



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE *Lonicera japonica* (MADRESELVA)
PARA LA ELABORACIÓN DE UNA CREMA TÓPICA**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Trabajo Experimental

Presentado para optar al grado académico de:

BIOQUÍMICA FARMACEÚTICA

AUTORA: MARLA DANIELA RUALES LOZANO

DIRECTORA: DRA. VERÓNICA MERCEDES CANDO BRITO PhD.

Riobamba – Ecuador

2023

© 2023, Marla Daniela Ruales Lozano

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Marla Daniela Ruales Lozano, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 28 de junio de 2023

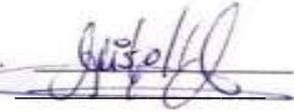


Marla Daniela Ruales Lozano

0604655084

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Trabajo Experimental, **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Lonicera japonica* (MADRESELVA) PARA LA ELABORACIÓN DE UNA CREMA TÓPICA**, realizado por la señorita: **MARLA DANIELA RUALES LOZANO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Elizabeth del Rocío Escudero Vilema MSc. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-06-28
Dra. Verónica Mercedes Cando Brito PhD. DIRECTORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-06-28
BQCl. Mishell Carolina Moreno Samaniego MSc. ASESORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2023-06-28

DEDICATORIA

A Dios por guiarme en cada paso que doy, por bendecirme, por darme fuerzas y sabiduría para seguir cumpliendo mis sueños. A mis padres que son la razón de mi vida, por todo su amor y confianza, quienes siempre me han brindado su apoyo incondicional para continuar con mi crecimiento personal y profesional. A grandes amigos que tuve el privilegio de compartir momentos felices y duros a lo largo de la investigación.

Marla

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios por guiarme y acompañarme en cada paso, por darme fortaleza en los momentos de debilidad, por poner en mi camino aquellas personas que formarían parte de esta gran etapa y por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias, y sobre todo felicidad. Agradezco a mis padres por apoyarme en todo momento de manera incondicional, por haberme inculcado valores como la honestidad, perseverancia, responsabilidad, que como resultado a ello es este gran logro que he alcanzado. Y a toda mi familia en general que estuvo conmigo.

Marla

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xii
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1.	DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA.....	2
1.1.	Planteamiento del problema.....	2
1.2.	Justificación.....	2
1.3.	Objetivos.....	3
1.3.1.	<i>Objetivo general</i>	3
1.3.2.	<i>Objetivos específicos</i>	3

CAPÍTULO II

2.	MARCO TEÓRICO.....	4
2.1.	Familia Caprifoliaceae.....	4
2.1.1.	<i>Características</i>	4
2.1.2.	<i>Distribución</i>	4
2.1.3.	<i>Taxonomía de la familia Caprifoliaceae</i>	5
2.1.4.	<i>Componentes químicos</i>	5
2.2.	Género Lonicera.....	5
2.2.1.	<i>Características</i>	5
2.2.2.	<i>Distribución geográfica</i>	6
2.2.3.	<i>Composición química del género Lonicera</i>	6
2.2.3.1.	<i>Especies</i>	6
2.3.	Lonicera japónica.....	6
2.3.1.	<i>Clasificación taxonómica</i>	7
2.3.2.	<i>Características botánicas</i>	7
2.3.3.	<i>Hábitat y distribución</i>	7
2.3.4.	<i>Composición química</i>	8

2.4.	Productos naturales	9
2.4.1.	<i>Biosíntesis de productos naturales</i>	9
2.4.2.	<i>Metabolismo primario</i>	10
2.4.3.	<i>Metabolismo secundario</i>	11
2.5.	Extractos vegetales	11
2.5.1.	<i>Generalidades</i>	11
2.5.2.	<i>Clasificación</i>	11
2.6.	Métodos de extracción	12
2.6.1.	<i>Maceración</i>	13
2.6.2.	<i>Percolación</i>	13
2.6.3.	<i>Infusión</i>	13
2.7.	Técnicas de separación	13
2.7.1.	<i>Cromatografía</i>	14
2.7.2.	<i>Cromatografía en capa fina</i>	14
2.8.	Técnicas de análisis	14
2.8.1.	<i>Espectroscopía infrarroja (IR)</i>	14
2.9.	Tamizaje fitoquímico	15
2.9.1.	<i>Ensayos para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios</i>	15
2.9.1.1.	<i>Detección de alcaloides</i>	15
2.9.1.2.	<i>Detección de cumarinas</i>	16
2.9.1.3.	<i>Detección de flavonoides</i>	16
2.9.1.4.	<i>Detección de taninos</i>	17
2.9.1.5.	<i>Detección de quinonas / antraquinonas</i>	17
2.9.1.6.	<i>Detección de saponinas</i>	18
2.9.1.7.	<i>Detección de triterpenos y esteroides</i>	18
2.10.	Actividad antibacteriana	19
2.10.1.	<i>Principales grupos de compuestos antimicrobianos de plantas naturales</i>	19
2.11.	Bacterias	20
2.11.1.	<i>Estructura</i>	21
2.11.2.	<i>Clasificación de las bacterias</i>	21
2.11.2.1.	<i>Según su morfología</i>	22
2.11.2.2.	<i>Según la composición de la pared celular</i>	22
2.11.2.3.	<i>Según el tipo de respiración</i>	23
2.11.2.4.	<i>Según el tipo de nutrición</i>	23
2.13.	Antibiótico	24
2.13.1.	<i>Concepto</i>	24
2.13.2.	<i>Clasificación</i>	25

2.13.2.1.	<i>Según su origen</i>	25
2.13.2.2.	<i>Según el mecanismo de acción</i>	25
2.14.	Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos	26
2.14.1.	<i>Método de Kirby - Bauer o difusión en disco</i>	27
2.14.2.	<i>Método de dilución</i>	27
2.15.	Interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos	28
2.16.	Resistencia bacteriana a los antibióticos	28
2.17.	Formas farmacéuticas	29
2.17.1.	<i>Concepto</i>	29
2.17.2.	<i>Formas farmacéuticas según el estado de la materia</i>	29
2.18.	Antibióticos tópicos	29
2.19.	Control calidad de las formas farmacéuticas semisólidas	30
2.20.	La piel	30
2.21.	Flora cutánea normal	31
2.22.	Infecciones bacterianas comunes en la piel	31

CAPÍTULO III

3.	MARCO METODOLÓGICO	32
3.1.	Lugar de la investigación	32
3.2.	Enfoque y diseño de investigación	32
3.3.	Diseño experimental	32
3.3.1.	<i>Población de estudio y/o tamaño de muestra y/o método de muestreo</i>	32
3.3.1.1.	<i>Criterios de inclusión</i>	33
3.3.1.2.	<i>Criterios de exclusión</i>	33
3.3.2.	<i>Hipótesis</i>	33
3.3.3.	Identificación de variables	33
3.4.	Equipos, materiales y reactivos	33
3.4.1.	<i>Equipos</i>	33
3.4.2.	<i>Materiales</i>	34
3.4.2.1.	<i>Materiales para obtención de extracto</i>	34
3.4.2.2.	<i>Materiales para realizar el control de calidad de la droga vegetal</i>	34
3.4.2.3.	<i>Materiales para realizar el tamizaje fitoquímico</i>	35
3.4.2.4.	<i>Materiales para realizar el control de calidad físico-químico del extracto</i>	35
3.4.2.5.	<i>Materiales para realizar la cromatografía capa fina</i>	35
3.4.2.6.	<i>Materiales para realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana</i>	35
3.4.2.7.	<i>Materiales para la formulación de la crema tópica</i>	36

3.4.2.8.	<i>Material biológico</i>	36
3.4.2.9.	<i>Materiales para realizar el control físico – químico y microbiológico de la crema</i>	36
3.4.3.	Reactivos	36
3.4.3.1.	<i>Reactivos para el tamizaje fitoquímico</i>	36
3.4.3.2.	<i>Reactivos para la cromatografía capa fina</i>	37
3.4.3.3.	<i>Reactivos para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana</i>	37
3.4.3.4.	<i>Reactivos para el control de calidad físico-químico y microbiológico de la crema.</i>	37
3.4.3.5.	<i>Reactivos para la formulación de la crema tópica</i>	37
3.5.	Técnicas y métodos	37
3.5.1.	Recolección de la materia vegetal	37
3.5.2.	Identificación de la materia vegetal	38
3.5.3.	Acondicionamiento de la materia vegetal	39
3.5.4.	Control de calidad de la droga vegetal seca	39
3.5.4.1.	<i>Determinación de humedad</i>	39
3.5.4.2.	<i>Determinación de cenizas totales</i>	39
3.5.4.3.	<i>Determinación de cenizas solubles en agua</i>	40
3.5.4.4.	<i>Determinación de cenizas insolubles en ácido</i>	41
3.5.5.	Obtención del extracto etanólico	42
3.5.6.	Tamizaje fitoquímico	42
3.5.6.1.	<i>Detección de flavonoides</i>	42
3.5.6.2.	<i>Detección de cumarinas</i>	43
3.5.6.3.	<i>Detección de quinonas/antraquinonas</i>	44
3.5.6.4.	<i>Detección de alcaloides</i>	44
3.5.6.5.	<i>Detección de triterpenos y/o esteroides</i>	45
3.5.6.6.	<i>Detección de saponinas</i>	45
3.5.6.7.	<i>Detección de taninos/compuestos fenólicos</i>	46
3.5.6.8.	<i>Detección de azúcares reductores</i>	47
3.5.7.	Determinación de fenoles totales	47
3.5.8.	Determinación de flavonoides	47
3.5.9.	Control de calidad del extracto	48
3.5.9.1.	<i>Determinación de olor</i>	48
3.5.9.2.	<i>Determinación de color/ aspecto</i>	48
3.5.9.3.	<i>Determinación de sabor</i>	48
3.5.9.4.	<i>Determinación del pH</i>	48
3.5.9.5.	<i>Determinación de la densidad relativa</i>	48
3.5.9.6.	<i>Determinación del índice de refracción</i>	49
3.5.10.	Cromatografía en capa fina	49

3.5.11.	<i>Espectroscopia IR</i>	49
3.5.12.	<i>Capacidad antibacteriana</i>	49
3.5.12.1.	<i>Método microdilución en caldo</i>	49
3.5.12.2.	<i>Método Kirby Bauer</i>	50
3.5.13.	<i>Elaboración de la crema tópica</i>	51
3.5.14.	<i>Control de calidad del producto terminado.</i>	52
3.5.14.1.	<i>Características organolépticas y físico-químicas</i>	52
3.5.14.2.	<i>Control de calidad microbiológico</i>	52

CAPÍTULO IV

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
4.1.	Control de calidad de la droga vegetal seca	54
4.2.	Rendimiento del extracto	55
4.3.	Control de calidad del extracto etanólico	55
4.4.	Tamizaje fitoquímico	56
4.5.	Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu	57
4.6.	Cuantificación de flavonoides totales	58
4.7.	Cromatografía capa fina	59
4.8.	Caracterización de grupos funcionales por espectroscopia infrarroja	61
4.9.	Capacidad antibacteriana	63
4.9.1.	<i>Método de microdilución en caldo</i>	63
4.9.2.	<i>Método de Kirby-Bauer</i>	64
4.10.	Control de calidad de la crema tópica	66
4.11.	Actividad antibacteriana de la crema tópica	67
4.12.	Control de calidad microbiológico de la crema tópica	69
4.13.	Elaboración de la etiqueta del producto	69

CAPÍTULO V

5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	71
5.1.	Conclusiones	71
5.2.	Recomendaciones	72

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2:	Taxonomía de <i>Lonicera japonica</i>	7
Tabla 2-2:	Rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios	10
Tabla 3-2:	Clasificación de las formas farmacéuticas según el estado de la materia.....	29
Tabla 4-2:	Principales infecciones cutáneas primarias	31
Tabla 1-3:	Localización de la recolección de <i>Lonicera japonica</i>	38
Tabla 2-3:	Interpretación de la Reacción de Shinoda	43
Tabla 3-3:	Interpretación de la Reacción de NaOH al 10%	43
Tabla 4-3:	Interpretación de la reacción con NH ₄ OH.....	43
Tabla 5-3:	Interpretación de la Reacción de Börntrager	44
Tabla 6-3:	Interpretación de los ensayos de Dragendorff, Wagner y Mayer	45
Tabla 7-3:	Interpretación de la Reacción de Lieberman- Bouchard	45
Tabla 8-3:	Interpretación de la Reacción de Rosenthaler	46
Tabla 9-3:	Interpretación de la Reacción con gelatina.....	46
Tabla 10-3:	Interpretación de la detección de azúcares reductores.....	47
Tabla 1-4:	Control de calidad de la droga seca	54
Tabla 2-4:	Control de calidad del extracto etanólico	55
Tabla 3-4:	Estudio fitoquímico preliminar de <i>Lonicera japonica</i>	56
Tabla 4-4:	Resultados de la cuantificación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu	58
Tabla 5-4:	Resultados de la cuantificación de flavonoides por espectrofotometría.....	59
Tabla 6-4:	Parámetros cromatografía capa fina	59
Tabla 7-4:	Determinación de R _f de metabolitos secundarios extracto de <i>Lonicera japonica</i> .	60
Tabla 8-4:	Grupos funcionales del espectro del extracto etanólico	61
Tabla 9-4:	Grupos funcionales del espectro del extracto acuoso	62
Tabla 10-4:	Resultados método micro dilución en caldo.....	63
Tabla 11-4:	Resultados método Kirby Bauer.....	64
Tabla 12-4:	Resultados del control de calidad del producto final.....	66
Tabla 13-4:	Resultados actividad antibacteriana método Difusión en placa	67
Tabla 14-4:	Resultados del control microbiológico de la crema tópica.....	69

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-2:	Familia Caprifoliaceae.....	4
Ilustración 2-2:	Distribución geográfica de la familia Caprifoliaceae	5
Ilustración 3-2:	Lonicera japónica.....	6
Ilustración 4-2:	Estructura química de la secologanina.....	8
Ilustración 5-2:	Estructura química de la loganina.....	9
Ilustración 6-2:	Metabolitos secundarios vegetales y sus rutas metabólicas.....	10
Ilustración 7-2:	Proceso general de Extracción vegetal	12
Ilustración 8-2:	Estructura química de alcaloides	15
Ilustración 9-2:	Estructura de una cumarina.....	16
Ilustración 10-2:	Estructura química de un flavonoide	16
Ilustración 11-2:	Estructura química de un tanino	17
Ilustración 12-2:	Estructura de una quinona.....	17
Ilustración 13-2:	Estructura química de una saponina	18
Ilustración 14-2:	Estructura química de un triterpeno.....	18
Ilustración 15-2:	Estructura química de compuestos fenólicos con actividad bactericida	20
Ilustración 16-2:	Estructura de la célula procariota.....	21
Ilustración 17-2:	Morfología bacteriana.....	22
Ilustración 18-2:	Diferencia entre la pared de las gram positivas y gram negativas	22
Ilustración 19-2:	Sitio de acción de los antimicrobianos.....	25
Ilustración 20-2:	Estructura de la piel	30
Ilustración 1-3:	Mapa de recolección de <i>Lonicera japonica</i>	36
Ilustración 2-3:	Acondicionamiento de la materia vegetal.....	39
Ilustración 3-3:	Obtención del extracto etanólico	42
Ilustración 1-4:	Curva de calibración de Ácido gálico.....	58
Ilustración 2-4:	Curva de calibración de Quercetina.....	59
Ilustración 3-4:	Espectro IR del extracto etanólico de <i>Lonicera japonica</i>	61
Ilustración 4-4:	Espectro IR del extracto acuoso de <i>Lonicera japonica</i>	62
Ilustración 5-4:	Etiqueta de la crema tópica formulada.....	70

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** CERTIFICADO IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL
- ANEXO B:** ACONDICIONAMIENTO DE *LONICERA JAPONICA*
- ANEXO C:** CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA VEGETAL SECA
- ANEXO D:** OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y ACUOSO
- ANEXO E:** CONTROL DE CALIDAD DEL EXTACTO ETANÓLICO
- ANEXO F:** RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO
- ANEXO G:** TÉCNICA DE SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA
- ANEXO H:** EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
- ANEXO I:** ELABORACIÓN DE LA FORMA FARMACÉUTICA SEMISÓLIDA
- ANEXO J:** CONTROL DE CALIDAD DEL PRODUCTO FINAL

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo principal comprobar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Lonicera japonica* (madreselva), para la elaboración de una crema tópica. La metodología implementada tuvo un enfoque cuantitativo de alcance correlacional con un diseño experimental; la población de estudio fueron las hojas de la madreselva recolectadas por el método de muestreo aleatorio simple. Se obtuvo el extracto etanólico por percolación, se realizó tamizaje fitoquímico y cromatografía en capa fina para identificar los metabolitos secundarios presentes, se evaluó la actividad antibacteriana por dos métodos: Kirby-Bauer y dilución en caldo frente a bacterias tipo ATCC (Cepas de Colección Certificadas) *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*; los extractos fueron vehiculizados en una crema base y se realizó el control de calidad del producto terminado. Mediante esta metodología, se estableció que esta especie vegetal contiene flavonoides, ácido clorogénico entre otros componentes; la actividad antibacteriana se evidenció a las siguientes concentraciones: 64000, 8000, 250 y 125 µg/mL y al ser vehiculizados, se determinó que la concentración mínima a la que existió inhibición bacteriana fue de 125 µg/mL; se realizó el control de calidad del producto final y contó con las características organolépticas, físico químicas y microbiológicas óptimas cumpliendo con las especificaciones requeridas por la Normativa Técnica Ecuatoriana INEN (Servicio Ecuatoriano de Normalización) 2867: 2015. Se concluyó que *Lonicera japonica* tiene una actividad antibacteriana considerable al tratarse de una planta y que la crema tópica formulada puede ser de gran ayuda para la desinfección de la piel con el fin de evitar la contaminación de bacterias patógenas mediante el contacto de una persona a otra.

Palabras clave: <BIOQUÍMICA Y FARMACIA>, <MADRESELVA (*Lonicera japonica*)>, <ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA>, <EXTRACTO ETANÓLICO>, <CREMA ANTIBACTERIANA>, <FLAVONOIDES>, <ÁCIDO CLOROGÉNICO>.

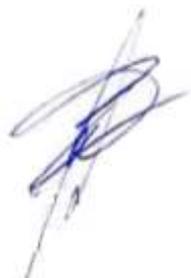
1437-DBRA-UPT-2023



ABSTRACT

The main objective of this research was to test the antibacterial activity of the ethanolic extract of the leaves of *Lonicera japonica* (honeysuckle) for the preparation of a topical cream. The methodology implemented had a quantitative approach of correlational scope with an experimental design; the study population was the leaves of honeysuckle collected by the simple random sampling method. The ethanolic extract was obtained by percolation; phytochemical screening and thin layer chromatography were performed to identify the secondary metabolites present; the antibacterial activity was evaluated by two methods: Kirby-Bauer and dilution in broth against ATCC type bacteria (American Type Culture Collection) *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa*; the extracts were conveyed in a base cream and the quality control of the finished product was performed. By means of this methodology, it was established that this vegetable species contains flavonoids, chlorogenic acid among other components; the antibacterial activity was evidenced at the following concentrations: 64000, 8000, 250 and 125 µg/mL and when transmitted, it was determined that the minimum concentration at which bacterial inhibition existed was 125 µg/mL; the quality control of the final product was performed and it had the optimum organoleptic, physical-chemical and microbiological characteristics complying with the specifications required by the Ecuadorian Technical Standard INEN (Ecuadorian Standardization Service) 2867: 2015. It was concluded that *Lonicera japonica* has considerable anti-bacterial activity as it is a plant and that the formulated topical cream can be of great help for skin disinfection in order to avoid contamination of pathogenic bacteria through contact from one person to another.

Keywords: <BIOCHEMISTRY AND PHARMACY>, <HONEYSUCKLE (*Lonicera japonica*)>, <ANTIBACTERIAL ACTIVITY>, <ETHANOLIC EXTRACT>, <ANTIBACTERIAL CREAM>, <FLAVONOIDS>, <CHLOROGENIC ACID>.



Edgar Mesías Jaramillo Moyano
0603497397

INTRODUCCIÓN

El ser humano ha estado ligado milenariamente al uso de ciertos productos naturales que proceden de la vegetación para sobrevivir, en consecuencia, ha ido adquiriendo un vasto conocimiento de las propiedades medicinales de las plantas. Por parte de la comunidad científica existe un gran interés en el campo de la medicina natural, actualmente se ha reportado alrededor de 50,000 especies de plantas que tienen algún uso medicinal, correspondientes a un 10% de todas las que existen en el mundo.

Las plantas al evolucionar han adquirido la capacidad de adaptarse al estrés ambiental y desarrollar mecanismos de defensa contra microorganismos, insectos y herbívoros, aumentando los niveles de metabolitos secundarios, con el fin de perpetuar la especie (Lustre, 2022). Investigadores han dirigido estudios de identificación y aislamiento de estas sustancias que tienen actividad antimicrobiana y ha logrado comprobar que una gran parte de las especies vegetales inhiben el crecimiento de bacterias resistentes a numerosos antibióticos.

Una de estas especies de plantas es *Lonicera japonica*, conocida comúnmente como Madreselva, se caracteriza por ser un arbusto trepador de la familia *Caprifoliaceae*. Es originaria del este de Asia, y ha llegado a distribuirse alrededor del mundo, con un uso ornamental. Históricamente la madreselva ha sido una planta muy apreciada y utilizada en medicina y, de hecho, en la antigüedad se utilizaba para curar infecciones de vías respiratorias tales como la tos, asma, gripe, bronquitis, resfriados comunes o incluso la tuberculosis. Se ha evidenciado en registros antiguos de la farmacopea China.

Investigaciones realizadas por la Universidad Agrícola de China demostraron que los extractos, fracciones y compuestos de las hojas de *Lonicera japonica* poseen actividad antibacteriana considerable contra ciertas cepas bacterianas (Xiong, y Wang, 2013). El objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de *Lonicera japonica* así como identificar mediante cromatografía en capa fina la presencia de los principales metabolitos secundarios responsables de esta función.

CAPÍTULO I

1. DIAGNÓSTICO DEL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

Durante casi nueve décadas la humanidad ha participado del beneficio de los antibióticos. Hoy la gran mayoría de los procesos infecciosos se resuelven con tratamientos cortos, pero el desconocimiento por parte de la población ha generado un problema mucho más grave que es el uso irracional de los mismos, es por eso que cada vez es más frecuente encontrar en nuestra práctica y en los reportes científicos ejemplos de una amplia resistencia a los antibióticos. Día tras día están apareciendo y propagándose en todo el planeta nuevos mecanismos de resistencia que ponen en peligro nuestra capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes. Este problema es hoy una de las mayores amenazas para la salud mundial, la seguridad alimentaria y el desarrollo, y puede afectar a cualquier persona independientemente de la edad, sexo, raza o estatus social (OMS, 2021).

La resistencia a los antimicrobianos reduce las posibilidades de tratamiento eficaz de enfermedades, prolonga el tiempo de agonía de los enfermos y los obliga a utilizar medicamentos costosos, además de alargar el tiempo de hospitalización y aumentar el riesgo de mortalidad. De acuerdo al MSP, el reporte de datos de resistencia a los antimicrobianos en Ecuador 2014-2018, menciona que el microorganismo sujeto a vigilancia de RAM que se ha reportado en mayor porcentaje a partir de los aislados de los servicios hospitalarios registrados por el CRN-RAM - INSPI, es *Escherichia coli* con más del 50%, seguido por *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Además, existen otros microorganismos resistentes que se han reportado en menores cantidades como: *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Serratia marcescens*, entre otros (MSP, 2019).

1.2. Justificación

El fenómeno de la resistencia bacteriana es considerado un problema de Salud Pública mundial de difícil solución. Si bien, no es posible acabar con el problema de la resistencia antimicrobiana, es posible convertir esta amenaza creciente en un problema manejable con el aporte de investigaciones dirigidas a buscar nuevas terapias antimicrobianas como opciones alternas a los tratamientos con antibióticos conocidos (Rodríguez et al., 2017).

De acuerdo a estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en conjunto

con otros organismos internacionales, establecen que por medio de la bioprospección y el aprovechamiento correcto de los recursos naturales se puede llegar a diseñar alternativas de tratamiento, puesto que las propiedades de ciertas plantas son la fuente primordial para trabajar en la obtención de nuevos compuestos antimicrobianos (Giraldo et al., 2015).

Los conocimientos de las plantas medicinales han sido adquiridos a través de los siglos de generación en generación por parte de sus ancestros, a partir de ello en la actualidad se ha generado un interés científico en estudiar los componentes químicos para ser empleados como una alternativa natural para el tratamiento de enfermedades. Alrededor del 60% de la población mundial utiliza plantas y productos derivados de ellas como parte de un tratamiento no farmacológico con el fin de evitar el uso de compuestos sintéticos (Gonçalves 2017, pp.600-605).

Frente a esta problemática se ha planteado la siguiente investigación ya que se enfoca en la búsqueda de moléculas con potencial antibacteriano en el extracto etanólico de la planta *Lonicera japonica* utilizando diversas técnicas in vitro frente a cepas bacterianas de interés clínico.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la planta *Lonicera japonica* (Madreselva).

1.3.2. Objetivos específicos

- Obtener el extracto etanólico de las partes aéreas de la especie *Lonicera japonica* mediante percolación.
- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la especie vegetal *Lonicera japonica* mediante un análisis fitoquímico preliminar y cromatografía en capa fina.
- Determinar la capacidad antibacteriana del extracto etanólico a través de los métodos de Kirby - Bauer y dilución en caldo.
- Desarrollar una forma farmacéutica semisólida a base del extracto etanólico de la Madreselva para el uso antibiótico en infecciones superficiales de la piel.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Familia Caprifoliaceae

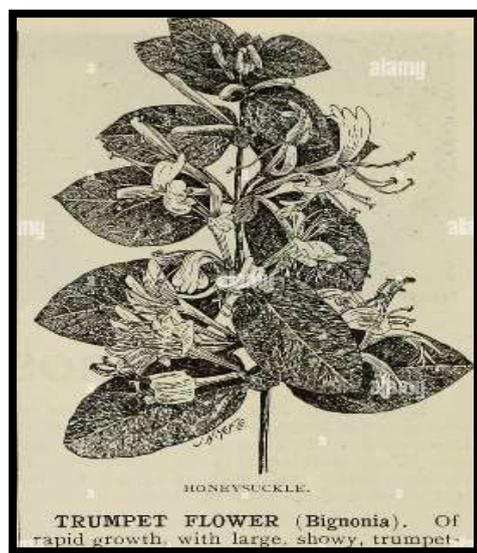


Ilustración 1-2: Familia Caprifoliaceae

Fuente: Alamy, 2019.

2.1.1. Características

Estas plantas en su mayoría son arbustos leñosos, y enredaderas, incluyen algunas ornamentales para jardín en regiones templadas. Las hojas son opuestas sin estípulas y pueden ser simples, caedizas o persistentes. Las flores son pequeñas, simétricas bilateralmente tubulares, parecidas a campanas, normalmente con cinco lóbulos vueltos hacia afuera y casi siempre con fragancia, normalmente forman un pequeño cáliz de brácteas diminutas (Villarreal, 2000, pp.36-37). Fruto en baya que se desarrolla en el ovario inferior, a menudo con pocas semillas o con una sola semilla (Díaz, 2010).

2.1.2. Distribución

Las Caprifoliaceas consta de 15 géneros y unas 400 especies que se encuentran distribuidas en regiones templadas y montañas tropicales (Ilustración 2-2), principalmente del Hemisferio Norte, ciertas plantas han llegado a situarse hasta Sudamérica, Australia y Nueva Zelanda (Villarreal 2000, pp.36-37).



Ilustración 2-2: Distribución geográfica de la familia Caprifoliaceae

Fuente: UNNE, 2015.

2.1.3. Taxonomía de la familia Caprifoliaceae

Presenta cinco géneros, *Heptacodium*, *Leycesteria*, *Lonicera*, *Symphoricarpos* y *Triosteum*, con más 220 especies, solo *Lonicera* con 180 (Caprifoliaceae, 2017).

2.1.4. Componentes químicos

En base a estudios realizados a diversos especímenes vegetales de esta familia, se ha descubierto que son fuente de metabolitos secundarios, como saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, los cuales muestran una variedad de actividades biológicas (Chrzaszcz et al., 2021).

2.2. Género *Lonicera*

2.2.1. Características

Lonicera es un género de plantas con flores perteneciente a la familia Caprifoliaceae. Comprende 526 especies descritas y de estas, solo 108 aceptadas. Las especies incluidas dentro de este género normalmente son conocidas por el nombre popular de madreselvas. Son arbustos arqueados o parras sarmentosas, la mayoría con dulces fragancias y flores con forma de campana. Las hojas son opuestas, ovales simples, y desde 1–10 cm de longitud; la mayoría son caducifolias y algunas son perennifolias. Estas plantas son la base de alimentación de las larvas de especies de Lepidoptera.

En el Ecuador están representados 2 géneros nativos y uno cultivado que corresponde a la *Lonicera japonica Thunb.* (madre selva) originaria del Japón (Ulloa y Moller 1991)

2.2.2. *Distribución geográfica*

Más de 150 especies se encuentran distribuidas desde el Hemisferio Norte hasta llegar al círculo polar ártico y al sur del Archipiélago Malayo, sur de Asia, África del norte, Sudamérica (Rehder 1903, p.39).

2.2.3. *Composición química del género Lonicera*

De acuerdo al estudio se encontró alrededor de 420 componentes del género de *Lonicera Linn.* incluyendo 87 flavonoides, 222 terpenoides, 51 ácidos orgánicos y otros compuestos, junto con sus actividades farmacológicas como efectos antiinflamatorios, anticancerígenos, hepatoprotectores, neuroprotectores, antidiabéticos, antialérgicos e inmunomoduladores (Ge et al. 2021, pp. 68-79).

2.2.3.1. *Especies*

Se han identificado 180 especies, de al menos 526 madreselvas extendidas por América del Norte, Australia, Nueva Zelanda, Hawaii, islas de Pacífico, norte de África y Europa. Las especies ampliamente conocidas incluyen:

- *Lonicera periclymenum* (madreselva común)
- *Lonicera japonica* (madreselva japonesa, madreselva blanca o madreselva china)
- *Lonicera sempervirens* (madreselva coralina, madreselva trompeta).
- *Lonicera caprifolium* (madreselva italiana, Honeysuckle o pata de cabra)

2.3. *Lonicera japónica*



Ilustración 3-2: *Lonicera japónica*

Fuente: Gardenia, 2020.

2.3.1. Clasificación taxonómica

En la tabla 1-2 se detalla la taxonomía de la especie vegetal, de acuerdo al banco de datos de Biodiversidad de Canarias (BIOTA).

Tabla 1-2: Taxonomía de *Lonicera japonica*

Taxonomía	
Reino:	Plantae
División:	Spermatophyta
Subdivisión:	Magnoliophytina
Clases:	Magnoliopsida
Orden:	Dipsacales
Familia:	Caprifoliaceae
Género:	Lonicera
Especie:	<i>Lonicera japonica</i> Thunb.

Fuente: Biodiversidad Canarias, 2019.

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

2.3.2. Características botánicas

Lonicera japonica (Ilustración 3-2) es un arbusto trepador leñoso perenne que puede alcanzar una altura de 5-7 metros, posee un tallo fuerte, flexible, piloso y liso. Las hojas se presentan de manera opuesta en las ramas, el haz son de color verde oscuro opaco y por el envés verde pálido en donde destaca un nervio central. Produce flores tubulares sésiles de color blanquecinas, emanan un aroma muy fragante generalmente todo el verano, cáliz verde, tubular, 4 estambres, corola blanca que se torna amarillentas al madurar (CABI, 2022). Por último, sus frutos son pequeñas bayas sésiles duras verdosas cuando están inmaduras y negras y blandas, incluso llenas de líquido cuando están maduras, que contienen algunas semillas aplanadas y pueden llegar a ser tóxicas si se lo ingiere.

2.3.3. Hábitat y distribución

Es originaria del este de Asia (Japón, China, Corea), posteriormente ha sido introducida en muchas regiones con clima templado para su uso en jardinería, para recubrimiento de verjas, muros y paredes por lo que ha desarrollado la capacidad de adaptarse a una amplia gama de suelos, puede llegar a tolerar sequías, sustratos derivados de rocas volcánicas, sedimentarias y metamórficas y resistir bajas temperaturas. Se reproduce por semilla, dispersada por las aves, y vegetativamente por estolones (CABI, 2022).

En la actualidad, al tratarse de una planta ampliamente distribuida en el mundo es considerada como una especie invasora ya que compite con la vegetación nativa de algunos países debido a la facilidad de extenderse, por este motivo en Ecuador es considerada como una planta exótica cultivable de uso ornamental controlado en aquellas zonas donde constituya un peligro para la flora autóctona.

2.3.4. Composición química

Al ser uno de los géneros más estudiados dentro de las caprifoliáceas, la *Lonicera japónica* ha sido el eje central de estudio para muchos investigadores, es así que se ha reportado la presencia de iridoides glicosidados derivados de la secologanina (Ilustración 4-2) y la loganina (Ilustración 5-2) (Rojas et al. 2015, pp.27-29).

Otra de las familias de compuestos importantes dentro de este género son las saponinas triterpénicas, las cuales están presentes en varias especies de *Loniceras* y que al igual que los iridoides glicosidados han sido de gran utilidad como marcadores quimiotaxonómicos tanto del género como de la familia. Entre las más representativas están aquellas que presentan como agliconas al ácido oleanólico y al ácido ursólico, así como la hederagenina, tal es el caso de los lonicerosidos A, B y C (Rojas et al. 2015, pp.27-29), todos estos compuestos aislados de *Lonicera japonica*.

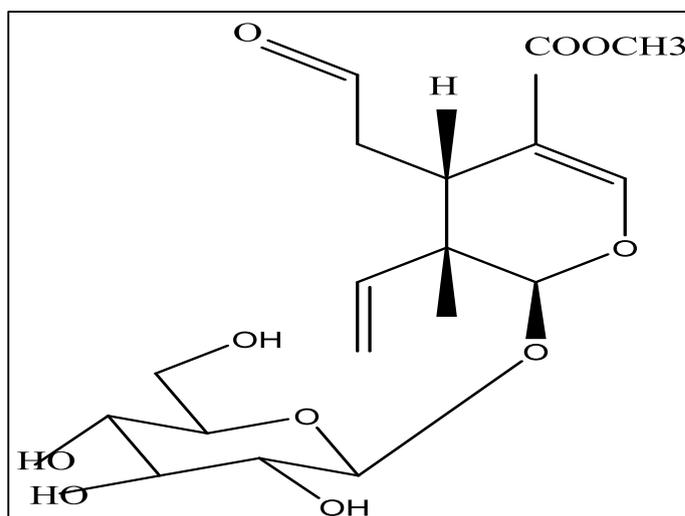


Ilustración 4-2: Estructura química de la secologanina

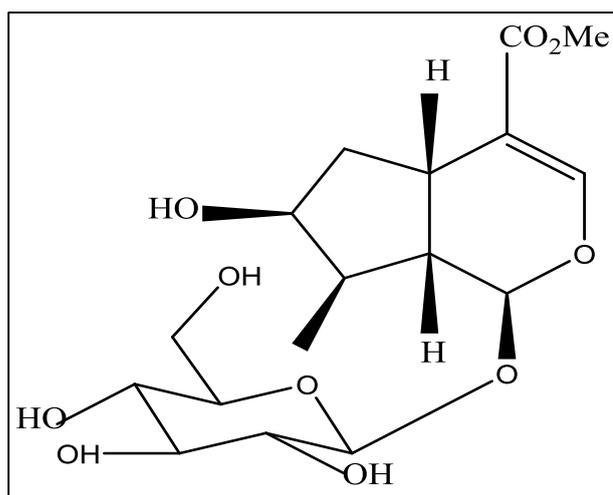


Ilustración 5-2: Estructura química de la loganina

2.3.2. Usos medicinales

La planta *Lonicera japónica* es una especie de madreselva pertenecientes a la familia Caprifoliaceae. Es conocida desde la antigüedad por sus propiedades medicinales, el primer registro en la literatura sobre esta planta se encuentra en una de las farmacopeas más antiguas del mundo, la monografía de Shen-Nong en donde varias partes de la planta se han utilizado en medicina tradicional para tratar diversas enfermedades, como los síndromes respiratorios agudos, graves, la gripe H1N1 y la enfermedad mano-pie-boca (Yuan et al. 2012, p. 2), detalla que los extractos de la planta *Lonicera japónica* muestran otras propiedades biológicas y farmacéuticas como protección antibacteriana, antiinflamatoria, antiviral y hepática.

2.4. Productos naturales

Los componentes químicos de las plantas son abundantes y de estructura variada, se pueden clasificar de acuerdo a su naturaleza química: productos naturales orgánicos, aquellas sustancias que proceden del metabolismo primario o secundario; productos naturales inorgánicos que corresponden al agua y los minerales. Dentro de los elementos existentes en las drogas vegetales pueden contener: principios activos, coadyuvantes, principios activos antagonistas, sustancias con valor diagnósticos, de interés tecnológico, dietético y nutricional, así como saborizantes, aromatizantes, entre otros componentes (Kuklinski, 2003, pp.51-52).

2.4.1. Biosíntesis de productos naturales

Los productos naturales pueden proceder de tres tipos de rutas biosintéticas, la ruta del ácido shikímico, ruta del acetato-malonato o conocido como ruta de los policétidos y ruta del acetato-

mevalonato o ruta del ácido mevalónico, como se observa en la Ilustración 6-2 (Kuklinski, 2003, p. 53). Existen casos en los que un metabolito secundario no procede solo de una ruta sino de varias. Se detalla a continuación en la Tabla 2-2. Las rutas biosintéticas de algunos productos naturales:

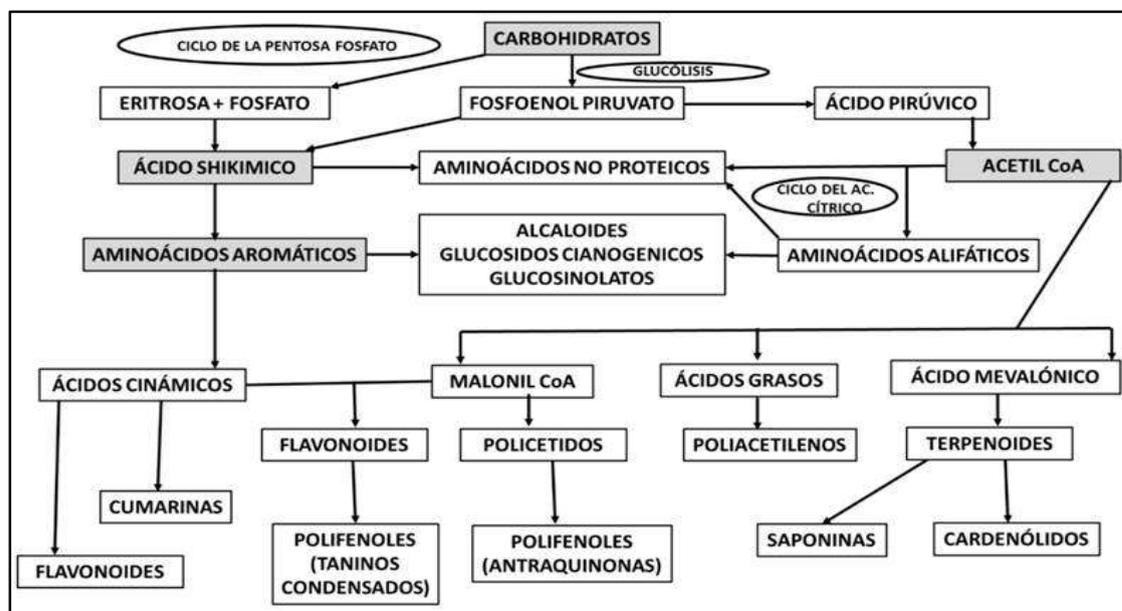


Ilustración 6-2: Metabolitos secundarios vegetales y sus rutas metabólicas

Fuente: (Camacho et al., 2020)

Tabla 2-2: Rutas biosintéticas de los metabolitos secundarios

Ácidos fenólicos	Ruta del ácido shikímico
Taninos	Ruta del ácido shikímico
Flavonoides	Ruta del ácido shikímico y ruta de los policétidos
Alcaloides	Ruta del ácido shikímico y ruta del ácido mevalónico
Antraquinonas	Ruta de los policétidos
Lignanos y cumarinas	Ruta del ácido shikímico
Esteroides	Ruta del ácido mevalónico
Terpenos	Ruta del ácido mevalónico

Fuente: (Kuklinski, 2003, p. 53)

2.4.2. *Metabolismo primario*

Hace referencia a todos aquellos procesos químicos fundamentales que la planta realiza para tener un crecimiento, desarrollo y reproducción óptimo, que resulte en su supervivencia. Intervienen en procesos como la fotosíntesis, glicólisis, ciclo del ácido cítrico, síntesis de aminoácidos, síntesis de materiales estructurales, duplicación del material genético, reproducción de células, absorción de nutrientes, etc. (Almaraz et al., 2006).

2.4.3. *Metabolismo secundario*

Este proceso abarca las actividades metabólicas que ayudan a la interacción ecológica entre la planta y el ambiente (Brunel 2017). Los productos obtenidos se denominan metabolitos secundarios, los cuales no son indispensables para el crecimiento y la vida de las plantas, entre ellos se encuentran los terpenos, compuestos fenólicos, cumarinas, glicósidos y alcaloides (Ávalos y Pérez, 2009, pp.121-122).

Algunos actúan como antimicrobianos y cumplen la función de atrayentes o, por el contrario, de repelentes, ya que se producen en respuesta al estrés. Estos compuestos se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros, en este caso la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios de las plantas permite descubrir nuevos productos o enfoques para el tratamiento de enfermedades (Teoh, 2015, pp.59-73).

2.5. Extractos vegetales

2.5.1. *Generalidades*

Los extractos vegetales son compuestos producidos de la obtención de sustancias biológicamente activas presentes en los tejidos de distintas partes de una determinada planta, por medio del uso de un solvente ya sea agua, alcohol, la mezcla de estos o a su vez otro solvente selectivo y un proceso de extracción adecuado. La elección del solvente depende del tipo de planta, la parte de la planta a extraer, la naturaleza de los compuestos bioactivos y la disponibilidad del solvente. En general, los solventes polares como el agua, el metanol y el etanol se usan en la extracción de compuestos polares, mientras que los solventes no polares como el hexano y el diclorometano se usan en la extracción de compuestos no polares (Abubakar y Haque, 2020).

2.5.2. *Clasificación*

Según el proceso y la calidad intrínseca, los extractos de plantas se pueden dividir en extractos simples, extractos cuantitativos, extractos estandarizados y extractos purificados (Keller, 2021). Según la forma del producto y del grado de concentración de solventes extractivos se clasifican en:

- **Extractos fluidos:** También conocidos como extractos líquidos, son preparaciones de drogas vegetales que contiene alcohol como disolvente o como preservante, o ambos,

preparados de tal manera que cada mililitro contiene los constituyentes extraídos de 1 g del material crudo que representa (Amaguaña y Curichumbi, 2018).

- **Extractos secos:** Estos se obtienen evaporando todo el solvente hasta que tienen una consistencia en polvo. Son altamente estables, aunque en ocasiones resultan ser higroscópicos, además son de fácil manipulación y se les puede utilizar para preparar tinturas de extractos fluidos (Amaguaña y Curichumbi, 2018).
- **Extractos semisólidos:** También se conocen como extractos blandos y tienen una riqueza superior a la droga de partida, se obtienen evaporando el disolvente hasta obtener un producto de textura semisólida pero que no moja el papel de filtro (Amaguaña y Curichumbi, 2018).
- **Crioextractos:** Se obtiene por molturación de la droga vegetal correctamente desecada, sometida a condiciones de congelación (-196 °C), mediante inyección de nitrógeno líquido, de forma que los principios activos no se ven alterados por la acción del calor desprendido en un proceso de molturación y que, dependiendo de la droga vegetal, puede llegar a ser hasta 70 °C (Amaguaña y Curichumbi, 2018).

También se puede clasificar por el disolvente utilizado, los más comunes son:

- Alcohol y agua (extractos hidroalcohólicos o tinturas).
- Aceite (oleados)
- Glicólicos
- Hidrosolubles (Iribarren, 2012).

2.6. Métodos de extracción

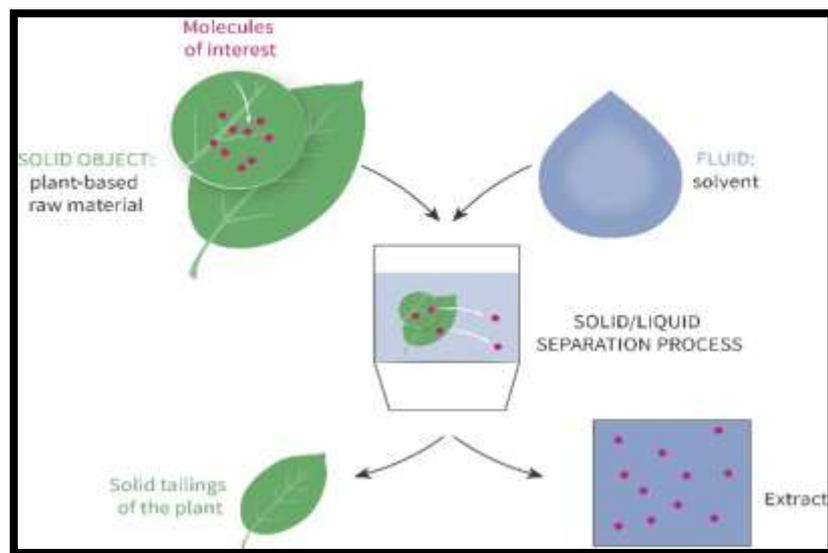


Ilustración 7-2: Proceso general de Extracción vegetal

Fuente: Oest, 2019.

Las plantas al ser la principal fuente de sustancias biológicamente activas aportan al desarrollo de medicamentos por lo que es necesario elegir los métodos correctos, efectivos, y selectivos de extracción y asilamiento de estos compuestos naturales para obtener un mayor beneficio terapéutico, es así que en la actualidad se encuentra disponible una amplia gama de tecnologías que utilizan varios métodos de extracción (Ilustración 7-2).

2.6.1. Maceración

La maceración consiste en remojar los materiales vegetales (gruesos o en polvo) en un recipiente sellado con solvente y mantenerlos a temperatura ambiente durante al menos 3 días con agitación frecuente (Bryda y Stadnytska, 2021). Tal retención con el solvente tiene por objeto ablandar y destruir la pared celular de la planta y, como consecuencia, para liberar fitoquímicos solubles. Después de 3 días, la mezcla se filtra. En este método convencional, el calor se transfiere por convección y conductividad, y la elección de los solventes determinará el tipo de compuesto a extraer.

2.6.2. Percolación

El material vegetal se tritura hasta quedar en polvo posteriormente se coloca en un equipo llamado percolador para la impregnación (infiltración), luego se agrega agua hervida y las muestras se maceran durante 2 horas. El proceso de impregnación se suele realizar a un ritmo moderado ya que el solvente de extracción se agrega continuamente, por ejemplo, 5 gotas/min hasta antes de la evaporación para obtener extractos concentrados el cual se recolectará simultáneamente (Bryda y Stadnytska, 2021, pp.1740-1741).

2.6.3. Infusión

En caso de infusión las muestras se sumergen en agua fría o hervida. Sin embargo, el período de maceración por infusión es más corto y la muestra se hierve en un volumen específico de agua durante un cierto tiempo para la decocción (Bryda y Stadnytska, 2021). La decocción solo es adecuada para extraer compuestos resistentes al calor de materiales vegetales sólidos, por ejemplo, raíces y cortezas.

2.7. Técnicas de separación

Estos métodos constan de varios procedimientos físicos que permiten separar dos o más componentes de una mezcla, las cuales pueden estar constituidas por sustancias sólidas o ser

mezclas líquidas de distinta naturaleza, pueden ser extractos crudos o brutos, totales o parciales (Flores 2017,p. 1). Es importante mencionar que los componentes de la mezcla conservan su identidad y sus propiedades químicas luego del procedimiento (Ondarse 2021). Las técnicas más comunes son la evaporación, destilación, filtración y cromatografía.

2.7.1. Cromatografía

La cromatografía se fundamenta en la separación producida al arrastrar los componentes de una mezcla a través de una fase móvil a lo largo de una fase estacionaria. La fase móvil puede ser un líquido o un gas y la estacionaria puede ser un sólido o un líquido. Hay muchas opciones de fases estacionarias, algunas de las cuales son alúmina, sílice e incluso papel. La fase móvil, en cromatografía líquida, también puede variar. A menudo es un solvente o una mezcla de solventes y a menudo se lo denomina eluyente (López et al., 2005).

2.7.2. Cromatografía en capa fina

Esta es una técnica analítica que se abrevia como TLC (*Thin Layer Chromatography*), que utiliza un material absorbente en placas de vidrio planas. Este es un método simple y rápido que comprueba la pureza de compuestos orgánicos (Marcano y Hasegawa, 2002, pp. 69-72) .

La cromatografía en capa fina consiste en la separación de los componentes de una mezcla a través de la migración deferencial sobre una capa fina de adsorbente, retenida sobre la superficie plana. La muestra que va a ser analizada se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie adsorbente inerte (sílica, alúmina, etc.) distribuida uniformemente. Es una técnica importante ya que permite proporcionar información sobre la homogeneidad de los componentes químicos del producto y garantizar que las sustancias responsables de la actividad farmacológica estén presentes (Castillo et al. 2017).

2.8. Técnicas de análisis

2.8.1. Espectroscopía infrarroja (IR)

La espectroscopia IR se ocupa de la región infrarroja del espectro electromagnético, es decir, la luz que tiene una longitud de onda más larga y una frecuencia más baja que la luz visible. El principal uso de la espectroscopia infrarroja es determinar los grupos funcionales de las moléculas relevantes, tanto para la química orgánica como para la inorgánica. Se puede analizar de tres maneras: midiendo la reflexión, la emisión y la absorción (Kesharwani, 2019) .

2.9. Tamizaje fitoquímico

El tamizaje Fitoquímico, también conocido como “screening” fitoquímico preliminar es el punto de inicio de una investigación, es así es utilizado para determinar la presencia o ausencia de los principales grupos de metabolitos en una especie vegetal, a saber: alcaloides, antraquinonas y naftoquinonas, esteroides y triterpenos, flavonoides, taninos, saponinas, cumarinas, lactonas terpénicas y cardiotónicos, utilizando los solventes adecuados ya sea agua, alcohol o éter, además de la aplicación de reacciones de coloración y los resultados de las reacciones son reportados como (+) o (-) para el metabolito de que se trate. (Carrasco y Lara, 2014, p. 25). Dado que cada uno de estos grupos de compuestos está relacionado con actividades biológicas específicas, partiendo de los resultados obtenidos en el estudio fitoquímico preliminar es posible orientar investigaciones posteriores para determinar la actividad biológica de las especies en cuestión y los principios activos involucrados (Carvajal et al., 2009).

2.9.1. Ensayos para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios

Para los extractos alcohólicos, etéreo y acuoso de una planta se deben realizar varias pruebas para identificar la presencia de metabolitos secundarios (Pereira et al. 2009, pp. 196-197).

2.9.1.1. Detección de alcaloides

Los alcaloides se derivan de los aminoácidos por lo que en su estructura contienen nitrógeno en un anillo heterocíclico (Ilustración 8-2). En el análisis fitoquímico preliminar las técnicas de reconocimiento son basadas en la capacidad que tienen los alcaloides en estado de sal (extractos ácidos), de combinarse con el yodo y metales pesados formando precipitados con reactivos como el mercuriyoduro de potasio (de Mayer) y yoduro de bismuto (Dragendorff) (Safeena y Kalinga, 2020a, p.95).

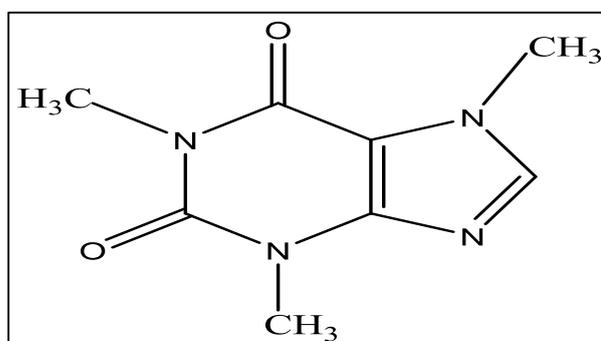


Ilustración 8-2: Estructura química de alcaloides

2.9.1.2. Detección de cumarinas

La identificación cualitativa de estos metabolitos se realiza por medio de la prueba de Erlich, donde se genera una lactonización del ácido cis-O-hidroxicinámico o ácido cumarínico, determinándose la presencia de grupo furano (Ilustración 9-2), formándose una coloración naranja (Ochoa y Sarmiento, 2018, p.31).

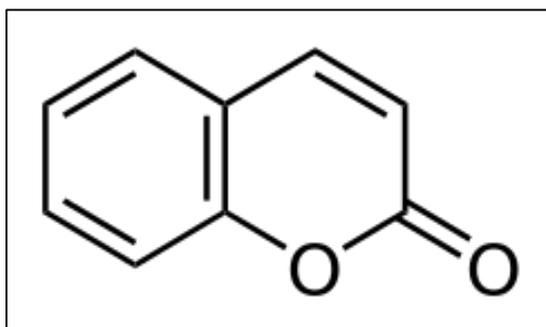


Ilustración 9-2: Estructura de una cumarina

2.9.1.3. Detección de flavonoides

Los flavonoides tienen naturaleza fenólica, se caracterizan por tener tres anillos: dos anillos de benceno (A y B) y un anillo heterocíclico (c), en la Ilustración 10-2 se observa un ejemplo de la estructura de un flavonoide. Para su identificación se realiza el ensayo de Shinoda el cual se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo, intensos en todos los casos (Soto, 2015, p.137), o a su vez la prueba de reactivo alcalino (NaOH al 10%), en donde se considera positivo al cambiar de color de amarillo a una solución clara (Safeena y Kalinga, 2020b, p.95).

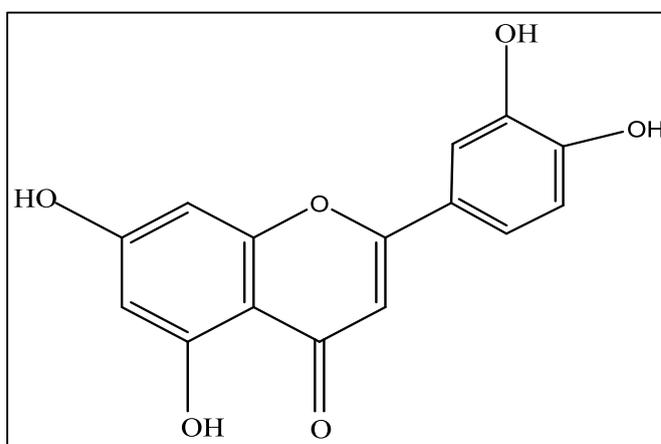


Ilustración 10-2: Estructura química de un flavonoide

2.9.1.4. Detección de taninos

Los taninos son compuestos fenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, su estructura es compleja y presentan masas moleculares altas (Ilustración 11-2) El ensayo de gelatina-sal sirve para reconocer la presencia de estos compuestos en un extracto vegetal, en donde los taninos reaccionan con las proteínas formando compuestos insolubles; por lo tanto, se observará un precipitado (Ochoa y Sarmiento, 2018, p.29). También se utiliza la prueba de cloruro férrico, en la que, la aparición de color negro azulado o verde azulado muestra la presencia de taninos (Safeena y Kalinga, 2020f, p.95).

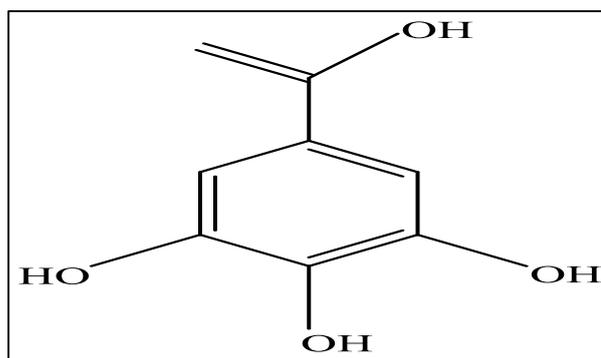


Ilustración 11-2: Estructura química de un tanino

2.9.1.5. Detección de quinonas / antraquinonas

Las quinonas son compuestos carbonílicos α - β insaturados (Ilustración 12-2), los cuales se clasifican en benzoquinonas, naftoquinonas o antraquinonas si son estructuras monocíclicas, bicíclicas o tricíclicas, respectivamente. Para la identificación de estos compuestos se realiza el ensayo de Borntrager, el cual se fundamenta en la hidrólisis de los enlaces glicosídicos, produciendo una oxidación de las antronas y los antranoles hasta antraquinonas generando la formación de complejos de color rojo (Ochoa y Sarmiento, 2018, p.31).

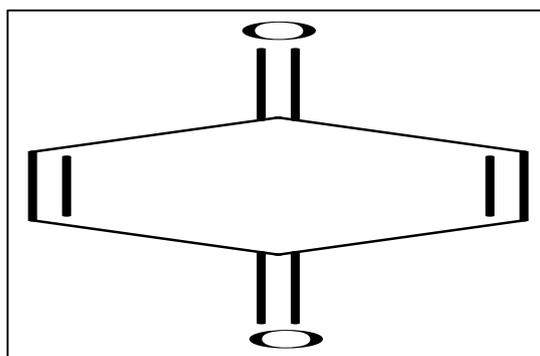


Ilustración 12-2: Estructura de una quinona

2.9.1.6. . Detección de saponinas

Desde el punto de vista químico las saponinas (Ilustración 13-2) son glucósidos que liberan por hidrólisis una o más unidades de azúcares y aglicones libres de azúcares, que son derivados de sistemas de anillos policíclicos (sapogeninas). Uno de los métodos para su identificación están basados en propiedades físico-químicas que presentan las soluciones acuosas de saponinas que, al disminuir la tensión superficial de los líquidos acuosos, provoca abundante espuma por agitación (Donald et al., 2017, p. 35). Otra forma de reconocer las saponinas es el uso del reactivo Rosenthaler; la aparición de una coloración violeta, se considera positiva para sapogeninas triterpenoidales y una coloración verde para sapogeninas esteroidales (Olivo, 2015, p. 35).

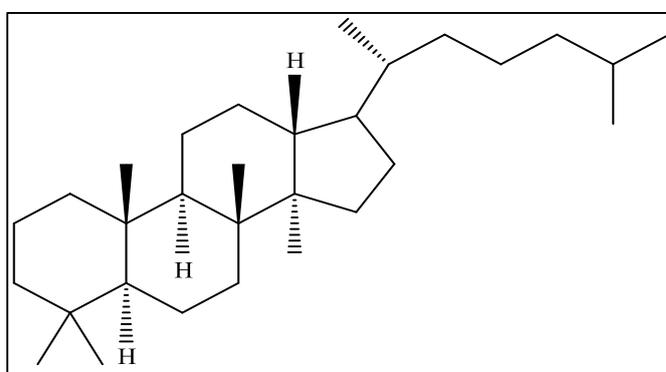


Ilustración 13-2: Estructura química de una saponina

2.9.1.7. Detección de triterpenos y esteroides

Los triterpenos y los esteroides poseen un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6 (Ilustración 14-2), el ensayo correspondiente para su identificación es de Lieberman- Buchard, se considera positivo para triterpenos cuando hay una variación de color de roja o rosado a púrpura o azul y finalmente a un tono verde oscuro; mientras que, para indicar la presencia de esteroides, hay una formación de un color rosa oscuro o rojo o un anillo marrón rojizo (Bermejo et al., 2014, p. 675)

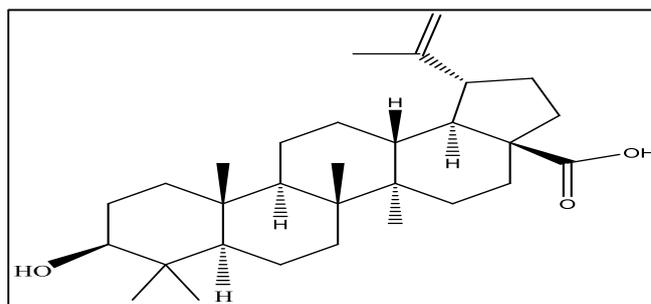


Ilustración 14-2: Estructura química de un triterpeno

2.10. Actividad antibacteriana

La actividad antimicrobiana es la capacidad que presenta un compuesto para inhibir el aumento de una población bacteriana o para eliminarla, y que se puede expresar cuantitativamente con pruebas in vitro. Se puede medir en CIM o en CBM, y permite comparar diferentes compuestos (Fica, 2005, pp. 80-110).

2.10.1. Principales grupos de compuestos antimicrobianos de plantas naturales

La parte aérea de las plantas, especialmente las hojas poseen una gran cantidad de componentes es así que, se ha logrado aislar aproximadamente 12.000 compuestos en donde solo el 10% corresponden a metabolitos secundarios. Ciertas plantas poseen capacidad de combatir agentes patógenos llegando a destruirlos o inhibirlos parcialmente en su desarrollo y crecimiento, por lo que un antibiótico natural posee la capacidad de ser bactericida o bacteriostático frente a un ente patógeno (Domingo y López 2021, p. 386),

Los principales grupos de compuestos fitoquímicos antimicrobianos en las plantas encontramos:

Compuestos fenólicos: Son un conjunto de compuestos que presentan en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, por lo general se presentan como glicósidos, combinados con unidades de azúcar. Son bactericidas o bacteriostáticos, dependiendo de la concentración a la que se use, algunos compuestos fenólicos actúan como fungicidas, su actividad se reduce a un pH alcalino y por material orgánico. Entre los principales compuestos fenólicos con actividad bactericida tenemos:

Fenoles y polifenoles: El ácido cafeico y el cinámico son representantes de estos grupos, ambos con acción antimicrobiana, antiviral y antifúngica.

Quinonas: Son anillos aromáticos con dos sustituciones cetónicas. El rango de la actividad antimicrobiana de las quinonas es amplio, actuando posiblemente sobre las adhesinas expuestas en la superficie de las bacterias, sobre los polipéptidos de la pared celular y sobre las enzimas unidas a membranas

Flavonas, Flavonoides y Flavonoles: Son estructuras fenólicas que contienen un solo grupo carbonilo. Estos compuestos son sintetizados por las plantas en respuesta a la infección antimicrobiana, y su actividad sobre las bacterias

Taninos: En las plantas, los taninos tienen una acción inhibitoria del crecimiento de insectos y perturban la digestión de rumiantes. Se cree que la actividad antimicrobiana de estos compuestos se debe a su interacción sobre las adhesinas, proteínas de la pared celular, y a su capacidad de unirse a polisacáridos.

Cumarinas: Son compuestos de los cuales se conoce muy bien su acción antitrombótica, antiinflamatoria y vasodilatadora.

Terpenoides y aceites esenciales: Son activos contra bacterias, virus, hongos y protozoarios (Araujo y Salas, 2008).

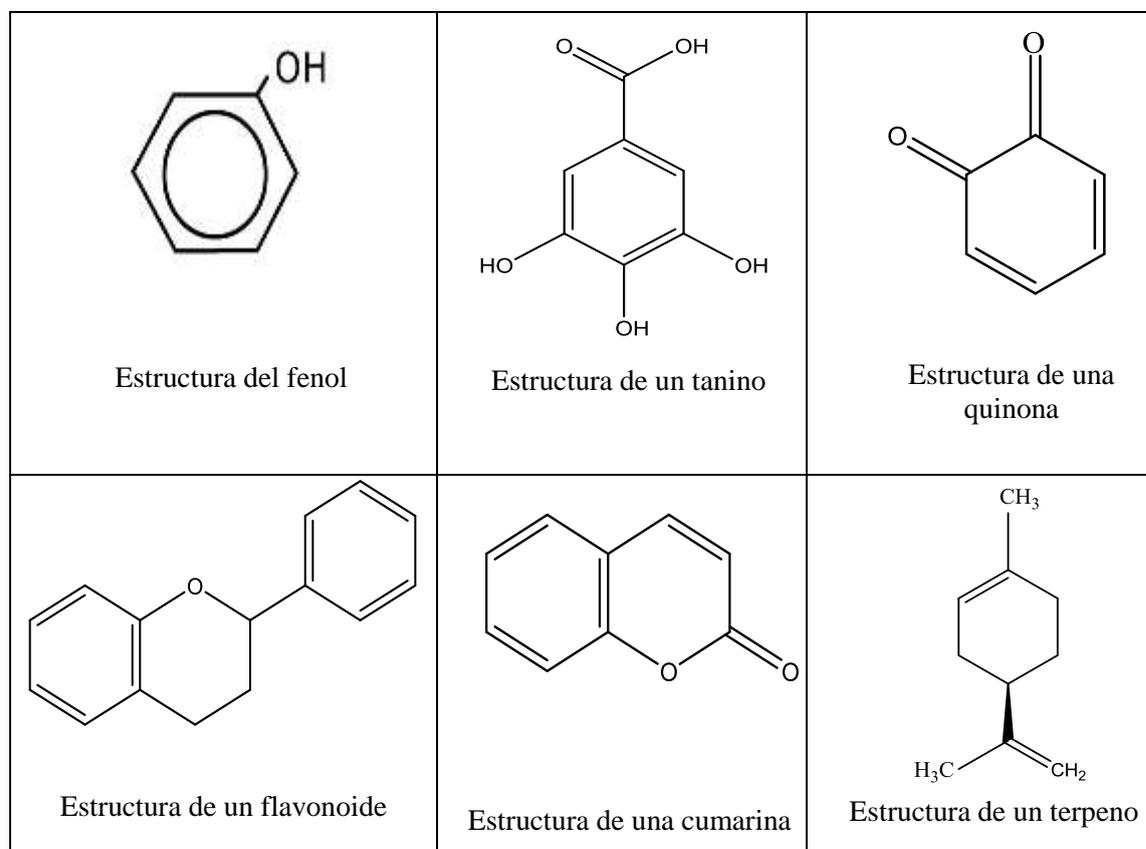


Ilustración 15-2: Estructura química de compuestos fenólicos con actividad bactericida

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

2.11. Bacterias

Son un grupo diverso de microorganismos unicelulares, procariotas, que se pueden encontrar prácticamente en cualquier ambiente, viven en el suelo, agua, aire, y como simbioses tanto de animales, plantas y el ser humano. Solo unos pocos tipos de bacterias causan enfermedades,

conocidas como patógenos. A veces, bajo ciertas condiciones, la flora bacteriana residente puede actuar como patógeno y causar enfermedades en el hombre (Bush, 2022).

2.11.1. Estructura

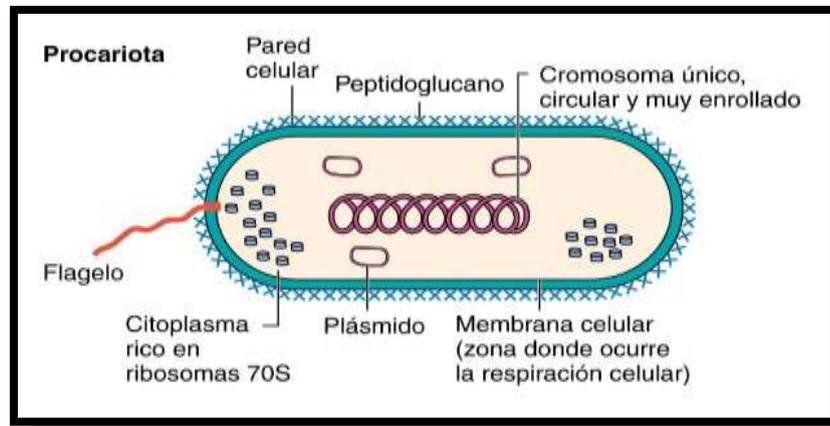


Ilustración 1615-2: Estructura de la célula procariota

Fuente: Olmo 2019.

La estructura bacteriana (Ilustración 21-2) es la anatomía de las bacterias las cuales son posibles de observar a través de un microscopio, estas estructuras pueden ser permanentes o variables dependiendo de las condiciones donde se desarrolle el microorganismo. Dentro de las estructuras permanentes abarcan la pared celular, la membrana celular, los ribosomas y el material genético y las estructuras variables son los flagelos, las fimbrias o pilis, la cápsula y las esporas, cabe recalcar que las últimas no son esenciales para la vida de la bacteria.

Además, podemos clasificar las estructuras bacterianas en internas o citoplásmicas y externas o de la envoltura celular. Dentro de las internas destacamos el material genético, los ribosomas y los cuerpos de inclusión. La envoltura celular engloba la membrana plasmática, la pared celular que la recubre, la cápsula y los apéndices como fimbrias o pilis y flagelos. Contiene los sitios de transporte para nutrientes, interviene en la relación huésped parásito, es blanco de las reacciones del sistema inmune y puede contener estructuras tóxicas para el huésped (Pérez y Mota, 2009, pp. 27-40).

2.11.2. Clasificación de las bacterias

Las bacterias se pueden clasificar en varias categorías de acuerdo a sus características, de modo que están principalmente basados en los siguientes parámetros:

2.11.2.1. Según su morfología

La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular, de acuerdo a la Ilustración 22-2 básicamente, se diferencian según su forma en cocos, que pueden ser esféricas u ovaladas, bacilos que se presentan de forma cilíndrica o de bastones; rectos o curvos y espirilos (Pérez y Mota, 2009, pp. 24-25).

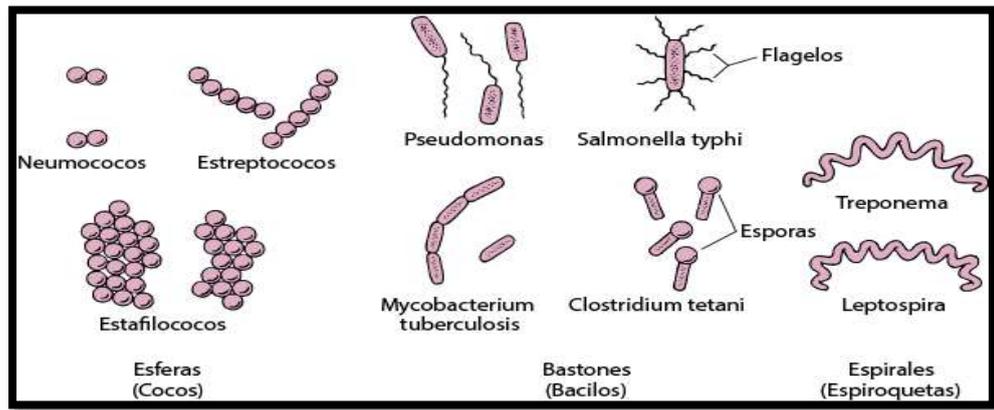


Ilustración 17-2: Morfología bacteriana

Fuente: (Bush, 2022).

2.11.2.2. Según la composición de la pared celular

Dependiendo de la estructura de la pared celular las bacterias se dividen en dos grandes grupos como se observa en la Ilustración 23-2, las Gram positivas, que tras la tinción aparecen de color violeta, y las Gram negativas, que se tiñen de rosa (Bruslind, 2021). La pared de las bacterias Gram positivas posee una gruesa envuelta con múltiples capas de peptidoglicano, además, poseen ácido teicóico y lipoteicóico, polímeros de alcoholes como el glicerol o el ribitol; la de las Gram negativas por el contrario es fina y formada por una sola capa, presentan una membrana plasmática situada fuera de las capas de peptidoglicano, conocida como membrana externa, compuesta por una bicapa lipídica (Rodríguez y Arenas, 2018, pp. 166-167).

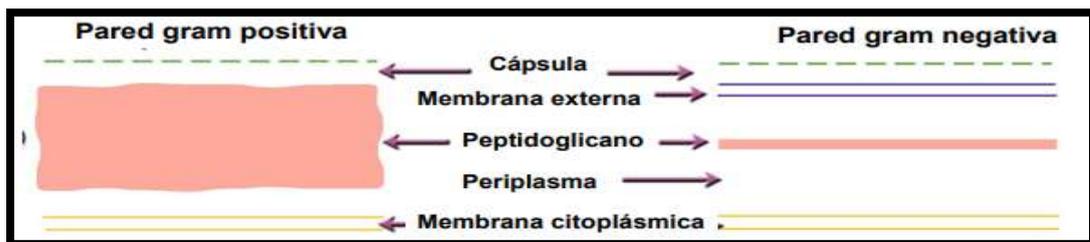


Ilustración 18-2: Diferencias entre la pared de las Gram positivas y las Gram negativas.

Fuente: OCW, 2018.

2.11.2.3. Según el tipo de respiración

Las bacterias de acuerdo a la necesidad de oxígeno para vivir y crecer pueden clasificarse en:

- Aerobias: Las que necesitan oxígeno.
- Anaerobias: Las que no necesitan oxígeno y tienen problemas para vivir o crecer cuando hay oxígeno.
- Facultativas: Aquellas que pueden vivir y crecer con o sin oxígeno.

2.11.2.4. Según el tipo de nutrición

Bacterias autótrofas: Producen sus propias sustancias a partir de fuentes inorgánicas como la luz del sol.

Bacterias heterótrofas: Se alimentan a partir de otros seres vivos, estas bacterias generalmente actúan como descomponedores y hacen que los nutrientes estén disponibles para los demás seres vivos (Caycedo et al., 2021, pp.53-54).

2.12. Descripción de las bacterias en estudio

2.12.1. *Staphylococcus aureus*

Son cocos Gram positivos, con 1 μm de diámetro. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsulas. Se agrupan como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimo de uvas. Son anaerobios facultativos, productores de catalasa, son bastante resistentes al frío y al calor y toleran altas concentraciones de salinidad (7,5 % de NaCl). Comúnmente no requieren medios enriquecidos para crecer, la mayoría de las especies crecen después de 18- 24 horas de incubación (Cervantes et al., 2014). Se considera que *Staphylococcus aureus* como la principal causa de infecciones de la piel y los tejidos blandos (McCaig et al 2006).

2.12.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Es una bacteria pertenece Gram negativa con forma de bacilo, con un tamaño de 0,5 a 3,0, Tiene un metabolismo aeróbico, no fermentativa y es móvil gracias a la presencia de un flagelo polar. Se considera como un patógeno oportunista. Es un microorganismo altamente versátil, capaz de tolerar condiciones bajas de oxígeno (De Sousa et al., 2021).

Puede sobrevivir con bajos niveles de nutrientes y crecer en rangos de temperatura de 4 a 42°C. Estas características le permiten adherirse, sobrevivir en equipos médicos y en otras superficies hospitalarias. Lo anterior favorece el inicio de infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos.

Las infecciones por *Pseudomonas* pueden aparecer en muchos sitios anatómicos, entre ellos, la piel, los tejidos subcutáneos, el hueso, los oídos, los ojos, las vías urinarias, los pulmones y las válvulas cardíacas. El sitio afectado varía según la puerta de entrada y la susceptibilidad del paciente (Ochoa et al., 2013).

La transmisión se produce principalmente a través del contacto de la piel lesionada o reblandecida y de las mucosas con el agua o con los objetos contaminados (Bush y Vázquez, 2022)

2.12.3. *Staphylococcus epidermidis*

Es una bacteria coco Gram positiva, es catalasa positivo, coagulasa negativo, anaerobio facultativo que puede crecer por respiración aeróbica o por fermentación. Forma colonias blancas en agar sangre. Los huéspedes del son humanos y otros animales de sangre caliente (Fernández, 2010).

Por otro lado, *Staphylococcus epidermidis* es un microorganismo comensal beneficioso en la piel intacta, pero la alteración de esta barrera, ya sea por mutación genética o alteración física, puede alterar drásticamente el comportamiento de *S. epidermidis* de benigno a patógeno, es por esta razón que esta bacteria es la fuente más común de infecciones en dispositivos médicos ya que al ser un colonizador permanente y ubicuo de la piel humana hay una alta probabilidad resultante de contaminación del dispositivo durante la inserción (Brown y Horswill, 2020).

2.13. Antibiótico

2.13.1. Concepto

Los antibióticos son aquellas sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos o sintetizados químicamente, que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos y producir su destrucción a partir de ellas se han elaborado sustancias para uso sistémico y tópico cuya indicación se ajusta a las necesidades terapéuticas determinadas por la naturaleza del cuadro infeccioso del paciente y el criterio médico (Sáenz y Sánchez, 2005, pp. 7-10).

2.13.2. Clasificación

2.13.2.1. Según su origen

- Antibióticos Biológicos: Aquellos que son sintetizados por organismos vivos, ej. Penicilina, Cloranfenicol
- Antibiótico Semisintéticos: Aquellos que se obtiene a partir de una modificación química de los antibióticos naturales. Ej. Ampicilina.
- Antibióticos Sintéticos: Aquellos que se generan por una síntesis química (Centrón, 2018).

2.13.2.2. Según el mecanismo de acción

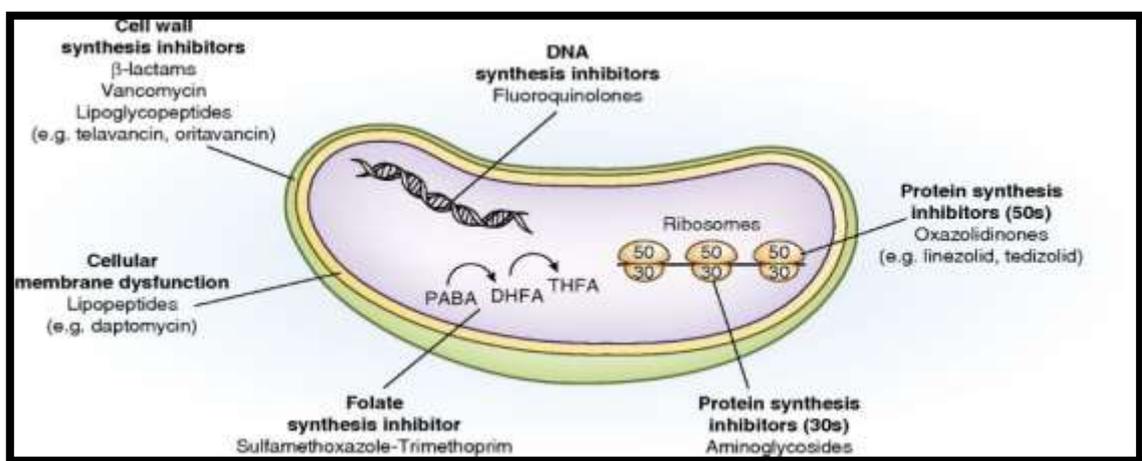


Ilustración 19-2: Sitio de acción de los antimicrobianos

Fuente: (Eyler y Shvets, 2019)

Inhibidores de la formación de la pared bacteriana: La pared celular protege la integridad de la bacteria y soporta su gran presión osmótica interna. La ausencia de esta estructura provocará la destrucción del microorganismo, inducida por el elevado gradiente de osmolaridad que suele existir entre el medio y el citoplasma bacteriano. La síntesis de la pared celular se desarrolla en 3 etapas, sobre cada una de las cuales pueden actuar diferentes compuestos: la etapa citoplásmica, donde se sintetizan los precursores del peptidoglucano; el transporte a través de la membrana citoplásmica, y la organización final de la estructura del peptidoglucano, que se desarrolla en la parte más externa de la pared (Ilustración 24-2) (Calvo y Martínez 2009 a, p. 45).

Inhibidores de la membrana citoplásmica: La membrana citoplásmica es vital para todas las células, ya que interviene activamente en los procesos de difusión y transporte activo, y de esta forma controla la composición del medio interno celular. Las sustancias que alteran esta

estructura modifican la permeabilidad, y provocan la salida de iones potasio, elementos esenciales para la vida bacteriana, o la entrada de otros que a altas concentraciones alteran el metabolismo bacteriano normal. Los antimicrobianos que actúan en esta estructura se comportan como bactericidas, incluso en bacterias en reposo, y pueden tener alta toxicidad sobre las células humanas, al compartir algunos componentes de la membrana citoplasmática (Calvo y Martínez 2009b, p. 47).

Inhibidores de la síntesis proteica: La síntesis proteica es uno de los procesos más frecuentemente afectados por la acción de los antimicrobianos, y su inhibición selectiva es posible gracias a las diferencias estructurales entre los ribosomas bacterianos y eucariotas. En esta estructura diferentes componentes pueden ser lugares de unión para los antimicrobianos. La mayoría de los antibióticos de este grupo tienen actividad bacteriostática, aunque los aminoglucósidos se comportan como bactericidas. La acción bactericida o bacteriostática también va a depender de las concentraciones del antimicrobiano, y del microorganismo afectado (Calvo y Martínez, 2009c, p. 48).

Inhibidores de la duplicación del ADN: Dentro de este grupo incluimos las rifamicinas y las quinolonas que actúan en enzimas que participan en los procesos de transcripción y replicación, y los nitroimidazoles y nitrofuranos que actúan directamente sobre el ADN, dañándolo. Por lo general, los antibióticos de este grupo no son particularmente selectivos en su acción y comportan cierta toxicidad para las células eucarióticas. La mayoría de los antibióticos que actúan sobre el ADN son bactericidas rápidos y normalmente independientes del inóculo y de la fase de crecimiento bacteriano (Calvo y Martínez, 2009d, p. 51).

Inhibidores de vías metabólicas: Antibióticos como las sulfamidas y la trimetoprima, inhiben vías metabólicas que impiden el crecimiento bacteriano ya que inhiben diferentes pasos en la vía de síntesis del folato; tienen por lo tanto acción bacteriostática. Es importante mencionar que los folatos son compuestos críticos para la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Cuando ambas drogas se administran en forma conjunta, su acción es bactericida (British Society for Antimicrobial Chemotherapy, 2021).

2.14. Determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos

Las pruebas de susceptibilidad in vitro se realizan en microorganismos sospechosos de causar enfermedades, particularmente si se cree que el organismo pertenece a una especie que puede mostrar resistencia a los agentes antimicrobianos de uso frecuente (Committee et al., 2003).

La sensibilidad in vitro de las bacterias a los agentes antimicrobianos se puede ensayar mediante varios métodos disponibles en el laboratorio, en este estudio se realizarán por dos métodos que se describen a continuación:

2.14.1. Método de Kirby - Bauer o difusión en disco

Este método cualitativo de acuerdo al *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) es adecuado para los microorganismos de crecimiento rápido permitiendo determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico (Pedrique 2002).

Consiste en utilizar un disco de papel de filtro de 6 mm impregnado con una concentración conocida de un compuesto antimicrobiano se coloca en un agar Mueller-Hinton (MH), inmediatamente el agua se absorbe en el disco del agar. El antimicrobiano comienza a difundirse en el agar circundante. La tasa de la difusión a través del agar no es tan rápida como la velocidad de extracción del antimicrobiano fuera del disco, por lo tanto, la concentración de antimicrobiano es el más alto más cercano al disco y una reducción logarítmica en la concentración ocurre a medida que aumenta la distancia desde el disco.

La tasa de difusión del antimicrobiano a través del agar depende de la difusión y propiedades de solubilidad del fármaco en agar MH y el peso molecular del compuesto antimicrobiano. Las moléculas más grandes se difundirán a una velocidad más lenta que los compuestos de menor peso molecular. Estos factores, en combinación, dan como resultado que cada antimicrobiano tenga un punto de corte único tamaño de la zona que indica la susceptibilidad a ese compuesto antimicrobiano (Hudzicki, 2012, pp. 2-3)

2.14.2. Método de dilución

Este método es utilizado para medir de forma cuantitativa la actividad de un antimicrobiano in vitro frente a un cultivo de bacterias de interés se caracteriza por ser preciso en sus resultados. Para su realización se debe preparar una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico (ATB) en distintas concentraciones.

Posteriormente se inocula cada uno de los tubos o placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio. Después se deja incubar toda la noche a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para poder examinar las muestras y así determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado (Cavalier et al., 2005, pp. 2-4).

El uso de la prueba de difusión en disco o también llamado Kirby- Bauer contribuye a los resultados obtenidos con el método de microdilución al establecer una “zona de inhibición” con la que se puede medir la eficacia del antibiótico en cuestión (Jorgensen, 2018).

2.15. Interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos

En todos los métodos descritos se produce como resultado un valor numérico, bien en forma de mm de diámetro, bien en forma de CMI o CMB. Dichos valores pueden tener un valor absoluto en sí mismos, fundamentalmente los resultados de CMI y CMB, ya que pueden representar las concentraciones mínimas que se deben alcanzar en el lugar de la infección para que dicho tratamiento sea eficaz. Sin embargo, en muchas ocasiones esta traslación no se puede realizar o es muy compleja, con lo que en la mayoría de los casos es recomendable categorizar dichos valores numéricos en forma de interpretaciones cualitativas que informen de la susceptibilidad de cada uno de los antimicrobianos frente a un determinado germen (Calvo y Martínez, 2009).

La International Organization for Standardization definió 3 categorías para la interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos, en función de la probabilidad del éxito o del fracaso terapéutico (Cantón, 2010, p.376):

- **Sensible:** cuando un aislado bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el éxito terapéutico.
- **Intermedio:** cuando un aislado bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a un efecto terapéutico incierto.
- **Resistente:** cuando un aislado bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el fracaso terapéutico.

2.16. Resistencia bacteriana a los antibióticos

La resistencia bacteriana a un medicamento antimicrobiano se ha convertido en un proceso natural en donde las bacterias adquieren cierta tolerancia hacia nuevas condiciones ambientales, se puede presentar de dos formas, la natural que es propia de cada microorganismo y la adquirida aparece como consecuencia de mecanismos de defensa que van desarrollando los microorganismos ante la exposición a los antimicrobianos o a través de procesos bioquímicos (Pelczar, et al., 1987, p. 11-425).

El uso inadecuado de los antibióticos es uno de los factores más importantes por los que se ha llegado a la alarmante situación actual: empleo de antibióticos sin prescripción médica, tiempo inapropiado de consumo, incumplimiento de los horarios de administración e infra dosificación.

Por otro lado, muchos de los médicos los prescriben innecesariamente, especialmente en patologías de vía aérea superior, de etiología viral en la mayoría de los casos o inclusive en cuadros alérgicos. Según estudios sobre consumo de antibióticos, los cuadros de vía aérea superior son las patologías en las que se emplean antibióticos innecesarios con mayor frecuencia (Farina, 2016, pp.04-05).

Es así como los investigadores de todo el mundo al observar esta problemática en materia de salud pública de forma permanente están estudiando nuevos compuestos centrados en diferentes recursos naturales, principalmente en las plantas, debido a la riqueza en compuestos con diferentes actividades, entre ellas la capacidad de inhibir el crecimiento (Rodríguez et al., 2017).

2.17. Formas farmacéuticas

2.17.1. Concepto

Es la forma física de una dosis de un compuesto químico utilizado como droga o medicamento, el cual está constituido por fármacos (principios activos) y excipientes (materia farmacológicamente inactiva) permitiendo un fácil suministro al organismo (Watts 2022).

2.17.2. Formas farmacéuticas según el estado de la materia

Tabla 3-2: Clasificación de las formas farmacéuticas según el estado de la materia

Estado de la forma farmacéutica	Estériles	No estériles
Sólidos	Polvo estéril para inyección, liofilizados	Comprimidos: tabletas y grageas No comprimidos: cápsulas, polvos, granulados
Líquidos	Homogéneos: soluciones parenterales y oftálmicas Heterogéneos: emulsiones y suspensiones intramusculares	Homogéneos: soluciones (oral, nasal, ótica, tópica), jarabe, elixir Heterogéneos: emulsión, suspensión, aerosoles
Semisólidos	Ungüento oftálmico	Cremas, ungüentos, pomadas, supositorios y geles

Fuente: (López, 2001; citado en Pabón y González, 2017)

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

2.18. Antibióticos tópicos

Al hablar de agentes antimicrobianos se incluye a un gran arsenal de sustancias que van desde agentes antibacterianos (antibióticos), antituberculoso, antimicóticos, antisépticos hasta agentes

antivirales. Con el paso de los años la industria farmacéutica ha visto la necesidad de buscar un antibiótico tópico ideal, seguro y eficaz para su uso con mínimos o nulos efectos adversos para el paciente. Es importante que este formulado posea una buena tolerabilidad, baja incidencia de alergia y una mínima o ausencia de toxicidad además que pueda penetrar en piel y costras (Sáenz y Sánchez, 2005, pp. 7-10).

2.19. Control calidad de las formas farmacéuticas semisólidas

Los ensayos de control de calidad de los productos farmacéuticos semisólidos proporcionan parámetros organolépticos que permiten evaluar inmediatamente el estado en que se encuentra la muestra en estudio por medio de análisis comparativos, como la determinación de olor, color, aspecto, presencia de grumos, tomando en cuenta que se debe utilizar una muestra de referencia, recientemente elaborada, o una muestra del producto, almacenada a temperatura adecuada, para evitar modificaciones en las propiedades organolépticas. También se realizan ensayos físico químicos como la determinación de pH, viscosidad, signo de emulsión, con el objetivo de verificar alteraciones como: separación de fases, precipitación y turbiedad permitiendo el reconocimiento primario del producto, además de detectar futuros problemas que pueden afectar la estabilidad y la calidad del producto (ANVISA, 2005, pp. 32-34).

2.20. La piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y es la que está siempre en contacto con el mundo exterior, por ende, con diversos gérmenes y cualquier agente, producto o sustancia que la agrede puede provocar una irritación, desencadenando una reacción inflamatoria y dañando la barrera protectora cutánea. Uno de los agentes del medio externo e interno, son las bacterias; sin embargo, la piel normal intacta de las personas sanas es muy resistente a la invasión y sólo se infecta bajo determinadas condiciones (Sánchez, 2016, p. 7).

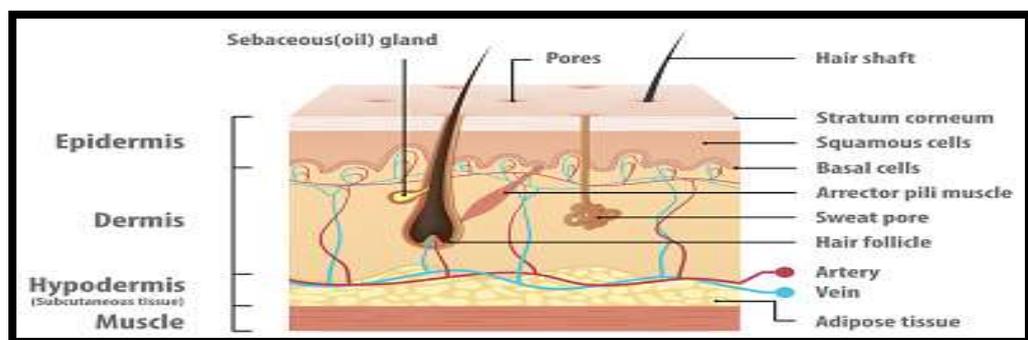


Ilustración 20-2: Estructura de la piel

Fuente: Paladjai, 2018.

2.21. Flora cutánea normal

Desde el momento del parto el ser humano inicia la colonización microbiana cutánea por lo que la piel posee una gran cantidad de microorganismos que viven regularmente como saprófitos generalmente entre las fisuras del estrato córneo y dentro de los folículos pilosos (Ilustración 25-2), son inofensivos, pero que en algunas ocasiones pueden ser patógenos.

Se considera la flora cutánea normal a los cocos aerobios, bacterias corineformes aerobias y anaerobias, bacterias gramnegativas y levaduras. La función de esta microflora es el de brindar protección y prevención en la piel contra microorganismos patógenos. Las infecciones bacterianas pueden afectar a una pequeña zona de la piel o extenderse por toda la superficie corporal. De la misma forma, pueden variar en agresividad, de leves a potencialmente mortales. Muchos tipos de bacterias pueden infectar la piel. Las más frecuentes son los *Staphylococcus* y los *Streptococcus* (Gómez et al., 2004).

2.22. Infecciones bacterianas comunes en la piel

Las infecciones bacterianas de la piel aparecen cuando las bacterias penetran a través de los folículos pilosos o a través de pequeñas fisuras en la piel consecuencia de rasguños, cirugía, quemaduras, mordeduras de animales o insectos, heridas y trastornos cutáneos preexistentes. En la tabla 5-2 se incluyen las infecciones comunes de la piel.

Tabla 4-2: Principales infecciones cutáneas primarias

Infeción cutánea	Agente causal
Impétigo	<i>Staphylococcus aureus</i> , y por <i>Streptococcus pyogenes</i>
Erisipela	<i>Staphylococcus aureus</i> y muy raramente por otros gérmenes.
Foliculitis bacteriana	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomona aeruginosa</i> , <i>estreptococos</i> , <i>Proteus</i> y otros bacilos gram negativos.
Celulitis	Causado por estreptococos beta hemolíticos, grupo A de Lancfield y <i>Staphilococo Aureus</i> .
Forúnculo	Causada por el <i>Staphylococcus aureus</i>
Ántrax	Causada por el <i>Staphylococcus aureus</i>

Fuente: (Gómez et al., 2004)

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Lugar de la investigación

La presente investigación se desarrolló en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia, en los Laboratorios de Productos Naturales, Investigación, Tecnología Farmacéutica y Microbiología.

3.2. Enfoque y diseño de investigación

El presente trabajo será diseñado bajo el planteamiento metodológico del enfoque, de alcance correlacional con un diseño experimental puesto que éstos son los que mejor se adaptan a las características y necesidades de la investigación.

El enfoque cuantitativo implica un proceso de recopilación y análisis de manera objetiva de los datos numéricos para describir, predecir o controlar variables de interés, además de confirmar o refutar una hipótesis propuesta en el apartado 3.3.2 (Hernández, et al., 2010 p.5).

A su vez, se orientó a un alcance correlacional, debido a que se asocian dos variables el de la actividad antimicrobiana y la concentración del extracto etanólico, para ello, primero se miden las variables que determinarían la capacidad antibacteriana del extracto de la planta (Arias, 2006).

Por último, corresponde a un diseño experimental debido a que se refiere a un estudio en el que se manipulan intencionalmente una o más variables independientes, para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre una o más variables dependientes, dentro de una situación de control para el investigador, en este caso se manipulará el grado de concentración del extracto etanólico relacionado con la cantidad de compuestos fenólicos que posee para observar la actividad antimicrobiana (Brien, 2009 y Green, 2003).

3.3. Diseño experimental

3.3.1. Población de estudio y/o tamaño de muestra y/o método de muestreo

La población de estudio serán las partes aéreas (hojas) de *Lonicera japonica*. La recolección del material vegetal se realizó en la Parroquia de Yaruquíes en la Provincia de Chimborazo,

mediante un muestreo aleatorio simple para obtener aproximadamente 2 kg de la especie vegetal *Lonicera japonica*. Al tratarse de una planta ornamental, no se requiere el permiso del Ministerio del Ambiente. Para la recolección del material vegetal se tomarán en cuenta los siguientes criterios:

3.3.1.1. Criterios de inclusión:

Las mejores especies vegetales que presenten buen estado, con todas sus partes íntegras y frescas.

3.3.1.2. Criterios de exclusión:

Hojas que presenten daños por acción de animales o insectos.

Hojas que presenten deterioro por factores físicos (agua o viento).

Hojas en mal estado o secas.

Hojas que se encuentren en proceso de descomposición o con contaminación microbiológica.

3.3.2. Hipótesis

Los metabolitos secundarios de la Madreselva (*Lonicera japonica*) presentan actividad antibacteriana.

3.3.3. Identificación de variables

- **Variable dependiente:**

Actividad antibacteriana

- **Variable independiente:**

Extracto etanólico

3.4. Equipos, materiales y reactivos

3.4.1. Equipos

- Balanza analítica RADWAG AS
- Reverbero 60/220.R2

- Molino de cuchilla giratoria RetschMühle
- Refractómetro BAUSC Y LOMS
- Sonicador BRANSON 3510
- Rotavapor BIOBASE RE100-Pro
- Bomba de succión al vacío ROCKER-420
- Equipo de Luz UV
- Mufla OPTIC IVYMEN SYSTEM
- Incubadora
- pH metro HANNA INSTRUMENT
- Estufa Memmert
- Autoclave
- Refrigeradora
- Desecador
- Estufa de secado
- Viscosímetro
- Vortex
- Cámara de Flujo Laminar
- Baño María
- Refractómetro

3.4.2. *Materiales*

3.4.2.1. *Materiales para obtención de extracto*

- Frascos ámbar de 1000 ml y 500 ml
- Kitasato de 500 ml.
- Papel filtro
- Parafilm
- Probeta de 100 ml
- Embudo de Büchner
- Espátula
- Toallas absorbentes
- Vasos de precipitación de 1000 ml , 400 ml
- Algodón
- Embudos
- Papel aluminio
- Equipo de venoclisis
- Marcador permanente
- Canicas
- Botellas ámbar
- Cinta adhesiva
- Frascos plásticos estériles

3.4.2.2. *Materiales para realizar el control de calidad de la droga vegetal*

- Crisol de porcelana
- Papel filtro
- Pinzas
- Pipeta
- Malla
- Pera de succión
- Vaso de precipitación
- Tubos de ensayo

3.4.2.3. *Materiales para realizar el tamizaje fitoquímico*

- Tubos de ensayo de 10 ml
- Gradilla
- Varilla de agitación
- Adhesivos para rotular
- Pinza para tubos
- Papel filtro
- Balón de aforo
- Pipetas 1ml, 5ml
- Pera de succión
- Pipetas Pasteur
- Vidrio reloj
- Olla
- Malla
- Espátula

3.4.2.4. *Materiales para realizar el control de calidad físico-químico del extracto*

- Tubo de ensayo
- Picnómetro
- Papel filtro
- Pipeta Pasteur
- Gradilla
- Piseta
- Varilla de vidrio

3.4.2.5. *Materiales para realizar la cromatografía capa fina*

- Placas de sílice
- Cuba cromatográfica
- Pipeta
- Pera de succión
- Regla

3.4.2.6. *Materiales para realizar las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*

- Erlenmeyer
- Tapones de gasa y algodón
- Cajas Petri de vidrio
- Tubos de ensayo
- Espátula
- Tapón de caucho para tubos
- Gradillas
- Papel filtro
- Placa microelisa 96 pocillos
- Marcador permanente
- Pipetas automáticas
- Puntas azules
- Puntas amarillas
- Papel aluminio
- Hisopos estériles
- Asa
- Discos de papel de filtro en blanco
- Mechero
- Regla
- Pinzas

3.4.2.7. *Materiales para la formulación de la crema tópica*

- Vaso de precipitación
- Varilla de agitación
- Envases estériles
- Espátula
- Vidrio reloj
- Papel aluminio

3.4.2.8. *Material biológico*

- *S. auerus* ATCC 29213
- *S. epidermidis* ATCC 12228
- *P. aeruginosa* ATCC 27853

3.4.2.9. *Materiales para realizar el control físico – químico y microbiológico de la crema*

- *Vaso de precipitación*
- *Tirillas de pH*
- *Cajas Petri*
- *Puntas estériles azules y amarillas*
- *Tubos de ensayo*
- *Erlenmeyer*
- *Asa*
- *Porta objetos*
- *Espátula*
- *Papel aluminio*
- *Algodón y gasa*
- *Gradilla*
- *Hisopos*
- *Marcador*

3.4.3. **Reactivos**

3.4.3.1. *Reactivos para el tamizaje fitoquímico*

- Agua Destilada
- Etanol
- Magnesio metálico
- Ácido clorhídrico
- Hidróxido de sodio al 10%
- Ácido clorhídrico concentrado
- Hidróxido de amonio concentrado
- Ácido sulfúrico concentrado
- Hidróxido de potasio al 5%
- Cloroformo
- Reactivo Rosenthaler
- Reactivo de gelatina
- Cloruro férrico al 1%
- Alcohol amílico
- Ácido clorhídrico al 10%
- Reactivo Mayer
- Reactivo Wagner
- Reactivo Dragendorff
- Peróxido de hidrógeno al 6%
- Anhídrido acético

3.4.3.2. *Reactivos para la cromatografía capa fina*

- Acetato de etilo
- Ácido fórmico
- Ácido acético glacial
- Agua destilada
- Natural Products 1%
- Extracto etanólico de *L. japónica*

3.4.3.3. *Reactivos para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana*

- Agar Mueller- Hinton (MH)
- Agar nutritivo
- DMSO
- Solución salina al 0.9%
- Caldo nutritivo
- Agua estéril
- Caldo cerebro-corazón

3.4.3.4. *Reactivos para el control de calidad físico-químico y microbiológico de la crema tópica*

- Agua Destilada
- Etanol al 96%
- Alcohol potable
- Agar Manitol
- Agar PCA
- Agar EMB
- Agua de peptona
- Agar Sabouraud

3.4.3.5. *Reactivos para la formulación de la crema tópica*

- Alcohol cetílico
- Deyquart
- Nipagin
- Extracto etanólico de *L. japonica*
- Glicerina
- Nipasol
- Agua destilada

3.5. **Técnicas y métodos**

3.5.1. *Recolección de la materia vegetal*

Las hojas de la madreelva (*Lonicera japonica*) se recolectaron en noviembre de 2022 en la Parroquia Yaruquíes, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo como se detalla en la Ilustración 26-3.

Tabla 1-3: Localización de la recolección de *Lonicera japonica*

Latitud:	1°41'37.9"S
Longitud:	78°40'31.5"W
Altitud:	2811 msnm

Fuente: Google Earth, 2022

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

Se seleccionaron ejemplares con las mejores hojas, descartando tanto las contaminadas biológicamente como las que poseen daños físicos (ver anexos-Ilustración 2-7). Las muestras vegetales se transportaron en fundas de plástico.

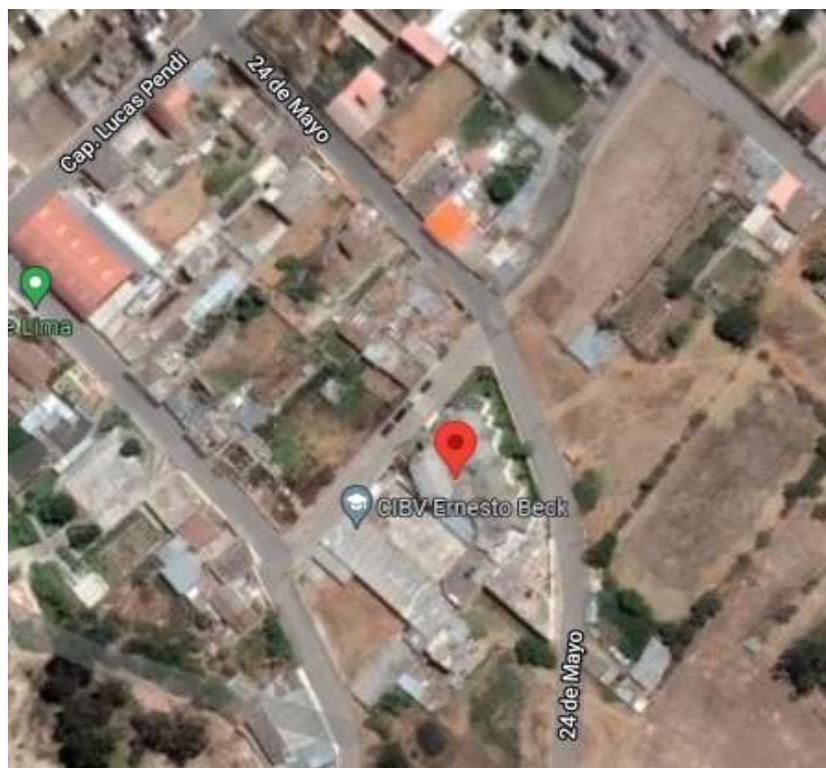


Ilustración 1-3: Mapa de recolección de *Lonicera japonica*

Fuente: Google Maps, 2022

3.5.2. Identificación de la materia vegetal

Se tomó la planta con todas sus partes y se prensó para llevarlo al herbario de la ESPOCH, dirigido por el Ing. Jorge Caranqui, quien identificó y certificó el ejemplar de *Lonicera japonica*. Ver anexos, Ilustración 1-7.

3.5.3. Acondicionamiento de la materia vegetal

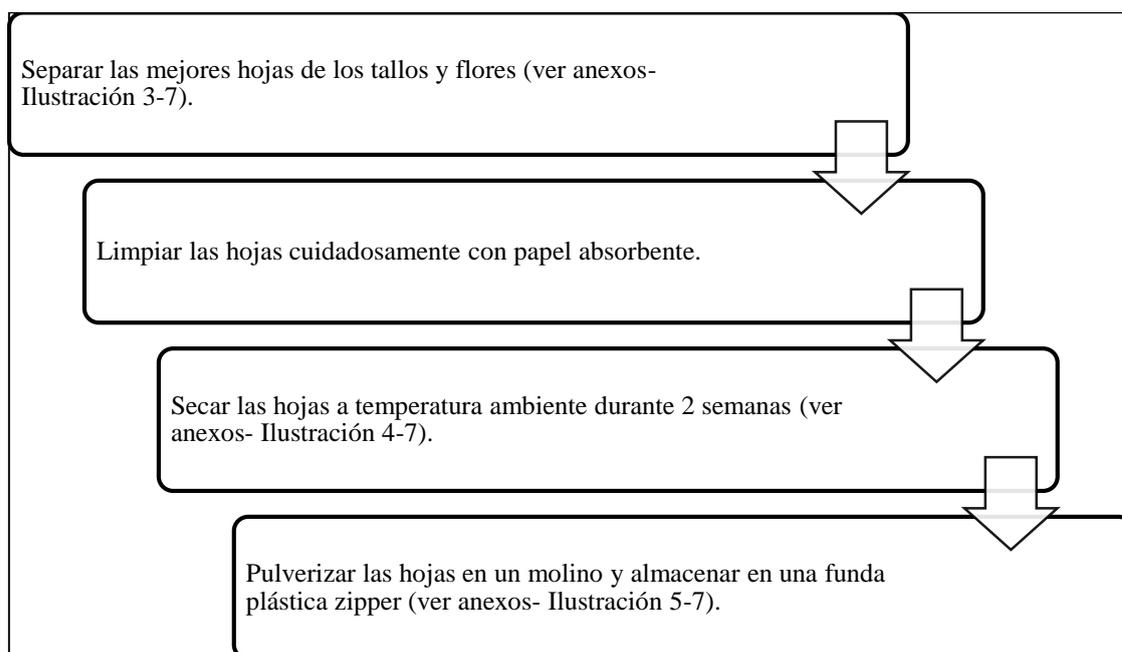


Ilustración 2-3: Acondicionamientos de la materia vegetal

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

3.5.4. Control de calidad de la droga vegetal seca

3.5.4.1. Determinación de humedad

Humedad es la cantidad de agua que tiene el material vegetal. Para una conservación buena debe su valor debe ser inferior a 10%.

Procedimiento:

A partir de la muestra triturada se pesó 4g con una desviación permisible de 0.5 mg, posteriormente se colocó dentro de la termobalanza y se esperó el resultado. El porcentaje de humedad se determina por la pérdida de peso que sufre la muestra después de ser sometida al proceso de calentamiento.

3.5.4.2. Determinación de cenizas totales

Las cenizas totales permiten determinar la cantidad de materia inorgánica que pueden estar presente en las plantas, y de esta forma establecer la calidad y pureza de las drogas vegetales y sus derivados. Es importante su determinación ya que esta puede ser la responsable de reacciones farmacológicas (Lima y Morales, 2014).

Procedimiento

Se pesó 2.0 g de la muestra de ensayo pulverizada y tamizada con una desviación permisible de 0.5 mg en un crisol de porcelana previamente tarado. Se colocó en el reverbero la porción de ensayo en un crisol hasta carbonizar y posteriormente se incineró en un horno mufla a una temperatura de 700 a 750°C, durante 2 horas. Y por último se enfrió el crisol en una desecadora y se pesó, repitiéndose el proceso hasta obtener un peso constante en donde no difieran en más de 0.5 mg por g (masa constante). Para obtener la masa constante los intervalos entre calentamiento y pesada son de 30 minutos.

El resultado se expresa mediante la siguiente fórmula:

$$\%C = \frac{M2 - M}{M1 - M} \times 100$$

C= porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M= masa del crisol vacío (g)

M1= masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M2= masa del crisol con la ceniza (g).

100= factor matemático para los cálculos.

3.5.4.3. Determinación de cenizas solubles en agua

A las cenizas totales se les añadió 15 a 20 ml de agua y el crisol se tapó y se dejó calentar en el reverbero durante 5 minutos. La solución se filtró y este residuo se transfirió al crisol inicial. Luego, se carbonizó y se incineró en un horno mufla de 700 a 750 °C, durante 2 h. Posteriormente se colocó en un desecador y al alcanzar temperatura ambiente se pesó. Se repite el proceso hasta alcanzar peso constante. Se calculó el porcentaje de cenizas solubles en agua con la siguiente fórmula:

$$\%Ca = \frac{M2 - Ma}{M1 - M} \times 100$$

Donde:

Ca= porcentaje de ceniza soluble en agua

M2= peso en gramos de las cenizas totales más el crisol

Ma= peso en gramos de las cenizas insolubles en agua más el crisol

M1= peso en gramos de la muestra de ensayo más el crisol

M= masa del crisol vacío

100= factor matemático

3.5.4.4. *Determinación de cenizas insolubles en ácido*

Se basa en la diferencia de pesos que se obtiene después de una calcinación de la droga vegetal y la extracción con HCl.

Procedimiento:

Se calentó a ebullición las cenizas obtenidas según se indica en Cenizas totales, con 25 ml de ácido clorhídrico 2 M durante 5 minutos en un crisol cubierto por un vidrio de reloj. Se lavó el vidrio de reloj con 5 mL de agua caliente, añadiendo el agua de lavado en un crisol. Se filtró y lavó con agua caliente hasta que el residuo no muestre presencia de cloruros identificando mediante la adición de Nitrato de Plata. El filtrado con el residuo se desecó de 100 a 105 °C, se transfirió al crisol inicial y se incineró en un horno mufla de 700 -750 °C durante 2 h. Posteriormente, se colocó en una desecadora y al alcanzar temperatura ambiente se pesó. se repite el procedimiento hasta obtener masa constante, en donde la diferencia no sea mayor a 1,0 mg. Se calculó el porcentaje de cenizas insolubles en ácido con la siguiente fórmula:

$$\%Cia = \frac{M2 - M}{M1 - M} \times 100$$

Donde:

M2= masa en gramos de la cápsula con las cenizas totales

M1= masa en gramos de la cápsula con la muestra seca

M= masa en gramos de la cápsula vacía

100= factor matemático.

3.5.5. Obtención del extracto etanólico

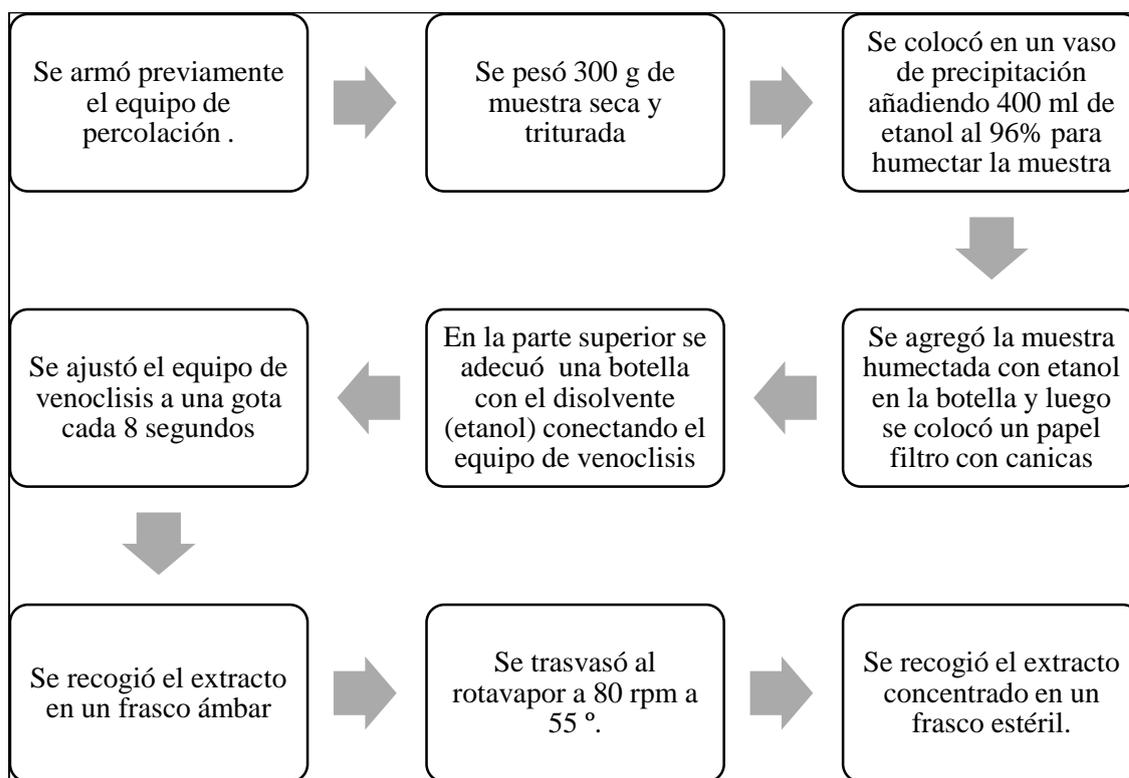


Ilustración 3-3: Obtención de extracto etanólico

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

3.5.6. Tamizaje fitoquímico

Para la identificación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Lonicera japonica* se obtuvo el extracto concentrado tanto acuoso como etanólico para luego ejecutar reacciones de coloración y caracterización, para ello se diluyó previamente el extracto en 3 o 5 ml de etanol y se dividió en tubos de ensayo de acuerdo al requerimiento de las pruebas realizadas.

3.5.6.1. Detección de flavonoides

- *Reacción de Shinoda*

En la alícuota del primer tubo adicionar 2 gotas de ácido clorhídrico concentrado y un trozo de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción esperar 5 minutos, agregar 1 ml de alcohol amílico, mezclar y dejar reposar hasta que se separen en dos fases. Observar cambios de color e interpretar resultados, ver Tabla 7-3.

Tabla 2-3: Interpretación de la Reacción de Shinoda

Coloración	Metabolito secundario
Naranja a rojo	Flavonas
Rojo	Flavonoles
Magenta	Flavononas

Fuente: (Bulugahapitiya, 2013a: p.83)a, p.89)

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

- *Reacción de hidróxido de sodio al 10%*

En la alícuota del segundo tubo adicionar 0,5 mL de hidróxido de sodio al 10%. Observar cambios de color e interpretar resultados, ver Tabla 8-3.

Tabla 3-3: Interpretación de la Reacción de NaOH al 10%

Coloración	Metabolito secundario
Amarillo a rojo	Xantonas y Flavonas
Café a naranja	Flavonoles
Púrpura a rojizo	Chalconas
Azul	Antocianinas

Fuente: (Bulugahapitiya, 2013: p.89)

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

3.5.6.2. Detección de cumarinas

- *Reacción con hidróxido de amonio*

Adicionar dos gotas de hidróxido de amonio concentrado a la alícuota. Observar en el equipo de Luz - UV e interpretar resultados, ver Tabla 9-3.

Tabla 4-3: Interpretación de la reacción con NH₄OH

Coloración	Metabolito secundario
Fluorescencia azul-violeta	Positivo para Cumarinas

Fuente: (Bulugahapitiya, 2013: p.89)

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

3.5.6.3. Detección de quinonas/antraquinonas

- *Reacción de hidróxido de amonio*

Se adiciona una gota de hidróxido de amonio concentrado al extracto. Se considera positiva la prueba para antraquinonas al tener la presencia de una coloración roja que aparece en los dos primeros minutos.

- *Reacción con ácido sulfúrico*

Se agrega 1 gota de ácido sulfúrico concentrado a otra porción del extracto. La formación de una coloración roja indica la presencia de quinonas.

- *Reacción de Börntrager*

Diluir una porción del extracto con 6 mL de agua destilada y filtrar. Al filtrado, añadir 3 mL de hidróxido de potasio al 5% calentando a ebullición por 3 minutos, enfriando y realizando una extracción con 6 mL de cloroformo. Se elimina la fase acuosa y a la fracción clorofórmica se le adicionan 4 mL de hidróxido de potasio al 5%. Observar cambios de color e interpretar resultados, en el caso de que se torne a un color amarillo verdoso, adicionar 1 gota de peróxido de hidrógeno al 6%, ver Tabla 10-3.

Tabla 5-3: Interpretación de la Reacción de Börntrager

Coloración	Metabolito secundario
Rosado	Naftaquinona y/o antraquinona (++)
Rojo	Benzoquinonas (+++)
Amarillo verdoso a rojo	Derivados de Antrona (+++)

Fuente: (Bulugahapitiya, 2013: p.89)

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

3.5.6.4. Detección de alcaloides

Tomar una porción del extracto etanólico y adicionar entre 6 mL de ácido clorhídrico al 10 %, calentar en baño de María por cinco minutos dejar enfriar hasta obtener una solución acida y filtrar. Posteriormente dividir el filtrado en 3 tubos de ensayo con 2,0 mL cada uno, etiquetar para cada reactivo (Dragendorff, Wagner y Mayer). Añadir a los tubos dos a tres gotas del

reactivo de Mayer, Wagner o Dragendorff respectivamente hasta la aparición de turbidez o precipitados, ver Tabla 11-3.

Tabla 6-3: Interpretación de ensayos Dragendorff, Wagner y Mayer

Observación	Presencia de Metabolito secundario
Opalescencia	(+)
Turbidez definida	(++)
Precipitado coposo	(+++)

Fuente: (Bulugahapitiya, 2013: p.89)

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

3.5.6.5. Detección de triterpenos y/o esteroides

- *Reacción de Lieberman- Bouchard*

En un tubo de ensayo limpio y seco, tomar una pequeña cantidad de extracto etanólico previamente llevado a sequedad, adicionar cloroformo o diclorometano en cantidad suficiente que cubra la muestra, colocar en el sonicador hasta disolver la muestra, añadir 0,5 mL de anhídrido acético, adicionar cuidadosamente por la pared del tubo, dos gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Observar y anotar los cambios de coloración, ver Tabla 12-3.

Tabla 7-3: Interpretación de Reacción de Lieberman- Bouchard

Coloración	Metabolito secundario
Rosa, rojo violeta en la interfase	Triterpenos
Verde oscuro o azul	Esteroides

Fuente: (Bulugahapitiya, 2013: p.89)

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

3.5.6.6. Detección de saponinas

Tomar una porción del extracto acuoso y dividir en dos tubos, para realizar las siguientes pruebas:

- *Prueba de altura y estabilidad de espuma*

En el primer tubo de ensayo colocar 1 mL de solución acuosa del extracto, agitar vigorosamente durante un minuto y tomar la altura de la espuma, en caso de que se presentara. Si se forma

abundante espuma, estable más de 2 mm por aproximadamente 5 minutos es prueba presuntiva de la presencia de saponinas en la muestra.

- *Reacción de Rosenthaler (reactivo de vainillina)*

A una porción del extracto concentrado, adicionar dos gotas del reactivo Rosenthaler y estratificando con dos gotas de ácido sulfúrico concentrado. Observar cambios de color e interpretar resultados, ver Tabla 13-3.

Tabla 8-3: Interpretación de la Reacción de Rosenthaler

Coloración	Metabolito secundario
Violeta	Sapogeninas triterpenoidales
Verde	Sapogeninas esteroidales

Fuente: (Bulugahapitiya, 2013: p.83)

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

3.5.6.7. *Detección de taninos/compuestos fenólicos*

Diluir una porción del extracto en 3 mL de agua y dividir en dos tubos, para lo siguiente:

- *Reacción de cloruro férrico*

Adicionar al primer tubo una gota de cloruro férrico al 1%, la formación de coloraciones indica la presencia de compuestos fenólicos: de azul a negro derivados del ácido gálico y coloraciones verdes de derivados del catecol. La formación de una coloración azul indica la presencia de taninos hidrolizables y una coloración verde identifica a los taninos condensados.

- *Reacción con gelatina*

Al segundo tubo, colocar 2 gotas de reactivo de gelatina. La formación de un precipitado blanco indica presencia de taninos, ver Tabla 14-3.

Tabla 9-3: Interpretación de la Reacción con gelatina

Coloración	Metabolito secundario
Precipitado blanco	Taninos

Fuente: (Bulugahapitiya, 2013a: p.83)

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

3.5.6.8. Detección de azúcares reductores

- *Reacción de Fehling*

Adicionar a una alícuota del extracto 1 mL de reactivo de Fehling A y 1ml de reactivo de Fehling B, posteriormente calentar en baño de agua María de 5 a 10 minutos. El ensayo se considera positivo (+++) si la solución tomó coloración roja o apareció un precipitado rojo.

Tabla 3-3: Interpretación de azúcares reductores

Coloración	Metabolito secundario
Color/ precipitado rojo	Azúcares reductores (+++)

Fuente: (Bulugahapitiya, 2013a: p.83)

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

3.5.7. Determinación de fenoles totales

Se realizó la cuantificación de los fenoles totales del extracto etanólico de las hojas de *Lonicera japonica* utilizando el método de Folin-Ciocalteu (FC). Se efectuó una reacción colorimétrica de óxido-reducción con el reactivo de FC como agente oxidante. Se utilizó una solución estándar de ácido gálico a partir de la cual se prepararon cuatro diluciones, con las que se construyó la curva de calibración. La coloración azul producida es proporcional a la concentración de compuestos fenólicos presentes, siendo susceptible a ser determinada espectrofotométricamente a 765 nm. Los resultados se expresaron en miligramos equivalentes de ácido gálico por litro de extracto (mg EAG/l) (Aguado et al., 2013 p.47).

3.5.8. Determinación de flavonoides

Para la determinación de flavonoides totales en el extracto etanólico de las hojas de *Lonicera japonica* se realizó por un método espectrofotométrico. La absorbancia de la muestra fue evaluada a una longitud de onda de 415 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Visible.

Luego estas absorbancias se compararon con una curva estándar de quercetina. Los resultados se expresaron como mg equivalentes de quercetina por litro de extracto (mgEQ/l) (Leyva et al., 2013).

3.5.9. Control de calidad del extracto

3.5.9.1. Determinación de olor

Se utilizó una tira de papel filtro de 1 cm x 10 cm aproximadamente y se introdujo un extremo en la muestra de ensayo, posteriormente se percibió y se determinó el olor característico del extracto.

3.5.9.2. Determinación de color/ aspecto

Se tomó un tubo de ensayo limpio y seco se llenó las tres cuartas partes con el extracto etanólico, se procedió a observar el color, posteriormente se determinó la transparencia y la presencia de partículas.

3.5.9.3. Determinación de sabor

Se colocó una pequeña cantidad de muestra en el borde de la palma de la mano o en el dedo índice e inmediatamente al contacto con la punta de la lengua se realizó la identificación del sabor.

3.5.9.4. Determinación del pH

Se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizó la determinación del valor del pH de la muestra. Se introdujo directamente los detectores del pH-metro en la muestra y se realizó la lectura.

3.5.9.5. Determinación de la densidad relativa

Se pesó el picnómetro vacío y seco, posterior se lo llenó con la porción de ensayo manteniendo a temperatura ambiente, y se llevó el líquido al nivel empleado, con una tira de papel se extrajo el exceso y se secó exteriormente el picnómetro. Luego se pesó cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo. En los resultados la densidad relativa se calculó con la siguiente fórmula:

$$f = \frac{(M_p + d - M_p)}{M_p + w + M_p} \times f_w$$

Donde:

Mp+d: La masa del picnómetro enrasado con disolución (g)

Mp+w: masa del picnómetro enrasado con agua

Mp: masa del picnómetro vacío (g)

∫ w: densidad del agua

3.5.9.6. *Determinación del índice de refracción*

Se colocó sobre el prisma de medición una gota del extracto etanólico, se cerró el termo prisma y se procedió a la lectura del resultado.

3.5.10. *Cromatografía en capa fina*

Se aplicó aproximadamente 10 µL de extracto concentrado en la placa cromatográfica de sílica gel 60 F254 (MERCK) con la ayuda de un capilar. Se dejó secar por unos minutos, luego se introdujo la placa en la cuba cromatográfica hasta que haya recorrido el solvente las ¾ partes de la placa. Se retiró de la cuba cromatográfica, se dejó secar y luego se observó en la lámpara UV 366nm. Por último, se reveló la placa y se anotó el Rf. Se utilizó como Fase Estacionaria: Sílica gel 60 F254 (MERCK) (7cm x 2 cm) y como Fase móvil: Acetato de Etilo-Ácido Fórmico-Ácido Acético Glacial-Agua (100:11:11:26). Calculamos el Rf con la siguiente fórmula:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida de la muestra}}{\text{Distancia recorrida del solvente}}$$

3.5.11. *Espectroscopia IR*

Se colocaron dos gotas del extracto puro en el centro del cristal ATR y se cerró la tapa. se realizaron las respectivas correcciones en el software de acuerdo a los requerimientos del estudio. Y por último se esperó el resultado.

3.5.12. *Capacidad antibacteriana*

3.5.12.1. *Método microdilución en caldo*

Para la preparación de pre-inóculo, se pesó y preparó la cantidad suficiente de caldo cerebro corazón. Se llevó a autoclavar a 121°C por 30 min y se dejó enfriar para realizar la suspensión bacteriana tomando las colonias de las cepas ATCC de los microorganismos a ensayar con la

ayuda de un asa estéril, dejando incubar por 18 horas a 37°C. Transcurridas las 18 horas, la suspensión se ajustó a 0,5 en escala McFarland equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL, pasando a ser el inóculo bacteriano. Luego, para obtener la solución de la muestra stock se pesaron 64 mg del extracto etanólico de *Lonicera japonica* y se agregó 456 µl de caldo nutritivo, alcanzando una concentración de 128000 ppm.

Se colocó 100 µl de caldo nutritivo en los 96 pocillos como base, en donde a la primera fila se consideró como control negativo, agregando 100 µl más de caldo nutritivo y a la última fila como control positivo añadiendo 100 µl de inóculo bacteriano. A partir de la segunda a la onceava fila se agregó 100 µl de la muestra stock (128000 ppm) y 100 µl del inóculo bacteriano (por triplicado), es decir en cada pocillo va a contener 300 µl de la mezcla. Posteriormente se procedió a realizar 10 microdiluciones iniciando desde la segunda fila con la ayuda de una pipeta multicanal, en donde se partió de una concentración de 64000 ppm transfiriendo 100 µl del contenido a la tercera fila y así sucesivamente hasta la onceava fila.

Después, la placa se dejó en la incubadora de 18 a 24 horas a 37°C. Finalmente, se observó qué pocillo presentó menos turbidez para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria.

3.5.12.2. Método Kirby Bauer

- *Preparación del medio de cultivo*

Se preparó el medio de Muller- Hinton de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121 °C por 15 minutos y se dejó enfriar, por último, se distribuyó un volumen apropiado en las cajas Petri.

- *Preparación del inóculo*

Con un asa de inoculación estéril, se tomó colonias del organismo a ensayar. Se suspendió el organismo en 3 ml de solución salina estéril Se ajustó la turbidez de esta suspensión a un estándar de 0,5 McFarland, lo cual corresponde aproximadamente a 10^8 microorganismos viables por ml. Se usó esta suspensión dentro de los 15 minutos posteriores a la preparación.

- *Preparación solución stock y de los extractos a diferentes concentraciones*

La solución stock de los extractos se prepararon con DMSO a la concentración de 128000 µg/mL, para lo cual se pesó 64 mg del extracto etanólico de las hojas de la madreelva en un

tubo Eppendorf y se añadió 456 µL de DMSO. Las diluciones seriadas se realizaron a concentraciones de 64000, 32000, 16000, 8000, 4000, 2000, 1000, 500, 250 y 125 µg/mL a partir de la solución stock. Se realizó por duplicado.

- *Inoculación de la placa MH*

Se introdujo un hisopo estéril en el tubo de inóculo y retiró el exceso de líquido girándolo contra el interior del tubo. Se distribuyó el inóculo homogéneamente sobre toda la superficie de la placa inoculándola en tres direcciones a 60° aproximadamente y se dejó que el inóculo se seque durante unos minutos temperatura ambiente con la tapa cerrada.

- *Colocación de los discos con el extracto vegetal e incubación de la placa*

Se colocaron los discos en blanco en la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril y se agregó una alícuota de 10 µL de extracto etanólico a diferentes concentraciones en cada uno de los discos, incluyendo el control positivo y negativo. A continuación se llevó a incubar las placas de 18 a 24 horas a 37°C de forma invertida, después de 15 minutos de la colocación de los discos (Miranda et al., 2012, pp.356-357).

- *Medida e interpretación de resultados*

Después de la incubación durante 18 a 24 horas a 37°C, se procedió a medir el halo de inhibición de cada disco con una regla y se registró las medidas en milímetros. Luego, los resultados se interpretaron de acuerdo con la tabla de susceptibilidad a los antimicrobianos (EUCAST, 2012 pp. 5-11).

3.5.13. Elaboración de la crema tópica

La elaboración de la formulación semisólida se compone de dos fases, la fase oleosa consistió en agregar a un vaso de precipitación 15 g de alcohol cetílico, 10 mL de glicerina, 0,02 g de nipasol, 0,18g de nipagín, 3 mL de deyquart, mezclando constantemente a baño maría a una temperatura de 65°C hasta incorporar todos los ingredientes. La segunda fase es la acuosa en donde el vaso de precipitación se colocó con la csp de agua destilada en el baño maría a 65°C.

Una vez que las dos fases se encuentran a la misma temperatura se incorporó la fase acuosa a la oleosa agitando constantemente mientras se agregaba el agua. Se retiró el recipiente del baño maría y se agitó la mezcla hasta obtener una consistencia homogénea de color blanco. Para

agregar la actividad antibacteriana a la formulación se tomaron en cuenta las concentraciones a las que existió inhibición bacteriana en base a los ensayos realizados (64000, 8000, 250 y 125 ppm), que luego de pesar el extracto se incorporó paulatinamente a la crema unibase preparada hasta conseguir una consistencia homogénea.

Para finalizar, la crema obtenida se envasó y se etiquetó, cabe recalcar que para proceso de elaboración del producto se tomaron en cuenta todas las medidas de esterilidad para evitar la contaminación con microorganismos patógenos.

3.5.14. Control de calidad del producto terminado.

3.5.14.1. Características organolépticas y físico-químicas

- Determinación de olor: Se utilizó una tira de papel filtro de 1 cm x 10 cm aproximadamente y se introdujo un extremo en la muestra de ensayo, posteriormente se percibió y se determinó el olor característico de la crema.
- Determinación de color/ aspecto: Se tomó un tubo de ensayo limpio y seco se llenó las tres cuartas partes con el producto terminado, se procedió a observar el color, posteriormente se determinó la transparencia y la presencia de impurezas.
- Determinación de la presencia de grumos: Se tomó aproximadamente 0,20 g del producto sobre el dorso de la mano limpia y seca y se observó si hay presencia o ausencia de grumos.
- Determinación del pH: Se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango en que se realizó la determinación del valor del pH de la muestra. Se introdujo directamente los detectores del pH-metro en la muestra y se realizó la lectura.
- Determinación de la viscosidad: La viscosidad se determinó utilizando el viscosímetro. Para la formulación se midió la viscosidad a tiempo cero y a diferentes intervalos de tiempo. Se encendió el equipo, se seleccionó el número de spin (64), se seleccionó la velocidad (10 rpm).
- Determinación del signo de la emulsión: Se utilizó el método de coloración, en este caso azul de metileno que corresponde a un colorante hidrosoluble, una vez pesado 1,0 g de la crema tópica se agregó una gota de azul de metileno, luego se observó si se trata de una emulsión de tipo O/W o de tipo W/O. (Rubio, 2014 pp. 56-58).

3.5.14.2. Control de calidad microbiológico

Para el análisis microbiológico del producto terminado se tomó 1 g de la crema tópica y se disolvió en 9 ml de agua de peptona para obtener una disolución 1:10. De acuerdo a la

Normativa NTE INEN: 2015 los microorganismos a evaluar son los siguientes: Aerobios mesófilos totales, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y Recuento total combinado de mohos y levaduras.

Para ello se deben preparar los medios de cultivos adecuados para cada microorganismo de acuerdo a las indicaciones del fabricante, posteriormente se colocaron los agares de PCA, Manitol, EMB, y Saboraud en cada caja Petri y se dejó enfriar. Se sembró 1000 ul de la dilución, se dispersó la muestra y se dejó incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas de forma invertida y en el caso de Mohos y levaduras incubar de 3 a 5 días. Por último, se realizó el conteo de microorganismos en UFC/ g o ml y se interpretaron los resultados (Yambay, 2022, pp.43-44).

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Control de calidad de la droga vegetal seca

Los ensayos para el control de calidad de la droga vegetal seca se realizaron por duplicado como se observa la tabla 1-4.

Tabla 4-4: Control de calidad de la droga seca

Parámetros	Resultado (%)	Valores de referencia	Farmacopea
Humedad	9.702	≤ 12	Japonesa 15ª edición 2006
Cenizas totales	6.0005 ± 0.2424	≤ 9	Japonesa 15ª edición 2006
Cenizas solubles en agua (H₂O)	1.49	≤ 2	Española 2002
Cenizas solubles en Ácido Clorhídrico (HCl)	1.22	≤ 1	Japonesa 15ª edición 2006

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

En la tabla 1-4 se evidencia los resultados obtenidos del control de calidad de la droga seca de las hojas de la madre selva japonesa, en donde se reporta con un 9,70% de contenido de humedad, este parámetro indica la cantidad de agua libre que se encuentra en la especie vegetal, al encontrarse dentro del rango de referencia la droga vegetal se puede mantener estable y prevenir la acción de las enzimas, bacterias y hongos, demostrando que fueron óptimas las condiciones de conservación y almacenamiento (Acosta et al. 2012).

El contenido de ceniza indica la presencia de materia inorgánica, es por eso que es útil para establecer la calidad y pureza de una droga vegetal, en donde el 6% corresponde al contenido de ceniza total, el 1,49% a las cenizas solubles en agua y el 1,22% a las cenizas insolubles en ácido; los dos primeros parámetros mencionados cumplen con el valor de referencia establecido, pero cabe recalcar que, dentro de la ceniza total se incluye la ceniza fisiológica, como es el oxalato de calcio el cual se deriva del propio tejido vegetal y las cenizas no fisiológicas que provienen de contaminantes ambientales (Yulan y Bingren, 2009, p.881).

Por lo que se puede evidenciar, el valor de 1,22% de cenizas insolubles en ácido supera al valor de referencia, se presume que este valor se encuentra alterado debido a que la recolección del

material vegetal se realizó luego de un proceso de actividad volcánica donde hubo emisión de ceniza por lo tanto presencia de residuos en las hojas.

Los límites de aceptación de los parámetros del control de calidad se obtuvieron de la Farmacopea Japonesa 15ª edición 2006 del apartado drogas crudas de la hoja y tallo de *Lonicera japonica* y de la Real Farmacopea Española 2002.

4.2. Rendimiento del extracto

A partir de 300 g de hojas secas y trituradas de *Lonicera japonica* usando la técnica de percolación en etanol al 96% y posterior evaporación rotatoria, se obtuvo un peso de 52,54 g de extracto, de tal manera que el porcentaje de rendimiento fue de 17,51 %.

4.3. Control de calidad del extracto etanólico

Tabla 5-4: Control de calidad del extracto etanólico

Parámetros	Resultados	
Características organolépticas	Olor	Ligeramente Dulce
	Color/ aspecto	Verde botella oscuro con presencia de partículas brillosas / siruposo
	Sabor	Amargo
Características Físico-Químicas	pH	5,64 ± 0,01
	Densidad	0,8461 ± 0,00
	Índice de refracción	1,3884 ± 0,00

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

Los controles físico-químicos en los extractos vegetales ayudan a determinar la calidad de la droga vegetal utilizada, garantizando su identidad, pureza y contenido en principios activos (López et al., 2016). En la tabla 2-4 se detallan los parámetros analizados, en donde es necesario mencionar que las características organolépticas de las plantas no poseen estándares de referencia debido a que los extractos poseen sus propios valores y características dependiendo de la especie analizada; es así que el olor del extracto etanólico de las hojas de *Lonicera japonica* fue ligeramente dulce, mostró una coloración verde botella oscura con la presencia de pequeñas partículas brillosas, un aspecto siruposo y un sabor amargo.

Presentó un pH de 5,64 el cual va acorde a los metabolitos secundarios presentes en el extracto debido a que contienen mayor cantidad de compuestos ricos en iones H⁺, como los de

naturaleza fenólica. El índice de refracción fue de 1,38 encontrándose dentro de los valores de referencia según la farmacopea francesa de 1989, que establece que el porcentaje no debe ser menor a 1,20 ;estos parámetros indican una buena solubilidad de los metabolitos en el solvente utilizado (Allauca 2017).

4.4. Tamizaje fitoquímico

Tabla 6-4: Estudio fitoquímico preliminar de *Lonicera japonica*

METABOLITO SECUNDARIO	ENSAYO CUALITATIVO	RESULTADOS	
		EXTRACTO ETANÓLICO	EXTRACTO ACUOSO
Flavonoides	Shinoda	(++)	(-)
	Hidróxido de sodio al 10%	(+++)	0
Alcaloides	Dragendorff	(++)	(+)
	Mayer	(+)	(++)
	Wagner	(+)	(++)
Triterpenos y esteroides	Lieberman-Burchard	(+++)	0
Azúcares Reductores	Fehling	(+++)	(+++)
Quinonas/ Antraquinonas	Hidróxido de amonio	(-)	0
	Ácido sulfúrico	(-)	0
Cumarinas	Hidróxido de amonio	(-)	0
Taninos/ compuestos fenólicos	Cloruro férrico	(+++)	(+++)
	Gelatina	(++)	(-)
	Espuma	(+++)	(-)
Saponinas	Rosenthaler	0	(-)

INTERPRETACIÓN: (+) Baja evidencia; (++) Evidencia; (+++) Alta evidencia; (-) Ausencia; (0) No se realizó

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

El objeto de estudio fueron las hojas de la madreselva, por lo que se preparó dos tipos de extractos: acuoso y orgánico (etanólico al 96%), para realizar una comparación cualitativa de la presencia de los metabolitos secundarios, se efectuaron pruebas para la identificación de: flavonoides, alcaloides, triterpenos/ esteroides, azúcares reductores, quinonas antraquinonas, cumarinas, taninos/ compuestos fenólicos y saponinas.

Los resultados del estudio preliminar fitoquímico detallados en la tabla 3-4, revelaron que el extracto acuoso de *Lonicera japonica* presentó: alcaloides, azúcares reductores y taninos / compuestos fenólicos. Mientras que el extracto etanólico presentó: flavonoides, alcaloides,

triterpenos/ esteroides, azúcares reductores, taninos /compuestos fenólicos y saponinas. Según un estudio mencionan que desde el punto de vista fitoquímico las plantas del género *Lonicera* han sido uno de los géneros más estudiados dentro de las caprifoliáceas, en donde se ha determinado la presencia de una gran variedad de compuestos (Rojas y Amaro 2015, pp. 27-29).

Los componentes químicos de *Lonicera japonica* aislados en su estudio incluyen ácidos orgánicos representados por ácidos clorogénicos, flavonoides, iridoides y glucósidos iridoides, triterpenoides y saponinas, aceites volátiles, así como monoterpenoides, sesquiterpenos, y algunos otros compuestos, los cuales poseen efectos farmacológicos de interés (Chen et al 2015).

La importancia del tamizaje fitoquímico radica en el análisis, identificación, extracción y experimentación de las distintas clases de fitoconstituyentes presentes en varias partes de la planta que actúan como reservorio de los metabolitos secundarios como hojas, tallos raíces o corteza; al mismo tiempo es útil para descubrir componentes bioactivos para el desarrollo de fármacos (Prinyaka, 2014). Es por eso que estudios farmacológicos recientes han demostrado que la madreselva tiene varias actividades biológicas, como antibacteriana de amplio espectro, antiviral, antitumoral, potenciadora del sistema inmunitario, antipirética y antiinflamatoria. La madreselva tiene cierto efecto terapéutico sobre forúnculos, llagas, ántrax, hinchazones, picaduras de insectos, hinchazones, reumatismo, hematomas, etc., destaca que las hojas y los tallos de la madreselva son los que poseen las actividades antioxidantes y antibacterianas (Chen et al 2015).

4.5. Cuantificación del contenido de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu

En cuanto a la determinación del contenido de fenoles totales presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Lonicera japonica*, se utilizó el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, posteriormente se elaboró una curva de calibración de ácido gálico (Ilustración 1-4) usado como material de referencia, y se obtuvo la siguiente ecuación de la recta: $y = 0.0037x + 0.0021$, con $R^2 = 0.9999$, luego de interpolar el valor de las absorbancias, el resultado de la concentración se reportó como miligramos de Equivalentes de ácido gálico, ver tabla 4-4. Debe señalarse que, los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios indispensables para el crecimiento y reproducción de las plantas ya que cumplen con funciones de defensa frente a patógenos, se atribuyen las propiedades antioxidantes y antimicrobianas, visto de esta forma el resultado obtenido de la cuantificación de fenoles totales fue de 19545 mg/l EAG, considerándose una elevada concentración de estos compuestos en la muestra (Zárate et al., 2021).

Además, se confirma las propiedades antes mencionadas con estudios previos acerca de los compuestos fenólicos presentes en plantas como el ácido gálico y ácido elágico demostrando la capacidad para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias (Leyva, 2013 p.12).

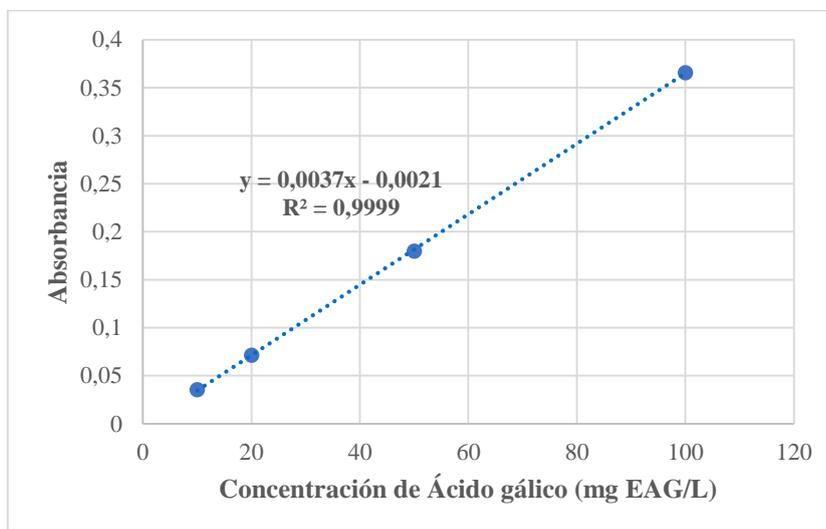


Ilustración 1-4: Curva de calibración de Ácido gálico

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

Tabla 7-4: Resultados de la cuantificación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu

Extracto	Parámetro	Unidades	Resultado
Etanólico	Polifenoles totales	mg/l EAG	19545

EAG: Equivalentes de ácido gálico

Fuente: Laboratorio LASA, 2023.

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

4.6. Cuantificación de flavonoides totales

Para determinar la concentración de flavonoides en el extracto etanólico de las hojas de *Lonicera japonica* se utilizó una técnica espectrofotométrica, para lo cual se elaboró una curva de calibración de quercetina (Ilustración 2-4), sustancia utilizada como material de referencia, proporcionando la siguiente ecuación de la recta: $y = 0.0651x + 0.0062$, con $R^2 = 0.9997$, luego de interpolar el valor de las absorbancias, el resultado de la concentración se reportó como miligramos de Equivalentes de quercetina, ver Tabla.5-4. Ahora bien, los flavonoides al ser parte de un amplio grupo de compuestos fenólicos se caracterizan por tener varias propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales, anticancerígenas y antioxidantes, en esta perspectiva resultado obtenido de la cuantificación de flavonoides totales fue de 8284 mg/l EQ, considerándose una elevada concentración de estos compuestos en la muestra, es importante mencionar que la cantidad de flavonoides es muy

variable, no solamente de una especie a otra sino también dentro del mismo taxón. Esta variación se debe mucho a factores, sean climáticos, atmosféricos, edáficos y topográficos (Vásquez, 2015 p.139).

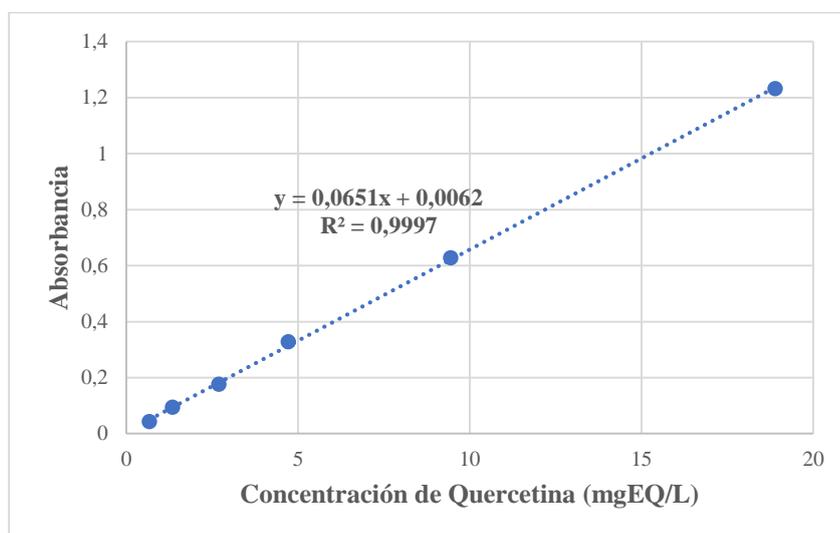


Ilustración 2-4: Curva de calibración de quercetina

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

Tabla 8-4: Resultados de la cuantificación de flavonoides por espectrofotometría

Extracto	Parámetro	Unidades	Resultado
Etanólico	Flavonoides	mg/l EQ	8284

EQ: Equivalentes de quercetina

Fuente: Laboratorio LASA, 2023

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

4.7. Cromatografía capa fina

El método de separación aplicado para determinar los compuestos presentes en el extracto etanólico fue la TLC, en donde se describe con detalle los solventes utilizados como fase móvil y estacionaria en la tabla 6-4, y los resultados obtenidos en la tabla 7-4.

Tabla 9-4: Parámetros cromatografía capa fina

Placa de sílica gel	7 cm x 2 cm
Longitud de onda	366 nm
Solvente recorrido	Acetato de Etilo, Ácido Fórmico, Ácido Acético Glacial, Agua (100:11:11:26)
Muestra	Extracto etanólico de <i>Lonicera japonica</i>
Revelador	Natural products 1% PEG 400

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

Tabla 10-4: Determinación de Rf para metabolitos secundarios del extracto de *Lonicera japonica*



Bandas observadas	Recorrido del disolvente	Recorrido de la muestra	Rf	Color
1	5 cm	0,5 cm	0,1	Amarillo verdoso
2	5 cm	2,7 cm	0,54	Verde
3	5 cm	4,5 cm	0,9	Azul

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

La polaridad en cromatografía, es un factor importante para identificar componentes químicos presentes en una muestra, por medio del orden de elución que se da en la fase estacionaria, en el caso de los flavonoides al poseer un gran número de grupos hidroxilos se consideran polares; por lo tanto, todos los compuestos derivados se ubicarán en la parte más baja en relación con el punto de origen ya que tendrán más afinidad con la sílica gel.

En los resultados obtenidos reflejados en la tabla 7-4 se observa que se formaron 3 tipos de bandas luego de aplicar el revelador NP/ PEG de las cuales, al observar bajo luz UV a 366nm, la banda No.1 se presume que se trata de una flavona debido al color amarillo-verdoso, la banda No.2 de color ligeramente verde puede ser una flavonona (Zamora 2017).

Únicamente la banda No. 3 de color azul intenso se identificó al compuesto como ácido clorogénico, en base características descritas por un atlas estandarizado de cromatografía, de modo que, se confirma con un estudio donde unos de los componentes químicos principales de la madre selva incluyen ácidos orgánicos representados por ácido clorogénico (Chen et al 2015).

4.8. Caracterización de grupos funcionales por Espectroscopia infrarroja

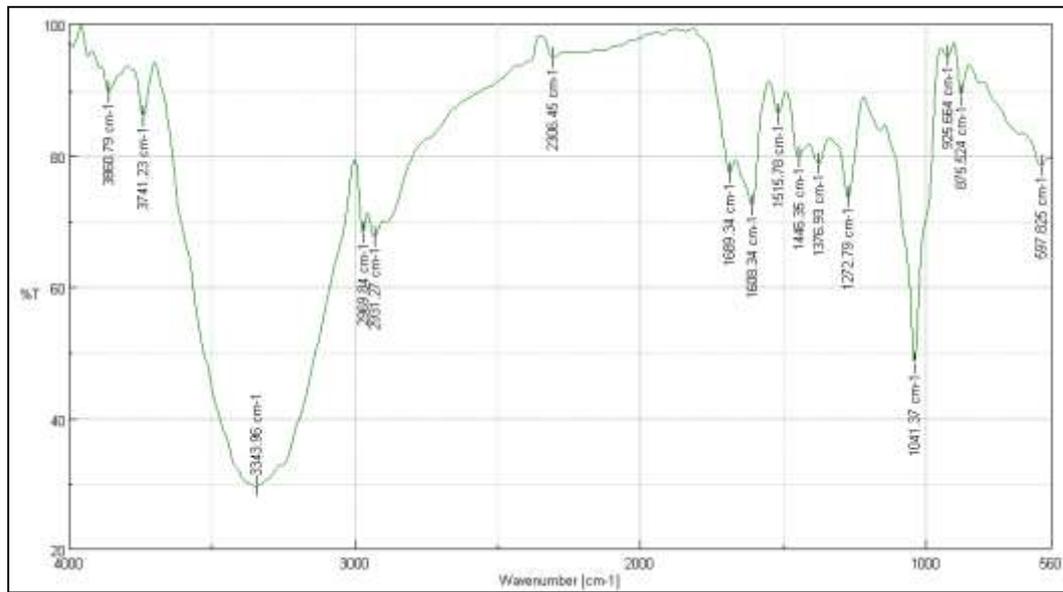


Ilustración 3-4: Espectro IR del extracto etanólico de *Lonicera japonica*

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

Tabla 11-4: Grupos funcionales del espectro del extracto etanólico

Número de onda [cm ⁻¹]	%T	Interpretación
3741.23	85.9571	-OH
3343.96	29.5888	-NH ₂
2931.27	67.5873	-CH ₃ y -CH ₂ -
2306.45	94.8902	-C≡N
1689.34	77.3163	C = O
1608.34	72.3063	C = C; C = N, NH

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

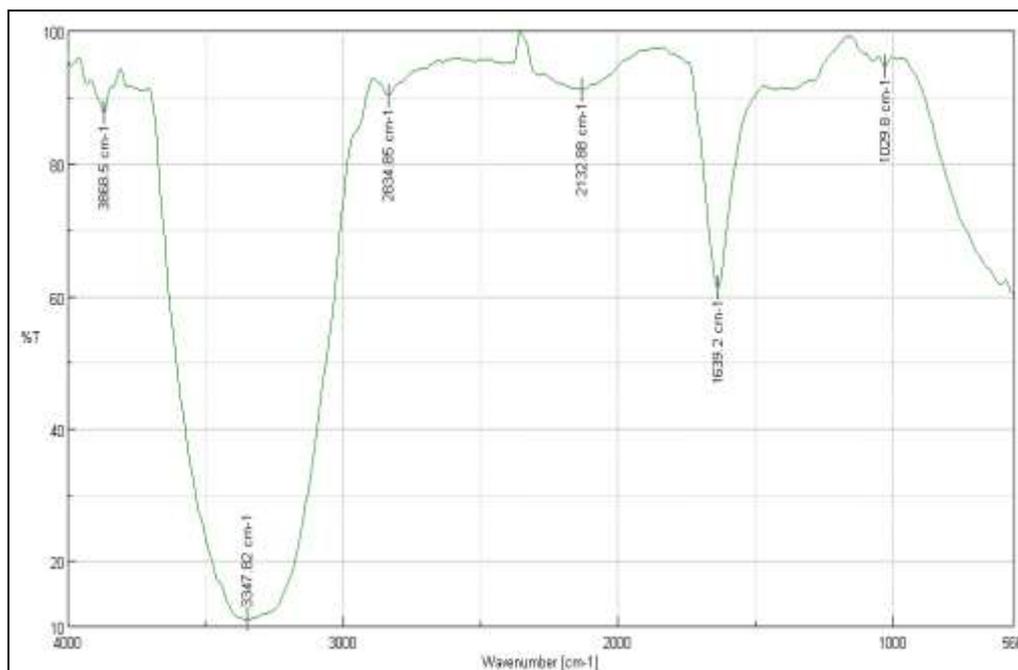


Ilustración 4-4: Espectro IR del extracto acuoso de *Lonicera japonica*

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

Tabla 12-4: Grupos funcionales del espectro del extracto acuoso

Número de onda [cm ⁻¹]	%T	Interpretación
3347.82	11.1116	-OH
2834.85	90.1767	-CH ₃
2132.88	91.1066	-C≡N
1639.2	61.208	C = O
1029.8	94.5534	C-OH

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

Los espectros infrarrojos (IR) de los extractos etanólico y acuoso de *Lonicera japonica* Ilustración 3-4 e Ilustración 4-4 respectivamente, son una representación gráfica del porcentaje de transmitancia (%T) que presenta la muestra en varios números de longitud de onda (λ) en cm-1, donde la intensidad de los picos es proporcional al cambio del momento dipolar que la absorción causó en la molécula. Las frecuencias de absorción de alargamiento y flexión característicos de los grupos funcionales permitieron interpretar que existen un conjunto de compuestos químicos (Kesharwani, 2019).

De acuerdo a las bandas de absorción obtenidas en el espectro infrarrojo del extracto etanólico y acuoso, se puede afirmar la presencia de los principales grupos funcionales de aquellos metabolitos secundarios que poseen la actividad antibacteriana, en el caso de los flavonoides que tienen radicales hidroxilos (-OH) evidenciándose en los dos espectros IR una banda ancha

característico de los puentes de hidrógeno a un número de onda entre 3500-3200 cm⁻¹, indicando el estiramiento de O-H, además de que hay la presencia de otros tipos de compuestos como se menciona en bibliografía, la planta contiene una gran cantidad de ácidos orgánicos representados por ácido clorogénico, flavonoides, glucósidos iridoides, triterpenos y saponinas triterpénicas, aceites volátiles, etc., así como glucósidos cíclicos monoterpénicos, terpenos sesquiterpénicos y entre otros. Por lo que concuerda con los distintos tipos de radicales que poseen estos metabolitos secundarios (Chen et al., 2015).

Para conocer con más detalle los componentes específicos de *Lonicera japonica*, se puede realizar Resonancia Magnética Nuclear en futuras investigaciones.

4.9. Capacidad antibacteriana

Para evaluar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Lonicera japonica* se siguió el protocolo del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) de la susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar y microdilución en caldo, se realizó por duplicado frente a tres bacterias de interés clínico. Las bacterias ensayadas fueron: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

Para la suspensión de los extractos y sus correspondientes diluciones el Dimetil Sulfóxido (DMSO) fue el diluyente elegido debido a la característica de conservar principios activos en los medicamentos y facilitar su difusión en medios polares y solución salina al 0,9% por su capacidad de brindar las mejores condiciones para mantener a las bacterias vivas e íntegras hasta el momento de ser utilizadas (Muñoz y Alfaro, 2000).

4.9.1. Método de microdilución en caldo

Tabla 13-4: Resultados método micro dilución en caldo

Bacterias		CMI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	500 ppm	250 ppm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	250 ppm	125 ppm
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	250 ppm	125 ppm

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

4.9.2. Método de Kirby-Bauer

Tabla 14-4: Resultados método Kirby Bauer

Bacterias	EXTRACTO ETANÓLICO					Control positivo	Control negativo	CMI
	Concentración (µg/mL)							
	64000	32000	16000	8000	4000		DMSO	µg/mL
HALOS DE INHIBICIÓN (mm)								
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0	0	0	0	0	E (15) 31	0	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	11	0	GE (10) 25	0	8000
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	10	0	0	0	0	AX (10) 28	0	64000

INTERPRETACIÓN DE LA TABLA: E: Eritromicin; GE: Gentamicina; AX: Amoxicilina; NA: No hay Actividad

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

La tabla 10-4 detalla los resultados obtenidos por el método de microdilución en caldo determinando la Concentración Mínima Inhibitoria de los microorganismos, a una concentración de 250 ppm para *Staphylococcus aureus* y a 125 ppm para *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus epidermidis*. Se utilizó como control positivo al inóculo de cada bacteria y como control negativo caldo nutritivo.

Al evaluar mediante el método de Kirby-Bauer difusión en discos, los resultados descritos en la tabla 11-4 se expresaron en mm de diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano. Se tomaron en cuenta 10 diluciones a partir de una solución stock de 128000 µg/mL, frente a las tres cepas bacterianas. Se realizó por duplicado, destacando en cada uno el uso de controles positivos (discos de antibióticos comerciales: Gentamicina (10 µg), Eritromicina (15 µg) y Amoxicilina (10 µg), y de un control negativo (Dimetilsulfóxido).

De esta forma, los resultados obtenidos indican que el extracto etanólico de la madre selva (*Lonicera japonica*) demuestra actividad antibacteriana frente a: *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 8000 µg/mL siendo esta la CMI con un halo de inhibición de 11 mm, y frente a *Staphylococcus epidermidis* a una concentración de 64000 mg/µL, con un halo de 10 mm. Mientras que para *Staphylococcus aureus* y las demás concentraciones no se evidenció actividad antimicrobiana.

No existen antecedentes bibliográficos que demuestren la actividad antibacteriana del extracto etanólico de esta planta frente a las bacterias seleccionadas, por lo tanto, no se puede comparar los resultados obtenidos, pero se puede observar que, en relación a la susceptibilidad de los microorganismos con los antibióticos comerciales, el extracto etanólico de *Lonicera japonica* tiene una actividad antibacteriana considerable al tratarse de una planta.

Es importante atribuir esta propiedad a los componentes que presenta esta especie vegetal. Los metabolitos secundarios de la madreSelva japonesa que le proporcionan la actividad antibacteriana son los compuestos fenólicos como los flavonoides por lo que la inhibición observada frente de las bacterias *P. aeruginosa* y *S. epidermidis* se debe a estos compuestos químicos además de que son reconocidos como agentes antibacterianos contra una amplia gama de microorganismos patógenos (Chen et al 2015).

En concordancia con un estudio, los mecanismos antibacterianos de los flavonoides son: la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, inhibición de la función de la membrana citoplasmática, inhibición del metabolismo energético, inhibición de la unión y formación de biopelículas, inhibición de la porina en la membrana celular, alteración de la permeabilidad de la membrana, y atenuación de la patogenicidad (Xie et al 2015).

Al evaluar la actividad antibacteriana mediante el método de Kirby Bauer puede existir ciertos factores que intervengan con la efectividad de los resultados puesto que, se puede observar un efecto inhibitorio aparentemente menor y se puede atribuir a que el extracto vegetal al contener una variedad de componentes y al ser aplicado el extracto sobre el disco, estos podría absorber metabolitos que ayudan a la inhibición del microorganismo pero al momento de reaccionar con el microorganismo, dichos metabolitos no puedan interactuar y cumplir con su función.

También la composición del disco en blanco y la polaridad de los compuestos de extracto tienen una gran influencia para su efectividad. Otro punto a considerar como desventaja es que, al impregnar el extracto en el disco, no se absorba totalmente, lo que implicaría un menor volumen del extracto a evaluar (Carrillo et al. 2020, pp.73-74).

Después de todo, el obtener un resultado disminuido o nulo de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de la madreSelva frente a las demás diluciones y bacterias en estudio no debe ser motivo para detener la investigación, ya que resultaría importante ensayar la actividad de estos frente a otros microorganismos patógenos que infectan al ser humano, con el fin de conocer su espectro de acción (Valarezo, 2019 p.26).

4.10. Control de calidad de la crema tópica

El control de calidad del producto terminado tiene como objetivo determinar si el producto farmacéutico cumple con las características de calidad preestablecidas para las que fue diseñado, para ello las muestras se almacenaron a temperatura ambiente, evitando el contacto con la luz solar. Una vez transcurrido 24 horas se evaluaron las características organolépticas y físico químicas, como se observa en la tabla 12 -4.

Tabla 15-4: Resultados del control de calidad del producto final

Parámetros	Resultados		
Características organolépticas	Olor	Ligeramente Dulce y mentolado	
	Color	F1	Verde oliva
		F2	Verde tenue
		F3	Blanco hueso
		F4	Blanco
Aspecto	Homogeneo		
Presencia de grumos	Ausencia		
Características Físico-Químicas	pH aparente	4,75± 0,35	
	Viscosidad aparente	38475 cP	
	Signo de emulsión	O/W	

INTERPRETACIÓN DE LA TABLA: F1: Formulación 1 (64000 ppm); F2: Formulación 2 (8000 ppm) ; F3: Formulación 3 (250 ppm) ; F4: Formulación 4 (125 ppm)

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

Al realizar el análisis sensorial, de las cuatro formulaciones se observó una variación de la tonalidad de colores verde a blanco, debido a la concentración agregada a la crema base. Presentaron un aspecto homogéneo atractivo a la vista y ausencia de grumos, olor ligeramente dulce mentolado. Con respecto al análisis físico químico se obtuvo un pH aparente de 5 que , de acuerdo el pH óptimo de la piel está entre 4,0 a 6,0 por lo que en su estudio describe que los productos tópicos deben estar dentro de esos valores debido a que el pH ácido de la superficie de la piel es reconocido como un factor regulador para el mantenimiento de la homeostasis del estrato córneo y la permeabilidad de la barrera.

De acuerdo con la Guía de estabilidad de Productos Cosméticos dispuesto por la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, la viscosidad es un parámetro que determina la consistencia o fluidez apropiada, es así que se obtuvo un valor de 38475 cP, a una temperatura de 24,7 °C a 10 RPM (ANVISA, 2005 , p.35).

Por último, se demostró que la formulación es de tipo aceite en agua (O/W), ya que al realizar el signo de la emulsión con azul de metileno, el colorante se dispersó sobre la muestra. Generalmente, las emulsiones O/W son las más utilizadas debido a su facilidad para aplicar sobre la piel (Quisnancela, 2019 p. 43).

4.11. Actividad antibacteriana de la crema tópica

Tabla 16-4: Resultados actividad antibacteriana método Difusión en placa

Bacterias	Crema Tópica Formulada				Control Positivo Crema antibacteriana comercial	Control Negativo Crema base
	Concentración (µg /mL)					
	64000	8000	250	125		
HALOS DE INHIBICIÓN (mm)						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0	0	0	8	22	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0	10	10	9	20	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	0	0	0	9	18	0

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

Los resultados de la actividad antibacteriana del producto final se detallan en la tabla 13-4, en donde se aprecia una inhibición para las bacterias: *S. aureus* a una concentración de 125 µg/mL con un halo de 8 mm, *P. aeruginosa* a las concentraciones de 8000, 250 y 125 µg/mL con halos de 10, 10 y 9 mm respectivamente y *S. epidermidis* a una concentración de 125 µg/mL con un halo de 9 mm.

Se comparó con una crema antibacteriana comercial a base de manteca de karité, hialuronato de sodio, proteína de trigo hidrolizada, pantenol y extracto de hojas de *Symphytum officinale* (consuelda). Este producto ha sido utilizado para mantener la higiene de las manos sin reseccarlas, de acuerdo a estudios realizados donde la consuelda contiene un componente denominado alantoína la cual puede curar la piel herida o dañada, por lo que en muchas preparaciones, el extracto puede ser utilizado como un agente curativo. Así mismo, tiene la capacidad de elimina cualquier otra proteína relacionada con los microorganismos de la superficie de la piel por acción astringente (Araújo et al. 2012).

De esta manera al realizar la evaluación antibacteriana de la crema comercial se observó que en efecto tuvo una buena actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus epidermidis* con halos de 22, 20 y 18 mm respectivamente.

De acuerdo a bibliografía acerca de la medicina tradicional China en el "Compendio de Materia Médica" de Li Shizhen afirma que los tallos, las hojas y las flores de la madreselva tienen varias propiedades curativas, es por eso que las generaciones posteriores consideraron el uso de esta planta como medicamento clave para reducir la hinchazón, dispersar las toxinas y tratar las llagas. Estudios farmacológicos actuales han demostrado que la madreselva tiene una variedad de actividades biológicas, como antibacteriana de amplio espectro, antiviral, antitumoral, potenciadora del sistema inmunitario, antipirética y antiinflamatoria, especialmente un efecto terapéutico sobre hinchazones, picaduras de insectos, ántrax, forúnculos, sarpullidos. Estos últimos generalmente producidos por *Staphylococcus aureus* que según un estudio, lo describe como la principal causa de infecciones de la piel y los tejidos blandos (McCaig et al 2006).

Por otro lado, *Staphylococcus epidermidis* al ser un microorganismo comensal beneficioso en la piel que al existir una alteración genética o física, puede cambiar drásticamente el comportamiento benigno a patógeno, especialmente a nivel hospitalario, esta bacteria es la fuente más común de infecciones en dispositivos médicos ya que al ser un colonizador permanente y ubicuo de la piel humana hay una alta probabilidad resultante de contaminación del dispositivo durante la inserción (Brown y Horswill, 2020).

De manera similar *Pseudomonas aeruginosa* son ubicuas y prefieren los ambientes húmedos en ocasiones esta bacteria se encuentra presente en la piel normal de las zonas axilar y anogenital. En los hospitales, el microorganismo suele encontrarse en los lavamanos, las soluciones antisépticas y los recipientes para orina. Puede producirse la transmisión a través del contacto de la piel lesionada o reblandecida y de las mucosas con el agua o con los objetos contaminados. (Bush y Vázquez 2022).

En base a lo expuesto se puede considerar que la crema antibacteriana formulada a base del extracto etanólico de *Lonicera japonica* puede ser de gran ayuda para la desinfección de la piel con el fin de evitar la contaminación de bacterias patógenas mediante el contacto de una persona a otra.

4.12. Control de calidad microbiológico de la crema tópica

Tabla 17-4: Resultados del control microbiológico de la crema tópica

Ensayos microbiológicos	Resultado	Límite de aceptabilidad (NTE INEN 2867:2015)
<i>Aerobios mesófilos totales</i>	Ausencia	Límite máximo 5×10^3 UFC*/g o mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Ausencia en 1 g o ml
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Ausencia en 1 g o ml
<i>Mohos y levaduras</i>	Ausencia	<100 UFC/g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausencia	Ausencia en 1 g o ml

Fuente: Norma INEN 2867-2015

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

En la tabla 14-4 se encuentran descritos los resultados de los ensayos microbiológicos realizados en la crema tópica, indicando que este producto cosmético se encuentra dentro de los límites de aceptabilidad de acuerdo a la Norma NTE INEN 2867: 2015, demostrando que este producto fue elaborado bajo óptimas condiciones por lo tanto su aplicación en la piel es segura y no hay riesgo de infección por microorganismo patógenos.

4.13. Elaboración de la etiqueta del producto

La etiqueta del producto se desarrolló en base a los requisitos establecidos en la norma NTE INEN 2867: 2015, exceptuando el número de notificación sanitaria obligatoria, trámite que se debe realizar cuando se llegue a comercializar el producto, razón por la cual no aplica en este caso, debido a que la elaboración de la crema antibacterial se realizó con fines netamente investigativos.

Por otro lado, el envase elegido para el producto fue un tubo colapsible de 60 g, en el que se colocó la etiqueta.



Ilustración 5-4: Etiqueta de la crema tópica formulada

Realizado por: Ruales, Marla, 2023.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se llevó a cabo el método de percolación con etanol a 96% para la obtención del extracto, demostrando un rendimiento del 17,51% a partir de 300 g de hojas secas y trituradas de *Lonicera japonica*. Además, se determinó las características organolépticas y físico-químicas de la droga seca y extracto etanólico, de modo que, se verificó su pureza y calidad debido a que los parámetros se encontraron dentro del rango de aceptabilidad de acuerdo a la Farmacopea Japonesa y Española, indicando una correcta recolección, secado y almacenado del material vegetal.
- Se identificaron los metabolitos secundarios del extracto acuoso y etanólico mediante un análisis fitoquímico preliminar detectando la presencia de alcaloides, azúcares reductores, flavonoides, triterpenos/esteroles, taninos/ compuestos fenólicos y saponinas, resultados que se relacionan con la cromatografía realizada con acetato de etilo, ácido fórmico, ácido acético glacial, agua (100:11:11:26) distinguiendo 3 bandas evidenciando a los flavonoides y ácido clorogénico, aseverando estudios previos en donde describen a estos compuestos como principales componentes la madre selva.
- Se realizaron dos métodos para evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Lonicera japonica* frente a tres bacterias (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228), se probaron 10 diluciones en cada uno. Para el método de difusión en disco (Kirby- Bauer) se partió de una disolución stock de 128000 ppm de las cuales presentó actividad frente a dos bacterias: *Pseudomonas aeruginosa* a una concentración de 8000 µg/mL. (CMI) y *Staphylococcus epidermidis* a una concentración de 64000 µg/mL. Mientras que para el método de microdilución en placa se determinó actividad antibacteriana frente a las tres bacterias a concentraciones de 250 y 125 ppm siendo las concentraciones mínimas inhibitorias en donde se mostró la acción biológica el extracto. En definitiva, se puede decir que los resultados obtenidos son aceptables, debido a que, al ser una planta de la que no existe mucha información bibliográfica, se pudo comprobar que posee actividad antibacteriana frente a las tres bacterias estudiadas.

- Se desarrolló una forma farmacéutica semisólida antibacteriana en donde el extracto etanólico a base de hojas de *Lonicera japonica* pudo ser vehiculizado, se elaboró a partir de las concentraciones que demostraron tener un efecto antibacteriano (8000, 64000, 250 y 125 µg/mL) evaluado mediante el método de difusión en placa. Contó con las características organolépticas, físico químicas y microbiológicas óptimas cumpliendo con las especificaciones requeridas por la NTE INEN 2867: 2015; por lo tanto, se consideró a la formulación como segura, inocua y de calidad, demostrando que el procedimiento aplicado fue el adecuado.

5.2. Recomendaciones

- Utilizar técnicas cromatografías más especializadas para aislar e identificar los compuestos fenólicos presentes en *Lonicera japonica* para estudiar de manera más exhaustiva el efecto antibacteriano de estos componentes.
- Analizar el efecto inhibitorio del extracto etanólico al 96% de *Lonicera japonica* frente a otros microorganismos patógenos para observar su comportamiento, no solo empleando cepas de colección como ATCC sino también bacterias aisladas de pacientes multirresistentes.
- Extender los estudios expuestos en este trabajo de investigación, haciendo uso de otras partes de la misma planta para conocer la posibilidad de un efecto sinérgico y así potenciar la actividad antibacteriana de esta especie vegetal, siendo una posible fuente natural para la elaboración de medicamentos.
- Experimentar otro tipo de formulación farmacéutica utilizando el compuesto que se atribuye a las propiedades inhibitorias de las bacterias, para observar un mejor resultado antibacteriano.

BIBLIOGRAFÍA

ABUBAKAR, A. y HAQUE, M. *Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes.* [en línea] 2018. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7398001/#:~:text=%5B1%2C2%2C3%2C4%2C5%5D%20Extraction,solvent and standard extraction procedure.](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7398001/#:~:text=%5B1%2C2%2C3%2C4%2C5%5D%20Extraction,solvent%20and%20standard%20extraction%20procedure.)

AGUADO, M et al. *Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de un extracto etanólico de Aloysia polystachya (Griseb.)* [en línea] 2013. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57929953006.pdf>

ALLAUCA, A. *Determinación de la actividad diurética de Oreocallis grandiflora en ratas (Rattus norvegicus).* [en línea] 2017. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7931/1/56T00744.pdf>

ALMARAZ N. et al. *El metabolismo secundario de las plantas* [en línea] 2006. Disponible en: <https://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/123456789/8292/1/metabolismosecundario-almaraz.pdf>.

AMAGUAÑA, F et al. *Estandarización fitoquímica del extracto de caléndula (Calendula officinalis)* [en línea]. 2018. Disponible en: <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/5081/1/UPS-CYT00109.pdf>.

ANVISA. *Guía de estabilidad de productos cosméticos.* [en línea] 2004. Disponible en: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Gu%C3%ADa+de+Estabilidade+de+Produtos+Cosm%C3%A9ticos/dd40ebf0-b9a2-4316-a6b4-818cac57f6de>

ARAUJO, J y SALAS, R. *Actividad Antimicrobiana de Plantas.* 2008. Universidad Científica del Sur. Lima. Perú. [en línea]. 2020. Disponible en: <http://www.apicoladelalba.cl/actividad-antimicrobiana-de-plantas-sci/>

ARIAS, L. *Enfoque, tipo, diseño y método de investigación.* [en línea] 2006. Disponible en: https://miasesor detesis.com/enfoquetipodisenoinvestigacion/#Cuales_son_los_enfoques_principales_de_investigacion

ÁVALOS, A y PEREZ, C. *Metabolismo secundario de plantas Reduca (Biología).* Serie Fisiología Vegetal. [en línea] 2017. Disponible en: Disponible en:

https://eprints.ucm.es/id/eprint/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf

BELMONTE, Á. *Clasificación de las bacterias*. [en línea] 2020. Disponible en: <https://www.unprofesor.com/ciencias-naturales/clasificacion-de-las-bacterias-4049.html>.

BERMEJO, A et al. *Determinación de parámetros químico-físico de las tinturas al 20% obtenidas de las hojas, tallos y frutos de Melia azedarach L (Pursiana)*. *Revista Habanera de Ciencias Medicas*, vol. 13, no. 5, 2016, pp. 670-680.

BROWN, M y HORSWILL, R. *Staphylococcus epidermidis—Skin friend or foe?* [en línea], 2020. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7660545/>

BRUNEL, J. *Producción de los metabolitos secundarios en plantas medicinales*. [en línea]. 2017. Disponible en: <https://www.foodnewlatam.com/paises/93-venezuela/7021%C3%B3n-de-los-metabolitos-sekundarios-medicinales.html#:~:text=Los%20metabolitos%20sekundarios%2C%20en%20particular,la%20planta%20y%20su%20ambiente.>

BRUSLIND, L. *Bacteria - Cell Walls*. *Libretext biology* [en línea]. 2021. Disponible en: [https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_\(Bruslind\)/04%3A_Bacteria%3A_Cell_Walls](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Bruslind)/04%3A_Bacteria%3A_Cell_Walls).

BRYDA, O. *Extraction Methods of Extractive Substances from Medicinal Plant Raw Materials: Advantages and Limitations*. [en línea]. 2021. Disponible en: <https://www.annalsofrscb.ro/index.php/journal/article/view/4697>

BULUGAHAPITIYA, V. *Plants Based Natural products Extraction, Isolation and Phytochemical screening methods* [en línea]. 2013. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/324136585>.

BUSH, L. *Introducción a las bacterias*. *Manual MSD* [en línea]. 2022. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-ec/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-introducción/introducción-a-las-bacterias>

CABI. *Compendio de especies invasoras, Lonicera japonica* [en línea]. 2022. Disponible en: www.cabi.org/isc

CALVO, J. y MARTÍNEZ, L. *Mecanismos de acción de los antimicrobianos*. *Enfermedades*

Infecciosas y Microbiología Clínica [en línea] 2009. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X08000177>.

CANTÓN, R. *Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica.* *Revista Elsevier* [en línea], 2010, Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-lectura-interpretada-del-antibiograma-S0213005X1000087X>

CARRASCO, C y LARA, K. *Análisis comparativo del grado de variación del contenido del Principio Activo (Apigenina 7-Glucósido) de la Manzanilla (Matricaria Chamomilla) Y Matico (Budeja Globosa) fresca y deshidratada.* [en línea] 2014. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/421/1/UNACH-EC-IAGRO-2014-0001.pdf>

CARRILLO, T et al. *Actividad antimicrobiana de extractos hidroalcohólicos de hojas de dos variedades de Mangifera indica L.* [en línea]. 2020. Disponible en: <https://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/949>

CARVAJAL, L et al. *Preliminary phytochemical analysis of Cupatá (Strychnos schultesiana krukoff) stems and seeds.* *Revista Colombia Forestal* [en línea] 2009. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/cofo/v12n1/v12n1a11.pdf>

CASTILLO, G et al. *Análisis fitoquímico: Una herramienta para develar el potencial biológico y farmacológico de las plantas.* *TLATEMOANI: revista académica de investigación* [en línea], 2017. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7283800>.

CAYCEDO, L et al. *Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química.* 2021.

CAVALIER, S et al. *MIC Testing. Manual of antimicrobial susceptibility testing.* [en línea]. 2005. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>

CENTRÓN, D. *Antibióticos.* [en línea]. 2018. Disponible en: <https://www.fmed.uba.ar/sites/default/files/2020-02/C9 Clase 9 Antibióticos 1-Centrón 2020.pdf>.

CERVANTES, E et al. *Características generales de Staphylococcus aureus* [en línea] 2014. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>

CHEMOTHERAPY, B. *Mecanismos antimicrobianos*. [en línea]. 2021. Disponible en: <https://www.futurelearn.com/info/courses/introduccion-microbiologiapractica/0/steps/213069>.

CHEN, L et al. *Research progress on chemical constituents of Lonicera japónica*. 2015. [en línea] 2014. Disponible en: <http://www.tiprpress.com/xdywl/html/2015/1/20150126.htm>

CHRZASZCZ, M et al. *Phenolic composition and antioxidant activity of plants belonging to the cephalaria (Caprifoliaceae) genus*. *Plants*, vol. 10, no. 5, 2021. pp. 1-14.

COY, C et al. *Caracterización química del aceite esencial e identificación preliminar de metabolitos secundarios en hojas de la especie raputia heptaphylla (rutaceae)*. *Elementos*, 2014.

DE SOUSA, T et al. *Características genómicas y metabólicas de la Patogenicidad en Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Internacional de Ciencias Moleculares* [en línea] 2021. Disponible en la dirección: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms222312892>

DÍAZ, Á *Familia de plantas CAPRIFOLIACEAE*. *Jardín botánico.org* [en línea]. 2010. Disponible en: <https://www.jardinbotanico.org/parque-jardin-botanico-de-moraleja-de-enmedio/familias-de-plantas/>.

DONALD, D et al. *Extracción, identificación y evaluación de saponinas en Agaricus Bisporus*. *Biotempo*, vol. 5, 2017, pp. 3-36.

DUARTE O. *La bioprospección como mecanismo de cooperación para la construcción de capacidades endógenas en ciencia y tecnología y análisis de las capacidades de Colombia para adelantar procesos de Bioprospección*. *VI Jornadas Latinoamericanas de Estudios Sociales de la Ciencia y la Tecnología*. ESOCITE. 2006: 1-26.

DOMINGO, D y LÓPEZ, M. *Plantas con acción antimicrobiana* *Revista Española Quimioterapia*. [en línea], 2003. Disponible en: <https://seq.es/seq/0214-3429/16/4/385.pdf>

ESCMID. *Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution*. *Clinical Microbiology and Infection*. Online. 2003. Vol. 9, no. 8, pp. 9.

ESTRADA, A. *Revisión Taxonómica Familias Caprifoliaceae Saxifragaceae Grossulariaceae*

Hydrangeaceae Estado Guerrero. 2013.

EUCAST. *Estudio de sensibilidad de antimicrobianos* [en línea] 2012. Disponible en: <http://coesantseimc.org/documents/Descripci%C3%B3n%20del%20m%C3%A9todo%20de%20disco.pdf>

EYLER, R. y SHVETS, K. *Clinical Pharmacology of Antibiotics. Clinical Journal of the America Society of Nephrology* [en línea] 2019. Disponible en: <https://cjasn.asnjournals.org/content/14/7/1080/tab-figures-data>.

FARINA, L. *Resistencia bacteriana: un problema de salud pública de difícil solución.* [en línea] 2016. Disponible en: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_a=&lng=en&nrm=iso

FERNÁNDEZ, E. *Fórmulas dermatológicas. Farmacia Profesional* [en línea] 2003. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-pdf-13044494>.

FERNÁNDEZ, M. *Factores de patogenicidad de staphylococcus epidermidis y su modulación por antisépticos.* [en línea] 2007. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=200738#:~:text=Estas%20infecciones%20son%20muy%20frecuentes,hospedador%20y%20de%20los%20antimicrobianos>

FICA, A *Basics about antimicrobial agents. Medwave* [en línea], 2005. Disponible en: <https://www.medwave.cl/link.cgi/Medwave/Reuniones/medicina/2005/2/2522FUENTES>

FLORES, M. *Técnicas Separativas. Farmacognosia* [en línea] 2017. Disponible en: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/farmacognosia/wp-content/uploads/2017/03/COMPL-TEORICO-UNIDAD-2-Métodos-de-Separación-2017-FARGNOSI-FCN-UNPSJB.pdf>.

GALLARDO, C. *Efecto de la escarificación en el contenido de saponina en dos variedades de quinua (Chenopodium quinoa Willd)* [en línea]. 2017. Disponible en: <https://docplayer.es/89031028-Universidad-central-del-ecuador-facultad-de-ciencias-agricolas-carrera-de-ingenieria-agronomica.html>.

GE, L et al. *Genus Lonicera: New Drug Discovery from Traditional Usage to Modern Chemical and Pharmacological Research. ResearchGate.* [en línea],2021. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/357196747_Genus_Lonicera_New_Drug_Discovery_from_Traditional_Usage_to_Modern_Chemical_and_Pharmacological_Research/stats

GILABERTE, Y et al. *Fotoprotección* [en línea], 2003. Disponible en: [https://www.actasdermo.org/esfotoproteccionarticulo13048173#:~:text=La%20fotoprotecci%C3%B3n%20tiene%20como%20objetivo,la%20radiaci%C3%B3n%20ultravioleta%20\(UV\).](https://www.actasdermo.org/esfotoproteccionarticulo13048173#:~:text=La%20fotoprotecci%C3%B3n%20tiene%20como%20objetivo,la%20radiaci%C3%B3n%20ultravioleta%20(UV).)

GIRALDO S et al. *Descripción del uso tradicional de plantas medicinales en mercados populares de Bogotá D.C. Nova.* 2015. pp. 75-82.

GÓMEZ, P et al. *Infecciones bacterianas de la piel. Pediatría Integral,* 2004. pp. 281-286.

GONZALVES, R et al. *Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant and photoprotective activities of extracts from flowers of Bromelia laciniosa (Bromeliaceae)*". Taylor & Francis Group [en línea], 2017. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13102818.2017.1288073>

GOOGLE MAPS. *Yaruquíes.* [en línea] 2022. Disponible en: <https://www.google.com.ec/maps/@-1.6933108,-78.6761558,20z?entry=ttu>

GUAYMAS, O et al. *Breve fundamento y técnicas de purificación y caracterización de sólidos.* Universidad de las Palmas de Gran Canaria [en línea] 2020. Disponible en: <https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/436/1/494.pdf>.

HUDZICKI, J. *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol Author Information.* American Society For Microbiology [en línea] 2012. Disponible en: <https://www.asm.org/Protocols/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Pro>.

ILIES, D et al. *Volatile Constituents from the flowers of two Species of Honeysuckle (Lonicera japonica and Lonicera caprifolium)* [en línea] 2014. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/297282524_VOLATILE_CONSTITUENTS_FROM_THE_FLOWERS_OF_TWO_SPECIES_OF_HONEYSUCKLE_LONICERA_JAPONICA_AND_LONICERA_CAPRIFOLIUM/references

IRIBARREN, N. *Tipos de Extractos Vegetales en la Cosmética Natural* [en línea]. 2012. Disponible en: <https://kalimielcursos.com/tipos-de-extractos-vegetales-en-la-cosmetica-natural/>.

JORDANO, P. *Biología de la reproducción de tres especies del género Lonicera (Caprifoliaceae) en la Sierra de Cazorla* [en línea]. 1990. Disponible en: https://digital.csic.es/bitstream/10261/42692/1/Anales_48%281%29_031_052.pdf

JORGENSEN, J. *Broth Microdilution and Disk Diffusion*. [en línea] 2016. Disponible en: [https://goldbio.com/documents/2531/Broth Microdilution and Disk Diffusion.pdf](https://goldbio.com/documents/2531/Broth%20Microdilution%20and%20Disk%20Diffusion.pdf).

KELLER, T. *¿Qué son los extractos de plantas?* *Pharmaweb* [en línea] 2021. Disponible en: <https://www.pharmiweb.com/article/what-are-plant-extracts>.

KESHARWANI, S. *IR Spectropy*. [en línea] 2019. Disponible en: <https://byjus.com/chemistry/infrared-spectroscopy/>.

KUKLINSKI, C. *Farmacognosia, estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega. 2003.

LEYVA, J et al. *Funcionalidad antibacteriana y antioxidante de extractos hidroalcohólicos de *Phellinus merrillii**. [en línea] 2013. Disponible en: <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v37/v37a3.pdf>

LIMA, W y MORALES, R. *Caracterización farmacobotánica de *Byrsonima crassifolia* y *Neurolaena lobata** [en línea] 2014. Disponible en: https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/02/879002/caracterizacion-farmacobotanica-de-byrsonima-crassifolia-y-neur_hjFFmRJ.pdf

LÓPEZ, J et al. *Quality parameters for plant and extracts used in the preparation of an expectorant formulation*. [en línea] 2014. Disponible en: <https://revfarmacia.sld.cu/index.php/far/article/view/29/33#:~:text=1%2C3%2D5,El%20control%20de%20calidad%20de%20las%20drogas%20vegetales%20y%20sus,en%20principios%20activos%20o%20marcadores>.

LÓPEZ, M et al. *Métodos Físicos de Separación y Purificación de Sustancias Orgánicas. Universidad de las Palmas de Gran Canaria* [en línea] 2005. Disponible en: <https://accedacris.ulpgc.es/bitstream/10553/436/1/494.pdf>.

LORENZO, J. *Las plantas como fuente de compuestos fotoprotectores frente al daño en el ADN producido por la radiación ultravioleta*. [en línea], 2019. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/racefn/v43n168/0370-3908-racefn-43-168-550.pdf>

LUKIC, M et al. *Towards Optimal pH of the Skin and Topical Formulations: From the Current State of the Art to Tailored Products.* [en línea] 2021. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2079-9284/8/3/69>

LUNA, J et al. *Cáncer y cambio climático: ¿existe alguna evidencia?. ELSEVIER* [en línea], 2017. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-colombiana-cancerologia-361-articulocancercambioclimaticoexistealgunaS0123901517300070#:~:text=Se%20est%C3%A1%20produciendo%20un%20aumento,como%20el%20c%C3%A1ncer%20de%20piel>

LUSTRE, H. *Los superpoderes de las plantas: los metabolitos secundarios en su adaptación y defensa.* *Revista Digital Universitaria*, 2022.

MACCAIG, L et al. *Staphylococcus aureus-associated Skin and Soft Tissue Infections in Ambulatory Care.* [en línea] 2006. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3372331/>

MARCANO, D. y HASEGAWA, M. *Fitoquímica Organica* [en línea]. 2002. Disponible en: <http://saber.ucv.ve/omp/index.php/editorialucv/catalog/download/18/10/56-1?inline=1>.

MCGOUGH, S et al. *Rates of increase of antibiotic resistance and ambient temperature in Europe: a cross-national analysis of 28 countries between 2000 and 2016.* *Euro Surveill.* [en línea], 2020. Disponible en: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.45.1900414>

MSP. *Resistencia antimicrobiana.* [en línea] 2022. Disponible en: https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2019/08/gaceta_ram2018.pdf

MIRANDA, E et al. *Actividad antimicrobiana de extractos de Psidium friedrichsthalianum L., Pterocarpus hayesii L., Tynanthus guatemalensis L. y Spondias purpurea L.* [en línea] 2012. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85623048007.pdf>

MUÑOZ, R y ALFARO, W. *Estandarización de la técnica de reducción del NBT mediante lectura en placas de microELISA.* [en línea] 2020. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462000000100004

NTE INEN. *Productos cosméticos requisitos.* [en línea] 2015. Disponible en: https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas23/nte_inen_2867.pdf

OCHOA, L. y SARMIENTO, A. *Estudio fitoquímico de la especie vegetal Bucquetia glutinosa (L. f.) DC. (Melastomataceae) y evaluación de su actividad biológica. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales* [en línea] 2018. Disponible en: <https://repository.udca.edu.co/bitstream/11158/996/1/TESIS 2018-05-22.pdf>.

OCHOA, S et al. *Características patogénicas de cepas de Pseudomonas aeruginosa resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas.* [en línea] 2013. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-11462013000200010

OLIOSO, B. *Honeysuckle extract review for antimicrobial protection* [en línea] 2017. Disponible en: <https://thegreenchemist.com/wp-content/uploads/2019/05/Honeysuckle.pdf>

OLIVO, E. *Caracterización fitoquímica de la fracción hipoglucemiante aislada del extracto acuoso de la vaina de frijol (Phaseolus vulgaris L.)* [en línea]. 2015. Disponible en: https://tesis.ipn.mx/jspui/bitstream/123456789/18722/1/proyecto de investigacion_EOP.pdf.

OMS. *Resistencia a los antibióticos.* [en línea] 2021. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>

ONDARSE, D. *Métodos de separación de mezclas. Concepto* [en línea] 2021. Disponible en: <https://concepto.de/metodos-de-separacion-de-mezclas/>.

OUEST, M. *Una actividad estrictamente definida.* [en línea] 2019. Disponible en: <https://www.berkem.com/en/expertise-en/plant-extraction>

PABÓN, Y. y GONZÁLEZ, L. *Formas Farmacéuticas* [en línea] 2017, pp. 28. Disponible en: <https://doi.org/10.16925/greylit.2110>

PEDRIQUE, A. *Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibióticos (antibiograma)* [en línea]. 2022. Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicr/10_Antibiograma.pdf

PELCZAR, A et al. *Microbiología.* 2da. ed. México. McGraw -Hill. 1982. pp. 11- 425.

PEREIRA, S et al. *Tamizaje fitoquímico de los extractos alcohólico, etéreo y acuoso de las hojas de la Trichilia hirta L. Química Viva* [en línea] 2009. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/863/86320633005.pdf>.

PÍREZ, M. y MOTA, M. *Morfología y estructura bacteriana.* "Temas de bacteriología y virología médica. *European Journal of Social Sciences* [en línea] 2009. Disponible en: <https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/39779542/MorfologiayEstructuraBacteriana-1-withcover-pagev2.pdf?Expires=1667195697&Signature=JWa3OKTrw2krun1myDK40j3B0Lx1sDasW7bx59k~XeU6yOuxBKw2ybXsNiOq4CANz9Op3vkprAJ5xjyx8nSuveUv8DiMUqHV20CgG2d~9qDPDgU>.

PRIYANKA, S et al. *Herbal Medicine and Biotechnology for the Benefit of Human Health.* [en línea] 2019. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780124160026000304>

QUISNANCELA, A. *Formulación de un protector solar a base de Passiflora manicata (Juss.) Pers.* [en línea] 2019. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/10570/1/56T00856.pdf>

QUIZHPI, N. *Evaluación in vitro de la actividad fotoprotectora de los extractos alcohólico y glicólico de la cáscara de papa (Solanum tuberosum L.) variedad superchola para su uso en la elaboración de un protector solar.* [en línea] 2019. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/17968/1/UPS-CT008531.pdf>

REHDER, A. *Synopsis of the Genus Lonicera Author (s): Alfred Rehder Reviewed work (s): Source : Missouri Botanical Garden Annual Report 1993. pp. 27-232.*

RODRÍGUEZ, C et al. *Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia* [en línea], 2017. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v15n27/1794-2470-nova-15-27-00119.pdf>

RODRÍGUEZ, P. y ARENAS, R. *Tinción Gram. Dermatología Cosmética, Medica y Quirúrgica* [en línea] 2018. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>.

ROJAS, F. y AMARO, J. *Aportes Quimiotaxonomicos Al Estatus Actual De La Familia Caprifoliaceae Chemotaxonomic Contributions To Current Status of Caprifoliaceae.* *Av. cien. ing* [en línea] 2015. Disponible en: http://www.exceedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/25.

RUBIO, C. *Elaboración de una crema cicatrizante a base del extracto de la pulpa de aguacate (Persea americana mill) Machala, 2014.* [en línea], 2014. Disponible en: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1418/7/CD00282-TEISIS.pdf>

SÁENZ, E y SÁNCHEZ, L. *Antibióticos tópicos. Educación médica continua.* [en línea], 2005. Disponible en: https://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v15_n1/pdf/a02.pdf

SAFEENA, M. y KALINGA, J. *Qualitative and quantitative screening of secondary metabolites in selected medicinal plants of Sri Lanka. Journal of Medicinal Plants Studies*, vol. 8, no. 5, 2020, pp. 94-100.

SÁNCHEZ, L. *Infecciones Cutáneas Bacterianas Educación Médica Continua. Eliana Sáenz-Anduaga Dermatología Peruana* [en línea] 2016. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v16_n1/pdf/a02.pdf.

SEIGLER D. *Metabolismo Secundario de las Plantas.* Nueva York: Springer 2017.

SOTO, M. *Dialnet-EstudioFitoquimicoYCuantificacionDeFlavonoidesTota-6181512. UCV - Scientia*, 2015, pp. 135-139.

TEOH, E. *Secondary Metabolites of Plants.* NIH [en línea], 2015. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7123774/>

ULLOA, C. y MOLLER, P. *Caprifoliaceae AL Jussieu. Arboles y arbustos de los Andes del Ecuador* [en línea]. 2017. Disponible en: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=201&taxon_id=10159.

VALAREZO, S. *Actividad antimicrobiana de extractos de tallos y flores del Hedyosmum sp. recolectadas en el bosque Jacarón, Chimborazo.* [en línea] 2015. Disponible en: <http://dspace.unach.edu.ec/bitstream/51000/5555/1/UNACH-EC-FCS-LAB-CLIN-2019-0005.pdf>

VÁSQUEZ, M. *Estudio Fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de Piper peltatum L. y Piper aduncum L. procedente de la región Amazonas.* [en línea] 2015. Disponible en: <file:///C:/Users/alejo/Downloads/Dialnet-EstudioFitoquimicoYCuantificacionDeFlavonoidesTota-6181512.pdf>

VILLARREAL, J. *Caprifoliaceae* [en línea]. 2000. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0034666774900360>.

WATTS, B. *Dosage form. Pharma IQ* [en línea]. 2022.. Disponible en: <https://www.pharma-iq.com/glossary/dosage-form-df>.

XIE, Y et al. *Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism.* [en línea] 2015. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25245513/#:~:text=Flavonoids%20are%20well%20known%20as,to%20be%20substitutes%20for%20antibiotics>.

XIONG, J et al. *Screening and identification of the antibacterial bioactive compounds from Lonicera japonica Thunb. leaves, Food Chemistry. ScienceDirect*, 2013. pp. 327-333.

YAMBAY, R. *Elaboración y control de calidad de una pomada antiinflamatoria a base de Aristeguietia glutinosa.* [en línea] 2022. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/17390/1/56T01094.pdf>

YUAN, Y et al. *Genetic variation and metabolic pathway intricacy govern the active compound content and quality of the Chinese medicinal plant Lonicera japonica thunb. BMC Genomics* [en línea] 2012. Disponible en: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-13-195#citeas>.

YULAN, R y BINGREN, X. *Determination of total Ash and acid insoluble ash of chinese herbal medicine Prunellae Spica by near infrared spectroscopy.* [en línea] 2009. Disponible en: https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/129/7/129_7_881/_pdf/-char/ja

ZÁRATE, W et al. *Efecto de los ácidos fenólicos en el sistema antioxidante de plantas de tomate (Solanum lycopersicum Mill.)* en línea] 2021. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/437/43768194011/html/#:~:text=Los%20compuestos%20fen%C3%B3licos%20cumplen%20funciones,et%20al.%2C%202006>.



ANEXOS

ANEXO A: CERTIFICADO IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL

**HERBARIO POLITECNICA CHIMBORAZO (CHEP)**
ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL CHIMBORAZO
Panamericana sur Km 1, Ima: (03) 2 998 206 ext. 700123, jcaranqui@yshop.com
Riobamba Ecuador

Ofc.No.001.CHEP.2023

10 de enero del 2023

A QUIEN CORRESPONDA:

Reciba un atento y cordial saludo, por medio de la presente certifico que la señorita Ruales Lozano Maria Daniela con CI: 060465508-4 tesista de la carrera Bioquímica y Farmacia, se identificó *Lonicera japónica* Thunb. Esta especie es cultivada exótica, esta información se revisó en el herbario y registros existentes, se archivaré en el lapso de un año para los fines pertinentes. Es todo cuanto puedo decir en honor a la verdad y el interesado puedo usar el presente certificado como crea conveniente

Atte.


Ing. Jorge Caranqui Msc.
RESPONSABLE
HERBARIO ESPOCH



ANEXO B: ACONDICIONAMIENTO DE *LONICERA JAPONICA*



Recolección de *Lonicera japonica*



Selección de las mejores hojas



Secado de *Lonicera japonica* sobre papel periódico



Molienda de *Lonicera japonica*

ANEXO C: CONTROL DE CALIDAD DE LA DROGA VEGETAL SECA

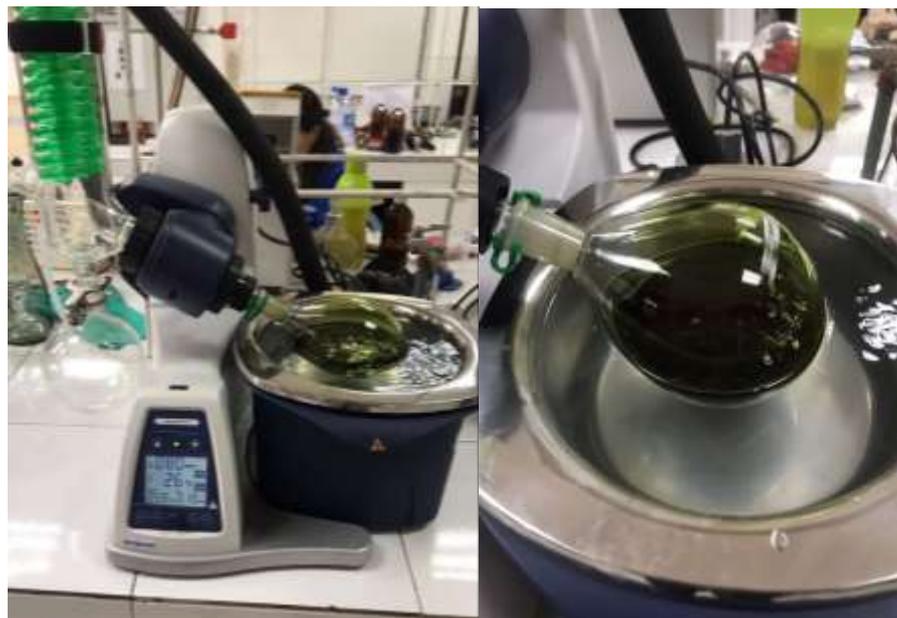


Determinación de la humedad, cenizas totales, cenizas solubles en agua y ácido clorhídrico

ANEXO D: OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y ACUOSO



Equipo de percolación



Destilación de los extractos en el rotavapor



Extracto acuoso y etanólico concentrado de *Lonicera japonica*

ANEXO E: CONTROL DE CALIDAD DEL EXTRACTO ETANÓLICO



Determinación del pH, densidad e índice de refracción del extracto etanólico.

ANEXO F: RESULTADOS TAMIZAJE FITOQUÍMICO

EXTRACTO ETANÓLICO

Determinación de flavonoides

Flavonoides

Ensayo de Shinoda

Ensayo de NaOH 10%



POSITIVO



POSITIVO

Determinación de Alcaloides

Alcaloides

Ensayo de Dragendorff

Ensayo de Mayer

Ensayo de Wagner



POSITIVO



POSITIVO



POSITIVO

Determinación de Triterpenos / Esteroles

Triterpenos / Esteroles

Ensayo de Liebermann-Burchard



POSITIVO

Determinación de Azúcares Reductores

Azúcares Reductores

Ensayo de Fehling



POSITIVO

Determinación de Quinonas/ Antraquinonas

Quinonas/ Antraquinonas

Ensayo de Hidróxido de amonio

Ensayo de Ácido sulfúrico



NEGATIVO



NEGATIVO

Determinación de Cumarinas

Cumarinas

Ensayo de Hidróxido de amonio



NEGATIVO

Determinación de Taninos/Compuestos fenólicos

Taninos/Compuestos fenólicos

Reacción con Gelatina



POSITIVO

Determinación de Saponinas

Saponinas

Ensayo de Espuma



POSITIVO

EXTRACTO ACUOSO

Determinación de Flavonoides

Flavonoides

Ensayo de Shinoda



NEGATIVO

Determinación de Alcaloides

Alcaloides

Ensayo de Dragendorff



POSITIVO

Ensayo de Mayer



POSITIVO

Ensayo de Wagner



POSITIVO

Determinación de Azúcares Reductores

Azúcares Reductores

Ensayo de Fehling



POSITIVO

Determinación de Taninos/ Compuestos fenólicos

Taninos / Compuestos fenólicos

Reacción de Gelatina

Ensayo de Cloruro férrico



NEGATIVO



NEGATIVO

Determinación de Saponinas

Saponinas

Ensayo de Espuma

Ensayo de Rosenthaler



NEGATIVO



NEGATIVO

ANEXO G: TÉCNICA DE SEPARACIÓN POR CROMATOGRAFÍA CAPA FINA



Realización de cromatografía y resultado de la placa al observar en luz UV a 366nm

ANEXO H: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA



Reactivación de las bacterias



Ensayo por el método de microdilución en caldo



Ensayo por el método de difusión en disco

ANEXO I: ELABORACIÓN DE LA FORMA FARMACÉUTICA SEMISÓLIDA



Preparación de la crema base

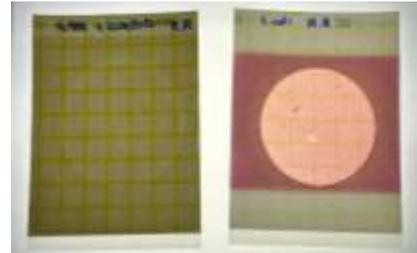
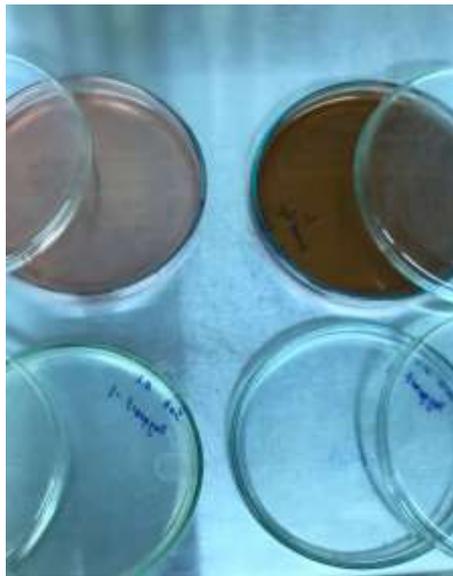


Formulación de las cremas antibacterianas a distintas concentraciones del extracto

ANEXO J: CONTROL DE CALIDAD DEL PRODUCTO FINAL.



Control de las características físico- químicas de la formulación semisólida (pH, viscosidad, signo de emulsión)



Control de calidad microbiológico de la formulación



esPOCH

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 27 / 07 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Marla Daniela Ruales Lozano
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Bioquímica y Farmacia
Título a optar: Bioquímica Farmacéutica
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Rafael Inty Salto Hidalgo



1437-DBRA-UPT-2023