



**UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA**

**INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**



**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO**

**PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE**

**INGENIERO AGROINDUSTRIAL**

**TEMA:**

Optimización de actividad antifúngica sobre *Candida albicans* y  
*Aspergillus niger* de mezclas de extractos acuosos de plantas  
amazónicas

**AUTOR:**

Enrique Alejandro Moya Vargas

**TUTORES:**

Dr. Yasiel Arteaga

Dr. Luis Bravo

Pastaza – Ecuador

2018



# DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, Enrique Alejandro Moya Vargas, con cédula de identidad 160047970-1, declaro que las actividades efectuadas para la realización y culminación del presente proyecto de investigación y desarrollo, que tiene como tema “**Optimización de actividad antifúngica sobre *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de mezclas de extractos acuosos de plantas amazónicas**”, se basaron en la búsqueda de información, ideas, análisis, conclusiones y recomendaciones, que me guiaron para estructurar mi trabajo y sea considerado para posibles investigaciones futuras, basándose en los resultados obtenidos; además que me responsabilizo en forma legal y académicamente como el autor del presente trabajo previo a la obtención del título como Ingeniero Agroindustrial.

Puyo, 11 de junio del 2018

---

Moya Vargas Enrique Alejandro  
CI. 1600479701

# **CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO**

Certifico que el presente proyecto investigación y desarrollo sobre el tema **“OPTIMIZACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA SOBRE *Candida albicans* Y *Aspergillus niger* DE MEZCLAS DE EXTRACTOS ACUOSOS DE PLANTAS AMAZÓNICAS”**, previo a la obtención del título de ingeniero (a) Agroindustrial ha sido desarrollado por el Sr. Moya Vargas Enrique Alejandro bajo nuestra tutoría y dirección, cumplimiento con todos los requisitos y disponibilidades legales establecidos por la Universidad Estatal Amazónica “UEA”, por lo que autorizo su presentación.

---

Dr. Yasiel Arteaga  
DIRECTOR DEL PROYECTO

---

Dr. Luis Bravo  
DIRECTOR DEL PROYECTO

# CERTIFICADO DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO



**UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA**



Oficio No. 006-UTIC-UEA-2018  
Puyo, 11 de Junio de 2018

Señores  
**Secretaría Académica U.E.A.**  
Presente.-

Por medio de presente CERTIFICO que:

El proyecto de titulación, investigación y desarrollo correspondiente a **MOYA VARGAS ENRIQUE ALEJANDRO**, con C.I. 1600479701 con el Tema: **"OPTIMIZACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFUNGICA SOBRE candida albicans y Aspergillus niger DE MEZCLAS DE EXTRACTOS ACUOSOS DE PLANTAS AMAZÓNICAS"**, de la Carrera de Ing. Agroindustrial, Director de proyecto. Dr. Yassiel Artega Crespo. PhD., ha sido revisado mediante el sistema antiplagio URKUND, reportando una similitud del 0 %. Informe generado con fecha 11 de junio de 2018 por parte de la Directora, conforme archivo adjunto.

Particular que comunico a usted para los fines pertinentes.

Atentamente,



Ing. Elías Jachero Robalino MSc.  
**UNIDAD DE TECNOLOGÍAS DE LA INFORMACIÓN DE LA UEA**  
**ADMINISTRADOR DEL SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND – UEA - .**

*NOTA: Adjunto Informe generado el 11 de junio de 2018 por parte del Director del proyecto.*

www.uea.edu.ec

Campus UEA, Paso Lateral km. 2 1/2 Vía Napo  
Tel: 03-2889118 - Telefax: 03-2888118

Puyo, Pastaza - Ecuador

CIPCA, km 44 vía Puyo - Tena  
Tel: 03-030653

## Urkund Analysis Result

Analysed Document: OPTIMIZACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA SOBRE Candida albicans Y Aspergillus niger D E MEZCLAS DE EXTRACTOS ACUOSOS DE PLANTAS AMAZÓNICAS.docx (D40087935)  
Submitted: 6/11/2018 5:43:00 PM  
Submitted By: yarteaga@uea.edu.ec  
Significance: 0 %

Sources included in the report:

Instances where selected sources appear:

0

## AVAL

Quien suscribe Yasiel Arteaga Crespo, Docente de la Universidad Estatal Amazónica avala el Proyecto de investigación:

Título: “Optimización de actividad antifúngica sobre *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de mezclas de extractos acuosos de plantas amazónicas”

Autor: Enrique Alejandro Moya Vargas

Certifico haber acompañado el proceso de elaboración del Proyecto de Investigación y considero cumple los lineamientos y orientaciones establecidas en la normativa vigente de la institución.

Por lo antes expuesto se avala el Proyecto de investigación para que sea presentado ante la Coordinación de la Carrera Ingeniería Agroindustrial como forma de titulación como Ingeniero Agroindustrial, y que dicha instancia considere el mismo a fin de que tramite lo que corresponda.

Para que así conste, firmo la presente a los 11 días del mes de junio del 2018.

Atentamente

Yasiel Arteaga Crespo

175701625-6

# INFORME DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título: “Optimización de actividad antifúngica sobre *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de mezclas de extractos acuosos de plantas amazónicas”.

Autor: Enrique Alejandro Moya Vargas.

Unidad de Titulación: Ingeniería Agroindustrial

Director del proyecto: Yasiel Arteaga Crespo

Fecha: 11 de junio de 2018

## Introducción y contexto de la investigación:

Los extractos de algunas plantas amazónicas del Ecuador son utilizados por sus propiedades biológicas como inhibidores antifúngicos. Las plantas son una fuente invaluable de nuevas moléculas biológicamente activas; ellas producen diversos metabolitos secundarios, muchos de los cuales presentan actividad antifúngica.

En la actualidad, numerosos investigadores han encaminado sus trabajos hacia la búsqueda y aplicación de nuevos compuestos biológicamente activos naturales permitan sustituir los plaguicidas químicos o productos medicinales sintéticos para humanos.

El trabajo tuvo como propósito determinar la proporción óptima para mezclas de extractos acuosos de *Cedrela odorata* L. (cedro), *Psidium guajava* L. (guayaba), *Ocotea quixos* (Lam) Kosterm. (Canela), que pueda ser empleada como fungicida “in vitro” para el control de *Candida albicans* y *Aspergillus niger*.

## Cumplimiento de objetivos

Los objetivos planteados se cumplieron al 100%

## Principales resultados obtenidos

Se evaluó el rendimiento de la extracción acuosa asistida por ultrasonido a partir de *C. odorata* L., *P. guajava* L., y *O. quixos* (Lam) Kosterm sobre la base de los polifenoles totales. Se logró optimizar la actividad antifúngica de las mezclas de extractos acuosos de las tres plantas amazónicas sobre *C. albicans* y *A. niger*.

El estudiante Enrique Alejandro Moya Vargas ha mostrado durante el desarrollo de la investigación una elevada dedicación y un alto grado de independencia, sirviendo como guía de los principales elementos a desarrollar en la investigación.

Se destacó la actividad curricular por su rendimiento académico, mostrado durante la investigación interés, motivación en el mismo, lo cual condujo a culminar de forma exitosa el trabajo, cumpliendo con las 400 horas establecidas en el Reglamento de Régimen Académico de la UEA.

La presentación final del trabajo cumple con las normas establecidas en la reglamentación institucional.

La redacción, ortografía, calidad de los gráficos, tablas y anexos es adecuada.

Sin otro particular.

Atentamente,

Yasiel Arteaga Crespo

175701625-6



# **CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR EL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN**

El Tribunal de sustentación del Proyecto de Investigación y Desarrollo aprueba el proyecto de investigación y desarrollo “**Optimización de actividad antifúngica sobre *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de mezclas de extractos acuosos de plantas amazónicas**”.

---

Dra. C. Karina Carrera PhD

---

MSc. Paúl Manobanda

---

MSc. Ángel Enríquez

## **AGRADECIMIENTO**

Primeramente, agradezco a Dios y a la Universidad Estatal Amazónica por haberme aceptado ser parte de ella y abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar mi carrera, así como también a los diferentes docentes que brindaron sus conocimientos y su apoyo para seguir adelante día a día.

Agradezco también a mis Asesores del proyecto de investigación Dr. Luis Bravo y Dr. Yasiel Arteaga por haberme brindado la oportunidad de recurrir a sus capacidades y conocimientos científicos, así como también haberme tenido toda la paciencia del mundo para guiarme durante todo el desarrollo del trabajo.

Y para finalizar agradezco a todos los que fueron mis compañeros de clase durante todos los niveles de Universidad ya que gracias al compañerismo amistad y apoyo moral han aportado en un alto porcentaje a mis ganas de seguir adelante en mi carrera profesional.

Enrique Alejandro Moya Vargas

## **DEDICATORIA**

El presente trabajo dedico a madre Gladys Vargas por traerme al mundo y a mis hermanos, Oldemar Zurita y Marisol Moya por confiar en mí.

Especial a mi querida esposa Karina Torres e hija Danna Moya, quienes sacrifican día a día su tiempo, paciencia, brindando cariño y amor.

Por ser los mejores ángeles que Dios me ha regalado, la mejor fuente de inspiración y motivación para mi superación profesional.

# RESUMEN EJECUTIVO Y PALABRAS CLAVES

## RESUMEN

Se evaluó la eficacia de la extracción asistida por ultrasonidos para la obtención de los extractos acuosos, ricos en polifenoles, de *Cedrela odorata* L., *Psidium guajava* L. y *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. El contenido de polifenoles totales extraídos se determinó a través de la técnica espectrofotométrica de Folin Ciocalteu y se encontró entre 2 y 4 g/100g de sólidos, concordantes con estudios recientes. Se empleó el diseño estadístico de mezclas “Simple Lattice” para la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos acuosos obtenidos sobre los hongos *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. Las mezclas ensayadas no resultaron eficaces para el control de *Aspergillus niger*, sin embargo, fueron adecuadas para el control de *Candida albicans* y se observó potenciación de la acción en determinadas proporciones. El orden de actividad antifúngica de los extractos individuales resultó ser: *P. guajava* L. > *O. quixos* = *C. Odorata*. El comportamiento del radio de inhibición, respecto a la actividad individual y combinada de los extractos acuosos de *C. odorata* L., *P. guajava* L. y *O. quixos* (Lam.) Kosterm se ajustó a un modelo cuadrático que permitió describir de manera adecuada la relación entre las variables.

## PALABRAS CLAVE

*Cedrela odorata* L., *Psidium guajava* L., *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm, polifenoles, diseño de mezclas

## ABSTRACT AND KEYWORDS

### ABSTRACT

The effectiveness of ultrasound-assisted extraction for obtaining aqueous extracts, rich in polyphenols from *Cedrela odorata* L., *Psidium guajava* L. and *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm was evaluated. The content of extracted total polyphenols through the spectrophotometric technique of Folin Ciocalteu was determined and concentrations between 2 and 4 g / 100g based on total solids were found, this agreed with recent studies. The statistical design of mixtures "Simple Lattice" for the evaluation of the antifungal activity of the aqueous extracts obtained on the fungi *Candida albicans* and *Aspergillus niger* was used. The mixtures tested were not effective for the control of *Aspergillus niger*, however, they were suitable for the control of *Candida albicans* and a potentiation of the action was observed in certain proportions. The antifungal activity order of the individual extracts was: *P. guajava* L. > *O. quixos* = *C. Odorata*. The behavior of the radius of inhibition, with respect to the individual and combined activity of the aqueous extracts of *C. odorata* L., *P. guajava* L. and *O. quixos* (Lam.) Kosterm, was adjusted to a quadratic model that allowed to describe in an adequate way, the relationship between the variables.

### KEYWORDS

*Cedrela odorata* L., *Psidium guajava* L., *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm, polyphenols, mixture design.

## TABLA DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y SU JUSTIFICACIÓN .....	1
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA .....	2
1.3. OBJETIVOS .....	2
1.3.1. OBJETIVO GENERAL .....	2
1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	2
CAPÍTULO II.....	3
2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN .....	3
2.1. Plantas amazónicas con metabolitos antifúngicos. Alelopatía. ....	3
2.2. <i>P. guajava</i> . Taxonomía, distribución geográfica. Usos medicinales.....	4
2.3. <i>O. quixos</i> . Taxonomía, distribución geográfica. Usos medicinales.....	6
2.4. <i>C. odorata</i> . Taxonomía, distribución geográfica. Usos medicinales.....	8
2.5. Taninos y Flavonoides de plantas.....	9
2.6. Métodos de extracción de metabolitos secundarios.....	11
2.7. Métodos de análisis.....	11
2.8. Actividad antifúngica de extractos ricos en taninos y flavonoides.....	12
2.9. Métodos de evaluación de la actividad antifúngica.....	12
2.10. Diseño estadístico de mezclas.....	13
CAPÍTULO III .....	14
3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	14
3.1. LOCALIZACIÓN.....	14
3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN .....	14
3.3. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN.....	14
3.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....	14
3.4.1. RECURSOS MATERIALES .....	14

3.4.2. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	15
3.4.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS MEDIANTE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS, A PARTIR DE SÓLIDOS PULVERULENTOS DE <i>C. odorata</i> , <i>P. guajava</i> y <i>O. quixos</i> .....	15
3.4.4. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES MEDIANTE EL MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEAU .....	16
3.4.5. DISEÑO ESTADÍSTICO DE MEZCLAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS SOBRE LA BASE DE SU ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	16
3.4.6. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	18
a. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.....	18
CAPÍTULO IV .....	19
4. RESULTADOS ESPERADOS .....	19
4.1. CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES .....	19
4.2. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS SOBRE LA BASE DE SU ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	19
CAPÍTULO V .....	25
5.1. CONCLUSIONES .....	25
5.2. RECOMENDACIONES.....	26
CAPÍTULO VI.....	27
BIBLIOGRAFÍA .....	27

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>P. guajava</i> .....	5
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>O. quixos</i> .....	6
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>C. odorata</i> .....	8
Tabla 4. Diseño experimental de mezclas para la optimización de la actividad antifúngica .....	17
Tabla 5. Polifenoles totales en los extractos acuosos de <i>C. odorata</i> , <i>P. guajava</i> y <i>O. quixos</i> .....	19
Tabla 6. Diseño experimental de mezclas para la optimización de la actividad antifúngica en extractos acuosos de <i>C. odorata</i> , <i>P. guajava</i> y <i>O. quixos</i> .....	21
Tabla 7. Modelos matemáticos propuestos .....	21
Tabla 8. Resultados ANOVA para el modelo cuadrático sugerido .....	23
Tabla 9. Mezclas resultantes con mayor inhibición en <i>C. albicans</i> .....	24



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del cinamaldehído .....	7
Figura 2. Estructura química del cinamato de etilo .....	7
Figura 3. Estructura química de un tanino.....	9
Figura 4. Estructura de flavonoide con numeración y especificación de cada heterociclo .	10
Figura 5. Categorías de los diseños de experimentos para su estudio .....	13
Figura 6. Actividad antifúngica sobre <i>C. albicans</i> (a) y <i>A. niger</i> (b) .....	20
Figura 7. Relación entre los datos de radio de inhibición experimentales y calculados por el modelo (a) y relación entre número de experimento y residual (b).....	22
Figura 8. Efecto de las mezclas en la actividad inhibitoria de <i>C. albicans</i> .....	23

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN Y SU JUSTIFICACIÓN

Los extractos de algunas plantas amazónicas del Ecuador son utilizados por sus propiedades biológicas como inhibidores antifúngicos. Las plantas son una fuente invaluable de nuevas moléculas biológicamente activas; ellas producen diversos metabolitos secundarios, muchos de los cuales presentan actividad antifúngica (Divicio, *et al.*, 2017). La actividad antifúngica de extractos de plantas usadas sobre diversos hongos ha sido ampliamente estudiada (Carpinella, 1999; Quiroga, *et al.*, 2001; Navarro, *et al.*, 2003; Somchit, *et al.*, 2003; Dabur, *et al.*, 2004; Zhu, *et al.*, 2005;) Algunos de los productos antifúngicos utilizados actualmente (Girois, *et al.*, 2005; Song, *et al.*, 2005), son poco efectivos e inducen frecuentemente a resistencia (Escalante, *et al.*, 2002; Zhang, *et al.*, 2005).

A esto se suma los elevados costos (Ibelise de Gonzáles, *et al.*, 1998). En la actualidad, numerosos investigadores han encaminado sus trabajos hacia la búsqueda y aplicación de nuevos compuestos biológicamente activos naturales permitan sustituir los plaguicidas químicos (Kandil, *et al.*, 1994; Ali, *et al.*, 1999; Bisignano, *et al.*, 2000; Jones, *et al.*, 2000; Ferner, *et al.*, 2005) o productos medicinales sintéticos para humanos (Moura, *et al.*, 2012; Urióstegui, 2015). Los ensayos de mezclas son una clase especial de experimentos de superficie de respuesta en los que el producto objeto de investigación se compone de varios componentes o ingredientes. Los diseños para estos experimentos resultan útiles porque muchas actividades de diseño y desarrollo de productos en situaciones industriales implican fórmulas o mezclas.

En estas situaciones, la respuesta depende de las proporciones de los diferentes ingredientes incluidos en la mezcla. En el experimento de mezclas más simple, la respuesta (la calidad, actividad o rendimiento del producto) depende de las proporciones relativas de los ingredientes. Las cantidades se pueden establecer como: medidas en peso, volumen o alguna otra unidad (Pullido, *et al.*, 2012). Se pretende buscar una alternativa antifúngica ecológica con la combinación de tres extractos acuosos naturales a partir de *Cedrela*

*odorata* L, *Psidium guajava* L. y *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm sobre *Candida albicans* (C.P.Robin), y *Aspergillus niger* (P.E.L. van Tieghem), para sustituir productos medicinales sintéticos o productos agroquímicos en la fase de poscosecha, respectivamente.

Se ha descrito que los extractos acuosos de estas especies presentan mezclas de taninos y flavonoides que pueden contribuir a sus propiedades antifúngicos (Divicio, *et al.*, 2017). En años recientes se han empleado diseños estadísticos de mezclas para optimizar propiedades bioactivas de combinaciones de diferentes extractos vegetales (Pullido, *et al.*, 2012). Este estudio tiene como objetivo, determinar una evaluación *in vitro* la proporción óptima para mezclas de extractos acuosos de *C. odorata*, *P. guajava* y *O. quixos* que pueda ser empleada como fungicida ecológico en la poscosecha para el control de *A. niger* o como producto medicinal humano para afecciones por *C. albicans*.

## **1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA**

¿Cuál sería la proporción óptima de los extractos acuosos de *C. odorata*, *P. guajava*, y *O. quixos*, que garantizaría la mayor actividad antifúngica sobre *C. albicans* y *A. niger* de la mezcla resultante?

## **1.3. OBJETIVOS**

### **1.3.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la proporción óptima para mezclas de extractos acuosos de *Cedrela odorata*, *Psidium guajava* y *Ocotea quixos* que pueda ser empleada como fungicida *in vitro* para el control de *Candida albicans* y *Aspergillus niger*.

### **1.3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Evaluar el rendimiento de la extracción acuosa asistida por ultrasonidos a partir de *C. odorata*, *P. guajava*, y *O. quixos*, sobre la base de polifenoles totales.
- Optimizar la actividad antifúngica de las mezclas de extractos acuosos de *C. odorata*, *P. guajava*, y *O. quixos*, sobre *C. albicans* y *A. niger*.

## CAPÍTULO II

### 2. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

#### 2.1. Plantas amazónicas con metabolitos antifúngicos. Alelopatía.

Las plantas fueron utilizadas desde el origen de la humanidad como fitoterapéuticos, para prevenir o sanar lesiones y enfermedades. Desde el año 1649, con la llegada del cristianismo, los Jesuitas estudiaron las primeras plantas amazónicas y sus utilidades, y esas investigaciones fueron publicadas en el libro *Shedula Romana*, e informaban sobre *Cinchona officinalis* L. (quina), de la cual se han obtenido diversos alcaloides fenólicos, entre ellos la quinina, que ha sido utilizada durante más de trescientos años para curar la malaria, para hacer buen uso de las plantas medicinales se deben tener conocimientos básicos acerca de los tipos de especies de plantas, de su manejo y utilización, la dosificación, y la forma de preparación del medicamento herbario (Cáliz, *et al.*, 2000).

La actividad antifúngica de diversas plantas ha sido muy estudiada por la resistencia a los distintos fungicidas comerciales utilizados frecuentemente en el control de enfermedades de cultivos, y a medicamentos sintéticos, en el caso de enfermedades de humanos o animales. Esto ha motivado en años recientes, a la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas entre los productos naturales y se ha demostrado su efectividad sobre hongos patógenos tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” (Prego, *et al.*, 1999).

En otro reporte bibliográfico se presentan propiedades antifúngicas y molusquicidas por la gran concentración de saponinas de *Paullinia clavigera*. Schltdl, *Sapindaceae*. Juss, (Pérez, *et al.*, 2006).

La especie *Pelargonium peltatum* L'Hér., conocida popularmente en algunos lugares como María Panga, Santa María, o cordoncillo, tiene una amplia gama de actividades biológicas: antibióticas, antitumorales, insecticidas y antifúngicas (Soto, *et al.*, 2015); por este motivo se han realizado investigaciones fitoquímicas que han mostrado que estas especies están compuestas por metabolitos de tipo flavonoide, amida,

propinilfenoles, lignanos, neolignanos, kavapironas y terpenos (Parmar, *et al.*, 1997; Jara, *et al.*, 2013).

Los metabolitos secundarios del reino vegetal se producen como mecanismo de defensa de las plantas, mediante el fenómeno de la alelopatía, presente en una variedad de plantas amazónicas. El término alelopatía es utilizado para describir los efectos estimulantes o de inhibición de una planta sobre otras, a través de la liberación de compuestos bioquímicos (Rice, 1984; Choesin, *et al.*, 1991). Esta definición incluye también microorganismos como algas, hongos y bacterias. Los aleloquímicos poseen una amplia diversidad estructural que incluye compuestos fenólicos, cumarinas, alcaloides, taninos, terpenoides y esteroides, así como ácidos orgánicos y otros (Paolo, *et al.*, 2013).

En estos tiempos la alelopatía se presenta como una alternativa para la reducción del uso de pesticidas (herbicidas, fungicidas, insecticidas) que afectan la calidad del ambiente y de los suelos, debido principalmente a que muchos de ellos no son biodegradables (Sampietro, *et al.*, 2009).

Los compuestos antes mencionados son liberados al ambiente a través de la exudación de las raíces de la planta, lixiviación de partes aéreas, especialmente foliar, emisión de volátiles y descomposición de hojas (Anaya, *et al.*, 1990; Xuan, *et al.*, 2005).

Respecto al uso de aleloquímicos en los agro-sistemas se han realizado ensayos de campo con buenos resultados en países como Pakistán, China, Irán e India (Cheema, *et al.*, 2013). Estos estudios han permitido identificar especies como el sorgo (*Sorghum bicolor*), que se ha posicionado como un potente agente alelopático para el control de malezas en campos de trigo (Weston, *et al.*, 2003).

## **2.2. *P. guajava*. Taxonomía, distribución geográfica. Usos medicinales.**

*P. guajava*, es una planta tropical que pertenece a la familia de las mirtáceas la cual incluye a más de 3.000 especies de árboles y arbustos de los cinco continentes (FAO, 1982) ver Tabla 1.

Todas las guayabas las producen árboles del género *Psidium* y crecen en regiones tropicales de América, Asia y Oceanía (Cuba, 1985). En otros países también se la conoce como guayabo, guará, arrayana y luma (Araujo, *et al.*, 1997).

Son países productores y exportadores de guayabas: Brasil, Colombia, Perú, Ecuador, India, Sudáfrica, California, Estados Unidos, México, Filipinas, Venezuela, Costa Rica, Cuba y Puerto Rico (Leal, *et al.*, 1986; Marín, *et al.*, 1993; Araujo, *et al.*, 1997).

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de *P. guajava*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Myrtales
Familia	Myrtaceae
Subfamilia	Nepetoideae
Tribu	Myrteae
Especie	<i>Psidium guajava</i>

**Fuente:** Guía Técnica del cultivo de la guayaba (García, 2010)

*P. guajava*, es una planta originaria de Centroamérica, común en las áreas calientes de América tropical (García, 2010). La fruta también tiene usos medicinales; se utiliza como astringente, evita la caída del cabello, contra la ictericia, llagas e hinchazones, como desparasitante y contra el reumatismo.

La corteza y las hojas son ricas en taninos (10 % en las hojas, 11-30 % en la corteza). La corteza se utiliza en Centroamérica para el curtido de pieles. En Malasia se usan las hojas con otros materiales para hacer un tinte negro para la seda. En el sureste de Asia, las hojas se emplean para dar color negro al algodón, y en Indonesia, sirven para la coloración de esteras (Roig, *et al.*, 1988). En Cuba se echan manojos de hojas verdes sobre las brasas para producir un humo de olor característico durante el ahumado casero de jamones y embutidos.

La guayaba es rica en el flavonoide quercetina, un antioxidante que posee la capacidad de bloquear las enzimas de la construcción de sorbitol (Roig, *et al.*, 1988). Por su contenido de vitamina A se conoce como un refuerzo para la salud general de los ojos. Puede ayudar a disminuir la aparición de cataratas, degeneración macular e incluso una mejora en la vista una vez que ha comenzado a degradarse. Debido a su alto contenido de vitamina C, la guayaba es muy útil para aliviar la tos y los resfriados, la desinfección de las vías respiratorias, la garganta y los pulmones, y la inhibición de la actividad microbiana por sus propiedades astringentes (Roig, *et al.*, 1988). Ayuda a

reducir el colesterol en la sangre y evita su engrosamiento, manteniendo de ese modo la fluidez de la sangre y reduciendo la presión arterial. Además, contiene vitaminas B3 y B6. La vitamina B3 (también conocida como niacina) puede aumentar el flujo de la sangre y estimular la función cognitiva (Roig, *et al.*, 1965). La vitamina B6 es un gran nutriente para la función nerviosa y cerebral. Posee propiedades antibióticas contra las bacterias que causan el mal aliento, y es ideal en el deporte, la artritis, el estrés y el embarazo (Roig, *et al.*, 1988).

### **2.3. *O. quixos*. Taxonomía, distribución geográfica. Usos medicinales.**

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica de *O. quixos*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Laurales
Familia	Lauraceae
Género	<i>Ocotea</i>
Especie	<i>Ocotea quixos</i>

**Fuente:** La Granja (Noriega & Dacarro, 2008)

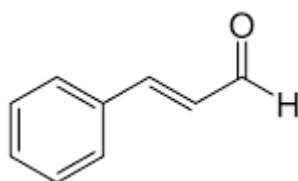
Es una especie endémica de la Amazonía ecuatoriana, peruana, y colombiana, se ha venido utilizando desde los tiempos incaicos por las comunidades ancestrales que habitan en la cuenta amazónica en alimentos, terapéuticos y medicinales (Naranjo, *et al.*, 1981). Es una plantas arbórea o arbustiva, con corteza aromática de olores placenteros (Ballabeni, *et al.*, 2010).

Las especies del género *Ocotea* se ha utilizado para la humanidad en la medicina tradicional, por lo tanto sus extractos se aplicado como aromáticos, diuréticos, etc. (Ortuño, 2006). En Ecuador es conocida con diferentes nombres comunes: canelón, ishpink o ishpingo (Gupta, 1995).

*O. quixos* puede evitar las infecciones intestinales provocadas por: *Escherichia coli* (Escherich), *Staphylococcus aureus* (Rosenbach), *Staphylococcus epidermidis* (Winslow), *Streptococcus mutans* (Clarke), *Streptococos piogenes* (Rosenbach) y *C. albicans* (Radice, *et al.*, 2017). En un trabajo sobre los hongos fitopatógenos A.

*oryzae*, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries., *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., *Rhizopus stolonifer* (Ehrenberg: Fries) Vuillemin, *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans, Stalpers, Samson and Benny, y *Phytophthora sp.* (Scalvenzi, *et al.*, 2016), con un promedio de tasa de inhibición incluido en un intervalo entre 89 y 95%, a la concentración de 500  $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

La planta es muy rica en aceites esenciales, uno de los compuestos más importantes descrito es cinamaldehído (Figura 1) que se encuentra en un 27,91% (Carrizosa, 2013).

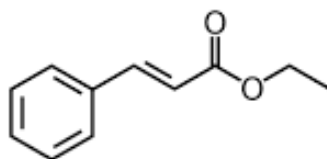


**Figura 1.** Estructura química del cinamaldehído

**Fuente:** (Carrizosa, 2013)

El cinamaldehído es un compuesto orgánico responsable del sabor y del olor característico de la canela (Carrizosa, 2013).

El segundo compuesto con mayor presencia en *O. quixos* (Lam.) Kosterm es el cinamato de etilo con un 21,65%, conjuntamente con otros 42 componentes con una alta actividad de antifúngica (Carrizosa, 2013).



**Figura 2.** Estructura química del cinamato de etilo

**Fuente:** (Carrizosa, 2013)

El cinamaldehído es un compuesto orgánico que también contribuye al sabor y al olor característico de la canela (Carrizosa, 2013).



## 2.4. *C. odorata*. Taxonomía, distribución geográfica. Usos medicinales.

**Tabla 3.** Clasificación taxonómica de *C. odorata*

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Sapindales
Familia	Meliaceae
Género	<i>Cedrela</i>
Especie	<i>Cedrela odorata</i>

**Fuente:** Ambiente, & FAO, 2014

*C. odorata*, recibe varios nombres comunes: cedro, cedro amargo, cedrela, cedro, cedro blanco, citro, cedrillo, mashuwa, cedro macho, sitor, pamba cedro, cedro colorado, suegro y cedro muyu (Ambiente, & FAO, 2014).

El árbol alcanza hasta 30 – 40 m de altura; posee un tronco recto y cilíndrico, con raíces grandes; corteza externa gruesa gris-marrón, con fisuras longitudinales irregulares. La copa es redondeada y densa; hojas pinnadas, agrupadas hacia el extremo de las ramas, de 15 – 50 cm de longitud, con 5 – 11 pares de folíolos opuestos o alternos, a menudo falcados, color verde oscuro en el haz y más claros o verde amarillentos en el envés, glabros en ambas caras, con olor a ajo cuando se estrujan; flores masculinas y femeninas en la misma inflorescencia; fruto cápsula leñosa lenticelada, dehiscente, oblongo – elipsoide (Aguilar, 2010; Yucatán *et al.*, 2012; Vinueza, 2015).

La madera fina es usada para fabricar muebles tallados, instrumentos musicales, enchapados, contrachapados, canoas, construcción de viviendas, para elaborar platos y tazones para chicha. La corteza es usada como aditivo alimenticio en bocadillos (MAE, *et al.*, 2014). La raíz se usa para elaborar utensilios de cocina e instrumentos musicales. Varias partes de la planta tienen uso medicinal y el fruto sirve de alimento para algunos animales silvestres (De la Torre, *et al.*, 2008). Se puede usar la madera como aromatizante, en artesanal, como combustible (leña) en construcción.

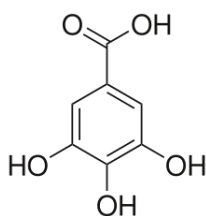
Para usos medicinales se pueden aprovechar: hoja, raíz, corteza, semilla, tallo o exudados. La infusión de hojas se usa para el dolor de muelas, oídos y disentería. Extractos del tallo se usan como antipiréticos y abortivos. El látex para la bronquitis; de la corteza se pueden obtener extractos febrífugos y de uso en caídas o golpes. La raíz es beneficiosa para la epilepsia y como vermífuga. En algunas regiones se emplea para tratar las manchas blanquecinas presentes en la piel, ocasionadas por hongos, en este caso se colocan las hojas machacadas durante varios días (Cedrela odorata, 1759).

## 2.5. Taninos y Flavonoides de plantas.

Diversas plantas se han utilizado empíricamente y científicamente por el hombre, en el campo de la medicina, por diferentes culturas del mundo, por ende, la fitoterapia es la más antigua de los tratamientos terapéuticos en el ámbito mundial. Las plantas son usadas tradicionalmente para tratar infecciones bacterianas, micóticas y parasitarias (Pérez., *et al.*, 2017).

Como ya se ha dicho, los metabolitos secundarios de las plantas en general, como los alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos, son compuestos químicos que intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente (Cabrera, *et al.*, 2017). Se sintetizan cuando las plantas están en condiciones adversas, entre ellas, el ataque por herbívoros, microorganismos y la presencia de diferentes especies que compiten por luz, agua y nutrientes (Sepúlveda, *et al.*, 2003; Granados, *et al.*, 2008).

Los taninos (Figura 3) son compuestos polifenólicos, más o menos complejos, de origen vegetal, masa molar relativamente elevada, sabor astringente, conocidos y empleados desde hace muchos siglos por su propiedad de ser capaces de convertir la piel en cuero, es decir de curtir las pieles (Dey, 1989; Hartisch, 1997; Hughes, 1998).



**Figura 3.** Estructura química de un tanino

**Fuente:** Compuestos Fenólicos: Taninos (Carretero Accame, 2000)

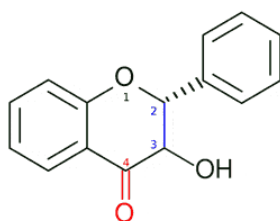
La propiedad antes mencionada se debe a su capacidad para unirse a macromoléculas como hidratos de carbono y proteínas. Precipitan con sales de metales pesados,

proteínas y alcaloides (Martínez, *et al.*, 2000). En las verduras, los taninos suelen encontrarse en las vacuolas celulares, combinados con alcaloides, proteínas (Dey, 1989; Hartisch, 1997; Hughes, 1998). El proceso más antiguo utilizado de este metabolito es en la industria de curtiembre.

A los taninos se les puede resaltar por sus actividades farmacológicas, por sus propiedades astringentes, tanto por vía interna como tópica. También son antioxidantes y se comportan como captadores de radicales libres. Se pueden aplicar como antídoto en diversos envenenamientos debido a su complejidad con los alcaloides tóxicos (Dey, 1989; Hartisch, 1997; Hughes, 1998).

Los taninos son compuestos polifenólicos muy astringentes y amargos. Se clasifican en taninos hidrosolubles y condensados. En medicina popular los taninos se aplican para curar la diarrea, las hemorroides, las heridas externas, las bacterias y los hongos y como antídotos de otros venenos (Barnola, *et al.*, 2018).

Cuando se habla de flavonoides (Figura 4), se hace referencia a compuestos con un grupo aromático y pigmentos heterocíclicos que contienen oxígeno, ampliamente distribuidos entre las plantas, constituyendo la mayoría de los colores amarillo, rojo y azul de las plantas y frutas (Sax, 1993).



**Figura 4.** Estructura de flavonoide con numeración y especificación de cada heterociclo

**Fuente:** <https://mundoasistencial.com/flavonoides/>

Flavo proviene del latín flavus y significa de color entre amarillo y rojo, como el de la miel o el del oro (Española, 2001).

Se pueden encontrar en abundancia en las uvas, manzanas, cebollas, cerezas, repollos; además de ser parte del árbol *Ginkgo biloba* L., y la *Camellia sinensis* (L.) Kuntze. Al ingerirlos se pueden obtener los beneficios de sus propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antitrombóticas, antialérgicas, antitumorales, anticancerígenas y antioxidantes. Los flavonoides ayudan al sistema nervioso en la protección contra enfermedades neurodegenerativas (Jiménez, *et al.*, 2009).

## **2.6. Métodos de extracción de metabolitos secundarios.**

Existen métodos que se han empleado para la extracción de metabolitos secundarios, entre estos se encuentran: extracción con disolventes, destilación a vacío, extracción con fluidos supercríticos, extracción con Soxhlet, destilación molecular, destilación por arrastre con vapor, extracción asistida por ultrasonidos y extracción por maceración (Cerón, *et al.*, 2009; Pabón, *et al.*, 2013; Mariscal, *et al.*, 2015; Villacís, *et al.*, 2017;). Es fundamental la selección adecuada de la técnica de extracción, que se debe aplicar en el estudio de un componente específico en cualquier matriz (Nieto, *et al.*, 2013). Algunos autores resaltan que las extracciones desde medios acuosos son más eficientes a pH bajos (Lee, *et al.*, 2007; Nieto, *et al.*, 2013). La extracción asistida por ultrasonido ha sido una herramienta eficiente, simple y segura para realizar la extracción de metabolitos secundarios (Ojito, *et al.*, 2012; Nieto, *et al.*, 2013). Entre las ventajas de este método están: limpieza, seguridad, no inflamabilidad, no corrosividad, no toxicidad, empleo de disolventes eco amigable, no contaminante y libre de residuos perjudiciales (Martín, *et al.*, 2011; Nieto, *et al.*, 2013).

## **2.7. Métodos de análisis.**

Para determinar los metabolitos como taninos y flavonoides se emplean, en el campo de estudio, diferentes métodos como: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia y espectrofotometría UV/Vis (Kostennikova, 1983; Gutiérrez, *et al.*, 2000; De la Rosa, *et al.*, 2012;). Para determinar flavonoides en las hojas de *P. guajava* se han estudiado diferentes técnicas de análisis como: cromatografía en capa fina (CCF), de gases (CG) y de líquidos de alta eficacia (HPLC), así como la espectrofotometría ultravioleta visible (UV-Vis), la cual ha sido una de las que más ampliamente se ha utilizado por su sencillez y su bajo costo (Kostennikova, 1997; Gutiérrez, 2003; Fernández, *et al.*, 2016).

La medida más común del contenido de fenoles totales se realiza utilizando el método de Folin–Ciocalteu, que determina la capacidad que tienen los polifenoles para reducir el Mo(VI) a Mo (V), como resultado de tal reacción, el reactivo de color amarillo adquiere un intenso color azul que se mide con el espectrofotómetro (Singleton & Rossi, 1999).

## **2.8. Actividad antifúngica de extractos ricos en taninos y flavonoides**

Se investigó la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos metanólicos, etanólicos e hidroalcohólicos de cuatro plantas del nororiente peruano: *Cassia reticulata* (Willd.) H.S.Irwin and Barneby, (planta entera), *Ilex guayusa* Loes (hojas), *Piper lineatum* Ruiz & Pav (hojas), y *Terminalia catappa* L. (hojas) y excepto *T. catappa* (Amazonas). La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en agar. Los microorganismos utilizados fueron las bacterias y los hongos *C. albicans*, *A. niger* y *Microsporum canis* (E. Bodin) Langeron.

De doce extractos investigados; ocho (67%) presentaron actividad antimicrobiana significativa frente a *S. aureus* y *S. epidermidis* y uno (8%) frente a *E. coli*. De doce extractos investigados, diez (83%) presentaron actividad significativa frente a *C. albicans*, y seis (50%) contra *M. canis*.

Los extractos con la mejor actividad antimicrobiana fueron los tres extractos del *Piper lineatum* (R. & P.) Kunth; el extracto hidroalcohólico de *C. reticulata* y el hidroalcohólico de *T. catappa* (Ruiz, *et al.*, 2009).

Con el extracto de *O. Basilicum* se pone de manifiesto que de las especies microbianas estudiadas las más sensibles resultaron ser la levadura *C. albicans*, el dermatofito *T. mentagrophytes* (Hernández, *et al.*, 2001).

## **2.9. Métodos de evaluación de la actividad antifúngica.**

En la actualidad se han utilizado diversos métodos para evaluar la actividad antifúngica y antimicrobiana de sustancias sintéticas (Rojas, *et al.*, 2005). Estos métodos se aplican mucho en el ámbito hospitalario como el caso del método de difusión de discos (PA, 1997; Phillips, 1998) el método de pozos en agar (Frobisher, 1974) y método de dilución en tubos (turbidimétrico) (Wilcke, 1999) para encontrar no solo la potencia sino la resistencia de algunos microorganismos a ciertos antibióticos (Vizcano, *et al.*, 2007).

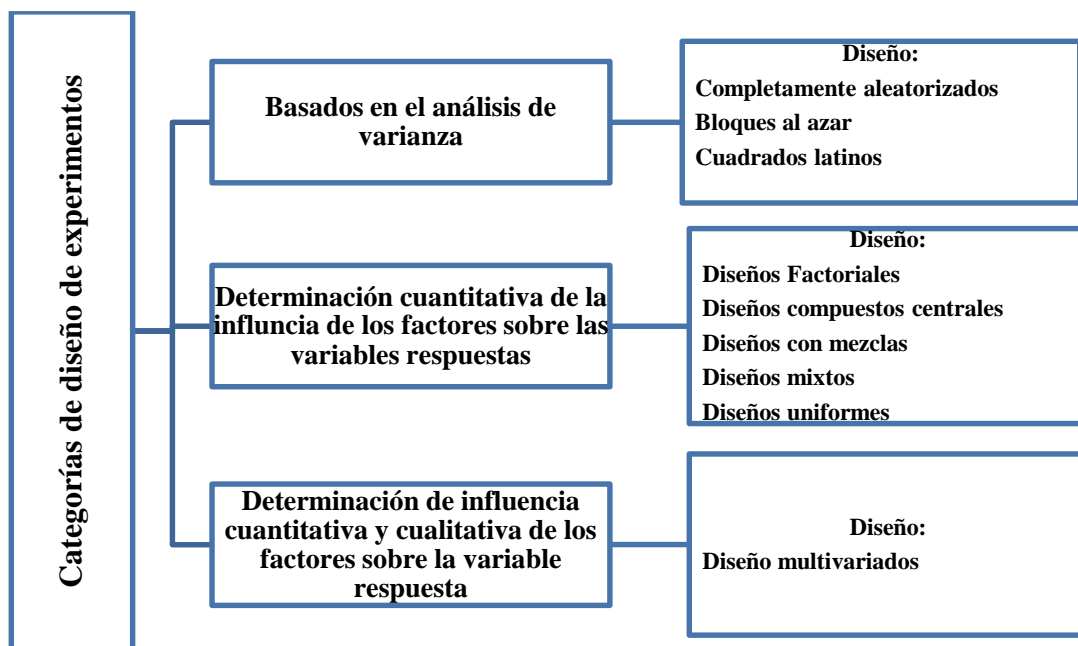
Se han realizado estudios preliminares de evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto fluido (preparado en etanol al 40 %) de las hojas del *P. guajava* y se ha empleado el método de difusión en gel-perforación en placa (De García, *et al.*, 1995).

## 2.10. Diseño estadístico de mezclas.

Dependiendo el tipo de estudio, los diseños de experimentos se han clasificado en tres categorías, atendiendo al tipo de problema que se pretende resolver con los mismos (Fernández, *et al.*, 2008).

Los diseños experimentales de mezclas (DEM) poseen características especiales; los factores que influyen sobre la variable respuesta son fáciles de modelar. El DEM permite aplicar el criterio de que la suma de las proporciones de los componentes es el 100% y que por ende la modificación de un porcentaje afecta a los otros (Saltos, *et al.*, 2010; Napolitano, 2012).

En la industria alimentaria, del mismo modo que en la industria farmacéutica, han venido aplicándose con éxito los diseños experimentales de mezclas para evaluar de manera consistente y económica la influencia de cada uno de los componentes de la mezcla en el producto final (Thompson, *et al.*, 1968).



**Figura 5.** Categorías de los diseños de experimentos para su estudio  
**Fuente:** Manual de diseño de mezcla (Fernández, *et al.*, 2008)

Para los productos alimenticios, tales como salsas, néctares o yogures, es muy importante encontrar la mejor mezcla de los ingredientes utilizados en su elaboración (Cornell, 2002). También se han aplicado en pruebas de valoración sensorial para optimizar las proporciones de frutas diversas en bebidas de frutas y en otros productos (Huor, 1981).

## **CAPÍTULO III**

### **3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **3.1. LOCALIZACIÓN**

La investigación se llevará a cabo en los laboratorios de Química y Biología de la Universidad Estatal Amazónica, ubicada en el kilómetro 2 ½ de la vía Puyo a Tena (Paso Lateral) de la ciudad de Puyo, Pastaza, Ecuador.

#### **3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN**

El presente proyecto será una investigación de tipo aplicada, la cual se fundamentará en la experimentación.

#### **3.3. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN**

Se emplearán métodos cuantitativos que permitirán controlar las variables independientes, se realizarán cálculos numéricos y análisis estadísticos para establecer modelos de comportamiento.

#### **3.4. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

##### **3.4.1. RECURSOS MATERIALES**

###### **EQUIPOS**

- Balanza analítica ADAM. Alemania
- Balanza técnica THOMAS Scientific. TSXB4200C. Estados Unidos
- Baño ultrasónico. BRANSON. Estados Unidos.
- Autoclave. Shanan. China
- Plancha de calentamiento. Boeco. Alemania
- Estufa. Barnstead. Estados Unidos.
- Bomba de vacío. GE Motors & Industrial System. Estados Unidos.
- Evaporador rotatorio. Büchi. Alemania
- Molino de cuchillas. Malla 1 mm. Thomas-Weley. Estados Unidos.

## **INSTRUMENTOS**

- Espectrofotómetro UV-Vis Thermo Electron Corporation. Estados Unidos.

## **UTENSILIOS Y MATERIALES**

- Micropipeta Eppendorf Research Plus 100 – 1000 µL. Alemania
- Micropipeta Eppendorf Research Plus 10 – 100 µL. Alemania
- Viales de plástico. Eppendorf 1 mL
- Espátulas de laboratorio
- Cristalería común de laboratorio, incluido material volumétrico
- Cajas de Petri de vidrio 9 x 1 cm
- Medio de cultivo PDA, Difco™, Francia.
- Cepas de los hongos *A. niger* y *C. albicans*.
- Material foliar pulverizado de guayaba, cedro y canela amazónica

## **REACTIVOS Y DISOLVENTES**

- Reactivo de Folin Ciocalteu. MERCK. Alemania
- Agua destilada
- Etanol, MERCK. Alemania

### **3.4.2. SELECCIÓN Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL**

Las especies vegetales: *C. odorata*, *P. guajava* y *O. quixos*, fueron recolectadas en la Comunidad Puerto Santa Ana. Parroquia Madre Tierra. Cantón Mera. Provincia Pastaza.

Se separó el material foliar, se lavó con agua corriente y agua destilada para eliminar restos de materias extrañas y garantizar una adecuada limpieza. Se sometió a secado en estufa a 60°C por 24 horas. Se redujo el tamaño de partícula con una abertura de malla de 1mm, para incrementar la superficie específica de contacto.

### **3.4.3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS MEDIANTE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS, A PARTIR DE SÓLIDOS PULVERULENTOS DE *C. odorata*, *P. guajava* y *O. quixos*.**

Se pesaron 4 g de los sólidos pulverulentos, se colocaron en matraces de fondo redondo, se añadieron 400 mL de agua destilada y se extrajo en baño ultrasónico a 60 °C y máxima potencia, durante 30 minutos. Se empleó la extracción asistida por ultrasonidos para lograr una mayor eficacia en la extracción de los metabolitos activos de interés.



Posteriormente se filtró a vacío y para una porción del filtrado de 200 mL se redujo el volumen en evaporador rotatorio a la mitad. La filtración a vacío permitió recuperar la totalidad de los extractos.

#### **3.4.4. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES MEDIANTE EL MÉTODO DE FOLIN CIOCALTEAU**

Se determinó cuantitativamente el contenido de polifenoles en cada uno de los extractos y los resultados se expresaron en g/L de extracto, a través de la expresión basada en el modelo matemático de la curva de calibración de ácido gálico (Bravo & *et al*, 2017), siguiendo la siguiente fórmula (1).

$$C = \frac{(A+0,0028)*0,25}{0,0734} \quad (1)$$

Dónde:

C = concentración en g/L

A = absorbancia de las disoluciones de muestras

0,25 = factor de dilución

El resultado final fue expresado en gramos por cada 100 gramos de sólido pulverulento.

#### **3.4.5. DISEÑO ESTADÍSTICO DE MEZCLAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS SOBRE LA BASE DE SU ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.**

Se utilizó un diseño: “Simplex-Lattice” (S-LD) (Goupy & Creighton, 2006; Cornell, 2011) con vistas a generar los puntos experimentales para la actividad antifúngica. En esta clase de diseño, los puntos experimentales están simétricamente distribuidos y se obtiene una ecuación polinomial para representar la superficie de respuesta.

El efecto del S-LD sobre la actividad antifúngica se analizó mediante una regresión múltiple de cuadrados mínimos. Se emplearon ecuaciones de regresión múltiple típicas, tales como:

Modelo cuadrático:

$$y = b_1 * x_1 + b_2 * x_2 + b_3 * x_3 + b_{12} * x_1 * x_2 + b_{13} * x_1 * x_3 + b_{23} * x_2 * x_3 \quad (2)$$

Dónde:

y = variable respuesta (radio de inhibición)

$x_i$  = componentes de la mezcla  $b_i, b_{ij}, b_{ijk}, d_{ij}$ ; coeficientes de la función de regresión (Yolmeh, *et al.*, 2017)

Los modelos utilizan una función polinomial de 3<sup>er</sup> grado para describir la superficie de respuesta. La suma de cuadrados, la media cuadrática, los grados de libertad, la prueba F, los valores de probabilidad, el coeficiente  $R^2$  y  $R^2$  ajustado, fueron se tuvieron en cuenta para seleccionar el modelo estadístico apropiado (Goupy & Creighton, 2006; Cornell, 2011). Los puntos experimentales se presentan en la Tabla 4.

La variable respuesta fue el radio de inhibición del crecimiento de los hongos *C. albicans* y *A. niger* determinada por simple medición mediante una regla (Pulido, *et al.*, 2000).

**Tabla 4.** Diseño experimental de mezclas para la optimización de la actividad antifúngica

Mezcla	<i>O. quixos</i> Lam. (A)	<i>P. guajava</i> L. (B)	<i>C. odorata</i> L. (C)
1	0	1	0
2	0	0	1
3	0	1	0
4	0,1667	0,6667	0,1667
5	1	0	0
6	0,5	0,5	0
7	0,6667	0,1667	0,1667
8	0,5	0	0,5
9	0,1667	0,1667	0,6667
10	0	0	1
11	0	0,5	0,5
12	0,3333	0,3333	0,3333
13	1	0	0

**Fuente:** Simplex-Lattice (Goupy & Creighton, 2006; Cornell, 2011)

### **3.4.6. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.**

Se utilizó una metodología ampliamente informada (Engelmeier & Hadacek, 2006; Sierra-García, *et al.*, 2012) para la evaluación de la actividad antimicótica. El inóculo fúngico se preparó en suspensión de esporas de *C. albicans* y *A. niger* en concentraciones entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^7$  conidios.mL<sup>-1</sup> (conteo directo en cámara de Neubauer). Se sembraron cantidades de 0,1 mL de la suspensión de esporas en cada caja de Petri (9 x 1 cm) con el medio PDA ya solidificado, teniendo cuidado de cubrir toda el área superficial mediante un hisopo.

El medio PDA se preparó a partir de 39 g para 1 000 mL de agua destilada, se sometió a calentamiento y agitación magnética, controlando la temperatura a 40 °C por 15 minutos.

Los tubos de ensayo, las cajas de Petri, el medio PDA, los hisopos y los discos enumerados de acuerdo a las mezclas de cada extracto a ensayar, se sometieron a esterilización en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

#### **a. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR**

Se colocaron los discos estériles de papel filtro de 7 mm de diámetro, previamente embebidos en cada una de las 13 mezclas de los extractos de *P. guajava*, *C. odorata* y *O. quixos*, manualmente, con la ayuda de pinzas estériles, por triplicado, cuidando que contacten perfectamente con la superficie del medio de cultivo y que la distancia respecto al borde de la caja sea superior a 15 mm (Santiago, *et al.*, 2003) Esta colocación se hizo en forma triangular y tratando de que los discos quedaran equidistantes.

Las cajas de Petri inoculadas se incubaron invertidas a 30 °C por tres días y se midieron los halos de inhibición (diámetros en mm) alrededor de los discos con la ayuda de una regla sobre el reverso de la caja.

Durante todo el procedimiento se observaron todas las medidas de bioseguridad y cuidado de la esterilidad, como, por ejemplo: desinfección de la superficie del área a trabajar y el mantenimiento de dos mecheros de alcohol encendidos para no contaminar (Santiago, *et al.*, 2003).

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS ESPERADOS

#### 4.1. CUANTIFICACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES

Se cuantificaron los polifenoles presentes en los tres extractos acuosos obtenidos con y sin concentrar, sobre la base de materia seca, a partir del sólido pulverulento de cada material vegetal (Tabla 5). Para *P. guajava* se observó el mayor valor en cuanto a la concentración de polifenoles totales con un valor medio de 3,8 g.100g<sup>-1</sup>, seguido de *C. odorata* (1,9 g.100g<sup>-1</sup>) y finalmente *O. quixos* (1,7 g.100g<sup>-1</sup>).

**Tabla 5.** Polifenoles totales en los extractos acuosos de *C. odorata*, *P. guajava* y *O. quixos*

Muestra	Absorbancia	C (mg/L)	C media (mg/L)	C (g/100g)	C (g/100g) Concentrado
<i>C. odorata</i>	1,191	16,26	14,92	0,933	1,865
	0,994	13,58			
<i>P. guajava</i>	2,200	30,01	30,58	1,911	3,823
	2,284	31,16			
<i>O. quixos</i>	1,008	13,77	13,57	0,848	1,696
	0,978	13,36			

**Fuente:** Elaboración propia 2018

Los resultados de concentración obtenidos concuerdan con los informados en la literatura por Bruni, 2003; Pérez & Medina, 2014; Mariscal, 2015, en dichos trabajos se reportan contenidos de polifenoles totales entre 4 y 5 g.100g<sup>-1</sup> para *C. odorata* y entre 1,7 y 4,6 g.100g<sup>-1</sup> para *P. guajava*.

#### 4.2. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LOS EXTRACTOS ACUOSOS SOBRE LA BASE DE SU ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.

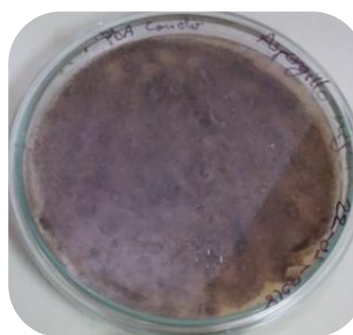
En los experimentos realizados al doble de la concentración inicial, una vez concentrados los extractos acuosos en evaporador rotatorio, arrojaron resultados positivos para *C. albicans* y fue posible llevar a cabo el procedimiento estadístico de optimización de la actividad antifúngica sobre la base del radio de inhibición (Tabla 6).

Es importante señalar que, desde hace algunos años, se han publicado trabajos en los que se describió el empleo de extractos de hojas de *P. guajava*, y se informaron halos de inhibición entre 11 y 22 mm para *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* y *C. krusei*, con lo que se demostró que estos extractos presentaban una elevada capacidad de inhibir el crecimiento de levaduras del género *Candida* (Alves, *et al.*, 2006; Metwally, *et al.*, 2010).

Para *A. niger* no ocurrió lo mismo pues los resultados fueron negativos. Esto también concuerda con lo informado en alguna literatura reciente en trabajos realizados en otras latitudes con extractos de *C. odorata* y *P. guajava*, (Huamani, 2005) (Figura 6).



(a) *C. albicans*



(b) *A. niger*

**Figura 6.** Actividad antifúngica sobre *C. albicans* (a) y *A. niger* (b)

**Fuente:** Elaboración propia 2018

Cuando se llevaron a cabo los experimentos a la dosis más baja, no se observó inhibición del crecimiento de los hongos en ninguno de los casos y eso coincide con estudios realizados con un extracto fluido al 40 % (sobre la base de sólidos totales disueltos) de *P. guajava*, y *C. albicans* mediante el método de difusión en agar (Martínez, *et al.*, 1997).

Luego del análisis estadístico se observó que, dentro de los modelos propuestos, el más adecuado resultó ser el cuadrático. El ajuste fue significativo con un coeficiente de determinación ( $R^2$ ) igual a 0,9904 y el coeficiente de variación 4,11%. Esto implica que el 99,04% de la variación total en el estudio se atribuyó a las mezclas consideradas (Tabla 7). El  $R^2$  ajustado (0,9835) y el  $R^2$  pronosticado (0,9676) tuvieron una diferencia menor a 0,2 (Anderson & Whitcomb, 2015).

**Tabla 6.** Diseño experimental de mezclas para la optimización de la actividad antifúngica en extractos acuosos de *C. odorata*, *P. guajava* y *O. quixos*

Mezcla	<i>O. quixos</i> Lam. (A)	<i>P. guajava</i> L. (B)	<i>C. odorata</i> L. (C)	Radio de inhibición (mm)
1	0	1	0	7,6
2	0	0	1	3,7
3	0	1	0	7,9
4	0,1667	0,6667	0,1667	6,9
5	1	0	0	3,3
6	0,5	0,5	0	5,9
7	0,6667	0,1667	0,1667	4,9
8	0,5	0	0,5	3,9
9	0,1667	0,1667	0,6667	4,8
10	0	0	1	3,4
11	0	0,5	0,5	6,0
12	0,3333	0,3333	0,3333	5,3
13	1	0	0	3,1

**Fuente:** Elaboración propia 2018

La falta de ajuste resultó ser no significativa con un valor de  $p > 0,05$ , lo cual indica que el modelo es adecuado para representar los datos experimentales con un nivel de confianza del 95% (Whitcomb and Anderson, 2004).

**Tabla 7.** Modelos matemáticos propuestos

Fuente	s	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Ajustado	R <sup>2</sup> Pronosticado	PRES	
Linear	0,36	0,961	0,9532	0,9279	2,34	
<b>Cuadrático</b>	<b>0,21</b>	<b>0,9904</b>	<b>0,9835</b>	<b>0,9676</b>	<b>1,05</b>	<b>Sugerido</b>
Cúbico Especial	0,23	0,9905	0,981	0,9108	2,9	
Cúbico	0,26	0,9915	0,9745	0,1102	28,89	
Cuártico Especial	0,26	0,9915	0,9745	0,1102	28,89	
Cuártico	0,19	0,9966	0,9864			

**Fuente:** Elaboración propia 2018

La ecuación, en términos de factores codificados, obtenidos a partir del análisis de regresión resultó:

$$Y_{cod} = 3,23A + 7,75B + 3,55C + 2,07AB + 2,44AC + 1,56BC \quad 3$$

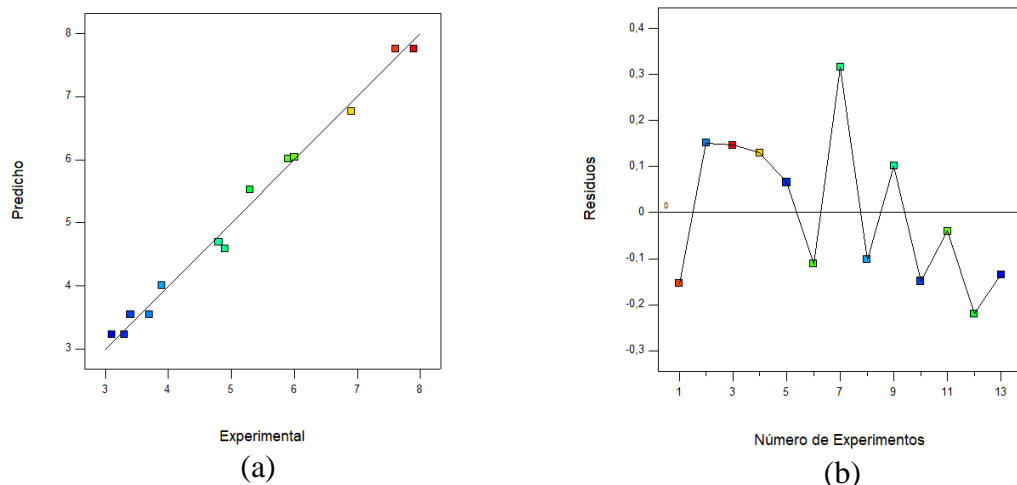
Esta ecuación puede ser utilizada para reconocer el efecto relativo de los factores significativos mediante la comparación de sus coeficientes, por ejemplo, resulta evidente que el extracto de *P. guajava*, fue el de mayor efecto, con un valor de coeficiente de 7,75.

El orden de actividad antifúngica de los extractos individuales sería

*P. guajava* > *O. quixos* = *C. odorata*. Esto es consistente con investigaciones realizadas en años recientes, en las que se demostró que los extractos y compuestos aislados de *P. guajava* mostraron buenas actividades antifúngica frente a *C. albicans* (Metwally, *et al.*, 2010).

La ecuación no codificada en términos de factores reales puede utilizarse para hacer predicciones sobre la variable de respuesta en el intervalo considerado para cada factor.

La Figura 7 muestra la comparación entre los valores de respuesta calculados por el modelo y los valores de reales obtenidos a partir de los resultados experimentales. La distribución del gráfico confirma la capacidad del modelo para cubrir toda la gama de experimentos estudiados.



**Figura 7.** Relación entre los datos de radio de inhibición experimentales y calculados por el modelo (a) y relación entre número de experimento y residual (b)

**Fuente:** Elaboración propia 2018

El valor F fue de 144,42 lo que implicó que el modelo fuera significativo. Los valores de "Prob > F" inferiores a 0,0500 indicaron que los términos del modelo eran significativos

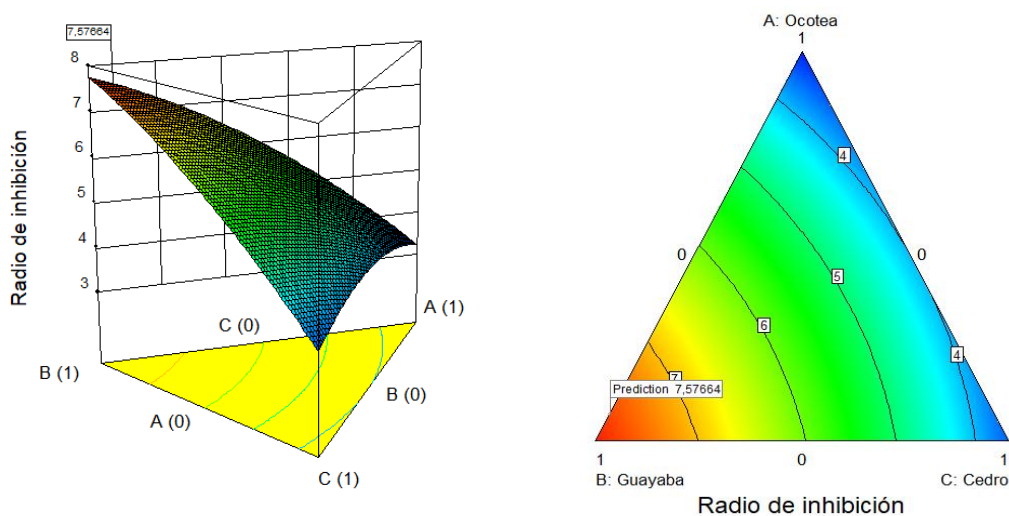
(Tabla 8). En este caso, A, B, C, AB, AC fueron términos significativos del modelo. Los valores superiores a 0,1000 indicaron que los términos del modelo no eran significativos, como en el caso de la interacción BC (*P. guajava*, con *C. odorata*). El "valor F de falta de ajuste" fue 1,38 lo que evidenció que esta no fue significativa en relación con el error puro (Tabla 8).

**Tabla 8.** Resultados ANOVA para el modelo cuadrático sugerido

Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Media cuadrática	Valor F	Prob. > F	
Model	32,16	5	6,43	144,42	< 0,0001	Significativo
Combinación Lineal	31,20	2	15,60	350,33	< 0,0001	
AB	0,27	1	0,27	6,08	0,0431	
AC	0,38	1	0,38	8,46	0,0227	
BC	0,15	1	0,15	3,44	0,1062	
Residuo	0,31	7	0,045			
Falta de ajuste	0,20	4	0,050	1,38	0,4131	No significativo
Error Puro	0,11	3	0,037			
Correlación Total	32,47	12				

**Fuente:** Elaboración propia 2018

En la Figura 8 se aprecian los gráficos obtenidos a partir del análisis de los datos experimentales mediante el software Desing Expert ver. 10.



**Figura 8.** Efecto de las mezclas en la actividad inhibitoria de *C. albicans*

**Fuente:** Elaboración propia 2018



A través de la información gráfica se pudo observar la influencia de cada extracto sobre el radio de inhibición; en la medida en que aumentaba la proporción en la mezcla del extracto de *P. guajava* se incrementó la actividad inhibitoria, mientras que los extractos de *O. quixos* y *C. odorata* presentaron efectos similares entre sí dentro de las mezclas.

Mediante la aplicación del diseño se analizaron todas las mezclas y se llevó a cabo un proceso de optimización para determinar cuál de ellas resultó ser la de mayor actividad inhibitoria en el intervalo de inhibición 7,5 - 7,9 mm (Tabla 9).

**Tabla 9.** Mezclas resultantes con mayor inhibición en *C. albicans*

Mezclas			Radio de inhibición (mm)
<i>O. quixos</i>	<i>P. guajava</i>	<i>C. odorata</i>	
0	1	0	7,753
0,016	0,984	0	7,713
0,033	0,967	0	7,672
0,048	0,952	0	7,632
0	0,94	0,06	7,589
<u>0,067</u>	<u>0,932</u>	<u>0,001</u>	<u>7,577</u>
0,086	0,914	0	7,527
0,003	0,914	0,084	7,514

**Fuente:** Elaboración propia 2018

Los resultados del software sugirieron que era posible obtener una apreciable inhibición de *C. albicans* para las mezclas de los extractos. Si se comparara la actividad antifúngica encontrada para mezclas seleccionadas con la suma del aporte individual de cada componente a la actividad final en cada una, se observaron incrementos entre un 5 y un 10 %, lo cual es indicativo de una posible potenciación de la acción o sinergismo (Calderón, *et al.*, 2016).

De esta manera, se tiene una mezcla optimizada de extractos acuosos de tres especies vegetales amazónicas: 6,7 % de extracto de *O. quixos*; 93,2 % de *P. guajava* y 0,1 % de *C. odorata*, que puede ser utilizada como ingrediente farmacéutico activo herbario para el control de *C. albicans*.

## CAPÍTULO V

### 5.1. CONCLUSIONES

- La extracción asistida por ultrasonidos resultó eficaz para la obtención de los extractos acuosos de *C. odorata*, *P. guajava*, y *O. quixos*, pues se obtuvieron rendimientos sobre la base de los polifenoles extraídos entre 2 y 4 g/100g de sólidos.
- La actividad antifúngica de las mezclas ensayadas resultó adecuada para el control de *C. albicans* y se observó potenciación de la acción en determinadas proporciones, siendo la óptima la mezcla que contenía 6,7 % de *O. quixos*, 93,2 % de *P. guajava* y 0,1 % de *C. odorata*. La mejor respuesta de extracto puro se obtuvo para *P. guajava*.
- El modelo cuadrático permitió describir de manera adecuada, con un buen ajuste, el comportamiento del diámetro de inhibición, respecto a la actividad individual y combinada de los extractos acuosos de *C. odorata*, *P. guajava*, y *O. quixos*.
- Los extractos acuosos de *C. odorata*, *P. guajava*, y *O. quixos*, no resultaron eficaces para el control de *A. niger*.

## 5.2. RECOMENDACIONES

- Evaluar la eficacia antagónica de los extractos obtenidos sobre otros hongos del género *Aspergillus*, así como otros tipos de extractos de estas plantas amazónicas sobre *A. niger*.
- Formular un producto medicinal para el control de *C. albicans* que utilice como ingrediente farmacéutico activo herbario la mezcla de extractos acuosos que contiene 6,7 % de *O. quixos*, 93,2 % de *P. guajava* y 0,1 % de *C. odorata*.
- Evaluar la efectividad de la formulación obtenida a partir de la mezcla óptima en condiciones de campo.

## CAPÍTULO VI

### BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, R. (2010). <http://diversidadbiologica.minamb.gob.ve>. Obtenido de <http://diversidadbiologica.minamb.gob.ve>: <http://diversidadbiologica.minamb.gob.ve/especies/ficha/6/31342/>
- Ali-Shtayeh, M. S., & Abu Ghdeib, S. I. (1999). Antifungal activity of plant extracts against dermatophytes. *Mycoses*, 11-12(665-6672.), 42.
- Alves, P. M., & Lima, E. O. (2006). Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn.(goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação in vitro. *Rev Bras Farmacogn*, 16(192-196.), 2.
- Amilia Destryana, R., Gary Young, D., Woolley, C., Huang, T.-C., Wu, H.-Y., & Shih, W.-L. (2014). Antioxidant and anti-inflammation activities of ocotea, copaiba and blue cypress essential oils in vitro and in vivo. *Journal of the American Oil Chemists' Society*(1531-1542), 91.
- Anaya, A., Calera, M., Mata, R., & Miranda, R. (1990). Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea atricolor* Cav.(Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology*(2145-2152), 16.
- Araujo, F. S. (1997). Crecimiento y acumulación de nutrientes del fruto de guayaba (*Psidium guajava* L.) del tipo Criolla Roja en la planicie de Maracaibo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*(315-328), 14.
- Ballabeni, V. T. (2010). *Ocotea quixos* (Lam) essential oil: Invitro and in vivo investigation on its anti-inflammatory properties. *Fitoterapia*(289-295), 81.
- Barnola, Alarcon, P., Maza, M., Enrich, M., Maier, C., Martínez, & D. (26 de Abril de 1999-2018). *Botanical-Online SL*. Obtenido de Plantas Venenosas (las plantas mas peligrosas del Mundo): <https://www.botanical-online.com/plantasvenenosas.htm#taninos>

- Bisignano, G. S., & Marino, A. (2000). Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. *Lett. Appl Microbiol.*(105-108.), 30.
- Bravo, L. R., & Chiurato, M. (2017). Determinación de polifenoles en cinco especies amazónicas con potencial antioxidante. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología.*, 1(55-64.), 6.
- Brooke, J. (1999). Biología de los microorganismos. *Editorial Prentice Hall. Madrid, España*, 8, 1125.
- Bruni, R. (2003). Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*(415-421), 85.
- Cabrera-Carrión, J. L.-J.-T.-C. (2017). Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleifera* Lam. en función de su edad y altura. *Bioagro*, 1( 53-60), 29.
- Calderón-Oliver, M. E.-B.-C.-C.-I., & Ponce-Alquicira, E. (2016). Optimization of the antioxidant and antimicrobial response of the combined effect of nisin and avocado byproducts. *LWT-Food Science and Technology*(46-52.), 65.
- Cáliz Vila B, M. K., & Rengifo, E. (1995, 2000). *Plantas medicinales de uso popular en la Amazonía peruana* (2 ed.). (E. Uldemolins, Ed.) Breña, Lima, Peru: Tarea Asociación Gráfica Educativa.
- CÁRDENAS-TELLO, C. D.-R. (2016). FITOQUÍMICA DE EXTRACTOS DE *Ocotea quixos* (canela amazónica) Y *Piper carpunya* (guaviduca, pinku), POTENCIALES FUNGOCONTROLADORES.
- Carpinella, M. C. (1999). Antifungal. 3, 70.
- Carretero Accame, E. (2000). Compuestos fenólicos: taninos. *Panorama Actual del Medicamento*, 24(235), 633-636.
- Carrizosa, C. (2013). Cinemaldehído: no solo un dulce aroma. . *Universidad Pablo de Olavide, Facultad deficiencias Biotecnológicas, México*.
- Cedrela odorata*, L. (1759). *Cedrela odorata* - Conabio. *Systema Naturae*( 940. 1759), 10.

- Cerón Salazar, I. X. (2009). Separación de metabolitos de los aceites esenciales de eucalipto y cidrón por destilación molecular. (*Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales*).
- Cheema, Z., Farooq, M., & Wahid, A. (2013). Allelopathy. *Current Trends and Future Applications, Springer, London*.
- Choesin, D. N., & Boerner, R. E. (1991). Allyl isothiocyanate release and the allelopathic potential of *Brassica napus* (Brassicaceae). *Am. J. Bot*( 1083-1090), 78.
- Cornell J, A. (2002). Experiments with Mixtures: Design, Models and the Analysis of Mixtures 3rd Ed. *New York & Sons*.
- Cuba. (1985). Instructivo técnico del cultivo de la guayaba. *Ministerio de la Agricultura*, 47.
- Dabur, R. S. (2004). Antifungal potential of Indian medicinal plants. *Fitoterapia.*, 3-4(389-391.), 75.
- De García, C. L., & Rojas, N. (1995). Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antimicrobiana de algunas plantas superiores colombianas. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 3(42-48.), 21.
- De La Rosa, C. A., & Osorio, O. (2012). Cuantificación de flavonoides totales en el extracto metanólico de *Glycine max* (soya) y su efecto larvicida contra *Aedes aegypti*. *Rev Col Cien Salud*,(39-43.), 1.
- De la Torre, L., H Navarrete, P., M., M., & (eds), M. M. (2008). Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. *Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus*, 323.
- Dey J, H. J. (1989). Methods in Plant Biochemistry. *Plant Phenolics. Academic Press*, 1.
- Divicio, R. M., & Micalizzi, B. (2017). Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina. *Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM*, 2(247-251), 14.
- Ekabo, O. N. (1996). Antifungal and molluscicidal saponins from *Serjania salzmanniana*. *J. Nat.*(431-435), 59.

- Eksangsri T, H. H. (Diciembre de 2004). Extraction of compactin (ML-236B): equilibrium distribution in water ethyl acetate system. *Chem Eng Process*, 10(1203-1210.), 43.
- Engelmeier, D., & Hadacek, F. (2006). Antifungal natural products: assays and applications. *Advances in Phytomedicine.*, 3, 423-467.
- Erturk S, O. A. (Abril de 2003). Analytical methods for the quantitative determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. *J Chromatogr B.*, 2(193-205.), 793.
- Escalante, A. M., & Lòpez, S. N. (2002). Isolation of antifungal saponins from *Phytolacca tetramera*, an Argentinean species in critic risk. *Ethnopharmacol.*(29-39.), 82.
- Española., R. A. (2001). Diccionario de la Lengua Española. *España: Mateu cromos artes gráficas, S. A.* .
- FAO. (1982). Especies frutales forestales. *Estudios FAO-Montes*(34), 150.
- Fernández, E. G., & Pérez, N. (2008). Diseños de experimentos en tecnología y control de los medicamentos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 2(28-40.), 39.
- Fernández, k. (2007). Caracterización de Taninos. *Universidad de Concepción*.
- Fernández, W. O., & Sánchez, L. R. (2016). Desarrollo y Validación de Técnicas Espectrofotométricas para la Determinación de Flavonoides Totales, Basada en Quercetina, en las Hojas de *Psidium guajava L.* *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 3(276-289.), 5.
- Ferner, R. S., & Rates, S. M. (2005). Antifungal activity of some Brazilian Hypericum species. *Phytomedicine.*, 3(236-240.), 12.
- Frobisher M, H. R. (1974). Fundamentals of Microbiology, Ed. W.B. *Saunders Company, Philadelphia, EEUU.*, 390.
- GARCIA J.A, C. R. (2002). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los Antimicrobianos. . *Procedimientos en Microbiología*.
- García, M. A. (Diciembre de 2010). GUIA TECNICA DEL CULTIVO. *CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA "Enrique Alvarez Córdova"*.(600), 26.

- Girois, S. B., & Deculier, E. (2005). Adverse effects of antifungal therapies in invasive fungal infections: review and meta-analysis. *Eur. J. Clin. microbiol. infect. dis.*, 2(119-130.), 24.
- Granados-Sánchez, D. P.-P.-E. (2008). Ecología de la herbivoría. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente*, 1(51-63), 14.
- Gupta, M. (1995). 270 Plantas medicinales Iberoamericanass. *CYTED-SECAB*.
- Gutiérrez Gaitén, Y. I., & Rodríguez, A. T. (2000). Validación de 2 métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajava*, L.. *Revista Cubana de Farmacia*. Recuperado en 31 de mayo de 2018, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152000000100007&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152000000100007&lng=es&tlng=es), 1( 50-55), 34.
- Gutiérrez Y, M. M. (2003). Validación de dos métodos espectrofotométricos para la cuantificación de taninos y flavonoides (quercetina) en *Psidium guajava*, L. *Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de La Habana*, 1( 20-35.), 38.
- Hartisch C, K. H.-B. (1997). Dual inhibitory activities of tannins from *Hamamelis virginiana* and related polyphenols on 5-lipoxygenase and lyso-PAF: acetyl-CoA acetyltransferase. *Planta Medica*(106-10), 63.
- Hernández Díaz, L., & Rodríguez Jorge, M. (2001). Actividad antimicrobiana de plantas que crecen en Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2(44-47), 6.
- Huamani, M. E. (2005). Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos: Lima, Peru*.
- Hughes Formella BJ, B. K. (1998). Anti-inflammatory of *Hamamelis* lotion in UVB. *Dermatology*, 3(316-22), 196.
- Huor S., e. a. (1981). "Formulation and Sensory Evaluation of a Fruit Punch Containing Watermelon *Citrullus Lanatus* aplicando un Tratamiento con Vapor. *Tesis. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Universidad Tecnológica de la Mixteca. Ciudad México*.



- Ibelise de Gonzáles, M. I., & Bartardo de Albornoz, M. (1998). Efecto del ajoeno sobre dermatofitos, *Candida albicans* y *Malassezia furfur*. *Rev Iberoam Micol.*(277-281.), 15.
- Jara, A. (2013). Análisis fitoquímico y determinación de la actividad antioxidante del extracto etanólico de las hojas de la especie *Piper imperiale* (Piperaceae). *Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales*.
- Jia C-Y, Y. Q.-X.-B.-K. (Diciembre de 2009). Solubility of Form A Pravastatin Sodium in Aqueous 2-Propanol Mixtures. *J Chem Eng Data.*, 1(154-156.), 54.
- Jiménez, C. I. (2009). Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*, 2(73-5), 52.
- Jones, N. P., & Abou-Zaid, M. (2000). Antifungal activity of extracts from medicinal plant used by first Nations Peoples of eastern Canada. *J Ethnopharmacol.*(191-198.), 73.
- Jørgensen P.M., L.-Y. S. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*.
- Kandil, O. R., & Hassan, A. B. (1994). Extracts and fractions of thymus capitatus exhibit antimicrobial activities. *J Ethnopharmacol.*, 1(19-24.), 44.
- Kostennikova, Z. (1983). UV spectrophotometric quantitative determination of flavonoid in calendula tintur. *Farmatsiya*, 6(83-6. ), 33.
- Kostennikova, Z. (1997). UV spectrophotometric quantitative determination of flavonoid in calendula tincture. *Farmatsiya*, 6(83-6.), 33.
- Landrum, L. (1981). Flora Neotrópica. A. Monograph of the genus. *The New York Garden.*(20), 5.
- Leal, F., & Avilán, L. (1986). Áreas potenciales para el desarrollo de diferentes especies frutícolas. *La Guayaba. Rev Fac Agron. (Maracay)*, 3-4(157-167), 14.
- Lee C-L, H. H.-K.-J.-M. (Julio de 2007). Improving the Ratio of Monacolin K to Citrinin Production of *Monascus purpureus* of pH Value and Ethanol Addition. *J Agric Food Chem.*, 16(6493-6502.), 55.
- MAE, I, F., & FAO. (2014). *Propiedades Anatómicas Físicas y Mecánicas de 93 especies forestales*. Obtenido de Ministerio del Ambiente del Ecuador (MAE) y el Proyecto

“Manejo Forestal Sostenible ante el Cambio Climático (MFSCC)” de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), a través del soporte financiero del Gobierno de F: <http://www.fao.org/3/a-i4407s.pdf>

- Marín, M. A. (1993). Variación de las características químicas de los frutos de guayaba (*Psidium guajava*) en una plantación comercial del municipio Mara del estado Zulia. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*(297-310), 10.
- Mariscal-Lucero, S. d.-C.-M.-S. (2015). Evaluación de fenoles y limonoides en hojas de *Cedrela odorata* (Meliaceae) de una plantación experimental establecida en Tezonapa Veracruz, México. *Revista de Biología Tropical*, 2(545-558), 63.
- Martín J, B. W. (Julio de 2011). Comparison of different extraction methods for the determination of statin drugs in wastewater and river water by HPLC/QTOF-TOF-MS. *Talanta*, 1(607-615.), 85.
- Martínez- Valverde, I. P. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 1(5-18), 50.
- Martínez, M. J., & BOUCOURT, E. (1997). Evaluación de la actividad antimicrobiana del *Psidium guajava* L.(Guayaba). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2(12-14), 1.
- Metwally, A. M., & El Sohafy, S. M. (2010). Phytochemical investigation and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. leaves. *Pharmacognosy magazine*, 6(212), 23.
- Moura Mendes, J. S., & de Oliveira Lima, E. (2012). Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(3).
- Napolitano, H. (2012). Diseño de experimentos. *Journal Article*.
- Napralert. (1990). Illinois. USA.
- Naranjo P, K. A. (1981). Ocote aquixos, Ammerican cinnamon. *Journal of ethnopharmacology*(233-236), 4.

- Navarro, V. M., & al, e. (2003). Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, 1(85-88.), 87.
- NIETO-RAMIREZ, I. J.-A., & SEPÚLVEDA A., L. J. (2013). LAS ESTATINAS: QUÍMICA, TÉCNICAS ANALÍTICAS, BIOSÍNTESIS Y FARMACOCINÉTICA. *Vitae*, 1(49-63), 20.
- Noriega, P., & Dacarro, C. (2008). Aceite foliar de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.: actividad antimicrobiana y antifúngica. *La granja*, 7(1), 3-8.
- Nti-Gyabaah J, C. Y. (2008). Solubility of Lovastatin in Ethyl Ac-Solubility of Lovastatin in Ethyl Acetate, Acetate, Isobutyl Acetate, tert-Butyl Acetate, and 2-Butanone, between (285 and 313). *K. J Chem Eng Data*, 9(2060-2065.), 53.
- Ojito Ramos, K. H., & Portal Villafaña, O. (2012). Actividad antioxidante in vitro y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de Citrus spp. (Rutaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, Recuperado en 31 de mayo de 2018, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962012000400008&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962012000400008&lng=es&tlng=es), 4(368-379), 17.
- Orellana C, M. A. (Mayo de 2007). Determinación cuantitativa de taninos en extracto hidroalcohólico de hojas de *Fragaria vesca* L.(Fresa) por espectrofotometría ultravioleta (Doctoral dissertation, Universidad de El Salvador).
- Ortuño, M. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. *Primera edición ed.*
- PA, W. (1997). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Approved Standard M2-A6*. En <http://www.nccls.org/es/source/orders/free/m2-a8.pdf>.
- Pabón Baquero, L. C. (2013). Actividad antioxidante y antibacteriana de extractos de hojas de cuatro especies agroforestales de la Orinoquía colombiana. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 1(57-70.), 18.
- Pansuriya RC, S. R. (Julio de 2009). Supercritical Fluid Extraction of Lovastatin from the Wheat Bran Obtained after Solid-State Fermentation. *Food Technol Biotech.*, 2(159-165.), 47.

- Paola., R. L. (2016). "Determinación de las propiedades físicas, composición química y evaluación de la actividad biológica y antioxidante del aceite esencial de la especie *Ocotea quixos* L. Kosterm de la Provincia de Morona Santiago. (Tesis de Pegrado) Universidad Técnica Particular de Loja.
- Paolo, O. R.-Z.-S., & CABANILLAS, B. (2013). EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ALELOPÁTICA DE CINCO ESPECIES VEGETALES AMAZÓNICAS. *Folia Amazónica*, 1-2(91-96), 22.
- Parmar, V. K. (1997). Phytochemistry of the Genus Piper. *Phytochemistry*, 4(591-673), 46.
- Perez D, D., & Iannacone O, J. (Enero, Marzo de 2006). Efectividad de Extractos Botánicos de Diez Plantas Sobre la Mortalidad y Repelencia de Larvas de *Rhynchophorus palmarum* L., Insecto Plaga del Pijuayo *Bactris gasipaes* Kunth en la Amazonía del Perú. . *Agricultura Técnica*, 1(21-30), 66.
- Pérez, E. P., & Medina, D. (2014). Determinación de fenoles y flavonoides totales en hojas de guayabo (*Psidium guajava* L.). *Revista de la Facultad de Agronomía*, 1, 31.
- Pérez, K. C., & Molina, Z. J. (2017). Actividad contra *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) de extractos metanólicos de plantas de uso medicinal en México. *Revista de Biología Tropical*, 4(1459-1469), 65. Obtenido de Revista de Biología Tropical.
- Phillips, I. (1998). The subtleties of antibiotic resistance. *J. Antimic.Chemother.*(5 - 12), 42.
- PREGO M, D. J. (1999). Actividad antifúngica de la capsicina frente a varios hongos fitopatógenos. *Memorias, XIII Reunión Nacional de Sociedad Española de Fisiología Vegetal*.
- Pulido, R. B., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 8(3396-3402.), 48.
- Pullido, H. G., & Pérez, M. D. (2012). Análisis y diseño de experimentos.
- Quiroga, E. N., & Vattuone, M. A. (2001). Screening antifungal activities of selected medical plants. *J. Ethno-pharmacol*, 1(89-96.), 74.

- Radice, M. S. (2017). *Ocotea quixos* essential oil: A systematic review about the ethno-medicinal uses, phytochemistry and biological activity. In *MOL2NET 2017, International Conference on Multidisciplinary Sciences, 3rd edition. Multidisciplinary Digital Publishing Institute.*
- Rice, E. (1984). Allelopathy. *Academic Press*, 422.
- Richter, H. G., & Van der Werff, H. (1996). Toward an improved classification of Lauraceae. *Ann. Missouri Bot. Gard.*(409-418), 83.
- Rohwer, J. (1991). Borderline cases between *Ocotea*, *Nectandra*, and *Phoebe* (Lauraceae): The "marginal" species of the *Ocotea helicterifolia*-group, including the *O. heydeana*-group. *Bot. Jahrb. Syst.*
- Roig y Mesa, J. T. (1965-1988). Diccionario Botánico de Nombres Vulgares Cubanos. *Tomado de la Tercera edición, ampliada y corregida, 3.*
- Roig y Mesa, J. T. (19 de Junio de 1988-1965). *Ecured.cu*. Obtenido de Conocimiento con todos y para todos: [https://www.ecured.cu/Guayaba#Composici.C3.B3n\\_qu.C3.ADmica](https://www.ecured.cu/Guayaba#Composici.C3.B3n_qu.C3.ADmica)
- Rojas, F., & Torres, G. (26 de Enero de 2014). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú (Costa Rica)* . Obtenido de Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Cedro amargo (*Cedrela odorata* L.): file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Dialnet-ArbolesDelValleCentralDeCostaRica-5123216.pdf
- Rojas, J. J., & López, A. J. (2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas.*, 2, 4.
- Rolli, E., Marieschi, M., Maietti, S., Sacchetti, G., & Bruni, R. (2014). Comparative phytotoxicity of 25 essential oils on pre- and post-emergence development of *solanum lycopersicum* l.: A multivariate approach. *Industrial Crops and Products*(280-290), 60.
- Ruiz, J. R., & Roque, M. (2009). Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-oriente peruano. *Ciencia e investigación*, 1(41-47), 12.

- Saltos, H. A., & Bayas, A. (2010). Aplicación de un Diseño Experimental de Mezclas en el Desarrollo de una “Barra Energética” con base en el Salvado de Palmito de Pejibaye (*Bactris gasipaes* HBK). *Revista Tecnológica-ESPOL*, 1(0113-128), 30.
- Sampietro, D., Catalan, A., & Vattuone, M. (2009). Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals-Natural Products. *Science Publishers, USA*, 547.
- Santiago, E. B., & Cobacho, A. R. (2003). Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
- Sax NI, L. R. (1993). Hawley Diccionario de química y de productos. *Barcelona: Omega*, 2.
- Scalvenzi, L., Yaguache-Camacho, B., Cabrera-Martínez, P., & Guerrini, A. (2016). Actividad. *Bioagro*(39-46), 28.
- Sepúlveda, G. H. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 3(355- 363), 21.
- Sierra-García, I. N.-T., & Orduz-Peralta, S. (2012). Determinación De La Actividad Antimicrobiana E Insecticida De Extractos Producidos Por Bacterias Aisladas De Suelo/Determination Of The Antimicrobial And Insecticidal Activities In Extracts Produced By Bacteria Isolated From Soil. *Actualidades Biológicas*, 34(96), 5.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1999). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Somchit., M. N. (2003). In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassialata*. *J Ethnopharmacol*, 1(1-4.), 84.
- Song, J. C., & Deresinski, S. (2005). Hepatotoxicity of antifungal agents. *Curr Opin Investig Drugs*, 2(170-177), 6.
- Soto Vásquez, M. R. (2015). Estudio fitoquímico y cuantificación de flavonoides totales de las hojas de *Piper peltatum* L. y *Piper aduncum* L. procedentes de la región Amazonas. *In Crescendo. Institucional*, 1(33-43), 6.

- Thompson, & W.O., R. M. (1968). Response Surface for Experiments with Mixtures". *Technometrics*, 10(739-755).
- Tognolini, M., Barocelli, E., Ballabeni, V., Bruni, R., Bianchi, A., Chiavarini, M., & Impicciatore, M. (2006). Comparative screening of plant essential oils: Phenylpropanoid moiety as basic core for antiplatelet activity. *Life Sciences*(1419-1432), 78.
- Urióstegui-Flores, A. (2015). Hierbas medicinales utilizadas en la atención de enfermedades del sistema digestivo en la ciudad de Taxco, Guerrero, México. *Revista de Salud Pública*, 17(1), 85-96.
- Villacís-Aldaz, L. A.-G.-M.-T.-M. (2017). Actividad anti fúngica (*in vitro*) de extractos vegetales para el control de antracnosis (*Colletotrichum acutatum*). *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 1(59-64), 5.
- Vinueza, M. (15 de agosto de 2015). *Ministerio de agricultura, ganadería, acuicultura y pesca (MAGP)*. Obtenido de Programa de incentivos para la Reforestación con Fines Comerciales.: <http://ecuadorforestal.org/fichas-tecnicas-de-especies-forestales/ficha-tecnica-no-5-cedro/>
- Vizcano, R. L. (2007). Actividad antifúngica del extracto total en etanol de la hojas frescas de *pedilanthus tithymaloides* L. (ultimorrial). *Scientia et Technica*, 1, 33.
- Weston, L., & S.O., D. (2003). Weed and crop allelopathy. *Critical Reviews in Plant Sciences*(367–389), 22.
- Wilcke, J. (1999). Antimicrobial therapy. *Virginia-Maryland Regional College of Veterinary and Medicine*. En <http://cpharm.vetmed.vt.edu/vm8784/ANTIMICROBIALS/Principles.htm>.
- Xuan, T., Shinkichi, T., Khanh, T., & Min, C. (2005). Biological control of weeds and plant pathogens in paddy rice by exploiting plant allelopathy: an overview. *Crop Protection*(197–206), 24.
- Yolmeh, M. K., & Ahmadi, Z. (2017). Application of mixture design to introduce an optimum cell-free supernatant of multiple-strain mixture (MSM) for *Lactobacillus* against food-borne pathogens. *LWT-Food Science and Technology*,(298-304.), 83.

- Yucatan, & SEDUMA. (2012). *Yucatan*. Obtenido de Flora:  
<http://www.seduma.yucatan.gob.mx/flora/fichas-tecnicas/Cedro.pdf>
- Zhang, J. D., & Xu. (2005). *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the eight steroid saponins from *tribulus terrestris* L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal pathogens. *Biol Pharm Bull*, 12(2211-2215.), 28.
- Zhu, X. F. (2005). Antifungal activity of *Cynara scolymus* l.extractos. *Fitoterapia.*, 1(108-111.), 76.