compleja de la pared celular de manera que sea posible la extracción y liberación de compuestos químicos a través del solvente (Puri et al., 2012).

#### **2.1.7.5.9. Destilación por arrastre de vapor**

La destilación a vapor es una técnica que se utiliza para extraer principalmente compuestos sensibles a la temperatura, como los componentes aromáticos (volátiles) identificados en el aceite esencial de la planta. Se introduce agua en el aparato de destilación y al mismo tiempo que aumenta la temperatura, el vapor de agua transporta los compuestos insolubles en agua y los lleva al matraz de condensación. Al final del proceso, se llena con agua destilada y por decantación es posible separar el aceite esencial de la fase líquida (Romanik et al., 2007).

#### **2.1.7.5.10. Extracción por Hidrodestilación**

La hidrodestilación se ha utilizado durante mucho tiempo para la extracción de aceites esenciales y compuestos bioactivos de materiales vegetales. La hidrodestilación se puede realizar de tres formas diferentes: destilación de agua, destilación de agua y vapor y destilación directa de vapor. Los tres procesos fisicoquímicos principales implicados en la hidrodestilación son la hidrodifusión, la hidrólisis y la descomposición por calor. El agua caliente y el vapor de agua que actúan como agentes extractores, principales medios para liberar compuestos bioactivos en la estructura vegetativa de las partes de la planta y transportarlos. El enfriamiento indirecto condensa la mezcla de vapor y hace que se produzca la separación del aceite y los compuestos bioactivos del agua. Los aceites esenciales y los compuestos bioactivos a base de aceite generalmente se secan sobre sulfato de sodio anhidro. Dado que la hidrodestilación se realiza a menudo a una temperatura superior al punto de ebullición del agua, es posible que se pierdan algunos componentes volátiles, pigmentos naturales y compuestos bioactivos termolábiles (Azmir et al., 2013).

No intervienen disolventes orgánicos y se puede realizar inmediatamente después de la deshidratación del material vegetal estudiado. La hidrodestilación implica tres procesos fisicoquímicos: descomposición por calor, hidrodifusión e hidrólisis. Se debe considerar que se pueden perder algunos componentes volátiles, razón por la cual se suele limitar su uso para la extracción de compuestos termolábiles (Ruiz-Benitez Martha, 2020)

### ***Ventajas de la hidrodestilación***

Por lo general se trata de un sistema de fácil montaje, comparado con el sistema de destilación por arrastre de vapores. Demuestra fácil manejo a sustancias que contienen un tamaño de partícula de diámetro pequeño, ejemplo sustancias pulverizadas.

### ***Desventajas de la hidrodestilación***

Algunos componentes del aceite esencial son sensibles a la hidrólisis como el caso de los ésteres, aldehídos y determinados monoterpenos pueden polimerizar. También, hay compuestos simples oxigenados como fenoles son solubles en determinados ambientes como el agua, lo que impide su recuperación fácil e inmediata. Razón por la cual resultan ser operaciones más lentas si se compara con el método de destilación por arrastre de vapor (Obregon, 2018).

#### **2.1.7.6. Rendimiento del aceite esencial obtenido.**

Se obtuvo el rendimiento porcentual (p/p), aplicando la Ecuación (Ec.1), una vez que se terminaba cada proceso de destilación. Se trató de obtener la razón existente entre la cantidad de producto (aceite esencial obtenido) y la materia prima fresca utilizada. Se trata entonces del rendimiento teórico en gramos, quedando la ecuación, así:

$$R = \frac{\text{Peso del aceite esencial obtenido}}{\text{Peso de la materia prima empleada (chuquiraga fresca)}} \times 100 = \text{Ec. 1}$$

Según (Cedeño et al., 2019).

#### **2.1.7.6.1. Composición química y propiedades del aceite esencial extraído.**

El aceite esencial es el producto del metabolismo secundario de algunas especies vegetales, apareciendo como líquidos volátiles a temperatura ambiente, contribuyendo al aroma de las plantas que los producen (Mamadaliyeva et al., 2018). La Organización Internacional de Normalización (OIN) define Aceites Esenciales (AE) o Volátiles como productos obtenidos de partes de plantas, especialmente de las hojas, pero también pueden obtenerse de las flores, corteza, frutos y semillas), que se extraen mediante la

técnica de arrastre de vapor, en la mayoría de los casos, y también presionando el pericarpio. Químicamente suelen ser mezclas complejas de sustancias volátiles, lipófilas, olorosas y líquidas. Se asocian a varias funciones necesarias para la supervivencia de la planta en su ecosistema, jugando un papel fundamental en la defensa frente a microorganismos y depredadores, y también en la atracción de insectos y otros agentes fertilizantes. En la medicina popular, los aceites esenciales tienen una larga tradición de uso (Aljaafar et al., 2019).

Los aceites volátiles rara vez se encuentran en las gimnospermas (excepto en las coníferas). En las angiospermas monocotiledóneas, la ocurrencia es relativamente rara, con la excepción de Poaceae (especialmente especies *Cymbopogon* y *Vitiveria*) y Zingiberaceae (especies *Alpinia* y *Curcuma*, entre otras). Sin embargo, las plantas ricas en aceites volátiles abundan en angiospermas dicotiledóneas, como en las familias Asteraceae, Apiaceae (Mamadaliyeva et al., 2018).

La composición y concentración de los componentes fitoquímicos del aceite esencial puede verse influenciada por factores como radiación, temperatura, precipitación, vientos fuertes, altitud, suelo, tiempo de recolección y otros. Los aceites esenciales son productos complejos y, dependiendo de la especie, pueden contener más de 100 componentes químicos, teniendo uno o dos componentes principales que les dan sus propios sabores y olores. Los componentes químicos que se encuentran en los aceites esenciales pertenecen principalmente a la clase de los terpenos, además de moléculas más pequeñas como ésteres de ácidos grasos, fenilpropanoides, alcoholes, aldehídos, cetonas de cadena corta y, en algunos casos, hidrocarburos alifáticos (Cedeño et al., 2019).

Los terpenos, constituyentes principales de los aceites esenciales, se dividen en diferentes subclases, según el número de unidades de isopreno presentes en sus estructuras, tales como: hemiterpenos(C5), monoterpenos(C10), sesquiterpenos(C15), diterpenos(C20), triterpenos(C30) y tetraterpenos(C40) y, cuando se agregan elementos adicionales a sus estructuras, generalmente oxígeno, se denominan terpenoides (Perez-Chauca et al., 2020).

Las propiedades farmacológicas atribuidas a los aceites esenciales son múltiples y presentan importantes ventajas frente a otros productos, como su volatilidad, lo que los

hace ideales para su uso en nebulizaciones e inhalaciones. Su volatilidad y el bajo peso molecular de sus constituyentes permiten que sean absorbidos y eliminados rápidamente del organismo a través de vías metabólicas (Hurtado-Huarcaya1 et al., 2021). La actividad antibacteriana del aceite esencial se atribuye a los monoterpenos, sesquiterpenos y sus derivados oxigenados, como los monoterpenos oxigenados linalol, 1,8-cineol, neral y geranial y a compuestos fenólicos como timol y mentol (Perez-Chauca et al., 2020), los que actúan sobre el crecimiento de los microorganismos, como agentes inhibidores. Uno de los posibles mecanismos de acción de estos compuestos ocurre a través de la interacción de los componentes oleosos con la doble capa de fosfolípidos de la pared bacteriana, lo que produce un aumento de su permeabilidad, resultando en la pérdida de componentes celulares. Esto provoca cambios en el sistema enzimático celular, que pueden generar cambios en la producción de energía, destrucción de material genético y en la síntesis de constituyentes estructurales de la célula (Kuma, 2008). Otro factor sumamente importante con respecto a los aceites esenciales es que presentan un riesgo mínimo de desencadenar resistencias en microorganismos patógenos, ya que estos productos son una mezcla compleja de varias sustancias con propiedades antimicrobianas que actúan por múltiples mecanismos (Raeisi et al., 2019).

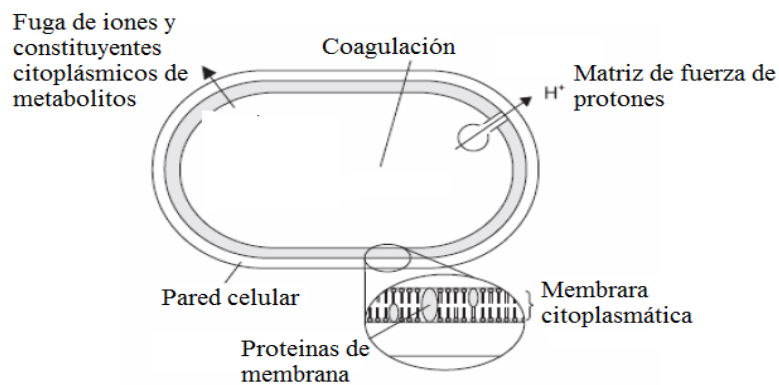
#### **2.1.7.6.2. Principales metabolitos secundarios presentes en los aceites esenciales de las plantas.**

El metabolismo se define como un conjunto total de reacciones químicas (anabólicas, catabólicas o de biotransformación) que ocurren continuamente en cada célula, es decir, transformación de compuestos orgánicos catalizada por enzimas que dirigen estas reacciones para producir energía en las células vivas para su mantenimiento diario (Petroll et al., 2019). El metabolismo primario realiza funciones vitales en la célula mediante la síntesis de sustancias como proteínas, azúcares, lípidos, entre otras sustancias químicas. Mientras tanto, el metabolismo secundario está destinado a elementos no esenciales para el organismo productor, cuya producción y acumulación están restringidas a un número limitado de organismos (Ramos-Páez, 2017). Actualmente se sabe que el medio ambiente, junto con la influencia antropogénica, ha venido provocando varias interferencias en el ecosistema, y especialmente en la producción de compuestos, productos químicos de ciertos vegetales, hongos, etc. De esta forma, los vegetales acaban

produciendo una mayor cantidad de metabolitos secundarios que tienen varias funciones que van desde la defensa frente a herbívoros y microorganismos, protección frente a los rayos ultravioleta (UV), atracción de polinizadores o dispersores de semillas. Los metabolitos secundarios comprenden una clase rica y diversa de compuestos que están destinados a impartir propiedades o actividades funcionales a una planta determinada. Sin embargo, la calidad de la materia vegetal no garantiza por sí sola la eficacia y seguridad del producto final, ya que el análisis fitoquímico se rige por pruebas cualitativas para detectar clases de metabolitos, por lo que el análisis fisicoquímico asociado al farmacológico, garantiza en parte la eficacia mediante ensayos preclínicos y clínicos de los efectos preconizados (Hussein y El-Anssary, 2018). En este contexto, el análisis químico de metabolitos secundarios y material botánico, ya sean hojas, frutos, ramas y flores, brindan información esencial para la formulación de productos naturales con alta calidad farmacognóstica, por ejemplo.

### 2.1.8. Mecanismo de acción antimicrobiana de los aceites esenciales

La parte estructural o sitios de la célula bacteriana considerados como sitios de acción para el desarrollo de los componentes químicos de los productos naturales que presentan actividad antimicrobiana, se ilustran en la Figura 8. Generalmente, los mecanismos de acción de estos componentes naturales son el flujo de electrones, la desintegración de la membrana citoplasmática, la coagulación del contenido de la célula, la desestabilización de la fuerza impulsora de protones (FIP) y el transporte activo. Es de esperar que algunos mecanismos de acción actúan sobre objetivos específicos y otros sitios son afectados por el resultado de otros mecanismos (Edwards-Jones, 2018)



**Figura 8.** Sitios y mecanismos de acción que pueden ser sitios para la acción de compuestos naturales en la célula bacteriana.

**Fuente:** Mecanismo de acción antimicrobiana (Adaptado de Burt, 2004, 2007)



Una característica importante, responsable de la acción antimicrobiana de los aceites esenciales. Los elementos esenciales son los componentes hidrófobos que permiten la partición de los lípidos de la membrana celular bacteriana, desintegrando las estructuras y haciéndolas más permeables. Los componentes de los aceites esenciales también actúan sobre las proteínas de la membrana citoplasmática. Los hidrocarburos cíclicos podrían actuar sobre las enzimas ATPasa que se sabe que están ubicadas en la membrana citoplasmática y rodeadas por moléculas de lípidos.

Y los hidrocarburos lipídicos podrían distorsionar la interacción lípido-proteína, es posible la interacción directa de compuestos lipofílicos con partes hidrofóbicas de la proteína (Mickymaray, 2019). Algunos aceites esenciales estimularon el crecimiento de pseudomicelia, una indicación de que pueden actuar sobre enzimas involucradas en la síntesis de componentes estructurales de bacterias (Gonelimali et al., 2018). A continuación, se describen algunos compuestos y su mecanismo de acción sobre los microorganismos.

Carvacrol y timol: el timol tiene una estructura similar al carvacrol, que difiere en términos de la ubicación del grupo hidroxilo en el anillo fenólico. Las dos sustancias parecen hacer que la membrana sea permeable. Ambas estructuras desintegran la membrana externa de las bacterias Gram negativas liberando lipopolisacáridos (LPS) y aumentando la permeabilidad de la membrana citoplasmática al ATP. La presencia de cloruro de magnesio no influye en esta acción, lo que sugiere un mecanismo de quelación de cationes diferente en la membrana externa (Carhuallanqui, 2020).

Eugenol: También se han encontrado concentraciones de eugenol que inhiben la producción de amilasa y proteasa de *B. cereus*, degradación de la pared celular y lisis celular (Revelo, 2017).

P-cimeno: un precursor del carvacrol, es hidrófobo y provoca una mayor hinchazón de la membrana citoplasmática que el carvacrol (Carhuallanqui, 2020).

Carvona: cuando se prueba en concentraciones superiores a su concentración inhibitoria mínima (MIC), la carvona disipa el gradiente de pH y el potencial de

membrana celular. El crecimiento de *E. coli*, *Streptococcus thermophilus* y *L. lactis* disminuyó según las concentraciones de carvona, lo que sugiere que actúa alterando el estado metabólico general de la célula (Rivas y Alberto, 2018).

Cinamaldehído: Se sabe que el cinamaldehído tiene una acción inhibitoria sobre *E. coli* y *Salmonella Typhimurium* en concentraciones similares a las de carvacrol y timol, pero no desintegra la membrana externa ni debilita el ATP intracelular. El grupo carbonilo tiene afinidad por las proteínas que previenen la acción de las descarboxilasas de aminoácidos en *E.aerogenes* (A. Martínez, 2018) La Tabla 7 presenta los principales mecanismos de acción de los antimicrobianos vegetales.

**Tabla 7.** Principales clases de compuestos con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas

<b>Clase</b>	<b>Subclase</b>	<b>Ejemplo</b>	<b>Mecanismos de acción</b>
Fenólicos	<b>Fenoles simples</b>	Catechol	Previene la entrada del sustrato
		Epicatequina	Desintegración de la membrana
	Ácidos fenólicos	Ácido cinámico	?
	Quinonas	Hipericina	Unión adhesina, inactiva enzimas, complejación de la pared celular
	Flavonoides	Crisina	Unión adhesiva. Complejo de pared celular.
	Flavonas	Abisinona	Inactiva enzimas e inhibe la transcriptasa inversa del VIH
Taninos	Ellagitanina	Privación de sustrato, alteración de la membrana, Unión adhesiva, inactiva enzimas, unión a	

			proteínas, complejos de iones metálicos.
	Cumarinas	Warfarina	Interacción con el ADN eucariota (Actividad Antivírico)
Terpenoides, aceites esenciales		Capsaicina	Desintegración de la membrana
Alcaloides		Berberina	Interactúa con la pared celular y / o el ADN
		Piperina	
Lectinas y polipéptidos		Aglutinina manosa específica	Forma enlaces disulfuro e interfiere con la replicación viral.
Poliacetilenos			?

---

**Fuente:** Adaptado de Ayaz et al.,( 2019)

### **2.1.9. Ensayos preclínicos de actividad biológica in vitro**

Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se utilizan para probar la actividad biológica de extractos o compuestos puros como los aceites esenciales, frente a diferentes microorganismos como bacterias y hongos. La diversidad química de los productos naturales brinda la oportunidad de verificar la actividad antimicrobiana en este tipo de pruebas, permitiendo el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, además de ayudar a predecir resultados terapéuticos (Balouiri et al., 2016). Hay dos tipos de métodos, difusión y dilución. La técnica de difusión implica la propagación del agente terapéutico sobre la placa de agar inoculada con un microorganismo específico.

En comparación, la técnica de dilución facilitó el cálculo de los valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) de cualquier tipo de agente antimicrobiano probado en un medio de agar o caldo. MIC (expresada en  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) se refiere a la concentración más baja de un extracto o compuesto activo que se requiere para inhibir el crecimiento del microorganismo. Tanto los métodos de difusión como los de dilución son técnicas donde factores como el método de extracción utilizado, el medio de cultivo o los

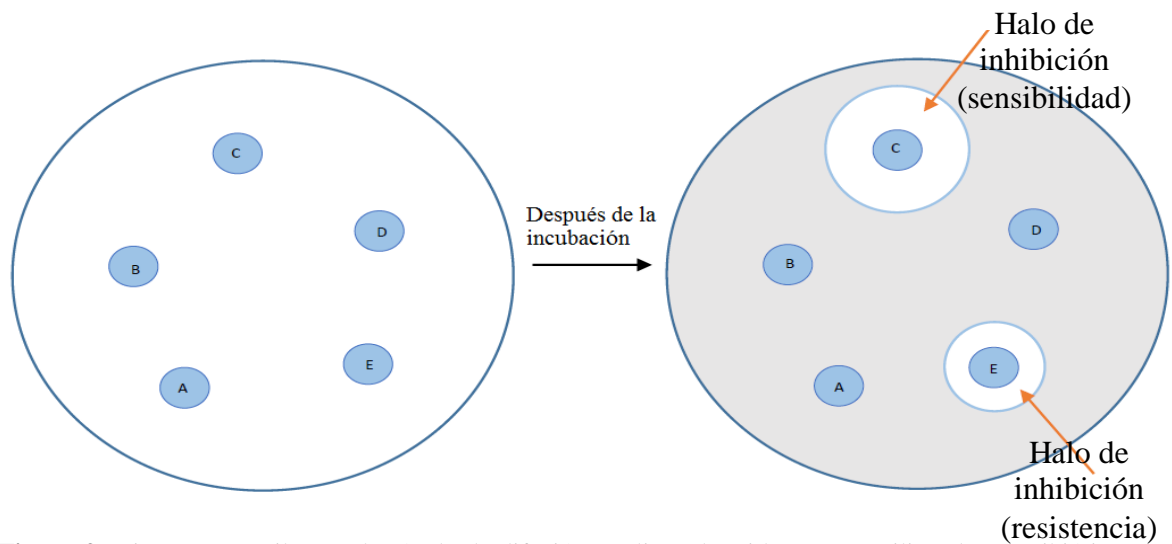
microorganismos ensayados, pueden afectar los resultados obtenidos (Rodríguez-Tudela et al., 2003).

Un microorganismo se considera susceptible a una sustancia antimicrobiana cuando se inhibe su crecimiento con una concentración mínima de un cuarto a un octavo de la dosis estándar que se encuentra en el suero cuando se administra a un ser humano (Christenson, Korgenski y Relich, 2018). Según varios estudios, el método de difusión más destacado es la difusión en disco y la difusión en pozos de agar, mientras que la dilución en caldo y agar se destaca en los métodos de dilución. Estas técnicas se describen en esta sección ya que son las pruebas in vitro más conocidas y esenciales para evaluar la actividad antimicrobiana de componentes o extractos puros (Balouiri et al., 2016).

### **2.1.9.1. Métodos de difusión**

**2.1.9.1.1. Método de difusión en disco**, también conocido como "el método Kirby-Bauer", es un método eficaz para conocer el efecto antimicrobiano de un compuesto previamente aislado. Primero, en una placa de Petri con agar Muller-Hinton (MHA), se debe inocular el microorganismo a ensayar; por lo general, se utilizan nuevos subcultivos (Christenson et al., 2018). A continuación, se colocan en el agar inoculado pequeños discos de papel de filtro (de unos 6 mm de diámetro) con una concentración específica del agente antimicrobiano ensayado (extracto, productos naturales, fármacos) y se incuban durante la noche durante 16-24 h a 35°C. 37 °C (Relle et al, 2019). Si el agente es un compuesto activo, se formará una zona de inhibición alrededor del disco, y su tamaño dependerá de la potencia antimicrobiana y la velocidad de difusión de la muestra a través del medio de agar (Figura No. 8) (Horváth et al, 2016).

Esta técnica ha sido mejorada y estandarizada por diferentes institutos de todo el mundo, como el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) en los Estados Unidos y el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) en Europa (Tenover, 2009).



**Figura 9.** Diagrama que ilustra el método de difusión en disco de Kirby-Bauer utilizando 5 antibióticos diferentes (A, B, C, D, E). Las flechas indican la zona de inhibición

**Fuente:** Halos por difusión en disco (Relle et al, 2019).

### 2.1.9.1.2. Agar con método de difusión de pozos

Esta técnica es muy similar al método de difusión en disco. El microorganismo de interés se inocula en un medio de cultivo de agar y se realizan pequeños orificios (diámetro 6-8 mm) con una punta estéril o cualquier otro instrumento. En estos pocillos se coloca un volumen de 20 a 100  $\mu$ L del agente antimicrobiano que se va a analizar y se incuba la placa durante la noche. La presencia de halos significa que la muestra se difundió desde el orificio hacia el medio de agar, formando zonas de inhibición donde el microorganismo no creció, lo que brinda información sobre la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Balouiri et al., 2016).

### 2.1.9.2. Métodos de dilución

#### 2.1.9.2.1. Método de dilución en caldo

Es el método más básico para evaluar la actividad biológica de un posible componente terapéutico y ha sido recomendado por el CSLI como método estándar para las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos (Wiegand et al., 2017). Este procedimiento implica el crecimiento del organismo en un medio líquido (generalmente Muller-Hinton) que contiene concentraciones del agente antimicrobiano que son generalmente diluciones dobles (1, 2, 4, 6, 16 mg / ml), en las que se introduce una

cantidad conocida del microorganismo inoculado. Dependiendo de si se inocula en tubos de ensayo con un volumen de 2 ml, se denomina microdilución, y si se inocula en el volumen de placas de 96 pocillos, se denomina microdilución (Balouiri et al., 2016) A continuación, los tubos o placas se incuban durante la noche en condiciones apropiadas según el microorganismo y los resultados se pueden analizar a simple vista. Si muestra una turbidez, significa que hubo crecimiento microbiano, y si no, hubo una inhibición del crecimiento por la acción del agente antimicrobiano. De esta forma, se puede conocer el valor de la CIM teniendo en cuenta la concentración mínima a la que no se observó crecimiento del microorganismo. Según el CSLI, el método de dilución en caldo está estandarizado para analizar bacterias, hongos y levaduras frente a diferentes muestras con fines terapéuticos (Jorgensen y Ferraro, 2019).

#### **2.1.9.2.2. Método de dilución en agar**

El método de dilución en agar consiste en preparar placas de agar (Muller-Hinton) con diferentes concentraciones del agente antimicrobiano a estudiar, generalmente en diluciones dobles, como en el método de dilución en caldo. Luego, se inocula un número definido del microorganismo (1-5 ml) en la placa de agar y se incuba durante la noche en condiciones que dependen del organismo que se eligió. Las colonias que no son capaces de crecer a las diferentes concentraciones del agente antimicrobiano mostrarán una zona de inhibición que se puede calcular para determinar la CMI (Wiegand, Hilpert y Hancock, 2018). Esta técnica es beneficiosa para probar compuestos activos con posible actividad antibacteriana y antifúngica. Cuando se ha aislado el compuesto, se llevan a cabo pruebas preclínicas in vitro para probar la eficacia del producto natural como antimicrobiano (Balouiri et al., 2016).

#### **2.1.10. Microorganismos patógenos evaluados**

##### **2.1.10.1. Tipos de microorganismos**

Existe un abanico de investigaciones sobre microorganismos patógenos, responsables de la contaminación de los alimentos y capaces de provocar infecciones en humanos y animales. El propósito de realizar pruebas in vitro es identificar nuevos

bioproductos con actividad antimicrobiana. Ciertos microorganismos son más sensibles a los aceites esenciales, como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* y *Bacillus cereus* (Wang et al., 2020).

#### **2.1.10.2. Bacterias**

Las bacterias son microorganismos unicelulares, procariotas, que se encuentran en todos los ambientes, que pueden tener o no patogenicidad y causar infecciones en animales y plantas. Las características de estos microorganismos, su dosis infecciosa y el entorno en el que se encuentran son factores cruciales para su desarrollo y proliferación (Jansen y Palmer, 2018). Las bacterias tienen una organización celular relativamente simple, básicamente formada por una membrana plasmática cubierta por una pared celular, con su material genético normalmente ubicado en una región nucleoide, existiendo, en algunos casos, moléculas de ADN más pequeñas llamadas plásmidos (Pinto et al., 2018). También existe un proceso de recombinación genética en las bacterias, que les permite transformarse en microorganismos capaces de degradar determinadas sustancias, como, por ejemplo, algunos fármacos, haciéndolas resistentes a ellas.

Las bacterias se pueden clasificar a partir de las características de la pared celular en Gram-positivas y Gram-negativas. Las Gram-positivas tienen paredes celulares más simples, compuestas por aproximadamente un 90% de peptidoglicanos, a diferencia de los gramnegativos, que contienen menor cantidad de peptidoglicanos, siendo su estructura más compleja al tener una pared externa de lipopolisacáridos, lo que hace que los microorganismos sean más resistentes. Así, según la estructura de la pared celular, se teñirán de rojo o violeta, según la técnica de Gram, clasificándose las bacterias de color violeta en Gram-positivas y Gram-negativas con un color rojizo (Gazim et al., 2010).

En el ser humano, algunos microorganismos forman parte de la microbiota normal, donde ayudan en el correcto funcionamiento del organismo. Sin embargo, algunas especies de microorganismos nocivos para la salud pueden provocar diferentes tipos de enfermedades, como intoxicaciones en el tracto gastrointestinal y urinario. Las

enfermedades infecciosas causadas por bacterias siguen siendo una de las principales causas de muerte en todo el mundo. El desarrollo de resistencia de estos microorganismos a los agentes antibacterianos comúnmente encontrados en el mercado, asociado a los efectos secundarios que produce su uso prolongado y en altas dosis, aumenta la necesidad de descubrir nuevos fármacos más activos y selectivos frente a bacterias patógenas. (Lozano, 2020).

Algunas especies bacterianas tienen un alto potencial para desarrollar cepas resistentes a diversos antibióticos, que pueden surgir de forma natural o adquirida. El natural está relacionado con características de la especie bacteriana, inherente a la herencia genética del microorganismo y no presenta riesgos para la salud. Por otro lado, la resistencia adquirida puede traer varios problemas al estado clínico de los individuos, ya que surge cuando una bacteria que previamente era sensible a un determinado fármaco se vuelve resistente a éste, por lo que es necesario buscar nuevos agentes terapéuticos (Laborclin et al., 2019).

Algunos autores también relacionan la resistencia de muchos microorganismos con el uso excesivo de antibióticos durante décadas por parte de la industria agrícola, ganadera y doméstica para tratar o inhibir rápidamente la mayoría de las infecciones. Principalmente, el uso indebido de fármacos antimicrobianos en la medicina humana y animal ha sido responsable de la selección sin precedentes en la evolución microbiana (Rojas, 2002). Con esto, la sociedad está contribuyendo al surgimiento de enfermedades infecciosas que presentan agentes etiológicos resistentes a muchos y en ocasiones a todos los agentes antimicrobianos utilizados por la medicina. El crecimiento de la resistencia a los antimicrobianos provoca un aumento en la morbilidad y mortalidad de los individuos y un aumento en los costos de las instituciones de salud para los pacientes (Lozano, 2020).

### **2.1.10.3. Escherichia coli**

*Escherichia coli* es un bacilo gramnegativo que se encuentra en la microbiota intestinal de los seres humanos y otros animales de sangre caliente. Este microorganismo forma parte de los coliformes termotolerantes, debido a su capacidad para resistir las altas temperaturas, presentes en las heces de los animales. Su presencia en los alimentos indica



una probable contaminación por heces o aguas residuales (Bermúdez-Matus et al., 2019). Estas bacterias causan enfermedades intestinales como diarrea y pueden causar enfermedades extra-intestinales como sepsis, meningitis e infecciones urinarias, por lo que se conocen como *E. coli* patógena extra-intestinal. La transferencia de genes de resistencia a bacterias de la microbiota intestinal humana es hoy una de las mayores preocupaciones de salud pública en todo el mundo (Rojas, 2002).

#### **2.1.10.4. Pseudomona aeruginosa**

Es un género de bacterias Gram-negativa de naturaleza muy extendida, que forma parte de la microflora de la piel y las membranas mucosas de los animales. Algunas especies de *Pseudomonas* se reconocen como agentes etiológicos de muchas infecciones oportunistas humanas. Las especies patógenas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus* y *S. haemolyticus* son las especies más comunes que causan infección en humanos y animales (Laborclin et al., 2019). Estas especies también son responsables de causar diferentes tipos de intoxicaciones, como *S. aureus*, que ha sido el microorganismo más común de infecciones supurantes que pueden atacar diferentes tejidos y / u órganos, provocando furúnculos, abscesos, miocarditis, endocarditis, neumonía, meningitis, , artritis bacteriana, entre otros (Rojas, 2002). De las especies con potencial para desarrollar resistencia a los antibióticos y aumentar la sensibilidad a los agentes antimicrobianos, se ha reconocido que los estafilococos tienen una resistencia antimicrobiana creciente y preocupante (Bermúdez-Matus et al., 2019). Por tanto, es necesario buscar nuevas moléculas sintetizadas por plantas, o productos naturales como los aceites esenciales, activos contra bacterias patógenas (Lucas et al., 2021).

#### **2.1.10.5. Staphylococcus aureus**

Los portadores asintomáticos de *Staphylococcus aureus* toxigénico son una fuente potencial de enfermedades, incluida la intoxicación alimentaria. Es uno de los principales patógenos en las infecciones hospitalarias y comunitarias y puede causar muchas enfermedades infecciosas, como infecciones leves de piel y tejidos blandos, endocarditis infecciosa, osteomielitis, bacteriemia y neumonía mortal. Las colonias en la placa de agar sangre son gruesas, brillantes y redondas con un diámetro de 1 ~ 2 mm

(González-Cabrera et al., 2014). La mayoría de ellos son hemolíticos, formando un anillo hemolítico transparente alrededor de las colonias en placas de agar sangre. Además, *S. aureus* no forma esporas ni flagelos, pero posee una cápsula, puede producir pigmento amarillo dorado y descomponer manitol (Chino et al., 2017) Además, también se ha encontrado que las pruebas de coagulasa plasmática, fermentación de lactosa y desoxirribonucleasa son positivas en *S. aureus* (Sato et al., 2019).

#### **2.1.10.6. Salmonella enterica serovar Typhimurium-**

Es un importante agente causante de gastroenteritis y bacteriemia humana en muchos países. En todo el mundo, hay 93,8 millones de casos de gastroenteritis humana debido a la infección por *Salmonella* anualmente, asociados con un número de muertos de hasta 150.000 (Mather et al., 2018). La resistencia a los antimicrobianos de *Salmonella* se ha convertido en un motivo de preocupación en todo el mundo. Por lo tanto, es necesaria la selección adecuada de fármacos antimicrobianos para el tratamiento de las infecciones por *Salmonella*. *Salmonella enterica* es una de las principales causas de gastroenteritis tanto en humanos como en animales. La serotipificación es el primer paso en la investigación epidemiológica de la salmonelosis. Cada serovariedad se define por la combinación de los restos de lipopolisacárido de la superficie celular en la superficie celular (antígeno O) y una o dos proteínas flagelares diferentes (antígenos H) (Luo et al., 2020)

#### **2.1.10.7. Candida albicans**

Las sepas de *Candida albicans* se utilizan comúnmente como organismo modelo para patógenos fúngicos. *Chuquiraga albicans* se cultiva fácilmente en el laboratorio y se puede estudiar tanto in vivo como in vitro. Dependiendo del medio se pueden realizar diferentes estudios ya que el medio influye en el estado morfológico de *Chuquiraga albicans* (Wilson, 2019).

*Chuquiraga albicans* es normalmente un comensal inofensivo para los seres humanos, pero puede causar infecciones superficiales de la mucosa (aftas oral / vaginal) en individuos sanos y (raramente) infecciones de la piel o las uñas. También puede

volverse invasivo, causando infecciones sistémicas y del torrente sanguíneo potencialmente mortales en huéspedes inmunodeprimidos, donde la tasa de mortalidad puede llegar al 50%. Es la causa más común de infecciones fúngicas graves y es una causa común de infecciones nosocomiales en los hospitales. Se ha reconocido que algunas cepas son resistentes a los azoles o las equinocandinas, que son los antifúngicos de primera línea para el tratamiento de las infecciones por *Candida albicans* (Medina et al., 2019).

## CAPÍTULO III

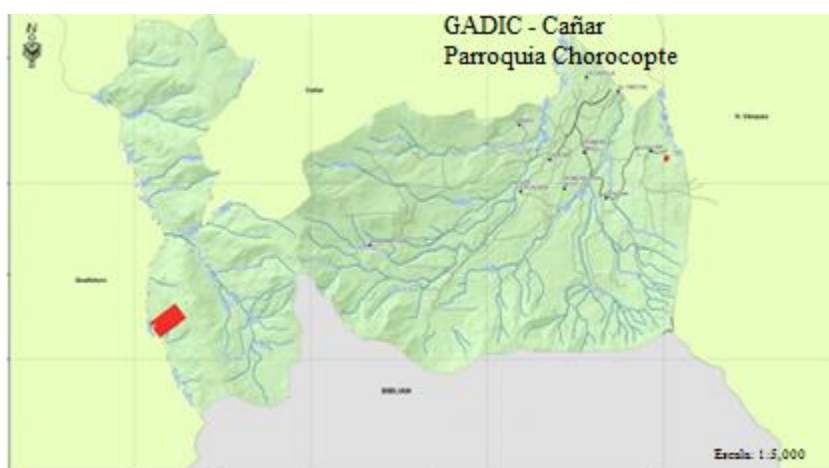
### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Lugar de trabajo

Los experimentos se realizaron en los Laboratorios de Microbiología, Parasitología y Bioquímica de la Facultad de Salud y Bienestar de la Universidad Católica de Cuenca y en los Laboratorios de Química y Biología de la Unidad Educativa San José de Calasanz de la ciudad de Cañar. La composición química de los aceites esenciales se determinó en la Universidad Técnica Particular de Loja.

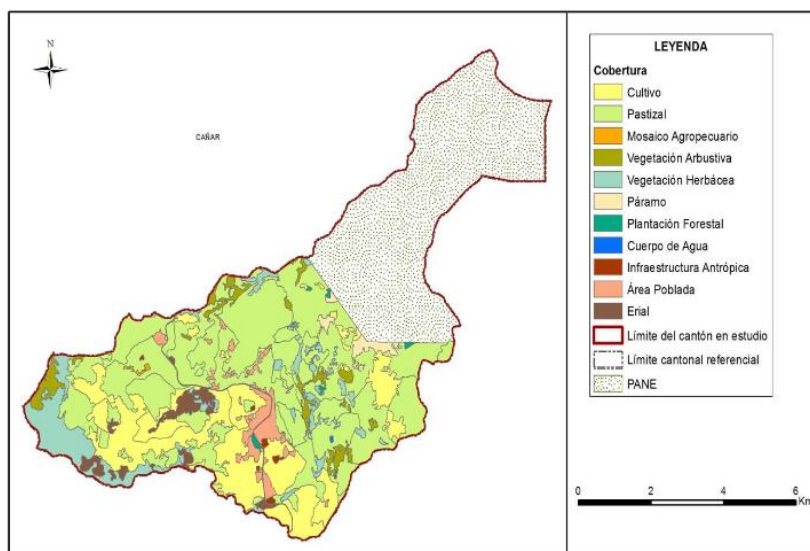
#### 3.2. Obtención de material vegetal

La especie silvestre *Chuquiria jussieui* fue recolectada en los campos y bosques de la parroquia Chorocópte y de la laguna de Patococha perteneciente al cantón Cañar (2°29'1.32" S, 78°58'42.24" W), desde una altitud de 2987 a 3540 msnm, con pluviosidad media de 785 a 950 mm por año, humedad relativa de 78,2% y una temperatura media de 10°C. También, en las comunidades de Absul y Romerillo del cantón El Tambo (2°30'29.16" S, 78°55'29.64" W), desde una altitud 2830 a 3430 msnm, pluviosidad media de 850 a 1000 mm por año y humedad relativa de 87,8%, y temperatura media de 11°C (Prefectura del Cañar, 2015)



**Figura 10.** Parroquia Chorocópte y laguna de Patococha, cantón Cañar

**Fuente:** (Prefectura del Cañar, 2015)



**Figura 11.** Comunidades de Absul y Romerillo, cantón El Tambo

**Fuente:** (Prefectura del Cañar, 2015)



**Figura 12.** Localización satelital de los lugares de muestreo

**Fuente:** GoogleMaps (2021)

Se seleccionaron dos puntos distintos de muestreo con el fin de evaluar si el rendimiento del aceite esencial extraído varía con las condiciones ambientales relacionadas con la posición geográfica.

### **3.3. Obtención del aceite esencial**

Las hojas y flores de las partes aéreas de la planta se cortaron en trozos de aproximadamente 2-3 cm de longitud, se lavaron con agua corriente de la llave y se agregó al balón de destilación de 2 litros de capacidad, completando con agua destilada hasta cubrir completamente la planta trozada. Por último se armó el aparato uniendo el conjunto a la trampa de Clenverger. El material vegetal restante se mantuvo en refrigeración (4 °C), hasta ser utilizado nuevamente.

Por ser la *Chuquiraga jussieui* una especie en peligro de extinción (León-yáñez et al., 2019), fue necesario desarrollar varias recolecciones de las plantas en distintas épocas del año y extraer el aceite esencial inmediatamente (desde octubre del 2020 hasta julio del 2021).

#### **3.3.1. Extracción del aceite esencial por hidrodestilación**

El aceite esencial se extrajo por hidrodestilación en un dispositivo modificado tipo Clenverger. Para ello, el material vegetal se retiró del ambiente, se separó entre hojas y ramas sanas, material infectado con hongos o devorado por insectos. La masa de la muestra vegetal fresca se pesó en una balanza analítica y se anotó su peso para el cálculo posterior del rendimiento. El proceso de extracción se desarrolló durante varias destilaciones y con materia prima fresca. Cada destilación estaba compuesta por 250 gramos de hojas y flores trituradas manualmente con el apoyo de unas tijeras. Se adiciona a un matraz de fondo plano de 2 litros de capacidad y luego se sumergió en una cantidad suficiente de agua destilada.

Se colocó en una manta calefactora adecuada (o bajo la acción de un mechero de bunsen), durante 2 horas y 30 minutos, a una temperatura de 107 ° C (punto de ebullición de la mezcla agua-materia vegetal a la altura de 2830 m.s.n.m. que se encuentra el laboratorio de microbiología, en el cantón Cañar).

Tras el inicio de la ebullición, los vapores de agua arrastran el aceite esencial, siendo conducidos por el extractor Clenverger y llegando al condensador donde estos vapores son

enfriados por una corriente de agua a temperaturas inferiores a 10 ° C, El agua y los vapores de aceite regresan al extractor Clevenger, separándolos por su mutua inmiscibilidad y sus diferentes densidades, donde permanecen hasta el final de la extracción, durante el cual el flujo de vapor se mantiene constante (MAIA et al., 2009). Una vez completada la extracción, el aceite esencial se retira del extractor Clevenger y se recoge en un tubo de ensayo graduado. Luego, se añadió al aceite una pequeña cantidad de Sulfato sódico ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anhidro para eliminar el agua residual y luego se centrifugó durante 10 minutos con rotaciones de 2500 a 3000 rpm. El objetivo de este último procedimiento era separar completamente el aceite del agua para evitar que futuras pruebas con el aceite se vieran comprometidas por esta variante. Al final de la centrifugación, el aceite se pipeteó en una ampolla de vidrio ámbar y la ampolla se selló con la ayuda de un soplete, evitando la oxidación de los componentes del aceite debido a la exposición prolongada al aire. Luego, el aceite se almacenó en ambiente refrigerado a 5–10 °C, evitando la degradación de sus componentes por exposición a la luz y al calor (Guimarães et al., 2008), donde permaneció depositado hasta que se realizaron las siguientes pruebas.



**Figura 13. Extractor de aceite esencial Clevenger (modificado)**

**Fuente:** El autor, 2021.

### 3.4. Determinación de la densidad relativa

Peso no específico, que resulta de la relación entre masa de un volumen de la sustancia a ensayar y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura.

Para encontrarlo se pesa el picnómetro seco y vacío, luego se llena con una porción del aceite esencial mateniendolo a temperatura ambiente y se pesa. Luego extramemos el aceite y limpiamos el picnómetro (Castillo, 2007, p. 63). Se vuelve a llenar con agua destilada y se pesa nuevamente el conjunto (Arriaga-Tórtola, 2017).

Los resultados se obtuvieron aplicacno la siguiente fórmula (Ec. 2)

$$D = \frac{M_1 - M}{M_2 - M} \quad \text{Ec. 2}$$

Dónde:

M1 = peso del picnómetro con la muestra (g)

M2 = peso del picnómetro con agua (g)

M = peso del picnómetro vacío (g)

Los resultados se aproximan hasta la tercera cifra. Tanto las densidades individuales como la densidad media pueden observar en la Tabla 8.

### 3.5. Rendimiento del aceite esencial

Cada una de las destilaciones se terminaba con el cálculo del respectivo rendimiento, considerando la relación entre el volumen del aceite esencial y el peso del material vegetal empleado.

### 3.6. Determinación de la composición química del aceite esencial

La composición química de los aceites esenciales fue determinada por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC / MS), con el apoyo de la Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL), identificando y cuantificando los principales compuestos químicos constituyentes de las muestras de aceite esencial. El cromatógrafo utilizado fue de la marca Shimadzu, con detector de masas modelo GCMS-QP2010S, con interfaz acoplada a una computadora para control y obtención de datos con sistema de muestreo automatizado. Las condiciones de funcionamiento del equipo fueron



las siguientes: Columna: Marca Agilent DB -1: 0,25 mmx30 m, espesor de película 0,25 µm, 100% dimetilpolisiloxano; Horno: Rampa: comience a 100 ° C (2 min) hasta 200 ° C a 10 ° C / min, luego a 25 ° C / min hasta 300 ° C restante durante 4 min; Volumen de inyección: 1.0 µL; Detector: relación MS m / z con escaneo de 40 a 450 um; Eluyente: He, 0,75 ml / min (100°C); Inyector: splitless: split ratio 50.0: 1 a 280 ° C. Los análisis de espectros de masas se realizaron comparando los espectros encontrados en la biblioteca NIST 8.0 y también calculando el índice de Kolvats (IK) respectivo y comparándolo con los valores descritos en la literatura.

### **3.7. Evaluación de la actividad antibacteriana.**

#### **3.7.1. Obtención y activación de los microorganismos**

Se utilizaron cepas estándar en las pruebas de Difusión de Agar y Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), provenientes de cultivos de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), obtenidos en la Universidad Católica de Cuenca UCACUE, Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular – CIIT. Para la evaluación de la actividad antibacteriana, se utilizaron cuatro cepas bacterianas y una fungica estándar. Las cepas fueron: *Escherichia coli* (ATCC25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Salmonella enterica* serovar (ATCC14028), *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853) y *Candida Albicans* (ATCC 25933). Previo a los ensayos las cepas se subcultivaron en agar estándar a 37°C por 24 horas, considerando para su uso la dilución de McFarland 0,5 de concentración correspondiente a  $5 \times 10^4$  UFC, con una absorbancia entre 0,08-0,12 a 625 nm (Balouiri et al., 2016), para trabajar con bacterias se agusto el caldo Mueller Hinton con cationes, se agrego al caldo alícuotas de NaCl aL 20% para *Pseudomona aeruginosa*, bacteria halofílica (Weinstein et al., 2018).

#### **3.7.2. Método de difusión en agar con discos y porcentaje de inhibición del crecimiento microbiano**

La actividad antibacteriana se determinó mediante el método de difusión en medio sólido (Bauer et al., 1966), adaptado por Jorgensen y Ferraro (2019), en el cual, el aceite esencial en estudio se diluye 8:2 con dimetilsulfóxido (DMSO, al 5%). La siembra de

microorganismos se realizó en medio sólido de agar nutritivo y Caldo de Infusión Cerebro Corazón (Agar ICC), incubados a 37°C durante 24 horas. Luego, a los inóculos de estos microorganismos se agregó 9.0 mL de ICC y se incubaron en un agitador (Incubator SL 222/CFR Shaker) a una temperatura de 37°C a 160 rpm durante 24 horas.

Al día siguiente, la suspensión del medio que contenía los microorganismos se diluyó 10 veces, seguido de la medición de la densidad óptica (D.O.) en un espectrofotómetro (Lozano, 2020), a 625 nm. Para obtener la D.O. deseada (McFarland 0,5), la suspensión se volvió a agitar en el agitador durante 1 hora a 37°C y 160 rpm.

En la siguiente etapa, para la fase de crecimiento bacteriano se colocó 1 mL de suspensión bacteriana en placas estériles y 25.0 mL de medio semisólido, conteniendo agar (10%) más ICC fundido a 50 ° C. Luego del proceso de solidificación del medio de cultivo, se inoculó uniformemente con el microorganismo de interés la superficie de la placa de agar, se agregaron sobre la superficie del agar discos de papel filtro de 6 mm de diámetro impregnados con el agente antimicrobiano y con 10 µL de las soluciones DMSO del aceite esencial de chuquiragua *jussieui*, en concentraciones de 1.0; 3.0; 6.0; 12.0 y 24.0 mg/mL, y se incubaron a 37°C por un período de 48 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado, acompañados del control positivo, el antibiótico Ciprofloxacino y antifúngito Ketoconazol a una concentración de 3.0 mg/mL y el control negativo, el solvente DMSO.

Como resultado se observaron la formación de halos fruto de la acción de los agentes antimicrobianos que se difunden en el agar e inhiben su reproducción, generando halos donde no hay crecimiento bacteriano visible cuyo diámetro es proporcional a la acción invidora del microorganismo investigado. Los resultados finales se expresaron como la media de esta zona de inhibición provocadas en cada medio de cultivo, considerándose positivos los halos con un tamaño igual o superior a 10 mm de diámetro, según lo descrito por Manzano et al., (2011). El porcentaje de inhibición del crecimiento microbiano se determinó mediante la relación entre el diámetro de los halos generado por el aceite esencial de la chiquiragua y el halo generado por el antimicrobiano respectivo, como lo indica la Ec. 1 (Martínez et al., 1997):

$$\text{Porcentaje del efecto de inhibición} = \frac{\text{Diámetro halo de inhibición del aceite (mm)}}{\text{Diámetro halo de inhibición control positivo (mm)}} \times 100 \quad (\text{Ec.3})$$

### 3.7.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) se realizó según el método CLSI (Wikler, 2006), modificada por Balouiri et al., (2016). Los valores de MIC se determinaron diluyendo aceite esencial de chuquiragua *jussieui* en dimetilsulfóxido (DMSO al 5%). Todas las pruebas se realizaron por triplicado y se utilizó como control positivo el antibiótico Ciprofloxacino y el antifungico Ketoconazol. Se utilizaron placas estériles de 96 pocillos, adecuadas para microdilución. Inicialmente, se colocaron 90 µL del medio Muller Hinton Broth (MHB) en cada pocillo y, posteriormente, se agregaron las soluciones de aceite esencial de la tercera columna (A3) a la duodécima columna (A12), a concentraciones de 40,0; 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,62 y 0,31 mg/mL. Cada columna recibió una concentración diferente de aceite esencial, de acuerdo con los valores especificados anteriormente.

Finalmente, se inoculo agregando a cada pocillo una alícuota de 10 µl de la suspensión de microorganismos ajustada a un McFarland 0,5. El control positivo también se utilizó a una concentración de 20,0 mg/mL, en la columna A13, para observar el crecimiento de microorganismos. Posteriormente, las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C, en un Estufa (Marca SELECTA P 115/220). Después de este período de incubación, se agregaron 30 µL de resazurina a una concentración final de 0,01% para el análisis cuantitativo del crecimiento microbiano en los pocillos de prueba y la determinación de la actividad antimicrobiana relativa de cada dilución de muestra. Se utilizo la resazurina como indicador de viabilidad de los microorgaismos investigados. La resurzina es de color azul y se reduce a resorufina de color rojo por acción del óxido reductasas mitocondrial de células vivas (Hongos y Bacterias).

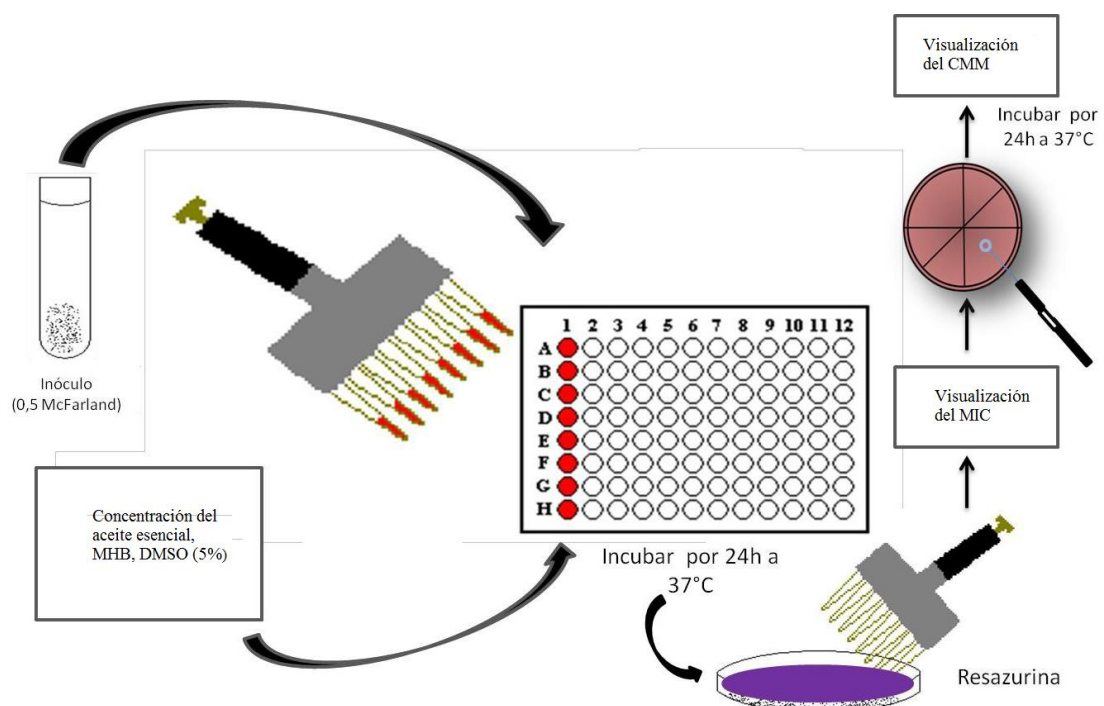
Terminado el proceso de incubación, la MIC corresponde a la dilución menos concentrada del aceite esencial de la chuquiragua que aun presentaba color azul. Mientras que para el control negativo que contiene 50 µl de antimicrobiano y 50 µl de caldo Mueller Hinton ajustado con cationes y 10 µl de resazurina 0,01 g/100 ml. El control

positivo contenía 10 µl DMSO, 50 µl caldo Mueller Hinton ajustado con cationes, 50 µl dilución microbiana y 10 µl de resazurina.

En este ensayo se llevaron a cabo los controles de viabilidad de los microorganismos probados, la esterilidad del medio de cultivo, el aceite esencial y el potencial de inhibición de DMSO en los microorganismos probados.

### 3.7.5. Concentración Mínima Microbicida (CMM - CMB y CMF)

Esta prueba se desarrollo una vez conocido el valor de la MIC de cada microorganismo para el aceite esencial de chuquiragua. Se tomo 10.0 µL de las concentraciones que mostraron actividad microbiana (o tambien 10.0 µL del poso anterior o 10,0 µL del poso posterior, correspondientes al doble o la mitad de la MIC encontrada). Se replica sembrando en placas Petri que contenían Agar Mueller Hinton (AMH). Estas placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Terminada la incubación se revisaron las placas en busca de unidades formadoras de colonias (UFC) microbianas. La CMM se tomó como la concentración más baja de aceite esencial donde no hubo crecimiento celular visible en la superficie de AMH (Wikler, 2006)



**Figura 14.** Esquema de la determinación de MIC y CMM

**Fuente:** El autor, 2021. Adaptado de (Wikler, 2006),

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Rendimiento de aceites esenciales

El aceite esencial de la especie *Chuquiragua jussieu* fue extraída mediante hidrodestilación de las partes aéreas (hojas y flores) de la planta endémica que fue recolectada durante los meses de febrero a septiembre del año 2021. El aceite obtenido es una sustancia líquida viscosa de color amarillo pálido, de olor agradable que recuerda vagamente al talco. La densidad media relativa encontrada en los dos aceites (Cañar y El Tambo), es de 0,888 g/mL, cuyos valores individuales permitió encontrar el rendimiento de los dos aceites esencial y su valor medio, como se observa en la Tabla 8

Tabla 8. Rendimiento por destilación y general del aceite esencial de la parte aérea (hojas y flores) de la especie *Chuquiragua Jussieu*.

Muestra (*)	Cantidad de material vegetal (g)	Volumen (mL)	Densidad (g/mL)	Cantidad de aceite esencial obtenido (g)	Rendimiento (%)	$\bar{x}$	$\sigma$
CHU-C1	3.870	0,30	0,887	0,27	0,00698	0,00703512	0,00051041
CHU-C2	2.589	0,19	0,884	0,17	0,00657		
CHU-C3	2.978	0,22	0,879	0,19	0,00638		
CHU-C4	1.867	0,14	0,878	0,12	0,00643		
CHU-T1	1.470	0,12	0,899	0,11	0,00748		
CHU-T2	1.280	0,11	0,894	0,096	0,00750		
CHU-T3	1.140	0,10	0,892	0,085	0,00746		
CHU-T4	2.870	0,24	0,891	0,215	0,00749		
<b>Total:</b>	<b>18.064</b>	<b>1,42</b>	<b>0.888</b>	<b>1,256</b>	<b>0,007035</b>		

\* CHU-C = Chuquiraga Cañar (parroquia Chorocópte y laguna de Patococho), CHU-T= Chuquiraga El Tambo (comunidades de Absul y Romerillo).  $\bar{x}$  = Media Artimética,  $\sigma$  = Desviación Estandar

**Fuente:** El autor, 2021.

El valor promedio de la densidad del aceite esencial obtenido de la *Chuquiragua jussieu* en los dos lugares fue de 0,888 g/mL, resultados que son similares a los encontrados por Dueñas *et al* (2014), en la misma especie (0,889 g/mL), y en la especie *Chuquiragua longiflora* (0,875 g/mL) (Orellana *et al.*, 2020), y de igual forma en la

especie *Chuquiraga erinacea* (0,854 g/mL), obtenidos por hidrofestilación en los países vecinos. (Cristobal y Paredes, 2019).

El rendimiento medio de los aceites esenciales obtenidos de las dos zonas rurales de Cañar y El Tambo es de 0,00703, sin embargo se observa una leve diferencia entre estas (0,00658763% y estas 0,00748261%), siendo un poco más denso el aceite esencial obtenido de las plantas de las comunidades rurales del cantón El Tambo. Resultados que son justificados por Verma y Shukla (2015), al estudiar los factores responsables de la fluctuación en el metabolito secundario de la planta, para el cual algunas diferencias pueden ocurrir en la composición de los aceites esenciales de la misma especie probablemente debido a la variación genética y diferentes factores ambientales, como el clima, las temporadas de cosecha y la ubicación geográfica. Por otra parte Dourado y Silveira,(2005), al evaluar el rendimiento de aceites esenciales obtenidos de hojas de especies de chuquiragua obtuvieron valores de 0,075% y 0,72%. En otra especie, investigando en las hojas secadas al aire libre de *Chuquiraga spinosa* (Asteraceae) se obtuvo por hidrodestilación un rendimiento de aceite esencial del 0,2% (Senatore et al., 2008). En trabajos previos de investigación desarrollados con especies de chuquiragua *longiflora* se obtuvieron rendimientos de 0.97% y 0.65%, en épocas diferentes y en la misma especie (Ccana-Ccapatinta et al., 2018).

La variación en la producción de aceites esenciales por especies vegetales está relacionada con factores como la temperatura ambiente, la humedad del aire, la diversidad genética de cada especie, así como la época del año (Castro y Sosoranga, 2020). Al respecto, se observó que la especie *Chuquiraga jussieu* produce aceite esencial con un rendimiento más bajo en relación a otras especies de la misma familia y género.

#### **4.2 Evaluación de la composición química de los aceites esenciales**

La composición química de los aceites esenciales de *Chuquiraga jussieu* se determinó mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS), donde se identificaron y cuantificaron los principales componentes químicos presentes en los aceites evaluados. Los resultados se obtuvieron mediante la

determinación de las áreas de los picos principales, comparando los espectros de masa al observar los Cromatogramas de los respectivos corridos.

Se identificaron setenta y tres componentes, que constituyen el 97% del aceite. Los análisis cualitativo y cuantitativo de la muestra de aceite se evidencian en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Composición química del aceite esencial de la parte arerea (hojas y flores) de la especie *Chuquiraga Jussieui*.

<b>Compuestos químicos</b>	<b>%</b>	<b>Rt (min)</b>	<b>Identificación</b>
<i>Alcohol (7, 8%)</i>			
Octano- 1-ol	0,1	30,4	RT, MS, Co
Linalol	2,8	32,6	RT, MS, Co
<i>p</i> -Cymen-8-ol	1,2	38,2	RT, MS
$\alpha$ -Terpineol	3	39	RT, MS, Co
Carveol	0,7	41	RT, MS, Co
Octadecan-1-ol	traza	91,2	RT, MS, Co
<i>Aldehídos (9, 1%)</i>			
3-Methylhexanal	traza	22,6	RT, MS
Octanal	1,1	24,5	RT, MS, Co
Oct-2-en-1-a1	0,2	28,4	RT, MS
Nonanal	2,6	32,4	RT, MS, Co
Citronela1	0,5	35,8	RT, MS, Co
Decanal	1,7	40,1	RT, MS, Co
(E)-Cinamaldehído	2,1	43,3	RT, MS, Co
Geranial	0,9	44	RT, MS, Co
<i>Cetonas (27, 0%)</i>			
(E) -6-Metilhepta-3,5-dien-2-ona	traza	31,9	RT, MS
Decan-2-one	0,5	34,6	RT, MS, Co
Mentón	trace	36,3	RT, MS, Co
Isomenthone	0,3	36,5	RT, MS, Co
<i>p</i> -Metilacetofenona	0,1	37,6	RT, MS, Co
Pulegone	3,9	42,1	RT, MS, Co
Piperitona	0,2	42,8	RT, MS, Co
Undecan-2-one	1,0	46,6	RT, MS, Co
<i>p</i> -Metoxiacetofenona	8,6	47,4	RT, MS, Co
Piperitenona	1,9	48,5	RT, MS
15-Nor-1-thujopsen-3-one	0,8	48,3	RT, MS
Damascenona	0,5	52,5	RT, MS
Dodecan-2-one	0,8	53,6	RT, MS

<i>p</i> -Hidroxiactofenona	5,8	54,3	RT, MS, Co
Tridecan-2-uno	2,6	60,2	RT, MS, Co
<i>Fenoles, fenilpropanoides y flavonoides (15, 9%)</i>			
T hymol	0,4	48,8	RT, MS, Co
Eugenol	0,9	50,4	RT, MS, Co
Metileugenol	1,4	53,3	RT, MS
Metilisoegenol	0,9	59,2	RT, MS
BHT	2,1	61	RT, MS, Co
Piceol	1,1	62,3	RT, MS, Co
Kaempferol	0,7	63,2	RT, MS, Co
Quercetina	1,3	65,1	RT, MS, Co
Apiol	7,1	67	RT, MS, Co
<i>Sesquiterpeno hidrocarburos (15, 7%)</i>			
Cyperene	1,4	49,2	RT, MS
$\alpha$ -Selinene	0,8	51,1	RT, MS
$\beta$ -Gujunene	0,6	52,6	RT, MS
$\alpha$ -Cedreno	1,9	55,9	RT, MS
$\beta$ -Humuleno	3,4	56,7	RT, MS
$\alpha$ -Cadineno	0,6	57	RT, MS
$\alpha$ -Himachalene	0,2	57,5	RT, MS
$\beta$ -Maliene	0,2	57,9	RT, MS
<i>alo</i> -Aromadendreno	0,2	58,3	RT, MS
<i>ar</i> -Curcumene	2,8	59,5	RT, MS
Cuparene	2,5	61,3	RT, MS
<i>trans</i> - $\beta$ -Farneseno	0,2	61,8	RT, MS
$\delta$ Cadinene	0,5	62,2	RT, MS
<i>trans</i> -Calamenene	0,4	64,6	RT, MS
<i>Sesquiterpenos que contienen oxígeno (6,9%)</i>			
( <i>E</i> )-Nerolidol	0,5	64,5	RT, MS, Co
Spathulenol	3,8	65,1	RT, MS
Óxido de cariofileno	1,7	65,4	RT, MS, Co
Alcohol pachulí	0,1	65,9	RT, MS
Junenol	traza	67,6	RT, MS
Cedr-8-en-14-ol	0,1	68	RT, MS
<i>trans-trans</i> -Farnesol	0,4	68,8	RT, MS
Eudesm-11-en-4-ol	0,3	69,6	RT, MS
<i>Hidrocarburos (4,9%)</i>			
Decano	0,7	31,3	RT, MS, Co
2-Metilnaftaleno	0,4	45,9	RT, MS
8-Metilundec-1-ene	1,3	48,3	RT, MS
Pentadecano	1,1	61,6	RT, MS, Co



Hexadecano	1	67,7	RT, MS, Co
Heptadecano	0,1	77,5	RT, MS, Co
Octadecano	0,2	78,8	RT, MS, Co
Nonadecano	traza	84,2	RT, MS, Co
Eicosano	0,1	93,5	RT, MS, Co
<i>Otros (9,5%)</i>			
Tifurano 2-n-Pen	0,5	24,2	RT, MS
2 Metil-3-hidroxi-5,6,7,8-tetra- hidrocromona	7	47	RT, MS
$\gamma$ -Decalactona	1,3	49,6	RT, MS, Co
Acetato de 2-pinen-6-ol	0,7	55,5	RT. MS
<i>No identificado 3,2%</i>			

**Traza**, <0,05%, **RT** = tiempo de retención; **MS** = GC-MS; **Co** = coinyección con estándar auténtico

**Fuente:** El autor, 2021

Se sabe poco sobre la química de las Barnadesiinae y en el género *Chuquiraga*. Pocas veces se han aislado compuestos simples de los aceites esenciales puros de estas especies de Asperaceas, obtenido a la dificultad que conlleva su extracción por hidrodestilación y a las técnicas de análisis usadas para obtener los metabólicos secundario (Senatore et al., 2008). En esta investigación con aceite esencial puro y usando CG-MS se han podido identificar flavonoides y fenoles poco estudiados en especie de *Chuquiragua Jusieui*, como: Kaempferol y Quercetina. Con algunas coincidencias reportadas previamente, la composición química identificada en los aceites esenciales se caracterizó por la presencia de moléculas oxigenadas como componentes más prevalentes (76,6%) compuestos con grupo carbonilo que constituyen más de un tercio del aceite esencial. Se identificaron también una gran cantidad de cetonas, siendo los principales representantes p-metoxiacetofenona y p-hidroxiacetofenona, que representaron el 14,4% del aceite. Entre los aldehídos nonanal (2,6%) y (E) - cinamaldehído (2,1%) fueron los más abundantes. Los fenoles, fenilpropanoides y flavonoides representaron el 15,9% del aceite con apiol (9,8%) como componente principal de esta fracción y del aceite. Es de destacar que no se detectaron hidrocarburos monoterpénicos en el aceite. Por el contrario, los monoterpénicos que contienen oxígeno representan el 17,1% del aceite. Entre esos compuestos se destaca la pulegona (3,9%),  $\alpha$ -terpineol (3,0%), linalol (2,8%) y piperitenona (1,9%).

Los hidrocarburos sesquiterpénicos representaron el 15,7% del aceite. Los componentes principales de esta fracción fueron p-humuleno (3,4%), ar-curcumeno (2,8%), cupareno (2,5%), a-cedreno (1,9 %) y cipereno (1,4%). Los sesquiterpenos que contienen oxígeno representan el 6,9% del aceite, siendo el espatulenol (3,8%) y el óxido de cariofileno (1,7%) los constituyentes más representativos de esta fracción. Compuestos químicos identificados en los aceites esenciales en otras especies de chuquiraga, aunque en menor concentración (Landa et al., 2009), con moléculas de flavonoides y fenoles menos complejas (Castro & Sosoranga, 2020); en diferentes lugares de investigación y muestreo y utilizando otros métodos de extracción (Koc et al., 2015), incluso en la misma especie (*Chuquiraga Jussieui*) (Maldonado-Coello y Naula-Orrala, 2020).

En cuanto a los compuestos más complejos, el espatulenol (3,8%) fue el principal sesquiterpeno oxigenado. Apiol (6,7%) fue el derivado fenilpropanoide más abundante. La presencia de Piceol, Kaempferol y pequeñas cantidades de Quercetin, que suman el 3,1%, indican la presencia de flavonoides en la muestra de aceite esencial investigada. Otras investigaciones reportaron también el hallazgo de tres glicósidos de flavonol, kaempferol-3-O-rutinoside, kaempferol-3-O-glucósido y quercetina-3-O-rutinósido (Senatore et al., 2008). Landa et al., (2009) ensayando en la especie *Chuquiraga spinosa* en extractos de metanol, metanol acuoso al 50% y agua, encontraron además quercetina-3-O-glucósido, kaempferol-3-O-rutinósido o nicotiflorina y kaempferol-3-O-glucósido o astragalina, informando su presencia en otras especies de el mismo género, mediante análisis HPLC/DAD (Rojas et al., 2015). En otras especies de Chuquiraga, los espectros UV visibles de nueve componentes también mostraron absorbancias típicas de los flavonoles (derivados de quercetina y kaempferol) (Dueñas-Rivadeneira et al., 2017) Para Fisher y Phillips (2008), la presencia de concentraciones deseables de flavonoides y fenoles en las estructuras químicas del aceite esencial de las plantas como metabolitos secundarios posibilitan actividad protectora como antimicrobianos, analgésicos, antiinflamatorios y antimicrobianos; pudiendo contribuir benéficamente a la farmacopea popular.

Debido al hecho de que los flavonoides son universales en las plantas verdes terrestres y que los patrones distintos de dichos compuestos a menudo representan

caracteres taxonómicamente valiosos (Cartaya y Reynaldo, 2001) se investigan los compuestos flavonoides al aceite esencial diferentes especies del chuquiraga, como: avellanadae, calchaquina, erinaceae, incana, oppositifolia, rosulata, longifolia, calchaquina, spinosa y longiflora; en las que igual se han encontrado estos y otros compuestos flavonoides: quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-rutinósido o rutina, kaemperol-3-O-rutinósido o nicotiflorina y kaemperol-3-ogluósido o astragalina. Incluso los compuestos isorhamnetina-3-O-rutinósido) e isorhamnetina-3-O-glucósido se han identificado por primera vez en el género Chuquiraga mediante CG-SM y HPLC / DAD /MS (Landa et al., 2009).

### 4.3 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se realizaron controles de esterilidad (medio y control diluyente - DMSO), negativos (Medio + DMSO + inóculo), control de inóculo (inóculo + Medio) y control de antibióticos (Medio + inóculo + ciprofloxacina). Las cepas bacterianas fueron resistentes al control negativo, demostrando que el solvente no interfirió con el crecimiento de microorganismos y, por lo tanto, no altera el resultado de las pruebas de actividad antimicrobiana, de acuerdo a los resultados que se observan en la Tabla 10.

**Tabla 10.** Resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana en el control negativo **DMSO**, frente a diferentes cepas bacterianas.

<b>Microorganismos</b>	<b>Concentraciones de DMSO (mg/mL)</b>	<b>Halos de inhibición (mm)</b>
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	1; 3; 6; 12; 24	<b>0</b>
<i>Salmonella enterica</i> serovar (ATCC14028)	1; 3; 6; 12; 24	<b>0</b>
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)	1; 3; 6; 12; 24	<b>0</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923),	1; 3; 6; 12; 24	<b>0</b>
<i>Candida Albicans</i> (ATCC 25933)	1; 3; 6; 12; 24	<b>0</b>

**Fuente:** El autor, 2021.

Como control positivo se utilizó el antibiótico Ciprofloxacino y antifungico Ketoconazol, a una concentración de 3,0 mg/mL, para la evaluación comparativa de las muestras frente al patrón de referencia. Los halos de inhibición formados con los

antimicrobianos (Ciprofloxacino y Ketoconazol) variaron de 32 a 44 mm (Tabla 11). Las cepas ATCC25922 *Escherichia coli* y ATCC14028 *Salmonella enterica* fueron las más inhibidas por el antibiótico, lo que indica su mayor susceptibilidad al mismo. En cuanto al tamaño de los halos, Alves et al., (2010) propuso una clasificación en la que las muestras que producen un halo menor a 9 mm se considera inactivas, interpretándose cualitativamente como sensible (+) ó resistente (-), según estándares M100 del CLSI. (NCCLS, 2015; Weinstein et al., 2018).

**Tabla 11. Halos de inhibición de la actividad antimicrobiana de la Ciprofloxacino y Ketoconazol a una concentración de 3.0 mg/mL**

Microorganismos	Halos de inhibición (1) (mm)	Halos de inhibición (2) (mm)	Halos de inhibición (3) (mm)	Halos de inhibición - Promedio (mm) (*)	$\sigma$
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	44,2	42,8	42,7	43,2	0,839
<i>Salmonella enterica</i> serovar (ATCC14028)	38,2	38,2	38,1	38,2	0,058
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)	36,2	36,1	36,1	36,1	0,058
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)	32,3	32,1	32,2	32,2	0,100
<i>Candida Albicans</i> (ATCC 25933)	42,9	42,7	42,8	42,8	0,100

\*Halo promedio de tres repeticiones, ( $p > 0,05$ )

**Fuente:** El autor, 2021.

El ciprofloxacino es un antibiótico de la clase de los fluoroquinolonas, que actúa principalmente como bactericida, que actúa a nivel intracelular inhibiendo la DNA girasa y enzima bacteriana interfiriendo con la replicación y síntesis de proteínas bacterianas.

Es activo contra microorganismos Gram-positivos, Gram-negativos y anaerobios. (Aspiazu et al., 2020).

El ketoconazol es un agente antifúngico imidazol que se utiliza en la prevención y el tratamiento de una variedad de infecciones por hongos. Funciona previniendo la síntesis de ergosterol, el equivalente fúngico del colesterol, aumentando así la fluidez de la membrana y previniendo el crecimiento del hongo (Tavakkoli et al., 2020).

Las pruebas para la evaluación de la actividad antimicrobiana por el método de difusión en medio sólido con aceites esenciales de *Chuquiraga jussieui* en concentraciones de 1.0 mg/mL a 24.0 mg/mL, produjeron halos de diferente diámetro proporcionales a la concentración del aceite esencial y en las diferentes cepas de microorganismos investigados (Tabla 12).

**Tabla 12.** Resultados de la evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Chuquiraga jussieui*, frente a diferentes cepas microbianas.

Microorganismos	Halos de inhibición (mm)					Control positivo Ciprofloxacino	Control positivo Ketoconazol
	Concentración del aceite esencial (mg/mL)						
	1,0	3,0	6,0	12,0	24,0		
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	0	0	0	0	18,6	+	N/A
<i>Salmonella enterica</i> serovar (ATCC14028)	0	0	0	0	10,4	+	N/A
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)	0	0	0	0	17,1	+	N/A
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923),	0	0	0	19,2	27,2	+	N/A
<i>Candida Albicans</i> (ATCC 25933)	0	0	15,3	23,1	24,2	N/A	+

Resultados expresados con Prom  $\pm$  (control positivo) y N/A: No aplica (halo promedio redondeado de tres repeticiones,  $p > 0,05$ )

**Fuente:** El autor, 2021.

Los halos formados en las cajas Petri inoculadas con *Staphylococcus aureus* y *Candida Albicans* resultan tener un promedio superior a los 16 mm. Según Alves et al., (2010), si los halos son < 9 mm, la cepa se considera inactiva, por lo tanto, las cepas presentan actividad. La cepa de *Escherichia coli* es activa, pero tiene poca sensibilidad y la cepa de *Salmonella* no presenta actividad; demostrando de esta manera que el aceite esencial estudiado presenta actividad antimicrobiana, especialmente frente a bacterias Gram-positivas y hongos. Resultado que lo apoya (Perez-Chauca et al., 2020), indicando que los aceites esenciales de la especie *Chuquiraga spinosa*, si resulto activa para esta o otras cepas de bacterias Gram-negativas, incluyendo la *Pseudomona aeruginosa* y una fuerte actividad antimicrobiana en presencia de levadura que producen *candidiasis*.

Estos resultados permiten además relacionar los halos de inhibición del aceite esencial y los halos del control positivo frente a los microorganismos evaluados, como se observa en la Tabla 13.

**Tabla 13.** Halo de inhibición del aceite esencial de *Chuquiraga jussieuif* frente a diferentes cepas microbianas.

Microorganismos	Halos de inhibición del control positivo (mm)	Halos de inhibición del aceite esencial (mm)	Inhibición del crecimiento microbiano (%)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	42,70	18,6	42,56
<i>Salmonella enterica serovar</i> (ATCC14028)	38,10	10,4	27,30
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)	36,10	17,1	47,37
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)	32,20	27,2	84,47
<i>Candida Albicans</i> (ATCC 25933)	42,80	24,2	56,54

Halo promedio de tres repeticiones, con  $p > 0,05$

**Fuente:** El autor, 2021.

En cuanto al proceso inhibitorio del crecimiento microbiano, se observó que la cepa de *Staphylococcus aureus* es la que mayor valor de inhibición experimentó (84,47%), con un mejor porcentaje de inhibición la cepa activa de *Salmonella entérica*; lo que se justifica al considerar los valores del diámetro del halo de inhibición del aceite esencial y el diámetro del halo de inhibición del control positivo (ciprofloxacino y ketoconazol).

En cuanto a la prueba de susceptibilidad microbiana del aceite esencial de *Chuquiragua Jussieui*, se aplica el método de Kierby Bauer, por incorpora características recomendadas por la Organización Mundial de la Salud para la aplicación del método en estudios de aceites esenciales extraídos de las plantas (William y Laynes, 2002). El método consiste en la comparación del diámetro de los halos obtenidos en las pruebas con el diámetro de los halos estándar predeterminados del control positivo (Ciprofloxacino y Ketoconazol). En La Tabla 14, se resumen los hallazgos encontrados en las pruebas respectivas.

**Tabla 14. Prueba de susceptibilidad antimicrobiana del aceite esencial de la *Chuquiragua jussieui* y el patrón positivo (Ciprofloxacino y Ketoconazol)**

Microorganismos	Halos de inhibición (diámetro en mm.)		
	Resistencia	Intermedio	Sensible
<b>*Ciprofloxacino</b>	<b>≤ 15</b>	<b>16 - 20</b>	<b>≥ 21</b>
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)		18,6	
Aceite esencial al 100% (24.0 mg/mL)			42,70
<i>Salmonella enterica</i> serovar (ATCC14028)	10,4		
Aceite esencial al 100% (24.0 mg/mL)			38,10
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)		17,1	
Aceite esencial al 100% (24.0 mg/mL)			36,10
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)			<b>27,2</b>
Aceite esencial al 100% (24.0 mg/mL)			32,20
<b>*Ketoconazol</b>	<b>≤ 14</b>	<b>15 - 18</b>	<b>≥ 19</b>
<i>Candida Albicans</i> (ATCC 25933)			<b>24,2</b>
Aceite esencial al 100% (24.0 mg/mL)			42,80

\*Valores estándar de los halos de control positivo del Ciprofloxacino y Ketoconazol, frente a las cepas de los microorganismos ((William y Laynes, 2002)

Fuente: El autor, 2021

En La Tabla 14 se observan los valores estándar de los diámetros de los halos del control positivo del Ciprofloxacino y Ketoconazol para el microorganismo correspondiente (William y Laynes, 2002).

En los ensayos desarrollados, el disco de Ciprofloxacino aplicado a los cultivos inoculados con cepa de *Escherichia coli* nos dio halos con diámetro medio de 42,70 mm., mientras que el aceite esencial aplicado a la concentración del 100% (24.0 mg/mL), produjo halos con diámetro promedio de 18,6mm. Al comparar estos valores con los observados en la Tabla 14, se deduce que la cepa de *Escherichia coli* es sensible al control positivo, como es de esperarse. Mientras que manifiesta una sensibilidad intermedia ante la acción inhibitoria del aceite esencial.

Con la cepa de *Salmonella enterica* en cultivo, el disco de Ciprofloxacino produjo halos con un diámetro medio de 38,10 mm., mientras que el efecto inhibitorio del aceite esencial al 100% de concentración produjo halos con un diámetro medio de 10.4 mm. Comparando así mismos estos valores con los estándares se concluye que las cepas prueba de *Salmonella enterica* son resistentes a la acción inhibitoria del aceite esencial.

En los cultivos inoculados con cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, los halos generados por la acción inhibitoria del aceite esencial en concentración al 100%, tenían un diámetro medio de 17,1 mm; por lo tanto, estas cepas, igual que la *Escherichia coli*, manifiesta una sensibilidad intermedia ante la acción inhibitoria del aceite esencial.

Un cambio significativo se observa en los cultivos inoculados con la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* y con el hongo *Candida Albicans*. En ambos casos se generan halos inhibitorios cuyo diámetro medio de 27,2 mm y 24,3mm respectivamente, indican que son sensibles a la acción antimicrobiana del aceite esencial a la misma concentración que los casos anteriores. En todos los casos se observa sensibilidad al control positivo de Ciprofloxacino y Ketoconazol.

Estos resultados señalan un alto porcentaje de actividad antimicrobiana del aceite esencial de la *chuquiraga Jussieu*, especialmente frente las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Candida Albicans*, resultados que apoyan a los encontrados por (Huanca-



Quispe, 2021), estudiando un extracto alcohólico de *Chuquiraga rotundifolia*, en Peru, inoculado con *Staphylococcus aureus* y hongos dimórfico que reside comúnmente en las membranas mucosas de las cavidades oral y vagina. Quintero-Chacón et al., (2014), argumenta esta postutura, indicando que parece ser comun en las plantas de la familia Asteraceae cuyos aceites esenciales de diverso origen resultan ser resistentes a las bacterias Gram-negativas, siendo sencibles y activas para levaduras y bacterias gram positivas. Satorres et al.,(2012), Gazim et al., (2018) y Cristobal y Paredes (2019) que investigaron en aceites esenciales extraídos por maceración e hidroestilación de distitas Barnadesioideaes observando que solo demostraban un efecto inhibitoria sobre *Staphylococcus aureus*, mientras que *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* mostraron resistencia. Concluyen que su acción antimicrobina podria no se efectiva por la ausencia otros metabolitos secundarios requeridos para su actividad bactericida. A pesar de ello, Ramirez (2014) identifica actividad antimicrobiana de la especie *Chuquiraga lessing* ante cepas activas de *Escherichia coli*, justificándolo con el posible beneficio que prestan los factores endógenos o exógenos al crecimiento de la planta (Perez-Chauca, 2020).

Los microorganismos probados en el ensayo anterior se sometieron a un proceso de microdilución en caldo para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y los resultados se resumen en La Tabla 15. En la (MIC), se consideró la concentración más baja responsable de inhibir completamente el crecimiento de los microorgaismos. Los valores de IMC se determinaron por la lectura visual luego de la adición de resazurina, considerándose positivos para los pozos que quedaron azules y negativos para los que obtuvieron un color rosa (SALVAT et al., 2001). El crecimiento bacteriano también fue considerado por la presencia de turbidez y/o un sedimento en el fondo del pozo.

**Tabla 15.** Gráfico de la Bandeja de Microdilución

<b>Micro Tubos</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>Aceite Esencial</b>
<b>A</b>	<b>CE</b>	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	<b>CP</b>	<b>AC1</b>	
<b>B</b>	<b>CE</b>	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	<b>CP</b>	<b>AC2</b>	
<b>C</b>	<b>CE</b>	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	<b>CP</b>	<b>AC3</b>	
<b>D</b>	<b>CE</b>	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	<b>CP</b>	<b>AC4</b>	

<b>E</b>	<b>CE</b>	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	<b>CP</b>	<b>AC5</b>
<b>F</b>	<b>CE</b>	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	<b>CP</b>	<b>AC6</b>
<b>G</b>	<b>CE</b>	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	<b>CP</b>	<b>AC7</b>
<b>H</b>	<b>CE</b>	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	<b>CP</b>	<b>AC8</b>
<b>I</b>	<b>CE</b>	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	<b>CP</b>	<b>AC9</b>
<b>J</b>	<b>CE</b>	40	20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.313	0.156	0.078	<b>CP</b>	<b>AC10</b>

**Leyenda:** CE: Control de esterilidad, CP: Control positivo

**Fuente:** El autor, 2021.

**Tabla 16.** Resultados de las pruebas para determinar la MIC del aceite esencial de *Chuquiragua jussieui*, frente a las cepas de microorganismos.

<b>Microorganismos</b> <b>Concentración</b> <b>mg/mL</b>	<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	<i>Salmonella enterica</i> serovar (ATCC14028)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Candida Albicans</i> (ATCC 25933)
40	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
5	+	-	+	+	+
2,5	-	-	+	+	+
1,25	-	-	-	+	+
0,625	-	-	-	+	+
0.313	-	-	-	-	+
0,156	-	-	-	-	-
0,078	-	-	-	-	-

(+) Mostró sensibilidad a las concentraciones probadas. (-) No hubo actividad a las concentraciones ensayadas.

**Fuente:** El autor, 2021.

**Tabla 17.** Actividad antimicrobiana del aceite esencia de *Chuquiragua Jussieui*

Microorganismos	Aceite esencial de la <i>Chuquiragua Jussieui</i> (µg/mL)	
	MIC	CMM (CMB o CMF)
<b>Bacterias Gram-negativas</b>		
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	600 - 800	> 2400
<i>Salmonella enterica</i> serovar (ATCC14028)	600 - 1600	> 6400
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (ATCC 27853)	2400 - 6400	> 2400
<b>Bacterias Gram-positivas</b>		
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923)	300 - 600	<2400
<b>Levaduras</b>		
<i>Candida Albicans</i> (ATCC 25933)	300 -800	<2400

**Fuente:** El autor, 2021.

Según los datos observados en el Tabla 17, en las cepas de *Staphylococcus aureu* y *Candida Albicans*, se encontro una MIC > 30 µl/mL, para *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, la MIC es > 600 µl/mL y para *Salmonella entérica*, la MIC es > 2500 µl/mL.

Ahora bien, la según clasificación propuesta por Paredes et al., (2016), el aceite esencial de una planta, presenta actividad antimicrobiana cuando IMC es ≤ 1000 µg/mL.

**Tabla 18.** Clasificación de la actividad antimicroniana de acuerdo a la MIC (Paredes et al., 2016)

Actividad antimicrobiana	MIC
Débil actividad	500 a 1000 µg/mL
Moderada actividad	100 a < 500 µg/mL
Buena actividad	< 100 µg/mL

**Fuente:** El autor, 2021.

Por lo tanto, el aceite esencial de la planta *Chuquiragua jussieui* presenta buena actividad antimicrobiana en presencia de las cepas activas de *Staphylococcus aureu* y *Candida Albicans*. Moderada actividad antimicrobiana ante las cepas de las bacteria

*Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa aeruginosa*; y, no presenta actividad antimicrobiana ante la cepa de *Salmonella entérica*. Resultados similares de IMC también fueron reportados por Arias et al., (2004) al analizar la actividad antimicrobiana de cepas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, frente a la acción inhibitoria del aceite esencial de otras especies del género *Chuquiraga* que crecen en diferentes regiones altoandinas de Argentina.

Por otro lado, por tratarse de cepas de bacterias y hongos como microorganismos de prueba, la Concentración Mínima Bacteriana (CMB) la tomamos como Concentración Mínima Microbiana (CMM), definida como la concentración más baja de aceite esencial que puede inhibir el 99% del crecimiento microbiano. Por esta razón, para la determinación de la CMM, no se consideraron aquellos ensayos que presentaban débil y moderada actividad antimicrobiana. Se tomaron 10 µl/mL de suspensiones con MIC de aceite 2x y 4x y se sembraron con la ayuda de un asa en una placa que contenía agar MacConkey y se incubaron a 37 °C, durante 24 horas. Después de este período, se verificó la aparición de crecimiento bacteriano. Todas las pruebas se realizaron por triplicado (DEVI; et al., 2010).

La CMM encontrada para *Staphylococcus aureu* y *Candida Albicans* es de 2400 µl/mL, para *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa* la CMM es > 2400 µl/mL y para *Salmonella entérica* la CMM es > 6400 µl/mL

El desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de las bacterias a múltiples antimicrobianos ha sido un problema, y la búsqueda de sustancias bioactivas, principalmente derivadas de plantas va siendo una alternativa viable en las últimas décadas. Este interés se debe a la diversidad de metabolitos secundarios producidos por las plantas, como alcaloides, flavonoides, terpenoides y compuestos fenólicos, los cuales tienen propiedades farmacológicas comprobadas, incluyendo actividad antibacteriana (Coelho et al., 2004; Nascimento et al., 2000). En investigaciones previas consultadas se evidencian resultados similares a los encontrados en ésta investigación. Por ejemplo, el aceite esencial de las hojas de *Chuquiragua spinosa* y *jussieui*, extraído con disolventes disolvente hidro alcohólico mostró actividad antimicrobiana en presencia de la bacteria *Staphylococcus aureus* (Costa et. Al. 2008). La actividad antimicrobiana también se

observó en otras especies como la *Chuquiraga pulegioides*, donde al analizar el extracto de metanol presentó actividad antimicrobiana con considerable diámetro de halos de inhibición frente a bacterias Gram-positivas (Arrais et al., 2014). En otra investigación con aceite de diferente especie de *Chuquiragua* se identificaron diterpenos en su constitución química, manifestando actividad antimicrobiana en presencia de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Saccharomyces cerevisiae* y actividad fungicida contra *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophyts* (Packer Luz, 2007).

Los aceites esenciales tienen en su constitución varias sustancias con probables actividades biológicas, por lo que se esperaba encontrar un resultado positivo en relación a la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Chuquiragua jussieui*. Sin embargo, este resultado no es único ni se limita al aceite esencial analizado.

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. CONCLUSIONES

- Se obtuvo aceites esenciales de la especie *Chuquiraga jussieui* con un rendimiento promedio de 0,0070%, valor considerado como un rendimiento bajo en relación al rendimiento obtenido de otras especies de *Chuquiragua*. A pesar de que las diferencias entre los rendimientos son pequeños, sin embargo si son estadísticamente significativas, variaciones de rendimiento que pueden deberse a factores extrínsecos e intrínsecos de la planta, como los ambientales y las propiedades genéticas que expresan las plantas en el medio.

- El análisis CG-MS mostró la presencia de setenta y tres compuestos químicos que constituyeron el 97% del aceite esencial de la planta *Chuquiraga jussieui*. Los principales componentes químicos del aceite esencial resultaron ser moléculas oxigenadas (76,6%), cetonas como la p-metoxiacetofenona y p-hidroxiacetofenona (14,4%), aldehídos (2,6%) y las (E)-cinamaldehído (2,1%) que fueron los más abundantes. El 15,9% son moléculas más complejas en estructura fenólica, fenilpropanoides y flavonoides como el apiol (9,8%). El 32,8% están formados por compuesto monoterpenos e hidrocarburos sesquiterpénicos. Estructura fitoquímica que lo cataloga como potencial agente antimicrobiano.

- La evaluación de la actividad antimicrobiana desarrollada por el método de difusión en medio sólido, la MIC y la CMM mostraron que las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* y las levaduras como *Candida Albicans*, demuestran sensibles a la actividad antimicrobiana del aceite esencial de la planta *Chuquiraga jussieui*, También mostraban intermedia actividad microbiana con bacterias Gram-negativas como la *Escherichia coli* y la *Pseudomona aeruginosa* y se manifiesta resistente para la cepa de *Salmonella enterica*. En todos los casos de MIC y CMM los diámetros de los halos de inhibición microbiana mostraron ser de longitud inferiores a los obtenidos con el control positivo (Ciprofloxacina, Ketoconazol), incluso donde ambos microorganismos resultaron ser sensibles. La utilidad medicinal que ofrece la *Chuquiragua jussieui*, incluyen infecciones

producidas por hongos y bacterias Gram-positivas, justificanose en este caso el uso prudente y responsable.

## RECOMENDACIONES

- A pesar de su bajo rendimiento, el uso tradicional de esta planta en peligro de extinción y su posible acción terapéutica para el tratamiento de afecciones bacterianas y micóticas, se sugiere desarrollar estrategias para la conservación de la especie y su uso como materia prima para la industrialización de fitofármacos de bajo costo y al alcance de las comunidades que la consumen ancestralmente. Investigar más profundamente los factores que influyen en el rendimiento y dar continuidad a la investigación en busca de mejores métodos y procedimientos alternativos de extracción del aceite esencial, mejorar la técnica de producción evitando evite la eliminar metabolitos secundarios eficaces para optimizar su acción terapéutica.

- Desarrollar pruebas de tamizajes fitoquímicos particularizando a cada uno de los órganos vegetales de la planta, así como considerar las diversas condiciones ambientales, épocas del año, aspectos edafológicos, altitud, sistema lunar, tiempo de conservación luego de la recolección entre otros factores que pueden influir decididamente en la presencia y concentración de los metabolitos secundarios en la planta. Al mismo tiempo, por no constituir parte de los objetivos de la investigación no se llegó a evaluar los posibles efectos tóxicos de la presencia aislada o combinada de los metabólicos secundarios aislados en los aceites esenciales extraídos de la *Chuquiraga jussieui*

- Actualmente, debido al rápido desarrollo de la resistencia a los antimicrobianos, las infecciones causadas principalmente por bacterias, hongos y virus se han convertido en una amenaza para la salud pública en todo el mundo. La medicina tradicional juega un papel fundamental en el descubrimiento de nuevas especies vegetales con actividad terapéutica, especialmente en la región andina del Ecuador por su gran diversidad en flora. Sin embargo, por los resultados encontrados se recomienda el uso prudente de las infusiones por las posibles complicaciones de resistencia antimicrobiana que podrá generar el uso indiscriminadamente los productos derivados de estas plantas, especialmente como parte del tratamiento antimicrobiano en la medicina ancestral.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguaiza Quizhpilema, J., Carlos, J., & Solano, S. (2021). Uso de plantas medicinales y conocimientos ancestrales en las comunidades rurales de la provincia de Cañar, Ecuador Use of medicinal plants and ancestral knowledge in rural communities of the province of Cañar, Ecuador. *Rev. CENIC Cienc. Biol.*; Vol, 52(2).
- Aguirre-Mendoza, Z. (2018). Composición florística, estructura y endemismo del componente leñoso de un bosque montano en el sur del Ecuador. *Arnaldoa*, 24(2), 543–556. <https://doi.org/10.22497/arnaldoa.242.24207>
- Aljaafar, M., Alhosani, M., Abushelaib, A., Lai, K., & Lim, S. (2019). Aceites esenciales: asociación con antibióticos. En *Aceites Esenciales-Aceites de la Naturaleza. IntechOpen*.
- Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V., & Aguiar, R. M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Quimica Nova*, 33(10), 2202–2210. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>
- Ambrosio, C. M. S., de Alencar, S. M., de Sousa, R. L. M., Moreno, A. M., & Da Gloria, E. M. (2017). Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. *Industrial Crops and Products*, 97, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.045>
- Anjo, F. A., Yara, C., Ogawa, L., Carolina, A., & Vital, P. (2021). *Phytochemical and technological characterization of canistel dehydrated pulp : a new potential food ingredient Caracterização fitoquímica e tecnológica da polpa desidratada de canistel : um novo potencial ingrediente alimentar Caracterización fitoquímica . 2021*, 1–11.
- Antonio, C. N. S., Selene, M. de M., Elnatan, B. de S., & Raquel, O. dos S. F. (2019). The genus *Eupatorium* L. (Asteraceae): A review of their antimicrobial activity. *Journal of Medicinal Plants Research*, 11(3), 43–57. <https://doi.org/10.5897/jmpr2016.6313>
- Arnelas, I., Armijos-barros, J. L., & Calvo, J. (2020). *Estudio taxonómico del género Oritrophium ( Astereae , Compositae ) en Ecuador. 1856*.
- Arriaga-Tórtola, I. (2017). *CARACTERIZACIÓN, EXTRACCIÓN Y ESTABILIDAD DE LOS COLORANTES NATURALES PRESENTES EN EL CÁLIZ DE Hibiscus sabdariffa L. (rosa de jamaica) COMO ALTERNATIVA DE CONSUMO DEL COLORANTE ARTIFICIAL. 40*.
- Arroyo-Acevedo, J., Herrera-Calderón, O., Chávez-Asmat, R., Anampa-Guzmán, A., Chumpitaz-Cerrate, V., & Enciso-Roca, E. (2017). Protective effect of Chuquiraga spinosa extract on N-methyl-nitrosourea (NMU) induced prostate cancer in rats. *Prostate International*, 5(2), 47–52. <https://doi.org/10.1016/j.pnil.2017.01.005>
- Aspiazu, R. C., Nogales, J., & Torrez, N. A. (2020). Estudio de las propiedades moleculares y reactivas del antibiótico Ciprofloxacina a nivel de teoría de funcional de densidad DFT B3LYP/6- 31G\* TT - Study of the molecular and reactive properties of the



- antibiotic Ciprofloxacin at the level of functional. *Con-Ciencia (La Paz)*, 8(2), 35–59. [http://www.scielo.org.bo/pdf/rcfb/v8n2/v8n2\\_a04.pdf](http://www.scielo.org.bo/pdf/rcfb/v8n2/v8n2_a04.pdf)
- Attimarad, M., Mueen Ahmed, K. K., Aldhubaib, B. E., & Harsha, S. (2011). High-performance thin layer chromatography: A powerful analytical technique in pharmaceutical drug discovery. *Pharmaceutical Methods*, 2(2), 71–75. <https://doi.org/10.4103/2229-4708.84436>
- Ayaz, M., Sadiq, A., Junaid, M., Ullah, F., Ovais, M., Ullah, I., Ahmed, J., & Shahid, M. (2019). Flavonoids as prospective neuroprotectants and their therapeutic propensity in aging associated neurological disorders. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11(JUN). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00155>
- Ayukekbong, J. A., Ntemgwa, M., & Atabe, A. N. (2017). La amenaza de la resistencia a los antimicrobianos en los países en desarrollo: causas y estrategias de control. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0208-x>
- Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., Jahurul, M. H. A., Ghafoor, K., Norulaini, N. A. N., & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426–436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bermúdez-Matus, K., Delgado-Soto, A., & Valle-García, G. (2019). *Análisis microbiológico de fitofármacos: Llantén, Cola de caballo, Quebra piedra para problemas urinarios, comercializados en farmacias botánicas de la ciudad de León. Junio 2019. April*, 33–35.
- Boudreau, R. G. (2021). *Pharmaceutical Ethics and Health Care Access. Archway Publishing.*
- Britto, B. (2017). Actualización de las Ecorregiones Terrestres de Perú propuestas en el Libro Rojo de Plantas Endémicas del Perú. *Gayana. Botánica*, 74(ahead), 0–0. <https://doi.org/10.4067/s0717-66432017005000318>
- Bussmann, R. W. (2019). Haciendo amigos en el campo: Cómo convertirse en un etnobotánico. - Una reflexión personal. *Ethnobotany Research and Applications*, 18(January). <https://doi.org/10.32859/era.18.2.1-13>
- Bussmann, R. W., & Sharon, D. (2014). Two decades of ethnobotanical research in Southern Ecuador and Northern Peru. *Ethnobiology and Conservation*, 3(2014). <https://doi.org/10.15451/ec2014-6-3.2-1-50>
- Cáceres-Ortiz, A. (2019). *Especies de plantas endémicas de las bioregiones de la costa de Ecuador. April*, 33–35.
- Carhuallanqui, A. (2020). *Evaluación del efecto combinado bactericida del aceite esencial del ajo ( Allium sativum ) y orégano ( Origanum vulgare ) sobre Listeria*

*monocytogenes* ATCC ) y *Sta.* 95.

- Carrillo-Hormaza, L., Mora, C., Alvarez, R., Alzate, F., & Osorio, E. (2015). Chemical composition and antibacterial activity against *Enterobacter cloacae* of essential oils from Asteraceae species growing in the Páramos of Colombia. *Industrial Crops and Products*, 77, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.08.047>
- Carrizo, S. L., Zampini, I. C., Sayago, J. E., Simirgiotis, M., Bórquez, J., Cuello, S., & Isla, M. I. (2019). Actividad antifúngica de preparados fitoterapéuticos de especies de *Baccharis* de la Puna argentina frente a hongos clínicamente relevantes. *Вестник Росздравнадзора*, 6, 5–9.
- Carrizo, S. L., Zampini, I. C., Sayago, J. E., Simirgiotis, M. J., Bórquez, J., Cuello, A. S., & Isla, M. I. (2020). Antifungal activity of phytotherapeutic preparation of *Baccharis* species from argentine Puna against clinically relevant fungi. *Journal of Ethnopharmacology*, 251, 112553. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.112553>
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Reseña bibliográfica FLAVONOIDES : CARACTERISTICAS QUÍMICAS Y APLICACIONES O . Cartaya ☒ e Inés Reynaldo. *Cultivos Tropicales*, 22(2), 5–14.
- Casado, R., Landa, A., Calvo, J., García-Mina, J. M., Marston, A., Hostettmann, K., & Calvo, M. I. (2011). Anti-inflammatory, antioxidant and antifungal activity of *Chuquiraga spinosa*. *Pharmaceutical Biology*, 49(6), 620–626. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.577436>
- Castro, L. J., & Sosoranga, S. L. (2020). *Evaluación fitoquímica y actividad antioxidante de los extractos hidroalcohólicos en hojas y flores de Chuquiraga jussieui JF Gmeil (Asteraceae)*.
- Ccana-Ccapatinta, G. V., Monge, M., Ferreira, P. L., & Da Costa, F. B. (2018). Chemistry and medicinal uses of the subfamily Barnadesioideae (Asteraceae). *Phytochemistry Reviews*, 17(3), 471–489. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9544-y>
- Cedeño, A., Moreira, C., Muñoz, J., Muñoz, A., Pillasaguay, S., & Riera, M. (2019). EUCALIPTO ( Comparison of distillation methods for obtaining eucalyptus essential oil ). *Revista Colón Ciencias, Tecnología y Negocios*, 6(1), 10.
- Chaib, F., Allali, H., Bennaceur, M., & Flamini, G. (2019). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from the Aerial Parts of *Asteriscus graveolens* (Forssk.) Less. and *Pulicaria incisa* (Lam.) DC.: Two Asteraceae Herbs Growing Wild in the Hoggar. *Chemistry and Biodiversity*, 14(8). <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700092>
- Chino, T., Nukui, Y., Morishita, Y., & Moriya, K. (2017). Morphological bactericidal fast-acting effects of peracetic acid, a high-level disinfectant, against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in tubing. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 6(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13756-017-0281-1>
- Christenson, J. C., Korgenski, E. K., & Relich, R. F. (2018). Laboratory Diagnosis of Infection Due to Bacteria, Fungi, Parasites, and Rickettsiae. In *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* (Fifth Edit). Elsevier Inc.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40181-4.00286-3>

- Chuctaya, H., & Roque, W. (2018). *Investigación de las tesis realizadas sobre plantas medicinales y alimenticias en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Norbert Wiener del 2012 al.*
- Contreras, A. (2019). Capacidad inhibitoria de los aceites esenciales del Jengibre (*Zingiber officinale*) y Pino (*Pinus sp.*) frente a la bacteria *Xanthomona sp* en condiciones in vitro. In *Universidad Politecnica Salesiana*.
- Cristobal, S., & Paredes, M. (2019). *Efectividad del uso de la Huamanpinta (Chuquiraga Spinoza) en el alivio de signos y síntomas en pacientes de 40 a 60 años con cálculos renales - distrito de Huariaca - Pasco Julio - Setiembre del 2018*. 104.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M. J., & Balslev, H. (2018). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador (con extracto de datos). In *Herbario QCA & Herbario AAU*.
- de Lima Ferreira, P., Antonelli, A., & Groppo, M. (2021). Touch me carefully: A step towards understanding morphological diversity in the South American spiny sunflowers (Compositae, Barnadesioideae). In *Phytotaxa* (Vol. 518, Issue 2). <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.518.2.3>
- De Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., & Trevisan, M. T. S. (2019). Vegetals as natural sources of antioxidants. *Quimica Nova*, 32(3), 689–702. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422009000300013>
- Delgado Ospina, J., Menjívar Flores, J. C., & Sánchez Orozco, M. S. (2018). Influencia de la fertilización en la producción y composición del aceite esencial de *Lippia origanoides* HBK (orégano criollo). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 20(3), 335–347.
- Desai, S. D., Desai, D. G., & Kaur, H. (2009). Saponins and their biological activities. *Pharma Times*, 41(3), 13–16.
- Díaz-Santana, O., Vega-Moreno, D., & Conde-Hardisson, F. (2017). Gas chromatography-mass spectrometry and high-performance liquid chromatography-diode array detection for dating of paper ink. *Journal of Chromatography A*, 1515, 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.093>
- Divya, A., Anbumalarmathi, J., & Sharmili, S. (2018). Phytochemical Analysis, Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Clitoria ternatea* Blue and White Flowered Leaves. *Advances in Research*, 14(5), 1–13. <https://doi.org/10.9734/air/2018/39030>
- Dourado, R. C. M., & Silveira, E. R. (2005). Preliminary investigation on the volatile constituents of *croton sonderianus* muell. arg.: Habitat, plant part and harvest time variation. *Journal of Essential Oil Research*, 17(1), 36–40. <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698823>
- Dueñas-Rivadeneira, A. A., Alcivar-Cedeño, Ulbio-Olazabal Manso, E., Cortés, R., Marrero-Chang, O., Donato-Pérez, A., Serrano-Pérez, H., Betancourt-Puron, T., &

- Legarreta-Navarro, M. (2017). Análisis fitoquímico y de seguridad de los extractos de Chuquiraga jussieui J.F. Gmell. *Centro Agrícola*, 41(2), 79–84.
- Duke, J. (2008). Medicinal plants of Latin America. In *Farmaceutisch Tijdschrift voor Belgie* (Vol. 64, Issue 1). <https://doi.org/10.4018/978-1-6684-3546-5.ch004>
- Durant-Archibold, A. A., Santana, A. I., & Gupta, M. P. (2018). Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus Piper in Panama: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 217, 63–82. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.008>
- Edwards-Jones, V. (2018). Alternative Antimicrobial Approaches to Fighting Multidrug-Resistant Infections. *Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398539-2.00001-X>
- Estrella et al. (2017). Manual de laboratorio de Botánica. Herramientas bioinformáticas para la conservación. *REDUCA (Biología)*, 10(1), 1–10.
- Falzon, C. C., & Balabanova, A. (2017). Phytotherapy: An Introduction to Herbal Medicine. *Primary Care - Clinics in Office Practice*, 44(2), 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2017.02.001>
- Fernández, M., Ezcurra, C., & Calviño, C. I. (2017). Taxonomic revision of the South American genus *Mulinum* (Azorelloideae, Apiaceae). *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 74(1), 048. <https://doi.org/10.3989/ajbm.2433>
- Fernandez-Sanzhe, A. (2020). Componentes de la diversidad biológica empleados por familias de la cabecera parroquial de Membrillal en la medicina natural y tradicional. *Comportamiento Agronómico Del Cultivo de Maní (Arachis Hypogaea L.) Con Aplicación de Microorganismos Benéficos (Micorrizas y Rizobacterias)*, 05, 108.
- Fisher, K., & Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer. *Trends in Food Science and Technology*, 19(3), 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.11.006>
- Fondo, C. (2020). *Historia y decadencia de los antibióticos: la fagoterapia*. 1–21.
- Gallegos-Zurita, M. (2019). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de La Facultad de Medicina*, 77(4), 327. <https://doi.org/10.15381/anales.v77i4.12647>
- Gazim, Z. C., Ana Carolina, L. A., Hovell, A. M. C., Rezende, C. M., Nascimento, I. A., Ferreira, G. A., & Garcia Cortez, D. A. (2010). Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Cdd in southern Brazil. *Molecules*, 15(8), 5509–5524. <https://doi.org/10.3390/molecules15085509>
- Gazim, Z. C., Ana Carolina, L. A., Hovell, A. M. C., Rezende, C. M., Nascimento, I. A., Ferreira, G. A., & Garcia Cortez, D. A. (2018). Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from

- leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Cdd in southern Brazil. *Molecules*, 15(8), 5509–5524. <https://doi.org/10.3390/molecules15085509>
- Gomez, R., & Murillo, R. (2017). ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA. *Facultad de Ciencias UNAM*, 1–14.
- Gonelimali, F. D., Lin, J., Miao, W., Xuan, J., Charles, F., Chen, M., & Hatab, S. R. (2018). Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01639>
- González-Cabrera, O., Ruiz-Pérez, T., Claro-Pérez, M., Pérez-Pino, N. M., Pérez-Gálvez, G., & Collazo-Alfonso, L. (2014). Estudio de patentes sobre tecnologías para tratamiento de agua y el agua residual. *Transinformacao*, 26(3), 339–347. <https://doi.org/10.1590/0103-37862014000300010>
- Grosser, K., & van Dam, N. M. (2017). A straightforward method for glucosinolate extraction and analysis with high-pressure liquid chromatography (HPLC). *Journal of Visualized Experiments*, 2017(121), 1–9. <https://doi.org/10.3791/55425>
- Guayasamin-López, M. (2018). Evaluación Antimicótica de extracto de Mosquera (*Croton elegans*) Frente a: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC9533. *Tesis*, 1–100.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1), 1–93. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.008>
- Gurovic, M. S. V., Castro, M. J., Richmond, V., Faraoni, M. B., Maier, M. S., & Murray, A. P. (2017). Triterpenoids with acetylcholinesterase inhibition from *Chuquiraga erinacea* D. Don. subsp. *erinacea* (Asteraceae). *Planta Medica*, 76(6), 607–610. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1240582>
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2018). The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.028>
- Harvey, A. L. (2018). Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13(19–20), 894–901. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.07.004>
- Hossan, M. S., Jindal, H., Maisha, S., Raju, C. S., Sekaran, S., Nissapatorn, V., Kaharudin, F., Yi, L. S., Khoo, T. J., Rahmatullah, M., & Wiert, C. (2018). Antibacterial effects of 18 medicinal plants used by the Khyang tribe in Bangladesh. *Pharmaceutical Biology*, 56(1), 201–208. <https://doi.org/10.1080/13880209.2018.1446030>
- Houghton, P. J. (2017). Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 2(3), 36–41.
- Huanca-Quispe, A. (2021). TAMIZAJE FITOQUÍMICO CUALITATIVO DE LOS EXTRACTOS ALCOHÓLICOS DE *Ephedra americana* H&B EX WILL Y *Chuquiraga rotundifolia* WEDD. Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA EN EL CRECIMIENTO DE *Escherichia coli* y

*Klebsiella sp.*

- Huayta-Arapa, N., Visag, R., & Cotacallapa, D. (2018). *ACTIVIDAD INHIBITORIA in vitro DE ACEITE ESENCIAL DE MARCO (Ambrosia peruviana Will) y (Ambrosia arborescens Mill) FRENTE A Streptococcus mutans*. 10, 11–14.
- Hurtado-Huarcaya<sup>1</sup>, J., Castañeda, R., & Joaquina, A.-C. (2021). Asteráceas medicinales en dos comunidades andinas del sur del Perú: Quinoa (Ayacucho) y Lircay (Huancavelica). *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 351–366.
- Hussein, R., & El-Anssary, A. (2018). Metabolitos secundarios de las plantas: los principales impulsores de las acciones farmacológicas de las plantas medicinales. *Medicina herbaria. Drug Discovery Today*, 13(19–20), 894–901. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.07.004>
- Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., & Amini-Khoei, H. (2018). Medicinal plants: Past history and future perspective. *Journal of HerbMed Pharmacology*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.15171/jhp.2018.01>
- Jansen, R. K., & Palmer, J. D. (2018). A Chloroplast DNA Inversion Marks an Evolutionary Split in the Genus *oenothera*. *Evolution*, 45(4), 1050. <https://doi.org/10.2307/2409709>
- Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2019). Antimicrobial susceptibility testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1749–1755. <https://doi.org/10.1086/647952>
- Juárez, B. E., & Mendiondo, M. E. (2018). Flavonoid chemistry of Chuquiraga (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(4), 371–373. [https://doi.org/10.1016/S0305-1978\(01\)00098-9](https://doi.org/10.1016/S0305-1978(01)00098-9)
- Karak, P. (2019). BIOLOGICAL ACTIVITIES OF FLAVONOIDS: AN OVERVIEW Prithviraj Karak Department of Physiology, Bankura Christian College, Bankura - 722101, West Bengal, India. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 10(4), 1567–1574. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10\(4\).1567-74](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.10(4).1567-74)
- Kenny, O., Smyth, T. J., Walsh, D., Kelleher, C. T., Hewage, C. M., & Brunton, N. P. (2018). Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food Chemistry*, 161, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.126>
- Kim, K. J., Choi, K. S., & Jansen, R. K. (2005). Two chloroplast DNA inversions originated simultaneously during the early evolution of the sunflower family (Asteraceae). *Molecular Biology and Evolution*, 22(9), 1783–1792. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi174>
- Koc, S., Isgor, B. S., Isgor, Y. G., Shomali Moghaddam, N., & Yildirim, O. (2015). The potential medicinal value of plants from Asteraceae family with antioxidant defense enzymes as biological targets. *Pharmaceutical Biology*, 53(5), 746–751. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.942788>

- Koparde, A. A. (2017). Phyto Active Compounds From Herbal Plant Extracts: Its Extraction, Isolation and Characterization. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 6(8), 1186–1205. <https://doi.org/10.20959/wjpr20178-8958>
- Kriplani, P., Guarve, K., & Baghael, U. S. (2019). Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69(8), 925–945. <https://doi.org/10.1111/jphp.12724>
- Laborclin, A. Mota, A. Correa, F. Silva, J. Ferreira, L. A., Brasil. Ministério da Saúde. Secretária de Atenção à Saúde., Câncer, P. O., No, G., Zilberstein, B., Malheiros, C., Lourenço, L. G., Kassab, P., Jacob, C. E., Weston, A. C., José, C., Bresciani, C., Desai, H. G., Gill, H. H., Shankaran, K., Mehta, P. R., Prabhu, S. R., Fox, J. G., ... Nero, L. A. (2019). Manual de Bacteriologia e de Enteroparasitos. In *Artmed* (Vol. 26, Issue 1). <https://sapiencia.ualg.pt/handle/10400.1/7641%0Ahttps://pdfs.semanticscholar.org/f2c9/5f98629684f23a9ae654801b6484203c133b.pdf%0Ahttps://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/9-Rectum-fact-sheet.pdf%0Ahttps://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789>
- Lahlou, M. (2017). The Success of Natural Products in Drug Discovery. *Pharmacology & Pharmacy*, 04(03), 17–31. <https://doi.org/10.4236/pp.2013.43a003>
- Landa, A., Casado, R., & Calvo, M. I. (2009). Identification and quantification of flavonoids from Chuquiraga spinosa (Asteraceae). *Natural Product Communications*, 4(10), 1353–1355. <https://doi.org/10.1177/1934578x0900401008>
- León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C., & Navarrete, H. (2012). Libro rojo, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. In P. U. C. DEL ECUADOR (Ed.), *Review of Palaeobotany and Palynology* (Segunda Ed, Vol. 2, Issues 1–3). [https://doi.org/10.1016/0034-6667\(91\)90066-C](https://doi.org/10.1016/0034-6667(91)90066-C)
- León-yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa, C. U., Navarrete, H., León-yáñez, S., Valencia, R., Navarrete, H., & Pitman, N. (2019). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador 2019*.
- Lima, P. G. C., Coelho-Ferreira, M., & da Silva Santos, R. (2016). Perspectives on Medicinal Plants in Public Markets across the Amazon: A Review. *Economic Botany*, 70(1), 64–78. <https://doi.org/10.1007/s12231-016-9338-y>
- López-García, R., Merino, de la V., Sánchez-Belloso, A., & Ruiz, L. L. (2017). Extracción con fluidos supercríticos. *Reduca (Recursos Educativos). Serie Congresos Alumnos*, 4(10), 142.
- Lozano, L. C. (2020). Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología Physicochemical principles of dyes used in microbiology. *Nova*, 18, 73–100.
- Lucas, G. V. S., Jaime, K. E. C., & Parrales, E. N. (2021). *Staphylococcus aureus: factores asociados a su hipervirulencia y adhesión y formación de biopelículas* (Vol. 6, Issue 9). <https://doi.org/10.23857/pc.v6i9.3143>

- Luo, Q., Wan, F., Yu, X., Zheng, B., Chen, Y., Gong, C., Fu, H., Xiao, Y., & Li, L. (2020). MDR *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ST34 carrying *mcr-1* isolated from cases of bloodstream and intestinal infection in children in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(1), 92–95. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz415>
- Maldonado-Coello, G., & Naula-Orrala, J. (2020). EVALUACION FARMACOGNOSTICA Y FARMACOLOGICA DE LA RAIZ Y TALLO DE LA ESPECIE *Chuquiraga jussieui* J.F. Gmel (Asteraceae). *Akrab Juara*, 5(1), 43–54.
- Mamadaliyeva, N. Z., Abdullaeva, N. S., Rosenau, T., Fakhrutdinova, M., Azimova, S., & Böhmdorfer, S. (2018). Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches. *Natural Product Research*, 32(16), 1926–1950. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1356838>
- Mammer, B. (2019). *Optimizando la purificación de ornitina transcarbamilasa humana (OTC) producida recombinantemente*.
- Manzano, C., Landa, A., Calva, D., & Lehman, M. (2011). Un método simple para la medida de halos de difusión en cultivos biológicos. *Inaoe*, 5.
- Marasini, B. P., Baral, P., Aryal, P., Ghimire, K. R., Neupane, S., Dahal, N., Singh, A., Ghimire, L., & Shrestha, K. (2015). Evaluation of antibacterial activity of some traditionally used medicinal plants against human pathogenic bacteria. *BioMed Research International*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/265425>
- Marotti, M., Dellacecca, V., Piccaglia, R., & Giovanelli, E. (1999). *Agronomic and chemical evaluation of three varieties of foeniculum vulgare mill* (pp. 1–7). <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1993.331.9>
- Martin-Smith, & Sneader. (2018). Biological activity of the terpenoids and their derivatives. *Progress in Drug Research/Fortschritte der Arzneimittelforschung/Progrès des Recherches Pharmaceutiques. Pharmaceutiques*, 13, 1–521.
- Martínez, A. (2018). *APLICACIÓN DE MÉTODOS COMBINADOS PARA LA INACTIVACIÓN DE SALMONELLA TYPHIMURIUM EN AGUA DE COCO (COCOS NUCIFERA L.*
- Martinez, F. J., Norrbom, A. L., Schliserman, P., & Campanella, M. V. (2020). Tephritidae flies associated with *Chuquiraga avellaneda* (Asteraceae) in Patagonia, Argentina. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 92, 1–6. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020191524>
- Martínez, M., Molina, N., & Boucourt, E. (1997). Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L. (GUAYABA). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2(1), 12–14.
- Mather, A. E., Phuong, T. L. T., Gao, Y., Clare, S., Mukhopadhyay, S., Goulding, D. A., Do Hoang, N. T., Tuyen, H. T., Lan, N. P. H., Thompson, C. N., Trang, N. H. T., Carrique-Mas, J., Tue, N. T., Campbell, J. I., Rabaa, M. A., Thanh, D. P., Harcourt, K., Hoa, N. T., Trung, N. V., ... Baker, S. (2018). New variant of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium associated with invasive disease in immunocompromised patients in Vietnam. *MBio*, 9(5), 1–11.



<https://doi.org/10.1128/mBio.01056-18>

- Medeo, N., Haque, M., Sahira Banu, K., & Cathrine, L. (2015). General Techniques Involved in Phytochemical Analysis Related papers EXTRACTION, ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM PLANTS... akila easwari Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for . *International Journal of Advanced Research in Chemical Science (IJARCS)*, 2(4), 25–32.
- Medina, M., D'armas, H., Jaramillo, C., & Martin, D. S. (2019). Analysis of the fungal content of some vegetable species grown in Ecuador Resumen. *FAC Salud*, 3(4), 3–12.
- Mickymaray, S. (2019). Efficacy and mechanism of traditional medicinal plants and bioactive compounds against clinically important pathogens. *Antibiotics*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/antibiotics8040257>
- Molina-Brito, A. A. (2018). Determinación de la actividad antioxidante de las especies vegetales *Chuquiragua jussieui* y *Bidens andicola* tomando como estándar de referencia al ácido ascórbico. *Advanced Optical Materials*, 10(1), 1–9.
- Molina, L. M., & Rivera, C. M. (2020). Prevalencia y Factores de Riesgo del *Helicobacter Pylori* en niños escolares de 5 a 12 años de edad Prevalence and Risk Factors of *Helicobacter Pylori* in school children from 5 to 12 years old. *Facsalud*, 4, 23–33.
- Montoya-Cadavid, G. de J. (2010). ACEITES ESENCIALES: una alternativa de diversificación para el eje cafetero. *Sección de Publicaciones e Imagen Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales*, 1, 12–174.
- Mtewa, A. G., Deyno, S., Kasali, F. M., Annu, A., & Sesaazi, D. C. (2018). General Extraction, Isolation and Characterization Techniques in Drug Discovery: A Review. *Article in International Journal of Sciences: Basic and Applied Research*, 38(1), 10–14.
- Nascimento, L., Pimentel, M., & Aragão, M. A. (2018). *Uso de produtos naturais com fins terapêuticos em pediatria*.
- Navas, A. (2019). *FUNCIONES ECOSISTÉMICAS Y ATRIBUTOS ECOLÓGICOS DE LAS COSTAS BIOLÓGICAS EN ECOSISTEMAS SEMIÁRIDOS-ÁRIDOS-HIPERÁRIDOS DEL CENTRO-OESTE DE LA ARGENTINA*.
- NCCLS, N. C. for C. L. S. (2015). M02-A12: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 35(M02-A12), 73. [www.clsi.org](http://www.clsi.org).
- Nguyen, T. S., Xia, N. H., Van Chu, T., & Van Sam, H. (2019). Ethnobotanical study on medicinal plants in traditional markets of son la province, Vietnam. *Forest and Society*, 3(2), 171–192. <https://doi.org/10.24259/fs.v3i2.6005>
- Obregon, M. (2018). *ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA HIDRODESTILACIÓN CON EL ARRASTRE DE VAPOR PARA LA EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES DE LA CASCARA DE NARANJA*.

- OMS. (2017). *Resistencia a los antimicrobianos Informe de la Secretaría A70/12. 3*, 12–17.
- OMS. (2018). *Organización Mundial de la Salud*.
- OMS. (2020). *Resistencia a los antimicrobianos*.
- Orchard, A., & Van Vuuren, S. (2017). Commercial Essential Oils as Potential Antimicrobials to Treat Skin Diseases. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2017*. <https://doi.org/10.1155/2017/4517971>
- Orellana, A., Achig, D., Angulo, A., Barrera, G., Brito, L., & Mosquera, L. (2020). *SABIDURÍA ANCESTRAL ANDINA Y USO DE PLANTAS MEDICINALES: perspectiva de los curanderos del cantón Cuenca* (Issue July).
- Orhan, I. E. (2019). Pharmacognosy: Science of natural products in drug discovery. *BiolImpacts, 4*(3), 109–110. <https://doi.org/10.15171/bi.2014.001>
- Paniagua-Zambrana, N. Y., Bussmann, R. W., Echeverría, J., & Romero, C. (2020). *Chuquiraga atacamensis Kuntze Chuquiraga jussieui J.F. Gmel. Chuquiraga spinosa Less. Chuquiraga weberbaueri Tovar Asteraceae. 1–9*. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-77093-2\\_70-2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-77093-2_70-2)
- Perez-Chauca, E., Saldaña-Bobadilla, V., & Minchán-Herrera, P. (2020). Etnobotánica, farmacología, fitoquímica y usos medicinales de huamanpinta en el Perú – chuquiraga spinosa less. (asteraceae). *Ethnobotany Research and Applications, 19*(Camino 1992). <https://doi.org/10.32859/era.19.22.1-13>
- Petroll, K., Kopp, D., Care, A., Bergquist, P. L., & Sunna, A. (2019). Tools and strategies for constructing cell-free enzyme pathways. *Biotechnology Advances, 37*(1), 91–108. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.007>
- Pinto, E., Pérez, Á. J., Ulloa, C., & Cuesta, F. (2018). Árboles representativos de los bosques montanos del noroccidente de Pichincha, Ecuador. In *Condesan*.
- Prefectura del Cañar. (2015). *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial de la provincial del Cañar actualizado. Periodo: 2015 - 2019*. 1003. [http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL\\_SNI/data\\_sigad\\_plus/sigadplusdiagnostico/0360000150001\\_PDY\\_OT\\_Act\\_16\\_05\\_2016\\_16-05-2016\\_16-43-57.pdf](http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdiagnostico/0360000150001_PDY_OT_Act_16_05_2016_16-05-2016_16-43-57.pdf)
- Profesional, E., & Biologicas, D. E. C. (2021). *Flora Etnomedicinal empleada por el poblador del distrito de Moche-Trujillo, La Libertad, 2021*.
- Puente, S., & Vilcayauri, A. (2018). *EFFECTO ANTILITIASIS DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE Chuquiraga spinosa - Huamanpinta EN RATAS ALBINAS CEPA HOLTZMAN*.
- Puri, M., Sharma, D., & Barrow, C. J. (2012). Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. *Trends in Biotechnology, 30*(1), 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.014>
- Quintero-Chacón, A., Colmenares, D., González, N., & Staschenko, E. (2014). Aceite

- esencial de *Hyptis umbrosa* Salzm extraído por diferentes técnicas. *Acta Científica Venezolana*, 55(2), 181–187.
- Raeisi, M., Ghorbani Bidkorpeh, F., Hashemi, M., Tepe, B., Moghaddam, Z., Aman Mohammadi, M., & Noori, S. M. A. (2019). Chemical Composition and Antibacterial and Antioxidant Properties of Essential Oils of *Zataria multiflora*, *Artemisia deracunculus* and *Mentha piperita*. *Medical Laboratory Journal*, 13(2), 1–7. <https://doi.org/10.29252/mlj.13.2.1>
- Ramos-Páez, A. (2017). EXTRACCIÓN DE ACEITE DE SEMILLAS DE GUANÁBANA (*Annona muricata*): ANÁLISIS PROXIMAL Y PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS AISLADOS PROTEICOS. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952., 1–116.
- Reddy, L. J., Oil, E., Coriandrum, O. F., & Linn, S. (2012). World Journal of Pharmaceutical research SCAVENGING ACTIVITIES OF THE LEAF EXTRACTS AND LEAF. *World Journal Of Pharmaceutical Research*, 1(3), 705–716.
- Rengifo-Zevallos, D. (2018). ESTUDIO FITOQUÍMICO CUALITATIVO PRELIMINAR Y CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES Y TANINOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS DE *Desmodium vargasianum* Schubert PRELIMINARY QUALITATIVE FITOCHEMICAL STUDY AND QUANTIFICATION OF FLAVONOIDS AND TANNINS OF ETHANOLIC EXT. *Rev Soc Quím Perú*, 84(2).
- Revelo, J. (2017). *Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite de canela (Cinnamomun zeylanicum ) sobre cepas de salmonella*. 63.
- Rios, M., Tinitana, F., Jarrín-v, P., Donoso, N., & Romero-Benavides, J. C. (2017). “Horchata” drink in Southern Ecuador: Medicinal plants and people’s wellbeing. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 13(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13002-017-0145-z>
- Rivas, A. (2018). Evaluación del aceite esencial de limón (*Citrus aurantifolia* swingle) como conservante natural en carne de cerdo (*Sus scrofa domesticus*). *Rueda Montoya, Rudsvi. 2018. “Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.”* 1–250., 8–10.
- Rodríguez-Segovia, M., Rubio-Jiménez, D., Narvaez-Verdesoto, K., & Tuz-Chamorro, J. (2020). Conocimientos Sobre Plantas Rituales Utilizadas Por Yerbateras De Los Mercados De Quito, Ecuador: Aportes Sobre Su Estado De Conservación. *Ethnoscientia*, 5(1). <https://doi.org/10.22276/ethnoscientia.v5i1.309>
- Rodríguez-Tudela, J. L., Barchiesi, F., Bille, J., Chryssanthou, E., Cuenca-Estrella, M., Denning, D., Donnelly, J. P., Dupont, B., Fegeler, W., Moore, C., Richardson, M., & Verweij, P. E. (2003). Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(8), i–viii. <https://doi.org/10.1046/j.1469-0691.2003.00789.x>
- Rojas-Graü, M. A., Avena-Bustillos, R. J., Friedman, M., Henika, P. R., Martín-Belloso, O., & Mchugh, T. H. (2006). Mechanical, barrier, and antimicrobial properties of apple puree edible films containing plant essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(24), 9262–9267. <https://doi.org/10.1021/jf061717u>
- Rojas, Jaramillo, C., & Lemus, M. (2015). Métodos analíticos para la determinación de

- metabolitos secundarios de plantas. *Universidad Técnica de Machala*, 1(978-9978-316-62-7), 108. [http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/6653/1/20 METODOS ANALITICOS PARA LA DETERMINACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE PLANTAS.pdf](http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/6653/1/20%20METODOS%20ANALITICOS%20PARA%20LA%20DETERMINACION%20DE%20METABOLITOS%20SECUNDARIOS%20DE%20PLANTAS.pdf)
- Rojas, R. (2002). *Guía para la vigilancia y control de la calidad del agua para consumo humano*. 2, 1–353. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2012/fift794d/doc/fift794d.pdf>
- Romanik, G., Gilgenast, E., Przyjazny, A., & Kamiński, M. (2007). Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 253–261. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.09.012>
- Rondón, M., García, I., Cornejo, X., Rojas, J., & Terán, W. (2015). Phytochemical screening and antioxidant activity of seven medicinal plants species from Ecuador. *Pharmacologyonline*, 3(2015-DECEMBER), 19–28.
- Ruiz-Benitez Martha. (2020). *Métodos Físicos de Separación Obtención de Extractos e Hidrodestilación*.
- Sánchez, O., Manuel, S., Bonilla, C., Carmen, R., & Vanegas, M. (2017). Efecto de la altura y frecuencia de corte y secado en el rendimiento y calidad del aceite esencial de pronto alivio. *Scientia Et Technica*, 13(33), 253–255. <https://doi.org/10.22517/23447214.7097>
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K., Lath, L., & Yoga, L. (2017). *EXTRACTION, ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM PLANTS' EXTRACTS*. 8, 93–130. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-56936-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-56936-4_2)
- Sato, A., Yamaguchi, T., Hamada, M., Ono, D., Sonoda, S., Oshiro, T., Nagashima, M., Kato, K., Okazumi, S., Katoh, R., Ishii, Y., & Tateda, K. (2019). Morphological and biological characteristics of staphylococcus aureus biofilm formed in the presence of plasma. *Microbial Drug Resistance*, 25(5), 668–676. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0068>
- Satorres, S. E., Chiaramello, A. I., Tonn, C. E., & Laciari, A. L. (2012). Antibacterial activity of organic extracts from *Zinnia peruviana* (L.) against gram-positive and gram-negative bacteria. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 24(4), 344–347.
- Scuteri, D., Rombolà, L., Morrone, L. A., Bagetta, G., Sakurada, S., Sakurada, T., Tonin, P., & Corasaniti, M. T. (2019). Neuropharmacology of the neuropsychiatric symptoms of dementia and role of pain: Essential oil of bergamot as a novel therapeutic approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms20133327>
- Senatore, F., Nunziata, A., D'Agostino, M., & De Feo, V. (2008). Flavonol glycosides and p-hydroxyacetophenone from *Chuquiraga spinosa*. *Pharmaceutical Biology*, 37(5), 366–368. <https://doi.org/10.1076/phbi.37.5.366.6050>
- Siddiqui, M. R., AlOthman, Z. A., & Rahman, N. (2017). Analytical techniques in

- pharmaceutical analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S1409–S1421. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.016>
- Silveira-Rabelo, A. C., & Caldeira-Costa, D. (2018). A review of biological and pharmacological activities of *Baccharis trimera*. *Chemico-Biological Interactions*, 296, 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.09.002>
- Soares, N., Santos, P., Vieira, V., Pimenta, V., & Araújo, E. (2017). TÉCNICAS DE PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E SUA IMPORTÂNCIA PARA O ESTUDO DE BIOMOLÉCULAS DERIVADAS DE PLANTAS. *October 2019*, 530–543. <https://doi.org/10.18677/EnciBio>
- Sparkman, O. D., Penton, Z. E., & Kitson, F. G. (2018). THE FUNDAMENTALS OF GC/MS. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*, 2–13. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-373628-4.00001-0>
- Swami, S., Singh, S., Longo, G., & Rakesh, D. (2018). *Tecnologías de extracción para plantas medicinales y aromáticas [Internet]*. *Centro Internacional de Ciencia y Alta Tecnología*.
- Tariq, S., Wani, S., Rasool, W., Shafi, K., Bhat, M. A., Prabhakar, A., Shalla, A. H., & Rather, M. A. (2019). A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 134, 103580. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580>
- Tavakkoli, A., Johnston, T. P., & Sahebkar, A. (2020). Antifungal effects of statins. *Pharmacology and Therapeutics*, 208, 107483. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107483>
- Tenover, F. C. (2009). Antibiotic Susceptibility Testing. *Encyclopedia of Microbiology*, 67–77. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00239-X>
- Thawabteh, A., Juma, S., Bader, M., Karaman, D., Scrano, L., Karaman, S., & Bufo, R. (2019). La actividad biológica de los alcaloides naturales contra Herbívoros, Células Cancerosas y Patógenos. *Toxins*, 11(656), 1–28.
- Thomford, N. E., Senthebane, D. A., Rowe, A., Munro, D., Seele, P., Maroyi, A., & Dzobo, K. (2018). Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6). <https://doi.org/10.3390/ijms19061578>
- Tinitana, F., Rios, M., Romero-Benavides, J. C., de la Cruz Rot, M., & Pardo-de-Santayana, M. (2016). Medicinal plants sold at traditional markets in southern Ecuador. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 12(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13002-016-0100-4>
- Tinoco, S., & Vispo, S. (2020). *An overview of the biological activities of Aristeguietia glutinosa, Lepechinia rufocampii, and Croton elegans (endemic plants of Ecuador) and its potential application in drug discovery*.
- Torre, L. D. La, Muriel, P., & Balslev, H. (2006). *Etnobotánica en los Andes del Ecuador*.

- Botánica Económica de Los Andes Centrales*. Editores: M. Moraes R., B. Øllgaard, L. P. Kvist, F. Borchsenius & H. Balslev. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, May, 246–267.
- Torres, R. (2018). EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIINFLAMATORIO DE ESPECIES VEGETALES QUE HABITAN EN ZONAS EXTREMAS DEL NOROESTE ARGENTINO. In *Universidad de Alcalá*.
- Valdez, L. Y. C. (2019). Uso de plantas medicinales relacionadas con las creencias de enfermedades gastrointestinales en el barrio Boca del Lobo en la ciudad de Esmeraldas. *Universidad Católica Del Ecuador*.
- Vanegas-Múnera, J. M., & Jiménez-Quiceno, J. N. (2020). Antimicrobial resistance in the 21st century: Towards a post-antibiotic era? *Revista Facultad Nacional de Salud Publica*, 38(1), 1–6. <https://doi.org/10.17533/udea.rfnsp.v38n1e337759>
- Vega, M. del C. (2013). Identificación parcial de principios activos de diez plantas medicinales del norte de México con actividad biológica contra bacterias patógenas de aislados clínicos y cepas de referencia. *Universidad Autónoma De Nuevo León*, 97.
- Velavan, S. (2015). Phytochemical techniques - a review. *World Journal of Science and Research*, 1(2), 80–91.
- Verma, N., & Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2015.09.002>
- Villagrán, C., Romo, M., & Castro, V. (2003). ETNOBOTÁNICA DEL SUR DE LOS ANDES DE LA PRIMERA REGIÓN DE CHILE: UN ENLACE ENTRE LAS CULTURAS ALTIPLÁNICAS Y LAS DE QUEBRADAS ALTAS DEL LOA SUPERIOR. *Chungará (Arica)*, 35(1), 73–124. <https://doi.org/10.4067/s0717-73562003000100005>
- Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., & Pérez-Álvarez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. *Food Control*, 19(12), 1130–1138. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.12.003>
- Wang, X., Shen, Y., Thakur, K., Han, J., Zhang, J. G., Hu, F., & Wei, Z. J. (2020). Antibacterial Activity and Mechanism of Ginger Essential Oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 25(17). <https://doi.org/10.3390/molecules25173955>
- Weckmüller, H., Barriocanal, C., Maneja, R., & Boada, M. (2019). Factors affecting traditional medicinal plant knowledge of the Waorani, Ecuador. *Sustainability (Switzerland)*, 11(16), 1–12. <https://doi.org/10.3390/su11164460>
- Weinstein, M. P., Patel, J. B., Burnhman, C.-A., & Zimmer, B. L. (2018). Clinical and Laboratory Standards Institute Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically Standard,, Approval CDM-A.; *M07 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically.*, 91.

- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2017). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- William, M., & Laynes, S. (2002). *Manua l Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana Serie de Normas*.
- Wilson, D. (2019). Candida albicans. *Trends in Microbiology*, 27(2), 188–189. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.10.010>
- Zambrano, A., & Tonato, E. (2020). Revisión de la distribución geográfica y utilidad de plantas medicinales en mercados del Distrito Metropolitano de Quito, 2020. *Вестник Росздравнадзора*, 4(9), 9–15.

## ANEXOS

<b>UTPL</b>		
<b>Universidad Técnica Particular de Loja</b> <b>Departamento de Biología Celular y Molecular</b>		
Reporte N- 213		
Atento: Luis Moncayo Molina	CI: 0300885670	
Lote de muestra: 000-00-27-09-2021		
Lugar: Cañar, El Tambo. – Zona rural,		
Muestreo:	Coordenadas:	Fecha:
Descripción de la muestra:		

**Muestra: Aceite esencial – Planta Chuquiragua (*Chuquiraga jussieu*)**

### RESULTADOS

**Tabla 1.** Composición del aceite esencial de hojas y flores de *Chuquiraga jussieu* (R. et P.) D. Don

	%	Rt (min)	Identificationb
<i>Alcohol</i> (7,8%)			
Octan- 1-ol	0,1	30,4	RT, MS, Co
Linalol	2,8	32,6	RT, MS, Co
<i>p</i> -Cymen-8-ol	1,2	38,2	RT, MS
$\alpha$ -Terpineol	3	39	RT, MS, Co
Carveol	0,7	41	RT, MS, Co
Octadecan-1-ol	trazoe	91,2	RT, MS, Co
<i>Aldehydes</i> (9,1%)			
3-Methylhexanal	trazoe	22,6	RT, MS
Octanal	1,1	24,5	RT, MS, Co
Oct-2-en-1-ol	0,2	28,4	RT, MS
Nonanal	2,6	32,4	RT, MS, Co
Citronellal	0,5	35,8	RT, MS, Co
Decanal	1,7	40,1	RT, MS, Co
(E)-Cinnamaldehyde	2,1	43,3	RT, MS, Co
Geranial	0,9	44	RT, MS, Co
<i>Ketones</i> (27,0%)			
(E)-6-Methylhepta-3,5-dien-2-one	trazoe	31,9	RT, MS
Decan-2-one	0,5	34,6	RT, MS, Co
Menthone	trazoe	36,3	RT, MS, Co
Isomenthone	0,3	36,5	RT, MS, Co
<i>p</i> -Methylacetophenone	0,1	37,6	RT, MS, Co
Pulegone	3,9	42,1	RT, MS, Co
Piperitone	0,2	42,8	RT, MS, Co
Undecan-2-one	1,0	46,6	RT, MS, Co

**Figura 14.** Resultados de la GC-SM aplicados la muestra de aceite esencial de la *Chuquiraga jussieu*





**Figura 15. Hidrodestilación adaptado a Clevenger con mechero de bunsen, para obtener el aceite esencial de la *Chuquiraga jussieui***



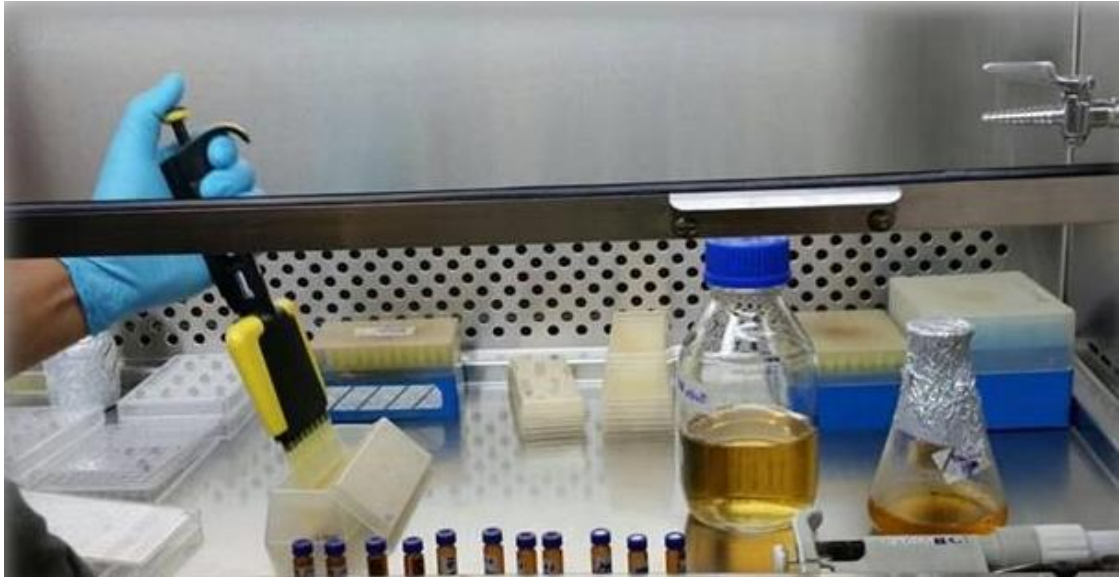
**Figura 16 Proceso de hidrotésilación destilación por arrastre de vapor de aceite esencial de la *Chuquiraga jussieui*.**



**Figura 17** Envases utilizados para recolectar el destilado aceite esencial-agua y el aceite esencial puro, antes y después de purificarlo y deshidratarlo con Sulfato de Sodio.



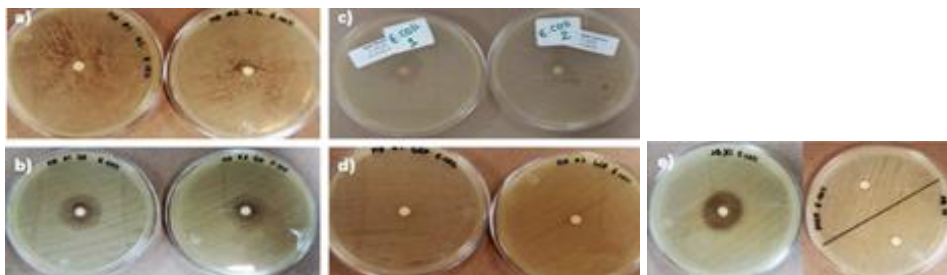
**Figura 18** Equipos usados para determinar la densidad y el peso del aceite esencial extraído



**Figura 19** Cabina de aislamiento para analisis microbiológico



**Figura 20** Kit de materiales y equipos, y resultados de las pruebas para determinar el IMC del aceite esencia de la *Chuquiraga jussieui*



**Figura 21** Cultivos con halos de inhibición que indican la sensibilidad de los microorganismos analizados ante del aceite esencial de *Chuquiraga jussieui*