



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA E IDENTIFICACIÓN
FITOQUÍMICA DE EXTRACTOS DE *MONOLENA PRIMULIFLORA* HOOK.F.

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: TATIANA CECIBEL SHIGUANGO GREFA

TUTORA: MSc. ENITH VANESSA YÁNEZ RAMÍREZ

COTUTORAS: MSc. NINA QUILLA ESPINOSA DE LOS MONTEROS SILVA

MSc. DAYANNA CAROLINA ÑACATO CHICAIZA

Tena - Ecuador

2024

Carrera de Biotecnología

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Tena, 27 de agosto de 2024

De mi consideración:

Yo, Tatiana Cecibel Shiguango Grefa con documento de identidad 1501087306, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título de Ingeniería en Biotecnología, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en el presente documento, son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Por la favorable atención a la presente, suscribo de usted,



Tatiana Cecibel Shiguango Grefa

CI: 1501087306

Carrera de Biotecnología

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Tena, 27 de agosto de 2024

Yo, Tatiana Cecibel Shiguango Grefa, con documento de identidad 1501087306 en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación “Evaluación de la actividad antimicrobiana e identificación fitoquímica de extractos de *Monolena primuliflora* Hook.f.”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.



Tatiana Cecibel Shiguango Grefa

CI: 1501087306

Carrera de Biotecnología

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Tena, 27 de agosto de 2024

Certifico que el trabajo de titulación: “Evaluación de la actividad antimicrobiana e identificación fitoquímica de extractos de *Monolena primuliflora* Hook.f.”, aprobado bajo el mecanismo de titulación de: tesis, fue realizado por Tatiana Cecibel Shiguango Grefa, bajo mi dirección.

El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.



Firmado electrónicamente por:
**ENITH VANESSA YANEZ
RAMIREZ**

Enith Vanessa Yáñez Ramírez
C.I: 1713485033
Tutora



Firmado electrónicamente por:
**NINA QUILLA
ESPINOSA DE LOS
MONTEROS SILVA**

Nina Quilla Espinosa de los Monteros Silva
C.I: 1500755283
Cotutora



Firmado electrónicamente por:
**DAYANNA CAROLINA
ÑACATO CHICAIZA**

Dayanna Carolina Ñacato Chicaiza
C.I: 1725483505
Cotutora

AGRADECIMIENTO

Me gustaría comenzar expresando mi más sincero agradecimiento a mí mismo por la dedicación, esfuerzo y perseverancia demostrados a lo largo de este arduo proceso investigativo. Este camino estuvo lleno de desafíos, pero gracias a mi determinación y compromiso, logré culminar este trabajo con éxito.

Agradezco a mi familia por su amor y apoyo incondicional. En especial a mis padres por creer en mí, incluso cuando yo no creía en mí mismo. Sin ustedes, que son mi motor de inspiración, este logro no habría sido posible.

También quisiera expresar mi sincero agradecimiento a la MSc. Enith Yáñez Ramírez, por sus valiosos consejos y paciencia a lo largo de este proceso. Su apoyo constante y su confianza en mi trabajo han sido fundamentales para la culminación de esta investigación.

Agradezco profundamente a la MSc. Nina Espinosa por su invaluable ayuda en el laboratorio y su orientación constante. Su paciencia y apoyo han sido fundamentales para el desarrollo de esta investigación.

También quiero agradecer a la MSc. Carolina Ñacato por su contribución en la fase de identificación fitoquímica y por los conocimientos compartidos.

Agradezco a la Universidad Regional Amazónica Ikiam y al Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica, por las facilidades de infraestructura para el desarrollo de este trabajo de titulación.

Por último, a mis amigos y compañeros de laboratorio, por su apoyo y momentos agradables compartidos durante la etapa universitaria.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a la comunidad científica de microbiología y etnofarmacología, quienes han sido una fuente de inspiración.

A todos los investigadores y académicos que, a través de su compromiso y dedicación, han contribuido al avance de la ciencia y a la mejora de la humanidad.

Que este pequeño aporte se sume a la vasta colección de conocimientos que se construye día a día.

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD ii

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL iii

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN iv

AGRADECIMIENTO v

DEDICATORIA vi

TABLA DE CONTENIDO vii

ÍNDICE DE TABLA ix

ÍNDICE DE ANEXOS x

RESUMEN xi

ABSTRACT xii

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN 1

1.1. Antecedentes 1

1.1.1. Los antimicrobianos y la resistencia microbiana 1

1.1.2. Tipos de resistencia y mecanismos 1

1.1.3. Impacto y consecuencias de la resistencia 2

1.1.4. Medicina tradicional y la familia Melastomataceae 3

1.2. Planteamiento del problema a investigar 5

1.3. Justificación de la Investigación 6

1.4. Objetivos 8

1.4.1. General 8

1.4.2. Específicos 8

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA 9

2.1. Recolección del material vegetal 9

2.2. Preparación del material vegetal 9

2.3. Extracción de metabolitos secundarios 9

2.4.	Ensayo de actividad antimicrobiana	10
2.4.1.	Activación y preparación del inóculo.....	10
2.4.2.	Preparación de extractos y controles	10
2.4.3.	Diseño experimental.....	11
2.4.4.	Ensayo exploratorio de difusión por disco.....	11
2.4.5.	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Microbica (CMM)	12
2.4.6.	Análisis estadístico de datos	12
2.5.	Identificación de los metabolitos secundarios	13
2.5.1.	Determinación cualitativa de alcaloides	13
2.5.2.	Determinación cualitativa de flavonoides	13
2.5.3.	Determinación cualitativa de fenoles.....	14
2.5.4.	Determinación cualitativa de saponinas.....	14
2.5.5.	Determinación cualitativa de terpenoides	14
CAPÍTULO III. RESULTADOS.....		15
3.1.	Rendimiento de preparación de extractos de <i>M. primuliflora</i>	15
3.2.	Ensayo antimicrobiano	15
3.2.1.	Ensayo antimicrobiano de difusión en disco de Kirby-Bauer.	15
3.2.2.	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Microbica (CMM) de extractos	16
3.3.	Identificación preliminar de metabolitos secundarios	18
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN.....		19
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		30
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1-3:	Rendimiento porcentual de los extractos de <i>M. primuliflora</i> en diferentes solventes	15
Tabla 2-3:	Actividad antimicrobiana de diferentes extractos de <i>M. primuliflora</i>	16
Tabla 3-3:	Valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Microbicida (CMM) de diferentes extractos de <i>M. primuliflora</i> frente a microorganismos de interés clínico	17
Tabla 4-3:	Valores de significancia del ANOVA de dos vías de los efectos del extracto y CMI para diferentes microorganismos	18
Tabla 5-3:	Tamizaje fitoquímico cualitativo de los extractos de hojas de <i>M. primuliflora</i>	18

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** PROCESO DE OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE *M. PRIMULIFLORA*
- ANEXO B:** PRUEBA DE DRAGENDORFF PARA LA DETERMINACIÓN DE ALCALOIDES
- ANEXO C:** PRUEBA DE SHINODA PARA LA DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES
- ANEXO D:** PRUEBA DE CLORURO FÉRRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES
- ANEXO E:** PRUEBA DE LA ESPUMA PARA LA DETERMINACIÓN DE SAPONINAS
- ANEXO F:** PRUEBA DE SALKOWSKI PARA LA DETERMINACIÓN DE TERPENOIDES
- ANEXO G:** ENSAYO EXPLORATORIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS DE *M. PRIMULIFLORA* A 200 mg/mL
- ANEXO H:** GRÁFICA DE LA MEDIA Y ERROR ESTÁNDAR DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA EMITIDA A 580-640 nm DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE *M. PRIMULIFLORA*
- ANEXO I:** GRÁFICA DE LA MEDIA Y ERROR ESTÁNDAR DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA EMITIDA A 580-640 nm DEL EXTRACTO METANÓLICO DE HOJAS DE *M. PRIMULIFLORA*
- ANEXO J:** GRÁFICA DE LA MEDIA Y ERROR ESTÁNDAR DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA EMITIDA A 580-640 NM DEL EXTRACTO ÉTER DIETÍLICO DE HOJAS DE *M. PRIMULIFLORA*
- ANEXO K:** ANÁLISIS DE VARIANZA DE DOS FACTORES DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA VS CONCENTRACIÓN, REALIZADA PARA CADA MICROORGANISMO FRENTE A DIVERSOS EXTRACTOS
- ANEXO L:** ANÁLISIS ANOVA DE DOS VÍAS DE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA VS CONCENTRACIONES DE CMI PARA DIFERENTES MICROORGANISMOS Y EXTRACTOS DE HOJAS DE *M. PRIMULIFLORA* USANDO LA APLICACIÓN GraphPad Prism

RESUMEN

Con el propósito de contribuir a la lucha contra la resistencia a los antimicrobianos (RAM), se llevó a cabo una evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de extractos de *Monolena primuliflora*, junto con una identificación preliminar de metabolitos secundarios de extractos de hojas frescas y secas utilizando diversos solventes (agua, metanol y dietil éter). El análisis fitoquímico cualitativo reveló la presencia de alcaloides, flavonoides, fenoles, saponinas y terpenoides en algunos extractos. Los extractos de hojas frescas mostraron mayor diversidad de metabolitos que los extractos de hojas secas. Se evaluó la actividad antimicrobiana frente a seis microorganismos mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer, y se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Microbicida (CMM) mediante el método de microdilución. Todos los extractos mostraron actividad antimicrobiana frente al menos un microorganismo, con valores de CMI/CMM de 1.56-12.5 mg/mL en bacterias y 6.25-50 mg/mL para el hongo. Se encontró que, a mayor diversidad de metabolitos, mayor es el número de cepas microbianas afectadas. Los resultados muestran el potencial de los extractos de *M. primuliflora* como agentes antimicrobianos.

Palabras clave: antimicrobiana, extracto, fitoquímico, metabolitos secundarios, *Monolena primuliflora*.

ABSTRACT

To contribute to the fight against antimicrobial resistance (AMR), an *in vitro* evaluation of the antimicrobial activity of *Monolena primuliflora* extracts was conducted, alongside a preliminary identification of secondary metabolites in extracts from fresh and dry leaves using various solvents (water, methanol, and diethyl ether). The qualitative phytochemical analysis revealed the presence of alkaloids, flavonoids, phenols, saponins, and terpenoids in some extracts. Extracts from fresh leaves exhibited a greater diversity of metabolites compared to extracts from dry leaves. The antimicrobial activity was assessed against six microorganisms using the Kirby-Bauer disk diffusion method, and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were determined using the microdilution method. All extracts showed antimicrobial activity against at least one microorganism, with MIC/MBC values ranging from 1.56-12.5 mg/mL for bacteria and 6.25-50 mg/mL for fungi. It was found that a greater diversity of metabolites correlates with a higher number of affected microbial strains. These results highlight the potential of *M. primuliflora* extracts as antimicrobial agents.

Keywords: antimicrobial, extract, *Monolena primuliflora*, phytochemical, secondary metabolites.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

1.1.1. *Los antimicrobianos y la resistencia microbiana*

Los antimicrobianos son fármacos diseñados específicamente para combatir infecciones causadas por bacterias, hongos, virus y parásitos, con la finalidad de tratar y controlar las enfermedades causadas por estos patógenos (Di Martino, 2022). Sin embargo, debido al uso indiscriminado de los antimicrobianos, los microorganismos han desarrollado mecanismos de resistencia que les permiten sobrevivir y multiplicarse incluso en presencia de estos fármacos (World Health Organization, 2023). La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es la capacidad que tienen los microorganismos para adaptarse y resistir los efectos de los antimicrobianos mediante diversos mecanismos de modificación o inactivación de los fármacos (Huemer et al., 2020; Purssell, 2020).

1.1.2. *Tipos de resistencia y mecanismos*

En el ámbito de la genética, se ha descubierto que la resistencia microbiana puede surgir de manera natural (intrínseca) o adquirida (extrínseca). La resistencia intrínseca es una característica innata que presentan ciertos microorganismos para desarrollar resistencia, la cual está relacionada con la fisiología y puede transmitirse por una evolución vertical mediada por fisión binaria (Kakurinov, 2014). Mientras que la resistencia extrínseca proviene de una evolución horizontal de genes y está ligada a la modificación genética (Kostyanev & Can, 2017). Los mecanismos por los que ocurre este tipo de resistencia son: expulsión del antibiótico por sistemas de eflujo, inactivación del agente antimicrobiano, alteración o modificación del sitio de unión, limitación del ingreso del fármaco y disminución de la permeabilidad de la membrana celular (Camachos, 2023).

1.1.3. Impacto y consecuencias de la resistencia

La RAM representa una grave amenaza para la salud humana, siendo responsable de un incremento significativo en la mortalidad y enfermedades infecciosas en todo el mundo (Tang et al., 2023). Según el informe de Murray et al. (2022), en el año 2019 se registraron un total de 4.95 millones de muertes asociadas a RAM a nivel mundial, de las cuales 1.27 millones fueron atribuibles a la RAM bacteriana. De estas muertes atribuibles, 929 mil fueron causadas por patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* (Murray et al., 2022).

Estas cifras reflejan las graves consecuencias de la RAM, como recaídas de la infección postratamiento, fracaso terapéutico que conduce a problemas crónicos, aumento en la propagación de microorganismos y, sobre todo, la escasez de antibióticos clínicamente eficaces (Hamdani et al., 2020). Esta situación alarmante ha hecho que la Organización Mundial de la Salud (OMS) (2021) afirme que “*la línea de desarrollo clínico de nuevos antimicrobianos está agotada*” (párr. 5). Este escenario subraya la necesidad de ampliar la investigación en busca de agentes antimicrobianos efectivos, ya que, de no abordarse esta problemática, se incrementa de manera considerable el riesgo asociado a procedimientos quirúrgicos como cesáreas, implantes de prótesis, quimioterapias contra el cáncer y trasplantes de órganos (Organización Mundial de la Salud, 2021).

Diversos estudios han identificado compuestos bioactivos en plantas que muestran actividad potencial contra microorganismos RAM, demostrando su prometedor rol como alternativa en la lucha contra este problema global (Álvarez-Martínez et al., 2020; Perim et al., 2019).

1.1.4. Medicina tradicional y la familia Melastomataceae

La medicina tradicional, respaldada por el conocimiento ancestral, ofrece información valiosa en el campo etnofarmacológico (Schultz & Garbe, 2023). Tradicionalmente, las plantas medicinales han sido cruciales para el tratamiento de enfermedades, debido a que poseen una variedad de compuestos bioactivos tales como flavonoides, fenilpropanoides, terpenos, quinonas, cumarinas, saponinas, terpenoides, fitoesteroles, glúcidos y otros (Noor et al., 2022). Por ejemplo, de las plantas se han obtenido fármacos terapéuticos como la artemisinina, utilizada para tratar la malaria; la metformina, como antidiabético; los fitoesteroles, que tienen efectos medicinales y se utilizan como complementos nutricionales; la morfina, para el tratamiento de edemas pulmonares; la nicotina, como estimulante y antiinflamatorio; y la tebaína (paramorfina), como analgésico (Twaij & Hasan, 2022). Es por ello que se ha propuesto a las plantas como una posible alternativa a los antimicrobianos sintéticos, debido a su capacidad inhibitoria contra microorganismos RAM (Khameneh et al., 2019; Seukep et al., 2023).

Dentro de estos recursos vegetales de interés, encontramos a la familia Melastomataceae, conocida por su potencial biológico y su extraordinaria diversidad vegetal, que incluyen árboles, arbustos, hierbas o epífitas (Manjula & Kumar, 2021). Abarca alrededor de 5 750 especies distribuidas en 177 géneros en todo el mundo, de las cuales la mayoría habitan en zonas tropicales y subtropicales, incluyendo Ecuador (N. S. Ferreira et al., 2022). En etnofarmacología, las melastomatáceas se han destacado por sus capacidades analgésicas, antiinflamatorias, antioxidantes, antiparasitarias, citotóxicas y antimicrobianas (Bomfim et al., 2021; da Silva et al., 2022; Zheng et al., 2021).

De esta familia de plantas, los géneros más representativos son *Miconia* (Celotto et al., 2003; N. S. Ferreira et al., 2022; Gontijo et al., 2019; Rodrigues et al., 2008; Zheng et al., 2021), *Melastoma* (Aryal et al., 2021; Zheng et al., 2021), *Tristemma* (Kengne et al., 2023), *Tibouchina* (Golias et al., 2020), *Dissotis* y *Amphiblemma* (Nzogong et al., 2018). Se ha demostrado que los extractos acuosos, etanólicos, metanólicos, acetato etílicos,

butanólicos y otros, de algunos de estos géneros, presentan actividades antifúngicas y antibacterianas contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* y otros microorganismos (Aryal et al., 2021; Celotto et al., 2003; Kengne et al., 2023; Nzogong et al., 2018).

A pesar de la actividad biológica y las aplicaciones reportadas para esta familia de plantas, hay algunos géneros que no han sido estudiados, como *Monolena*. Este género incluye 8 especies aceptadas al momento (The Plant List, 2010), de las cuales ninguna ha sido objeto de identificación y caracterización de metabolitos secundarios. No se ha investigado su actividad antimicrobiana u otras actividades biológicas, lo que representa una oportunidad para futuras investigaciones.

Monolena primuliflora Hook.f., del género *Monolena*, es una planta nativa que habita bosques tropicales o pluviales y zonas arboladas de Ecuador, Brasil, Colombia, Costa Rica, Panamá y Perú (Plants of the World Online, 2023). En Ecuador, es conocida como “Kiru Jambi Yura” en Orellana y “Shankur” en Morona Santiago. Es una hierba epífita que alcanza hasta los 40 cm de altura, con tallos rizomáticos y hojas de pecíolos largos que brotan desde la base (Doyle et al., 2019).

De acuerdo con los reportes etnofarmacológicos de Ballesteros et al. (2016), Caballero-Serrano et al. (2019), Doyle et al. (2017, 2019), Fierro et al. (2002) y Leon & Tayupanta (2022), realizados en comunidades de los grupos étnicos Kichwas y Shuar del Ecuador, las raíces, tallos, hojas, escapos y látex de *M. primuliflora* se utilizan como analgésico, antiofídico, vermífugo y estimulante. Conforme a la información, específicamente se emplean para tratar la gripe; dolores musculares, estomacales y de muela; conjuntivitis; diarrea; heridas cutáneas; expulsión de parásitos; y mordeduras de serpientes. Según estos reportes, las partes vegetales se aplican de manera directa, mediante pulverización o trituración, por ingestión o por decocción.

Si bien varias especies de la familia Melastomataceae han sido estudiadas por su actividad antimicrobiana, no existe un estudio que valide las propiedades medicinales de *M. primuliflora*. Dada la larga historia en la medicina tradicional y la potencial actividad biológica reportada para la familia Melastomataceae y esta especie, resulta imperativo explorar y validar su potencial actividad biológica.

1.2. Planteamiento del problema a investigar

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es un problema que perjudica la salud pública en continuo aumento, afectando tanto a Ecuador como al resto del mundo (World Health Organization, 2023). La RAM implica la pérdida de eficacia de los antimicrobianos, debido a que los microorganismos evolucionan para resistir altas concentraciones de estos, dificultando así el tratamiento de enfermedades infecciosas y exacerbando las tasas de mortalidad (Huemer et al., 2020).

El informe de la Plataforma de Información de la Salud para las Américas (PLISA) ha puesto de manifiesto una tendencia preocupante en Ecuador, indicando que, desde el año 2014 hasta el 2020, se ha observado un aumento en el número de aislamientos de patógenos resistentes. Solo en el año 2020, Ecuador registró 42 469 patógenos de *Pseudomonas aeruginosa*, 54 823 de *Staphylococcus aureus*, 71 817 de *Klebsiella pneumoniae*, 154 109 de *Escherichia coli*, entre otros (Pan American Health Organization & World Health Organization, 2023).

Estos aislamientos bacterianos resistentes reflejan la creciente prevalencia de RAM en Ecuador y la necesidad de abordar esta problemática. De acuerdo con el informe del Instituto de Métrica y Evaluación de la Salud y la Universidad de Oxford (IHME & Universidad de Oxford, 2023), en 2019, Ecuador enfrentó las graves consecuencias de la RAM, con 2 400 muertes atribuibles y 9 300 asociadas a la misma. El informe destaca que patógenos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron los principales responsables de causar 1 700, 1 600, 1 100, 1 200, 781 muertes respectivamente.

Además, se informa que estas cifras colocaron a Ecuador en el puesto 111 en términos de tasa de mortalidad asociada a la resistencia antimicrobiana, de un total de 204 países analizados (IHME & Universidad de Oxford, 2023).

Por otro lado, las proyecciones futuras muestran que, si no se toman medidas efectivas para controlar la tendencia actual de la resistencia a los antimicrobianos, para el año 2050, enfrentaremos 10 millones de muertes cada año, superando incluso las muertes causadas por cáncer y accidentes de tránsito a nivel global (O'Neill, 2016). A esto se suman las implicaciones económicas y la crisis en la salud pública debido a la falta de acceso a los antimicrobianos (Shafiq et al., 2021).

Por lo mencionado anteriormente, se vuelve imperativo el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas. En este sentido, *Monolena primuliflora* podría ser una alternativa muy prometedora para combatir una amplia gama de microorganismos.

1.3. Justificación de la Investigación

Ecuador es uno de los 17 países más biodiversos del mundo y abarca aproximadamente el 10% de todas las especies de plantas del planeta (Armijos et al., 2021, 2022). Esta riqueza se refleja en la diversidad de plantas vasculares distribuidas en las tres regiones: Costa, Sierra, y Amazonía, con alrededor de 17 000 especies (Carpio, 2018), de las cuales unas 3 000 son empleadas con fines medicinales por diversas comunidades indígenas (Altamirano et al., 2020).

A lo largo de la historia, las diversas culturas ecuatorianas han recurrido a una amplia gama de plantas medicinales para aliviar dolores y malestares, tratar enfermedades respiratorias, aliviar problemas digestivos y otros padecimientos (Armijos et al., 2021). Este conocimiento ancestral, transmitido oralmente de generación en generación, ha sido invaluable para las comunidades (Ballesteros et al., 2016). Sin embargo, muchas de las propiedades y usos de estas plantas carecen de validación científica (Armijos et al., 2022). Es por ello que varios autores hacen hincapié en la necesidad de ampliar la

investigación de plantas con propiedades medicinales que han sido reportadas etnobotánicamente para evaluar la eficacia, toxicidad y composición química de los extractos vegetales utilizados con fines terapéuticos (Kumar Srivastava, 2018; Mohammed, 2019; Sofowora et al., 2013).

Alrededor del 60% de la población mundial utiliza las plantas medicinales como alternativa terapéutica debido a sus propiedades, lo que resalta la importancia de validar los conocimientos de forma científica (Armijos et al., 2022). Bajo este contexto surge el interés por *M. primuliflora*, una especie nativa de la Amazonía ecuatoriana que, a pesar de sus propiedades curativas documentadas etnofarmacológicamente, carecen de validación científica *in vitro*. De acuerdo con Fierro et al. (2002), de las 10 especies registradas dentro del género *Monolena*, esta especie ha sido identificada como un potencial recurso terapéutico, que debe ser investigado. Su contribución no solo se limita a la medicina y la salud pública, sino que refuerza el conocimiento ancestral de las comunidades sobre plantas medicinales de la Amazonía ecuatoriana (Raja Ratna Reddy et al., 2020).

Asimismo, es relevante destacar que la OMS ha recomendado realizar estudios de plantas medicinales, ya que reconoce que el conocimiento tradicional indígena y ancestral ha sido un recurso fundamental dentro de las áreas de la salud, bienestar y atención médica (World Health Organization, 2013). Además, esta investigación contribuye al cumplimiento de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030 de las Naciones Unidas. De hecho, la OMS ha señalado que la resistencia a los antimicrobianos afecta a siete de los diecisiete objetivos, afectando áreas ambientales, sociales y económicas. Estos objetivos incluyen: Fin de la pobreza, Hambre cero, Salud y Bienestar, Agua limpia y saneamiento, Trabajo decente y crecimiento económico, Producción y consumo responsable, y Alianzas para lograr los objetivos (Jasovský et al., 2016). La validación científica de su eficacia podría abrir nuevas perspectivas en la síntesis de fármacos derivados de productos naturales, contribuyendo así al mejoramiento de la salud pública mediante la lucha global contra la RAM.

1.4. Objetivos

1.4.1. General

Evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes extractos de las hojas frescas y secas de *Monolena primuliflora* e identificación fitoquímica.

1.4.2. Específicos

- Identificar la presencia o ausencia del efecto antimicrobiano *in vitro* de los extractos acuoso, metanólico, y éter dietílico de hojas frescas y secas de *Monolena primuliflora* frente a microorganismos de importancia clínica, utilizando la prueba de difusión por disco de Kirby-Bauer.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) y Concentración Mínima Microbiciada (CMM) de extractos acuoso, metanólico y éter dietílico de hojas frescas y secas de *Monolena primuliflora* frente a microorganismos de importancia clínica, utilizando el método de microdilución.
- Identificar cualitativamente los metabolitos secundarios presentes en los extractos de hojas frescas y secas de *Monolena primuliflora*.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1. Recolección del material vegetal

Se recolectó hojas de *M. primuliflora* libres de daños físicos en un área cercana a las coordenadas 1°05'35.4"S 77°39'10.7"W en la zona del Puerto Misahuallí, Napo, Ecuador. Las muestras vegetales fueron transportadas en bolsas plásticas al laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Regional Amazónica Ikiam para su procesamiento. Se recolectó el material bajo el permiso de investigación MAATE-DBI-CM-2023-0310.

2.2. Preparación del material vegetal

Las hojas recolectadas fueron limpiadas con una franela humedecida en agua ultra purificada, con el fin de eliminar residuos que pudiesen estar en la superficie de las hojas. Posteriormente, con ayuda de una tijera estéril se cortaron las hojas en partes más pequeñas (**Anexo A**) (Hassan & Ullah, 2019). Se consideró como hojas frescas aquellas que fueron cortadas y sometidas a maceración inmediatamente (Ver sección 2.3), y como hojas secas, a aquellas que luego de su corte fueron deshidratadas en una estufa a 50 °C durante 72 horas, previo a su maceración (Ezebo et al., 2021).

2.3. Extracción de metabolitos secundarios

Se empleó el método de maceración para la extracción de metabolitos secundarios. Este método consistió en sumergir las hojas (frescas y secas) en 3 diferentes solventes: agua, metanol y dietil éter, durante 14 días en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente (Sindhu et al., 2023). Se maceraron muestras de hojas frescas y secas en proporciones 1:10 (1 gramo de hojas por 10 mililitros de solvente) (Rajendrasozhan et al., 2021). Se obtuvo un total de seis extractos vegetales. Una vez completa la etapa de maceración, los extractos se filtraron utilizando papel filtro cualitativo. Los extractos se

concentraron en un rotavapor® R-300 (marca BUCHI). Finalmente, fueron liofilizados a -80 °C y 120 mTorr en un liofilizador BTP-9E LOVE (Genevac). Terminado el proceso, se calculó el rendimiento de extracción para cada extracto mediante el uso de la ecuación (EC 1) descrita en Abbas et al. (2021) y se almacenó a -20 °C hasta su posterior uso.

$$\text{Rendimiento de extracción (\%)} = \frac{\text{Masa del extracto liofilizado (g)}}{\text{Masa inicial de la muestra (g)}} * 100 \quad (\text{EC 1})$$

2.4. Ensayo de actividad antimicrobiana

Se trabajó con 6 microorganismos, los cuales fueron proporcionados por el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de la Universidad Regional Amazónica Ikiam. El ensayo consistió en el uso de 3 cepas de microorganismos del Tipo Colección Americana de Cultivo (ATCC): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, y *Candida albicans* ATCC 10231 y tres cepas de aislados clínicos, resistentes a ampicilina (AmpR): *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus subtilis*.

2.4.1. Activación y preparación del inóculo

Se preparó el inóculo de cada cepa siguiendo la metodología descrita en el trabajo de Morán-Marcillo et al. (2022), sin modificaciones, hasta alcanzar una concentración de 10^6 UFC/mL (unidades formadoras de colonias por mililitro) para bacterias y 10^5 UFC/mL para hongos.

2.4.2. Preparación de extractos y controles

Los extractos vegetales liofilizados se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) al 1%, a una concentración de 200 mg/mL como solución madre para los ensayos. Se usó el método de Gavrill et al. (2021) con modificaciones para eliminar la presencia de compuestos insolubles. Esto consistió en homogenizar el extracto disuelto mediante vórtex y someterlo a una posterior centrifugación por 5 minutos a 10 000 rpm. Después, se recuperó el sobrenadante, el cual fue utilizado en los ensayos. Los fármacos

adquiridos en farmacias, como ampicilina (AMP), gentamicina (GTM) y fluconazol (FLZ), sirvieron como controles positivos para cepas ATCC, resistentes a ampicilina y hongos, respectivamente. Estos fueron utilizados en una concentración de 1 mg/mL.

2.4.3. *Diseño experimental*

El diseño experimental implementado en este estudio es un diseño factorial completo. Este diseño se estructuró considerando el tipo de hoja: fresca (HF) y seca (HS), solvente: acuoso(A), metanólico (M), éter dietílico (DE) y bacterias: seis cepas microbianas.

2.4.4. *Ensayo exploratorio de difusión por disco*

La evaluación de actividad antimicrobiana comenzó con un ensayo exploratorio para determinar si los extractos de *M. primuliflora* inhiben las cepas de microorganismos utilizados. Este ensayo se realizó mediante la Prueba de Difusión por Disco de Kirby-Bauer, que es una técnica estandarizada para evaluar la susceptibilidad de los microorganismos frente a los antimicrobianos, extractos y aceites vegetales (Horváth et al., 2016). La prueba consistió en sembrar por extensión 150 µL de cada microorganismo previamente preparado (sección 2.4.1) en una placa Petri con Agar Mueller-Hinton (MHA). Las placas se dejaron entreabiertas para permitir el secado de la superficie del agar. Inmediatamente, se colocaron discos de papel filtro estériles sobre el medio MHA y se aplicó 6 µL de los extractos vegetales de 200 mg/ mL (disueltos en DMSO al 1%) en cada disco, así como 6 µL de los controles correspondientes. Las placas fueron incubadas de 16-18 horas para registrar los resultados. Se identificó la actividad antimicrobiana de cada extracto en dependencia de la presencia o ausencia de halos de inhibición de crecimiento de los microorganismos.

2.4.5. *Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Microbica (CMM)*

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se realizó mediante la técnica de microdilución, utilizando resazurina como indicador de viabilidad celular (Dagne et al., 2023; Ramadan et al., 2017). Se colocó 50 µL de diluciones seriadas de los extractos disueltos en DMSO al 1% (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.4 mg/mL) en una placa de 96 pocillos de fondo plano. Se añadió 50 µL de microorganismo en cada pocillo, obteniendo un volumen final de 100 µL. Se incubó a 37 °C durante 16-18 horas y posteriormente, se añadió 10 µL de resazurina (6.75 mg/mL) a cada pocillo, se dejó incubar durante 5 horas a 37 °C (Gahlaut & Chhillar, 2013; Nadeem et al., 2022; Rafiq et al., 2022; Ramadan et al., 2017; Teh et al., 2017). Los resultados se registraron mediante la lectura de fluorescencia en un espectrofotómetro de microplacas (Glomax Discover, Promega), considerando una longitud de excitación de 520 nm y de emisión de 580- 640 nm (Pollo et al., 2021). Después, para la determinación de CMM, se tomó 10 µL del contenido de cada pocillo de la microplaca y se sembró en forma de gotas en placas Petri con MHA. Se dejó secar completamente las placas y se incubó a 37 °C durante 16-18 horas. Aquella concentración que no presentó signos de crecimiento microbiano se designó como CMM (Ahmad Nejhad et al., 2023). Los ensayos se realizaron por triplicado.

2.4.6. *Análisis estadístico de datos*

El análisis estadístico se realizó por un ANOVA de dos vías para evaluar la significancia de los efectos del tipo de extracto y cepas microbiana sobre las CMI, utilizando el software GraphPad. Este análisis permitió identificar diferencias significativas en la actividad antimicrobiana entre los diferentes tratamientos. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

2.5. Identificación de los metabolitos secundarios

Se realizó un tamizaje fitoquímico para identificar cualitativamente los metabolitos secundarios de los extractos metanólicos, acuosos y éteres dietílicos. Se detectaron compuestos bioactivos como flavonoides, alcaloides, fenoles, terpenoides y saponinas, mediante métodos de observación colorimétrica, precipitación y aparición de espuma (Ugochukwu et al., 2013). Las observaciones se registraron como ausencia (-), leve (+) y abundante (++)

2.5.1. Determinación cualitativa de alcaloides

Se determinó la presencia de alcaloides mediante la prueba con el reactivo de Dragendorff (**ANEXO B**). Se diluyeron 5 mg de cada extracto liofilizado en 2 mL de ácido clorhídrico (HCl) al 0.1 M y se añadieron 10 gotas del reactivo de Dragendorff. Se utilizó atropina como control positivo y agua destilada como control negativo. La precipitación o turbidez de color marrón rojizo indicó la presencia de alcaloides (Shaikh & Patil, 2020).

2.5.2. Determinación cualitativa de flavonoides

Se realizó la prueba de Shinoda para identificar la presencia de flavonoides en la muestra (**ANEXO C**). Se diluyeron 5 mg de cada extracto en 1 mL de etanol. Luego, se añadieron 0.5 mL de HCl concentrado y un trozo de cinta de magnesio. Se agitó suavemente hasta que no se observó la formación de gas. Para distinguir mejor el cambio producido, se añadió 1 mL de alcohol isoamílico. Se utilizó quercetina como control positivo y agua como control negativo. La coloración de alcohol amílico a amarillo, naranja, azul, violeta o rojo intenso indicó la presencia de flavonoides (Shaikh & Patil, 2020; Solikhah et al., 2020).

2.5.3. Determinación cualitativa de fenoles

Se realizó la prueba de cloruro férrico para identificar la presencia de fenoles en la muestra (**ANEXO D**). Se diluyeron 5 mg del extracto en 1 mL de etanol. A continuación, se añadieron 5 gotas de cloruro férrico (FeCl_3) al 1%. Se utilizó ácido gálico como control positivo y agua como control negativo. Un cambio de color púrpura, verde o azul, ya sea transitorio o permanente, indicó la presencia de fenoles (Alemu et al., 2024).

2.5.4. Determinación cualitativa de saponinas

Se realizó la prueba de la espuma para identificar la presencia de saponinas en la muestra (**ANEXO E**). Se diluyeron 40 mg del extracto en 1 mL de agua destilada. Se agitó fuertemente la muestra durante 1 minuto. La formación de espuma indicó la presencia de saponinas (Nortjie et al., 2022).

2.5.5. Determinación cualitativa de terpenoides

Se realizó la prueba de Salkowski para identificar la presencia de terpenoides en la muestra (**ANEXO F**). Se diluyó 5 mg del extracto en 0.5 mL de etanol. Luego, se añadió 0.4 mL de cloroformo y 0.4 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4). Se utilizó alcanfor como control positivo y agua como control negativo. Un interfaz de color marrón rojizo indicó la presencia de terpenoides (Adil et al., 2024; Nortjie et al., 2022).

CAPÍTULO III. RESULTADOS

3.1. Rendimiento de preparación de extractos de *M. primuliflora*

El rendimiento porcentual de los extractos de *M. primuliflora* se detalla en la **Tabla 1**. Se observa que los rendimientos de extracción variaron entre 0.95% a 10.72% para los diferentes extractos. El extracto AHS mostró el rendimiento más alto con un 10.72%, seguido por el extracto MHS con un 9.05%. En contraste, el extracto MHF exhibió el rendimiento más bajo, con un 0.95%.

Tabla 1. Rendimiento porcentual de los extractos de *M. primuliflora* en diferentes solventes

Extractos vegetales	Masa inicial de la muestra (g)	Masa del extracto liofilizado (g)	Rendimiento porcentual (% m/m)
AHF	130	2.7424	2.11
AHS	28.25	3.0276	10.72
MHF	90	0.8524	0.95
MHS	28.25	1.8034	9.05
DEHF	157.5	1.2165	7.77
DEHS	53.12	1.3240	2.49

AHF: Acuoso de hojas frescas. AHS: Acuoso de hojas secas. MHF: Metanólico de hojas frescas. MHS: Metanólico de hojas secas. DEHF: Éter dietílico de hojas frescas. DEHS: Éter dietílico de hojas secas. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

3.2. Ensayo antimicrobiano

3.2.1. Ensayo antimicrobiano de difusión en disco de Kirby-Bauer.

La evaluación preliminar del efecto antimicrobiano *in vitro* de los extractos de *M. primuliflora* evaluados a una concentración de 200 mg/mL se detalla en la **Tabla 2 (ANEXO G)**. El extracto MHF presentó halos de inhibición contra todos los microorganismos probados, seguido por el extracto DEHF, con la diferencia que no inhibió *C. albicans* ATCC 10231. El extracto AHF mostró halos de inhibición frente a *S. aureus* ATCC 29213, *B. subtilis* AmpR y *P. aeruginosa* AmpR, similar al extracto AHS, que además presentó inhibición de *C. albicans* ATCC 10231. El extracto MHS fue efectivo

contra *S. aureus* ATCC 29213 y *B. subtilis* AmpR, mientras que el extracto DEHS solo fue activo contra *B. subtilis* AmpR.

Los microorganismos, *S. aureus* ATCC 29213, *B. subtilis* AmpR y *P. aeruginosa* AmpR, mostraron sensibilidad frente a la mayoría de extractos evaluados. Mientras que, *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 10231 y *K. pneumoniae* AmpR, fueron sensibles solo a ciertos extractos.

Tabla 2. Actividad antimicrobiana de diferentes extractos de *M. primuliflora*

Extractos vegetales (200 mg/mL)	Presencia o ausencia de halos de inhibición					
	SA ATCC	EC ATCC	CA ATCC	BS AmpR	PA AmpR	KP AmpR
AHF	+	-	-	+	+	-
AHS	+	-	+	+	+	-
MHF	+	+	+	+	+	+
MHS	+	-	-	+	-	-
DEHF	+	+	-	+	+	+
DEHS	-	-	-	+	-	-

(+): Presencia de halo de inhibición del microorganismo. (-): Ausencia de halo de inhibición del microorganismo. AHF: Acuoso de hojas frescas. AHS: Acuoso de hojas secas. MHF: Metanólico de hojas frescas. MHS: Metanólico de hojas secas. DEHF: Éter dietílico de hojas frescas. DEHS: Éter dietílico de hojas secas. SA ATCC: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. EC ATCC: *Escherichia coli* ATCC 25922. CA ATCC: *Candida albicans* ATCC 10231. BS AmpR: *Bacillus subtilis* resistente a ampicilina. PA AmpR: *Pseudomonas aeruginosa* resistente a ampicilina. KP AmpR: *Klebsiella pneumoniae* resistente a ampicilina. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

3.2.2. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Microbicida (CMM) de extractos

Mediante el método de microdilución en caldo, se determinó los valores de CMI y CMM de los microorganismos que fueron susceptibles a los extractos de *M. primuliflora* (Tabla 2). Los datos presentados en la Tabla 3 (ANEXO H, I, J) todos los extractos analizados mostraron actividad con CMIs que oscilan entre 1.56 y 12.5 mg/mL para las bacterias. Para *C. albicans* ATCC 10231, las CMIs varían entre 6.25 y 12.5 mg/mL. De acuerdo a los resultados de la Tabla 4 (ANEXO K, L) existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las diferentes concentraciones de extractos utilizados.

En el caso del tipo de extracto, para *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* ATCC 10231, *K. pneumoniae* AmpR, no se observa diferencia significativa ($p > 0.05$); para el resto de microorganismos el valor de p fue menor a 0.05, lo cual indica que existe diferencia significativa entre el tipo de extracto utilizado.

Los valores de CMM se encontraron por encima de 1.56 mg/mL en todos los extractos evaluados. En el caso de bacterias, la CMM más baja para *S. aureus* ATCC 29213 fue 1.56 mg/mL en MHF y DEHF; para *E. coli* ATCC 25922 fue de 6.25 mg/mL en MHF y DEHF; para *B. subtilis* AmpR fue de 1.56 mg/mL en AHF, MHF, DEHF; para *P. aeruginosa* AmpR fue de 3.13 mg/mL en MHF y DEHF; y para *K. pneumoniae* AmpR fue de 6.25 con el extracto DEHF. En el caso del hongo *C. albicans* ATCC 10231, se encontró una CMM de 50 mg/mL con el extracto MHF.

Tabla 3. Valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Microbicida (CMM) de diferentes extractos de *M. primuliflora* frente a microorganismos de interés clínico

Extractos vegetales	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Microbicida (CMM) (mg/mL)											
	SA ATCC		EC ATCC		CA ATCC		BS AmpR		PA AmpR		KP AmpR	
	CMI	CMM	CMI	CMM	CMI	CMM	CMI	CMM	CMI	CMM	CMI	CMM
AHF	6.25	6.25	-	-	-	-	1.56	1.56	6.25	12.5	-	-
AHS	6.25	6.25	-	-	12.5	>50	6.25	6.25	6.25	12.5	-	-
MHF	1.56	1.56	3.13	6.25	6.25	50	1.56	1.56	3.13	3.13	6.25	12.5
MHS	3.13	6.25	-	-	-	-	6.25	6.25	-	-	-	-
DEHF	1.56	1.56	6.25	6.25	-	-	1.56	1.56	3.13	3.13	3.13	6.25
DEHS	-	-	-	-	-	-	3.13	6.25	-	-	-	-

(-): Ensayo no realizado. AHF: Acuoso de hojas frescas. AHS: Acuoso de hojas secas. MHF: Metanólico de hojas frescas. MHS: Metanólico de hojas secas. DEHF: Éter dietílico de hojas frescas. DEHS: Éter dietílico de hojas secas. SA ATCC: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. EC ATCC: *Escherichia coli* ATCC 25922. CA ATCC: *Candida albicans* ATCC 10231. BS AmpR: *Bacillus subtilis* resistente a ampicilina. PA AmpR: *Pseudomonas aeruginosa* resistente a ampicilina. KP AmpR: *Klebsiella pneumoniae* resistente a ampicilina. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

Tabla 4. Valores de significancia del ANOVA de dos vías de los efectos del extracto y CMI para diferentes microorganismos

Microorganismo	P valor	P valor
	Extractos	Concentraciones (mg/mL)
SA ATCC	<0.0001	0.0002
EC ATCC	0.1247	0.0064
CA ATCC	0.1401	<0.0001
BS AmpR	<0.0001	0.0204
PA AmpR	0.0159	<0.0001
KP AmpR	0.0958	0.0033

Los valores $P < 0.05$ indican diferencias significativas. SA ATCC: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. EC ATCC: *Escherichia coli* ATCC 25922. CA ATCC: *Candida albicans* ATCC 10231. BS AmpR: *Bacillus subtilis* resistente a ampicilina. PA AmpR: *Pseudomonas aeruginosa* resistente a ampicilina. KP AmpR: *Klebsiella pneumoniae* resistente a ampicilina. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

3.3. Identificación preliminar de metabolitos secundarios

Las pruebas fitoquímicas cualitativas realizadas en los extractos de hojas frescas y hojas secas de *M. primuliflora* revelaron la presencia de alcaloides, flavonoides, fenoles, saponinas y terpenoides, como se detalla en la **Tabla 5**. El extracto AHF mostró la presencia de alcaloides, saponinas y terpenoides, mientras que el extracto AHS exhibió saponinas y terpenoides. El extracto MHF contenía flavonoides, fenoles y saponinas. Además, se observó la presencia de fenoles en el extracto MHS y de terpenoides en el extracto DEHF. Sin embargo, los ensayos realizados en el extracto DEHS no detectaron la presencia de los metabolitos secundarios que fueron objeto del estudio.

Tabla 5. Tamizaje fitoquímico cualitativo de los extractos de hojas de *M. primuliflora*

Metabolitos Secundarios	Ensayo cualitativo	Extractos vegetales					
		AHF	AHS	MHF	MHS	DEHF	DEHS
Alcaloides	Prueba de Dragendorff	+	-	-	-	-	-
Flavonoides	Prueba de Shinoda	-	-	+	-	-	-
Fenoles	Prueba de cloruro férrico	-	-	+	++	-	-
Saponinas	Prueba de la espuma	++	++	+	-	-	-
Terpenoides	Prueba de Salkowski	++	+	-	-	+	-

(-): Ausencia. (+): Leve. (++): Abundante. AHF: Acuoso de hojas frescas. AHS: Acuoso de hojas secas. MHF: Metanólico de hojas frescas. MHS: Metanólico de hojas secas. DEHF: Éter dietílico de hojas frescas. DEHS: Éter dietílico de hojas secas. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

El género *Monolena* (Melastomataceae) incluye varias especies de plantas que han recibido escasa atención científica, siendo *M. primuliflora* particularmente notable por su falta de investigación en el campo fitoquímico y su potencial actividad antimicrobiana. Esta carencia en el conocimiento científico contrasta con los usos medicinales tradicionales documentados para esta planta (Ballesteros et al., 2016). Aunque otras especies relacionadas de la familia Melastomataceae han mostrado propiedades antimicrobianas prometedoras y contienen diversos compuestos bioactivos como flavonoides, alcaloides, taninos, quinonas y otros, *M. primuliflora* sigue siendo una especie inexplorada en este sentido. Este es el primer estudio en donde se evaluó la actividad antimicrobiana de *M. primuliflora* y se identificaron cualitativamente los principales metabolitos secundarios presentes en diferentes extractos de esta especie, potencialmente responsables de la actividad biológica.

M. primuliflora mostró rendimientos de extracción más bajos (**Tabla 1**) en comparación con los reportados en la literatura para especies del género *Dissotis* de la misma familia (Melastomataceae), utilizando los mismos solventes. Los estudios han documentado rendimientos de extracción del 15.0% para el extracto metanólico, 12.5% para el extracto éter dietílico y 8.2% para el extracto acuoso (Djuichou et al., 2019; Simeon et al., 2016). Esta diferencia puede atribuirse a factores como, las condiciones de extracción, que incluyen variaciones de la temperatura, el tiempo de extracción y la agitación, la naturaleza de la muestra (fresca o seca), el tamaño de las partículas del material vegetal utilizado, la proporción de los solventes empleados, entre otros (de Moura et al., 2017).

A pesar de que se ha reportado que el método de maceración puede mostrar bajo rendimiento de extracción debido a la falta de agitación continua, lo que resulta en una interacción reducida entre las fases sólida-líquida y provoca una saturación localizada cerca de las partículas de la muestra, impidiendo que el disolvente penetre

eficientemente en la matriz vegetal (Cacique et al., 2020). El presente estudio utilizó esta metodología debido a que es un método eco-amigable y económico en comparación con otras técnicas, como extracción basada en ultrasonido, extracción asistida por microondas, extracción por fluidos supercríticos, entre otros (Barthwal & Mahar, 2024; Đurović et al., 2022). Además, al considerar este trabajo como un estudio piloto de evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de *M. primuliflora* y caracterización cualitativa de metabolitos secundarios presentes, se utilizó diferentes solventes para la extracción, con el objetivo de tener una visión general de la composición química y su actividad antimicrobiana. Así, por ejemplo, se consideró como solvente al agua debido a su uso frecuente por curanderos en diversas culturas, mientras que los solventes orgánicos se consideraron debido a su mayor eficacia comprobada en la extracción de compuestos bioactivos con potencial antimicrobiano (K. Das et al., 2010). Esto se debe a que los diferentes solventes pueden extraer distintas moléculas según su polaridad (Villaret-Cazadamont et al., 2020). El agua se utiliza para extraer taninos, saponinas, terpenoides, alcaloides, entre otros; el metanol se usa para extraer terpenoides, saponinas, taninos, polifenoles, flavonoides; y el dietil éter para la extracción de alcaloides, terpenoides, cumarinas (Siddiqui, 2021; Tiwari et al., 2011).

El perfil de metabolitos secundarios identificados cualitativamente en los extractos de *M. primuliflora* no pudo ser comparado con especies del mismo género debido a la falta de reportes en la literatura. No obstante, se han encontrado similitudes con algunos estudios en especies de la misma familia (Melastomataceae). Por ejemplo, en el caso del extracto acuoso de *Dissotis thollonii*, se ha documentado la presencia de flavonoides, fenoles y saponinas (Djuichou et al., 2019). Además, en estudios del extracto acuoso de *Melastomastrum capitatum* se ha evidenciado la presencia de flavonoides, taninos, antraquinonas, glúcidos cardíacos, saponinas, carbohidratos y proteínas en extractos acuosos obtenidos por fraccionamiento y maceración (Ukwubile et al., 2020). Del mismo modo, investigaciones en especies como *Miconia chamissois* y *Bellucia dichotoma*, se han identificado saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas, flavonoides y otros metabolitos bioactivos (de Moura et al., 2017; Gomes et al., 2021).

El perfil de metabolitos secundarios identificados en extractos metanólicos de *D. thollonii* ha revelado la presencia de fenoles, flavonoides, taninos, esteroides, polifenoles y antraquinonas (Gilbert et al., 2014). En *D. theifolia* se ha registrado la presencia de alcaloides, antraquinonas, flavonoides, taninos, glúcidos cardiacos (Simeon et al., 2016). Además, se ha descubierto flavonoides y taninos en *Clidemia capitellata*, como también alcaloides, taninos, saponinas, glúcidos cardiacos y flavonoides en *M. capitatum* (Ferreira da Silva et al., 2022; Ighere et al., 2019). Por otro lado, los extractos éter dietílico de la especie *D. theifolia* han revelado la presencia de alcaloides, antraquinonas, flavonoides, taninos, glúcidos cardiacos (Simeon et al., 2016). Aunque no se encontraron estudios específicos sobre el uso de dietil éter de la familia Melastomataceae, sí se han documentado con otros solventes de baja polaridad como el etil acetato, éter de petróleo y hexano (Abubakar & Haque, 2020). Por ejemplo, en extractos hexánicos y de acetato de etilo de 10 especies de Melastomataceae, se han identificado taninos, terpenos y esteroides, pero no se ha reportado la presencia de alcaloides (Bomfim et al., 2021; Matos et al., 2020). Además, Das & Anjeza (2013) encontraron fenoles, taninos, flavonoides, triterpenoides, saponinas, esteroides y glúcidos en el extracto de éter de petróleo de *Osbeckia stellata*.

La mayoría de estudios reportados anteriormente han utilizado hojas secas en el proceso de maceración. No obstante, el presente estudio demostró que, para todos los solventes utilizados, los extractos obtenidos a partir de hojas frescas mostraron mayor diversidad de grupos de metabolitos secundarios en comparación con los extractos obtenidos a partir de hojas secas (**Tabla 5**). Esto sugiere que la temperatura es un factor importante en la preparación de extractos. Así, por ejemplo, se ha demostrado que los flavonoides y compuestos fenólicos pueden extraerse eficientemente a temperaturas de hasta 100 °C (Krakowska-Sieprawska et al., 2022). Además, se ha reportado que el mayor rendimiento de extracción de polifenoles se encuentra entre 60-80 °C, mientras que para fenoles y flavonoides la temperatura óptima reportada es de 45-50 °C (Antony & Farid, 2022; ElGamal et al., 2023). El cambio en estos rangos de temperatura podría afectar la concentración, pero no siempre representa la pérdida total de ciertos grupos de moléculas, pues estudios como el de Ezebo et al. (2021) documentaron la presencia

de alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos y terpenoides en extractos de hojas secadas a 60 °C. Teniendo esto en cuenta, este estudio utilizó 50 °C para el secado del material, buscando mantenerse dentro de las temperaturas reportadas.

Este estudio mostró resultados variables en cuanto a la composición fitoquímica de los extractos (**Tabla 5**). Por ejemplo, los alcaloides son más solubles en solventes orgánicos, lo cual podría explicar su presencia leve (+) en el extracto AHF (**Tabla 5**). Además, se ha revelado que los alcaloides pueden degradarse de manera acelerada por oxidación y pH, mientras que la luz y la temperatura tienen una menor influencia en su degradación (Nesměrák et al., 2019). Por otro lado, se informan que la exposición prolongada a temperaturas elevadas durante el proceso de secado provoca la degradación y disminución del contenido de alcaloides, lo que podría haber reducido su presencia, explicando así la ausencia (-) de estos en el extracto AHS (Zou et al., 2019).

También, se registró una presencia leve (+) de flavonoides en el extracto MHF, la cual no se detectó en el extracto MHS (**Tabla 5**). Esta diferencia puede deberse a que los fitoquímicos son susceptibles a degradación térmica durante los procesos de secado (F. Liu et al., 2022). Asimismo, se ha observado que los solventes orgánicos pueden crear un ambiente propicio de reacciones no deseadas como la ionización, hidrólisis y oxidación, que desactivan los flavonoides (X. Liu et al., 2022). Aunque los flavonoides se solubilizan mejor en solventes polares como el metanol debido a los grupos hidroxilos, el proceso de secado pudo haberse reducido su contenido debido a la oxidación y otros factores de degradación (Rodríguez De Luna et al., 2020).

Por otra parte, se observó una presencia leve (+) de fenoles en el extracto MHF y una presencia abundante (++) en el extracto MHS de fenoles (**Tabla 5**). El tejido vegetal contiene una gran cantidad de enzimas, como la polifenol oxidasa (POO) y peroxidasas, que pueden degradar compuestos fenólicos acelerando su oxidación (Dey et al., 2020). Se ha comprobado que los compuestos bioactivos, como los fenoles presentes en el material vegetal fresco, son susceptibles a la descomposición por reacciones enzimáticas que los oxidan o hidrolizan (Baugh & Ignelzi, 2000). Se ha revelado que el

secado inactiva estas enzimas y ayuda a conservar los metabolitos secundarios, lo que explica la presencia abundante de fenoles identificados en hojas secas con metanol en comparación con las hojas frescas (Jones & Kinghorn, 2012).

De igual manera, en la **Tabla 5** se observa una presencia abundante (++) de saponinas en los extractos AHF y AHS. Las saponinas son metabolitos termoestables hasta los 200 °C y tienen alta solubilidad en solventes polares como el agua y metanol, lo que coincide con lo reportado en extractos AHF y AHS de *M. primuliflora* (NGUYEN et al., 2020). Sin embargo, en los extractos MHF y MHS se observó una presencia leve (+) y ausente (-) de saponinas, respectivamente. A pesar que las saponinas son termoestables, la concentración del metanol puede afectar su solubilidad, ya que se ha encontrado que una mezcla de metanol y agua resulta mejor para la extracción de saponinas, lo que explica la presencia leve de saponinas en el extracto MHF (Hu et al., 2021). La presencia limitada o la ausencia de saponinas en los extractos metanólicos podría deberse a varios factores, como una solubilidad inadecuada y un pH no óptimo. Estas condiciones podrían haber provocado la degradación o desestabilización de las saponinas, afectando así su detección en los extractos (Rickert et al., 2004).

Por otro lado, los terpenoides en las hojas secas de *M. primuliflora* mostraron una presencia leve (+) en el extracto MHS (**Tabla 5**), probablemente debido a la degradación térmica por oxidación o hidrólisis durante el proceso de secado o maceración (ElNaker et al., 2021). En contraste, en las hojas frescas, el extracto AHF mostró una presencia abundante (++) y el extracto DEHF una presencia leve (+) de terpenoides. Esto podría deberse a la degradación por oxidación e hidrólisis durante la maceración con metanol y dietil éter, o a la volatilización durante la concentración de los extractos en el rotavapor, ya que también podrían afectar negativamente el contenido de los fitoquímicos (Chen et al., 2021; Z. Jiang et al., 2016).

La menor diversidad de metabolitos registrada en extractos de hojas secas en comparación con hojas frescas de *M. primuliflora* podría sugerir la presencia de metabolitos termolábiles, los cuales podrían ser inestables a la exposición prolongada a

altas temperaturas. Además, factores como la solubilidad de los fitoquímicos y factores como la degradación térmica, hidrólisis, enzimática y oxidación, pueden afectar la concentración de uno o varios metabolitos secundarios (ElGamal et al., 2023). También es importante considerar que la composición química de las plantas puede variar debido a factores ambientales como la ubicación geográfica, variabilidad estacional, condiciones climáticas (temperatura y disponibilidad de la luz), la disponibilidad de minerales en el suelo y la presencia de plagas (Martínez et al., 2022).

Cabe mencionar que los ensayos cualitativos pueden dificultar la distinción de los metabolitos secundarios debido a la subjetividad en la interpretación visual de los resultados y pueden presentar margen de error entre la determinación ausente (-) y leve (+) (Charoenchai et al., 2013; B. G. Ferreira et al., 2017). Esto puede resultar en la no detección de metabolitos secundarios presentes en bajas concentraciones. No obstante, el cribado fitoquímico, aunque no puede determinar la concentración exacta de metabolitos secundarios ni exponer las estructuras químicas de los componentes, es la base para estudios posteriores, ya que revela los componentes de los extractos en las plantas y es útil en la búsqueda de agentes bioactivos (Wachira et al., 2024; Wang et al., 2022). Por ello, se recomienda realizar ensayos cuantitativos que revelen con exactitud la presencia de los componentes bioactivos.

Los ensayos fitoquímicos muestran que los extractos de hojas frescas contienen una mayor diversidad de metabolitos secundarios de acuerdo con las pruebas realizadas, lo cual se relaciona con una actividad antimicrobiana más amplia frente a varios microorganismos, especialmente en los extractos metanólico y éter dietílico (**Tabla 2**). Por otro lado, los extractos de hojas secas, exhibieron una menor actividad antimicrobiana, pudiendo atribuirlo al menor número de metabolitos secundarios identificados. Esta disminución en la actividad antimicrobiana de los extractos de hojas secas podría deberse a la desintegración y desestabilización de metabolitos secundarios, afectados por factores como la temperatura, oxidación, hidrólisis, y degradación por acción enzimática, como se ha documentado en estudios previos (Antony & Farid, 2022; Justine et al., 2019; Krakowska-Sieprawska et al., 2022).

El extracto MHF presentó actividad antimicrobiana contra todas las cepas evaluadas (bacterias y hongo), y se identificó la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, fenoles y saponinas, que podrían ser los principales responsables de su actividad biológica. Se ha reportado que los flavonoides son conocidos por afectar las vías de señalización celular, aumentar la permeabilidad celular, y como consecuencia, inducir la salida de sustancias intracelulares de los microorganismos, además de causar daños estructurales en la pared celular (Wang et al., 2023). De manera similar, las saponinas actúan destruyendo la pared y membrana celular, alterando proteínas, provocando la salida de los componentes celulares y como consecuencia inducir la muerte del microorganismo (Alibi et al., 2021; Dong et al., 2020; Jeyakumar & Lawrence, 2021). Mientras que, los fenoles son capaces de inducir hiperacidificación, volviendo las membranas más permeables y afectando la bomba sodio-potasio, lo que provoca un desequilibrio osmótico y la muerte celular (Lobiuc et al., 2023).

En contraste, el extracto MHS mostró actividad antibacteriana contra dos cepas (**Tabla 2**) y solo se detectó la presencia de fenoles. La diferencia en la actividad antimicrobiana del extracto MHS en comparación con el extracto MHF, puede deberse a la variación en la presencia de metabolitos. Aunque los fenoles son efectivos al destruir paredes y membranas celulares, su eficacia puede ser menor sin el apoyo de otros metabolitos como los flavonoides y saponinas (X. Jiang et al., 2015; Meng et al., 2020). Además, se ha demostrado que los fenoles son muy activos contra especies gram-positivas, ya que estas son más susceptibles, debido a la ausencia de la membrana externa (Cueva et al., 2010). Esta mayor susceptibilidad de las bacterias gram-positivas puede explicar los resultados obtenidos con el extracto MHS.

De manera similar, el extracto DEHF presentó actividad antimicrobiana contra todas las bacterias evaluadas (**Tabla 2**), lo que podría asociarse con la presencia de terpenoides (**Tabla 5**). Se conoce que estos compuestos se destacan por inducir la ruptura de la membrana celular y la despolarización de la membrana citoplasmática, como cambio en los canales iónicos (Na^+ , K^+ , Ca^{+2} o Cl^-) (Guimarães et al., 2019). Esta alteración aumenta la permeabilidad de la membrana, lo que conlleva a la liberación de componentes

intracelulares vitales, ocasionando la muerte celular (Asadi et al., 2023; Tian et al., 2021). Por el contrario, el extracto DEHS tuvo actividad solo contra una cepa (*B. subtilis* AmpR), a pesar de esta actividad, no se pudo identificar metabolitos bioactivos dentro de los grupos analizados, lo que sugiere que el extracto podría contener bajas concentraciones detectables de los metabolitos analizados en este estudio o contener otros metabolitos secundarios responsables de la actividad que no fueron evaluados, como cumarinas, esteroides, taninos, antraquinonas, entre otros.

Los extractos AHF y AHS fueron activos contra *S. aureus* ATCC 29213, *B. subtilis* AmpR y *P. aeruginosa* AmpR, con la diferencia de que el extracto AHS también presentó actividad antifúngica (**Tabla 2**). Esta actividad antimicrobiana se asocia con los contenidos de alcaloides, saponinas y terpenoides en el extracto AHF, y saponinas y terpenoides para el extracto AHS (**Tabla 5**). Los alcaloides ejercen la actividad antibacteriana mediante la acción inhibidora de bombas de eflujo, lo que permite la acumulación de agentes tóxicos en el citoplasma y la destrucción de proteínas (Sulaiman et al., 2022). Además, inhiben el desarrollo de biopelículas, mientras que los terpenoides y saponinas actúan en la ruptura de membranas y pared celular, como se mencionó anteriormente (Alibi et al., 2021; Chakraborty et al., 2020).

A pesar de los resultados obtenidos, varios estudios recalcan la actividad sinérgica de los metabolitos, por lo cual no siempre se le puede atribuir por completo la actividad biológica a un sólo grupo de moléculas (Poh et al., 2023). De modo que, esta sinergia estaría proporcionando una mayor capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos (Jeong et al., 2023).

Todos los extractos mostraron actividad contra al menos un microorganismo (**Tabla 3**). Incluso, uno de los extractos (MHF) mostró actividad contra todas las cepas evaluadas, incluyendo las resistentes a ampicilina, registrando un rango de CMI entre 1.56 a 12.5 mg/mL y CMM de 1.56 a 50 mg/mL (**Tabla 3**). Estos valores de CMI resultan cercanos a los reportados para otras especies del género *Miconia*, como *M. rubiginosa* y *M. stenostachya*, para las cuales en sus extractos metanólicos se ha identificado CMIs

mayores a 6 mg/mL contra *C. albicans*, *S. aureus* y *B. subtilis* (Rodrigues et al., 2008). Del mismo modo, la CMI y CMM registrada para *M. primuliflora* son similares a los reportados en los extractos de *C. capitellata* con valores CMI y CMM de 0.5 a 2 mg/mL en bacterias gram-positivas (*S. aureus* y *B. subtilis*) y gram negativos (*E. coli* y *P. aeruginosa*) (Ferreira da Silva et al., 2022). Los extractos de *M. primuliflora* mostraron un comportamiento microbicida dentro de las concentraciones evaluadas a excepción del extracto AHS en *C. albicans* ATCC, donde no se detectó el CMM. Esta información es valiosa ya que demuestra que, además de tener actividad antimicrobiana inhibitoria, los extractos son capaces de eliminar al 99% en el rango de concentraciones evaluadas (Rodríguez-Melcón et al., 2021). Las capacidades microbicidas de un agente antimicrobiano resultan en un daño irreversible que altera los componentes celulares según su mecanismo de acción, ejerciendo su acción de manera rápida y eficiente (Tavares et al., 2020). Esto es crucial para posibles aplicaciones farmacológicas, ya que estos extractos podrían ser una alternativa para enfrentar diversos patógenos con menor posibilidad de generar resistencia (Finberg et al., 2004). La actividad microbicida es ideal para tratar pacientes inmunocomprometidos, endocarditis o meningitis, donde la eliminación rápida y efectiva de bacterias es vital (Cushnie & Lamb, 2011; Eliopoulos, 2012).

Por otra parte, pese a que no se han registrado estudios con las mismas cepas de microorganismos resistentes utilizadas en este trabajo, podemos mencionar los resultados obtenidos por Ferreira et al. (2022), donde en los extractos metanólicos de *M. minutiflora*, se reportaron CMI/CMM de 0.625/1.25 mg/mL, 1.25/2.5 mg/mL, 0.625/1.25 mg/mL y 2.5/5 mg/mL, contra microorganismos resistentes a cloranfenicol como *E. coli* CCMB, *P. aeruginosa* CCMB, *S. aureus* CCMB y *C. albicans* CCMB, respectivamente. Los valores de CMI y CMM determinados en el presente estudio no difieren significativamente de los mencionados por Ferreira et al. (2022), lo que se podría sugerir a los extractos de *M. primuliflora* como prometedores en términos de inhibición bacteriana y microbicida frente a cepas resistentes a antibióticos.

De forma general, se sabe que los extractos de plantas tienden a exhibir mayor actividad contra bacterias gram-positivas (Hassan & Ullah, 2019). Esto se debe a que las bacterias gram-positivas poseen una pared celular simple y gruesa, compuesta principalmente de peptidoglicano, lo cual facilita el acceso y la acción de los antimicrobianos, en comparación con las gram-negativas, que tienen una membrana externa adicional que sirve como capa protectora (Tetteh et al., 2020). Esto coincide con la actividad antimicrobiana más potente identificada frente a los microorganismos gram-positivos *S. aureus* ATCC 29213 y *B. subtilis* AmpR, con CMI y CMM de 1.56 mg/mL para las dos cepas. Este resultado es importante ya que *S. aureus* es un patógeno humano, causante de una amplia gama de infecciones clínicas como infecciones de la piel, bacteriemia, endocarditis infecciosa, infecciones osteoarticulares, entre otros (Tong et al., 2015). Mientras que, *B. subtilis* es un patógeno no humano de baja virulencia y se encuentra comúnmente en el medio ambiente, puede colonizar la piel y el tracto gastrointestinal de los humanos, y producir infecciones como endocarditis, neumonía, bacteriemia, infecciones de piel, abscesos, intoxicación alimentaria, entre otros padecimientos en pacientes inmunocomprometidos (EPA, 2018; Minnaard et al., 1996; Yassin & Ahmad, 2012).

En esta investigación se llevó a cabo el primer estudio *in vitro* de *M. primuliflora*, revelando la presencia de compuestos bioactivos con propiedades antimicrobianas. Los resultados obtenidos durante el estudio respaldan lo expuesto, ya que se determinó la presencia de compuestos bioactivos asociados con la inhibición microbiana como alcaloides, fenoles, saponinas, terpenoides y flavonoides presentes en los extractos de *M. primuliflora*. Así, la evidencia científica reafirma y valida los principios de la medicina tradicional. Esto es especialmente relevante, considerando que los extractos evaluados podrían ser útiles para enfrentar problemas de salud causados por los microorganismos utilizados en el estudio, como infecciones en las vías respiratorias (*S. aureus*, *K. pneumoniae*), gastrointestinales (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*), en heridas cutáneas (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*), así como combatir el desarrollo de conjuntivitis (*S. aureus*, *P. aeruginosa*) ((Arshad et al., 2020; Chaughule & Barve, 2024; Maheswary et al., 2021; Montúfar-Andrade et al., 2016; Pfalzgraff et al., 2018; Shedoeva

et al., 2019). Esta relevancia se acentúa aún más, considerando que estas enfermedades han sido tratadas por las comunidades indígenas, utilizando *M. primuliflora* como parte de su medicina tradicional (Ballesteros et al., 2016; Doyle et al., 2017).

Por lo tanto, estudios como este no solo son fundamentales para abordar problemáticas globales como la Resistencia Antimicrobiana (RAM), sino que también juegan un papel crucial en la preservación y valorización de los conocimientos tradicionales de los pueblos indígenas.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los diferentes extractos de *M. primuliflora* muestran actividad antimicrobiana contra al menos uno de los microorganismos evaluados. Es notable que los extractos obtenidos de hojas frescas exhiben una actividad antimicrobiana superior frente a un mayor número de cepas microbianas en comparación con sus equivalentes obtenidos de hojas secas, particularmente en los extractos metanólico y éter dietílico, seguidos por los extractos acuosos.

Todos los extractos mostraron inhibición antimicrobiana en el rango de 1.56 mg/mL a 12.5 mg/mL para CMI y actividad microbicida con CMM de 1.56 mg/mL a 50 mg/mL. En particular, el extracto MHF y DEHF obtenidos de hojas frescas, se destacaron con una CMI y CMM de 1.56 mg/mL frente a microorganismos gram-positivos como *S. aureus* ATCC 29213 y *Bacillus subtilis* AmpR, patógenos asociados con bacteriemias, endocarditis e infecciones de heridas, entre otros. Estos microorganismos representan una amenaza para la salud humana y la efectividad de los extractos podría tener aplicaciones terapéuticas valiosas en el tratamiento de infecciones causadas por estos patógenos.

El potencial antimicrobiano demostró estar relacionado con la diversidad de metabolitos presentes en los extractos; a mayor diversidad de metabolitos, mayor fue la actividad antimicrobiana frente a un mayor número de microorganismos susceptibles. Además, se identificaron los metabolitos secundarios más representativos en las hojas frescas y secas de *M. primuliflora*, como alcaloides, flavonoides, fenoles, saponinas y terpenoides, los cuales están directamente relacionados con la actividad antimicrobiana registrada.

Los resultados preliminares obtenidos para esta especie, nos brinda una pauta importante de los beneficios que podría traer para la salud, reforzando la idea de su uso potencial en aplicaciones terapéuticas para enfrentar problemas como la RAM. Sin

embargo, a pesar de la información obtenida en este estudio, es importante promover estudios más profundos que incluyan aislamiento, purificación, identificación y cuantificación de moléculas bioactivas, así como ensayos bioquímicos cuantitativos, metabolómica y redes moleculares. Además, sería esencial evaluar extractos obtenidos a partir de otras partes de la planta, así como ampliar el número de microorganismos testeados y realizar ensayos *in vivo* que le otorguen mayor relevancia al uso de esta especie como potencial para enfrentar la RAM.

Para preservar la especie y garantizar al mismo tiempo una extracción eficaz de estos compuestos, se recomienda emplear métodos de extracción optimizados y eficientes, como la extracción asistida por ultrasonidos o la extracción con fluidos supercríticos. Estos métodos maximizan el rendimiento y mantienen la integridad de los componentes bioactivos, garantizando la utilización sostenible de los recursos vegetales. Además, la adopción de un enfoque basado en la conservación a lo largo de toda la investigación permitirá salvaguardar el hábitat natural de la planta y promoverá su uso sostenible.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A., Naqvi, S. A. R., Rasool, M. H., Noureen, A., Mubarik, M. S., & Tareen, R. B. (2021). Phytochemical Analysis, Antioxidant and Antimicrobial Screening of *Seriphidium Oliverianum* Plant Extracts. *Dose-Response*, 19(1). <https://doi.org/10.1177/15593258211004739>
- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 12(1), 1. https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_175_19
- Adil, M., Filimban, F. Z., Ambrin, Quddoos, A., Sher, A. A., & Naseer, M. (2024). Phytochemical screening, HPLC analysis, antimicrobial and antioxidant effect of *Euphorbia parviflora* L. (Euphorbiaceae Juss.). *Scientific Reports*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-55905-w>
- Ahmad Nejhad, A., Alizadeh Behbahani, B., Hojjati, M., Vasiee, A., & Mehrnia, M. A. (2023). Identification of phytochemical, antioxidant, anticancer and antimicrobial potential of *Calotropis procera* leaf aqueous extract. *Scientific Reports*, 13(1), 14716–14716. <https://doi.org/10.1038/S41598-023-42086-1>
- Alemu, M. I., Lulekal, E., Asfaw, Z., Warkineh, B., Debella, A., Abebe, A., Degu, S., & Debebe, E. (2024). Antibacterial activity and phytochemical screening of traditional medicinal plants most preferred for treating infectious diseases in Habru District, North Wollo Zone, Amhara Region, Ethiopia. *Plos One*, 19(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0300060>
- Alibi, S., Crespo, D., & Navas, J. (2021). Plant-Derivatives Small Molecules with Antibacterial Activity. *Antibiotics* 2021, Vol. 10, Page 231, 10(3), 231. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10030231>
- Altamirano, G. L. V., Moyota, J. M. Q., Usca, I. R. T., & Rodríguez, J. A. V. (2020). Identificación de metabolitos secundarios y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Callistemon speciosus* (escobillón rojo). *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 39(2). http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_aavft/article/view/19434
- Álvarez-Martínez, F. J., Barraji n-Catal n, E., Encinar, J. A., Rodríguez-Díaz, J. C., & Micol, V. (2020). Antimicrobial Capacity of Plant Polyphenols against Gram-positive Bacteria: A Comprehensive Review. *Current Medicinal Chemistry*, 27(15), 2576–2606. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181008115650>
- Antony, A., & Farid, M. (2022). Effect of Temperatures on Polyphenols during Extraction. *Applied Sciences* 2022, Vol. 12, Page 2107, 12(4), 2107. <https://doi.org/10.3390/APP12042107>
- Armijos, C., Ramírez, J., Salinas, M., Vidari, G., & Suárez, A. I. (2021). Pharmacology and Phytochemistry of Ecuadorian Medicinal Plants: An Update and Perspectives. *Pharmaceuticals*, 14(11), 1145. <https://doi.org/10.3390/PH14111145>
- Armijos, C., Ramírez, J., & Vidari, G. (2022). Poorly Investigated Ecuadorian Medicinal Plants. *Plants*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/PLANTS11121590>

- Arshad, J. I., Saud, A., White, D. E., Afshari, N. A., & Sayegh, R. R. (2020). Chronic Conjunctivitis From a Retained Contact Lens. *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice*, 46(1), e1–e4. <https://doi.org/10.1097/ICL.0000000000000587>
- Aryal, B., Niraula, P., Khadayat, K., Adhikari, B., Khatri Chhetri, D., Sapkota, B. K., Bhattarai, B. R., Aryal, N., & Parajuli, N. (2021). Antidiabetic, Antimicrobial, and Molecular Profiling of Selected Medicinal Plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: Ecam*, 2021, 5510099–5510099. <https://doi.org/10.1155/2021/5510099>
- Asadi, S., Nayeri-Fasaei, B., Zahraei-Salehi, T., Yahya-Rayat, R., Shams, N., & Sharifi, A. (2023). Antibacterial and anti-biofilm properties of carvacrol alone and in combination with cefixime against *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, 23(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S12866-023-02797-X/TABLES/2>
- Ballesteros, J. L., Bracco, F., Cerna, M., Vita Finzi, P., & Vidari, G. (2016). Ethnobotanical Research at the Kutukú Scientific Station, Morona-Santiago, Ecuador. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9105746>
- Barthwal, R., & Mahar, R. (2024). Exploring the Significance, Extraction, and Characterization of Plant-Derived Secondary Metabolites in Complex Mixtures. *Metabolites*, 14, 119. <https://doi.org/10.3390/METABO14020119>
- Baugh, S., & Ignelzi, S. (2000). Hydrolysis and redox factors affecting analysis of common phenolic marker compounds in botanical extracts and finished products. *Journal of AOAC International*, 83(5), 1135–1140. <https://europepmc.org/article/med/11048854>
- Bomfim, E. M. S., Coelho, A. A. O. P., Silva, M. C., Marques, E. J., & Vale, V. L. C. (2021). Phytochemical composition and biological activities of extracts from ten species of the family Melastomataceae Juss. *Brazilian Journal of Biology*, 82, e242112. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.242112>
- Caballero-Serrano, V., McLaren, B., Carrasco, J. C., Alday, J. G., Fiallos, L., Amigo, J., & Onaindia, M. (2019). Traditional ecological knowledge and medicinal plant diversity in Ecuadorian Amazon home gardens. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00524. <https://doi.org/10.1016/J.GECCO.2019.E00524>
- Cacique, A. P., Barbosa, É. S., Pinho, G. P. de, & Silvério, F. O. (2020). Maceration extraction conditions for determining the phenolic compounds and the antioxidant activity of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Ciência e Agrotecnologia*, 44. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202044017420>
- Camachos, L. A. (2023). Resistencia bacteriana, una crisis actual. *Revista Española de Salud Pública*, 97. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10541255/>
- Carpio, P. (2018). Plant Biodiversity of Ecuador: A Neotropical Megadiverse Country. In *Global Biodiversity* (Vol. 4). Apple Academic Press. <https://doi.org/10.1201/9780429433634-6>
- Celotto, A. C., Nazario, D. Z., De Almeida Spessoto, M., Gomes Martins, C. H., & Cunha, W. R. (2003). Evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species.

Brazilian Journal of Microbiology, 34(4), 339–340. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822003000400010>

- Chakraborty, P., Dastidar, D. G., Paul, P., Dutta, S., Basu, D., Sharma, S. R., Basu, S., Sarker, R. K., Sen, A., Sarkar, A., & Tribedi, P. (2020). Inhibition of biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* by caffeine: a potential approach for sustainable management of biofilm. *Archives of Microbiology*, 202(3), 623–635. <https://doi.org/10.1007/S00203-019-01775-0/METRICS>
- Charoenchai, L., Settharaksa, S., Songsak, T., Ruangrunsi, N., & Kraisintu, K. (2013). Phytochemical screening tests of *Melientha suavis* Pierre and *Urobotyra siamensis* Hiepko extracts. In *Science and Technology BHST* (Vol. 11, Issue 2).
- Chaugule, R. S., & Barve, R. S. (2024). Role of herbal medicines in the treatment of infectious diseases. *Vegetos*, 37, 41–51. <https://doi.org/10.1007/S42535-022-00549-2>
- Chen, C., Wongso, I., Putnam, D., Khir, R., & Pan, Z. (2021). Effect of hot air and infrared drying on the retention of cannabidiol and terpenes in industrial hemp (*Cannabis sativa* L.). *Industrial Crops and Products*, 172, 114051. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114051>
- Cueva, C., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A., Rivas, C. L., Requena, T., Rodríguez, J. M., & Bartolomé, B. (2010). Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, 161(5), 372–382. <https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2010.04.006>
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38(2), 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014>
- da Silva, V. B., Almeida-Bezerra, J. W., Costa, A. R., Morais-Braga, M. F. B., de Oliveira, M. G., Pinheiro, A. A. V., Sampaio, R. S. L., Castro, J. W. G., Dos Santos, M. A. F., Ulisses, V. R. de A., Pereira, M. E. da S. S., de Souza, D. L., de Alcântara, B. M., Generino, M. E. M., Silva, J. T. da C., Filho, A. M., da Silva, S. B., Moon, M., Kim, B., & da Costa, J. G. M. (2022). The Genus *Miconia* Ruiz & Pav. (Melastomataceae): Ethnomedicinal Uses, Pharmacology, and Phytochemistry. *Molecules*, 27(13). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27134132/S1>
- Dagne, A., Degu, S., Abebe, A., & Bisrat, D. (2023). Antibacterial Activity of a Phenylpropanoid from the Root Extract of *Carduus leptacanthus* Fresen. *Journal of Tropical Medicine*, 2023, 4983608–4983608. <https://doi.org/10.1155/2023/4983608>
- Das, K., Tiwari, R., & Shrivastava, D. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research*. <https://doi.org/10.5897/JMPR09.030>
- Das, S., & Anjeza, C. (2013). Antimicrobial and antioxidant activities of *Osbeckia Stellata* Buch.-Ham. ex D. Don (Melastomataceae) prevalent of Darjeeling hills. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 551–554. <https://acortar.link/FCqdv3>

- de Moura, V. M., de Souza, L. Y. A., da Costa Guimarães, N., dos Santos, I. G. C., de Almeida, P. D. O., de Oliveira, R. B., Mourão, R. H. V., & Dos-Santos, M. C. (2017). The potential of aqueous extracts of *Bellucia dichotoma* Cogn. (Melastomataceae) to inhibit the biological activities of *Bothrops atrox* venom: A comparison of specimens collected in the states of Pará and Amazonas, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 196, 168–177. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.12.031>
- Dey, P., Kundu, A., Kumar, A., Gupta, M., Lee, B. M., Bhakta, T., Dash, S., & Kim, H. S. (2020). Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). In *Recent Advances in Natural Products Analysis* (pp. 505–567). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00015-9>
- Di Martino, P. (2022). Antimicrobial agents and microbial ecology. *AIMS Microbiology*, 8(1), 1–4. <https://doi.org/10.3934/MICROBIOL.2022001>
- Djuichou, S. F., Tsafack, E. G., Mbiantcha, M., Gilbert, A., Atsamo, A. D., Yousseu Nana, W., Matah Marthe Mba, V., & Adjouzem, C. F. (2019). *In Vitro* Anti-Inflammatory and *In Vivo* Antiarthritic Activities of Aqueous and Ethanolic Extracts of *Dissotis thollonii* Cogn. (Melastomataceae) in Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019(1), 3612481. <https://doi.org/10.1155/2019/3612481>
- Dong, S., Yang, X., Zhao, L., Zhang, F., Hou, Z., & Xue, P. (2020). Antibacterial activity and mechanism of action saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. husks against foodborne pathogenic bacteria. *Industrial Crops and Products*, 149, 112350. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112350>
- Doyle, B. J., Asiala, C. M., & Fernández, D. M. (2017). Relative importance and knowledge distribution of medicinal plants in a Kichwa community in the Ecuadorian Amazon. *Ethnobiology Letters*, 8(1). <https://doi.org/10.14237/EBL.8.1.2017.777>
- Doyle, B. J., Fernández, D. M., King, H. V., Svobodny, G. S., Brewer, J. M., Huffman, C., Asiala, C. M., Patiño, J. L., & Comunidad San José de Payamino. (2019). *Medicina de Payamino. Una guía de plantas medicinales de la comunidad kichwa San José de Payamino, Orellana, Ecuador*. Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo. http://inabio.biodiversidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/06/MEDICINA_DE_PAYAMINO_WEB_1.pdf
- Đurović, S., Domínguez, R., Pateiro, M., Lorenzo, J. M., Teslić, N., & Pavlić, B. (2022). Industrial hemp nutraceutical processing and technology. *Industrial Hemp: Food and Nutraceutical Applications*, 191–218. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90910-5.00008-7>
- ElGamal, R., Song, C., Rayan, A. M., Liu, C., Al-Rejaie, S., & ElMasry, G. (2023). Thermal Degradation of Bioactive Compounds during Drying Process of Horticultural and Agronomic Products: A Comprehensive Overview. *Agronomy*, 13(6), 1580. <https://doi.org/10.3390/agronomy13061580>
- Eliopoulos, G. M. (2012). Principles of Anti-Infective Therapy. In *Goldman's Cecil Medicine* (pp. 1762–1768). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-1604-7.00287-6>
- ElNaker, N. A., Daou, M., Ochsenkühn, M. A., Amin, S. A., Yousef, A. F., & Yousef, L. F. (2021). A metabolomics approach to evaluate the effect of lyophilization versus oven drying on the

- chemical composition of plant extracts. *Scientific Reports*, 11(1).
<https://doi.org/10.1038/S41598-021-02158-6>
- EPA, U. (2018). *Attachment i: Final risk assessment of bacillus subtilis*. <https://acortar.link/fvwztl>
- Ezebo, R. O., Okonkwo, C. C., Ozoh, C. N., Nwankwo, C. A., Nwafor, E. C., Esimai, B. G., Achonye, C. C., & Obienyem, J. N. (2021). Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Ethanol and Methanol Extracts of *Lantana camara* Leaf. *World News of Natural Sciences*, 37, 151–163.
www.worldnewsnaturalsciences.com
- Ferreira, B. G., Falcioni, R., Guedes, L. M., Avritzer, S. C., Antunes, W. C., Souza, L. A., & Isaias, R. M. S. (2017). Preventing False Negatives for Histochemical Detection of Phenolics and Lignins in PEG-Embedded Plant Tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 65(2), 105–116.
<https://doi.org/10.1369/0022155416677035>
- Ferreira da Silva, A. V., Silva dos Santos, R. H., Anderson de Moraes, B., Ferreira de Araújo, M. I., de Souza Barbosa, P. P., de Oliveira Borba, E. F., Reges de Sena, A., & Campos, T. C. (2022). Phytochemical Analysis and Biological Activity from *Clidemia capitellata* leaves (Melastomataceae). *Revista Brasileira Multidisciplinar*, 25(3), 62–72. <https://doi.org/10.25061/2527-2675/ReBraM/2022.v25i3.1296>
- Ferreira, N. S., Cascaes, M. M., Santos, L. da S., de Oliveira, M. S., Zoghbi, M. D. G. B., Araújo, I. S., Uetanabaro, A. P. T., Andrade, E. H. de A., & Guilhon, G. M. S. P. (2022). Flavanone Glycosides, Triterpenes, Volatile Compounds and Antimicrobial Activity of *Miconia minutiflora* (Bonpl.) DC. (Melastomataceae). *Molecules*, 27(6), 2005–2005.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES27062005/S1>
- Fierro, A. F., Fernández, D., & Quintana, C. (2002). Usos de Melastomataceae en el Ecuador. *SIDA, Contributions to Botany*, 20(1), 233–260. <http://www.jstor.org/stable/41968018>
- Finberg, R. W., Moellering, R. C., Tally, F. P., Craig, W. A., Pankey, G. A., Dellinger, E. P., West, M. A., Joshi, M., Linden, P. K., Rolston, K. V., Rotschafer, J. C., & Rybak, M. J. (2004). The Importance of Bactericidal Drugs: Future Directions in Infectious Disease. *Clinical Infectious Diseases*, 39(9), 1314–1320. <https://doi.org/10.1086/425009>
- Gahlaut, A., & Chhillar, A. K. (2013). Evaluation of antibacterial potencial of plant extracts using Resazurin based microtiter dilution assay. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(2), 372–376.
- Gavriil, A., Zilelidou, E., Papadopoulos, A. E., Siderakou, D., Kasiotis, K. M., Haroutounian, S. A., Gardeli, C., Giannenas, I., & Skandamis, P. N. (2021). Evaluation of antimicrobial activities of plant aqueous extracts against *Salmonella Typhimurium* and their application to improve safety of pork meat. *Scientific Reports 2021 11:1*, 11(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01251-0>
- Gilbert, A., Herve, T. T., William, Y. N., Leonard, S. F., Jules-Roger, K., & Albert, K. (2014). Antidiarrhoeal and antibacterial activity of aqueous and methanolic leaves extracts of *Dissotis thollonii* Cogn.

- (Melastomataceae). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4, S672–S678. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.201414B214>
- Golias, H. C., Polonio, J. C., dos Santos Ribeiro, M. A., Polli, A. D., da Silva, A. A., Bulla, A. M., Volpato, H., Nakamura, C. V., Meurer, E. C., Azevedo, J. L., & Pamphile, J. A. (2020). *Tibouchina granulosa* (Vell.) Cogn (Melastomataceae) as source of endophytic fungi: isolation, identification, and antiprotozoal activity of metabolites from *Phyllosticta capitalensis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51(2), 557–569. <https://doi.org/10.1007/S42770-019-00221-Z>
- Gomes, L. F., Martins, D. H. N., da Silva, S. M. M., de Barros, Y. Y., de Souza, P. M., de Freitas, M. M., Fagg, C. W., Simeoni, L. A., Magalhaes, P. O., Silveira, D., & Fonseca-Bazzo, Y. M. (2021). Biological properties and phytochemical characterization from *Miconia chamissois* Naudin aqueous extract. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 20(4), 427–442. <https://doi.org/10.37360/blacpma.21.20.4.32>
- Gontijo, D. C., Gontijo, P. C., Brandão, G. C., Diaz, M. A. N., de Oliveira, A. B., Fietto, L. G., & Leite, J. P. V. (2019). Antioxidant study indicative of antibacterial and antimutagenic activities of an ellagitannin-rich aqueous extract from the leaves of *Miconia latecrenata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 236, 114–123. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2019.03.007>
- Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., Guimarães, M. C. C., Endringer, D. C., Fronza, M., & Scherer, R. (2019). Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils. *Molecules*, 24(13). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24132471>
- Hamdani, S. S., Bhat, B. A., Tariq, L., Yaseen, S. I., Ara, I., Rafi, B., Hamdani, S. N., Hassan, T., & Rashid, O. (2020). *Antibiotic Resistance: The Future Disaster*. <https://papers.ssrn.com/abstract=3722888>
- Hassan, A., & Ullah, H. (2019). Antibacterial and Antifungal Activities of the Medicinal Plant *Veronica biloba*. *Journal of Chemistry*, 2019, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/5264943>
- Horváth, Gy., Bencsik, T., Ács, K., & Kocsis, B. (2016). Sensitivity of ESBL-Producing Gram-Negative Bacteria to Essential Oils, Plant Extracts, and Their Isolated Compounds. In *Antibiotic Resistance* (pp. 239–269). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803642-6.00012-5>
- Hu, X., Tang, J., Zhang, G., Deng, J., Kan, H., Zhang, Y., Zhao, P., & Liu, Y. (2021). Optimization of extraction process and antioxidant activities of saponins from *Camellia fascicularis* leaves. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(2), 1889–1898. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00754-0>
- Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence-Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO Reports*, 21(12), e51034. <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
- Ighere, D. A., Ezenwata, C. J., Edagbo, D. E., Alowonle, A. A., Lawyer, E. F., Michael, C., Abaku, N. S., Oham, R., Dave-Omore, A. O., & Okere, O. D. (2019). Phytochemical and Antibacterial Properties of Methanolic Extracts of *Melastomastrum capitatum* Leaves. *Asian Journal of Biological Sciences*, 13(1), 98–104. <https://doi.org/10.3923/AJBS.2020.98.104>

- Institute for Health Metrics and Evaluation, & University of Oxford. (2023). The burden of antimicrobial resistance (AMR) in Ecuador. In *Institute for Health Metrics and Evaluation* (pp. 1–4). https://www.healthdata.org/sites/default/files/files/Projects/GRAM/Ecuador_0.pdf
- Jasovský, D., Littmann, J., Zorzet, A., & Cars, O. (2016). Antimicrobial resistance a threat to the world's sustainable development. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 121(3), 159. <https://doi.org/10.1080/03009734.2016.1195900>
- Jeong, J.-Y., Jung, I.-G., Yum, S.-H., & Hwang, Y.-J. (2023). *In Vitro* Synergistic Inhibitory Effects of Plant Extract Combinations on Bacterial Growth of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceuticals*, 16(10), 1491. <https://doi.org/10.3390/ph16101491>
- Jeyakumar, G. E., & Lawrence, R. (2021). Mechanisms of bactericidal action of Eugenol against *Escherichia coli*. *Journal of Herbal Medicine*, 26, 100406. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100406>
- Jiang, X., Feng, K., & Yang, X. (2015). *In vitro* Antifungal Activity and Mechanism of Action of Tea Polyphenols and Tea Saponin against *Rhizopus stolonifer*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 25(4), 269–276. <https://doi.org/10.1159/000430866>
- Jiang, Z., Kempinski, C., & Chappell, J. (2016). Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids. *Current Protocols in Plant Biology*, 1(2), 345–358. <https://doi.org/10.1002/cppb.20024>
- Jones, W. P., & Kinghorn, A. D. (2012). *Extraction of Plant Secondary Metabolites* (pp. 341–366). https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_13
- Justine, V. T., Mustafa, M., Kankara, S. S., & Go, R. (2019). Effect of Drying Methods and Extraction Solvents on Phenolic Antioxidants and Antioxidant Activity of *Scurrula ferruginea* (Jack) Danser (Loranthaceae) Leaf Extracts. *Sains Malaysiana*, 48(7), 1383–1393. <https://doi.org/10.17576/JSM-2019-4807-07>
- Kakurinov, V. (2014). Food Safety Assurance Systems: Cleaning and Disinfection. *Encyclopedia of Food Safety*, 4, 211–225. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00356-5>
- Kengne, I. C., Fankam, A. G., Yamako, E. K., & Tamokou, J. D. D. (2023). Phytochemical Analysis, Antifungal, and Antioxidant Properties of Two Herbs (*Tristemma mauritianum* and *Crassocephalum boughyanum*) and One Tree (*Lavigeria macrocarpa*) Species. *Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences*, 2023, 2565857–2565857. <https://doi.org/10.1155/2023/2565857>
- Khameneh, B., Iranshahy, M., Soheili, V., & Fazly Bazzaz, B. S. (2019). Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 2019 8:1, 8(1), 1–28. <https://doi.org/10.1186/S13756-019-0559-6>
- Kostyanov, T., & Can, F. (2017). The Global Crisis of Antimicrobial Resistance. *Antimicrobial Stewardship*, 3–12. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810477-4.00001-5>
- Krakowska-Sieprawska, A., Kielbasa, A., Rafińska, K., Ligor, M., & Buszewski, B. (2022). Modern Methods of Pre-Treatment of Plant Material for the Extraction of Bioactive Compounds. *Molecules*, 27(3). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27030730>

- Kumar Srivastava, A. (2018). Significance of medicinal plants in human life. *Synthesis of Medicinal Agents from Plants*, 1–24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102071-5.00001-5>
- Leon, C. G. T., & Tayupanta, T. D. L. A. M. (2022). *El Uso de la Medicina Tradicional en Ecuador en el Cuidado de la Piel* (pp. 103–128). Editorial Universitaria Abya-Yala. <https://pure.ups.edu.ec/es/publications/el-uso-de-la-medicina-tradicional-en-ecuador-en-el-cuidado-de-la->
- Liu, F., Wang, Y., Corke, H., & Zhu, H. (2022). Dynamic changes in flavonoids content during congou black tea processing. *LWT*, 170, 114073. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.114073>
- Liu, X., Liu, Y., Shan, C., Yang, X., Zhang, Q., Xu, N., Xu, L., & Song, W. (2022). Effects of five extraction methods on total content, composition, and stability of flavonoids in jujube. *Food Chemistry: X*, 14, 100287. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2022.100287>
- Lobiuc, A., Pavăl, N. E., Mangalagiu, I. I., Gheorghită, R., Teliban, G. C., Amăriucăi-Mantu, D., & Stoleru, V. (2023). Future Antimicrobials: Natural and Functionalized Phenolics. *Molecules* 2023, Vol. 28, Page 1114, 28(3), 1114. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28031114>
- Maheswary, T., Nurul, A. A., & Fauzi, M. B. (2021). The Insights of Microbes' Roles in Wound Healing: A Comprehensive Review. *Pharmaceutics*, 13(7), 981. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS13070981>
- Manjula, R. R., & Kumar, P. R. (2021). A Review on Species of Melastomataceae. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 13(02). <https://doi.org/10.31838/IJPR/2021.13.02.367>
- Martínez, S., Fuentes, C., & Carballo, J. (2022). Antioxidant Activity, Total Phenolic Content and Total Flavonoid Content in Sweet Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Cultivars Grown in Northwest Spain under Different Environmental Conditions. *Foods*, 11(21), 3519. <https://doi.org/10.3390/foods11213519>
- Matos, E., Bomfim, S., Gomes, T., Santos, D., Santana De Oliveira Carneiro, A., Da Costa Silva, M., De, E., Marques, J., & Lúcia Costa Vale, V. (2020). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and chemical profile of species of *Miconia* Ruiz & Pav., *Clidemia* D. Don and *Tibouchina* Aubl. (Melastomataceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 14(1), 1–6. <https://doi.org/10.5897/JMPR2019.6846>
- Meng, Y., Du, Z., Li, Y., Gao, P., Song, J., Lu, Y., Tu, P., Jiang, Y., & Guo, X. (2020). The synergistic mechanism of total saponins and flavonoids in Notoginseng–Safflower pair against myocardial ischemia uncovered by an integrated metabolomics strategy. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110574. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110574>
- Minnaard, J., Rolny, I. S., & Pérez, P. F. (1996). *Bacillus. Laboratory Models for Foodborne Infections*, 131–154. <https://doi.org/10.1201/9781315120089-8>
- Mohammed, A. H. (2019). Importance of Medicinal Plants. *Research in Pharmacy and Health Sciences*, 05(02), 151–151. <https://doi.org/10.32463/RPHS.2019.V05I02.01>

- Montúfar-Andrade, F. E., Mesa-Navas, M., Aguilar-Londoño, C., Saldarriaga-Acevedo, C., Quiroga-Echeverr, A., Builes-Montaño, C. E., Villa-Franco, J. P., Zuleta-Tobon, J. J., Montúfar-Pantoja, M. C., Monsalve, M. A., & Hernández, C. (2016). Experiencia clínica con infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa, en una institución de enseñanza universitaria en Medellín, Colombia. *Infectio*, 20(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.infect.2015.07.003>
- Morán-Marcillo, G., Sánchez Hinojosa, V., de los Monteros-Silva, N. E., Blasco-Zúñiga, A., Rivera, M., Naranjo, R. E., Almeida, J. R., Wang, L., Zhou, M., Chen, T., Shaw, C., & Proaño-Bolaños, C. (2022). Picturins and Pictuseptins, two novel antimicrobial peptide families from the skin secretions of the Chachi treefrog, *Boana picturata*. *Journal of Proteomics*, 264. <https://doi.org/10.1016/J.JPROT.2022.104633>
- Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Nadeem, A., Shahzad, H., Ahmed, B., Muntean, T., Waseem, M., & Tabassum, A. (2022). Phytochemical profiling of antimicrobial and potential antioxidant plant: *Nepeta cataria*. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.969316>
- Nesměrák, K., Kudláček, K., Štícha, M., Kozlík, P., Červený, V., & Kunešová, J. (2019). Degradation of the opium alkaloids in pharmaceutical relics from the eighteenth century. *Monatshefte Für Chemie - Chemical Monthly*, 150(9), 1593–1602. <https://doi.org/10.1007/s00706-019-02461-z>
- NGUYEN, L. T., FĂRCAȘ, A. C., SOCACI, S. A., TOFANĂ, M., DIACONEASA, Z. M., POP, O. L., & SALANȚĂ, L. C. (2020). An Overview of Saponins – A Bioactive Group. *Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Food Science and Technology*, 77(1), 25–36. <https://doi.org/10.15835/buasvmcn-fst:2019.0036>
- Noor, F., Tahir ul Qamar, M., Ashfaq, U. A., Albutti, A., Alwashmi, A. S. S., & Aljasir, M. A. (2022). Network Pharmacology Approach for Medicinal Plants: Review and Assessment. *Pharmaceuticals*, 15(5), 572. <https://doi.org/10.3390/ph15050572>
- Nortjie, E., Basitere, M., Moyo, D., & Nyamukamba, P. (2022). Extraction Methods, Quantitative and Qualitative Phytochemical Screening of Medicinal Plants for Antimicrobial Textiles: A Review. *Plants*, 11(15). <https://doi.org/10.3390/PLANTS11152011>
- Nzogong, R. T., Ndjateu, F. S. T., Ekom, S. E., Fosso, J. A. M., Awouafack, M. D., Tene, M., Tane, P., Morita, H., Choudhary, M. I., & Tamokou, J. de D. (2018). Antimicrobial and antioxidant activities of triterpenoid and phenolic derivatives from two Cameroonian Melastomataceae plants: *Dissotis senegambiensis* and *Amphiblemma monticola*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/S12906-018-2229-2>

- O'Neill, J. (2016). Review on antimicrobial resistance: tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *Review on Antimicrobial Resistance: Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*.
- Organización Mundial de la Salud. (2021, November 17). *Resistencia a los antimicrobianos*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Pan American Health Organization, & World Health Organization. (2023). *Resistance percentages for selected pathogens*. PLISA Health Information Platform for the Americas. <https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/antimicrobial-resistance/571-amr-vig-en.html>
- Perim, M. C., Borges, J. da C., da Silva, E. M. L., Araújo, T. A. de S., da Silva, A. C. O., da Silva, V. C., Carreiro, S. C., Cunha, A. F., & Pranchevicius, M. C. da S. (2019). *In vitro* antibacterial and time-kill assay of ethanolic extract of *Davilla nitida* bark on multidrug resistant bacteria isolated from diabetic foot lesions. *Natural Product Research*, 33(16), 2383–2388. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1443085>
- Pfalzgraff, A., Brandenburg, K., & Weindl, G. (2018). Antimicrobial peptides and their therapeutic potential for bacterial skin infections and wounds. *Frontiers in Pharmacology*, 9(MAR), 352601. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00281/BIBTEX>
- Plants of the World Online. (2023). *Monolena primuliflora* Hook.f. Plants of the World Online. <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:323262-2>
- Poh, W. H., Ruhazat, N. S., Yang, L. K., Shivhare, D., Lim, P. K., Kanagasundaram, Y., Rice, S. A., & Mutwil, M. (2023). Transcriptomic and metabolomic characterization of antibacterial activity of *Melastoma dodecandrum*. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1205725>
- Pollo, L. A. E., Martin, E. F., Machado, V. R., Cantillon, D., Wildner, L. M., Bazzo, M. L., Waddell, S. J., Biavatti, M. W., & Sandjo, L. P. (2021). Search for Antimicrobial Activity Among Fifty-Two Natural and Synthetic Compounds Identifies Anthraquinone and Polyacetylene Classes That Inhibit *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 622629. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.622629/BIBTEX>
- Purssell, E. (2020). Antimicrobials. In *Understanding Pharmacology in Nursing Practice* (pp. 147–165). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-32004-1_6
- Rafiq, M. A., Shahid, M., Jilani, K., & Aslam, M. A. (2022). Antibacterial, Antibiofilm, and Anti-Quorum Sensing Potential of Novel Synthetic Compounds Against Pathogenic Bacteria Isolated From Chronic Sinusitis Patients. *Dose-Response*, 20(4), 1–12. <https://doi.org/10.1177/15593258221135731>
- Raja Ratna Reddy, Y., Krishna Kumari, C., Lokanatha, O., Mamatha, S., & Damodar Reddy, C. (2020). Antimicrobial activity of *Azadirachta Indica* (neem) leaf, bark and seed extracts. *Int. J. Res. Phytochem. Pharmacol*, 3(1). <http://repo.lib.jfn.ac.lk/ujrr/handle/123456789/9557>

- Rajendrasozhan, S., Moll, H. El, Snoussi, M., Romeilah, R. M., Shalaby, E. A., Younes, K. M., & El-Beltagi, H. S. (2021). Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of Various Extracts of Aerial Parts of *Rhanterium epapposum*. *Processes* 2021, Vol. 9, Page 1351, 9(8), 1351. <https://doi.org/10.3390/PR9081351>
- Ramadan, E. M., Abou-Taleb, K. A., Galal, G. F., & Abdel-Hamid, N. S. (2017). Antibacterial, antibiofilm and antitumor activities of grape and mulberry leaves ethanolic extracts towards bacterial clinical strains. *Annals of Agricultural Sciences*, 62(2), 151–159. <https://doi.org/10.1016/J.AOAS.2017.11.002>
- Rickert, D. A., Meyer, M. A., Hu, J., & Murphy, P. A. (2004). Effect of Extraction pH and Temperature on Isoflavone and Saponin Partitioning and Profile During Soy Protein Isolate Production. *Journal of Food Science*, 69(8). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09910.x>
- Rodrigues, J., Michelin, D. C., Rinaldo, D., Zocolo, G. J., Dos Santos, L. C., Vilegas, W., & Salgado, H. R. N. (2008). Antimicrobial Activity of *Miconia* Species (Melastomataceae). *Https://Home.Liebertpub.Com/Jmf*, 11(1), 120–126. <https://doi.org/10.1089/JMF.2007.557>
- Rodríguez De Luna, S. L., Ramírez-Garza, R. E., & Serna Saldívar, S. O. (2020). Environmentally Friendly Methods for Flavonoid Extraction from Plant Material: Impact of Their Operating Conditions on Yield and Antioxidant Properties. *The Scientific World Journal*, 2020, 1–38. <https://doi.org/10.1155/2020/6792069>
- Rodríguez-Melcón, C., Alonso-Calleja, C., García-Fernández, C., Carballo, J., & Capita, R. (2021). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for Twelve Antimicrobials (Biocides and Antibiotics) in Eight Strains of *Listeria monocytogenes*. *Biology*, 11(1), 46. <https://doi.org/10.3390/biology11010046>
- Schultz, F., & Garbe, L. A. (2023). How to approach a study in ethnopharmacology? Providing an example of the different research stages for newcomers to the field today. *Pharmacology Research & Perspectives*, 11(4). <https://doi.org/10.1002/PRP2.1109>
- Seukep, A. J., Mbuntcha, H. G., Zeuko'o, E. M., Woquan, L. S., Nembu, N. E., Bomba, F. T., Watching, D., & Kuete, V. (2023). Established antibacterial drugs from plants. *Advances in Botanical Research*, 106, 81–149. <https://doi.org/10.1016/BS.ABR.2022.08.005>
- Shafiq, N., Pandey, A. K., Malhotra, S., Holmes, A., Mendelson, M., Malpani, R., Balasegaram, M., & Charani, E. (2021). Shortage of essential antimicrobials: a major challenge to global health security. *BMJ Global Health*, 6(11), e006961. <https://doi.org/10.1136/BMJGH-2021-006961>
- Shaikh, J. R., & Patil, M. (2020). Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview. *International Journal of Chemical Studies*, 8(2), 603–608. <https://doi.org/10.22271/CHEMI.2020.V8.I2I.8834>
- Shedoeva, A., Leavesley, D., Upton, Z., & Fan, C. (2019). Wound healing and the use of medicinal plants. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2684108>

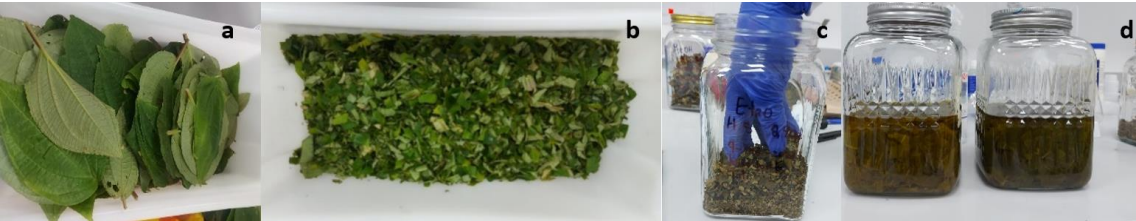
- Siddiqui, M. (2021). Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Liaquat Medical Research Journal*, 3(8). <https://doi.org/10.38106/lmrj.2021.36>
- Simeon, J. E., Deji Agboola, M. A., Femi-Oyewo, M. N., Olabanjo, O. K., & Jolaosho, A. O. (2016). Phytochemical and *invitro* antibacterial activities of the crude and fractionated leaf extracts of *Dissotis theifolia* g. Don. (Melastomataceae). *Journal of Sciences and Multidisciplinary Research*, 8(2).
- Sindhu, H. A., Afzal, M., & Shahid, I. (2023). Pharmacological Activities and *In-Silico* Studies of Bioactive Compounds Identified in Organic Fractions of the Methanolic Extract of *Citrullus Colocynthis*. *Dose-Response : A Publication of International Hormesis Society*, 21(3). <https://doi.org/10.1177/15593258231187357>
- Sofowora, A., Ogunbodede, E., & Onayade, A. (2013). The Role and Place of Medicinal Plants in the Strategies for Disease Prevention. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 10(5), 210. <https://doi.org/10.4314/AJTCAM.V10I5.2>
- Solikhah, T. I., Setiawan, B., & Ismukada, D. R. (2020). Antidiabetic Activity of Papaya Leaf Extract (*Carica Papaya* L.) Isolated with Maceration Method in Alloxan-Induces Diabetic Mice. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(9), 774–778. <https://doi.org/10.31838/SRP.2020.9.109>
- Sulaiman, M., Jannat, K., Nissapatorn, V., Rahmatullah, M., Paul, A. K., de Lourdes Pereira, M., Rajagopal, M., Suleiman, M., Butler, M. S., Break, M. K. Bin, Weber, J.-F., Wilairatana, P., & Wiart, C. (2022). Antibacterial and Antifungal Alkaloids from Asian Angiosperms: Distribution, Mechanisms of Action, Structure-Activity, and Clinical Potentials. *Antibiotics*, 11(9), 1146. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11091146>
- Tang, K. W. K., Millar, B. C., & Moore, J. E. (2023). Antimicrobial Resistance (AMR). *British Journal of Biomedical Science*, 80, 11387. <https://doi.org/10.3389/BJBS.2023.11387>
- Tavares, T. D., Antunes, J. C., Padrão, J., Ribeiro, A. I., Zille, A., Amorim, M. T. P., Ferreira, F., & Felgueiras, H. P. (2020). Activity of Specialized Biomolecules against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*, 9(6), 314. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060314>
- Teh, C. H., Nazni, W. A., Nurulhusna, A. H., Norazah, A., & Lee, H. L. (2017). Determination of antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of larval extract of fly via resazurin-based turbidometric assay. *BMC Microbiology*, 17(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/S12866-017-0936-3/TABLES/3>
- Tetteh, J. N. A., Matthäus, F., & Hernandez-Vargas, E. A. (2020). A survey of within-host and between-hosts modelling for antibiotic resistance. *Biosystems*, 196, 104182. <https://doi.org/10.1016/J.BIOSYSTEMS.2020.104182>
- The Plant List. (2010). *The Plant List*. <http://www.theplantlist.org/>
- Tian, L., Wang, X., Liu, R., Zhang, D., Wang, X., Sun, R., Guo, W., Yang, S., Li, H., & Gong, G. (2021). Antibacterial mechanism of thymol against *Enterobacter sakazakii*. *Food Control*, 123, 107716. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107716>

- Tiwari, P., Kaur, M., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Medicine, Chemistry, Environmental Science*, 1(1), 98–106.
- Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–661. <https://doi.org/10.1128/CMR.00134-14>
- Twaij, B. M., & Hasan, M. N. (2022). Bioactive Secondary Metabolites from Plant Sources: Types, Synthesis, and Their Therapeutic Uses. *International Journal of Plant Biology 2022, Vol. 13, Pages 4-14*, 13(1), 4–14. <https://doi.org/10.3390/IJPB13010003>
- Ugochukwu, S. C., Uche, A., & Ifeanyi, O. (2013). Preliminary phytochemical screening of different solvent extracts of stem bark and roots of *Dennetia tripetala* G. Baker. *Asian Journal of Plant Science & Research*, 3(3), 10–13. <https://www.imedpub.com/abstract/preliminary-phytochemical-screening-of-different-solvent-extracts-of-stem-bark-and-roots-of-dennetia-tripetala-g-baker-14633.html>
- Ukwubile, C., Ikpefan, E., Malgwi, T., & Umeokoli, B. (2020). Pharmacognostic study and physiochemical assessment on the leaves of *Melastomastrum capitatum* Fern. anticancer plant in Nigeria. *American Journal of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 10(1), 8. <https://doi.org/10.5455/ajpbp.20190822065441>
- Villaret-Cazadamont, J., Poupin, N., Tournadre, A., Batut, A., Gales, L., Zalko, D., Cabaton, N. J., Bellvert, F., & Bertrand-Michel, J. (2020). An Optimized Dual Extraction Method for the Simultaneous and Accurate Analysis of Polar Metabolites and Lipids Carried out on Single Biological Samples. *Metabolites*, 10(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/METABO10090338>
- Wachira, S. W., Mukherjee, P. K., Harwansh, R. K., Bahadur, S., Duraipandiyan, V., & Al-Dhabi, N. A. (2024). Factors to consider in development of nutraceutical and dietary supplements. In *Pharmacognosy* (pp. 757–768). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-18657-8.00032-3>
- Wang, L., Kong, D., Tian, J., Zhao, W., Chen, Y., An, Y., Liu, X., Wang, F., Cai, F., Sun, X., Liu, Q., Zhang, W., Tian, J., & Zhou, H. (2022). *Tapinanthus* species: A review of botany and biology, secondary metabolites, ethnomedical uses, current pharmacology and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology*, 296, 115462. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115462>
- Wang, L., Li, W., Li, X., Liu, J., & Chen, Y. (2023). Antimicrobial Activity and Mechanisms of Walnut Green Husk Extract. *Molecules*, 28(24). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES28247981/S1>
- World Health Organization. (2013). *WHO traditional medicine strategy: 2014-2023* (World Health Organization, Ed.). <https://www.who.int/publications/i/item/9789241506096>
- World Health Organization. (2023, November 17). *Antimicrobial resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Yassin, N. A., & Ahmad, A. M. (2012). Incidence and Resistotyping Profiles of *Bacillus subtilis* Isolated from Azadi Teaching Hospital in Duhok City, Iraq. *Materia Socio-Medica*, 24(3), 194. <https://doi.org/10.5455/MSM.2012.24.194-197>

- Zheng, W. J., Ren, Y. S., Wu, M. L., Yang, Y. L., Fan, Y., Piao, X. H., Ge, Y. W., & Wang, S. M. (2021). A review of the traditional uses, phytochemistry and biological activities of the *Melastoma* genus. *Journal of Ethnopharmacology*, 264. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2020.113322>
- Zou, L., Lu, F., Lin, B., Zhou, Y., Liu, T., & Sun, Y. (2019). Stability of Alkaloids during Drying Process and Their Effect on Anticoagulating Activity of *Uncariae Ramulus Cum Uncis*. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2019, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/7895152>

ANEXOS

ANEXO A: Proceso de obtención de extractos de *M. primuliflora*



a: Limpieza de hojas. b: Corte de hojas. c:Trituración de hojas secas. d:Macerados de 14 días.
Realizado por: Shiguango, 2024.

ANEXO B: Prueba de Dragendorff para la determinación de alcaloides

Control +	AHF	AHS	MHF	MHS	DEHF	DEHS	Control -

Control +: Atropina. AHF: Acuosos de hojas frescas. AHS: Acuosos de hojas secas. MHF: Metanólicos de hojas frescas. MHS: Metanólicos de hojas secas. DEHF: Éter dietílico de hojas frescas. DEHS: Éter dietílico de hojas secas. Control -: Agua destilada. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

ANEXO C: Prueba de Shinoda para la determinación de flavonoides

Control +	AHF	AHS	MHF	MHS	DEHF	DEHS	Control -
							

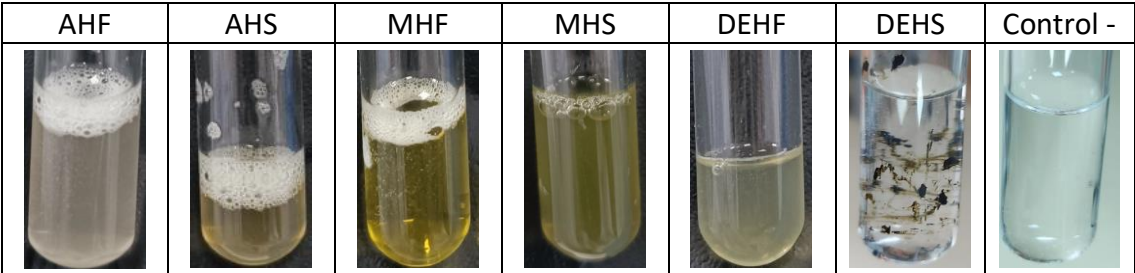
Control +: Quercetina. AHF: Acuoso de hojas frescas. AHS: Acuoso de hojas secas. MHF: Metanólico de hojas frescas. MHS: Metanólico de hojas secas. DEHF: Éter dietílico de hojas frescas. DEHS: Éter dietílico de hojas secas. Control -: Agua destilada. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

ANEXO D: Prueba de cloruro férrico para la determinación de fenoles

Control +	AHF	AHS	MHF	MHS	DEHF	DEHS	Control -
							

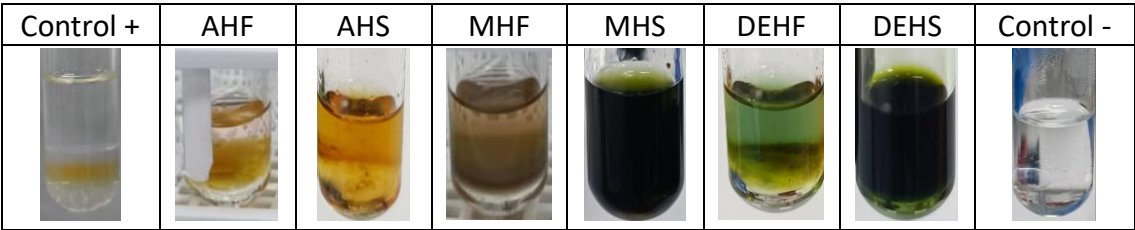
Control +: Ácido gálico. AHF: Acuoso de hojas frescas. AHS: Acuoso de hojas secas. MHF: Metanólico de hojas frescas. MHS: Metanólico de hojas secas. DEHF: Éter dietílico de hojas frescas. DEHS: Éter dietílico de hojas secas. Control -: Agua destilada. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

ANEXO E: Prueba de la espuma para la determinación de saponinas



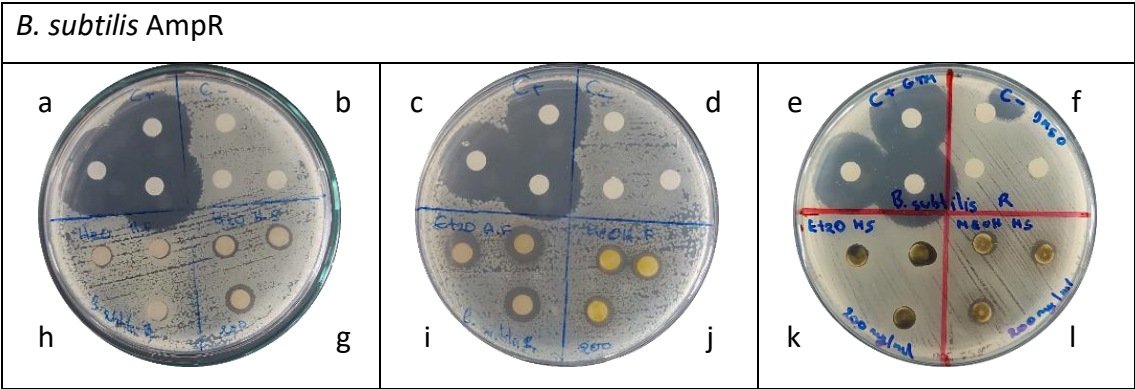
AHF: acuoso de hojas frescas. AHS: Acuoso de hojas secas. MHF: Metanólico de hojas frescas. MHS: Metanólico de hojas secas. DEHF: Éter dietílico de hojas frescas. DEHS: Éter dietílico de hojas secas. Control -: Agua destilada. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

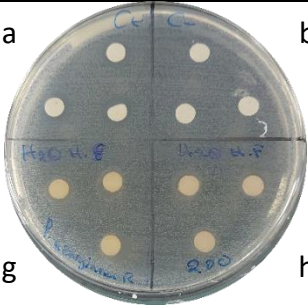
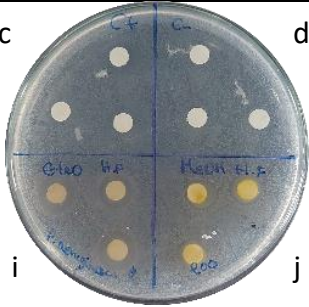
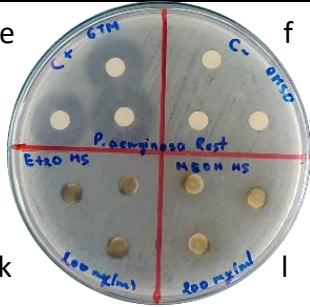
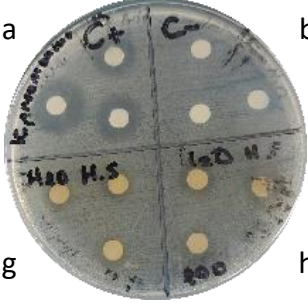
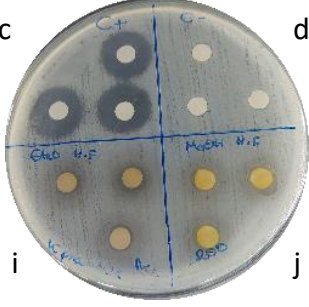
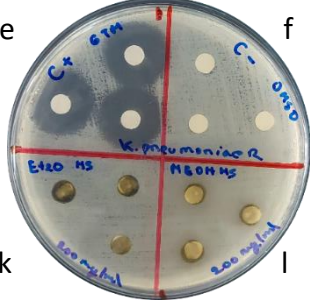
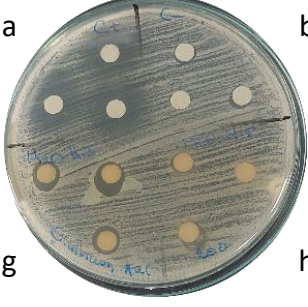
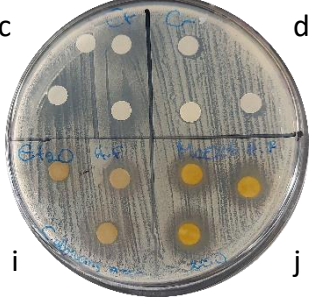
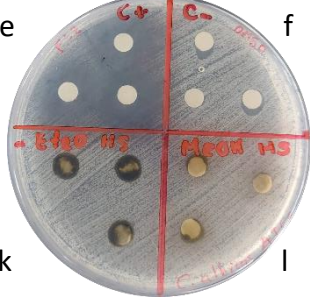
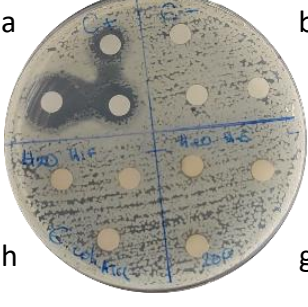
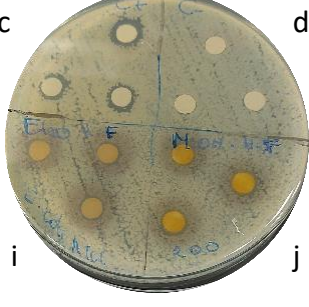
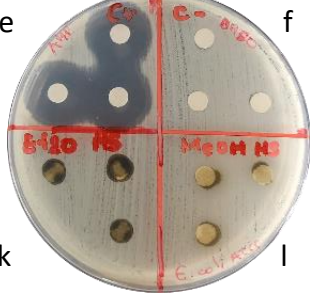
ANEXO F: Prueba de Salkowski para la determinación de terpenoides

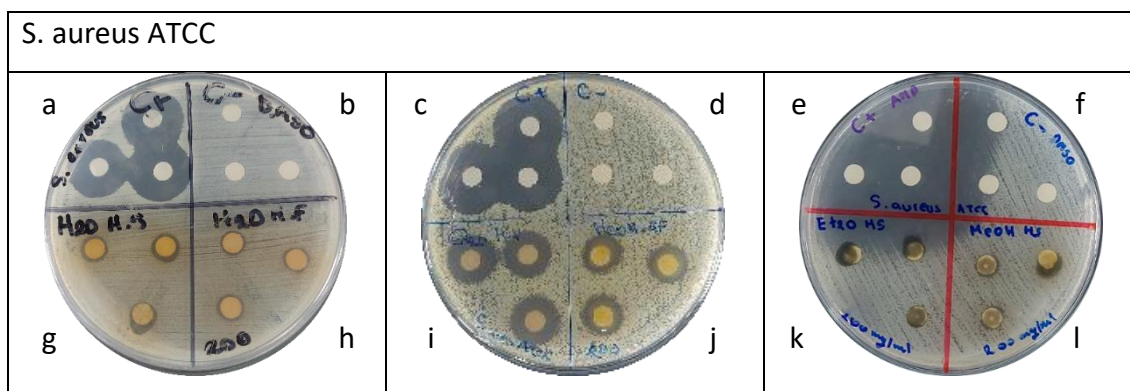


Control +: Alcanfor. AHF: Acuoso de hojas frescas. AHS: Acuoso de hojas secas. MHF: Metanólico de hojas frescas. MHS: Metanólico de hojas secas. DEHF: Éter dietílico de hojas frescas. DEHS: Éter dietílico de hojas secas. Control -: Agua destilada. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

ANEXO G: Ensayo exploratorio de la actividad antimicrobiana de los extractos de *M. primuliflora* a 200 mg/mL

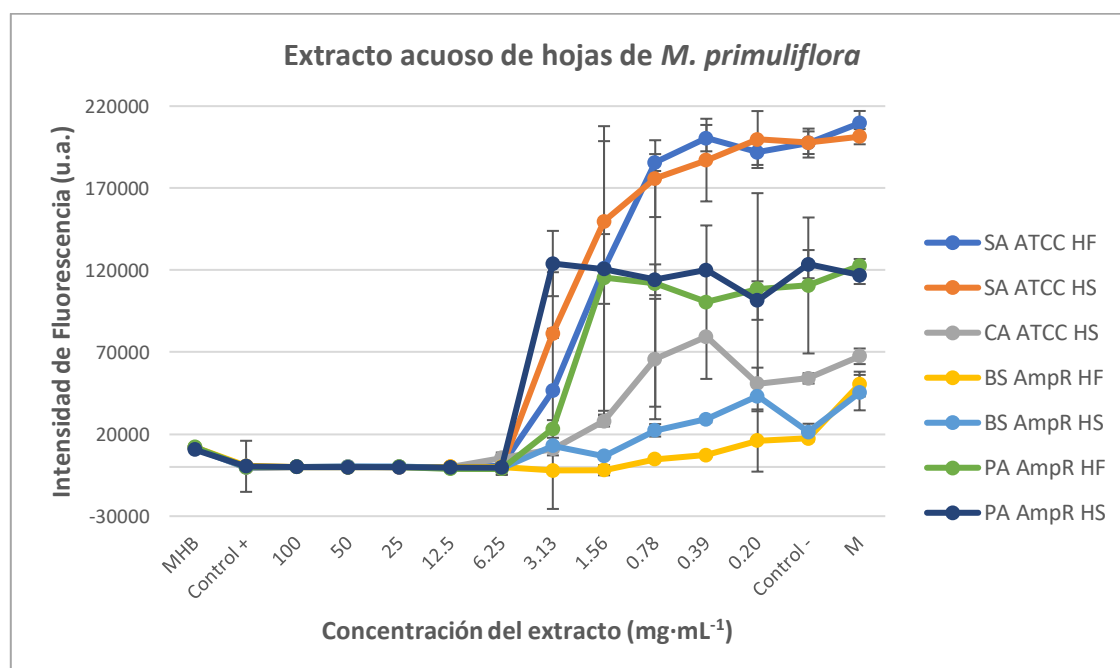


<i>P.aeruginosa</i> AmpR					
a	b	c	d	e	f
	g		h		i
<i>K. pneumoniae</i> AmpR					
a	b	c	d	e	f
	g		h		i
<i>C. albicans</i> ATCC					
a	b	c	d	e	f
	g		h		i
<i>E. coli</i> ATCC					
a	b	c	d	e	f
	g		h		i



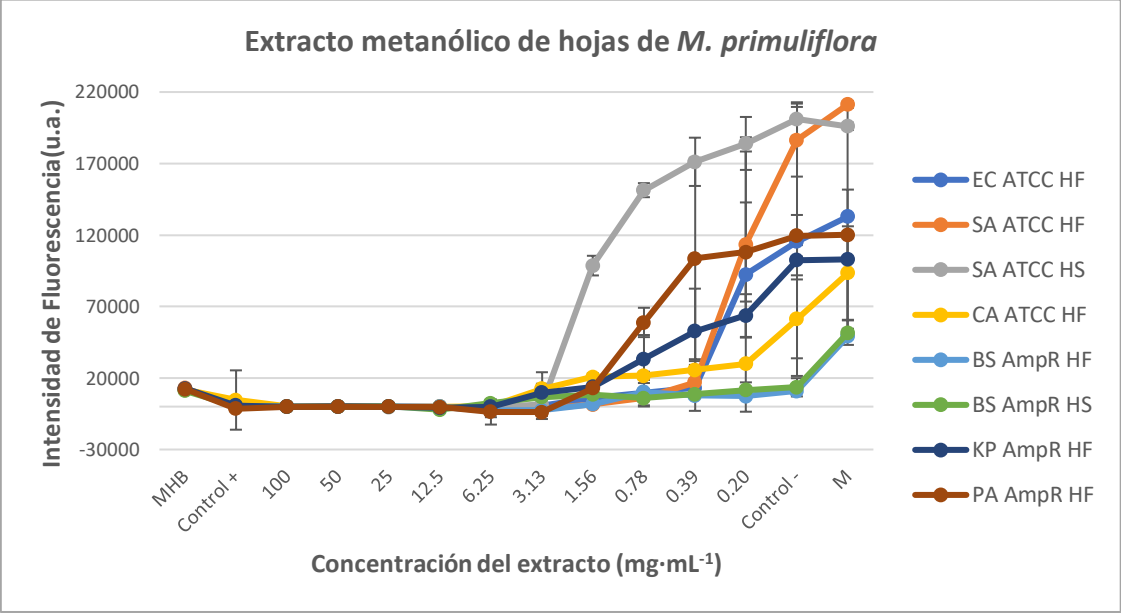
a, c, e: Control (+) (gentamicina, ampicilina, fluconzol a 1mg/ml). b, d, f: Control (-) (DMSO al 1%). g: Extracto AHS. h: Extracto AHF. i: Extracto DEHF. j: Extracto MHF. k: Extracto DEHS. l: Extracto MHS. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

ANEXO H: Gráfica de la media y error estándar de la Intensidad de Fluorescencia emitida a 580-640 nm del extracto acuoso de hojas de *M. primuliflora*



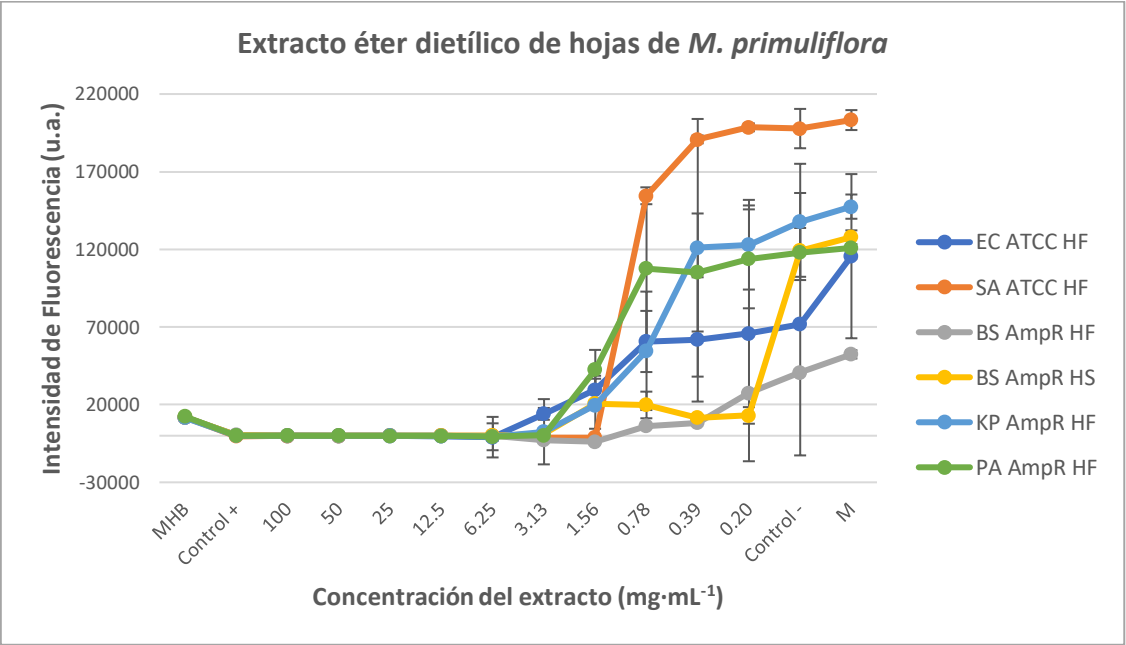
MHB: Caldo (control de esterilidad). Control +: gentamicina, ampicilina, fluconzol a 1mg/ml. Control -: DMSO al 1%. M: Microorganismo sin tratamiento. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

ANEXO I: Gráfica de la media y error estándar de la Intensidad de Fluorescencia emitida a 580-640 nm del extracto metanólico de hojas de *M. primuliflora*



MHB: Caldo (control de esterilidad). Control +: gentamicina, ampicilina, fluconazol a 1mg/ml. Control -: DMSO al 1%. M: Microorganismo sin tratamiento. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

ANEXO J: Gráfica de la media y error estándar de la Intensidad de Fluorescencia emitida a 580-640 nm del extracto éter dietílico de hojas de *M. primuliflora*



MHB: Caldo (control de esterilidad). Control +: gentamicina, ampicilina, fluconzol a 1mg/ml. Control -: DMSO al 1%. M: Microorganismo sin tratamiento. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

ANEXO K: Análisis de varianza de dos factores de la intensidad de fluorescencia vs concentración, realizada para cada microorganismo frente a diversos extractos

Análisis de varianza de dos factores para <i>S. aureus</i> ATCC 29213						
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Extractos	1,4071E+11	6	2,3452E+10	10,8636708	2,0329E-06	2,420523189
Concentraciones	7,6815E+10	5	1,5363E+10	7,11654176	0,00017099	2,533554548

Realizado por: Shiguango, 2024.

Análisis de varianza de dos factores para *C. albicans* ATCC 10231

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Extractos	1771908086	6	295318014	1,76596094	0,14013566	2,420523189
Concentraciones	7060144458	5	1412028892	8,44373776	4,4508E-05	2,533554548

Realizado por: Shiguango, 2024.

Análisis de varianza de dos factores para *E. coli* ATCC 25922

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Extractos	3447687639	6	574614607	1,84011419	0,12472289	2,420523189
Concentraciones	6308280489	5	1261656098	4,04025805	0,00637445	2,533554548

Realizado por: Shiguango, 2024.

Análisis de varianza de dos factores para *P. aeruginosa* AmpR

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Extractos	2,1955E+10	6	3659200148	3,16462793	0,01587434	2,420523189
Concentraciones	4,478E+10	5	8955910645	7,74544267	8,9092E-05	2,533554548

Realizado por: Shiguango, 2024.

Análisis de varianza de dos factores para *K. pneumoniae* AmpR

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Extractos	7078377642	6	1179729607	2,00778474	0,09576232	2,420523189
Concentraciones	1,3381E+10	5	2676193278	4,55461997	0,00329623	2,533554548

Realizado por: Shiguango, 2024.

Análisis de varianza de dos factores para *B. subtilis* AmpR

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Extractos	2235840729	6	372640122	7,21045805	7,8901E-05	2,420523189
Concentraciones	820248877	5	164049775	3,17430667	0,02037528	2,533554548

Realizado por: Shiguango, 2024.

ANEXO L: Análisis ANOVA de dos vías de la intensidad de fluorescencia vs concentraciones de CMI para diferentes microorganismos y extractos de hojas de *M. primuliflora* usando la aplicación GraphPad Prism

Table Analyzed		<i>S. aureus</i> ATCC 29213			
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Row Factor	49,85	<0,0001	****	Yes	
Column Factor	27,21	0,0002	***	Yes	
ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Row Factor	1,40714E+11	6	23452336461	F (6, 30) = 10,86	P<0,0001
Column Factor	76815440440	5	15363088088	F (5, 30) = 7,117	P=0,0002

Datos de ANOVA de dos vías obtenida del software GraphPad. Row Factor: Extractos. Column Factor: Concentraciones mg/mL. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

Table Analyzed		<i>E. coli</i> ATCC 25922			
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Row Factor	18,03	0,1247	ns	No	
Column Factor	32,99	0,0064	**	Yes	
ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Row Factor	3447687639	6	574614607	F (6, 30) = 1,840	P=0,1247
Column Factor	6308280480	5	1261656096	F (5, 30) = 4,040	P=0,0064

Datos de ANOVA de dos vías obtenida del software GraphPad. Row Factor: Extractos. Column Factor: Concentraciones mg/mL. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

C. albicans ATCC 10231					
Table Analyzed					
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Row Factor	12,79	0,1401	ns	No	
Column Factor	50,98	<0,0001	****	Yes	
ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Row Factor	1771908086	6	295318014	F (6, 30) = 1,766	P=0,1401
Column Factor	7060144455	5	1412028891	F (5, 30) = 8,444	P<0,0001

Datos de ANOVA de dos vías obtenida del software GraphPad. Row Factor: Extractos. Column Factor: Concentraciones mg/mL. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

P. aeruginosa AmpR					
Table Analyzed					
Two-way ANOVA	Ordinary				
Alpha	0,05				
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Row Factor	21,65	0,0159	*	Yes	
Column Factor	44,15	<0,0001	****	Yes	
ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Row Factor	21955200910	6	3659200152	F (6, 30) = 3,165	P=0,0159
Column Factor	44779553313	5	8955910663	F (5, 30) = 7,745	P<0,0001

Datos de ANOVA de dos vías obtenida del software GraphPad. Row Factor: Extractos. Column Factor: Concentraciones mg/mL. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

<i>K. pneumoniae</i> AmpR					
Table Analyzed					
Two-way ANOVA Alpha		Ordinary 0,05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Row Factor	18,58	0,0958	Ns	No	
Column Factor	35,13	0,0033	**	Yes	
ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Row Factor	7078377659	6	1179729610	F (6, 30) = 2,008	P=0,0958
Column Factor	13380966414	5	2676193283	F (5, 30) = 4,555	P=0,0033

Datos de ANOVA de dos vías obtenida del software GraphPad. Row Factor: Extractos. Column Factor: Concentraciones mg/mL. **Realizado por:** Shiguango, 2024.

<i>B. subtilis</i> AmpR					
Table Analyzed					
Two-way ANOVA Alpha		Ordinary 0,05			
Source of Variation	% of total variation	P value	P value summary	Significant?	
Row Factor	48,54	<0,0001	****	Yes	
Column Factor	17,81	0,0204	*	Yes	
ANOVA table	SS (Type III)	DF	MS	F (DFn, DFd)	P value
Row Factor	2235840728	6	372640121	F (6, 30) = 7,210	P<0,0001
Column Factor	820248876	5	164049775	F (5, 30) = 3,174	P=0,0204

Datos de ANOVA de dos vías obtenida del software GraphPad. Row Factor: Extractos. Column Factor: Concentraciones mg/mL. **Realizado por:** Shiguango, 2024.