

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Propiedades antimicrobianas, composición química y toxicidad
del extracto de *Xanthosoma undipes*.**

Ana Paula Cacao Yagual

Biología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Bióloga

Quito, 13 de mayo de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Propiedades antimicrobianas, composición química y toxicidad
del extracto de *Xanthosoma undipes*.**

Ana Paula Cacao Yagual

José Miguel Álvarez S., Ph.D (Director)

Cristina Chávez, M.Sc. (Codirectora)

Quito, 13 de mayo de 2024

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Ana Paula Cacao Yagual

Código: 00212253

Cédula de identidad: 0924443047

Lugar y fecha: Quito, 13 de mayo de 2024

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around thesis publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

En el contexto de la creciente lucha contra la resistencia a los antibióticos, este estudio exploró el potencial de *Xanthosoma undipes*, una planta medicinal, como fuente de agentes antimicrobianos naturales. Se investigó la composición química, la toxicidad y la actividad antimicrobiana de sus extractos de corteza, raíz y hoja contra diversas bacterias de importancia clínica. Los extractos metanólicos revelaron variaciones en el contenido fitoquímico. Las raíces exhibieron los niveles más altos de fenoles y demostraron el mayor potencial antioxidante. Las hojas, por otro lado, contienen la mayor cantidad de flavonoides. Cabe destacar que los ensayos antimicrobianos identificaron una actividad prometedora contra *Staphylococcus aureus* y su variante resistente a la meticilina MRSA, una amenaza para la salud mundial, siendo el extracto de raíz el que mostró mayor actividad, seguido del extracto de corteza. Esto resalta el potencial de *X. undipes* como fuente de antimicrobianos naturales para combatir bacterias resistentes a los antibióticos. El extracto de hoja no mostró efectos contra las bacterias analizadas. En cuanto a las evaluaciones de citotoxicidad en *Artemia salina* se identificaron niveles significativos de toxicidad, especialmente en los extractos de raíz y corteza, por lo que se necesita una evaluación adicional en células humanas para determinar la seguridad de su uso. En conclusión, los extractos de raíz y corteza de *X. undipes* exhiben una actividad antimicrobiana prometedora contra *S. aureus* MRSA, lo que justifica una investigación más profunda para aislar compuestos activos, comprender sus mecanismos de acción y refinar sus perfiles de seguridad. Se recomienda investigar las variaciones estacionales en el contenido fitoquímico y explorar métodos de extracción alternativos. Este trabajo contribuye al desarrollo de antimicrobianos de origen vegetal y podría ofrecer nuevas opciones de tratamiento para combatir bacterias de amenaza crítica como *S. aureus* MRSA.

Palabras clave: *Xanthosoma undipes*, planta medicinal, actividad antimicrobiana, fitoquímicos, toxicidad, *Staphylococcus aureus*, MRSA, compuestos activos.

ABSTRACT

In the ongoing fight against antibiotic resistance, this study explored the potential of *Xanthosoma undipes*, a traditionally used medicinal plant, as a source of natural antimicrobials. We investigated the chemical composition, toxicity, and antimicrobial activity of its bark, root, and leaf extracts against various clinically important bacteria. Methanolic extracts revealed variations in phytochemical content, with roots showcasing the highest levels of phenolics, particularly polyphenols, and demonstrating the strongest antioxidant potential. Leaves, on the other hand, contained the highest amount of flavonoids. Antimicrobial assays identified promising activity against *Staphylococcus aureus* and its methicillin resistant variant MRSA, a major global health threat, with the root extract demonstrating the most significant effects, followed by the bark extract. This highlights the potential of *X. undipes* as a source of natural antimicrobials to combat antibiotic-resistant bacteria. However, the leaf extract displayed no effects against the tested bacteria. Cytotoxicity assessments using *Artemia salina* indicated potential toxicity concerns, especially in root and bark extracts. Further evaluation in human cells is necessary to understand its safety of use. In conclusion, *X. undipes* root and bark extracts exhibit promising antimicrobial activity against MRSA, warranting further research to isolate active compounds, understand mechanisms of action, and refine safety profiles. Investigating seasonal variations in phytochemical content and exploring alternative extraction methods are recommended. This work contributes to the development of plant-based antimicrobials and could potentially offer new treatment options to combat bacterias that could pose serious threats such as *S. aureus* MRSA.

Keywords: *Xanthosoma undipes*, medicinal plant, antimicrobial properties, phytochemistry, toxicity, *Staphylococcus aureus*, MRSA, active compounds.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	10
METODOLOGÍA	14
Método Folin- Ciocalteu.....	16
Método Flavonoides	18
Método FRAP.....	19
Preparación de dilución madre (Stock)	21
Preparación de las diluciones experimentales	21
Ensayo de dispersión por disco - Kirby Bauer (KB).....	22
Ensayo de difusión en agar (DA)	24
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	25
Determinación de la Concentración Letal Mínima (CLM)	29
Ensayo de letalidad en <i>Artemia salina</i>	29
Análisis estadístico	31
RESULTADOS	32
Caracterización fitoquímica del extracto crudo.....	32
Ensayo de dispersión por disco (Kirby Bauer).....	34
Ensayo de difusión en agar.....	36
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Letal Mínima (CLM).....	36
Letalidad en <i>Artemia salina</i>	39
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXO A: VALORES DE SIGNIFICANCIA ENTRE BLANCOS E INOCULADOS	53
ANEXO B: PORCENTAJE DE CRECIMIENTO POR CONCENTRACIÓN, ENSAYO CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cambios en el peso y pérdida de agua de <i>X. undipes</i> durante el procesamiento de las muestras	15
Tabla 2. Peso final del extracto puro y seco	16
Tabla 3. Esquema para la preparación de las diluciones de los extractos para el ensayo de la CMI.....	26
Tabla 4. Resultados dicotómicos del ensayo Kirby Bauer para los extractos analizados.	34
Tabla 5. Halos de inhibición y resistencia de las cepas a los antibióticos control.	35
Tabla 6. Halos de inhibición de los extractos analizados	35
Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración letal mínima (CLM) del extracto metanólico de la Corteza y Raíz de <i>Xanthosoma undipes</i> contra una bacteria multirresistente.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del sitio de colección y de los registros de <i>Xanthosoma undipes</i> en el Ecuador.	14
Figura 2. Esquema de ubicación de los discos. Ensayo piloto Kirby Bauer.	23
Figura 3. Esquema de ubicación de los discos. Ensayo de difusión en agar.	25
Figura 4. Esquema del diseño de la placa para el ensayo de concentración mínima inhibitoria	27
Figura 5. Esquema del ensayo de letalidad en <i>Artemia salina</i>	30
Figura 6. Resultados del análisis químico: Polifenoles totales, Flavonoides y Capacidad Antioxidante (FRAP).	33
Figura 7. LOESS de la Actividad de <i>X. undipes</i> frente a <i>S. aureus</i> MRSA (INSPI 37).	37
Figura 8. Porcentaje de letalidad del extracto en <i>Artemia salina</i> a lo largo del tiempo.....	39

INTRODUCCIÓN

El saber ancestral acerca del uso de plantas medicinales ha sido transmitido de generación en generación, de individuo a individuo, desde tiempos anteriores al surgimiento del lenguaje escrito. Este se encuentra impregnado de rituales y leyendas que exaltan su poder restaurativo (Rahman et al., 2021), dejando un legado etnobotánico que ha impulsado la investigación hacia ciertas especies vegetales, buscando identificar compuestos activos con potencial terapéutico para hacer frente a patógenos cada vez más resistentes (Guglielmi et al., 2020; Manso et al., 2021).

De los primeros errores que puede cometer el ser humano, es asumir que la vida de una planta es simple. Evolutivamente, son organismos muy bien adaptados; son productores primarios y autótrofos que han logrado sobrevivir pese a sus tantos patógenos y depredadores. Si bien sus adaptaciones morfológicas son magníficas, la diversidad de recursos químicos, refinados y pulidos durante cientos de miles de años, presentan un potencial inmenso que todavía hace falta explorar (Heard et al., 2021; Ramawat & Goyal, 2019). De todas las especies vegetales los humanos hacemos uso de tan sólo entre un 1 a un 10% del total (Rahman et al., 2021). Específicamente en Ecuador, contamos con una diversidad de flora excepcional, donde el número de especies de plantas vasculares sobrepasa las 17 000. Así mismo, la flora ecuatoriana es reconocida por su riqueza en plantas útiles (Torre, 2008), impulsando la producción de estudios cada vez más rigurosos que permitan determinar el potencial biológico de nuestra flora.

Este potencial podría representar una alternativa al uso de antibióticos y sus crecientes fenómenos de resistencia, cada vez más presentes en microorganismos patógenos que afectan

tanto al hombre como a los animales. Tomando en cuenta sólo bacterias, se proyecta que para 2050 la presencia de cepas resistentes será la principal causa de muerte a nivel global; con un estimado de diez millones de muertes al año, superando incluso a enfermedades como el cáncer (Li et al., 2024; Manso et al., 2021). Si ampliamos nuestro enfoque a hongos, la prevalencia de organismos resistentes sigue en aumento. Los antifúngicos disponibles no presentan la misma efectividad y pueden causar serios efectos secundarios, dada nuestra proximidad con el reino Fungi (Arif et al., 2009). Así mismo, esto escapa de ser únicamente una crisis dentro del sistema de salud, llegando a afectar la seguridad alimenticia y al medio ambiente (Heard et al., 2021; Li et al., 2024).

Por su parte, los extractos naturales pueden contener cientos de componentes químicos, de los cuales unos pocos son bioactivos (Wu et al., 2013). Entre estos se considera de interés a los metabolitos secundarios, ya que en su mayoría se han asociado a mecanismos de regulación y de defensa en plantas (Erb & Kliebenstein, 2020). Los metabolitos secundarios suelen ser específicos del linaje y permiten a la planta interactuar con otros organismos y con su entorno (Rahman et al., 2021); compitiendo con plantas vecinas (alelopatía), defendiéndose de la herbivoría y lidiando con fitopatógenos (Latif et al., 2017). Así mismo, estos componentes atribuyen a muchas plantas sus pigmentos (quinonas y taninos), olores (terpenoides) y sabores (capsacina), presentando una diversidad considerable de la cual se ha caracterizado apenas menos del 10% (Arif et al., 2009; Rahman et al., 2021)

Xanthosoma undipes es una planta herbácea terrestre, nativa y perteneciente a la familia Araceae (Torre, 2008). Sus hojas presentan una textura coriácea, con un acabado mate o semibrillante; presenta una venación principal en el anverso de la hoja gruesa y prominente. Se distingue por presentar venas basioscópicas basales robustas y numerosas, con al menos siete

pares. La planta se caracteriza por su altura, que puede alcanzar hasta 3 metros, acompañada por un tronco largo y en ocasiones decumbente. Crece sin presentar características glaucas tanto en su pecíolo, como en el reverso de la hoja y la inflorescencia (Croat, Delannay, & Ortiz, 2017).

Ahondando más en sus características, la especie pertenece a una familia botánica rica en compuestos como glicoflavonas, flavonoles y proantocianidinas y, aunque existe evidencia de que contiene componentes irritantes para las membranas mucosas, estos aún no han sido identificados de manera definitiva. (Lans et al., 2001). Así mismo, la especie es de importancia alimenticia en Indonesia donde se ha convertido en un sustituto del trigo como fuente de carbohidratos, ganando popularidad por su relativa facilidad de cultivo (Pamela et al., 2019). El principal componente comestible es el tubérculo, específicamente el cormo (Windarsih et al., 2023). En cuanto a su potencial microbicida varios estudios han reportado sus efectos antiparasitarios. A partir de ensayos *in vitro* se evidenció la actividad promisoriosa del extracto etanólico de las hojas tiernas y maduras contra *Trypanosoma cruzi* (Chagas) y *Toxoplasma gondii* (Toxoplasmosis) Chinchilla, Valerio, et al., 2016), mientras que en un ensayo *in vivo* con *Plasmodium berghei* (malaria) se observó una actividad débil de los extractos etanólicos de la planta (Chinchilla et al., 2011). En cuanto a una evaluación de su potencial pesticida, se concluyó que puede tener utilidad contra insectos y mamíferos pequeños, dado su sabor amargo, su olor fuerte y su sensación irritante (Fatmawaty et al., 2019). Finalmente, en cuanto a la fitoquímica de la planta, se han identificado la presencia de taninos (3448.20 mg/kg) y ácido oxálico (8361.83 mg/kg) en las hojas cultivadas de la planta (Fatmawaty et al., 2019).

Tomando en consideración la información recopilada sobre *X. undipes* y sus potenciales propiedades medicinales, este estudio propone una evaluación desde el punto de vista químico

hasta la actividad biológica de los extractos de corteza, raíz y hoja de esta planta sobre bacterias de importancia clínica y sobre dos especies de levaduras.

Este trabajo se desarrolló en dos etapas principales: (i) La primera etapa se centró en la obtención y preparación de los extractos, para garantizar la extracción de compuestos bioactivos. Para comprender mejor el potencial antimicrobiano de los extractos, se realizó un análisis químico, evaluando la concentración de compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante de las muestras. Estos compuestos se han relacionado con la actividad antimicrobiana de las plantas medicinales (Manso et al., 2021), permitiéndonos tener un screening general de los posibles compuestos activos. (ii) La segunda etapa del estudio consistió en la evaluación de la actividad biológica de los extractos, realizando pruebas de actividad antimicrobiana *in vitro* de *X. undipes* contra 7 cepas de bacterias gram positivas, 5 gram negativas y dos cepas de levaduras, todas de importancia clínica. Por último, se efectuó un ensayo de letalidad utilizando un modelo *in vivo* de crustáceos (*Artemia salina*) como análisis preliminar de la toxicidad del extracto en eucariotas.

Se espera que este estudio proporcione información valiosa sobre los potenciales efectos antimicrobianos del extracto de *X. undipes*, contribuyendo a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas que nos equipen para la “guerra de armas” que tiene la humanidad contra los patógenos multirresistentes.

METODOLOGÍA

Colecta e identificación del material vegetal

Se colectó las muestras frescas de *Xanthosoma undipes* en la zona de Nanegalito, provincia de Pichincha en febrero del 2024 bajo el permiso de investigación código MAATE-ARSFC-2023-0077 emitido por el Ministerio del Ambiente Agua y Transición Ecológica (MAATE). El espécimen se identificó por especialistas del Herbario de Botánica Económica (QUSF) de la Universidad San Francisco de Quito y se almacenó una muestra en el herbario con váucher 35006 y guía de movilización 02075.

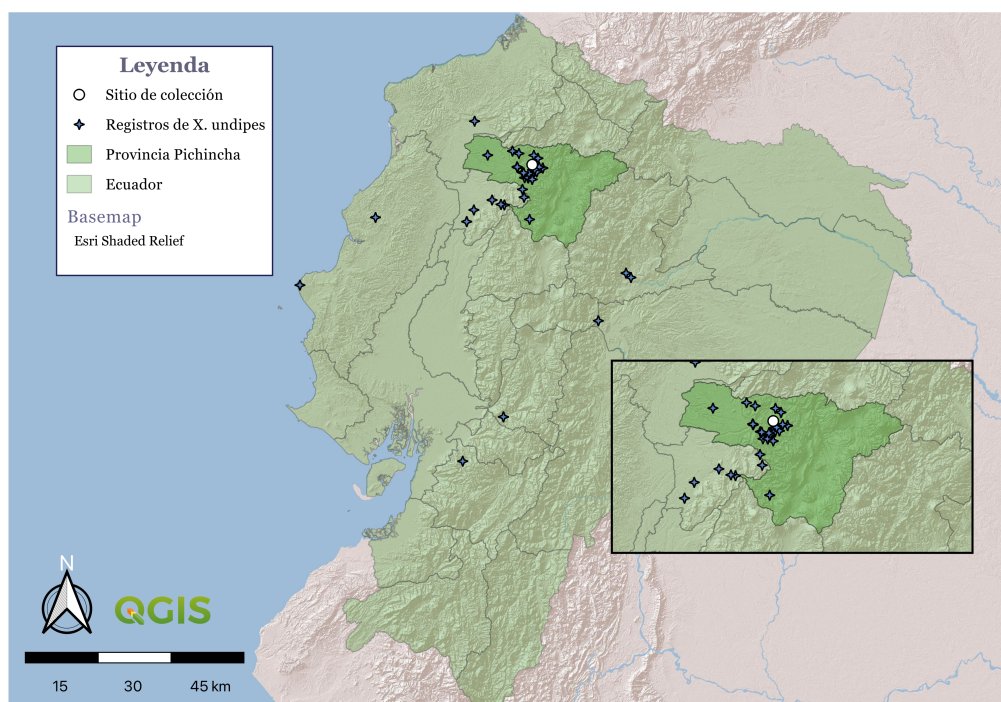


Figura 1. Mapa del sitio de colección y de los registros de *Xanthosoma undipes* en el Ecuador.

Procesamiento de la muestra vegetal

Se separó la planta en corteza, raíz y hoja. Al finalizar la separación por partes constitutivas, cada tejido vegetal se cortó en trozos pequeños, se pesó y se almacenó a -20° C. Se envió las

muestras a liofilizar en intervalos de 24 a 38 horas, dependiendo del tipo de muestra. Se recomienda colocarlas en los platos, dentro de la cámara de liofilizado para mejorar la eficiencia. Se utilizó un liofilizador (ZZKD[®] Intrument Equipment, China) configurado al estándar del laboratorio de alimentos. Una vez liofilizadas, las muestras se pesó y se molió hasta alcanzar una consistencia de polvo fino en un molino de café (Black+Decker[®]). En el caso de la corteza, dada la cantidad de filamentos, se hizo una primera molido en una licuadora (Licuadora Oster[®]) y una segunda en el molino, para alcanzar la consistencia deseada. Así mismo se obtuvo el peso final en polvo para calcular el rendimiento y determinar el porcentaje de pérdida en agua (Tabla 1.).

Tabla 1. Cambios en el peso y pérdida de agua de *X. undipes* durante el procesamiento de las muestras

Parte constitutiva	Peso en fresco (g)	Peso en seco (g)	Peso en polvo (g)	Porcentaje perdido en agua (%)
Corteza	1039.96	144.72	135.45	86.08
Hojas	505.87	70.92	70.17	85.98
Raíz	199.70	13.07	12.96	93.46

Preparación de extractos

Se realizó una extracción metanólica a una proporción de 1 gramo de muestra en polvo por cada 20 mililitros de metanol al 99.9% (1g/20ml). Se colocó el extracto en botellas ámbar (con tapa) y se dejó en un Orbital shaker JOANLAB[®] a 140 rpm por 12 horas. Posteriormente, se procedió a centrifugar las muestras en una centrífuga DLAB[®] a 4000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante se filtró a través de papel filtro Macherey-Nagel[®] MN 615 (tomando en cuenta cambiar el filtro al momento de saturarse). Del líquido centrifugado y filtrado se tomó 10 ml de cada extracto para la caracterización fitoquímica y se almacenaron a 4°C en frascos ámbar.

El resto se rotavaporó al vacío, en baño maría a 45°C y rotando a 80 rpm. El balón se removió al quedar 100 ml del material, se trasvasó a un vaso de precipitado y se lo colocó en un horno termostático eléctrico REBELK® a 45°C. Las muestras se secaron en el horno hasta que el metanol se evaporó por completo.

Una vez seco, se procedió a raspar el material en la base del vaso con una espátula pequeña, colocando el extracto puro obtenido en tubos Eppendorf de 2ml. Se pesó el material y se almacenó a 4°C, cubriendo los tubos con papel aluminio. La cantidad final del extracto puro se encuentra especificada en la Tabla 2.

Tabla 2. Peso final del extracto puro y seco de *Xanthosoma undipes*

Parte constitutiva	Peso final (g)
Corteza	3.821
Hojas	3.012
Raíz	1.607

Caracterización fitoquímica del extracto crudo

Se siguió los protocolos establecidos por el laboratorio de investigación de ingeniería en alimentos para determinar los fenoles totales, la actividad antioxidante y los flavonoides totales. Para este análisis se utilizó los 10 ml de extractos metanólicos que se almacenaron a 4°C, previo a rotavaporar.

Método Folin- Ciocalteu

Se siguió el protocolo establecido por Moreno-Escamilla et al., 2015 para cuantificar los polifenoles totales de los extractos de este estudio, con ligeras adaptaciones. Se comenzó con

la preparación de los estándares, estos consisten en Ácido gálico a distintas concentraciones, desde 3 mM (estándar 1) hasta 0.1875 mM (estándar 11). Se mezcló 100 μ l de cada estándar con 500 μ l del reactivo Folin (FC, 0.02 N). Luego se procedió a incubar la muestra a temperatura ambiente por 5 minutos. Pasado el tiempo de espera, se colocó 400 μ l de solución de carbonato de sodio (75g/L) y se almacenó en la oscuridad por dos horas a temperatura ambiente. Así mismo se preparó un blanco con 100 μ l de agua destilada, 500 μ l del reactivo FC y 400 μ l de carbonato de sodio. Pasado el tiempo de incubación se midió la absorbancia de los estándares a 760 nm en un espectrofotómetro contra el blanco obtenido. Cabe mencionar que se utilizó un espectrofotómetro para muestras de 1 ml con lectura en una cubeta de cuarzo.

Se anotó estos valores y se construyó una curva de calibración de ácido gálico; trazando una curva de la absorbancia de este compuesto fenólico a las distintas concentraciones conocidas. Esta sirve como un punto de comparación para determinar la cantidad de fenoles en el extracto.

En primer lugar, se determinó la dilución correspondiente; esto para que los valores entren dentro de la curva de calibración. Se repite el procedimiento anterior con las muestras obtenidas: se preparó 100 μ l de cada extracto, se añadió 500 μ l del reactivo FC, se esperó 5 minutos, se añadió 400 μ l de carbonato de sodio, se esperó dos horas almacenando en la oscuridad y, por último, se midió la absorbancia a 760 nm en el espectrofotómetro contra el blanco obtenido. Los resultados se ingresaron en la ecuación de la curva de calibración obtenida ($y = 1.63x + 0.0168$) y se despejó la variable x para determinar el contenido fenólico en mM. Las mediciones se realizaron por triplicado.

Método Flavonoides

Se determinó el contenido total de flavonoides mediante el método descrito por Moreno-Escamilla et al., 2015 con ligeras adaptaciones. Se comenzó con la preparación de los estándares, estos consisten en Catequina hidratada a distintas concentraciones, desde 1 mM (estándar 1) hasta 0.0625 mM (estándar 7). Se inició agregando 160 μ l de cada estándar en un tubo eppendorf y añadiendo 800 μ l de agua destilada. A esto se le añadió 48 μ l de una solución de Nitrito de sodio (NaNO_2) al 5% y se incubó por 6 minutos. Pasado el tiempo se añadieron 96 μ l de una solución de Cloruro de aluminio hexahidratado (2 g $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 10% de metanol) y se incubó por 5 minutos. Por último, se añadieron 320 μ l de Nitrito de sodio (NaNO_2 1M) y 176 μ l de agua destilada y se incubó la muestra en la oscuridad por 10 minutos. De la misma manera se preparó un blanco reemplazando las muestras con 160 μ l de agua destilada. Finalmente, se midió la absorbancia de los estándares en un espectrofotómetro a 510 nm contra el blanco generado. Se utilizó un espectrofotómetro para muestras de 1 ml con lectura en una cubeta de cuarzo.

Se anotó estos valores y se construyó una curva de calibración de Catequina; trazando una curva de la absorbancia de este compuesto a distintas concentraciones conocidas. Esta curva sirve como un punto de comparación para determinar la cantidad de flavonoides en el extracto.

En primer lugar, se determinó la dilución correspondiente; esto para que los valores entren dentro de la curva de calibración. Se repitió el procedimiento anterior con las muestras obtenidas: se preparó 160 μ l de cada extracto, se añadió 800 μ l de agua destilada y 48 μ l de la solución de NaNO_2 al 5% y se incubó por 6 minutos. Pasado el tiempo se añadió 96 μ l de la solución $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y se incubó por 5 minutos. Por último, se añadió 320 μ l de NaNO_2 (1M)

y 176 µl de agua destilada. Se incubó la muestra en la oscuridad por 10 minutos y se midió la absorbancia de las muestras a 510 nm contra el blanco generado. Los resultados se ingresaron en la ecuación de la curva de calibración obtenida ($y = 0.8951x + 0.0016$) y se despejó la variable x para determinar el contenido de flavonoides en µM. Las mediciones se realizaron por triplicado.

Método FRAP

Para evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos se realizó un ensayo de *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP). Este ensayo permite medir la capacidad de reducir iones férricos de los antioxidantes (no enzimáticos) en la muestra (Benítez-Estrada et al., 2020). Se comenzó con la preparación de los estándares, estos consisten en una solución Trolox a distintas concentraciones, desde 5000 µM (estándar 1) hasta 12.5 µM (estándar 10). Luego se preparó la solución FRAP; se utilizó 10 partes de una solución de acetato de sodio trihidratado (300 mM), 1 parte de solución de TPTZ (10 mM disueltos en 40 mM de HCl) y 1 parte de solución de cloruro férrico hexahidratado (20 mM). Para determinar la curva de calibración se agregó 900 µl de la solución FRAP en 100 µl de cada solución estándar, luego se preparó el blanco colocando 900 µl de la solución FRAP en 100 µl de agua destilada y se midió la absorbancia a 539 nm en un espectrofotómetro contra el blanco obtenido. Se utilizó un espectrofotómetro para muestras de 1 ml con lectura en una cubeta de cuarzo.

Se anotó estos valores y se construyó una curva de calibración Trolox; trazando una curva de la absorbancia a las distintas concentraciones conocidas. Esta sirve como un punto de comparación para determinar la capacidad antioxidante del extracto.

Para los extractos, en primer lugar, se determinó la dilución correspondiente; esto con el objetivo de que los valores entren dentro de la curva de calibración. Se repitió el procedimiento anterior con las muestras obtenidas: se prepararon 100 µl de cada extracto, se añadió 900 µl de la solución FRAP y se midió la absorbancia a 539 nm en el espectrofotómetro contra el blanco obtenido. Los resultados se ingresaron en la ecuación de la curva de calibración obtenida ($y = 0.0028x + 0.0232$) y se despejó la variable x para determinar la capacidad antioxidante (mM). Las mediciones se realizaron por triplicado.

Microrganismos: cepas, reactivación y mantenimiento

Para este estudio se trabajó con siete cepas de bacterias Gram (+): *Staphylococcus aureus* MRSA (INSPI 37), *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* (INSPI 32), *Enterococcus faecium* (INSPI 12), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; cinco cepas de bacterias Gram (-): *Pseudomonas aeruginosa* (INSPI 36), *Escherichia coli* BLEE, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y dos especies de levaduras: *Candida albicans* y *Candida tropicalis*. Las cepas de referencia ATCC se obtuvieron del American Type Culture Collection. Las cepas con el denominador INSPI son muestras clínicas obtenidas y caracterizadas por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública del Ecuador. Por último, aquellas cepas sin denominador son muestras clínicas obtenidas y clasificadas por el Instituto de Microbiología de la USFQ (LABOMIC).

Las cepas de bacterias y levaduras se reactivaron en agar nutritivo y se incubaron a 37°C por 24 horas, para asegurar que se encuentren en fase logarítmica. Se crioconservaron las cepas en un medio de Skim milk + Glicerol a -20°C. Las cepas eran reactivadas 24 h previo a cada ensayo a realizar.

Análisis de la actividad antimicrobiana

Preparación de dilución madre (Stock)

Se preparó una dilución madre de los extractos a una concentración de 1 g/ml. Se utilizó DMSO (dimetilsulfóxido) al 50%, debido a que los extractos no se disuelven uniformemente en agua destilada. Específicamente, el extracto de hoja se precipita al hacer contacto con agua, por lo que la dilución madre se tuvo que preparar con DMSO puro. Para la solución de DMSO al 50% se utilizó agua destilada estéril como solvente. En cada sección se detalla el proceso de dilución para cada ensayo biológico.

Preparación de las diluciones experimentales

Para los ensayos de difusión por disco y difusión en agar, las diluciones del extracto se prepararon a partir de la solución madre (1g/ml), utilizando agua destilada estéril como solvente. En el caso de la raíz y la corteza la solución fue homogénea; pero en el caso de la hoja se formaron precipitados al hacer contacto con el agua. Se sospecha que la cantidad de aceites en el extracto imposibilitan su dilución en agua, por lo que se trabajó con DMSO al 80% y se utilizó DMSO puro como control en los ensayos para determinar si tiene un efecto en el crecimiento microbiano. Así mismo en estos ensayos piloto se optó por trabajar con concentraciones altas del extracto, con el objetivo de aumentar la probabilidad de detectar actividad, minimizando la posibilidad de pasar por alto un efecto inhibitorio, especialmente tomando en consideración que se está trabajando con el extracto crudo. Todas las diluciones se prepararon en una cámara de Bioseguridad.

Para el ensayo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la mínima letal (CLM) se procuró mantener los niveles de DMSO por debajo del 10%, iniciando con una dilución de 100 mg/ml como se detalla en la Tabla 3. Para este ensayo el solvente fue el caldo Muller Hinton.

Cabe mencionar que se observó la formación de pequeños precipitados en las diluciones, por lo cual se tuvo que vortexear y agitar las muestras.

Ensayo de dispersión por disco - Kirby Bauer (KB)

Se realizó un ensayo piloto de los extractos vegetales para evaluar su actividad antibacteriana utilizando el método de difusión por disco descrito por Hudzicki, 2009. Se adaptaron ciertos aspectos del protocolo para ajustarlos al laboratorio y los materiales disponibles, siguiendo los estándares descritos en el manual M100 del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para la implementación de ensayos de susceptibilidad antimicrobiana (Weinstein, 2021).

Los discos en blanco (7mm de diámetro) se dividieron en distintas cajas Petri y se cargaron en una cabina de bioseguridad con 20 μ l del extracto en su máxima concentración (500mg/ml), 20 μ l del extracto a una concentración intermedia (200mg/ml) y 20 μ l del solvente puro (DMSO). Los discos cargados se dejaron en oscuridad secando por 24h hasta el momento del ensayo. Como control positivo se utilizaron discos de antibiótico estándares BBL™.

Así mismo, las cepas se reactivaron el día anterior al ensayo para asegurar que se encuentren en fase logarítmica. Para preparar la suspensión McFarland al estándar 0.5 se tomó con un hisopo estéril entre 1-5 colonias aisladas, se suspendió el inóculo en 4ml de solución salina, se utilizó un vórtex para homogenizar la solución y haciendo uso del estándar y la carta Wickerham se ajustó la turbidez. En caso de no alcanzar la turbidez requerida se tomó otro inóculo hasta alcanzar el estándar. En caso de sobrepasar la turbidez se repitió en un tubo nuevo. Una vez obtenida la suspensión, se sembró en una caja Petri (100x15mm) cubriendo

toda la superficie de la caja uniformemente. Una vez terminada la siembra se dejó reposar 15 minutos antes de colocar los discos.

Pasados los 15 min se colocaron 5 discos en la caja con una pinza estéril. Los discos se colocaron de acuerdo con el esquema presentado en la Figura 2, en el siguiente orden: Blanco, DMSO, extracto cc 200, extracto cc 500 y, por último, el antibiótico. La pinza se flameó con alcohol al 96% antes de colocar cualquier disco. De igual manera se desinfectó la tapa luego de colocar cada disco para evitar contaminación. Se trabajó en un ambiente estéril. Una vez colocados los discos se incubó las cajas a 37°C por 24h.

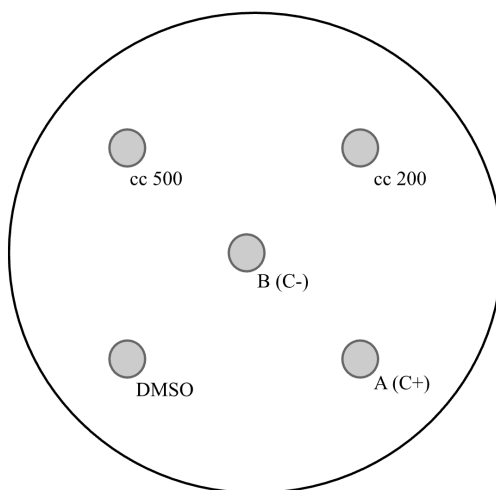


Figura 2. Esquema de ubicación de los discos. Ensayo piloto Kirby Bauer.

Se colocaron 5 discos: máxima concentración 500mg/ml (cc500), dilución 200 mg/ml (cc200), blanco-control negativo (B (C-)), solvente (DMSO) y antibiótico-control positivo (A (C+)).

Terminado el tiempo de incubación se revisaron los resultados, midiendo los halos de inhibición con un calibrador digital, se determinó si el extracto tuvo actividad inhibitoria y se determinó si las cepas presentaban resistencia a los antibióticos empleados.

Ensayo de difusión en agar (DA)

Para evaluar la actividad de los extractos contra las levaduras se empleó el método de difusión por pocillo en agar descrito por Jiru & Getahun, 2023. Las suspensiones de las levaduras se prepararon en solución salina estéril y se ajustaron al estándar de 0.5 McFarland. Se añadió un pequeño volumen (20 μ l) de la suspensión a cada placa de agar Sabouraud dextrosa (SDA) y se distribuyó uniformemente con un asa de vidrio estéril sobre la superficie del agar. Se realizaron pocillos en el agar utilizando un sacabocados esterilizado de 6 mm de diámetro. Los pocillos, de 2 mm de profundidad, se colocaron a aproximadamente 2,5 cm de separación para minimizar la superposición de zonas de inhibición. El dimetilsulfóxido (DMSO) se utilizó como control negativo, mientras que el voriconazol se empleó como control positivo. Así mismo se probó la susceptibilidad de los organismos contra la Anfotericina B para determinar si las muestras clínicas presentan resistencia.

Se sembró 50 μ l por pocillo de acuerdo con el esquema presentado en la Figura 3. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 48h. Cabe mencionar que las cajas se sellaron con Parafilm y se envolvieron en papel aluminio durante el periodo de incubación. Se tomaron resultados tanto en el día 2 como el 5, se utilizó una regla para determinar el diámetro de los halos.

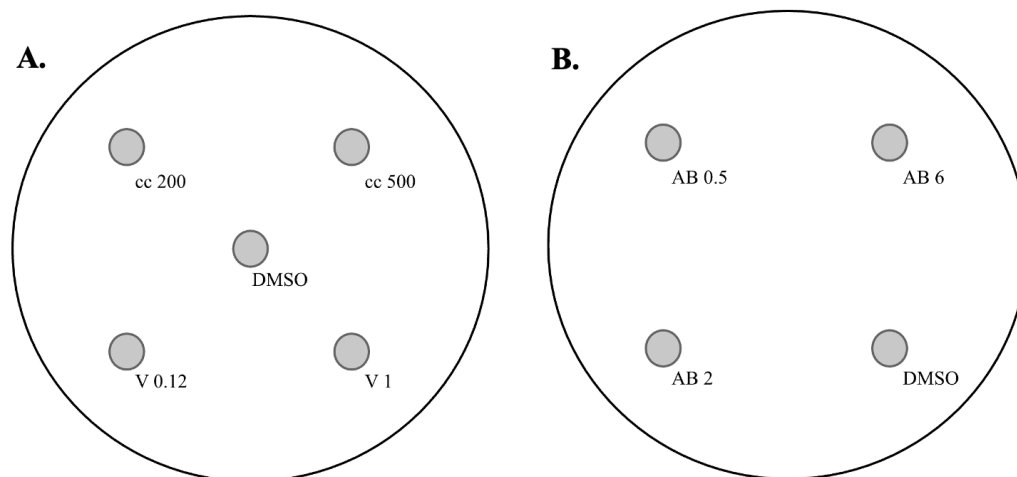


Figura 3. Esquema de ubicación de los discos. Ensayo de difusión en agar.

A. Se realizaron 5 pocillos: máxima concentración 500mg/ml (cc500), dilución 200 mg/ml (cc200), solvente (DMSO), Voriconazol concentración 0.12 $\mu\text{g/ml}$ y Voriconazol concentración 1 $\mu\text{g/ml}$ **B.** Se realizaron 4 pocillos: Anfotericina B concentración 0.5 $\mu\text{g/ml}$, Anfotericina B concentración 6 $\mu\text{g/ml}$, Anfotericina B concentración 2 $\mu\text{g/ml}$ y solvente (DMSO).

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se determinó la concentración mínima inhibitoria de acuerdo con el protocolo descrito por Wiegand et al., 2008. Este método se realizó solo con las bacterias en las que se observó actividad inhibitoria en el ensayo piloto. Se inició reactivando las cepas de 18-24h antes al día del ensayo, para asegurar de que se encuentren en fase logarítmica. Luego se procedió a seleccionar de tres a cinco colonias aisladas con un hisopo y a colocarlas en un tubo estéril con solución salina. Luego de vortexear, se ajustó la turbidez al estándar McFarland 0.5. Desde su elaboración, no se utilizó más allá de los primeros 30 min. Si se superaba este límite, se vuelve a preparar la suspensión.

En cuanto a las diluciones del material antimicrobiano, para los extractos se realizaron las diluciones detalladas en la Tabla 3 comenzando desde la solución madre, hasta alcanzar la concentración mínima deseada. Por otro lado, para los antibióticos que cumplen la función de control positivo, se utilizaron las diluciones indicadas en el manual M100 del CLSI para la implementación de ensayos de susceptibilidad antimicrobiana (Weinstein, 2021), indicado en la Figura 4 (A). Como la cantidad del inóculo bacteriano es la misma que la solución antibiótica, se debe colocar la dilución al doble de su concentración para alcanzar la concentración final deseada. En cuanto a la suspensión con la bacteria, esta se debe diluir en un factor de 1:100 antes de colocarla en la placa para alcanzar el inóculo deseado de 5×10^5 cfu ml^{-1} .

Tabla 3. Esquema para la preparación de las diluciones de los extractos para el ensayo de la CMI.

Paso	Dilución			Concentración alcanzada (mg/ml)	Concentración final en el ensayo (mg/ml)
	Concentración inicial del extracto (mg/ml)	Volumen del extracto (μl) +	Volumen del caldo estéril (μl) =		
1	200	400	-	200	100
2	100	400	400	100	50
3	50	400	400	50	25
4	25	400	400	25	12.5
5	12.5	400	400	12.5	6.25
6	6.25	400	400	6.25	3.125
7	3.125	400	400	3.125	1.5625
8	1.5625	400	400	1.5625	0.78125
9	0.78125	400	400	0.78125	0.390625

*Elaborado en referencia a Wiegand (2008). Se modificaron las diluciones en base a las muestras de este estudio.

Una vez obtenidas las diluciones, se rotularon las placas y se procedió a pipetear de acuerdo con los esquemas presentados en la Figura 4. Se comenzó añadiendo 100 μl de caldo MH en el pocillo de control de esterilidad (SC) y 50 μl de caldo MH en el pocillo de control de crecimiento (GC). Luego se añadieron 50 μl de cada dilución del material antimicrobiano (en

base al esquema) en los distintos pocillos. Finalmente se inocularon los pocillos con la solución antimicrobiana y el pocillo GC con 50 μ l de la suspensión bacteriana. Se incubaron las placas a 37°C entre 16-20 h. Se trabajó en réplica por triplicado.

A VANCOMICINA

		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
1	A	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	GC	SC
	B	0.5	0.25	0.125	μ g/ml								
2	C	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	GC	SC
	D	0.5	0.25	0.125	μ g/ml								
3	E	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	GC	SC
	F	0.5	0.25	0.125	μ g/ml								
BLANCOS	G	512B	256B	128B	64B	32B	16B	8B	4B	2B	1B		
	H	0.5B	0.25B	0.125B	μ g/ml								

B EXTRACTOS

		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
CORTEZA	A	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.7813	0.3906		GC	SC
	B	100B	50B	25B	12.5B	6.25B	3.125B	1.5625B	0.7813B	0.3906B	mg/ml		GC
CORTEZA	C	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.7813	0.3906		GC	SC
	D	100B	50B	25B	12.5B	6.25B	3.125B	1.5625B	0.7813B	0.3906B	mg/ml		GC
RAÍZ	E	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.7813	0.3906		GC	SC
	F	100B	50B	25B	12.5B	6.25B	3.125B	1.5625B	0.7813B	0.3906B	mg/ml		GC
BLANCOS	G	100	50	25	12.5	6.25	3.125	1.5625	0.7813	0.3906		GC	SC
	H	100B	50B	25B	12.5B	6.25B	3.125B	1.5625B	0.7813B	0.3906B	mg/ml		GC

Figura 4. Esquema del diseño de la placa para el ensayo de concentración mínima inhibitoria

A: Se tomó la vancomicina como ejemplo de un antibiótico control y se distribuyó el ensayo por triplicado, utilizando las diluciones recomendadas por el manual M100 del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **B:** En el caso de los extractos se distribuyó en dos partes constitutivas por placa, en réplica, por triplicado; comenzando

con una concentración máxima X de 100 mg/ml y realizando las siguientes diluciones -> X/2, X/4, X/8, X/16, X/32, X/64, X/128, X/256, X/512. En ambas placas las columnas 11 y 12 representan el Control de Crecimiento (GC) y el Control de Esterilidad (SC).

Como control de calidad se tomaron 10 μ l del pocillo GC inmediatamente luego de inocular con la suspensión bacteriana y se colocaron en un tubo Eppendorf estéril con 990 μ l de caldo MH. Se mezcló con un vórtex y se realizó una última dilución 1:10 pipeteando 100 μ l de la primera solución y colocándolos en 900 μ l de caldo MH. Se sembró 100 μ l de ambas diluciones en placas de Agar MH y se incubó a 37°C entre 16-20 h.

Terminada la incubación, se agitaron las placas hasta que los pocillos alcanzaron una mezcla homogénea, evitando la formación de precipitados en la base de la placa. Finalmente se midió la absorbancia a 3 longitudes de onda distintas, dos sugeridas por la literatura y una intermedia (McBirney et al., 2016). Se trabajó con 446nm, 510 nm y 570 nm. Se compararon los valores para determinar la longitud de onda óptima para reducir el ruido y no subestimar el crecimiento bacteriano.

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto se consideró como CMI a la concentración más baja del extracto que tuvo una densidad óptica equivalente a la de su respectivo Blanco (extracto + MH sin inocular). Esto indica que, a esa concentración, el extracto inhibió el crecimiento bacteriano visible (Eve et al., 2020).

Determinación de la Concentración Letal Mínima (CLM)

Se determinó la Concentración Letal Mínima (CLM) sembrando en placas de Agar MH un inóculo por cada pocillo de la placa analizada para la CMI. Se tomó a la dosis letal como aquella a la que no se observa ningún tipo de crecimiento en placa, anotando el valor para el cual hubo una inhibición del crecimiento bacteriano de un 100% (Becker & Gratwicke, 2017). Se sembró con un asa de estriado calibrada a 1 µl en placas de Agar MH. La siembra se realizó por el método de agotamiento cuantitativo (Oplustil, 2022). Se incubó por 24 horas a 37°C y se observó el crecimiento. Se determinó la CLM al observar una reducción del 100% del crecimiento bacteriano. Cabe mencionar, que para la siembra se utilizaron asas estándar estériles para facilitar la cuenta de UFC. Así mismo se sembraron los blancos para determinar que no exista contaminación en la placa.

Ensayo de letalidad en *Artemia salina*

Se realizó un ensayo de toxicidad en base a la metodología descrita por Carballo et al., 2002, este protocolo está recomendado como un análisis preliminar para determinar la toxicidad de los extractos de plantas. Consiste en un ensayo de letalidad en *Artemia salina*, un crustáceo braquiópodo que puede mantenerse en condiciones de laboratorio. Se inició por preparar el ambiente adecuado para la eclosión de los huevos de *Artemia salina*. Se preparó la solución de agua/sal, colocando 38 g de sal en grano en un litro de agua; esta se colocó en baño maría a 30°C con una manguera, una bomba de aire para generar burbujas y una fuente de luz constante. Una vez preparado el ambiente se colocaron 50 mg de huevos de *Artemia salina* y se incubó por 24 h. Al día siguiente se realizó el ensayo de letalidad con los extractos obtenidos.

Para preparar el ensayo se colocaron 10 individuos de *Artemia salina* por pocillo, como se muestra en el esquema de la Figura 5. En cada pocillo se colocaron 2 ml de agua sal y 2ml del extracto por triplicado. Se trabajó con la concentración mínima inhibitoria y la concentración letal obtenidas. El control negativo consistió en 2 ml de agua sal y 2 ml de agua destilada; y el control positivo de 2ml de aguasal, 1 ml de agua destilada y 1 ml de cloro al 1%. Las muestras se dejaron en incubación por 12h- 24h- 48h con una fuente de luz constante. Transcurrido el tiempo se observaron los pocillos bajo un estereomicroscopio y se clasificó los individuos de *Artemia salina* en dos categorías en base a la motilidad del organismo: Vivo- Muerto. Cabe mencionar que aquellos individuos que presentaron movilidad reducida se los clasificó como vivos, mientras que aquellos que no presentaron movilidad alguna luego de 1 minuto de observación se clasificaron como muertos. Se registraron los resultados y se determinó el porcentaje de letalidad.

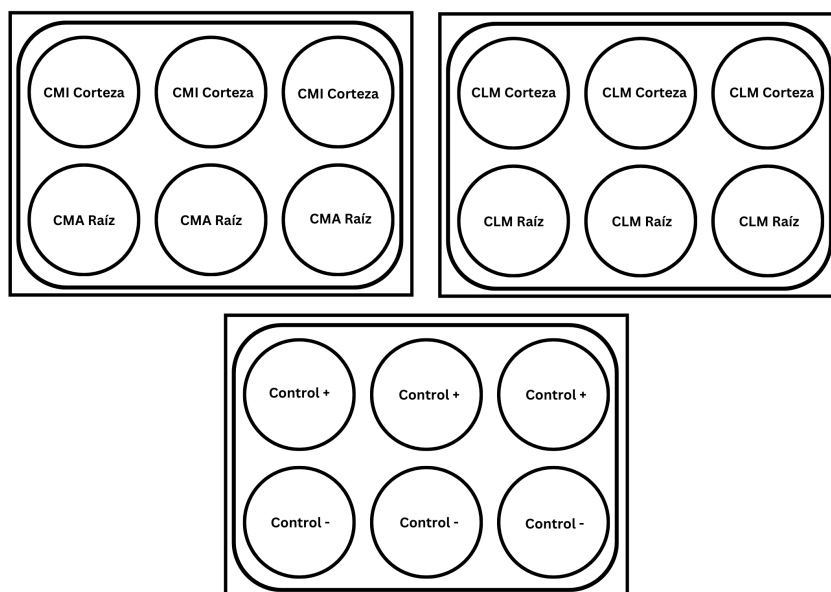


Figura 5. Esquema del ensayo de letalidad en *Artemia salina*.

Se utilizaron 3 placas de seis pocillos estériles, se colocaron 10 individuos de *Artemia salina* por pocillo y se trabajó por triplicado con la concentración mínima inhibitoria (corteza), la mínima analizada (raíz) y la mínima letal (corteza y raíz).

Análisis estadístico

Tanto los análisis estadísticos como los gráficos obtenidos se realizaron en el software R, haciendo uso de los paquetes de ggplot2, ggpubr, cowplot, dplyr y R de base. Mientras que la limpieza de la base de datos crudos se realizó en la plataforma de Excel. Se trabajó siempre por triplicados.

Para la caracterización química del extracto se utilizó estadística descriptiva para determinar la media y el error estándar de cada medición por triplicado. Luego, se realizó un ANOVA multifactorial y una prueba post-hoc de Tukey para determinar las diferencias entre tejidos en cada uno de los análisis químicos (polifenoles totales, flavonoides, FRAP).

Se utilizó la regresión LOESS (Locally Estimated Scatterplot Smoothing) para analizar los datos de absorbancia obtenidos en el ensayo de la CMI. El uso de LOESS es eficaz para el manejo de datos con ruido, suavizando las tendencias sin sobre ajustar el modelo. Este gráfico permite visualizar y revelar tendencias subyacentes en los datos sirviendo de apoyo estadístico para corroborar los resultados de la CMI. Se graficó la absorbancia con relación a factores como la concentración, la longitud de onda y el tejido. Para determinar la CMI se empleó un ANOVA de dos vías para encontrar si existieron diferencias significativas entre los valores de absorbancia de las muestras en blanco y las inoculadas. Se determinó el efecto de las longitudes de onda en los valores de absorbancia. Se trabajó con un valor p de significancia de ≤ 0.05 y

se complementó el análisis con una prueba post-hoc de Tukey para identificar grupos específicos con diferencias estadísticamente significativas.

De manera similar, se empleó un ANOVA multifactorial para analizar los datos obtenidos en el ensayo de letalidad en *Artemia salina*, determinando el efecto del tiempo de exposición, la concentración y el tejido en la letalidad de los crustáceos. Se trabajó con un valor p de significancia de ≤ 0.05 y se complementó el análisis con una prueba post-hoc de Tukey, permitiendo identificar grupos específicos con diferencias estadísticamente significativas sobre la letalidad.

Para los datos del ensayo piloto Kirby Bauer se utilizó estadística descriptiva para el análisis, específicamente se determinó el error estándar entre los triplicados y las medias.

RESULTADOS

Caracterización fitoquímica del extracto crudo

En la

Figura 6 se presentan en detalle los valores promedio más desviación estándar obtenidos de los ensayos de caracterización fitoquímica de los extractos metanólicos de la corteza, raíz y hoja de *X. undipes*. En el ensayo de flavonoides, el extracto de raíz precipitó al añadir el nitrito de sodio. La cantidad de precipitados no permitió medir la absorbancia dentro de la curva estándar.

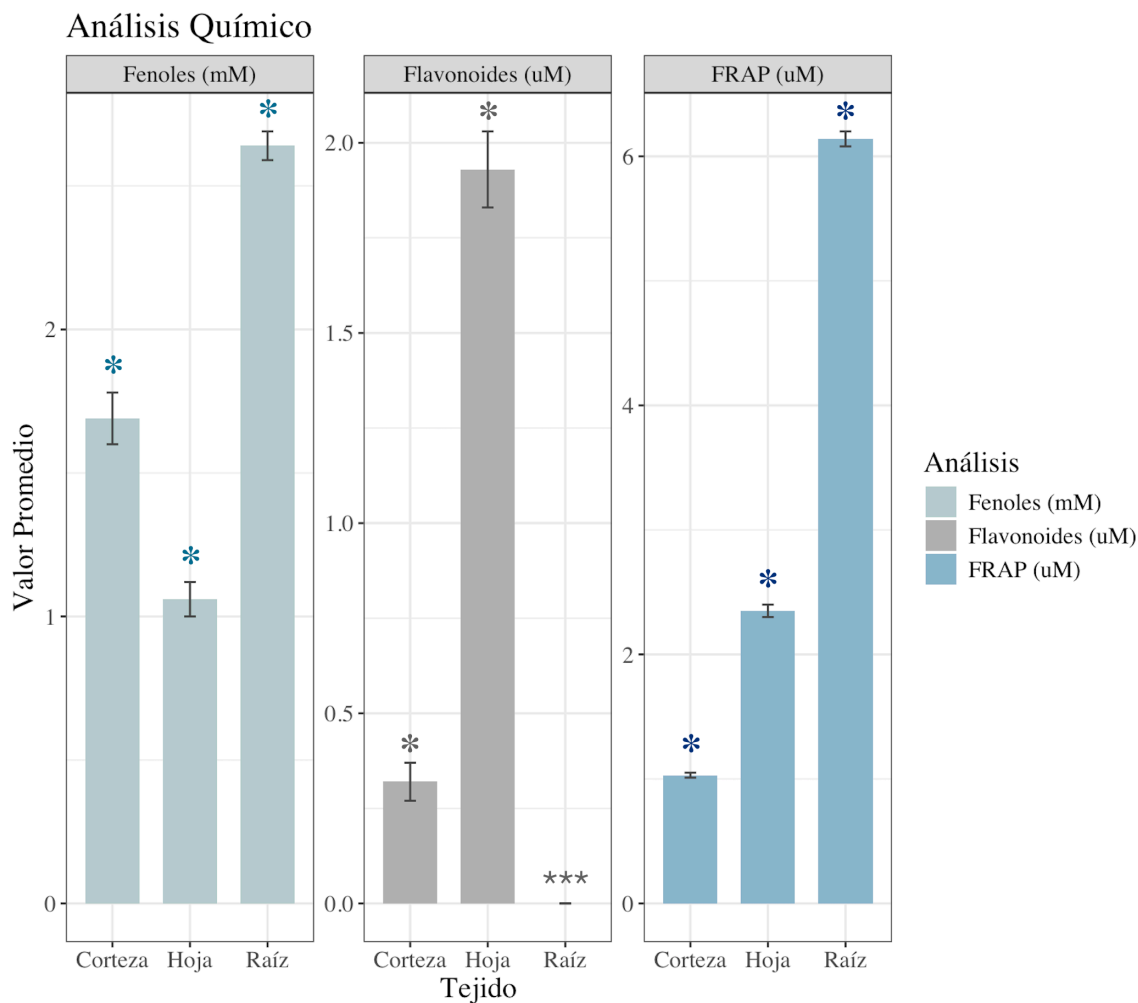


Figura 6. Resultados del análisis químico: Polifenoles totales, Flavonoides y Capacidad Antioxidante (FRAP).

Se encontraron los valores promedio y los errores estándar para polifenoles totales, flavonoides y FRAP en cada uno de los tejidos. En cuanto a polifenoles totales se encontraron diferencias significativas entre los tres tejidos ($p < 0.05$), representadas por un asterisco (*). La raíz presentó la mayor cantidad de polifenoles (2.64 ± 0.05 mM), seguida de la corteza (1.69 ± 0.09 mM) y por último la hoja (1.06 ± 0.06 mM). En cuanto a flavonoides se encontraron diferencias significativas entre los dos tejidos analizados ($p < 0.05^*$), siendo la hoja el tejido con mayor contenido de este fitoquímico (1.93 ± 0.1 μ M), en comparación con la corteza (0.32 ± 0.05 μ M). No se pudo obtener una lectura en el tejido de raíz dada la formación de precipitados

(***). Finalmente, en cuanto a FRAP se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05^*$) entre los tres tejidos. La raíz presentó la mayor capacidad antioxidante (6.14 ± 0.06 mM), seguida de la hoja (2.35 ± 0.05 mM) y por último la corteza (1.03 ± 0.02 mM).

Ensayo de dispersión por disco (Kirby Bauer)

En la Tabla 4. se encuentran los resultados del ensayo piloto Kirby Bauer. Se encontró que los extractos metanólicos de la raíz y la corteza a concentraciones de 200 y 500 mg/ml presentaron zonas de inhibición para dos de las cepas analizadas: *Staphylococcus aureus* MRSA (INSPI 37) y *Staphylococcus aureus* ATCC.

Tabla 4. Resultados dicotómicos del ensayo Kirby Bauer para los extractos analizados.

Microorganismos	Muestras					
	Corteza		Raíz		Hoja	
	cc200	cc500	cc200	cc500	cc200	cc500
Bacterias Gram (+)						
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (INSPI 37)	+	+	+	+	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Sptretococcus pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (INSPI 32)	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> (INSPI 12)	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	+	+	+	+	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC	-	-	-	-	-	-
Bacterias Gram (-)						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (INSPI 36)	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> BLEE	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	-	-	-	-	-	-

Se presentan los resultados donde se observó inhibición con un signo +, y aquellos donde no hubo con un -

Así mismo se identificó resistencia a los antibióticos en tres de las cepas estudiadas (Tabla 5.). Se presentan las medias por triplicado \pm el error estándar y las cepas con resistencia se indican con un asterisco (*).

Tabla 5. Halos de inhibición y resistencia de las cepas a los antibióticos control.

Microorganismo	Antibiótico			
	<i>Linezolid</i>	<i>Clindamicina</i>	<i>Imipenem</i>	<i>Penicilina</i>
Bacterias Gram (+)				
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (INSPI 37)	29.23 \pm 1.59	-	-	-
<i>Streptococcus pyogenes</i>	-	-	-	47.57 \pm 2.08
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	25.56 \pm 2.23	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> (INSPI 32)	24.44 \pm 0.97	-	-	-
<i>Enterococcus faecium</i> (INSPI 12)	24.86 \pm 2,31	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	28.02 \pm 1.42	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC	24.02 \pm 1.33	-	-	-
Bacterias Gram (-)				-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (INSPI 36)	-	-	8.50 \pm 0.36*	-
<i>Escherichia coli</i> BLEE	-	-	26.50 \pm 0.94	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	11.35 \pm 1.00*	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC	-	-	28.40 \pm 0.56	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC	-	-	17.74 \pm 2.04*	-

*Cepas que presentan resistencia al antibiótico control.

Por último, en la Tabla 6. se encuentra el detalle del diámetro de los halos de los ensayos por triplicado \pm el error estándar en las cepas donde hubo actividad. Se registra que el diámetro de los halos representa una actividad leve contra las bacterias analizadas.

Tabla 6. Halos de inhibición de los extractos analizados

Extracto crudo	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (INSPI 37)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC
Corteza cc500	11.28 \pm 0.75	10.69 \pm 0.95
Corteza cc200	8.61 \pm 0.20	8.52 \pm 0.32
Raíz cc500	11.32 \pm 0.43	12.22 \pm 1.48
Raíz cc200	9.18 \pm 0.24	10.92 \pm 1.75

Ensayo de difusión en agar

Los extractos no tuvieron ningún efecto inhibitorio sobre las levaduras. En cuanto a las cepas, se determinó que son susceptibles tanto al voriconazol como la anfotericina B.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Letal Mínima (CLM)

Se encontró la CMI para *Staphylococcus aureus* MRSA (INSPI 37) determinando las concentraciones con un valor de absorbancia significativo ($p \leq 0.05$) entre Blancos e Inoculados (Anexo A). Así mismo se determinó el porcentaje de crecimiento en base a la turbidez, utilizando los valores de absorbancia del control de crecimiento como control positivo del 100% (Anexo B). Mientras que para la concentración letal mínima se registró la concentración que mató al 100% de las bacterias. Estos resultados se presentan en la Tabla 7. Se observó que la raíz presentó mayor actividad inhibitoria que la corteza.

Tabla 7. Concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración letal mínima (CLM) del extracto metanólico de la Corteza y Raíz de *Xanthosoma undipes* contra una bacteria multirresistente.

Microorganismo analizado	Concentración mínima inhibitoria (CMI)		Concentración letal mínima (CLM)	
	Corteza	Raíz	Corteza	Raíz
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (INSPI 37)	0.78125 mg/ml	<0.390625 mg/ml	6.25 mg/ml	3.125 mg/ml.

Así mismo en la Figura 7. LOESS de la Actividad de *X. undipes* frente a *S. aureus* MRSA (INSPI 37). se presenta el modelo de regresión LOESS para la actividad de *Xanthosoma undipes* en base a las medidas de absorbancia tomadas durante el ensayo de CMI.

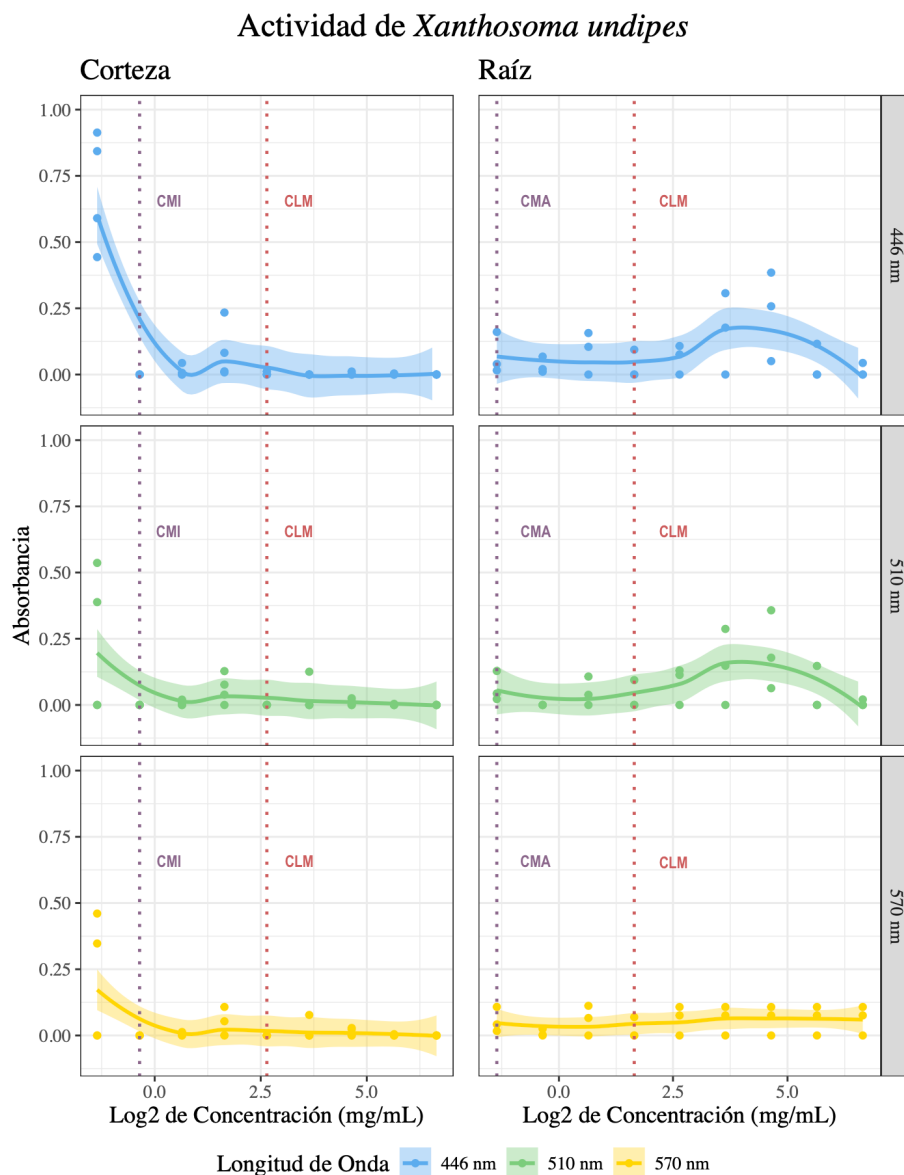


Figura 7. LOESS de la Actividad de *X. undipes* frente a *S. aureus* MRSA (INSPI 37).

Se presentan los valores de absorbancia y la curva de tendencia para tres longitudes de onda (446 nm, 510nm, 570 nm) en los dos tipos de tejido. El contorno de la línea representa la banda de confianza (95%); el ancho de las bandas indica el nivel de incertidumbre asociado con la curva suavizada, mientras que las líneas verticales punteadas representan la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la Concentración Letal Mínima (CLM) y la Concentración Mínima Analizada (CMA). Se realizó una

transformación logarítmica en base 2 de los datos de concentración, dado que se encontraban en dilución seriada $X/2$. Esto permitió visualizar mejor los datos.

El análisis reveló que la longitud de onda medida tiene un efecto significativo sobre los valores de absorbancia obtenidos a las mismas concentraciones ($p < 0.05$). Siendo 446 nm la longitud de onda más adecuada para cuantificar el crecimiento bacteriano, tal como lo evidenciaron McBirney et al., 2016. Sin embargo, esta longitud de onda también presenta mayor interferencia por parte de los pigmentos presentes en los extractos, especialmente en el tejido de raíz.

Por otro lado, a pesar de que a 570 nm se observa una menor tendencia hacia el crecimiento bacteriano, también se presenta la menor cantidad de ruido en los datos. Esta menor cantidad de ruido se atribuye al espectro de absorción de los pigmentos en las plantas (Kang et al., 2020). Debido a la menor cantidad de ruido y la menor interferencia por parte de los pigmentos, se optó por trabajar con las absorbancias obtenidas a 570 nm. De igual manera, se observaron diferencias significativas entre los tejidos ($p < 0.05$). En la corteza, se evidenció una tendencia al crecimiento a menores concentraciones del extracto, mientras que la raíz controló este crecimiento a la concentración mínima analizada. Esto se puede corroborar con lo obtenido en base al porcentaje de crecimiento bacteriano a distintas concentraciones del extracto en el ANEXO B.

Este análisis de regresión local sirvió como control de calidad y apoyo visual para observar la curva de crecimiento bacteriano en base a los valores de absorbancia.

Letalidad en *Artemia salina*

En cuanto al ensayo de letalidad en *Artemia salina* se obtuvieron los resultados detallados en la Figura 8.

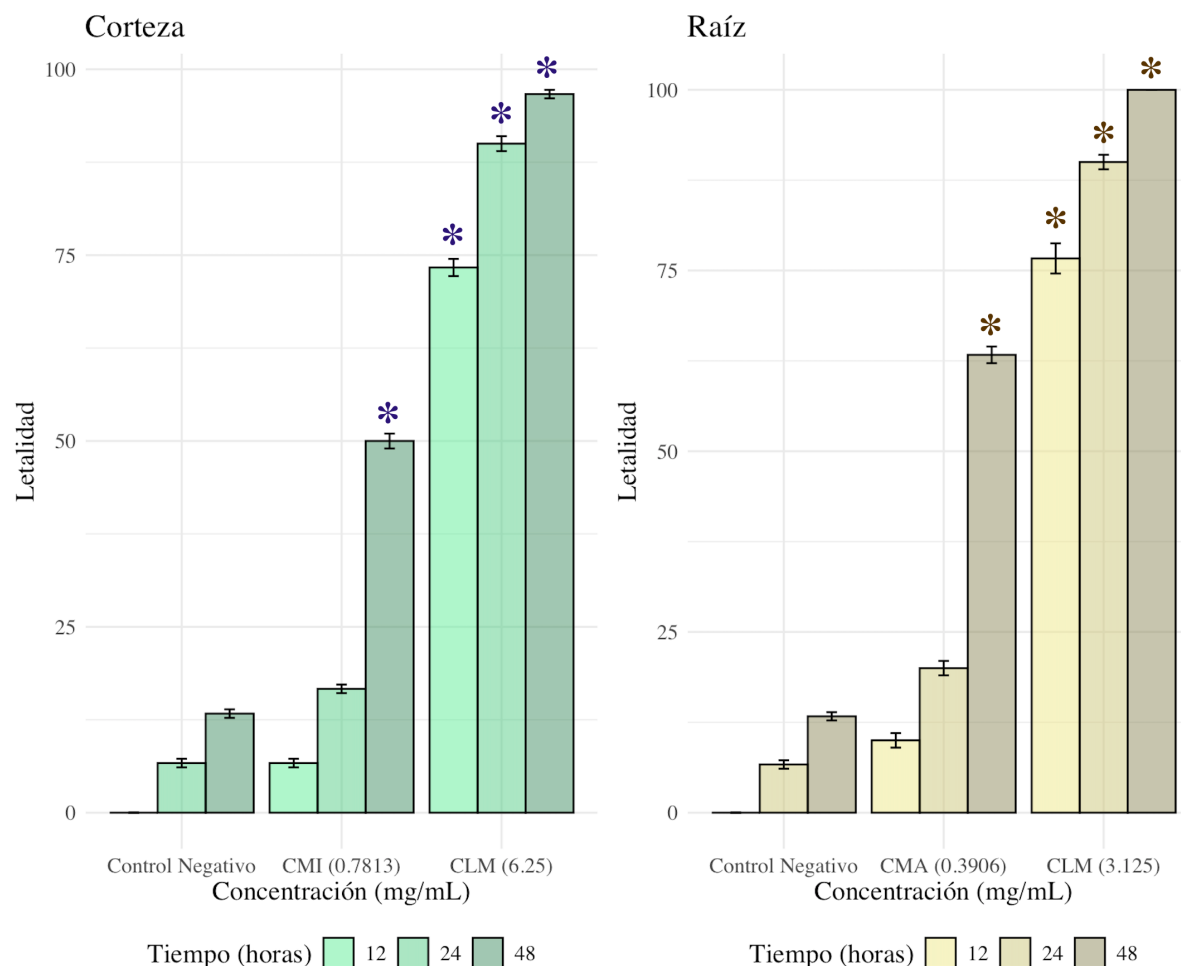


Figura 8. Porcentaje de letalidad del extracto en *Artemia salina* a lo largo del tiempo

Se encontraron diferencias significativas entre la CMA (raíz), la CLM (raíz) y la CLM (corteza) con el control negativo ($p < 0.05$). No obstante, no se encontraron diferencias significativas entre la CMI (corteza) y el control negativo ($p = 0.2306$). Por otro lado, se encontraron diferencias significativas en la letalidad entre ambos tejidos ($p = 0.0098$) y se encontró un efecto significativo del tiempo sobre la letalidad ($p = 2.78e-09$). Los asteriscos indican diferencias significativas entre cada hora analizada con el control ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Este estudio investigó la composición química y las propiedades antimicrobianas de los extractos de corteza, raíz y hoja de *Xanthosoma undipes*, una planta con potencial medicinal utilizada a nivel etnobotánico para tratar infecciones, heridas, malaria y diabetes (Windarsih et al., 2023). El análisis químico (Figura 6) reveló que el extracto de raíz presentó mayor cantidad de fenoles y mayor capacidad antioxidante que los extractos de corteza y hoja, no obstante, para este tejido no se pudo determinar los flavonoides totales. Los compuestos fenólicos son considerados antioxidantes naturales (Zeb, 2020), se les atribuye actividad antimicrobiana, anti-inflamatoria, anti-mutagénica, antialérgica e incluso anticancerígena (Singh et al., 2020). En cuanto a bacterias, los compuestos fenólicos han demostrado tener actividad frente a una amplia gama de especies de importancia clínica (Walsh et al., 2019) y sus mecanismos de acción suelen diferir de los presentes en antibióticos tradicionales (Takó et al., 2020). Esta relación se evidencia en los resultados del ensayo de Kirby Bauer (Tabla 6), CMI y CLM (Tabla 7), donde el extracto de raíz es también el que presenta mayor actividad, seguido por la corteza y por último la hoja. La ausencia de actividad en el extracto de hoja podría apuntar a que los flavonoides detectados no son necesariamente los protagonistas en el proceso inhibitorio. Cabe mencionar que los mecanismos de regulación de las plantas funcionan en respuesta a fluctuaciones en el ambiente, estas pudiendo ser tanto diarias como estacionales. Las interacciones entre estas variables suelen ser complejas, modulando la composición fitoquímica de la planta; esto ha probado ser un desafío a nivel experimental en la búsqueda de compuestos activos, afectando a los resultados y a las conclusiones hechas en este campo. Es tal la variabilidad en abundancia y composición, que es cuestión de días el encontrar un perfil molecular distinto (Liebelt et al., 2019). Un ejemplo de esto es lo reportado por (Fatmawaty et al., 2019), en donde determina que para la hoja de *X. undipes* no se

encontraron flavonoides, difiriendo significativamente con nuestro análisis. De igual manera, en otros estudios realizados con parásitos la hoja fue la parte constitutiva con mayor actividad, mientras que la raíz y la corteza no presentaron actividad (Chinchilla-Carmona, Valerio-Campos, et al., 2016). En base a esta información se concluye que el tiempo y las variables externas, al momento de la colecta, tienen gran influencia en el perfil fitoquímico de la planta, resaltando la importancia de realizar un estudio fenológico que apoye nuestros resultados.

Enfocándonos en los ensayos de la actividad antimicrobiana, los extractos de la raíz y la corteza presentaron actividad contra *Staphylococcus aureus*, incluida la cepa resistente a la meticilina, MRSA. Este coco gram-positivo es una amenaza para la salud humana y animal, con una capacidad de supervivencia que lo convierte en un enemigo formidable. Es un patógeno oportunista versátil, que invade las membranas mucosas, la piel e incluso los órganos internos. Dentro de las múltiples patologías que produce se encuentran la endocarditis, osteomielitis, la infección del tracto respiratorio, infecciones supurativas de la piel y septicemia (Algammal et al., 2020; Fishovitz et al., 2014). En cuanto a su variante zoonótica, *Staphylococcus aureus* MRSA, esta presenta un patrón de multirresistencia tanto contra los Beta Lactámicos como las Tetraciclinas, Aminoglucósidos, Fluoroquinolonas y Lincosamidas; convirtiéndolo en uno de los patógenos de mayor importancia médica a nivel global. Uno de los factores más preocupantes es que, entre los cocos gram positivos, este se ha convertido en el principal agente causal de infecciones intrahospitalarias e infecciones adquiridas en la comunidad, volviéndose un problema de salud pública (Abdelbary et al., 2017; Algammal et al., 2020; Wada & Watanabe, 1998). Los resultados obtenidos demostraron que los extractos presentan mayor actividad a menores concentraciones en los ensayos en medio líquido (CMI-CLM), en comparación con los ensayos de difusión en Agar (KB-DA). Esto se ha reportado anteriormente para extractos naturales en cepas de *Candida* (Teke et al., 2013) y de bacterias gram-negativas;

donde se observa inhibición en ensayos de CMI, pero no en ensayos de dispersión por disco. Esto se atribuye a la solubilidad de los compuestos activos en el agar (Alzoreky & Nakahara, 2003). Por esto se propone explorar distintos métodos piloto por fuera del KB para determinar la actividad de los extractos, y así mismo determinar si el resto de los microorganismos estudiados presentan inhibición en medio líquido. No obstante, es importante mencionar que sí existe una tendencia en la actividad inhibitoria de los extractos de plantas contra bacterias gram-positivas; y se ha encontrado mayor resistencia en gram-negativas. Precisamente, esta resistencia se atribuye a los lipopolisacáridos en la membrana externa de estas bacterias y a la permeabilidad de las porinas, que imposibilitan el paso de moléculas antibióticas más grandes como la vancomicina (Alzoreky & Nakahara, 2003; Murray et al., 2021). Por último, la diferencia entre las CMI y CLM cayeron por fuera del rango considerado como bactericida (>2 fold) (Teke et al., 2013), lo que sugiere que el extracto podría tener un efecto bacteriostático. Sin embargo, cabe mencionar que en otros estudios (Mohammed et al., 2016; Sule et al., 2010), se considera un extracto como bactericida si al sembrar en agar se reportan placas sin crecimiento, como lo presentado en este estudio. En base a esto se sugiere obtener resultados de una curva de crecimiento y la Concentración Bactericida Mínima (CBM) al 99.9%, para poder aseverar a qué categoría pertenece el extracto analizado.

Finalmente, en cuanto al ensayo de toxicidad, los extractos de corteza y raíz de *Xanthosoma undipes* exhibieron actividad citotóxica contra *Artemia salina*; siendo la raíz el tejido que presentó mayor letalidad a menores concentraciones. Por su parte la corteza no presentó diferencias significativas con el control en cuanto a su CMI, pero sí en cuanto a su CLM. De igual manera el tiempo fue una variable significativa que jugó un rol importante en la letalidad de *A. salina*. A mayor tiempo de incubación, incrementó también el porcentaje de muertes del crustáceo, tanto en las muestras como en el control. Al haber muertes en los controles negativos

a las 24 y 48 horas de exposición existe un factor por fuera de la toxicidad de los extractos que está provocando la muerte de estos animales. Se descartó la falta de alimento como variable, ya que los crustáceos eclosionados pueden sobrevivir hasta 48h sin comida, debido a que en esta etapa larval todavía se alimentan de su saco vitelino. Por lo que la principal variable que se hipotetiza afectó en la mortalidad fue la oxigenación y el flujo de agua (Carballo et al., 2002), no obstante, los efectos del extracto sobre *A. salina* siguen siendo significativos. Si bien este ensayo no nos permite determinar los mecanismos de toxicidad específicos del extracto, sí nos brinda un resultado preliminar que determina la presencia de compuestos activos (Waghulde et al., 2019). Este resultado se relaciona de igual manera con lo obtenido en el análisis químico. La raíz es el tejido con mayor contenido de polifenoles, mayor actividad antioxidante, antimicrobiana y el tejido más tóxico. En la literatura, se encontró que el extracto etanólico de la hoja de *X. undipes* presentó altos niveles de toxicidad en eritrocitos de ratón (Chinchilla, et al., 2016), mientras que el extracto de la flor seca no presentó lisis en los eritrocitos (Chinchilla, Valerio, et al., 2016). Esto podría atribuirse al contenido de ácido oxálico (8361.83 mg/kg) y taninos (3448.20 mg/kg) en las hojas (Fatmawaty et al., 2019). El ácido oxálico es un compuesto orgánico que a ciertas concentraciones resulta tóxico en la ingesta, provocando falla renal (Dassanayake & Gnanathan, 2012). De igual manera, estos resultados se pueden atribuir a la toxicidad intrínseca de ciertos compuestos fenólicos (incluyendo los taninos) (Bhuyan & Basu, 2017), presentes en nuestras muestras y en la familia (Araceae) a la que pertenece la planta (Lans et al., 2001). Por último, es de importancia mencionar que, si bien el extracto crudo presentó toxicidad, la planta cocinada y procesada es comestible y de importancia alimenticia en varias regiones de Indonesia donde ha sido incorporada en la elaboración de varios productos culinarios (Hakiki et al., 2019; Windarsih et al., 2023). Lo que lo vuelve un sujeto de estudio de lo más interesante.

CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que los extractos de raíz y corteza de *Xanthosoma undipes* podrían tener potencial como agentes antimicrobianos naturales, particularmente contra *Staphylococcus aureus* y su variante multi-resistente MRSA. Cabe mencionar que este continúa siendo un estudio piloto de la actividad de los extractos crudos de *X. undipes*; estudio que justifica una investigación más profunda para aislar e identificar los compuestos activos, determinar su mecanismo de acción y evaluar su seguridad, ya que los extractos analizados exhibieron cierta toxicidad. Se recomienda también realizar un estudio fenológico de la planta, para determinar los efectos de las variables externas en la producción de fitoquímicos y así mismo experimentar con otros agentes de extracción.

Es importante continuar la investigación para comprender mejor el potencial terapéutico de los extractos de *X. undipes*, su fenología y su composición molecular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelbary, M. M. H., Basset, P., Blanc, D. S., & Feil, E. J. (2017). The Evolution and Dynamics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. En *Genetics and Evolution of Infectious Diseases* (pp. 553-572). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799942-5.00024-X>
- Algammal, A. M., Hetta, H. F., Elkelish, A., Alkhalifah, D. H. H., Hozzein, W. N., Batiha, G. E.-S., El Nahhas, N., & Mabrok, M. A. (2020). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence Factors, Antibiotic-Resistance, and Zoonotic Impact. *Infection and Drug Resistance*, Volume 13, 3255-3265. <https://doi.org/10.2147/IDR.S272733>
- Alzoreky, N. S., & Nakahara, K. (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, 80(3), 223-230. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00169-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00169-1)
- Arif, T., Bhosale, J. D., Kumar, N., Mandal, T. K., Bendre, R. S., Lavekar, G. S., & Dabur, R. (2009). Natural products – antifungal agents derived from plants. *Journal of Asian Natural Products Research*, 11(7), 621-638. <https://doi.org/10.1080/10286020902942350>
- Becker, M. H., & Gratwicke, B. (2017). Minimum lethal concentration of sodium hypochlorite for the amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *PLOS ONE*, 12(4), e0176439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176439>
- Benítez-Estrada, A., Villanueva-Sánchez, J., González-Rosendo, G., Alcántar-Rodríguez, V. E., Puga-Díaz, R., Quintero-Gutiérrez, A. G., Benítez-Estrada, A., Villanueva-Sánchez, J., González-Rosendo, G., Alcántar-Rodríguez, V. E., Puga-Díaz, R., & Quintero-Gutiérrez, A. G. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia: Correlación con ensayos fluorométricos

- (ORAC) y espectrofotométricos (FRAP). TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas, 23. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244>
- Bhuyan, D. J., & Basu, A. (2017). Phenolic compounds: Potential Health Benefits and Toxicity (pp. 27-59).
- Carballo, J. L., Hernández-Inda, Z. L., Pérez, P., & García-Grávalos, M. D. (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology*, 2(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-2-17>
- Chinchilla-Carmona, M., Valerio-Campos, I., Alpizar-Cordero, J., Cordero-Villalobos, M., & Rodríguez-Chaves, D. (2016). Actividad antiparasitaria contra *Toxoplasma gondii* (Coccidia Toxoplasmatidae) de plantas de la Reserva Biológica Alberto Manuel Brenes (ReBAMB) de Costa Rica. *Revista Parasitología Latinoamericana*, 65(1), 57.
- Chinchilla-Carmona, M., Valerio-Campos, I., Sánchez-Porras, R., Bagnarello-Madrigal, V., Alpizar-Cordero, J., Cordero-Villalobos, M., & Rodríguez-Chaves, D. (2016). Efecto antiparasitario contra *Trypanosoma Cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae) de plantas de una Reserva Biológica de Costa Rica. *Revista Parasitología Latinoamericana*, 65(1), 57.
- Chinchilla-Carmona, M., Valerio-Campos, I., Sánchez-Porras, R., Mora-Chaves, V., Bagnarello-Madrigal, V., Martínez-Esquivel, L., González-Paniagua, A., & Vanegas, J. C. (2011). In vivo evaluation of the antimalarial activity of 25 plants from a Biological Conservation Reserve of Costa Rica. *Revista chilena de historia natural*, 84(1), 115-123. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2011000100009>
- Dassanayake, U., & Gnanathanan, C. A. (2012). Acute renal failure following oxalic acid poisoning: A case report. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 7(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-7-17>

- Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. *Plant Physiology*, 184(1), 39-52. <https://doi.org/10.1104/pp.20.00433>
- Eve, A., Aliero, A. A., Nalubiri, D., Adeyemo, R. O., Akinola, S. A., Pius, T., Nabaasa, S., Nabukeera, S., Alkali, B., & Ntulume, I. (2020). In Vitro Antibacterial Activity of Crude Extracts of *Artocarpus heterophyllus* Seeds against Selected Diarrhoea-Causing Superbug Bacteria. *The Scientific World Journal*, 2020, 9813970. <https://doi.org/10.1155/2020/9813970>
- Fatmawaty, A. A., Hermita, N., Hastuti, D., Kartina, A., & Hilal, S. (2019). Phytochemical analysis of beneng taro (*Xanthosoma undipes* K.Koch) leaves: Cultivation as raw material for biopesticides for eco-friendly agriculture. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 383(1), 012006. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/383/1/012006>
- Fishovitz, J., Hermoso, J. A., Chang, M., & Mobashery, S. (2014). Penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *IUBMB Life*, 66(8), 572-577. <https://doi.org/10.1002/iub.1289>
- Guglielmi, P., Pontecorvi, V., & Rotondi, G. (2020). Natural compounds and extracts as novel antimicrobial agents. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 30(12), 949-962. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1853101>
- Hakiki, D. N., Rostianti, T., Nasir, & Nursuciyoni. (2019). Development of Local Food Biodiversity of Nata De Taro from Talas Beneng (*Xanthosoma undipes* k. Koch.). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 309(1), 012030. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/309/1/012030>
- Heard, S. C., Wu, G., & Winter, J. M. (2021). Antifungal natural products. *Current Opinion in Biotechnology*, 69, 232-241. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.02.001>

- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer-Disk-DiffusionSusceptibility-Test-Protocol.pdf (Vol. 15, pp. 1-23). American Society for Microbiology. <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-DiffusionSusceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>
- Jiru, T. M., & Getahun, M. (2023). Antifungal Activity of *Plantago lanceolata* and *Sida ovata* Leaf Extracts against Dermatofungal Fungi. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2023, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2023/9957892>
- Kang, W. H., Kim, J., Yoon, H. I., & Son, J. E. (2020). Quantification of Spectral Perception of Plants with Light Absorption of Photoreceptors. *Plants*, 9(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/plants9050556>
- Lans, C., Harper, T., Georges, K., & Bridgewater, E. (2001). Medicinal and ethnoveterinary remedies of hunters in Trinidad. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 1(1), 10. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-1-10>
- Latif, S., Chiapusio, G., & Weston, L. A. (2017). Allelopathy and the Role of Allelochemicals in Plant Defence. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 82, pp. 19-54). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2016.12.001>
- Li, S., Jiang, S., Jia, W., Guo, T., Wang, F., Li, J., & Yao, Z. (2024). Natural antimicrobials from plants: Recent advances and future prospects. *Food Chemistry*, 432, 137231. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137231>
- Liebelt, D. J., Jordan, J. T., & Doherty, C. J. (2019). Only a matter of time: The impact of daily and seasonal rhythms on phytochemicals. *Phytochemistry Reviews*, 18(6), 1409-1433. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09617-z>
- Manso, T., Lores, M., & De Miguel, T. (2021). Antimicrobial Activity of Polyphenols and Natural Polyphenolic Extracts on Clinical Isolates. *Antibiotics*, 11(1), 46. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010046>

- McBirney, S. E., Trinh, K., Wong-Beringer, A., & Armani, A. M. (2016). Wavelength-normalized spectroscopic analysis of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* growth rates. *Biomedical Optics Express*, 7(10), 4034. <https://doi.org/10.1364/BOE.7.004034>
- Mohammed, S., Naziru, A., Mohammed, K., Sa'idu, H., Muntari, M., Andrawus, D., & Isa, S. (2016). Evaluation of Bacteriostatic Effect of Methanolic Extract of *Guiera senegalensis* on Some Clinical Bacteria. 18.
- Moreno-Escamilla, J. O., De La Rosa, L. A., López-Díaz, J. A., Rodrigo-García, J., Núñez-Gastélum, J. A., & Alvarez-Parrilla, E. (2015). Effect of the smoking process and firewood type in the phytochemical content and antioxidant capacity of red Jalapeño pepper during its transformation to chipotle pepper. *Food Research International*, 76, 654-660. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.031>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2021). *Medical microbiology* (Ninth edition). Elsevier.
- Oplustil, C. (2022). *Procedimientos Básicos en Microbiología Clínica* Carmen Paz Oplustil, Cássia Maria Zoccoli, Nina Rieko Tobouti, Mara Cristina Scheffer (Formato Clínico Chile Asesorías Ltda.). Poliniza.
- Pamela, V. Y., Nurtiana, W., & Meindrawan, B. (2019). AMYLOGRAPHY PROFILE AND MICROSTRUCTURE OF BENENG TARO BANTEN (*Xanthosoma undipes* K. Koch) STARCH. *Food ScienTech Journal*, 1(2), 100. <https://doi.org/10.33512/fsj.v1i2.7319>
- Patton, T., Barrett, J., Brennan, J., & Moran, N. (2006). Use of a spectrophotometric bioassay for determination of microbial sensitivity to manuka honey. *Journal of Microbiological Methods*, 64(1), 84-95. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.04.007>
- Pfaller, M. A., Messer, S. A., & Coffmann, S. (1995). Comparison of visual and spectrophotometric methods of MIC endpoint determinations by using broth

microdilution methods to test five antifungal agents, including the new triazole D0870.

Journal of Clinical Microbiology, 33(5), 1094-1097.

<https://doi.org/10.1128/jcm.33.5.1094-1097.1995>

Rahman, Md. M., Rahaman, Md. S., Islam, Md. R., Hossain, Md. E., Mannan Mithi, F.,

Ahmed, M., Saldías, M., Akkol, E. K., & Sobarzo-Sánchez, E. (2021). Multifunctional

Therapeutic Potential of Phytocomplexes and Natural Extracts for Antimicrobial

Properties. *Antibiotics*, 10(9), 1076. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091076>

Ramawat, K. G., & Goyal, S. (2019). Co-evolution of Secondary Metabolites During

Biological Competition for Survival and Advantage: An Overview. En J.-M. Merillon &

K. G. Ramawat (Eds.), *Co-Evolution of Secondary Metabolites* (pp. 1-15). Springer

International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76887-8_45-1

Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2020). Phenolic composition, antioxidant

potential and health benefits of citrus peel. *Food Research International*, 132, 109114.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109114>

Sule, A., Ahmed, Q. U., Samah, O. A., & Omar, M. N. (2010). Bacteriostatic and bactericidal

activities of *Andrographis paniculata* extracts on skin disease causing pathogenic

bacteria.

Takó, M., Kerekes, E. B., Zambrano, C., Kotogán, A., Papp, T., Krisch, J., & Vágvölgyi, C.

(2020). Plant Phenolics and Phenolic-Enriched Extracts as Antimicrobial Agents against

Food-Contaminating Microorganisms. *Antioxidants*, 9(2), 165.

<https://doi.org/10.3390/antiox9020165>

Teke, G. N., Elisée, K. N., & Roger, K. J. (2013). Chemical composition, antimicrobial

properties and toxicity evaluation of the essential oil of *Cupressus lusitanica* Mill. Leaves

from Cameroon. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13(1), 130.

<https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-130>

- Torre, L. de la (Ed.). (2008). Enciclopedia de las plantas útiles del Ecuador (1. ed). Herbario QCA [u.a.].
- Wada, A., & Watanabe, H. (1998). Penicillin-Binding Protein 1 of *Staphylococcus aureus* Is Essential for Growth. *Journal of Bacteriology*, 180(10), 2759-2765.
<https://doi.org/10.1128/JB.180.10.2759-2765.1998>
- Waghulde, S., Kale, M. K., & Patil, VijayR. (2019). Brine Shrimp Lethality Assay of the Aqueous and Ethanolic Extracts of the Selected Species of Medicinal Plants. The 23rd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, 47.
<https://doi.org/10.3390/ecsoc-23-06703>
- Walsh, D. J., Livinghouse, T., Goeres, D. M., Mettler, M., & Stewart, P. S. (2019). Antimicrobial Activity of Naturally Occurring Phenols and Derivatives Against Biofilm and Planktonic Bacteria. *Frontiers in Chemistry*, 7, 653.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00653>
- Weinstein, M. P. (Ed.). (2021). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (Thirty-first edition). Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163-175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Windarsih, G., RAHMA, A., MULYANA, D., Hariri, M., Erlinawati, I., Riastiwi, I., & Efendi, M. (2023). Pragmatical utilization of beneng taro (*Xanthosoma undipes*) based on local knowledge of the community of Mount Karang, Pandeglang, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 24, 6415-6424.
<https://doi.org/10.13057/biodiv/d241202>
- Wu, H., Guo, J., Chen, S., Liu, X., Zhou, Y., Zhang, X., & Xu, X. (2013). Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and

their metabolites using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 72, 267-291.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2012.09.004>

Zeb, A. (2020). Concept, mechanism, and applications of phenolic antioxidants in foods.

Journal of Food Biochemistry, 44(9). <https://doi.org/10.1111/jfbc.13394>

Kang, W. H., Kim, J., Yoon, H. I., & Son, J. E. (2020). Quantification of Spectral Perception of Plants with Light Absorption of Photoreceptors. *Plants*, 9(5), Article 5.

<https://doi.org/10.3390/plants9050556>

ANEXO A: VALORES DE SIGNIFICANCIA ENTRE BLANCOS E INOCULADOS

Tukey Test groups	Concentration	P value
Corteza Blanco vs Corteza Inoculado	0.3906	0.0000000
Corteza Blanco vs Corteza Inoculado	0.7813	0.9999981
Corteza Blanco vs Corteza Inoculado	1.5625	1.0000000
Corteza Blanco vs Corteza Inoculado	3.125	1.0000000
Corteza Blanco vs Corteza Inoculado	6.25	0.9735260
Corteza Blanco vs Corteza Inoculado	12.5	0.9999629
Corteza Blanco vs Corteza Inoculado	25	1.0000000
Corteza Blanco vs Corteza Inoculado	50	1.0000000
Corteza Blanco vs Corteza Inoculado	100	1.0000000
Raíz Blanco vs Raíz Inoculado	0.3906	1.0000000
Raíz Blanco vs Raíz Inoculado	0.7813	1.0000000
Raíz Blanco vs Raíz Inoculado	1.5625	1.0000000
Raíz Blanco vs Raíz Inoculado	3.125	1.0000000
Raíz Blanco vs Raíz Inoculado	6.25	1.0000000
Raíz Blanco vs Raíz Inoculado	12.5	0.9999909
Raíz Blanco vs Raíz Inoculado	25	0.6584561
Raíz Blanco vs Raíz Inoculado	50	1.0000000
Raíz Blanco vs Raíz Inoculado	100	1.0000000

ANEXO B: PORCENTAJE DE CRECIMIENTO POR CONCENTRACIÓN, ENSAYO CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

