



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL
EXTRACTO METANÓLICO DEL TALLO DE PASSIFLORA
QUADRANGULARIS

ARMIJOS SURI ANDREA NICOLE
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2019



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL
EXTRACTO METANÓLICO DEL TALLO DE PASSIFLORA
QUADRANGULARIS

ARMIJOS SURI ANDREA NICOLE
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

MACHALA
2019



UTMACH

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y DE LA SALUD

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

TRABAJO TITULACIÓN
TRABAJO EXPERIMENTAL

ESTUDIO FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO
METANÓLICO DEL TALLO DE PASSIFLORA QUADRANGULARIS

ARMIJOS SURI ANDREA NICOLE
BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA

SILVERIO CALDERON CARMEN ELIZABETH

MACHALA, 12 DE SEPTIEMBRE DE 2019

MACHALA
2019

Nota de aceptación:

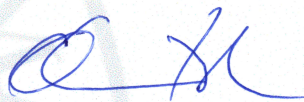
Quienes suscriben, en nuestra condición de evaluadores del trabajo de titulación denominado ESTUDIO FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DEL TALLO DE PASSIFLORA QUADRANGULARIS, hacemos constar que luego de haber revisado el manuscrito del precitado trabajo, consideramos que reúne las condiciones académicas para continuar con la fase de evaluación correspondiente.



SILVERIO CALDERON CARMEN ELIZABETH
0702531351
TUTOR - ESPECIALISTA 1



CAMPO FERNANDEZ MERCEDES
0959164625
ESPECIALISTA 2



CUESTA RUBIO OSMANY
0959164716
ESPECIALISTA 3

Machala, 12 de septiembre de 2019

Passiflora

INFORME DE ORIGINALIDAD

0%

INDICE DE SIMILITUD

0%

FUENTES DE
INTERNET

0%

PUBLICACIONES

0%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias

< 20 words

Excluir bibliografía

Activo

CLÁUSULA DE CESIÓN DE DERECHO DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO DIGITAL INSTITUCIONAL

La que suscribe, ARMIJOS SURI ANDREA NICOLE, en calidad de autora del siguiente trabajo escrito titulado ESTUDIO FITOQUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO METANÓLICO DEL TALLO DE PASSIFLORA QUADRANGULARIS, otorga a la Universidad Técnica de Machala, de forma gratuita y no exclusiva, los derechos de reproducción, distribución y comunicación pública de la obra, que constituye un trabajo de autoría propia, sobre la cual tiene potestad para otorgar los derechos contenidos en esta licencia.


La autora declara que el contenido que se publicará es de carácter académico y se enmarca en las disposiciones definidas por la Universidad Técnica de Machala.

Se autoriza a transformar la obra, únicamente cuando sea necesario, y a realizar las adaptaciones pertinentes para permitir su preservación, distribución y publicación en el Repositorio Digital Institucional de la Universidad Técnica de Machala.

La autora como garante de la autoría de la obra y en relación a la misma, declara que la universidad se encuentra libre de todo tipo de responsabilidad sobre el contenido de la obra y que asume la responsabilidad frente a cualquier reclamo o demanda por parte de terceros de manera exclusiva.

Aceptando esta licencia, se cede a la Universidad Técnica de Machala el derecho exclusivo de archivar, reproducir, convertir, comunicar y/o distribuir la obra mundialmente en formato electrónico y digital a través de su Repositorio Digital Institucional, siempre y cuando no se lo haga para obtener beneficio económico.

Machala, 12 de septiembre de 2019



ARMIJOS SURI ANDREA NICOLE
0750395329

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mis padres que son las personas incondicionales que me han apoyado durante mi desarrollo profesional, quienes comparten momentos junto a su nieta mientras cumplo esta meta tan importante para mí.

A mi pequeña y hermosa hija Ainhoita Victoria, mi mayor bendición y motor de vida quien con su amor brindado a diario me ha dado la motivación y fuerzas necesarias para seguir superándome y poder brindarle un mejor porvenir.

A mi abuela quien me ha sostenido y me ha brindado fortaleza y ánimos para culminar este sueño tan anhelado.

Andrea Armijos Suri.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Dra. Carmen Silverio tutora de esta investigación, por su paciencia, tiempo, apoyo y enseñanzas para entregadas para el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Segundo García Ledesma, por facilitarme el material y espacio que necesite durante la realización de la investigación.

A la Dra. Mercedes Campo PhD, por sus brindarme sus conocimientos transmitidos en la parte fitoquímica.

Al Dr. Osmany Cuesta PhD, por orientarme en la realización de la Cromatografía en Capa Delgada.

A la Dra. Ruth Castillo por el caluroso recibimiento en el Laboratorio privado BIOMEDILAB, al Dr. Lenin Torres por su tiempo, colaboración y conocimientos brindados en la parte microbiológica de esta investigación.

A Juddy Guamán mi gran amiga por escucharme y brindarme motivación durante el proceso de titulación.

Andrea Armijos Suri.

RESUMEN

Las plantas han sido reconocidas y utilizadas como un medio alternativo a los medicamentos, fundamentándose en conocimientos ancestrales para tratar y aliviar enfermedades. *Passiflora quadrangularis* (badea) es una planta trepadora y nativa en climas tropicales y no posee muchos estudios e investigaciones referentes a su actividad antibacteriana, sin embargo, ha sido utilizada como medicina tradicional aprovechando sus propiedades terapéuticas entre las cuales constan: antifúngicas, antiinflamatorias, antioxidantes, incluyendo la actividad antibacteriana. En Ecuador, la sociedad se ve, frecuentemente, afectada por enfermedades infecciosas causadas por *Staphylococcus aureus*, provocando infecciones en la piel y vías respiratorias, volviéndose muy virulenta debido a la resistencia bacteriana que presentan frente a varios antibióticos. El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico del tallo de *Passiflora quadrangularis* mediante el método modificado de pozos en agar para inhibir *Staphylococcus aureus*. El material vegetal de estudio fue recolectado en la parroquia Jumón del cantón Santa Rosa, provincia de El Oro; donde se fueron seleccionando de manera minuciosa tallos sanos, libres de maltrato y contaminación, lavados con agua destilada y suero fisiológico para posteriormente secarlos al ambiente y en una estufa a 50°C. Posteriormente, luego fueron triturados en un molino manual para la obtención de una pulverización fina de la droga vegetal, finalmente fue tamizada para conseguir un polvo uniforme. Se realizó el control de calidad de la droga cruda aplicando el método gravimétrico mediante la determinación del porcentaje de humedad, porcentaje de cenizas soluble y porcentaje de cenizas insolubles presentes en el tallo. Se obtuvo el extracto metanólico del tallo por el método de maceración al cual se le procedió a realizar un análisis cualitativo de la composición química que se llevó a cabo mediante varios ensayos del tamizaje fitoquímico y reveladores de la cromatografía en capa delgada. Se evaluó la susceptibilidad antibacteriana del extracto concentrado del tallo de *Passiflora quadrangularis* frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), utilizando diferentes concentraciones que permitieron determinar la concentración mínima inhibitoria del extracto concentrado. La droga utilizada para la presente investigación se mantuvo dentro de los límites de calidad establecidos por la Organización Mundial de la Salud y

Farmacopea española 2002, lo cual indicó que se encuentra apta para ser utilizada en la presente investigación. En el tamizaje fitoquímico se logró evidenciar la presencia de varios metabolitos secundarios como: flavonoides, taninos, fenoles y saponinas, que fueron nuevamente detectados de manera preliminar mediante la cromatografía en capa delgada que se efectuó bajo la aplicación de reveladores químicos y físicos, manifestándose en la corrida cromatográfica la presencia de manchas que caracterizan a los metabolitos secundarios encontrados en el tamizaje fitoquímico. La actividad antibacteriana del extracto metanólico de los tallos de *Passiflora quadrangularis* se determinó mediante el método modificado de pozos en agar utilizando diferentes concentraciones del extracto (200 mg/mL, 400 mg/mL, 800 mg/mL), lo cual permitió comprobar la susceptibilidad a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). La concentración mínima inhibitoria del extracto concentrado que demostró la sensibilidad fue a 400 mg/mL evidenciando el primer halo de inhibición; sin embargo, en concentraciones de 200 mg/mL no mostró el halo de inhibición evidenciándose resistencia de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Palabras claves: *Passiflora quadrangularis*, estudio fitoquímico, susceptibilidad antibacteriana, *Staphylococcus aureus*, concentración mínima inhibitoria.

ABSTRACT

Through history, plants have been used as an alternative to medicines, based on ancestral knowledge in order to treat and alleviate diseases. Following this idea, there is a climbing plant native to tropical climates which has not been widely researched with regards to its antibacterial activity, it is the *Passiflora quadrangularis* or *Badea*. This interesting species has been used as a traditional medicine due to its therapeutic properties which include antifungal, anti-inflammatory and antioxidants. In Ecuador, people are frequently affected by infectious diseases caused by *Staphylococcus aureus* bacterium that causes infections in the skin and respiratory tract that ended up being very virulent due to the bacterial resistance they present against most antibiotics. The aim of this research work is to evaluate the antibacterial activity of the secondary metabolites present in the methanolic extract of the *Passiflora quadrangularis*, using the modified method of agar wells to inhibit *Staphylococcus aureus*. The species used in this research was collected in the Jumón parish of Santa Rosa county, a province of El Oro. There, only healthy stems, free of abuse and contamination, were collected. After that, the stems were washed with distilled water and physiological serum to subsequently dry them in the fresh air. Finally, the stems were placed in an oven at 50 ° C, and then transferred to a manual mill to obtain a uniform powder. After obtaining the powder, a quality control was carried out by using a gravimetric method which was applied to determine the percentage of moisture, soluble ashes and insoluble ashes present in the stem. Moreover, the methanolic extract of the stem was obtained by the method of maceration which consists in a qualitative analysis of the chemical composition of the stems. This analysis was possible due to several tests of phytochemical screening and the development of thin layer chromatography carried out on the stems. These analyses were all carried out in order to test the antibacterial susceptibility of the concentrated extract of *Passiflora quadrangularis* stem against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). It is important to mention that the drug obtained from *Passiflora quadrangularis* remained within the quality limits established by the Spanish World Health Organization and Pharmacopoeia, which indicated that it is suitable for use in this research. During the phytochemical screening it was possible to find the presence of several secondary metabolites such as: flavonoids, tannins, phenols and saponins. These were also detected in a first attempt of

chromatography to the thin layer where chemical and physical developers were applied. The presence of spots that characterize the secondary metabolites was also found in the phytochemical screening. As a result of this investigation, by using the Modified Agar Well method, the minimum amount of concentration of the extract of the stem of *Passiflora quadrangularis* needed to fight the *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) bacterium, is 400 mg/mL. This means that any quantity inferior to 400 mg/mL, will not be a threat to the bacterium. This was proven through a test using only 200 mg/mL, where the bacterium displayed no resistance against the drug.

Keywords: *Passiflora quadrangularis*, phytochemical study, antimicrobial susceptibility, *Staphylococcus aureus*, minimum inhibitory concentration.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	11
PROBLEMA	12
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	14
IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES	14
Variable Independiente	14
Variable Dependiente	14
OBJETIVOS	15
Objetivo General	15
Objetivos Específicos	15
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	16
1.1. <i>Passiflora quadrangularis</i> (badea)	16
1.1.1. Taxonomía	16
1.1.2. Origen y distribución	16
1.1.3. Descripción botánica	16
1.1.4. Composición química de <i>Passiflora quadrangularis</i>	17
1.1.5. Usos medicinales y aplicación	17
1.2. Fitoquímica	17
1.2.1. Metabolitos secundarios	17
1.2.2. Metabolitos secundarios con acción antibacteriana	18
1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	18
1.3.1. Caracterización	19
1.4. Medios de cultivo	19
1.4.1. Agar Mueller Hinton	19
1.5. Susceptibilidad antibacteriana	20
1.5.1. Método modificado de pozos en agar	20
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1. Tipo de investigación	21
2.2. Lugar de la Investigación	21
2.3. Universo y Muestra	21
2.4. Descripción del área de estudio	21
2.5. Características de la zona del lugar de estudio	21
2.6. MATERIALES	22

2.6.1. Material Vegetal	22
2.6.2. Material Microbiológico	22
2.6.3. Materiales de Laboratorio	22
2.6.3.1. Equipos	22
2.6.3.2. Materiales	22
2.6.3.3. Sustancias y reactivos	23
2.7. MÉTODOS	24
2.7.1. Método para la obtención de la droga vegetal	24
2.7.1.2. Recolección y selección	24
2.7.1.3. Preparación de la muestra	24
2.7.2. Método gravimétrico para el control de calidad de la droga vegetal	24
2.7.2.1. Determinación del porcentaje de humedad	24
2.7.2.2. Determinación de cenizas totales	25
2.7.2.3. Determinación de cenizas solubles en agua	25
2.7.2.4. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico	26
2.7.3. Métodos de preparación de los extractos orgánicos	26
2.7.3.1. Extracto líquido por maceración	27
2.7.3.2. Extracto seco concentrado por rotoevaporador	27
2.7.4. Tamizaje fitoquímico	27
2.7.4.1. Determinación de alcaloides	27
2.7.4.2. Determinación de taninos	28
2.7.4.3. Determinación de flavonoides	28
2.7.4.4. Determinación de azúcares reductores	29
2.7.4.5. Determinación de saponinas	29
2.7.5. Cromatografía en capa delgada (CCD)	29
2.7.6. Método microbiológico	30
2.7.6.1. Método modificado de pozos en agar	30
2.7.8. Análisis estadístico	30
CAPÍTULO III. RESULTADOS	31
3.1. Porcentajes obtenidos por el método gravimétrico de los tallos de <i>Passiflora quadrangularis</i>	31
3.2. Obtención del rendimiento del extracto metanólico	32
3.3. Tamizaje fitoquímico	32
3.4. Cromatografía en Capa Delgada (CCD)	33
3.4.1. Revelado físico con luz UV 254 nm y 365 nm	33
3.4.2. Revelado químico	34
3.5. Actividad antibacteriana ante <i>Staphylococcus aureus</i>	35
3.6. Discusión	37
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES	39

CAPÍTULO V. RECOMENDACIONES

40

BIBLIOGRAFÍA

41

TABLAS

	pág.
Tabla 1. Taxonomía de <i>Passiflora quadrangularis</i>	15
Tabla 2. Porcentaje de humedad, porcentaje de cenizas totales y cenizas solubles en agua en droga cruda de <i>Passiflora quadrangularis</i>	30
Tabla 3. Metabolitos secundarios presentes en extracto metanólico	31
Tabla 4. Actividad antibacteriana del extracto de <i>Passiflora quadrangularis</i>	35

ILUSTRACIONES

	pág.
Ilustración 1. Cromatografía en Capa Delgada (CCD) revelado con luz UV 254 nm	32
Ilustración 2. Cromatografía en Capa Delgada (CCD) revelado con luz UV 365 nm	32
Ilustración 3. Cromatografía en Capa Delgada (CCD) revelado con luz Ácido Sulfúrico + calor	32
Ilustración 4. Cromatografía en Capa Delgada (CCD) revelado con luz Ácido Sulfúrico + Vainillina + calor	32
Ilustración 5. Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en metanol puro	34
Ilustración 6. Halos de inhibición en agar Mueller Hinton mediante el método modificado de pozos en agar	35

INTRODUCCIÓN

Las plantas han sido reconocidas y utilizadas como un medio alternativo a los medicamentos, fundamentándose en prácticas y conocimientos de nuestros ancestros para tratar y aliviar enfermedades ¹. Existen varios estudios de plantas medicinales que poseen propiedades curativas gracias a los metabolitos secundarios que les proporciona su actividad farmacológica.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2014, propone la investigación de la composición química de plantas medicinales con la finalidad de brindar información certera para la elaboración de fitofármacos o medicamentos herbarios que sean seguros, eficaces, de calidad e inocuidad para el ser humano que ayuden atenuar o combatir enfermedades en la población ^{1,2}.

En Ecuador, la sociedad se ve frecuentemente afectada por enfermedades infecciosas causadas por microorganismos patógenos, uno de los más frecuentes es la bacteria *Staphylococcus aureus*, provocando infecciones en la piel y vías respiratorias, es una bacteria que se encuentra comúnmente en el ambiente, y que presenta resistencia debido al uso indiscriminado de antibióticos, causando infecciones más agresivas ³. Por esta razón se ha visto la necesidad de investigar nuevos principios activos de plantas para combatir enfermedades bacterianas.

Esta investigación consiste en utilizar a *Passiflora quadrangularis* como recurso natural fitoterapéutico, considerando que es utilizada en nuestro país como medicina tradicional debido a que posee propiedades farmacológicas entre ellas antifúngicas y antioxidantes ²⁰.

Passiflora quadrangularis no posee muchos estudios e investigaciones científicas referentes a su actividad antibacteriana, por esta razón este estudio tendrá como objetivo evaluar la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico del tallo de *Passiflora quadrangularis* mediante el método modificado de pozos en agar para la inhibición de *Staphylococcus aureus*.

PROBLEMA

En la actualidad la resistencia bacteriana se está convirtiendo en un problema crítico de salud pública a nivel mundial, ya que constantemente la sociedad está siendo amenazada por enfermedades de tipo bacterianas, esta situación se presenta a causa del uso irracional de los antibióticos que provocan que las bacterias muten genéticamente volviéndose resistentes a estos medicamentos ⁴.

Uno de los problemas que se está presentando con mayor repercusión es especialmente en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a Meticilina (SARM), bacteria que forma parte de la flora basal de la piel y que se está convirtiendo en un mayor riesgo de incidencia en los ambientes hospitalarios ^{5,6}. El 16,3% de pacientes que se encuentran en instituciones de salud pública se ven afectadas diariamente por infecciones causadas por *S. aureus*, provocando problemas de susceptibilidad bacteriana ⁷.

Actualmente, *Staphylococcus aureus* se ha convertido en la bacteria más patógena en comparación a otros microorganismos, y es considerada de alto riesgo para la población debido a que está siendo la causante de altas tasas de mortalidad en el mundo ⁸.

Por esta razón se ha visto la necesidad de buscar nuevas alternativas que logren inhibir *Staphylococcus aureus*, aprovechando la gran diversidad de flora presente en Ecuador y tomando a *Passiflora quadrangularis* como un recurso principal, utilizando sus extractos que contienen metabolitos secundarios y que podrían lograr resolver algunos de los problemas de salud de la sociedad en general ^{9,10}.

La especie de *Passiflora quadrangularis* ha sido utilizada por nuestros ancestros en Latinoamérica y especialmente en Ecuador como medicina natural en el tratamiento de dolencias e infecciones producidas por microorganismos que hasta ese tiempo no eran identificados científicamente ¹⁰.

JUSTIFICACIÓN

La resistencia bacteriana se ha convertido en un problema emergente a nivel mundial, esto se debe al uso inadecuado e irracional de los antimicrobianos, llegando a generar cifras de morbilidad y mortalidad difíciles de cuantificar.

Una de las causas más frecuentes de enfermedades nosocomiales se debe a la bacteria *Staphylococcus aureus* que en la actualidad se encuentra provocando un grave problema de salud para la sociedad, volviéndose cada vez más resistente a diferentes tipos de antibióticos, debido a que es una bacteria muy versátil, generando rápidamente mutaciones genéticas en su estructura ¹¹.

Según la OMS en el año 2018, se ha incrementado la resistencia de infecciones de tipo bacteriano en el mundo, el sistema GLASS de vigilancia de resistencia de antibióticos emite un informe anual donde manifiesta el incremento de la susceptibilidad bacteriana afectando a casi 500.000 personas en las que se sospechaba enfermedades causadas por infecciones bacterianas ¹², siendo las más frecuentes *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *S. pneumoniae* provocando desde infecciones más simples hasta infecciones más peligrosas como neumonía, en un promedio de 22 países ^{12,13}.

Ecuador es un país que posee una gran biodiversidad de plantas que son utilizadas por la población ecuatoriana en un 80% como medicina alternativa, haciendo uso de sus extractos para aliviar o curar enfermedades, especialmente en las zonas rurales, cabe recalcar que *Passiflora quadrangularis* es una planta que crece en Ecuador y que a pesar de tener varias utilidades en la medicina tradicional, no ha sido estudiada en su totalidad en este país ¹⁴.

Por esta razón, el presente trabajo de investigación está encaminado al estudio fitoquímico de los tallos de *Passiflora quadrangularis*, para conocer los metabolitos secundarios presentes en esta planta, ya que de acuerdo a estudios científicos realizados en Latinoamérica son los que le proporcionan su acción terapéutica y de esta manera poder conocer si presenta actividad antibacteriana que logre la inhibición de *Staphylococcus aureus*.

HIPÓTESIS

El extracto metanólico obtenido de los tallos de *Passiflora quadrangularis* contienen metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES

Variable Independiente

- Presencia de metabolitos secundarios.

Variable Dependiente

- Susceptibilidad de *Staphylococcus aureus*.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico del tallo de *Passiflora quadrangularis* mediante el método modificado de pozos en agar para la inhibición de *Staphylococcus aureus*.

Objetivos Específicos

- Evaluar la composición química del extracto metanólico del tallo de *Passiflora quadrangularis*.
- Evaluar la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* frente al extracto metanólico del tallo de *Passiflora quadrangularis*.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto metanólico del tallo de *Passiflora quadrangularis* ante *Staphylococcus aureus*.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1. *Passiflora quadrangularis* (badea)

1.1.1. Taxonomía

La tabla 1 indica la clasificación taxonómica de *Passiflora quadrangularis*.

Tabla 1. Taxonomía de *Passiflora quadrangularis*.

Reino	Plantae
División	Angiospermae
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase	Dilleniidae
Familia	Passifloraceae
Género	<i>Passiflora</i>
Especie	<i>P. quadrangularis</i>
Orden	Violales

Fuente: Muñoz Garcés Diana Isabel (2016) ¹⁵.

1.1.2. Origen y distribución

La mayor parte de las especies de *Passiflora* son distribuidas en América Central y América del Sur ¹⁶. *Passiflora quadrangularis* es cultivada ampliamente en regiones con climas tropicales y subtropicales de América del Sur, crece a una temperatura que oscila entre 20°C a 25°C con una altitud entre 0 a 1000 msnm ¹⁷.

En Ecuador en la Provincia de El Oro crece una gran variedad de *Passiflora quadrangularis* en las zonas rurales de los cantones Santa Rosa, Machala y El Guabo, que se caracterizan por poseer climas tropicales.

1.1.3. Descripción botánica

La especie de *Passiflora quadrangularis* comúnmente conocida en Ecuador como badea se caracteriza principalmente por ser una especie de planta trepadora perteneciente a la familia *Passifloraceae* ¹⁸.

Posee tallos lisos, fuertes, gruesos y toscos de forma cuadrangular y espiral que llegan a medir hasta 50 metros, sus hojas son de color verde de forma oval de 8 a 15 cm de ancho y 10 a 30 cm de largo.

Sus flores son de colores llamativos y poseen una gran fragancia floral ¹⁶, sus sépalos son de color verde en su parte exterior y en su interior de color blanco y rosado, presenta pétalos rojos en su lado interno y blancos en su lado externo, su corona tiene 5 apéndices con pétalos de color morado proporcionando una gran ventaja para la atracción visual de sus polinizantes como son los insectos ^{18,19}.

Su fruto es conocido como la fruta de la pasión ¹⁶ y su forma es ovalada con textura carnosa y blanda de color amarillo pálido o blanco que miden 25 cm de largo, aproximadamente, sus semillas son duras de color negro.

1.1.4. Composición química de *Passiflora quadrangularis*

Según investigaciones científicas ¹⁷ las plantas del género *Passiflora* contienen una gran variedad de metabolitos secundarios como alcaloides, fenoles, flavonoides y terpenos.

1.1.5. Usos medicinales y aplicación

Passiflora quadrangularis, es utilizada como medicina tradicional como una fuente natural para prevenir problemas de hipertensión, sedante y para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos ²⁰.

1.2. Fitoquímica

1.2.1. Metabolitos secundarios

Las plantas tienen la capacidad de producir una gran variedad de metabolitos secundarios que son utilizados por ellas para su subsistencia como mecanismo de adaptación en los diferentes climas que existen en el mundo y como defensa contra microorganismo e insectos ²¹.

Los metabolitos secundarios tienen la capacidad de brindar a las especies vegetales sus diversas propiedades farmacológicas que son aprovechados para la elaboración de

muchos medicamentos de origen herbarios, son los que permiten que la planta logre la interacción ecológica con su entorno ²².

1.2.2. Metabolitos secundarios con acción antibacteriana

Los metabolitos secundarios que pueden brindarle la actividad antibacteriana a los extractos vegetales son las saponinas, flavonoides, taninos, compuestos fenólicos y quinonas ²³.

- **Saponinas:** las saponinas son glicósidos hidrosolubles forman parte de los metabolitos secundarios que tienen un amplio potencial farmacológico ²⁴.
- **Taninos:** son metabolitos secundarios pertenecientes al grupo de los compuestos fenólicos y están clasificados en dos grupos los condensados que son conocidos como proantocianidinas y los taninos hidrolizados ²³.
- **Fenoles:** los fenoles son metabolitos secundarios que se encuentran distribuidos ampliamente en especies vegetales y están compuestos por un anillo aromático (fenil) que se encuentra unido a un grupo hidroxilo (OH) ^{25,26}.
- **Flavonoides:** los flavonoides son el grupo más importante de los compuestos fenólicos que principalmente consiste en flavonoles, flavonas, antocianidas; todos estos metabolitos están formados por un núcleo flavan que tiene dos anillos aromáticos (A y B) junto a seis átomos de carbono conectados por un heterociclo incluyendo un anillo C (tres átomos de carbono) ^{27,28}.

1.3. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram-positiva, catalasa positiva, que presenta mayor importancia clínica para el ser humano debido a que puede convertirse en la especie más patógena en infecciones de piel y zonas blandas ^{29,30}. Esta bacteria forma parte de la flora normal de las superficies de las mucosas y de la piel de los seres humanos ³⁰.

En los ambientes hospitalarios *S. aureus* es uno de los principales agentes que causan infecciones intrahospitalarias en cuanto a los cuidados sanitarios que se realizan en pacientes que presentan heridas quirúrgicas ²⁹.

Una de las principales características de *S. aureus* es que tiene la gran capacidad de adquirir mecanismos de resistencia dentro de su estructura genética ante los antibióticos, convirtiéndose así en un problema de salud para la población más susceptible ³¹.

1.3.1. Caracterización

Staphylococcus aureus en observación al microscopio mediante una tinción de Gram presenta una morfología de cocos Gram positivos que se encuentran agrupados en forma de racimos, que miden, aproximadamente, entre 0,5 μm a 1,5 μm ³⁰.

S. aureus presenta en agar sangre colonias convexas de color amarillo con apariencia cremosa brillantes y bordes enteros ³². En este medio de cultivo se logra observar que *S. aureus* forma alrededor de sus colonias hemólisis beta.

En la caracterización enzimática *S. aureus* es catalasa positiva presentando burbujas, coagulasa positivo por formación de un coágulo, DNAsa positivo y también fermenta el manitol, lo que permite diferenciar de las diferentes especies que tiene el género *Staphylococcus* ³².

1.4. Medios de cultivo

Los medios de cultivos son fundamentales en el campo microbiológico, favorecen el crecimiento de microorganismos de interés para su identificación y observación. Están compuestos de nutrientes que ayudan a que las bacterias tengan un medio adecuado para su crecimiento, además implica someter a múltiples condiciones necesarias como son su temperatura, humedad, grados de alcalinidad o acidez adecuados.

1.4.1. Agar Mueller Hinton

Este medio de cultivo es muy utilizado en ensayos de susceptibilidad antibacteriana frente a los distintos antibióticos que se desean investigar. Una de las desventajas principales es que este medio de cultivo es higroscópico (logra absorber humedad muy rápido), por lo que el agar forma grumos y puede perder su eficacia. Es de color amarillo claro y necesita ser autoclavado a 121° C durante un tiempo de 15 minutos.

1.5. Susceptibilidad antibacteriana

La susceptibilidad antibacteriana son pruebas que se realizan *in vitro* y que tienen como finalidad evaluar la susceptibilidad de las cepas bacterianas (si son sensibles o resistentes). Estas pruebas forman parte de un seguimiento indispensable para la verificar la eficacia de tratamientos con antibióticos.

Los antibióticos son medicamentos que pueden ser de origen natural o sintético y tienen la finalidad de matar o lograr inhibir el crecimiento de las bacterias susceptibles³³. En la actualidad el mal uso o abuso excesivo de los antibióticos ha provocado que las bacterias se vuelvan resistentes y comprometen la efectividad ante estos tratamientos³³.

Por esta razón se ha generado mucho interés en la búsqueda de plantas medicinales que tengan metabolitos secundarios con interés farmacológico que logre reemplazar estos antibióticos³⁴. Para ello se realizan pruebas mediante métodos de susceptibilidad antibacteriana que logran apoyar a los investigadores en las terapias antibacterianas contra aquellos procesos infecciosos que producen las mismas, evaluando así su sensibilidad³⁴.

1.5.1. Método modificado de pozos en agar

El método modificado de pozos en agar es uno de los principales que se utilizan para la evaluación de la susceptibilidad antibacteriana, el cual permite determinar el efecto antibacteriano que poseen los extractos de plantas naturales sobre las bacterias que son de interés para las investigaciones³⁵.

Los resultados que se obtienen en este método son mediante mediciones de los diámetros que presentan los halos de inhibición que son producidos por efecto de los extractos³⁵.

Según investigaciones realizada por los autores Montero, M.; Vayas, L.; Avilés, D.; Pazmiño, P.; Erazo, V., 2018³⁴ el método modificado de pozos en agar es el que presenta mayor sensibilidad comparado con el método de Kirby-Bauer.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Tipo de investigación

Exploratorio.- Se realizó un estudio metódico de la planta *Passiflora quadrangularis* tanto de sus propiedades y componentes que posee la misma; también su ubicación y zona de plantación.

Observacional.- Es un estudio donde se observa la posible actividad antibacteriana del extracto metanólico de los tallos de *Passiflora quadrangularis*.

2.2. Lugar de la Investigación

La presente investigación fue realizada en la Universidad Técnica de Machala en el Laboratorio de Investigación Fitoquímica, Laboratorio de Investigación de Análisis Orgánico y Laboratorio de Bromatología de la Unidad Académica de Ciencias Químicas y de la Salud.

2.3. Universo y Muestra

Universo.- 4 plantas de *Passiflora quadrangularis* recolectada en la Provincia de El Oro, Cantón Santa Rosa en la Parroquia urbana Jumón.

Muestra.- Para el estudio e investigación respectiva se utilizaron 95 tallos de *Passiflora quadrangularis*.

2.4. Descripción del área de estudio

El estudio fue realizado en el cantón Santa Rosa, provincia de El Oro en la zona 7. El área de estudio está localizado en la Parroquia urbana Jumón, sitio Miraflores, sembrada en la Finca Montaña Flores -3.464846,-80.0035729.

2.5. Características de la zona del lugar de estudio

La planta *Passiflora quadrangularis* está cultivada en una finca la cual posee un suelo húmido muy fértil y rico en abono de materia orgánica, donde se cultivan frutos y vegetales para su venta y consumo, la zona cuenta con un clima tropical, lo cual favorece el crecimiento de *Passiflora quadrangularis*. Su mantenimiento y control de riego es realizado por agricultores y propietarios de la finca.

2.6. MATERIALES

2.6.1. Material Vegetal

- Tallos de *Passiflora quadrangularis*.

2.6.2. Material Microbiológico

- Cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)

2.6.3. Materiales de Laboratorio

2.6.3.1. Equipos

- Tamiz
- Estufa Memmert
- Balanza analítica
- Mufla Thermolyne
- Molino casero
- Autoclave Fanem (Vertical modelo 415)
- Incubadora Incucell
- Ultrasonic (Bath 5.7L Fisher Scientific)
- Turbidometer (0.5 Mcfarland)
- Rotoevaporador (Heidolph Rotary Evaporator Laborota 4001 efficient)
- TLC (Thin Layer Chromatography) plates sílica gel matrix UV 254 0.25nm de espesor
- Campana
- Cocineta eléctrica

2.6.3.2. Materiales

- Cápsulas de porcelana
- Crisol de porcelana
- Vasos de precipitación de 50 mL y 100 mL
- Pipetas graduadas de 5 mL, 10 mL y 50 mL
- Pipetas volumétricas de 1 mL, 5 mL y 10 mL.
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL, 500 mL, y 1000 mL

- Varilla de vidrio
- Papel aluminio
- Lápiz graso
- Tijeras
- Papel filtro poroso
- Gasas
- Papel absorbente
- Hisopos estériles
- Pinzas estériles
- Mechero de alcohol
- Asa de platino punta redonda
- Cajas Petri estériles
- Fundas herméticas de plástico
- Soporte
- Gradillas
- Espátula
- Bata de laboratorio
- Mascarilla
- Guantes
- Zapatones
- Cofia

2.6.3.3. Sustancias y reactivos

- Agua destilada
- Metanol 99% de pureza
- Alcohol potable
- Alcohol industrial
- Agar Mueller Hinton
- Agar sangre de cordero 5%
- Agar Manitol Salado
- Suero fisiológico

2.7. MÉTODOS

2.7.1. Método para la obtención de la droga vegetal

2.7.1.2. Recolección y selección

Este proceso permitió separar los tallos de las plantas que van a ser utilizados en este estudio, los tallos fueron recolectados en horas de la mañana y la tarde con la finalidad de no provocar daños en la planta, cortados con un machete previamente esterilizado, luego fueron seleccionados de manera minuciosa, que no presenten daños por insectos o nematodos, maltrato o contaminación por alguna materia inorgánica que pueda provocar alteraciones en la investigación.

2.7.1.3. Preparación de la muestra

El lavado de los tallos se realizó con agua potable para eliminar el polvo, luego con agua destilada y suero fisiológico para obtener tallos libres de contaminación, utilizando las debidas medidas de asepsia. Luego, se procedió al secado de los tallos que fue realizado al ambiente durante 2 días en una prensa artesanal con mallas dentro de una habitación totalmente estéril y libre de exposición directa a los rayos solares y fuertes corrientes de aire. Posteriormente fue secada en una estufa a 50 °C por 48 horas. La planta seca fue cortada en tamaños de 15 cm, aproximadamente, y triturada en un molino manual, para obtener su pulverización fue tamizada con tamiz N° 18 para conseguir un polvo uniforme de la droga vegetal, este proceso permite la liberación de humedad presente en la materia vegetal para evitar el crecimiento de microorganismos. Finalmente se procedió a triturar, pulverizar y tamizar el material vegetal.

2.7.2. Método gravimétrico para el control de calidad de la droga vegetal

2.7.2.1 Determinación del porcentaje de humedad

Se entiende por porcentaje de humedad a la pérdida de agua que contiene la droga vegetal y que es llevada a desecación hasta que la droga tenga un peso constante. Se pesó la droga cruda, la cual fue transferida a una cápsula de porcelana previamente desecada y tarada ³⁶.

La cápsula con la muestra fue llevada a una estufa de secado marca Mermet a una temperatura de 105 °C durante 3 horas hasta lograr obtener un peso constante, luego se procedió a colocar la cápsula en el desecador con la finalidad de que alcance una temperatura ambiente durante un tiempo de 20 minutos y después se procedió a pesar en una balanza analítica ³⁶.

Los resultados se expresaron de la siguiente manera:

$$\%H = \frac{M_1 - M_2}{M_1 - M} \times 100$$

%H= porcentaje del contenido de humedad en la muestra en estudio

M= gramos de la cápsula vacía tarada

M1= gramos de la cápsula con la muestra desecada

M2= gramos de la cápsula con la muestra en estudio

100= factor matemático

2.7.2.2. Determinación de cenizas totales

Se pesa la droga pulverizada en un crisol de porcelana previamente tarado, fue trasladado a una mufla para su carbonización e incineración a 750° C por 3 horas, posteriormente fue colocada en un desecador durante 20 minutos para proceder a su pesado en una balanza analítica ³⁶.

Los resultados fueron reemplazados en la siguiente fórmula:

$$\%CT = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100$$

%CT = porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M = gramos del crisol vacío

M1= gramos del crisol con la muestra

M2= gramos del crisol con la ceniza

100= factor matemático

2.7.2.3 Determinación de cenizas solubles en agua

A las cenizas totales que se obtuvieron se le agregó 20 mL de agua destilada, se tapó con una luna de reloj y fue llevada a una cocineta eléctrica para calentar durante 5 minutos,

posteriormente fue filtrada con un papel filtro libre de cenizas previamente tarado, el papel filtro fue calcinado con la ayuda de un mechero y colocado en el crisol para ser llevado a una mufla durante 2 horas para su calcinación e incineración, se enfrió el crisol en un desecador durante 20 minutos y pesado en una balanza analítica ³⁶.

Los resultados se expresaron de la siguiente manera:

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

%CA = porcentaje de cenizas solubles en agua.

M2 = gramos del crisol con las cenizas totales.

Ma = gramos del crisol con las cenizas insolubles en agua.

M1 = gramos del crisol con la muestra de estudio.

M = gramos del crisol vacío.

100 = factor matemático.

2.7.2.4. Determinación de cenizas insolubles en ácido clorhídrico

A las cenizas totales se las coloca en un crisol y se agrega HCl, se procede a tapanlo. Se calienta en baño maría, la solución obtenida es filtrada, el residuo se lava con agua caliente. El filtrado se lleva a desecación, se transfiere a un crisol para ser incinerado en una mufla. El resultado final es colocado en un desecador, pesado y se repite hasta obtener una masa constante ³⁶. Expresión de resultados:

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

%CI = porcentaje de cenizas insolubles en ácido clorhídrico en base hidratada.

M2 = gramos del crisol con las cenizas totales.

Ma = gramos del crisol con las cenizas insolubles en agua.

M1 = gramos del crisol con la muestra de estudio.

M = gramos del crisol vacío.

100 = factor matemático.

2.7.3. Métodos de preparación de los extractos orgánicos

La preparación de los extractos nos permite extraer los metabolitos secundarios que contiene la planta mediante el disolvente utilizado que es el metanol.

2.7.3.1. Extracto líquido por maceración

Este método fue aplicado para no alterar los principios activos por el calor, para la cual se procedió a pesar 20 g de la droga vegetal y se humectó durante 45 minutos con 40 mL de metanol 99.9% grados analítico de pureza, luego se completó con 60 mL de metanol, se lo dejó reposar durante 3 días y fue movido el día 2 con la finalidad de favorecer en el proceso de extracción.

Los extractos fueron filtrados mediante un papel filtro libre de cenizas. El extracto fue almacenado en un frasco de vidrio color ámbar, los cuales fueron previamente etiquetados, hasta la ejecución de su posterior análisis.

2.7.3.2. Extracto seco concentrado por rotoevaporador

Para la obtención del extracto seco se pesó 20 g de la droga en 100 mL de metanol 99.9% grado analítico de pureza, luego fue llevado a ultrasonido por 45 minutos y posteriormente fue llevado a sequedad en el rotoevaporador al vacío hasta obtener el extracto concentrado libre de metanol. La muestra del extracto seco obtenido fue pesada en una balanza analítica para obtener el rendimiento obtenido de ese extracto.

Para expresar los resultados del extracto seco se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%Rendimiento = \frac{p \times 100}{m}$$

2.7.4. Tamizaje fitoquímico

Se realizó la identificación de metabolitos secundarios de manera cualitativa presentes en los tallos de *Passiflora quadrangularis* en un extracto alcohólico, de la siguiente manera³⁶:

2.7.4.1. Determinación de alcaloides

- Ensayo de Dragendorff:

Permite reconocer en un extracto la presencia de alcaloides, si la alícuota del extracto está disuelta en un solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua maría y el residuo volverse a disolver en 1 mL de ácido clorhídrico al 1% en agua. Si el extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez). Con la solución acuosa ácida se realiza el ensayo, añadiendo 3 gotas del reactivo de Dragendorff, si hay opalescencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++).

- **Ensayo de Mayer:**

Proceda de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Añadir una pizca de ClNa en polvo, agite y filtre. Añada 2 ó 3 gotas de la solución reactiva de Mayer, si se observa opalescencia (+), turbidez definida (++), precipitado coposo (+++).

- **Ensayo de Wagner:**

Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 ó 3 gotas del reactivo, clasificando los resultados de la misma forma.

Observación: En el caso de alcaloides cuaternarios, éstos solo se encontrarán en el extracto acuoso y para considerar su presencia la reacción debe ser (++) ó (+++), en todos los casos, ya que un resultado (+), puede provenir de una extracción incompleta de bases primarias, secundarias o terciarias.

2.7.4.2. Determinación de taninos

- **Ensayo del cloruro férrico:**

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9% en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos. A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

Coloración rojo-vino, compuestos fenólicos en general.

Coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.

Coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos.

2.7.4.3. Determinación de flavonoides

Ensayo de Shinoda: Permite reconocer la presencia de flavonoides en un extracto vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Se espera 5 minutos después de la reacción y se añade 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases

y se deja reposar hasta observar separación. Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos.

2.7.4.4. Determinación de azúcares reductores

Ensayo de Fehling: Permite reconocer la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuentra en agua, debe evaporarse el solvente en baño maría y el residuo volverse a disolver en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño maría de 5 a 10 minutos la mezcla. Se considera el ensayo positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo.

2.7.4.5. Determinación de saponinas

Ensayo de espuma: Permite reconocer saponinas tanto de tipo esteroideal como triterpénicas. Se diluye la solución con 5 veces su volumen en agua y se agita fuertemente la mezcla durante unos 5 a 10 minutos. Se considera positivo el ensayo si aparece espuma en la superficie del líquido con una altura de más de 2 mm y además si la espuma persiste por más de 2 minutos.

2.7.5. Cromatografía en capa delgada (CCD)

Para el análisis cualitativo de CCD se utilizó como fase estacionaria placas de Sílica Gel fluorescent UV 254 MACHEREY-NAGEL 0.25 mm de espesor ³⁶.

Las placas fueron colocadas sobre una base de vidrio sosteniéndola por los extremos y cortadas con un bisturí, con un lápiz fueron señalados los puntos donde será aplicada la muestra y se procedió a tomarla con un capilar de vidrio haciendo aplicaciones pequeñas sobre la placa y secadas al ambiente.

Para la corrida cromatográfica se utilizó una cámara de extractor de gases bajo temperatura ambiente 25-29 °C ³⁶.

La fase móvil utilizada fue una mezcla de disolventes químicamente puros: butanol: ácido acético: agua destilada (65:25:10) ³⁶.

Luego de la corrida cromatográfica, la placa fue secada a temperatura ambiente y bajo la corriente de aire de la campana de laboratorio.

Los revelados que se realizaron fueron dos: físico y químico. El revelado físico se realizó mediante luz UV con una longitud de onda de 254 nm y 365 nm; para el revelado químico se utilizaron dos técnicas: ácido sulfúrico+calor (compuestos fenólicos) y ácido sulfúrico+calor+vainillina+calor (fenoles, terpenos y saponinas) ³⁶.

Las placas fueron rociadas con un nebulizador y colocadas en una plancha de calentamiento a temperatura de 105 y 110 °C durante un tiempo de 3-5 minutos, hasta observar una modificación en su apariencia ³⁶.

2.7.6. Método microbiológico

2.7.6.1. Método modificado de pozos en agar

Para la evaluación antibacteriana se obtuvo una cepa de la bacteria *S. aureus* (ATCC 25923) que fue diluida en tubo de ensayo utilizando 5 mL de suero fisiológico hasta obtener una solución a 0.5 en la escala de McFarland, que es un patrón de turbidez. Se utilizó cajas Petri desechables con agar Mueller Hinton, en las cuales se inocularon con cepas de *S. aureus* mediante la técnica de plateado. Posteriormente con la ayuda de un sacabocados de 6 mm de diámetro, se procedió a realizar perforaciones en el agar Mueller Hinton ³⁵. A cada uno de los pocillos se le añadió 50 µl del extracto metanólico concentrado de *Passiflora quadrangularis* por triplicado, dejando secar por 10 minutos y luego placas fueron incubadas a 35±2°C por 24 horas. Todo este procedimiento se realizó en una cámara de flujo laminar para conservar el ambiente estéril y seguir las respectivas normas de bioseguridad ³⁵. Para los resultados se mide la sensibilidad o resistencia mediante la presencia de los halos de inhibición.

2.7.8. Análisis estadístico

El análisis del control de calidad de la droga cruda del tallo de *Passiflora quadrangularis* fue procesado mediante el software IBM SPSS 21, expresados como media/desviación estándar, con un nivel significativo (p=0.05).

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1. Porcentajes obtenidos por el método gravimétrico de los tallos de *Passiflora quadrangularis*

La tabla 2 muestra los porcentajes obtenidos en el método gravimétrico para el control de calidad de la droga vegetal.

Tabla 2. Porcentaje de humedad, porcentaje de cenizas totales y cenizas solubles en agua en droga cruda de *Passiflora quadrangularis*.

Muestra	Humedad %	Cenizas totales %	CS en agua %	CI en ácido clorhídrico %
	X/DS	X/DS	X/DS	X/DS
Tallos	8,0/0,07	3,5/0,0	1,8/0,04	0,6/0,0

Interpretación: X= media; DS= desviación estándar; CS: cenizas solubles; CI: Cenizas insolubles.

De acuerdo al rango de porcentaje de humedad obtenido de los tallos de *Passiflora quadrangularis*, se obtuvo el valor mínimo de 8,0%, cumpliendo con el rango establecido según la Farmacopea Española, con lo que se garantiza que el polvo de la droga vegetal tiene menores posibilidades de ser un medio propicio para la proliferación de ningún tipo de microorganismo.

Los tallos de *Passiflora quadrangularis* obtuvieron un valor de cenizas totales menor (3,5%), que indica la droga se encuentra en estado óptimo para ser utilizada ya que se encuentra dentro de los parámetros establecidos, lo cual se garantiza que hubo un adecuado procedimiento de recolección, lavado, secado y almacenado de la droga vegetal³⁷.

El porcentaje de cenizas solubles obtuvo el 1,8% que corresponde a los minerales y nutrientes propios de la planta, las cenizas insolubles reflejan un valor mínimo de 0,6% en los tallos de *Passiflora quadrangularis* cumpliendo así con los límites establecidos por lo cual certifica hay poca contaminación por presencia de sílice principalmente de arena o tierra, y por ende la droga puede ser utilizada para la presente investigación.

3.2. Obtención del rendimiento del extracto metanólico

Una vez realizada la extracción de la muestra se obtuvo un rendimiento del 4,14 % m/m del extracto seco concentrado.

3.3. Tamizaje fitoquímico

En la tabla 3 se muestra el estudio fitoquímico cualitativo realizado al extracto metanólico de los tallos de *Passiflora quadrangularis*.

Tabla 3. Metabolitos secundarios presentes en extracto metanólico

Ensayo	Metabolitos	Extracto alcohólico
Dragendorff	Alcaloides	+
Shinoda	Flavonoides	++
Fehling	Azúcares reductores	+++
Cloruro férrico	Fenoles y taninos	++
Mayer	Alcaloides	+
Wagner	Alcaloides	+
Espuma	Saponinas	+++

Interpretación: Baja evidencia de metabolito secundario (+), evidencia leve de metabolito secundario (++) y alta evidencia de metabolito secundario (+++).

En los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico realizado al extracto metanólico de los tallos de *Passiflora quadrangularis* se logró identificar cualitativamente la presencia de metabolitos secundarios, de los cuales se observó una alta evidencia de azúcares reductores y saponinas; con una evidencia leve de flavonoides, fenoles y taninos; y en baja evidencia de metabolitos secundarios se encontraron a los alcaloides.

De esta manera es comprobado cualitativamente la composición química del tallo de *Passiflora quadrangularis*^{16,18}, cabe recalcar que para la realización del presente trabajo de investigación los metabolitos de mayor importancia son las saponinas, fenoles y taninos.

3.4. Cromatografía en Capa Delgada (CCD)

El extracto metanólico del tallo de *Passiflora quadrangularis* fue sometido a un análisis cualitativo preliminar, realizado mediante un estudio por Cromatografía en Capa Delgada donde los metabolitos secundarios fueron visualizados mediante revelados cromatográficos físico y químico.

3.4.1. Revelado físico con luz UV 254 nm y 365 nm

Al efectuar el análisis por CCD, los cromatogramas obtenidos para las muestras de extracto metanólico del tallo de *Passiflora quadrangularis*, utilizando como fase móvil una mezcla de disolventes químicamente puros: butanol: ácido acético: agua destilada (65:25:10), fueron revelados bajo luz UV a (254 nm y 365 nm) donde se demuestra la presencia de manchas con fluorescencia color azul y con valores de Rf 0,5 lo que sugiere la presencia en su estructura química de grupos de cromóforos conjugados, donde se puede evidenciar que se podría tratar de compuestos fenólicos u otros metabolitos secundarios que tengan la misma función estructural ⁴⁰.

Ilustración 1. Cromatografía en Capa Delgada (CCD) revelado con luz UV 254 nm

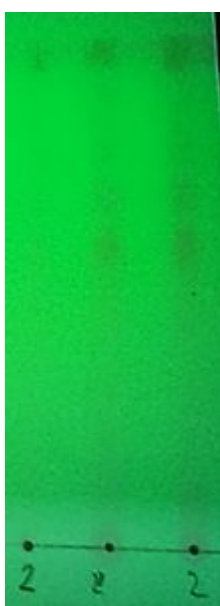
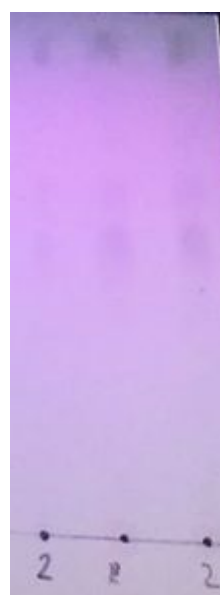


Ilustración 2. Cromatografía en Capa Delgada (CCD) revelado con luz UV 365 nm



3.4.2. Revelado químico

En el análisis por CCD, revelado químico del extracto metanólico del tallo de *Passiflora quadrangularis* se emplearon dos técnicas: (ácido sulfúrico + calor) y (ácido sulfúrico + calor + vainillina + calor); y en ambas corridas cromatográficas se utilizaron como fase móvil butanol: ácido acético: agua destilada (65:25:10).

En el revelado con luz Ácido Sulfúrico + calor que se muestra en la ilustración 3 se puede observar en el cromatograma la presencia de manchas de color amarillo y azul, lo cual puede sugerir la presencia de compuestos fenólicos ³⁹. Tomando en cuenta las sugerencias por los autores Verdugo y Tola (2017) ⁴⁰, en la ilustración 4 del revelado con luz Ácido Sulfúrico + Vainillina + calor, se logra evidenciar la existencia de manchas de color rojo al ser rociados con vainillina se relaciona con la presencia de compuestos fenólicos ³⁹ y clorofila en su estructura; además tomando en cuenta se observa manchas moradas y verdes que puede sugerir triterpenos y flavonoides.

Ilustración 3. Cromatografía en Capa Delgada (CCD) revelado con Ácido Sulfúrico + calor.

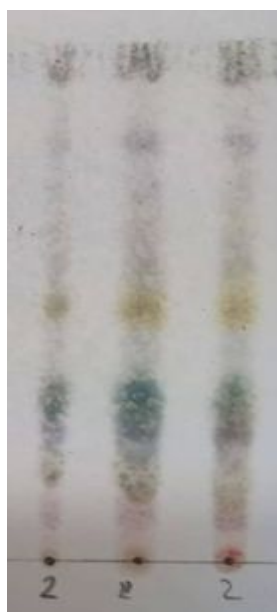


Ilustración 4. Cromatografía en Capa Delgada (CCD) revelado con Ácido Sulfúrico + Vainillina + calor.



3.5. Actividad antibacteriana ante *Staphylococcus aureus*

La presencia de los metabolitos secundarios en los tallos de *Passiflora quadrangularis* son una parte esencial en la acción contra las bacterias patógenas como lo es *S. aureus*, sin embargo, cabe recalcar que esto se debe al tipo de disolvente que se utilizó en este caso el metanol, que logró extraer los metabolitos secundarios con acción antibacteriana.

Antes de comenzar la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Passiflora quadrangularis* se procedió a comprobar la acción del metanol ante la bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), para lo cual se colocó en los pocillos metanol puro, sin embargo este no tuvo interferencia alguna con el crecimiento de *S. aureus* como se muestra en la ilustración 5.

Ilustración 5. Crecimiento de *Staphylococcus aureus* en metanol puro



Para comprobar la actividad antibacteriana del extracto del tallo de *Passiflora quadrangularis* y la concentración mínima inhibitoria de acuerdo al método modificado de pozos en agar ³⁵ para la inhibición de *S. aureus* (ATCC 25923), se lo ejecutó

mediante triplicados a diferentes concentraciones del extracto, como se muestra en la tabla 4.

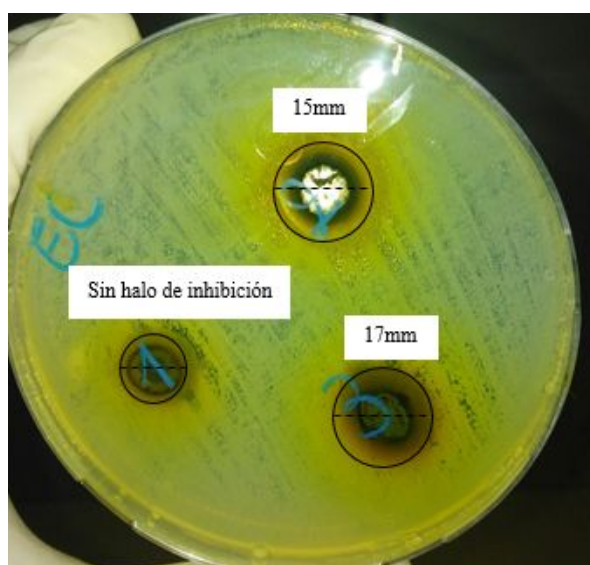
Tabla 4. Actividad antibacteriana del extracto de *Passiflora quadrangularis*

Muestras	Diámetros de los halos de inhibición (mm)		
	Cepa estudiada: <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)		
	N° de Réplicas		
Concentraciones del extracto (mg/mL)	1	2	3
200 mg/mL	-	-	-
400 mg/mL	15 mm	14,9 mm	15 mm
800 mg/mL	17 mm	17 mm	17 mm

Interpretación: Ausencia de halo de inhibición (-)

Para determinar la susceptibilidad bacteriana se midieron los tamaños de los halos de inhibición de las concentraciones de 200 mg/mL, 400 mg/mL y 800 mg/mL; que fueron interpretados de acuerdo a la técnica de actividad terapéutica sugerida por los autores Tapia y Armas (2014) ⁴¹, de las cuales se obtuvieron los siguientes resultados: en 200 mg/mL no se mostraron halos de inhibición por lo que se consideró resistente (R), en 400 mg/mL se mostraron halos de inhibición que oscilaron entre 14,9 mm y 15 mm de diámetro considerándose sensible (S) y en concentración de 800 mg/mL hubo susceptibilidad con halos de inhibición de 17 mm de diámetro, siendo sensible (S), tal como se presenta en la tabla 4 e ilustración 6.

Ilustración 6. Halos de inhibición en agar Mueller Hinton mediante el método modificado de pozos en agar.



Teniendo en cuenta los resultados se evidencia que la concentración mínima inhibitoria es de 400 mg/mL, debido a que a esta concentración del extracto se formó el primer halo de inhibición que fue de 15 mm.

3.6. Discusión

En el control de calidad de la droga vegetal de los tallos de *Passiflora quadrangularis* se determinó que el porcentaje de humedad fue de 8,0% indicando que el método de secado de la droga fue efectivo y de esta manera no será susceptible a la proliferación de microorganismos ¹, el porcentaje de cenizas totales fue de 3,5%, cenizas solubles en agua 1,8% y cenizas insolubles en ácido clorhídrico 0,6% cuyos valores se mantuvieron dentro de los parámetros establecidos por la farmacopea española y nos indica que los procedimientos utilizados fueron los adecuados para obtener la droga vegetal en óptimas condiciones ¹.

En el estudio fitoquímico del extracto metanólico del tallo de *Passiflora quadrangularis* se determinó la presencia de metabolitos secundarios que posee esta planta en su composición química como una alta evidencia de saponinas y azúcares reductores, evidencia leve de flavonoides, fenoles y taninos, baja evidencia de alcaloides. Lo cual se asemeja a estudios realizados por Adriana Martínez 2019 ⁴² en la parte aérea de esta planta. Estos resultados fueron comprobados mediante Cromatografía en Capa Delgada donde se evidenció mediante revelado bajo luz UV a (254 nm y 365 nm) manchas azules que sugieren la presencia de metabolitos cromóforos conjugados que se puede tratar de compuestos fenólicos ⁴⁰, en el revelado con ácido sulfúrico + calor se presenciaron manchas de color amarillo y azul lo cual puede sugerir la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos ^{39,40}, en la técnica ácido sulfúrico + vainillina + calor se presenció manchas rojas evidenciando compuestos fenólicos y clorofila, manchas moradas y verdes puede sugerir triterpenos y flavonoides ⁴⁰.

La actividad antibacteriana del extracto metanólico de los tallos de *Passiflora quadrangularis* fue comprobada en la presente investigación utilizando diferentes concentraciones del extracto, sin embargo, en 400 mg/mL y 800 mg/mL fue sensible (S) evidenciando un halo de inhibición de 14,9 mm y 17 mm de diámetro logrando inhibir a

Staphylococcus aureus (ATCC 25923) y en 200 mg/mL fue resistente (R) ya que no presentó halo de inhibición ⁴¹, de esta manera se logró determinar que la concentración mínima inhibitoria es de 400 mg/mL, cabe recalcar que esto se debe a la composición química de la planta que tiene metabolitos secundarios que son: saponinas, fenoles, flavonoides y taninos, lo cuales brindan a la planta su potencial antibacteriano que logra afectar directamente la membrana de esta bacteria y por ende inhibir su crecimiento ocasionándole la muerte ^{43,44}.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES

- Se logró evaluar cualitativamente la composición química del extracto metanólico del tallo de *Passiflora quadrangularis* mediante el tamizaje fitoquímico y CCD evidenciando la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, fenoles, taninos y saponinas que son responsables de atribuir la actividad antibacteriana a esta planta.
- El extracto metanólico del tallo de *Passiflora quadrangularis* tiene potencial antibacteriano in vitro frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) a concentraciones de 400 mg/mL y 800 mg/mL siendo sensible (S) con halos de inhibición que oscilan entre 14,9 mm y 17 mm logrando la inhibición de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), por lo tanto la concentración mínima inhibitoria es de 400 mg/mL.

CAPÍTULO V. RECOMENDACIONES

- Se recomienda probar la susceptibilidad que posee el extracto concentrado del tallo de *Passiflora quadrangularis* ante hongos u otros microorganismos.
- Se recomienda realizar al extracto metanólico del tallo de *Passiflora quadrangularis* un estudio para cuantificar los metabolitos secundarios que se encuentran presentes en el tallo de esta planta.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Márquez, I.; Bastidas, T.; Fernández, G.; Campo, M.; Jaramillo, C.; Rojas, L. Estudio farmacognóstico preliminar de tallo y raíz de la especie *Moringa Oleífera* cosechada en Machala. *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2017**, *22* (1), 1-13.
- (2) Silverio, C. Determinación de flavonoides y glucósidos en *Verbena litoralis*, Universidad de Guayaquil, 2016.
- (3) Arteaga, L.; Espinosa, Y.; Chávez, M. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* que coloniza el personal de salud de un hospital de la ciudad de Cali. *Rev. Ciencias la Salud* **2015**, *14* (1), 9-19. <https://doi.org/https://doi.org/10.12804/revsalud14.01.2016.01>.
- (4) Bareño, L.; Puebla, P.; Guerra, C.; Feliciano, A.; Isaza, G.; Guerrero, M. *Passiflora quadrangularis* L . Prevents experimental hypertension and vascular remodelling in rats exposed to nitric oxide deficit. *Vitae* **2017**, *24* (3),186-195. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.17533/udea.vitae.v24n4a04>.
- (5) Medina, D.; Machado, M.; Machado, J. Resistencia a antibióticos, una crisis global. *Rev. Médica Risaralda* **2015**, *21* (1), 74.
- (6) Horna, G.; Astocondor, L.; Jacob, J.; García, C. Evaluación de métodos fenotípicos para la detección de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. *Rev. Española Quimioter.* **2015**, *28* (2), 98-100.
- (7) Aguayo, A.; Quezada, M.; Mella, S.; Gisela, R.; Opazo, A.; Bello, H.; Domínguez, M.; González, G. Bases moleculares de la resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*. *Rev. Chil. infectología* **2018**, *35* (1), 7-14.
- (8) Barrero, L.; Castillo, J.; Leal, A.; Sánchez, R.; Cortés, J. A.; Álvarez, C. A.; González, A.; GREBO. Impacto económico de la resistencia a la meticilina

- en pacientes con bacteriemia por *Staphylococcus aureus* en hospitales de Bogotá. *Biomédica* **2014**, *34* (3), 345-353. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v34i3.1692>.
- (9) Arroyave, S.; Atehortúa, D.; Jaimes, F. Actualización en bacteriemia por *Staphylococcus aureus*. *Med. U.P.B.* **2014**, *33* (1), 48-55.
- (10) Quintana, M.; Ramírez, E. Acción del extracto hidroalcohólico de hojas de *Tessaria integrifolia* R. et P. sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, in vitro., Universidad Nacional de Trujillo, 2018.
- (11) Velásquez, A. Estudio del manejo postcosecha de la badea *Passiflora quadrangularis* L., Universidad técnica del norte, 2016.
- (12) Gómez, L.; Núñez, D.; Perozo, A.; Bermúdez, J.; Milagros, M. *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple a los antibióticos (MDR) en un Hospital de Maracaibo- Venezuela. *Kasmera* **2016**, *44* (1), 53-65.
- (13) Lindmeier, C. Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo <https://www.who.int/es/news-room/detail/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>.
- (14) Rodríguez, E. A.; Jiménez, J. Factores relacionados con la colonización por *Staphylococcus aureus*. *Iatreia* **2015**, *28* (1), 66-77.
- (15) Gallegos, M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *An. la Fac. Med.* **2016**, *77* (4), 327-332. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/anales.v77i4.12647>.
- (16) Muñoz, D. Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antioxidante In Vitro de hojas y flores de *Passiflora quadrangularis*., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2016.

- (17) Montero, D.; Ortíz, M.; Meletti, L.; Van, M.; Polozzi, S. Floral scent of brazilian *Passiflora*: five species analysed by dynamic headspace. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2016**, *88* (3), 1191-1200. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201620150285>.
- (18) Ramaiya, S.; Bujang, J.; Zakaria, M. Assessment of total phenolic , antioxidant , and antibacterial activities of *Passiflora species*. *Sci. World J.* **2014**, 1-10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2014/167309>.
- (19) Esquerre, B. *Passiflora dorisiae*, una nueva especie en el Subgénero *Passiflora* (*Passifloraceae*). *Rev. Peru. Biol.* **2015**, *22* (3), 303-308. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v22i3.11435>.
- (20) Zerpa, M.; Otahola, V. Morfoanatomía del tallo de tres especies del género *Passiflora* L. *Passifloraceae*. *Rev. Multidiscip. del Cons. Investig. la Univ. Oriente* **2014**, *26* (2), 114-120.
- (21) Vélez, M.; Campos, R.; Sánchez, H. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Rev. Mex. Fitopatol.* **2014**, *17* (3), 489-499.
- (22) Verde, M.; García, S.; Rivas, C. Metodología científica para el estudio de plantas medicinales. *OmniaScience* **2016**, 1-40. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3926/oms.335>.
- (23) Soto, M.; Soto, K.; Santos, A.; Moncayo, N. Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la raíz de *Rumex crispus* L. *Química viva* **2015**, *14* (3), 63-70.
- (24) Mena, L.; Tamargo, B.; Salas, E.; Plaza, L.; Blanco, Y.; Otero, A.; Sierra, G. Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). *Rev. Cuba. Plantas Med.* **2015**, *20* (1), 106-116.

- (25) Leyva, J.; Pérez, J.; González, G.; Esqueda, M.; Ayala, J. Funcionalidad antibacteriana y antioxidante de extractos hidroalcohólicos de *Phellinus merrillii*. *Rev. Mex. Micol.* **2013**, *37*, 11-17.
- (26) Peñarrieta, M.; Tejeda, L.; Mollinedo, P.; Vila, J.; Bravo, J. Compuestos fenólicos y su presencia en alimentos. *Rev. Boliv. Química* **2014**, *31* (2), 68-81.
- (27) Lillo, A.; Carvajal, F.; Nuñez, D.; Balboa, N.; Alvear, M. Cuantificación espectrofotométrica de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en distintos berries nativos del Cono Sur de América. *Rev. Investig. Agropecu.* **2016**, *42* (2), 168-174.
- (28) Ling, G.; Qi, S.; Shaoying, G.; Xue, B.; Wen, J.; Wei, X.; Peng, F. Antimicrobial activity and action approach of the olive oil polyphenol extract against listeria monocytogenes. *Front. Microbiol.* **2019**, *10* (1586), 1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01586>.
- (29) Duquesne, A.; Castro, N.; Monzote, A.; Paredes, I. Panorama Cuba y Salud. *Panor. Cuba y Salud* **2015**, *10* (2), 17-22.
- (30) Becerra, J.; Cabrera, J.; Solano, M. Efecto antibacteriano de la miel de abeja en diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus*. *Rev. Científica Cienc. Médica* **2016**, *19* (2), 38-42. <https://doi.org/http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=426049510007>.
- (31) Pimenta, L.; Marchetti, D.; Fleck, L.; Gambero, G.; Aparecida, M.; Gir, E. *Staphylococcus aureus* in nursing professionals and the microorganism's susceptibility profile to antimicrobials. *Texto Context. Enferm.* **2017**, *26* (2), 2-8. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/0104-07072017000400016>.
- (32) Torres, Q.; Alvarado, C.; Roa de la Fuente, L.; Pedraza, P.; Flores, M.; Méndez, J.; Vilchis, M.; Mendoza, P. Síntesis de (E)-1,3-difenil-prop-2-en-1-ona y su evaluación sobre el crecimiento de una

- cepa de *S. aureus* farmacorresistente. *Rev. Mex. Ciencias Farm.* **2017**, *48* (3), 67-74.
- (33) Tesfaye, H.; Alemayehu, H.; Desta, A. F.; Eguale, T. Antimicrobial susceptibility profile of selected Enterobacteriaceae in wastewater samples from health facilities, abattoir, downstream rivers and a WWTP in Addis Ababa, Ethiopia. *BioMed Cent.* **2019**, *8* (134), 1-11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13756-019-0588-1>.
- (34) Montero, M.; Vayas, L.; Avilés, D.; Pazmiño, P.; Erazo, V. Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus*. *Rev. Investig. Vet. del Perú* **2018**, *29* (4), 1543-1547. <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15185>.
- (35) Sánchez, E.; Castillo, S.; García, P. Actividad antimicrobiana. *Investig. plantas importancia médica* **2016**, 77-100. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3926/oms.334>.
- (36) Miranda, M.; Cuéllar, A. *Manual de Prácticas de Laboratorio. Farmacognosia y Productos Naturales.*, Editorial.; La Habana, 2001.
- (37) Sánchez, K. Composición química y potencial biológico de una muestra de propóleos ecuatoriano., Universidad Técnica de Machala, 2017.
- (38) Parra, J. Evaluación farmacognóstica y fitoquímica de las hojas de escancel (*Aerva sanguinolenta*) de la ciudad de Machala, Universidad Técnica de Machala, 2018.
- (39) Cuesta, O.; Márquez, I.; Campo, M. *Introducción a la Caracterización Estructural de Flavonoides*, Ediciones.; 2015.
- (40) Verdugo, M.; Tola, B. Capacidad antioxidante y composición química de varios extractos de propóleos de la zona sur del Ecuador, Universidad Politécnica Salesiana, 2017.

- (41) Tapia, W.; Armas, G. Estudio de la actividad antibacteriana y tóxica del Kinship (*Jacaranda copaia*). *La Granja. Rev. ciencias la vida*. **2014**, *19* (1), 12-20.
- (42) Martínez, M. Formulación y control de calidad de un fotoprotector a base de badea., Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, 2019.
- (43) Rubio, Y.; Valdivia, A.; Camacho, C.; Matos, M.; Sosa, M.; Pérez, Y. Composición fitoquímica y actividad antibacteriana de extractos de hoja de *Hamelia patens Jacq* . *Biotecnol. Veg.* **2018**, *18* (1), 37-45.
- (44) Sousa, A.; Andreza, R.; Alves, E.; Cruz, A.; Leandro, L.; Guedes, T.; Macêdo, R.; Lima, L.; Oliveira, C.; Coutinho, H.; et al. Avaliação da atividade antibacteriana dos extratos metanólico e hexânico do caule folhado de *Melissa Officinalis*. *Rev. Ciencias la Salud* **2016**, *14* (2), 201-210. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.12804/revsalud14.02.2016.05>.