



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA



CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de la hoja y fruto del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) frente a bacterias patógenas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*).

Informe Final de Integración Curricular, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera en Biotecnología, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Guamán Poaquiza Edith Johanna

Tutor: Ph.D. Irvin Ricardo Tubón Usca

Ambato - Ecuador

Septiembre - 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

Ph.D. Irvin Ricardo Tubón Usca

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final de Integración Curricular ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Titulación y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 22 de Agosto del 2022

.....

Ph.D. Irvin Ricardo Tubón Usca

C.I. 060425035-7

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Edith Johanna Guamán Poaquiza, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las citas bibliográficas.



.....
Edith Johanna Guamán Poaquiza

C.I. 180533732-4

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman:

.....

Presidente del Tribunal

.....

Dr. Mario Daniel García Solís

C.I. 110360547-1

.....

Dr. Orestes Darío López Hernández

C.I. 175478486-4

Ambato, 31 de Agosto del 2022

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Informe Final de Integración Curricular o parte de él un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



.....
Edith Johanna Guamán Poaquiza

C.I. 180533732-4

AUTORA

DEDICATORIA

A mis padres Segundo y María, por su apoyo incondicional en mi camino universitario, por brindarme sus consejos de vida y darme la oportunidad de estudiar.

A mi hermana Alexandra por acompañarme en todo momento y por ser quien me impulse a seguir a adelante.

A mis hermanos y hermanas quienes me han ayudado en todo momento para que esta meta sea posible.

A toda mi familia, por sus consejos y apoyo.

Con mucho cariño

Edith Guamán

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme dado la vida y fuerzas para alcanzar una meta más en mi vida.

A mis padres, por guiarme durante mi trayecto por la Universidad Técnica de Ambato que hoy me llena de orgullo culminar.

A mis hermanas y hermanos, por apoyarme en las buenas y malas de cada momento de mi vida.

A mi sobrino, Santiago por brindarme momentos de felicidad con su ternura y locuras.

A mi tutor Ph.D. Irvin Tubón por haberme guiado e impartido sus conocimientos en cada proceso de mi Trabajo de Titulación.

A mis amigas, Belén y Samantha quienes han estado a mi lado siempre a lo largo de toda la carrera, por su amistad, consejos y cariño.

A mis docentes de la FCIAB, por haberme formado profesionalmente con sus conocimientos y enseñanzas compartidas en toda la carrera.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR.....	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPITULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS.....	1
1.1.1. Usos ancestrales de plantas medicinales.....	1
1.1.2. Importancia de las plantas en la medicina	1
1.1.3. Plantas con actividad antimicrobiana en Ecuador	2
1.1.4. Bacterias patógenas.....	2
1.1.4.1. <i>Bacillus cereus</i>	3
1.1.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.1.4.3. <i>Escherichia coli</i>	3
1.1.4.4. <i>Listeria monocytogenes</i>	3
1.1.5. Patologías asociadas	3
1.1.6. Tratamientos	4
1.1.7. Resistencia a antibióticos.....	4

1.1.8.	Tasa de infecciones bacterianas	5
1.1.9.	<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth.....	5
1.1.9.1.	Taxonomía.....	5
1.1.9.2.	Descripción botánica	6
1.1.9.3.	Composición nutricional	6
1.1.9.4.	Distribución del mortiño en el Ecuador	7
1.1.9.5.	Usos del mortiño	7
1.1.9.6.	Valor antioxidante	7
1.1.9.7.	Compuestos fenólicos.....	7
1.1.10.	Tamizaje fitoquímico	8
1.1.11.	Capacidad antioxidante	9
1.1.11.1.	Método DPPH	9
1.1.12.	Extracción con solventes.....	9
1.1.12.1.	Extracción soxhlet	10
1.1.12.2.	Extracción por maceración	10
1.1.13.	Método de difusión en agar.....	10
1.2.	Objetivos	11
1.2.1.	Objetivo General.....	11
1.2.2.	Objetivos Específicos	11
CAPITULO II		12
METODOLOGÍA		12
2.1.	Materiales.....	12
2.1.1.	Material vegetal	12
2.1.2.	Material microbiano.....	12
2.1.3.	Material de laboratorio.....	12
2.1.4.	Reactivos.....	13
2.1.5.	Equipos de laboratorio	14
2.2.	Métodos.....	15
2.2.1.	Recolección del material vegetal	15
2.2.2.	Preparación del material vegetal.....	15

2.2.3.	Obtención de los extractos vegetales	16
2.2.3.1.	Extracción hidroalcohólica de la hoja	16
2.2.3.2.	Extracción soxhlet del fruto	16
2.2.3.3.	Cálculo del porcentaje de rendimiento	16
2.2.4.	Análisis de Tamizaje fitoquímico	17
2.2.4.1.	Ensayo de Dragendorff.....	17
2.2.4.2.	Ensayo de Espuma.....	17
2.2.4.3.	Ensayo de Shinoda	17
2.2.4.4.	Ensayo de Cloruro férrico	17
2.2.4.5.	Ensayo de Gelatina	17
2.2.4.6.	Ensayo de Borntrager	18
2.2.4.7.	Ensayo de Acetato de cobre	18
2.2.5.	Capacidad Antioxidante.....	18
2.2.5.1.	Preparación del reactivo DPPH y Trolox	18
2.2.5.1.	Medición de la actividad antioxidante.....	18
2.2.5.2.	Determinación del porcentaje de inhibición de DPPH.....	19
2.2.6.	Actividad Antimicrobiana por difusión en agar	19
2.2.6.1.	Activación y estandarización de las cepas bacterianas.....	19
2.2.6.2.	Difusión en pozos de agar	20
2.3.	Análisis estadístico.....	20
CAPITULO III		21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN		21
3.1.	Análisis y discusión de los resultados.....	21
3.1.1.	Rendimiento de los extractos.....	21
3.1.2.	Determinación de metabolitos secundarios	22
3.1.3.	Determinación de la actividad antioxidante.....	24
3.1.4.	Evaluación de la actividad antimicrobiana	25
CAPITULO IV.....		31
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		31

4.1. Conclusiones	31
4.2. Recomendaciones.....	32
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	33
ANEXOS	45
ANEXO A. Extracción de la hoja y fruto del mortiño.....	45
ANEXO B. Determinación de la capacidad antioxidante	47
ANEXO C. Actividad antimicrobiana	49
ANEXO D. Análisis de varianza y prueba Tukey de los halos de inhibición de los extractos	54
ANEXO E. Autorización del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica ..	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades patógenas y vías de transmisión.....	4
Tabla 2. Componentes nutricionales del mortiño.....	6
Tabla 3. Diferentes ensayos de tamizaje fitoquímico.	8
Tabla 4. Rendimiento de los extractos.	21
Tabla 5. Metabolitos secundarios identificados de los extractos de <i>V. floribundum</i> Kunth	23
Tabla 6. Capacidad antioxidante de las matrices vegetales.	24
Tabla 7. Halos de inhibición de los extractos de <i>V. floribundum</i> Kunth.	27
Tabla 8. Datos de las absorbancias del extracto de la hoja del mortiño.....	48
Tabla 9. Datos de las absorbancias del extracto del fruto del mortiño.....	48
Tabla 10. Datos de las absorbancias del trolox.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de compuestos fenólicos	8
Figura 2. Reacción entre DPPH y antioxidante	9
Figura 3. <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth	15
Figura 4. Actividad antimicrobiana	29
Figura 5. Porcentaje de inhibición antimicrobiana del extracto del fruto y hoja con referencia a la Vancomicina.....	30
Figura 6. Porcentaje de inhibición antimicrobiana del extracto del fruto y hoja con referencia a la Gentamicina.....	30
Figura 7. Preparación del material vegetal.....	45
Figura 8. Pesaje de las hojas, mezcla con etanol al 96%, planta en reposo y filtración .	45
Figura 9. Rotaevaporación de la hoja.....	45
Figura 10. Pesaje del fruto y elaboración de cartucho para el tubo extractor soxhlet	46
Figura 11. Extracción soxhlet del fruto.....	46
Figura 12. Resultado de la extracción con disolventes del mortíño.....	46
Figura 13. Preparación del Trolox y DPPH	47
Figura 14. Preparación de la concentración de los extractos	47
Figura 15. Preparación de la placa de 96 pocillos.....	47
Figura 16. Medición de la placa de 96 pocillos	48
Figura 17. Curva de calibración del Trolox en % de inhibición de DPPH.....	49
Figura 18. Cultivo de las cepas bacterianas en agar Mueller-Hinton	49
Figura 19. Estándar McFarland del cultivo bacteriano y preparación de cajas petri con agar MH	50
Figura 20. Inoculación de las cepas con hisopos estériles y perforación de pozos.....	50

Figura 21. Inoculación de los extractos en los pozos.....	50
Figura 22. Halos de inhibición antimicrobiano del extracto de la hoja	51
Figura 23. Halos de inhibición antimicrobiano del extracto del fruto	52
Figura 24. Vancomicina y Control negativo.....	53
Figura 25. Gentamicina y Control negativo.....	53

RESUMEN

La resistencia de bacterias multirresistentes a antibióticos es un problema de salud mundial, el cual ha generado diversas enfermedades infecciosas transmitidas por alimentos contaminados. Por tanto, la OMS impulsa la innovación e investigación de nuevas fuentes que contrarresten este problema. Por tal motivo, este proyecto de investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antioxidante de hojas y frutos de *V. floribundum* Kunth y la actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas. Primero, se obtuvo extractos etanólicos, resultando rendimientos de 11,189 y 41,163 por ciento del extracto de la hoja y fruto, respectivamente. La determinación cualitativa de metabolitos secundarios se desarrolló mediante ensayos fitoquímicos y se obtuvo metabolitos como: flavonoides y taninos en la hoja y flavonoides, taninos, fenoles y diterpenos en el fruto. La capacidad antioxidante se realizó con la técnica de DPPH, donde, se obtuvo 86,422 y 27,930 por ciento de la hoja y fruto. Finalmente, se utilizó el método de difusión en agar para evaluar la actividad antibacteriana. Los halos de inhibición en el extracto de la hoja fueron: *L. monocytogenes* (20,667 mm), *S. aureus* (17,833 mm), *B. cereus* (18,500 mm) y *E. coli* (13,667 mm) y en el extracto del fruto: *L. monocytogenes* (14,000 mm), *S. aureus* (11,667 mm), *B. cereus* (11,500 mm) y *E. coli* (9,833 mm). El mejor porcentaje de inhibición fue de *S. aureus* con 89 y 38,4 por ciento de la hoja y fruto con Vancomicina y con Gentamicina *L. monocytogenes* obtuvo 68,3 y 35 por ciento del extracto de la hoja y fruto.

Palabras clave: Extractos vegetales, *Vaccinium floribundum* Kunth, actividad antioxidante, actividad antimicrobiana, metabolitos secundarios, bacterias patógenas, plantas medicinales

ABSTRACT

The resistance of multiresistant bacteria to antibiotics is a global health problem, which has generated various infectious diseases transmitted by contaminated food. Therefore, the WHO promotes innovation and research of new sources that counteract this problem. For this reason, this research project aimed to evaluate the antioxidant activity of leaves and fruits of *V. floribundum* Kunth and the antimicrobial activity against pathogenic bacteria. First, ethanolic extracts were obtained, resulting in yields of 11,189 and 41,163 percent of leaf and fruit extract, respectively. The qualitative determination of secondary metabolites was developed through phytochemical assays and metabolites were obtained such as: flavonoids and tannins in the leaf and flavonoids, tannins, phenols and diterpenes in the fruit. The antioxidant capacity with the DPPH technique was performed, where 86,422 and 27,930 percent of the leaf and fruit were obtained. Finally, the agar diffusion method was used to evaluate the antimicrobial activity. The inhibition halos in the leaf extract were: *L. monocytogenes* (20,667 mm), *S. aureus* (17,833 mm), *B. cereus* (18,500 mm) and *E. coli* (13,667 mm) and in the fruit extract: *L. monocytogenes* (14,000 mm), *S. aureus* (11,667 mm), *B. cereus* (11,500 mm) and *E. coli* (9,833 mm). The best percentage of inhibition was of *S. aureus* with 89 and 38,4 percent of the leaf and fruit with Vancomycin and with Gentamicin *L. monocytogenes* obtained 68,3 and 35 percent of the extract of the leaf and fruit.

Key words: Vegetables extracts, *Vaccinium floribundum* Kunth, antioxidant activity, antimicrobial activity, secondary metabolites, pathogenic bacteria, medicinal plants.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

1.1.1. Usos ancestrales de plantas medicinales

Desde la antigüedad, las plantas medicinales han sido utilizadas de generación en generación por el hombre como medicina terapéutica para aliviar dolencias y curar algunas enfermedades (**Gallegos & Gallegos, 2017**), lo que, lo ha convertido en la primera alternativa para tratar problemas de salud en casi todas las culturas del mundo y zonas rurales del Ecuador (**Jiménez et al., 2021**). Ecuador, es considerado uno de los países megadiversos en plantas, ya que, se reportan 18,198 especies de plantas vasculares en el país, de las cuales 17,748 y 4,500 son nativas y endémicas, representando el 7,6% de esta vegetación a nivel mundial con diversas propiedades benéficas (**MAE, 2016**).

El uso de la medicina tradicional por su fácil disponibilidad y nivel de toxicidad reducido en comparación con productos sintéticos (**Gallegos, 2016**), en los últimos años ha recibido un interés gradual por el ser humano, debido a que, existe una preocupación por los medicamentos sintéticos (**Maldonado et al., 2020**). Por lo que, alrededor del 80% de la población a nivel mundial depende de este tipo de tratamiento tradicional (**OMS, 2013**).

1.1.2. Importancia de las plantas en la medicina

En la Estrategia de la OMS de medicina tradicional descrita en el año 2002 – 2005, declara la importancia de las plantas medicinales en la prevención y tratamientos de distintas enfermedades (**OMS, 2002**), así como, en la importancia económica inferior por ser una fuente de investigación de nuevos fármacos (**Bendezú et al., 2015**). Es así que, las plantas presentan relevantes aplicaciones en la medicina moderna, por ejemplo: proveedor de materia prima en la elaboración de fármacos semisintéticos, es fuente de agentes terapéuticos, sus principios activos pueden actuar como marcadores taxonómicos para la investigación de nuevos medicamentos y la estructura química es aprovechada como modelo para la fabricación de productos sintéticos (**Rivas et al., 2016**).

Aún con estas aportaciones, solo 26,000 especies vegetales tienen evidencias científicas que aseguren que sean medicinales de 390,000 especies identificadas en el mundo (Cordoba et al., 2021). Lo que, despierta el interés en los efectos que producen las plantas en la salud y la combinación en los sistemas de salud, catalogándolo como medicina complementaria (Lima et al., 2019).

1.1.3. Plantas con actividad antimicrobiana en Ecuador

En los últimos años, las actividades biológicas de varias especies vegetales han demostrado ser importantes en diferentes estudios del mundo, por su posible efecto antimicrobiano frente a bacterias patógenas (Zamora & Toro, 2021). Donde, Ecuador ha destacado algunos estudios en el uso de plantas como potencial antimicrobiano. Por ejemplo: el estudio antimicrobiano de 12 plantas medicinales del Ecuador de Azuero et al., (2016), el cual determina que de los 12 extractos metanólicos realizados, el Diente de León (*Taraxacum officinale* W.) y Guaviduca (*Piper carpunya*), mostraron un efecto bactericida alto frente a *E. coli*, mientras que, el extracto de Cendrón (*Lippia citriodora* K) y Guaviduca (*Piper carpunya*) no expresó sensibilidad contra *S. aureus*.

En otro estudio, se demostró que los extractos etanólicos de Sangre de drago (*Croton lechleri*) y Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labil) inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 (Núñez, 2019).

1.1.4. Bacterias patógenas

La mayoría de las bacterias son útiles e inofensivas para el cuerpo humano, no obstante, existen una pequeña cantidad de bacterias patógenas que provocan enfermedades infecciosas (Panayidou et al., 2014). Las bacterias patógenas poseen ciertas características como: fácil adherencia a su hospedador, son persistentes, invaden tejidos y células, capaces de subsistir o evitar el sistema inmunitario innato o adaptativo del huésped, alta toxigenicidad y transmisibilidad (Carrol et al., 2016). A continuación, se describen algunas de las generalidades de cuatro patógenos:

1.1.4.1. *Bacillus cereus*

Bacilo Gram positivo (1 - 1,2 µm), formador de esporas, anaerobio facultativo y móviles gracias a la presencia de flagelos peritricos. Sus condiciones óptimas de crecimiento son: pH de 4,9 – 9,3, temperatura entre 4°C a 48°C y sobrevive hasta 7% de concentración salina. Considerado patógeno, productor de toxinas infecciosas que afecta negativamente la salud (Cortés et al., 2017).

1.1.4.2. *Staphylococcus aureus*

Microorganismo Gram positivo (0,5 - 1,5 micras), es anaerobio facultativo, no esporulado e inmóvil. Estafilococo productor de catalasa y coagulasa, crecen a concentraciones altas de sal de 7,5%, resisten a la desecación y a temperaturas óptimas de 30°C - 40°C. Estas bacterias consideradas patógenas son capaces de ocasionar padecimientos de amplio espectro (Cervantes et al., 2014; Zendejas et al., 2014).

1.1.4.3. *Escherichia coli*

Bacilo mesófilo Gram negativo, anaerobio facultativo, no formador de esporas y por sus flagelos son móviles. La temperatura de crecimiento óptimo es de 35°C – 43°C, pH óptimo de 7,2 y actividad de agua de 0,99. Microorganismo más estudiado, sin embargo, por su ubicuidad ha favorecido la manifestación de nuevas cepas con propiedades patógenas que son difíciles de reconocer (Canet, 2016).

1.1.4.4. *Listeria monocytogenes*

Bacilo Gram positivo, no formador de esporas y considerado patógeno facultativo para humanos y animales. Microorganismo que crece y sobrevive a ambientes ácidos (pH: 4,4), temperaturas de 1°C hasta 45°C y concentraciones salinas hasta el 14%; para esta bacteria patógena su ambiente perfecto son los alimentos en congelación (Soto et al., 2016).

1.1.5. Patologías asociadas

Los patógenos bacterianos provocan enfermedades a través de diversas maneras, la más común es realizar un daño directo a las células o tejidos en la replicación, mediante la creación de toxinas bacterianas, lo que genera que la bacteria patógena llegue a nuevos

tejidos. Asimismo, estos patógenos se benefician de la respuesta inmunitaria del huésped para propagarse y elevar su transmisión al hospedador no infectado (**Balloux & van Dorp, 2017**). Bacterias que han generado enfermedades infecciosas con niveles considerables de morbilidad y mortalidad, afectado a países de bajos ingresos hasta países desarrollados sin excepción (**González et al., 2019**).

Tabla 1. Enfermedades patógenas y vías de transmisión.

Patógenos	Enfermedad	Vía de transmisión
<i>Escherichia coli</i>	Infecciones urinarias	Oral - fecal
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriosis	Alimentos
<i>Bacillus cereus</i>	Toxiinfección alimentaria	Contacto, alimentos, nosocomial, endógena
<i>Staphylococcus aureus</i>	Infecciones cutáneas	Contacto, alimentos, nosocomial, endógena

Fuente: (García et al., 2010).

1.1.6. Tratamientos

Las infecciones y la resistencia bacteriana patógena se pueden evitar a través de vacunas, pero para muchos de ellos no existe una vacuna como prevención (**Cárdenas et al., 2018**). Por ello, comúnmente se han utilizado antibióticos que contienen amoxicilina, ciprofloxacina y doxicilina (**Valnissen, 2020**). Estos agentes antimicrobianos poseen mecanismos de acción que impiden, retrasan o destruyen el crecimiento de las bacterias en el huésped. Mismos que, deben ser eficaces, seguros y específicos para cada bacteria identificada (**OPS, 2019**). Según **Manandhar et al., (2019)**, recalca que el uso de plantas medicinales sería una extraordinaria fuente de nuevos fármacos para lidiar con estas enfermedades infecciosas.

1.1.7. Resistencia a antibióticos

El uso excesivo e inadecuado de antibióticos ha generado resistencia a fármacos en diversos microorganismos patógenos (**Zilberberg et al., 2014**), lo que resulta que algunos medicamentos actualmente sean considerados ineficaces (**Baym et al., 2016**). La

resistencia antimicrobiana según **Vaou et al., (2021)**, se debe a los mismos genes de resistencia y a mecanismos de resistencia como: la alteración estructural de porinas, inactivación enzimática, destrucción de agentes antibacterianos y otros (**Khameneh et al., 2019**). Problema de salud mundial por la aparición de distintas enfermedades infecciosas (**Faye et al., 2021**). Por lo que, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha generado una lista de bacterias multirresistentes con prioridad crítica, elevada y media. Por ejemplo: *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (elevada), *Pseudomonas aeruginosa* resistente a los carbapenémicos (crítica), *Streptococcus pneumoniae* resistente a la ampicilina (media), entre otros (**OMS, 2021**).

1.1.8. Tasa de infecciones bacterianas

La Organización Mundial de la Salud (OMS), menciona que 1 de cada 10 personas contrae una enfermedad transmitida por alimentos contaminados, lo que resulta que cada año 420,000 habitantes mueran. Siendo, los más vulnerables los niños de 5 años que mueren alrededor de 125,000 al año por esta causa, seguido de mujeres embarazadas y adultos, situación que ocurre a nivel mundial (**OMS, 2018**).

1.1.9. *Vaccinium floribundum* Kunth

1.1.9.1. Taxonomía

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Ericales

Familia: Ericaceae

Género: *Vaccinium*

Especie: *Vaccinium floribundum* Kunth

(**Jácome, 2014**).

1.1.9.2. Descripción botánica

El mortiño es un arbusto ramificado de 1,5 metros de altura, las hojas son de forma lanceolada y borde aserrado de 2 cm de largo. Las flores se encuentran en grupos, miden 8 mm de largo. El fruto es color negro - azul, carnoso, forma redonda y mide aproximadamente 8 mm (Tipán, 2015). El género *Vaccinium* presenta alrededor de 450 especies, las más común en Ecuador es *V. floribundum* conocida vulgarmente como arándanos, mortiño, uva de los Andes, uva del monte, etc. (De la Cruz, 2011).

1.1.9.3. Composición nutricional

El mortiño es considera una superfruta por ser rico en vitaminas y fibra, ser libre de grasas, sodio y colesterol, lo que lo ha caracterizado una fuente potencial con diversos componentes nutricionales y propiedades antioxidantes que son útiles para la salud (Mayorga, 2012).

Tabla 2. Componentes nutricionales del mortiño.

Componentes	Cantidad (g/100 g)
Agua	83,2
Carbohidratos	15,3
Fibra	1,5
Proteínas	0,7
Grasas	0,5
Pectinas	0,5
Sacarosa	0,24
Glucosa	3,92
Fructosa	4,04
Azúcares totales	10 - 14
Vitamina A (U.I.)	100
Sólidos solubles	10,1 – 14,2
Ácido ascórbico (mg/100g)	14

Fuente: (Mayorga, 2012).

1.1.9.4. Distribución del mortiño en el Ecuador

V. floribundum se localiza en los páramos andinos del Ecuador, en la Cordillera Andina, parte de la Sierra ecuatoriana aproximadamente a 3,000 – 3,700 metros sobre el nivel del mar, en las provincias de Loja, Cañar, Carchi, Cotopaxi, Bolívar, Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Chimborazo y Azuay (Coba et al., 2012).

1.1.9.5. Usos del mortiño

Principalmente en Ecuador se ha usado el mortiño con fines gastronómicos, como: en la preparación de la colada morada, vinos, mermeladas, harinas, helados, jugos, jaleas, etc. y, además, lo usan para tinturar sus prendas (Coba et al., 2012). También, en el uso medicinal tradicional por parte de los habitantes rurales para tratar personas con fiebre, infecciones urinarias, reumatismo, gripe, dolencias pulmonares, cólicos y problemas renales y uso ornamental (Llvisaca et al., 2022).

1.1.9.6. Valor antioxidante

El género *Vaccinium* spp. ha sido el interés de varios estudios alrededor del mundo, debido a que es una fuente potencial antioxidante por la presencia de antocianinas y fenoles totales (Gaviria et al., 2015). De acuerdo, al estudio de Vasco et al., (2009), la capacidad antioxidante de las bayas de mortiño del Ecuador presentan 1,203 TEAC (mg Trolox/100 g FW); nivel de actividad antioxidante que podría retrasar o prevenir la oxidación de moléculas, convirtiéndose en una oportunidad en el uso de productos farmacéuticos (Luna, 2015). Por lo que, Vega et al., (2020), sugiere que las bayas por sus propiedades antioxidantes servirían en actividades antibacteriales, actuarían como nutracéutico, reducir el azúcar y otros, potencial para las industrias farmacológicas y alimenticias.

1.1.9.7. Compuestos fenólicos

Las bayas del género *Vaccinium* spp. de la familia Ericaceae se caracterizan por contener compuestos fenólicos que generalmente se encuentran a altas concentraciones, por ejemplo: proantocianidinas, antocianinas, ácido gálico, elagitaninos, flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y glucósidos de flavanol (Vasco et al., 2009). Otros compuestos fenólicos como la quercetina-3-O-galactósido, quercetina-3-O-glucósido, quercetina-3-

O-galactósido, quercetina-3-O-glucurónido, quercetina-3-O-xilósido, quercetina-3-O-arabinopiranosido, quercetina-3-O-arabinofuranosido, quercetina-3-O-ramnósido, ácido neoclorogénico, ácido clorogénico, ácido cafeico, mirecitrina,, etc. (Prencipe et al., 2014).

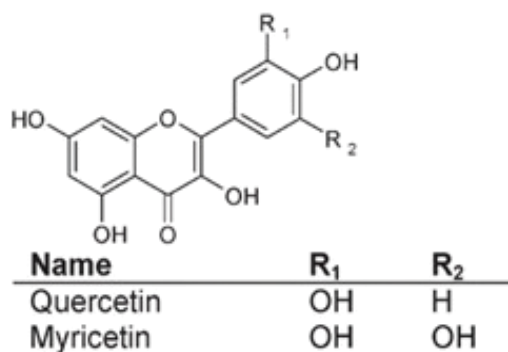


Figura 1. Estructura de compuestos fenólicos.

Tomado de (Vasco et al., 2009)

1.1.10. Tamizaje fitoquímico

Esta prueba cualitativa convencional actualmente sigue siendo utilizada para ensayos preliminares en la evaluación fitoquímica de material vegetal, el cual, permite la identificación cualitativa de metabolitos secundarios de la planta en estudio (Shaikh & Patil, 2020).

Tabla 3. Diferentes ensayos de tamizaje fitoquímico.

Ensayo	Metabolito
Dragendorff	Alcaloides
Espuma	Saponinas
Shinoda	Flavonoides
Cloruro férrico	Fenoles
Gelatina	Taninos
Borntrager	Quinonas
Acetato de cobre	Diterpenos

Fuente: (Shaikh & Patil, 2020).

1.1.11. Capacidad antioxidante

Los antioxidantes tienen la capacidad de retardar o inhibir la oxidación provocados por la influencia del oxígeno molecular, a través de la reacción con los radicales libres de otras moléculas. Existen diversos ensayos de antioxidantes basados en la transferencia de electrones (TE) y transferencia de átomos de hidrógeno (TAH) (Xiao et al., 2020). Actualmente, para medir la capacidad antioxidante, el más común son las pruebas antioxidantes *in vitro*, que son captadores de radicales libres y son fáciles de emplearlo, entre ellos el método DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) (Mendoza et al., 2020).

1.1.11.1. Método DPPH

Los radicales libres 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo son de color púrpura intenso y posee radicales nitrogenados de larga duración, esto gracias a que no sufre dimerización. Al mezclar la solución de DPPH con un átomo antioxidante, esta muestra su forma reducida mediante el cambio de color a amarillo; se pueden evaluar mediante la disminución de las absorbancias a 517 nm y se expresa en % de inhibición del DPPH o IC₅₀. Este ensayo es fácil, rápido y eficaz para la evaluación de actividad antioxidante (Gulcin, 2020).

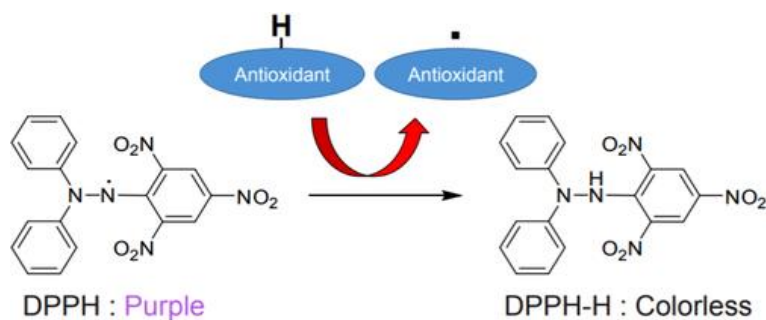


Figura 2. Reacción entre DPPH y antioxidante.

Tomado de (Xiao et al., 2020)

1.1.12. Extracción con solventes

La extracción por solventes es uno de los métodos de extracción más utilizados. La eficiencia de extracción por solventes se verá afectada por factores como: el tipo de solvente de extracción, tamaño de partícula de las muestras, temperatura, duración de extracción y proporción del solvente/sólido (Zhang et al., 2018).

1.1.12.1. Extracción soxhlet

Método con alta eficacia de extracción que requiere de un solvente fresco, el cual tendrá un flujo continuo sobre la muestra, proceso que se repetirá hasta conseguir la extracción total. Esta operación brinda algunas ventajas en comparación con otros métodos de extracción como: al estar el solvente en flujo constante sobre la muestra mejora el desplazamiento del equilibrio de transferencia que beneficia la extracción de los compuestos de interés, temperatura continua sobre la muestra y no necesita filtración. Sin embargo, al requerir períodos largos de tiempo usará grandes cantidades de solvente (**Garcia et al., 2020**).

1.1.12.2. Extracción por maceración

Método de extracción que alcanza extracciones con alto valor de compuestos al sumergir la muestra vegetal en un disolvente orgánico a temperatura ambiente. Para elevar la tasa de extracción de los compuestos fitoquímicos en el material vegetal se debe agitar por períodos y al término de la extracción se separa la muestra del solvente por filtración. La desventaja de este método es que el proceso puede tomar días de trabajo en la extracción, tiempo de filtrado y cantidad de solvente utilizado, pero es ventajoso para aquellos componentes frágiles al calor (**Harbourne et al., 2013**).

1.1.13. Método de difusión en agar

Existen diferentes métodos de difusión, entre ellos: el método de difusión en pozos de agar que es utilizado para evaluar la actividad antimicrobiana de plantas. Proceso que en toda la superficie del agar se inocula una suspensión bacteriana a escala McFarland (0.5), luego, con una punta o sacacorchos estéril se perfora en el agar un agujero de aproximadamente de 6 a 8 mm de diámetro, y se introduce un volumen de la solución del extracto o agente antimicrobiano en estudio de 20 – 100 μL a las concentraciones deseadas en el pozo. Finalmente, la placa de agar se incuba a las condiciones adecuadas según la bacteria de prueba y si, la solución del extracto en prueba tiene propiedades antimicrobianas inhibirá el crecimiento de la cepa bacteriana al observar halos alrededor del pozo (**Balouiri et al., 2016**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Evaluar la actividad antioxidante de hojas y frutos del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) y la actividad antimicrobiana frente a las bacterias patógenas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*).

1.2.2. Objetivos Específicos

- Obtener el extracto de las hojas y frutos del mortiño mediante el método de extracción con disolventes.
- Determinar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en el extracto mediante pruebas de tamizaje fitoquímico.
- Analizar la capacidad antioxidante de los extractos de hojas y frutos del mortiño mediante la técnica de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos utilizando bacterias patógenas por el método de difusión en agar.

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Material vegetal

- Hoja de mortiño
- Fruto de mortiño

2.1.2. Material microbiano

Cepas bacterianas de:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 12600
- *Listeria monocytogenes* ATCC 19115
- *Bacillus cereus* ATCC 10876
- *Escherichia coli* ATCC 11775

2.1.3. Material de laboratorio

- Botellas de frasco azul (250, 500 y 1000 ml)
- Probetas (10, 50 y 100 ml)
- Embudos de vidrio
- Tubos Falcon (15 y 50 ml)
- Tubos eppendorf
- Tubos de ensayo con tapa rosca
- Vasos de precipitación (100, 250 y 500 ml)
- Asas de inoculación

- Mechero Bunsen
- Balones de aforo (100 ml)
- Micropipeta de 100 - 1000 μ l
- Micropipeta de 20 - 200 μ l
- Agitadores Magnéticos
- Pinzas
- Gradilla
- Cajas Petri
- Placa de 96 pocillos
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Hisopos estériles

2.1.4. Reactivos

- Hipoclorito de sodio (5%)
- Etanol (96%)
- Metanol (99,8%)
- Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico)
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo)
- Agar Mueller - Hinton
- Caldo Mueller - Hinton
- Agua Destilada

- Gentamicina
- Vancomicina
- Cloruro de bario (1%)
- Ácido sulfúrico (1%)
- Reactivo Dragendorff
- Ácido clorhídrico concentrado
- Cinta de magnesio metálico
- Cloroformo
- Hidróxido de sodio (5%)
- Tricloruro férrico (5%)
- Alcohol amílico
- Acetato de cobre
- Solución gelatina (1%)

2.1.5. Equipos de laboratorio

- Rotavapor
- Balanza analítica
- Espectrofotómetro
- Incubadora
- Refrigerador
- Vortex
- Autoclave

- Plancha de Agitación
- Equipo soxhlet
- Cámara de flujo laminar
- Estufa

2.2. Métodos

2.2.1. Recolección del material vegetal

La planta del mortiño se recolectó en la Comunidad Santa Rosa de Totoras del cantón San Miguel de la provincia de Bolívar, una vez autorizada la recolección por el Ministerio del Ambiente y Agua (ANEXO E). El material vegetal fue trasladado y almacenado en los laboratorios de la Unidad Operativa de la Dirección de Investigación y Desarrollo (UODIDE) de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.



Figura 3. *Vaccinium floribundum* Kunth.
(Comunidad de Santa Rosa de Totoras, Bolívar)

2.2.2. Preparación del material vegetal

Las hojas y frutos del mortiño en buen estado, se desinfectaron con una mezcla de hipoclorito de sodio al 5% (20 ml) y agua destilada (100 ml) por 5 minutos, después se enjuagó con abundante agua. Para el secado se utilizó una estufa a 50° C durante 4 días hasta que se encuentre completamente seco y con una licuadora se trituraron las hojas y frutos secos hasta obtener un pulverizado y se almacenaron en bolsas ziploc.

2.2.3. Obtención de los extractos vegetales

2.2.3.1. Extracción hidroalcohólica de la hoja

Para la extracción de las hojas se implementó el método descrito por **Abirami et al., (2012)** con ciertas modificaciones. Se pesó 100 g de la muestra triturada y se mezcló con 500 ml de etanol al 96% durante 48 h con períodos cortos de agitación, a temperatura ambiente y fuera del alcance de la luz. Se recogió el extracto líquido y nuevamente se extrajo por 24 h. Finalmente, el extracto se filtró con papel filtro y para separar el disolvente del extracto se evaporó utilizando un rotavapor. Los residuos del extracto de la hoja se almacenaron a 4°C hasta su posterior análisis.

2.2.3.2. Extracción soxhlet del fruto

Una vez montado un esquema de extracción soxhlet, se inició con el proceso de extracción a partir de 25 g de la muestra triturada del fruto, el cual se añadió en un cartucho de papel filtro y se colocó en el interior del tubo extractor. Posteriormente, se añadió 500 ml de etanol (96%) en el balón y se empezó a calentar controlando la temperatura, hasta que recircule lo suficientemente el disolvente por la muestra, es decir, hasta que el solvente se encuentre claro. Por último, se evaporó con un rotavapor y los residuos del extracto del fruto se almacenaron a 4°C hasta su posterior análisis (**Herrera & Rodríguez, 2016**).

2.2.3.3. Cálculo del porcentaje de rendimiento

Para determinar el rendimiento del extracto de la hoja y fruto de *V. floribundum* Kunth se calculó con la ecuación 1, mencionada por **Gonelimali et al., (2018)**:

$$\%Rendimiento = \frac{X_1}{X_0} * 100$$

Ecuación 1. Porcentaje de rendimiento.

Donde:

X₁: Peso del extracto después de la evaporación del solvente

X₀: Peso seco del polvo vegetal antes de la extracción

2.2.4. Análisis de Tamizaje fitoquímico

Para el análisis cualitativo de metabolitos secundarios de los extractos de la hoja y fruto del mortiño se siguió la metodología de **Pujol et al., (2020)** y **Abubakar & Haque, (2020)**, que se detallan a continuación:

2.2.4.1. Ensayo de Dragendorff

En un tubo de ensayo se colocó 1 ml del extracto y 1 ml del reactivo de Dragendorff (solución de yoduro de bismuto y potasio) y se homogenizó. La aparición de un precipitado rojo anaranjado resulta positiva la prueba para alcaloides.

2.2.4.2. Ensayo de Espuma

Con 1 ml del extracto se diluyó en agua destilada por 5 veces en un tubo de ensayo y se agitó fuertemente por 5 minutos, la formación de aproximadamente 2 mm espuma muestra la presencia de saponinas.

2.2.4.3. Ensayo de Shinoda

Se colocó 1 ml del extracto y 1 ml ácido clorhídrico concentrado y trocitos de cinta de magnesio metálico en un tubo de ensayo. Se mantuvo en reposo por 5 minutos y se añadió 1 ml de alcohol amílico, el cambio de coloración de la solución a amarillo o rojo intenso indica la prueba positiva para flavonoides.

2.2.4.4. Ensayo de Cloruro férrico

En un tubo de ensayo se colocaron 1 ml del extracto, se añadieron 3 gotas de tricloruro férrico al 5% y se agitó. La coloración de la reacción negro azulado indica la presencia de fenoles.

2.2.4.5. Ensayo de Gelatina

Se añadió 1 ml del extracto y una solución de gelatina al 1% en un tubo de ensayo. Luego, se agitó y se formó un precipitado blanco, lo que indica la presencia de taninos.

2.2.4.6. Ensayo de Borntrager

Se disolvió en 1 ml de cloroformo al extracto, luego, se colocó 1 ml de hidróxido de sodio al 5%, se agitó hasta mezclar las fases y se dejó reposar hasta su visible separación. Si la coloración es rojo o rosado de la fase alcalina acuosa la prueba es positiva para quinonas.

2.2.4.7. Ensayo de Acetato de cobre

Se disolvió al extracto en agua destilada y se añadieron 3 gotas de acetato de cobre. Al tornarse la solución verde esmeralda resulta positivo para diterpenos.

2.2.5. Capacidad Antioxidante

Para la determinación de la actividad antioxidante se realizó la metodología de captación de radicales libres de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) en microplaca de 96 pocillos descrita por **Bobo et al., (2015)** con algunas modificaciones.

2.2.5.1. Preparación del reactivo DPPH y Trolox

Se preparó una solución madre de DPPH de concentración 150 μM , en donde, se disolvieron 0,0059 g de DPPH en 100 ml de una solución metanol-agua (80:20). Luego, a la solución se cubrió de la luz y se agitó por alrededor de 30 a 40 min. Por otra parte, se utilizó como estándar una solución madre de Trolox a 500 μM para generar una curva de calibración. Se pesó 0,0125 g de Trolox, el cual se disolvió en 100 ml de una solución metanol-agua (50:50) y se agitó. A partir de la solución madre del Trolox se prepararon diluciones a diferentes concentraciones de 50, 100, 200, 300, 400 y 500 μM .

2.2.5.1. Medición de la actividad antioxidante

En una placa de 96 pocillos se añadió el blanco, control y el extracto en estudio, los cuales se prepararon de la siguiente manera:

Blanco: 180 μl del diluyente DPPH (metanol-agua, 80:20) + 20 μl agua destilada

Control: 180 μl de la solución DPPH + 20 μl agua destilada

Extracto: 180 μl de la solución DPPH + 20 μl extracto diluido

Una vez preparada la placa se agitó y se cubrió con papel aluminio. Posteriormente, se dejó reposar por 40 minutos a temperatura ambiente en un lugar oscuro. Finalmente, se midió la absorbancia a 515 nm con un espectrofotómetro. Se realizó 4 réplicas.

2.2.5.2. Determinación del porcentaje de inhibición de DPPH

El porcentaje de inhibición de DPPH se calculó con la ecuación 2.

$$\% \text{ Inhibición DPPH} = \left[1 - \left(\frac{A_m - A_b}{A_c - A_b} \right) \right] \times 100$$

Ecuación 2. Porcentaje de inhibición de DPPH.

Donde:

A_m: absorbancia de la muestra

A_b: absorbancia del blanco

A_c: absorbancia del control

2.2.6. Actividad Antimicrobiana por difusión en agar

2.2.6.1. Activación y estandarización de las cepas bacterianas

Para la activación y estandarización McFarland de las cepas bacterianas se siguió el método descrito por **Prat, (2005)** basado en la estandarización de difusión en agar por la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), con modificaciones. Se utilizaron cepas certificadas Gram positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 y *Bacillus cereus* ATCC 10876 y Gram negativas: *Escherichia coli* ATCC 11775. Se activaron las bacterias en 5 ml de caldo Mueller - Hinton (MHB) y se incubaron a 37°C a 200 rpm de agitación durante 24 horas. Posteriormente, para ajustar la turbidez resultante del cultivo bacteriano se disolvió con MHB a fin de llegar a la turbidez estándar de 0,5 McFarland (BaCl₂ 1% y H₂SO₄ 1%). Para verificar que los cultivos bacterianos se encuentren en escala McFarland se leyó las absorbancias a 540 nm.

2.2.6.2. Difusión en pozos de agar

El cultivo bacteriano estandarizado se inoculó por toda la superficie de la caja Petri con agar Mueller-Hinton (MHA) con la ayuda de hisopos estériles. Luego, se realizaron cuatro pozos de 7 mm de diámetro en la superficie del MHA con la parte superior de una punta azul estéril y se añadieron a cada pozo 100 µl del extracto de la hoja y fruto a concentraciones de 1, 10, 25, 50, 100 mg/ml y 500 µg/ml, control positivo (gentamicina y vancomicina) y control negativo (agua destilada estéril). Se incubó a 37°C por 24 horas (Osés et al., 2016). Se midió la zona de inhibición en mm y se calculó el porcentaje de inhibición antimicrobiana con la ecuación 3 descrita por Corzo, (2012). Se realizó 6 réplicas por cada concentración.

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{\emptyset HE - \emptyset HB}{\emptyset HC - \emptyset HB} \right) \times 100$$

Ecuación 3. Porcentaje de inhibición antimicrobiana.

Donde:

∅ HE: Diámetro del halo extracto

∅ HB: Diámetro del halo blanco

∅ HC: Diámetro del halo control positivo

2.3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados de la actividad antimicrobiana se utilizó un análisis de varianza ANOVA y una prueba de comparación Tukey con un nivel de confianza del 95% mediante el programa estadístico STATGRAPHICS.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Rendimiento de los extractos

La obtención de los extractos de la hoja y fruto de *V. floribundum* Kunth se llevó a cabo mediante una extracción con disolventes y se calculó el rendimiento porcentual con la ecuación 1. El rendimiento de extracción de la hoja obtenido a través de una extracción hidroalcohólica fue de 11,189%, mientras que, el rendimiento del fruto por una extracción soxhlet fue de 41,163%, como se ilustra en la tabla 4. Siendo, el extracto del fruto el que mayor rendimiento presenta. Según **Soto & Rosales, (2016)**, el rendimiento de una extracción depende en su mayoría de la polaridad del disolvente, de la composición química de los componentes a extraer, el tamaño molecular y de factores como la temperatura, tamaño de partícula, tiempo de contacto con el disolvente, relación solvente/masa y la concentración del disolvente.

Tabla 4. Rendimiento de los extractos.

Extracción	Matriz vegetal	Rendimiento (%)
Macerado	Hoja	11,189 ± 0,007
Soxhlet	Fruto	41,163 ± 0,032

De acuerdo a **García et al., (2010)**, estos extractos vegetales son una mezcla amplia de metabolitos secundarios, que en gran medida posee carbohidratos, cetonas, alcoholes, aldehídos, proteínas, etc. mismos que, son los responsables de las magníficas propiedades biológicas de aquellas plantas medicinales y aromáticas. En particular, la baya fresca del mortiño (*V. floribundum* Kunth) presenta los siguientes componentes químicos detallados

en un análisis proximal realizado en el estudio de **Coba et al., (2012) & Tupuna et al., (2016)**: proteínas 0,76%, fibra dietética total 5,87%, cenizas 0,34%, vitamina C 1,27%, agua 80%, carbohidratos totales 16,9%, grasa 0,1%, minerales (Ca, K, Mg), azúcares (fructuosa y glucosa), entre otros. Por otro lado, se ha descubierto que el extracto de la hoja (*V. corymbosum*) poseen componentes como flavonoides (3,03%), taninos catéquicos (10%), ácidos hidróxicinámicos (2,92%), compuestos fenólicos (clorogénico y cafeico), glucósidos de quercetina y otros (**Koshovyi et al., 2021**).

3.1.2. Determinación de metabolitos secundarios

En diversas investigaciones reportan que la familia Ericaceae al cual pertenece *Vaccinium*, posee ciertos metabolitos secundarios como taninos, terpenos, esteroides, fenoles, flavonoides, cumarinas y quinonas; donde, los fenoles y flavonoides son los más representativos de esta familia. Estos metabolitos han sido de gran interés científico por sus capacidades biológicas y fisiológicas (**Plazas, 2015**). El análisis fitoquímico es una forma práctica y fácil de identificar componentes mayoritarios en una planta a través de pruebas químicas que provocan precipitados y cambio de coloración (**Rincón et al., 2014**). Del análisis de perfil fitoquímico de la especie *V. floribundum* Kunth se determinó que el extracto de la hoja y fruto mostraron algunos metabolitos secundarios.

En el caso del extracto de la hoja presentó metabolitos secundarios como las saponinas, flavonoides, taninos, fenoles y diterpenos, siendo, los flavonoides y taninos los que se presentan con una mayor intensidad (moderada) en el extracto; y con menor intensidad las saponinas, fenoles y diterpenos. Mientras que, los alcaloides y quinonas están ausentes en el extracto de la hoja, como se detalla en la tabla 5. De la misma manera, estos metabolitos secundarios fueron identificados en la investigación de **Ramirez, (2019)**, en la que se realizó una extracción por maceración con etanol al 96% de la hoja del mortiño (*V. floribundum* Kunth) procedente de los páramos de Perú, con la presencia de alcaloides y ausencia de quinonas.

Por otra parte, el extracto del fruto presentó ciertos metabolitos secundarios como los alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, fenoles y diterpenos. Los metabolitos que se presentan con mayor intensidad son los flavonoides, taninos, fenoles y diterpenos. Los

alcaloides y saponinas presentan una intensidad baja y las quinonas no fueron detectadas en este extracto. En el estudio de **Zurita, (2021)**, se reportó que el extracto etanólico del fruto de *V. meridionale* presenta alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, fenoles y quinonas.

Ambos extractos presentaron flavonoides, taninos y fenoles, según **Xavier et al., (2015)**, se debe a que el etanol consigue extraer eficientemente componentes como los taninos, flavonoles y polifenoles. Razón por la cual, es probable que el extracto de la hoja y fruto del mortiño presentan mayor cantidad de los metabolitos mencionados anteriormente, los cuales son compuestos reportados en varias investigaciones con actividad antimutágena y anticarcinógeno (**Luna & Delgado, 2014**).

Tabla 5. Metabolitos secundarios identificados de los extractos de *V. floribundum* Kunth.

Metabolitos	Ensayo	Extracción con disolventes	
		Macerado (etanol 96%)	Soxhlet (etanol 96%)
		Hoja	Fruto
Alcaloides	Dragendorff	-	+
Saponinas	Espuma	+	+
Flavonoides	Shinoda	++	++
Taninos	Gelatina	++	++
Quinonas	Borntrager	-	-
Fenoles	Cloruro Férrico	+	++
Diterpenos	Acetato de cobre	+	++

Nota. El signo (+) significa Presencia y signo (-) Ausencia; Intensidad del metabolito: (++) Moderada y (+) Baja.

3.1.3. Determinación de la actividad antioxidante

Los antioxidantes son compuestos que interactúan de forma segura con los radicales libres, terminando la reacción antes de que ocasionen daños a las moléculas vitales, es decir reducen o inhabilitan la oxidación de otras moléculas (Oroian & Escriche, 2015). Los antioxidantes han llegado a reducir la aparición de trastornos como: la diabetes, cáncer, inflamación, enfermedades hepáticas y cardiovasculares, envejecimiento y trastornos neurodegenerativos (Neha et al., 2019).

Por tanto, el consumo de vegetales y frutas ricos en antioxidantes preservan y benefician la salud. Tal es el caso del mortiño maduro que según Vasco et al., (2009), por su capacidad antioxidante se consideraría como una baya con mayor nivel de actividad antioxidante en el país. De manera que, los diferentes extractos y derivados de diferentes especies de *Vaccinium* han demostrado efectos antiinflamatorios, anticancerígenos, neurodegenerativos y cardiovasculares, debido a la presencia de altas concentraciones de flavonoides y antocianinas; además por su contenido de compuestos únicos su grado de capacidad antioxidante es alto (Tundis et al., 2021).

Es así como la determinación de la capacidad antioxidante de los extractos de la especie *V. floribundum* Kunth se llevó a cabo por la técnica de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo). En la tabla 6, se ilustra el porcentaje de inhibición de DPPH de las muestras, calculadas con la ecuación 2 y, además, se expresan en μmol Equivalente Trolox/L. Se evidencia que el resultado de la actividad antioxidante del extracto de la hoja del mortiño posee mayor capacidad antioxidante en comparación con el extracto del fruto.

Tabla 6. Capacidad antioxidante de las matrices vegetales.

Matriz vegetal	% de Inhibición	μmol Equivalente Trolox/L
Fruto	27,930 \pm 1,016	152,367 \pm 5,780
Hoja	86,422 \pm 0,275	488,344 \pm 6, 163

Los valores del % de inhibición de DPPH que se presentan en la tabla es la media de 4 repeticiones. Mientras que, los valores expresados en μmol Equivalente Trolox/L es la media de 2 repeticiones y su desviación estándar.

Generalmente, el fruto de *Vaccinium* se ha caracterizado por contener una gran cantidad de diversos componentes bioactivos con fuerte potencial antioxidante y nutricionales (Meléndez et al., 2021). El valor de la capacidad antioxidante del extracto del fruto fue de 27,930% y 152,367 μmol Equivalente Trolox/L, resultado aproximadamente similar al reportado por Masaquiza, (2018) de 29,864% del fruto microencapsulado (*V. floribundum* Kunth) y 29,96% de *V. clorisibyum* (Bunea et al., 2011), en el mismo estudio reporta porcentajes de 49,93% y 59,79% de *V. myrtillus*; también se obtienen valores de 2.204 μmol Trolox/100 g fruta fresca (*V. floribundum*) (Gaviria et al., 2015). La variabilidad de la actividad antioxidante puede verse afectada por el nivel de madurez de los frutos y hojas y la temperatura al cual se almacena el extracto (Álvarez et al., 2016).

Las hojas del género *Vaccinium* spp. en los últimos años ha sido estudiada por algunos investigadores por ser una fuente factible de productos farmacéuticos. Razón por la cual, se estudió la hoja del mortiño. Así, la capacidad antioxidante del extracto hidroalcohólico de la hoja que se obtuvo fue de 86,422% y 488,344 μmol Equivalente Trolox/L. El porcentaje de inhibición alto se puede deber a la exposición solar de la planta en altitudes altas, contribuyendo directamente el aumento de flavonoides como forma de protección a la irradiación (Rieger et al., 2008; Spitaler et al., 2008).

Los resultados que se obtuvieron son mayores a los encontrados por Ștefănescu et al., (2020), donde, la capacidad antioxidante fue de 61% y 63% de la hoja de arándano silvestre (*V. myrtillus* L.) y arándano rojo (*V. vitis-idaea* L.), respectivamente. Sin embargo, en el estudio de Pervin et al., (2013), el extracto hidroalcohólico de la hoja *V. clorisibyum* obtuvo 93,07 % a partir de 2mg/ml. Similar a los resultados reportados de la hoja de *V. vitis-idaea* L de 490,85 μM TE/g (Bujor et al., 2018).

3.1.4. Evaluación de la actividad antimicrobiana

El género *Vaccinium* spp. presenta varios compuestos polifenólicos, entre ellos, las proantocianidinas de tipo A, que especialmente son las que se encuentran directamente asociadas con esta actividad biológicas. Además de las antocianinas, glucósidos de flavonoles, taninos y flavan-3-oles son importantes por su capacidad antioxidante. Por

consiguiente, los extractos de diferentes especies de *Vaccinium* se relacionan potencialmente con tratamientos terapéuticos al ser eficaz en la inhibición de bacterias patógenas precursoras de enfermedades infecciosas en el humano (**Rico et al., 2021; Shamilov et al., 2020**).

Por tanto, se llevó a cabo la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en pozos de agar. Se presenciaron efectos inhibidores significativos de los extractos de la hoja y fruto del mortiño de la especie *V. floribundum* Kunth frente a las cuatro patógenos evaluados. En particular, la inhibición del extracto de la hoja fue superior al extracto del fruto en todas las bacterias.

Es así como, en el extracto de la hoja la mayor inhibición se visualizó a una concentración de 100 mg/ml, estableciendo halos de inhibición en *L. monocytogenes* de $20,667 \pm 1,751$, seguida de *B. cereus* con $18,500 \pm 0,548$, *S. aureus* con $17,833 \pm 0,983$ y, por último, en *E. coli* con $13,667 \pm 0,816$. De igual forma, en el extracto del fruto a la misma concentración, *L. monocytogenes* mostró mayor inhibición de $14,000 \pm 0,632$, *S. aureus* con $11,667 \pm 0,516$, *B. cereus* con $11,500 \pm 0,837$ y *E. coli* con $9,833 \pm 0,983$, como se indica en la tabla 7. Tomando en consideración que aquellos halos de inhibición (mm) ≥ 15 se considera sensibles; intermedio: 13 - 14 mm y resistente: ≤ 12 (**Cavaliere et al., 2005**), *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *B. cereus* son considerados como bacterias sensibles al extracto de la hoja, en cambio, *E. coli* se considera intermedio sobre el extracto de la hoja, mientras que, *S. aureus*, *B. cereus* y *E. coli* se consideraría resistente y *L. monocytogenes* intermedio al extracto del fruto.

El análisis de varianza ANOVA evaluado, demuestra que existen diferencias significativas entre las medias y varianza de las seis concentraciones y controles analizadas, con un nivel de confianza del 95 %. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los halos de inhibición de *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *B. cereus* a las concentraciones de 500 $\mu\text{g/ml}$, 1, 10 y 25 mg/ml; en *E. coli* de 500 $\mu\text{g/ml}$, 1 y 10 mg/ml en el extracto del fruto. Asimismo, en el extracto de la hoja no hubo diferencias significativas a las concentraciones de 500 $\mu\text{g/ml}$, 1 y 10 mg/ml en *S. aureus* y *E. coli*, mientras que, en *L. monocytogenes* y *B. cereus* a 500 $\mu\text{g/ml}$ y 1 mg/ml.

Tabla 7. Halos de inhibición de los extractos de *V. floribundum* Kunth.

Extracto	Concentración (mg/ml)	Halos de Inhibición (mm)			
		<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>
Hoja	1	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	10	0 ^a	11,000 ± 0,632 ^b	9,500 ± 1,049 ^b	0 ^a
	25	13,167 ± 0,983 ^b	11,333 ± 1,033 ^{bc}	13,000 ± 1,265 ^c	9,167 ± 0,408 ^b
	50	15,000 ± 0,894 ^c	13,000 ± 0,894 ^c	15,333 ± 1,506 ^d	9,667 ± 1,033 ^b
	100	17,833 ± 0,983 ^d	20,667 ± 1,751 ^d	18,500 ± 0,548 ^e	13,667 ± 0,816 ^c
	500 µg/ml	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	Vancomicina	19,167 ± 0,753 ^e	25,500 ± 1,049 ^e	23,333 ± 0,816 ^f	16,833 ± 1,169 ^d
	Gentamicina	24,667 ± 1,033 ^f	27,000 ± 1,549 ^e	28,167 ± 0,983 ^g	22,333 ± 1,033 ^e
	Control -	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
	Fruto	1	0 ^a	0 ^a	0 ^a
10		0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
25		0 ^a	0 ^a	0 ^a	8,667 ± 0,516 ^b
50		10,333 ± 0,516 ^b	12,500 ± 0,548 ^b	10,667 ± 0,516 ^b	9,500 ± 0,548 ^b
100		11,667 ± 0,516 ^c	14,000 ± 0,632 ^c	11,500 ± 0,837 ^b	9,833 ± 0,983 ^b
500 µg/ml		0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
Vancomicina		19,167 ± 0,753 ^d	25,500 ± 1,049 ^d	23,333 ± 0,816 ^c	16,833 ± 1,169 ^c
Gentamicina		24,667 ± 1,033 ^e	27,000 ± 1,549 ^e	28,167 ± 0,983 ^d	22,333 ± 1,033 ^d
Control -		0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Nota. Halos de inhibición promedio de 6 réplicas. Las letras demuestran una diferencia significativa de los halos de inhibición ($P \leq 0.05$).

La sensibilidad de las bacterias Gram positivas en estudio se debería a la composición de su pared celular (peptidoglucano y proteínas) que las convierte en susceptibles y filtrables a los metabolitos secundarios polares, permitiendo el paso al interior del microorganismo y provocando la muerte (**Rohde, 2019**). Del mismo modo, **Martín, (2018)**, reporta que los componentes polifenólicos de la planta se pueden adherir al ADN del microorganismo impidiendo la síntesis de proteínas y producción de componentes útiles para las bacterias, lo cual rompe la membrana celular y por ende, ocurre una apoptosis. Sin embargo, la inhibición de bacterias Gram negativas aún es un reto, ya que, su membrana externa presenta una baja permeabilidad (**Suárez et al., 2014**).

Los valores de los halos de inhibición obtenidos del extracto de la hoja son superiores al extracto vegetal del mortiño de la misma especie reportados por **Llvisaca et al., (2018)**, frente a *S. aureus* (12 mm) y *E. coli* (15 mm). No obstante, en el mismo estudio el extracto del fruto presentó halos de inhibición mayores a los reportados en la presente investigación, con halos de inhibición de 16 mm frente a *S. aureus* y 32 mm frente a *E. coli*. En la investigación de **Pervin et al., (2013)** sobre la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de la hoja del mortiño (*V. corymbosum*), se menciona el potencial inhibitorio de la hoja frente a *S. typhimurium* (23,18 mm), *E. coli* (20,59 mm) y a *S. aureus* (15,88 mm), lo cual es confirmado en otros artículos de diversas especies de *Vaccinium* frente a estas bacterias. De este modo, se confirma que el mortiño ecuatoriano (hoja y fruto) genera efectos inhibidores contra ciertos agentes patógenos.

A la concentración de 100 mg/ml tanto del extracto de la hoja como del fruto se obtuvo la mejor inhibición en comparación con las otras concentraciones, sin embargo, los dos controles positivos Vancomicina y Gentamicina tuvieron mejores halos de inhibición en todas las bacterias. En la figura 4, se observan los halos de inhibición del extracto de la hoja y del extracto del fruto frente a las cuatro bacterias patógenas.

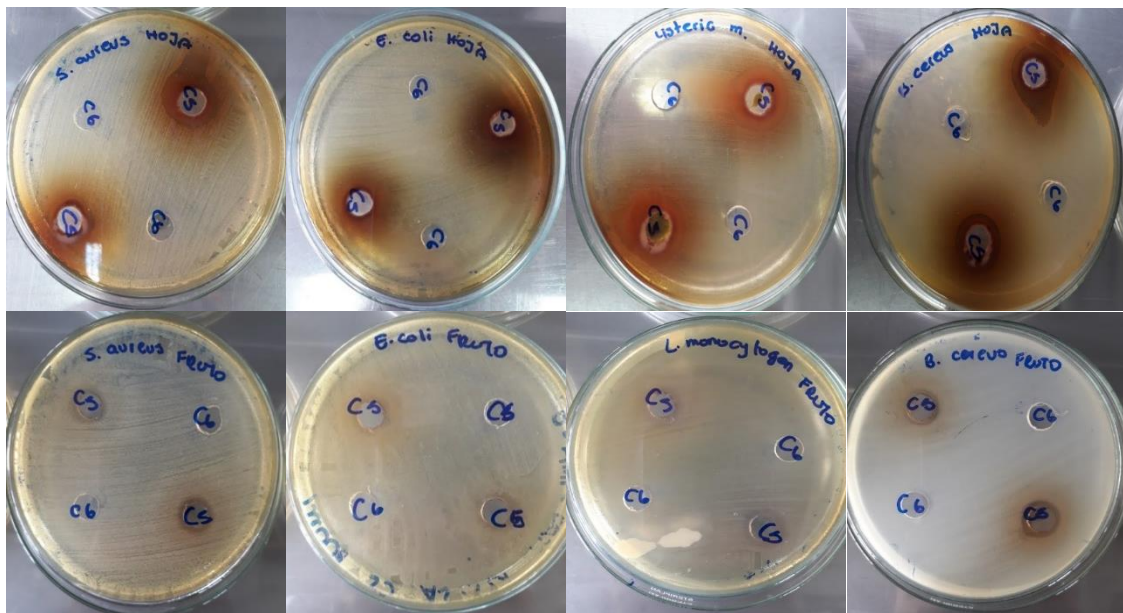


Figura 4. Actividad antimicrobiana. Fila superior: Extracto de la hoja y Fila inferior: Extracto fruto; a 100 mg/ml y 500 µg/ml frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 y *Bacillus cereus* ATCC 10876.

En la figura 5 y 6, se presenta de forma porcentual la inhibición de los extractos del fruto y hoja del mortiño calculados con la ecuación 3, tomando como referencia a los dos controles positivos. Donde, el mejor porcentaje de inhibición con referencia a la Vancomicina, se obtuvo en el extracto de la hoja a la concentración de 100 mg/ml frente a *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* y *E. coli*, los cuales inhibieron en un 89%, 73,9%, 70,4% y 67,8%, respectivamente. Mientras que, el extracto del fruto inhibió en un 38,4%, 37,8%, 27,6% y 28,8% frente a las mismas bacterias patógenas. Asimismo, el porcentaje de inhibición con referencia la Gentamicina, el extracto de la hoja obtuvo mayor inhibición contra las cuatro bacterias en comparación con los resultados del extracto del fruto, el cual presentó porcentajes bajos de 26,4%, 35%, 21,3% y 18,5% contra las bacterias (figura 6). De acuerdo a **Cruz et al., (2010)** se considera un alto porcentaje de inhibición al tener >70%, intermedio 50-70% y baja <50%. Por lo tanto, el extracto de la hoja muestra un porcentaje de inhibición más alto que el extracto del fruto, es decir, existe mayor efecto inhibitorio en la hoja del mortiño tanto en Vancomicina y Gentamicina.

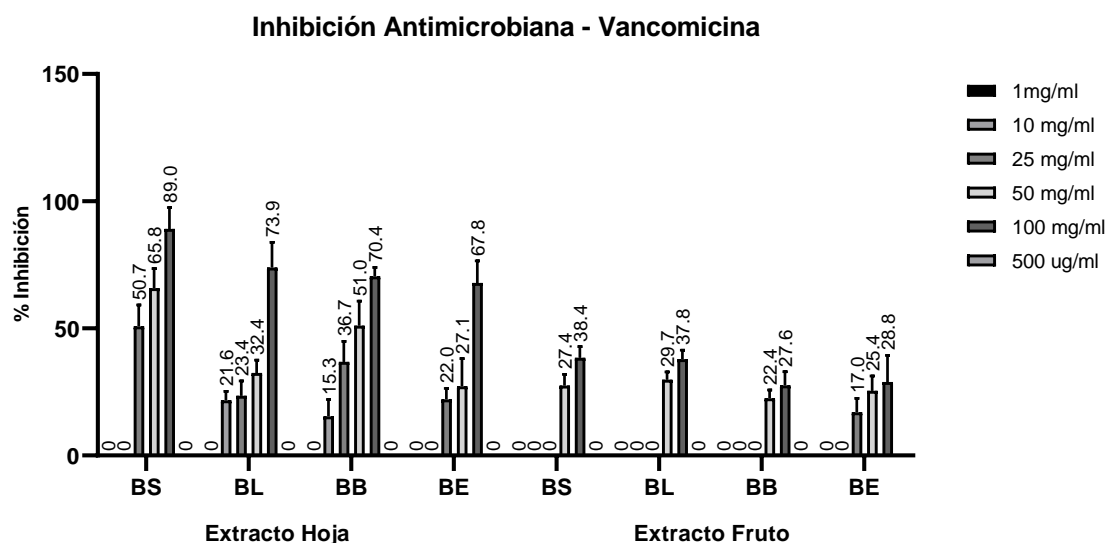


Figura 5. Porcentaje de inhibición antimicrobiana del extracto del fruto y hoja con referencia a la Vancomicina. BS: *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, BE: *Escherichia coli* ATCC 11775, BL: *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 y BB: *Bacillus cereus* ATCC 10876.

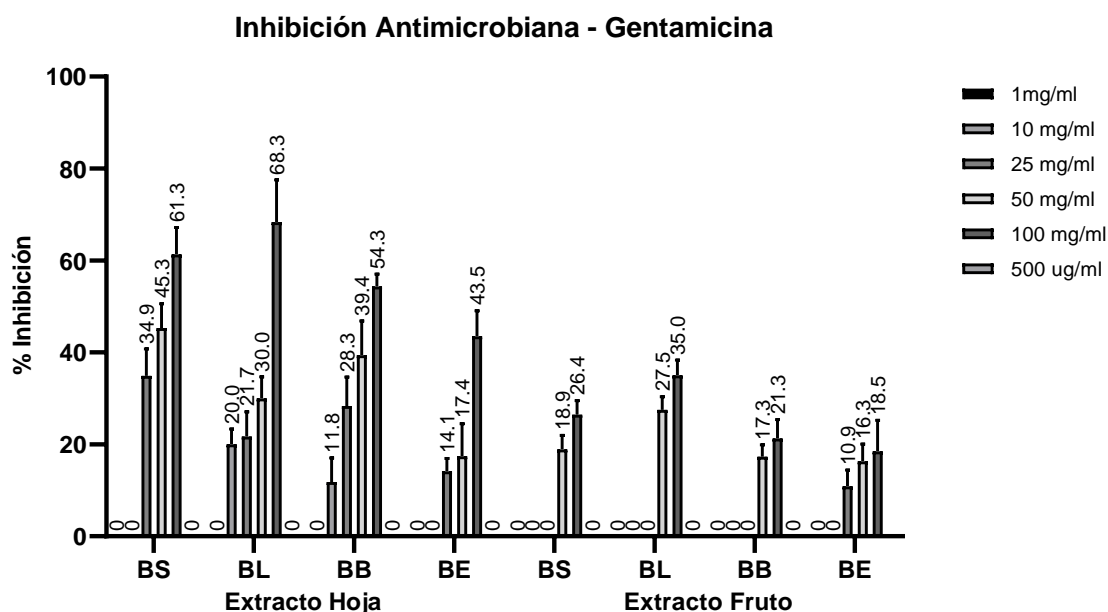


Figura 6. Porcentaje de inhibición antimicrobiana del extracto del fruto y hoja con referencia a la Gentamicina. BS: *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, BE: *Escherichia coli* ATCC 11775, BL: *Listeria monocytogenes* ATCC 19115 y BB: *Bacillus cereus* ATCC 1087.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se obtuvo rendimientos del extracto de la hoja y fruto de $11,189\% \pm 0,007$ y $41,163\% \pm 0,032$, respectivamente, mediante extracción con disolventes.
- El mortiño se caracteriza por contener metabolitos secundarios en diferentes partes de la planta. En este estudio se determinó mediante ensayos de tamizaje fitoquímico que la hoja y fruto del mortiño (*V. floribundum* Kunth), contienen diversos metabolitos. Como: las saponinas, flavonoides, taninos, fenoles y diterpenos se encuentran en el extracto etanólico de la hoja, mientras que, el extracto etanólico del fruto, posee alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, fenoles y diterpenos, los cuales se presentan con mayor y baja intensidad y son útiles para la salud del ser humano.
- La capacidad antioxidante de los extractos del mortiño expresados en porcentaje de inhibición fue de $27,930\% \pm 1,016$ y $86,422\% \pm 0,275$ y en equivalente de trolox de $152,367 \mu\text{mol ET/L} \pm 5,780$ y $152,367 \mu\text{mol ET/L} \pm 5,780$ del fruto y hoja, respectivamente. El extracto de la hoja tiene alta actividad antioxidante sobre el extracto del fruto, debido a su alto contenido de metabolitos secundarios como los flavonoides mencionados en estudios previos.
- Los dos extractos etanólicos del mortiño presentaron efectos inhibitorios frente a las bacterias patógenas, en el cual, el extracto de la hoja fue el que mayor halo de inhibición obtuvo contra las bacterias. El mayor halo de inhibición del extracto de la hoja y fruto fue de $20,667 \text{ mm} \pm 1,751$ y $14,000 \text{ mm} \pm 0,632$, respectivamente a una concentración de 100 mg/ml frente a *L. monocytogenes* ATCC 19115. Por otro lado, el mejor porcentaje de inhibición frente a las cuatro bacterias presentó el extracto de la hoja con los dos controles positivos.

- El fruto y la hoja de distintas especies de *Vaccinium* spp, por su alta capacidad antioxidante y contenido de flavonoides, polifenoles y antocianinas han sido utilizadas para prevenir o tratar enfermedades de amplio espectro, así como contrarrestar bacterias patógenas, lo cual respalda los diversos usos medicinales empleados mayoritariamente por las personas de las zonas rurales de todo el mundo.

4.2. Recomendaciones

- Realizar un análisis de la caracterización de metabolitos secundarios mediante HPLC, presentes en el fruto y sobre todo en la hoja del mortiño, debido a que varios de los compuestos identificados están relacionados con actividades antiinflamatorias, antimicrobianas, entre otros.
- Comparar las actividades biológicas de la misma especie del mortiño, pero que sean originarios de diversas altitudes, ya que, este factor podría afectar los principios activos de la planta.
- Obtener extractos con diferentes solventes (metanol y agua) e implementando otros métodos convencionales y no convencionales, para evidenciar que método es más eficiente en rendimiento y extracción de componentes propios del mortiño.
- Utilizar otras cepas bacterianas causantes de enfermedades drásticas en el humano a fin de ampliar el estudio sobre los efectos antimicrobianos del mortiño.
- Evaluar otras actividades biológicas como actividades antiinflamatorias, antineurodegenerativas, citotóxico, envejecimiento, etc.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abirami, P., Gomathinayagam, M., & Panneerselvam, R. (2012). Preliminary study on the antimicrobial activity of *Enicostemma littorale* using different solvents. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 5(7), 552–555. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60097-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60097-2)
- Abubakar, A., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. 12, 1–10. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_175_19
- Álvarez, F., Korbee, N., & Figueroa, F. (2016). Analysis of antioxidant capacity and bioactive compounds in marine macroalgal and lichenic extracts using different solvents and evaluation methods. *Ciencias Marinas*, 42(4), 271–288. <https://doi.org/10.7773/cm.v42i4.2677>
- Azuero, A., Jaramillo, C., San Martín, D., & D'Armas, H. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. *CIENCIA UNEMI*, 9(20), 11–18. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol9iss20.2016pp11-18p>
- Balloux, F., & van Dorp, L. (2017). Q&A: What are pathogens, and what have they done to and for us? *BMC Biology*, 15(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0433-z>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, 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>
- Baym, M., Stone, L., & Kishony, R. (2016). Multidrug evolutionary strategies to reverse antibiotic resistance. 1–21. <https://doi.org/10.1126/science.aad3292>
- Bendezú, G., Torres, C., Acevedo, T., Alarcon, J. J., & Arroyo, H. (2015). Investigación sobre plantas medicinales realizada por estudiantes de medicina en Perú. *Revista de Fitoterapia*, 15(2), 165–166.
- Bobo, G., Davidov, G., Arroqui, C., Vírseda, P., Marín, M. R., & Navarro, M. (2015).

- Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(1), 204–209. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6706>
- Bujor, O., Ginies, C., Popa, V., & Dufour, C. (2018). Phenolic compounds and antioxidant activity of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaf, stem and fruit at different harvest periods. *Food Chemistry*, 252, 356–365. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.052>
- Bunea, A., Rugină, D., Pinteă, A., Sconța, Z., Bunea, C., & Socaciu, C. (2011). Comparative polyphenolic content and antioxidant activities of some wild and cultivated blueberries from romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 39(2), 70–76. <https://doi.org/10.15835/nbha3926265>
- Canet, J. (2016). *Escherichia Coli*: características, patogenicidad y prevención (I). <https://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>
- Cárdenas, J., Castillo, O., De Cámara, C., & González, V. (2018). Combatiendo la resistencia bacteriana: una revisión sobre las terapias alternas a los antibióticos convencionales. *Bol Venez Infectol*, 29.
- Carrol, K., Miller, S., Morse, S., & Mietzner, T. (2016). Microbiología médica. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9).
- Cavalieri, S., Harbeck, R., McCarter, Y., Ortez, J., Rankin, I., Sautter, R., Sharp, S., & Spiegel, C. (2005). Manual de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. In *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2005/susceptibilidad-antimicrobiana-manual-pruebas-2005.pdf>
- Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Patología Clílica*, 61(1), 28–40.

- Coba, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M., Yugsi, E., & Huachi, L. (2012). Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *16*(2), 5–13. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=476047400002>
- Cordoba, L., Ríos, V., Largacha, M. F., Salas, M., Marrugo, J. L., Ramos, P. A., Mosquera, L., & Jonathan, M. P. (2021). Cultural belief and medicinal plants in treating COVID 19 patients of Western Colombia. *Acta Ecologica Sinica, December 2020*. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2021.10.011>
- Cortés, A., Díaz, M., & Salgado, M. (2017). *Bacillus cereus*: Alimentos, Salud y Biotecnología. *Agroproductividad*, *10*(10), 3–9. <https://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1001/1122/1/PUB-ARTICULO-3995.PDF>
- Corzo, D. C. (2012). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, *43*(3), 81–86.
- Cruz, A., Rodríguez, N., & Rodríguez, C. (2010). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, *13*(2), 117–124. <https://doi.org/10.31910/rudca.v13.n2.2010.738>
- De la Cruz, A. (2011). Uso combinado de la radiación uv-c y almacenamiento refrigerado sobre el tiempo de vida útil de mortiño (*Vaccinium floribundum*). http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/4937/1/47753_1.pdf
- Faye, G., Birhanu, T., & Belete, T. (2021). Survey and Antimicrobial Activity Study of Ethnomedicinal Plants in Selected Districts of North Shewa Zone, Oromia, Ethiopia. *Infection and Drug Resistance*, *Volume 14*, 5511–5520. <https://doi.org/10.2147/idr.s333772>
- Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-

55832016000400002

- Gallegos, M., & Gallegos, D. (2017). Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades de la piel en comunidades rurales de la provincia de Los Ríos – Ecuador. *Anales de La Facultad de Medicina*, 78(3), 315. <https://doi.org/10.15381/anales.v78i3.13767>
- García, C., Martínez, A., Ortega, J., & Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Revista Química Viva -Número*, 2(9). <https://www.redalyc.org/pdf/863/86314868005.pdf>
- García, J. D., Agüero, J., Parra, J. A., & Santos, M. F. (2010). Enfermedades infecciosas. Concepto. Clasificación. Aspectos generales y específicos de las infecciones. Criterios de sospecha de enfermedad infecciosa. Pruebas diagnósticas complementarias. Criterios de indicación. *Medicine*, 10(49), 3251–3264. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412\(10\)70027-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-5412(10)70027-5)
- García, M., Rajauria, G., & Tiwari, B. (2020). Conventional extraction techniques: Solvent extraction. In *Sustainable Seaweed Technologies*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817943-7.00006-8>
- Gaviria, C., Ochoa, C., Sánchez, N., Medina, C., Lobo, M., Galeano, P., Mosquera, A., Tamayo, A., Lopera, Y., & Rojano, B. (2015). Propiedades antioxidantes de los frutos de agraz o mortiño (*Vaccinium meridionale* Swartz). *ResearchGate*, April. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3509.8084>
- 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(1639), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01639>
- González, J., Maguiña, C., & González, F. de M. (2019). La resistencia a los antibióticos: un problema muy serio. *Acta Medica Peruana*, 36(2), 145–151.
- Gulcin, İ. (2020). Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. In

Archives of Toxicology (Vol. 94, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02689-3>

Harbourne, N., Marete, E., Christophe, J., & Riordan, D. (2013). Conventional extraction techniques for phytochemicals. *Handbook of Plant Food Phytochemicals: Sources, Stability and Extraction*, 400–410.

Herrera, X., & Rodríguez, K. (2016). Evaluación del extracto de flavonoles y antocianinas contenidos en el agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz) obtenidos a nivel laboratorio por medio de los métodos de extracción por solventes y extracción asistida por microondas. <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/478/1/6112802-2016-2-IQ.pdf>

Jácome, J. A. (2014). Aplicación de un Tratamiento Enzimático con Enzimas Pectolíticas (Pectinex Ultra SP-L y Ultrazym AFPL) en la Obtención de una Bebida tipo Vino de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) y su efecto en el contenido de Antocianinas. *Universidad Técnica de Ambato*, 20–23. <http://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/8448>

Jiménez, A., Mora, K. J., Rosete, S., & Cabrera, C. A. (2021). Utilización de plantas medicinales en cuatro localidades de la zona sur de Manabí, Ecuador. *Siembra*, 8(2), e3223. <https://doi.org/10.29166/siembra.v8i2.3223>

Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V., & Fazly, B. (2019). Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 8, 1–28.

Koshovyi, O., Granica, S., Piwowarski, J. P., Stremoukhov, O., Kostenko, Y., Kravchenko, G., Krasilnikova, O., & Zagayko, A. (2021). Highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) leaves extract and its modified arginine preparation for the management of metabolic syndrome—chemical analysis and bioactivity in rat model. *Nutrients*, 13(8). <https://doi.org/10.3390/nu13082870>

Lima, Y., Guzmán, V., López, Y., & Satchwell, R. (2019). La medicina tradicional herbolaria en los sistemas de salud convencionales.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-81202019000100201

- Llvisaca, S., León, F., Manzano, P., Ruales, J., Naranjo, J., Serrano, L., Chica, E., & Cevallos, J. M. (2022). Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth): An Underutilized Superplant from the Andes. *Horticulturae*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050358>
- Llvisaca, S., Manzano, P., Ruales, J., Flores, J., Mendoza, J., Peralta, E., & Cevallos-Cevallos, J. M. (2018). Chemical, antimicrobial, and molecular characterization of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) fruits and leaves. *Food Science and Nutrition*, 6(4), 934–942. <https://doi.org/10.1002/fsn3.638>
- Luna, C. (2015). Estudio del contenido de antocianinas y de la capacidad antioxidante en la concentración de la pulpa de mortiño (*Vaccinium floribundum*) con adición de pulpa de tomate de árbol morado (*Solanum betaceum*). http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/5132/1/59418_1.pdf
- Luna, M., & Delgado, A. (2014). Importancia, contribución y estabilidad de antioxidantes en frutos y productos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Avances De Investigacion Agropecuaria*, 18(1), 51–66. <http://ww.ucol.mx/revaia/portal/pdf/2014/enero/5.pdf>
- MAE. (2016). Estrategia Nacional de Biodiversidad 2015-2030 (p. 225). <http://maetransparente.ambiente.gob.ec/documentacion/WebAPs/Estrategia Nacional de Biodiversidad 2015-2030 - CALIDAD WEB.pdf>
- Maldonado, C., Paniagua, N., Bussmann, R., Zenteno, F., & Fuentes, A. (2020). La importancia de las plantas medicinales, su taxonomía y la búsqueda de la cura a la enfermedad que causa el Coronavirus (COVID-19). *Ecología En Bolivia*, 55(1), 1–5. http://www.scielo.org.bo/pdf/reb/v55n1/v55n1_a01.pdf
- Manandhar, S., Luitel, S., & Dahal, R. K. (2019). *In Vitro* Antimicrobial Activity of Some Medicinal Plants against Human Pathogenic Bacteria. *Journal of Tropical Medicine*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/1895340>

- Martín, D. (2018). Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 81–104. <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>
- Masaquiza, I. (2018). Evaluación de la actividad antimicrobiana y antioxidante de antocianinas microencapsuladas de maíz morado (*Zea mays* L.), papa morada (*Solanum tuberosum* L.) y mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27559/4/AL_664.pdf
- Mayorga, M. (2012). Estudio del efecto de la deshidratación por aire sobre la capacidad antioxidante del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunt). http://repositorio.ute.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/4988/51191_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Meléndez, M. R., Flor, L. E., Vasquez, W. A., & Racines, M. A. (2021). *Vaccinium* spp.: Características cariotípicas y filogenéticas, composición nutricional, condiciones edafoclimáticas, factores bióticos y microorganismos benéficos en la rizosfera. *Scientia Agropecuaria*, 12(1), 109–120. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172021000100109
- Mendoza, N. A., Hoyos, J. A., & Peláez, C. A. (2020). Capacidad antioxidante y contenido de polifenoles totales de extractos de tallo de *Stevia rebaudiana* en varios modelos in vitro. *Revista EIA*, 17(34), 1–9. <https://doi.org/10.24050/REIA.V17I34.1282>
- Neha, K., Haider, M. R., Pathak, A., & Yar, M. S. (2019). Medicinal prospects of antioxidants: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 178, 687–704. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.06.010>
- Núñez, E. (2019). Evaluación del efecto antibacteriano de los extractos de plantas medicinales del Ecuador. https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/30418/2/TESIS_BIBLIO.pdf
- OMS. (2002). Estrategias de la OMS sobre Medicina Tradicional 2002-2005. *Organización Mundial de La Salud*, 1–65.

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67314/WHO_EDM_TRM_2002.1_spa.pdf;sequence=1

OMS. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014 - 2023. www.who.int

OMS. (2018). Seguridad alimenticia. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/facts-in-pictures/detail/food-safety>

OMS. (2021). Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>

OPS. (2019). Tratamiento de las enfermedades infecciosas.

Oroian, M., & Escriche, I. (2015). Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. *Food Research International.*, 74, 10–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.04.018>

Osés, S. M., Pascual, A., de la Fuente, D., de Pablo, A., Fernández, M. A., & Sancho, M. T. (2016). Comparison of methods to determine antibacterial activity of honeys against *Staphylococcus aureus*. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences*, 78, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.njas.2015.12.005>

Panayidou, S., Ioannidou, E., & Apidianakis, Y. (2014). Human pathogenic bacteria, fungi, and viruses in *Drosophila*. *Virulence*, 5(2), 253–269. <https://doi.org/10.4161/viru.27524>

Pervin, M., Abul Hasnat, M., & Ou Lim, B. (2013). Antibacterial and antioxidant activities of *Vaccinium corymbosum* L. leaf extract Asian Pacific Journal of Tropical Disease. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 3(6), 444–453. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(13\)60099-7](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(13)60099-7)

Plazas, E. (2015). Tamizaje fitoquímico preliminar, evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* y toxicidad de seis especies de Ericaceas colombianas. Scielo. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962015000200004

Prat, S. (2005). Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar. *Instituto de*

Salud Pública de Chile, 40.

- Prencipe, F. P., Bruni, R., Guerrini, A., Rossi, D., Benvenuti, S., & Pellati, F. (2014). Metabolite profiling of polyphenols in *Vaccinium* berries and determination of their chemopreventive properties. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 89, 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.11.016>
- Pujol, A., Tamargo, B., Salas, E., Calzadilla, C., Acevedo, R., & Sierra, G. (2020). Tamizaje fitoquímico de extractos obtenidos de la planta *Sapindus saponaria* L. que crece en Cuba. <https://doi.org/10.21931/RB/2020.05.03.7>
- Ramirez, S. (2019). Capacidad antioxidante de fracciones de extracto de *Vaccinium floribundum* kunth “ushpa” procedente de los páramos de Ayabaca-Piura.
- Rico, N., Manrique, W., & López, D. (2021). Actividad antimicrobiana de polifenoles extraídos de frutos de diferentes especies del género *Vaccinium*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 26(2), 1–17. <http://revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/viewFile/910/469>
- Rieger, G., Müller, M., Guttenberger, H., & Bucar, F. (2008). Influence of altitudinal variation on the content of phenolic compounds in wild populations of *Calluna vulgaris*, *Sambucus nigra*, and *Vaccinium myrtillus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9080–9086. <https://doi.org/10.1021/jf801104e>
- Rincón, C. M., Patiño, O. J., & Plazas, E. A. (2014). Estudio químico preliminar y evaluación de la actividad antioxidante, antialimentaria y tóxica, de la especie *Pernettya prostrata* (Ericaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(2), 138–150. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962014000200003&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Rivas, C., Oranday, M. A., & Verde, M. J. (2016). Investigación en plantas de importancia médica. In *OmniaScience*. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3926/oms.313>
- Rohde, M. (2019). The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. In *Microbiology Spectrum* (Vol. 7, Issue 3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0044-2018>

- Shaikh, J. R., & Patil, M. (2020). Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview. *International Journal of Chemical Studies*, 8(2), 603–608. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2i.8834>
- Shamilov, A., Bubenchikova, V., Chernikov, M., Pozdnyakov, D., & Garsiya, E. (2020). *Vaccinium vitis-idaea* L.: Chemical contents, pharmacological activities. *Pharmaceutical Sciences*, 26(4), 344–362. <https://doi.org/10.34172/PS.2020.54>
- Soto, M., & Rosales, M. (2016). Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*. *Maderas. Ciencia y Tecnología*, 18(4), 701–714. <https://doi.org/10.4067/s0718-221x2016005000061>
- Soto, Z., Pérez, L., & Alvarado, D. (2016). Bacterias causantes de enfermedades transmitidas por alimentos: una mirada en colombia. *Barranquilla (Col.)*, 32(1), 105–122.
- Spitaler, R., Winkler, A., Lins, I., Yanar, S., Stuppner, H., & Zidorn, C. (2008). Altitudinal variation of phenolic contents in flowering heads of *Arnica montana* cv. ARBO: A 3-year comparison. *Journal of Chemical Ecology*, 34(3), 369–375. <https://doi.org/10.1007/s10886-007-9407-x>
- Stefănescu, B., Călinoiu, L., Ranga, F., Fetea, F., Mocan, A., Vodnar, D. C., & Crișan, G. (2020). Chemical composition and biological activities of the nord-west romanian wild bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leaves. *Antioxidants*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/antiox9060495>
- Suárez, B., Milián, Y., Espinosa, F., Hart, M., Llanes, N., & Martínez, M. L. (2014). Susceptibilidad antimicrobiana y mecanismos de resistencia de *Escherichia coli* aisladas a partir de urocultivos en un hospital de tercer nivel. *Revista Cubana de Medicina*, 53(1), 3–13. <http://scielo.sld.cu/pdf/med/v53n1/med02114.pdf>
- Tipán, K. (2015). Efectos de la deshidratación de la pulpa concentrada de mortiño (*Vaccinium floribundum*) y tomate de árbol morado (*Solanum betaceum*) sobre la capacidad antioxidante y contenido de antocianinas.

http://repositorio.ute.edu.ec/xmlui/bitstream/handle/123456789/14280/62176_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Tundis, R., Tenuta, M., Loizzo, M., Bonesi, M., Finetti, F., Trabalzini, L., & Deguin, B. (2021). *Vaccinium* species (Ericaceae): From chemical composition to bio-functional activities. *Applied Sciences (Switzerland)*, *11*. <https://doi.org/10.3390/app11125655>
- Tupuna, S., Vera, E., & Ruales, J. (2016). Obtención de jugo clarificado concentrado de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) mediante el uso de tecnología de membranas. *Revista Politécnica*, *38*(1), 1–11. https://revistapolitecnica.epn.edu.ec/ojs2/index.php/revista_politecnica2/article/view/641/pdf
- Valnissen, A. (2020). *Patógenos en Microbiología* (Cambridge Stanford Books (ed.)). https://books.google.com.ec/books?id=aqD5DwAAQBAJ&dq=Bacterias+patógenas+y+no+patógenas&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2021). Towards advances in medicinal plant antimicrobial activity: A review study on challenges and future perspectives. *Microorganisms*, *9*(10), 1–28. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102041>
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., & Kamal-Eldin, A. (2009). Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(18), 8274–8281. <https://doi.org/10.1021/jf9013586>
- Vega, P., Cobo, M. M., Argudo, A., Gutierrez, B., Rowntree, J., & de Lourdes Torres, M. (2020). Characterizing the genetic diversity of the Andean blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth.) across the Ecuadorian Highlands. *PLoS ONE*, *15*(12 December), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243420>
- Xavier, L., Freire, M., Vidal, I., & González, J. (2015). Application of aqueous two phase systems based on polyethylene glycol and sodium citrate for the recovery of phenolic compounds from eucalyptus wood. *Maderas: Ciencia y Tecnología*, *17*(2), 345–354.

<https://doi.org/10.4067/S0718-221X2015005000032>

Xiao, F., Xu, T., Lu, B., & Liu, R. (2020). Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, *1*(1), 60–69. <https://doi.org/10.1002/fft2.10>

Zamora, C., & Toro, C. (2021). Actividad antibiótica del *Eucalyptus globulus* frente a bacterias Gram positivas: un artículo de revisión. 93–104. <https://doi.org/https://doi.org/10.18050/revistamedicavallejiana.v10i2.07> Como

Zendejas, G., Avalos, H., & Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades de patogenicidad, metodos de identificacion. *Revista Biomed*, *25*(3), 129–143.

Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, *13*(1), 1–26. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

Zilberberg, M., Shorr, A., Micek, S., Vazquez, C., & Kollef, M. (2014). Multi-drug resistance, inappropriate initial antibiotic therapy and mortality in Gram-negative severe sepsis and septic shock: A retrospective cohort study. *Critical Care*, *18*(6), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13054-014-0596-8>

Zurita, K. (2021). Extracción hidroalcohólica de los compuestos bioactivos del mortiño (*Vaccinium meridionale*) en función de polifenoles y capacidad antioxidante. *Universidad Técnica de Cotopaxi*.

ANEXOS

ANEXO A. Extracción de la hoja y fruto del mortiño



Figura 7. Preparación del material vegetal. Secado y pulverizado de la hoja y fruto del mortiño.



Figura 8. Pesaje de las hojas, mezcla con etanol al 96%, planta en reposo y filtración.

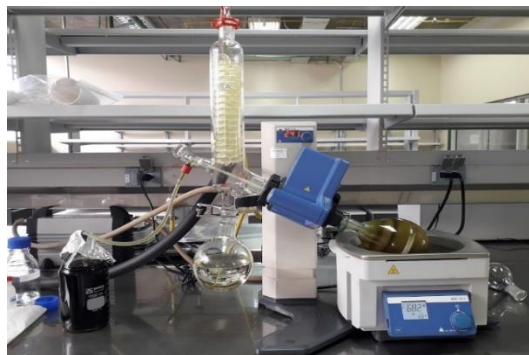


Figura 9. Rotaevaporación de la hoja.

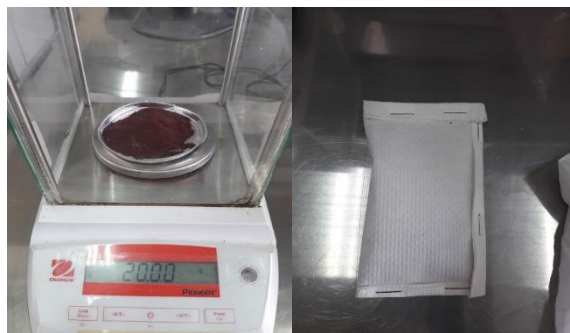


Figura 10. Pesaje del fruto y elaboración de cartucho para el tubo extractor soxhlet.

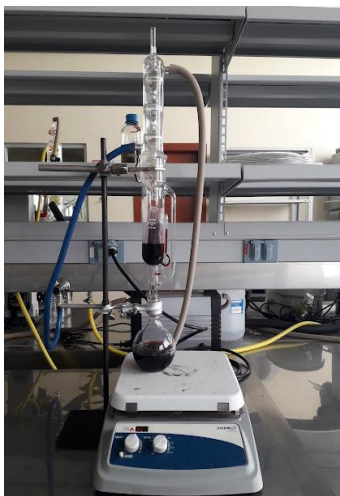


Figura 11. Extracción soxhlet del fruto.

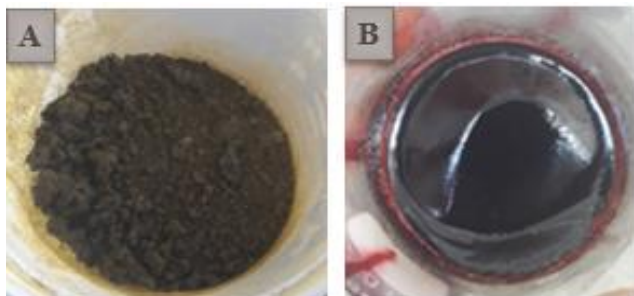


Figura 12. Resultado de la extracción con disolventes del mortiño; (A) Hoja y (B) Fruto.

ANEXO B. Determinación de la capacidad antioxidante

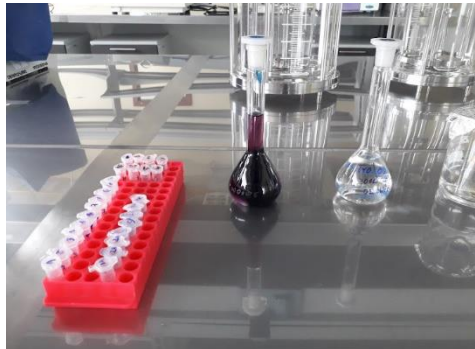


Figura 13. Preparación del Trolox y DPPH.



Figura 14. Preparación de la concentración de los extractos.

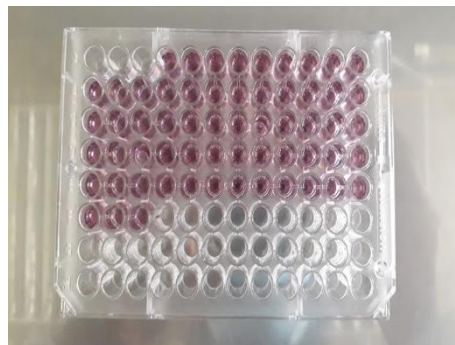


Figura 15. Preparación de la placa de 96 pocillos.

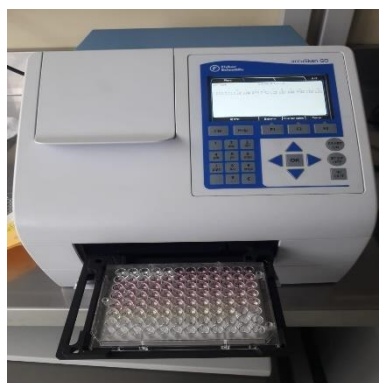


Figura 16. Medición de la placa de 96 pocillos.

Tabla 8. Datos de las absorbancias del extracto de la hoja del mortiño.

Concentración	Réplicas				Promedio	Desviación
	1	2	3	4		
1mg/ml	0,129	0,128	0,127	0,121	0,126	0,004
Blanco	0,044	0,043	0,051	0,045	0,046	0,004
Control	0,632	0,628	0,629	0,632	0,630	0,002
1mg/ml	0,150	0,151	0,149	0,155	0,151	0,003
Blanco	0,084	0,085	0,087	0,080	0,084	0,003
Control	0,585	0,582	0,589	0,59	0,587	0,004

Tabla 9. Datos de las absorbancias del extracto del fruto del mortiño.

Concentración	Réplicas				Promedio	Desviación
	1	2	3	4		
1mg/ml	0,446	0,446	0,446	0,445	0,446	0,001
Blanco	0,044	0,043	0,045	0,046	0,045	0,001
Control	0,596	0,598	0,595	0,594	0,596	0,002
1mg/ml	0,441	0,446	0,446	0,445	0,445	0,002
Blanco	0,045	0,043	0,045	0,046	0,045	0,001
Control	0,596	0,648	0,598	0,578	0,605	0,030

Tabla 10. Datos de las absorbancias del Trolox.

Concentración ($\mu\text{mol/L}$)	Réplicas				Promedio	Desviación
	1	2	3	4		
50	0,575	0,574	0,576	0,579	0,576	0,002
100	0,512	0,494	0,532	0,522	0,515	0,016

200	0,482	0,422	0,427	0,426	0,439	0,029
300	0,260	0,331	0,356	0,357	0,326	0,046
400	0,207	0,233	0,189	0,235	0,216	0,022
500	0,097	0,093	0,092	0,096	0,095	0,002
Blanco	0,041	0,041	0,041	0,041	0,041	0,000
Control	0,64	0,604	0,653	0,663	0,640	0,026

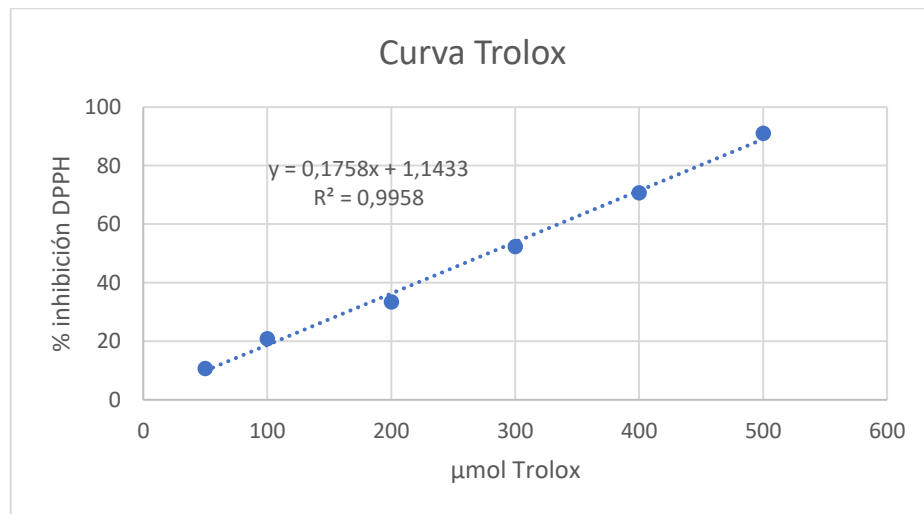


Figura 17. Curva de calibración del Trolox en % de inhibición de DPPH.

ANEXO C. Actividad antimicrobiana

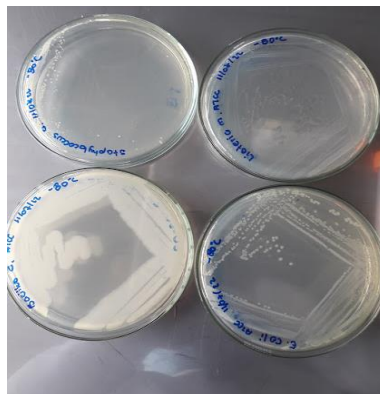


Figura 18. Cultivo de las cepas bacterianas en agar Mueller-Hinton (MH).

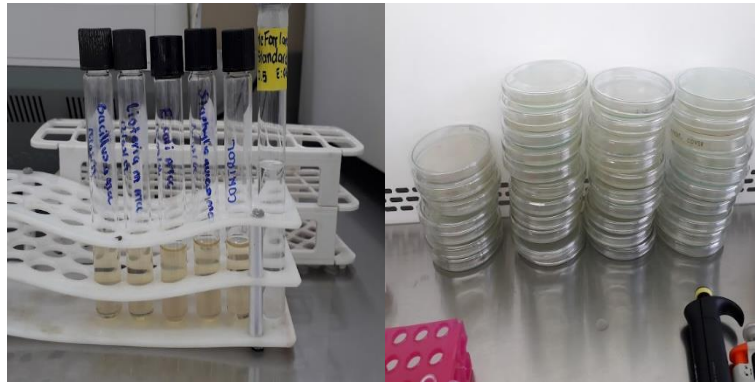


Figura 19. Estándar McFarland del cultivo bacteriano y preparación de cajas Petri con agar MH.

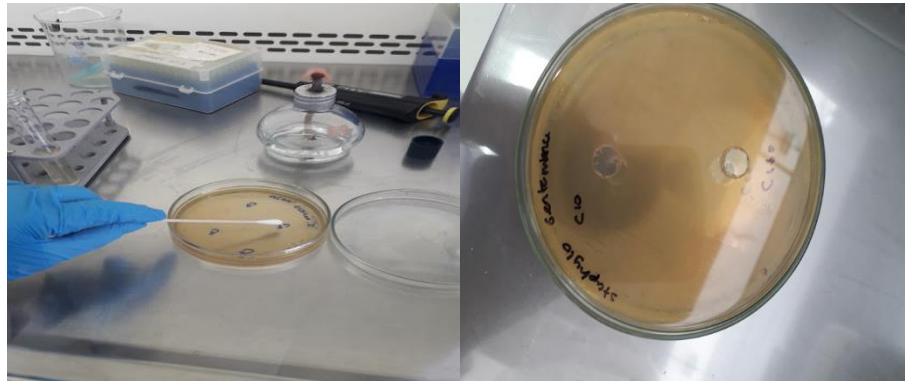


Figura 20. Inoculación de las cepas con hisopos estériles y perforación de pozos.

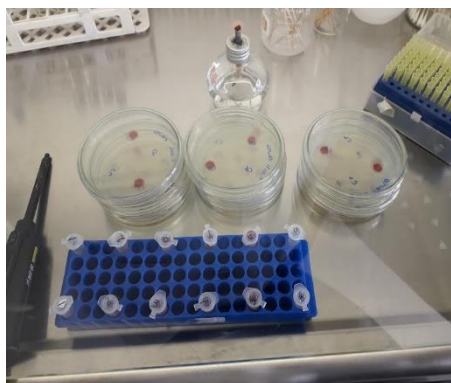


Figura 21. Inoculación de los extractos en los pozos.

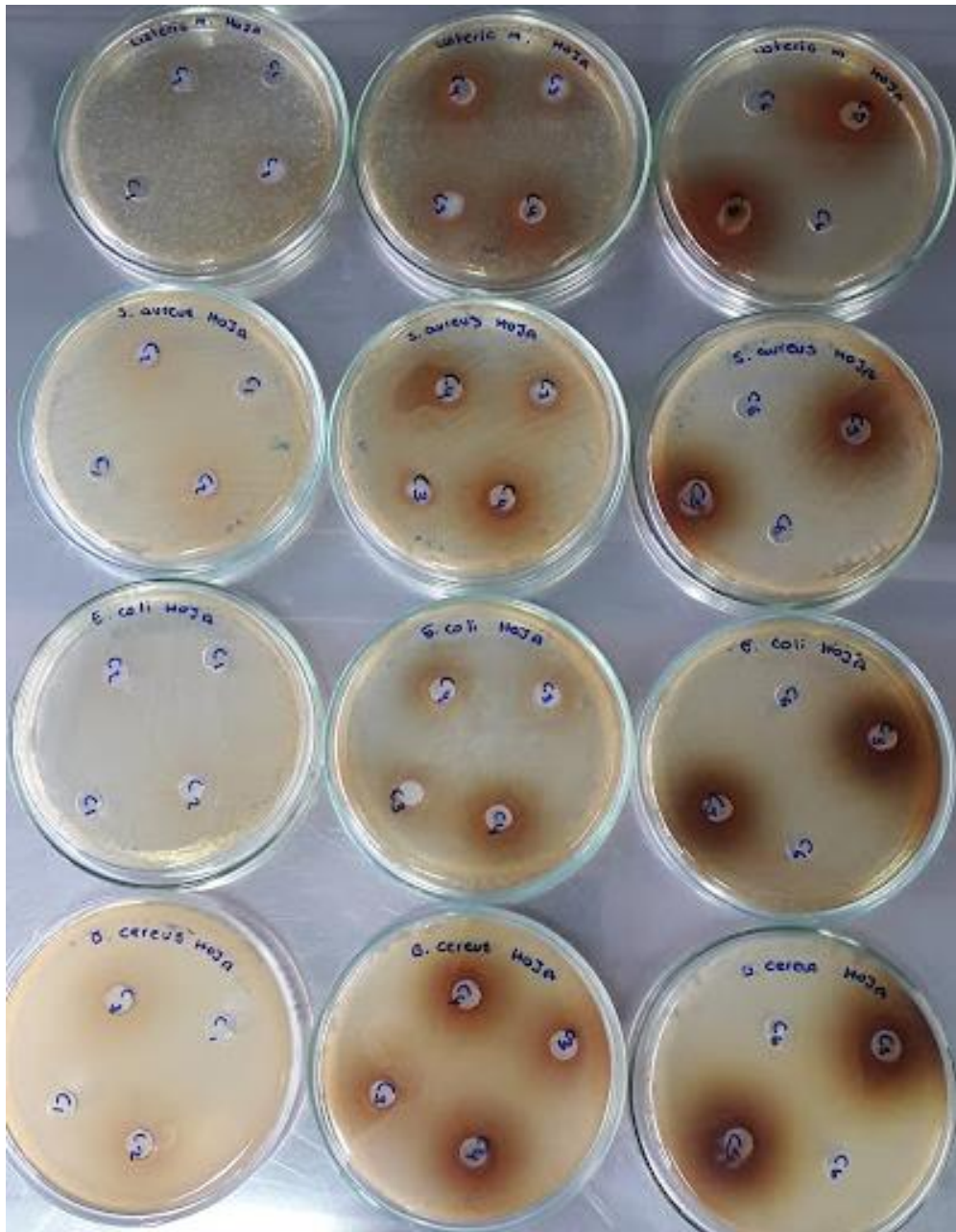


Figura 22. Halos de inhibición antimicrobiano del extracto de la hoja a concentraciones de C1: 1, C2: 10, C3: 25, C4: 50, C5: 100 mg/ml y C6: 500 µg/ml. Fila 1, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Fila 2, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, Fila 3, *Escherichia coli* ATCC 11775, y Fila 4, *Bacillus cereus* ATCC 10876; de arriba a abajo.

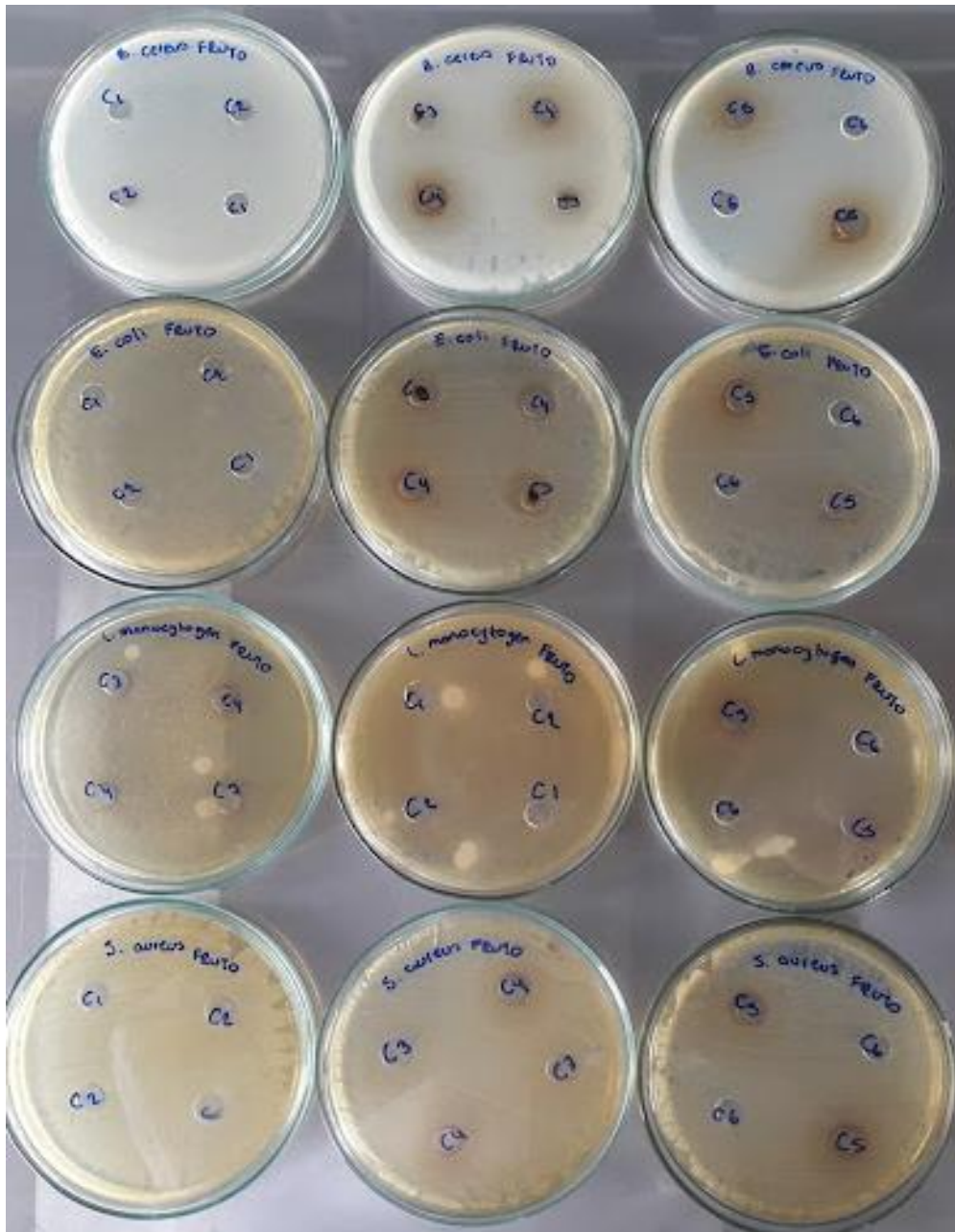


Figura 23. Halos de inhibición antimicrobiano del extracto del fruto a concentraciones de C1: 1, C2: 10, C3: 25, C4: 50, C5: 100 mg/ml y C6: 500 µg/ml. Fila 1, *Bacillus cereus* ATCC 10876, Fila 2, *Escherichia coli* ATCC 11775, Fila 3, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, y Fila 4, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600; de arriba a abajo.

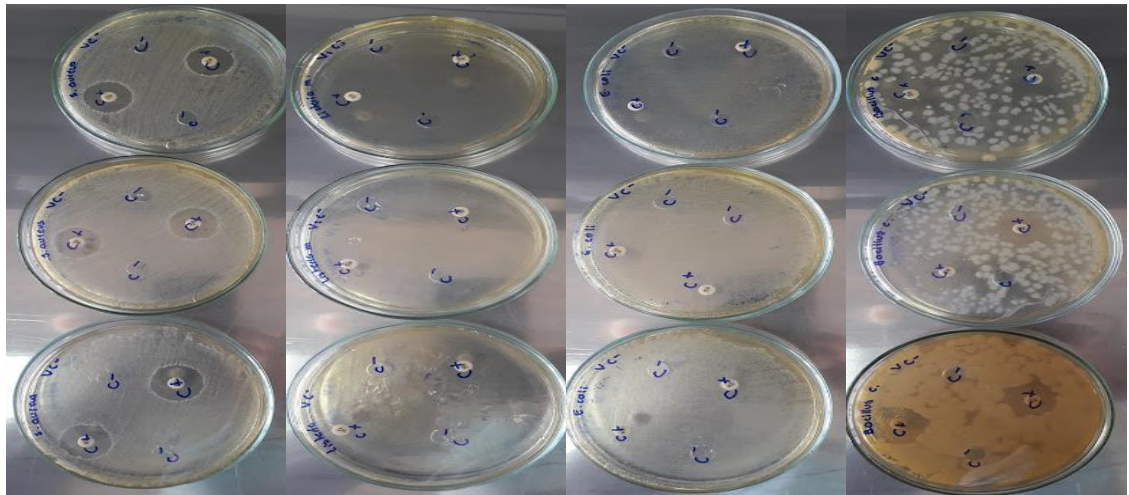


Figura 24. Vancomicina y Control negativo. Columna 1, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, Columna 2, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Columna 3, *Escherichia coli* ATCC 11775, y Columna 4, *Bacillus cereus* ATCC 10876.

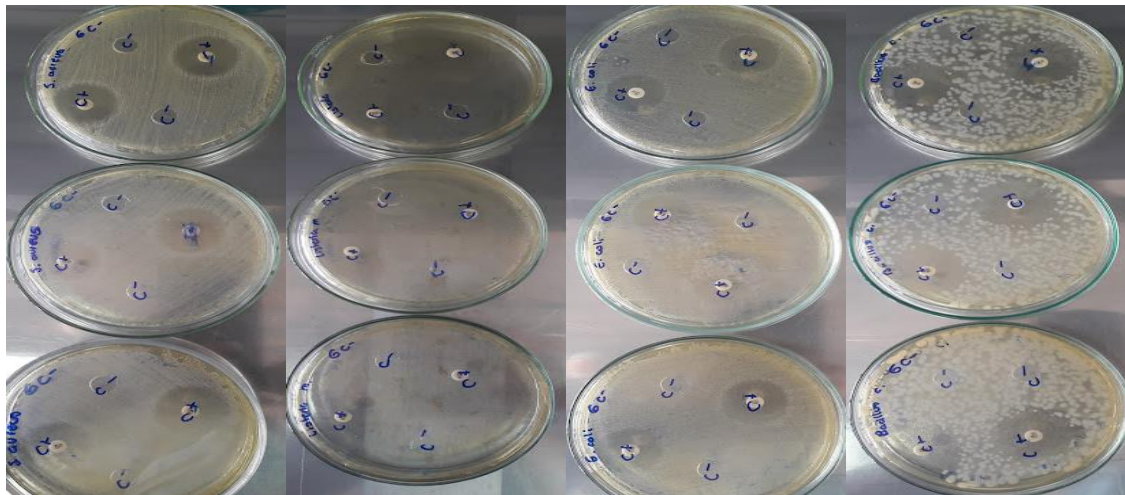


Figura 25. Gentamicina y Control negativo. Columna 1, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, Columna 2, *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, Columna 3, *Escherichia coli* ATCC 11775, y Columna 4, *Bacillus cereus* ATCC 10876.

ANEXO D. Análisis de varianza y prueba Tukey de los halos de inhibición de los extractos

- EXTRACTO HOJA

Staphylococcus aureus ATCC 12600

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Concentración	8	4773,15	596,644	1229,72	0,0000
Error	45	21,8333	0,485185		
Total	53	4794,98			

Prueba de comparación Tukey con un nivel de confianza del 95%

Concentración	N	Media	Agrupación
1	6	0	A
10	6	0	A
500	6	0	A
Control -	6	0	A
25	6	13,1667	B
50	6	15,0	C
100	6	17,8333	D
Vancomicina	6	19,1667	E
Gentamicina	6	24,6667	F

Aquellas letras que forman parte de la misma columna no hay diferencias estadísticamente significativas.

Listeria monocytogenes ATCC 19115

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Concentración	8	5500,67	687,583	700,56	0,0000
Error	45	44,1667	0,981481		
Total	53	5544,83			

Prueba de comparación Tukey con un nivel de confianza del 95%

Concentración	N	Media	Agrupación	
1	6	0	A	
500	6	0	A	
Control -	6	0	A	
10	6	11,0	B	
25	6	11,3333	B	C
50	6	13,0	C	
100	6	20,6667	D	
Vancomicina	6	25,5	E	
Gentamicina	6	27,0	E	

Aquellas letras que forman parte de la misma columna no hay diferencias estadísticamente significativas.

***Bacillus cereus* ATCC 10876**

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Concentración	8	5294,48	661,81	863,23	0,0000
Error	45	34,5	0,766667		
Total	53	5328,98			

Prueba de comparación Tukey con un nivel de confianza del 95%

Concentración	N	Media	Agrupación	
1	6	0	A	
500	6	0	A	
Control -	6	0	A	
10	6	9,5	B	
25	6	13,0	C	
50	6	15,3333	D	
100	6	18,5	E	
Vancomicina	6	23,3333	F	
Gentamicina	6	28,1667	G	

Aquellas letras que forman parte de la misma columna no hay diferencias estadísticamente significativas.

Escherichia coli ATCC 11775

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Concentración	8	3454,26	431,782	896,78	0,0000
Error	45	21,6667	0,481481		
Total	53	3475,93			

Prueba de comparación Tukey con un nivel de confianza del 95%

Concentración	N	Media	Agrupación
1	6	0	A
10	6	0	A
500	6	0	A
Control -	6	0	A
25	6	9,16667	B
50	6	9,66667	B
100	6	13,6667	C
Vancomicina	6	16,8333	D
Gentamicina	6	22,3333	E

Aquellas letras que forman parte de la misma columna no hay diferencias estadísticamente significativas.

- EXTRACTO FRUTO

Staphylococcus aureus ATCC 12600

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Concentración	8	4422,81	552,852	2296,46	0,0000
Error	45	10,8333	0,240741		
Total	53	4433,65			

Prueba de comparación Tukey con un nivel de confianza del 95%

Concentración	N	Media	Agrupación
1	6	0	A
10	6	0	A

25	6	0	A
500	6	0	A
Control -	6	0	A
50	6	10,3333	B
100	6	11,6667	C
Vancomicina	6	19,1667	D
Gentamicina	6	24,6667	E

Aquellas letras que forman parte de la misma columna no hay diferencias estadísticamente significativas.

Listeria monocytogenes ATCC 19115

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Concentración	8	6228,33	778,542	1668,30	0,0000
Error	45	21,0	0,466667		
Total	53	6249,33			

Prueba de comparación Tukey con un nivel de confianza del 95%

Concentración	N	Media	Agrupación
1	6	0	A
10	6	0	A
25	6	0	A
500	6	0	A
Control -	6	0	A
50	6	12,5	B
100	6	14,0	C
Vancomicina	6	25,5	D
Gentamicina	6	27,0	E

Aquellas letras que forman parte de la misma columna no hay diferencias estadísticamente significativas.

Bacillus cereus ATCC 10876

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Concentración	8	5885,15	735,644	2546,46	0,0000
Error	45	13,0	0,288889		
Total	53	5898,15			

Prueba de comparación Tukey con un nivel de confianza del 95%

Concentración	N	Media	Agrupación
1	6	0	A
10	6	0	A
25	6	0	A
500	6	0	A
Control -	6	0	A
50	6	10,6667	B
100	6	11,5	B
Vancomicina	6	23,3333	C
Gentamicina	6	28,1667	D

Aquellas letras que forman parte de la misma columna no hay diferencias estadísticamente significativas.

Escherichia coli ATCC 11775

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Concentración	8	3257,59	407,199	923,90	0,0000
Error	45	19,8333	0,440741		
Total	53	3277,43			

Prueba de comparación Tukey con un nivel de confianza del 95%

Concentración	N	Media	Agrupación
1	6	0	A
10	6	0	A
500	6	0	A

Control -	6	0	A	
25	6	8,66667		B
50	6	9,5		B
100	6	9,83333		B
Vancomicina	6	16,8333		C
Gentamicina	6	22,3333		D

Aquellas letras que forman parte de la misma columna no hay diferencias estadísticamente significativas.

ANEXO E. Autorización del Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica



Ministerio del Ambiente, Agua
y Transición Ecológica

PRONUNCIAMIENTO FAVORABLE No. MAAE-ARSFC-2022-2216

Srta. **GUAMAN POAQUIZA EDITH JOHANNA,**

Una vez que la propuesta para Autorización de Recolección de Especímenes de la Diversidad Biológica Sin Fines Comerciales para Investigación Científica, ha sido analizada, el Ministerio del Ambiente y Agua en uso de las atribuciones que le confiere el Acuerdo Interministerial SENESCYT-MAE N°001 aprueba el Proyecto **Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de la hoja y fruto de mortiño -Vaccinium floribundum kun- frente a bacterias patógenas - Bacillus cereus Staphylococcus aureus Escherichia coli y Listeria monocytogenes-**, al haber cumplido con los parámetros técnicos, administrativos y legales, establecidas en la ley.

Por lo dispuesto, se solicita realizar el pago correspondiente en:

BANECUADOR
RUC MAATE: 1768192860001
CUENTA CTE. No. 3001480604 / SUB-LÍNEA: 190499
TIPOS DE SERVICIOS: Servicios de Áreas Protegidas y Vida Silvestre

En base a lo dispuesto en el Texto Unificado de la Legislación Ambiental Secundaria.

Atentamente,

LAGLA CHIMBA BYRON ADRIAN

DIRECCIÓN DE BIODIVERSIDAD