



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZONICA IKIAM

Facultad Ciencia de la Vida

Ingeniería en Biotecnología

**ETNOFARMACOLOGÍA DE *PIPER ADUNCUM* L.: USOS
MEDICINALES Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: MADELYN ANDREA MONAR LUCERO

TUTOR: Dra. SILVIA LLERENA

**Napo, Ecuador.
2023**

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 17 de marzo de 2023

Yo, Madelyn Andrea Monar Lucero con documento de identidad N° 0250009560, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título 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 la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

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

Atentamente,

.....
Madelyn Andrea Monar Lucero

Certificado de dirección de trabajo de integración curricular

Certifico que el trabajo de integración curricular titulado: Etnofarmacología de *Piper aduncum* L.: usos medicinales y actividad biológica, en la modalidad de: proyecto de investigación en formato artículo original, fue realizado por: Madelyn Andrea Monar Lucero, 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.

Tena, 17 de marzo del 2023

.....
Dra. Silvia Alejandra Llerena Gordillo
C.I: 1715410625

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo Madelyn Andrea Monar Lucero, con documento de identidad N° 0250009560, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: “Etnofarmacología de *Piper aduncum* L.: usos medicinales y actividad biológica”, 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.

Tena, 17 de marzo del 2023

Madelyn Andrea Monar Lucero
C.I: 0250009560

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por permitirme tener tan buena experiencia dentro de la universidad. A la doctora Montserrat Rios quien inicio esta investigación y quien desafortunadamente no está ahora para ver la finalización del proyecto. Al Mg. Fabián Aguilar, quien amablemente colaboró como puente de comunicación con la Dra. Rios y que me acompañó durante todo el proceso de investigación en el laboratorio. Agradezco también a la Dra. Silvia Llerena quien, aunque se incorporó al proyecto en su finalización ha sabido guiarme en la escritura de la tesis. Sin ustedes y sus virtudes, guía, paciencia y constancia este trabajo no lo hubiese logrado. Sus consejos y acompañamiento durante la realización de la investigación fueron de gran importancia para lograrlo.

Quiero agradecer a mi familia por ser ese apoyo incondicional durante toda mi carrera, aunque a veces quise dejarlo ustedes siempre estuvieron ahí para apoyarme en todo momento. Especialmente a mis padres, por todo el esfuerzo que hicieron para que culminara mi carrera con éxito.

Agradezco a mis amigas Yulisa Ugsha, Anghe Reinoso, Viviana Cabrera y Nicole Vinuesa, que estuvieron durante toda la travesía de la investigación, con quienes compartí experiencias inolvidables en el laboratorio y en la convivencia como compañeras de cuarto. Con Yuli compartí anécdotas de laboratorio muy peculiares. Con Vivi y Nico compartí hasta el final la loca travesía de una investigación que comenzó en tiempos de pandemia. A Anghe agradezco sus consejos. Gracias por estar ahí aun cuando las cosas se pusieron un poco difíciles.

Quiero también agradecer a todos los docentes que me han acompañado durante la carrera, les debo mis conocimientos y sembraron en mi la semilla de la investigación, gracias por su paciencia y sabiduría impartida en el aula. Es preciso agradecer a Juan Betancourt biotecnólogo de campo, quien me ayudó durante las entrevistas en las comunidades Kichwas. A Nina Espinosa de los Monteros, técnico docente del laboratorio de investigación en biología molecular de la Universidad, por su paciencia, dedicación y horas extra, cuando estaba iniciando en el uso y aprendizaje de los equipos y técnicas del laboratorio.

Por último y no menos importante agradezco a mis amigos y compañeros de viaje con quienes pasamos tardes, noches y madrugadas de estudio y trabajos por las aventuras fuera de la universidad y la convivencia. A Dayana Martínez y Sam Oña quienes me apoyaron y ayudaron incondicionalmente durante toda la carrera.

DEDICATORIA

Dedico con todo mi corazón mi tesis a mi familia porque sin ellos no lo hubiese logrado. Somos diez quienes nos apoyamos en todo momento, por sobre todas las adversidades. Sin ustedes la culminación de mi carrera no hubiese sido posible.

CONTENIDO

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad	i
Certificado de dirección de trabajo de integración curricular	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	vi
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
GRAPHICAL ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MÉTODOS.....	4
2.1 Colección de datos: Conocimiento local y uso de la especie medicinal	4
2.1.1 Área de estudio.....	4
2.1.2 Entrevistas semiestructuradas	5
2.1.3 Valor cultural: Índice de fidelidad	5
2.2 Extractos metanólicos.....	5
2.2.1 Recolección del material vegetal.....	5
2.2.2 Preparación del extracto vegetal	6
2.3 Actividad antimicrobiana	6
2.3.1 Microorganismos	6
2.3.2 Ensayo exploratorio	6
2.3.3 Concentración Mínima Inhibitoria	7
2.4 Ensayo Cometa.....	7
2.5 Análisis estadístico	8
3. RESULTADOS	9
3.1 Valor cultural.....	9
3.2 Actividad antimicrobiana	9
3.3 Ensayo cometa	10
4. DISCUSIÓN.....	11
5. CONCLUSIONES	15
REFERENCIAS	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Área de estudio. Siete comunidades Kichwas de Bajo Napo, Ecuador y lugar de toma de muestras.

Figura 2. Concentración mínima inhibitoria del extracto de *P. aduncum* contra *S. aureus*.

Figura 3. Linfocitos humanos expuestos a tres concentraciones del extracto de *P. aduncum*. a, control (-); b, control (+); c, 300 mg/mL; d, 7.5 mg/mL y e, 0.47 mg/mL.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Índice de fidelidad (FL) y usos terapéuticos en siete comunidades Kichwas de la provincia de Napo.

Tabla 2. Media $\pm$ desviación estándar de radio inhibitorio (mm) según concentración de extracto metanólico (mg/ml) (N=9).

Tabla 3. Correlación entre el diámetro del núcleo (mm) y concentraciones del extracto metanólico de *P. aduncum* (mg/mL). N=40

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Entrevistas estructuradas realizadas en las siete comunidades del Bajo Napo, Ecuador

Anexo 3. Información colectada durante las entrevistas organizado por comunidades.

Anexo 4. Flujograma del Ensayo Cometa

RESUMEN

Una de las principales causas de muerte en el mundo son las enfermedades del tracto respiratorio. A esto se suman los mecanismos de resistencia de las bacterias a los antibióticos que ponen en peligro la capacidad para tratar enfermedades infecciosas. Las plantas usadas en la medicina tradicional es una alternativa para manejar dichas afecciones, especialmente *Piper aduncum* (Piperaceae) que ha mostrado gran potencial. Este estudio tiene como objetivos analizar el valor cultural de *P. aduncum* en siete comunidades de Napo, evaluar su actividad biológica contra microorganismos patógenos y determinar la genotoxicidad. Se realizaron entrevistas estructuradas en siete comunidades Kichwas del Bajo Napo para corroborar el uso tradicional de la especie y el índice de fidelidad (IF). La actividad biológica se investigó en el ensayo exploratorio con *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* y se complementó con el ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC). Se determinó la genotoxicidad por medio del ensayo cometa en linfocitos. Observamos que el IF fue mayor para el uso antibronquítico con un 83%. El extracto metanólico de *P. aduncum* mostró actividad biológica contra *S. aureus* con MIC de 0.58mg/mL ($p < 0,05$), pero no para los demás microorganismos. No se encontró daño al material genético, pero si hubo reducción en el tamaño de los núcleos de los linfocitos. En conclusión, el extracto metanólico de *P. aduncum* presentó actividad biológica contra *S. aureus* y no causa daño genético en linfocitos por lo cual se recomienda como una alternativa efectiva en enfermedades respiratorias y además se respalda el uso ancestral de la planta.

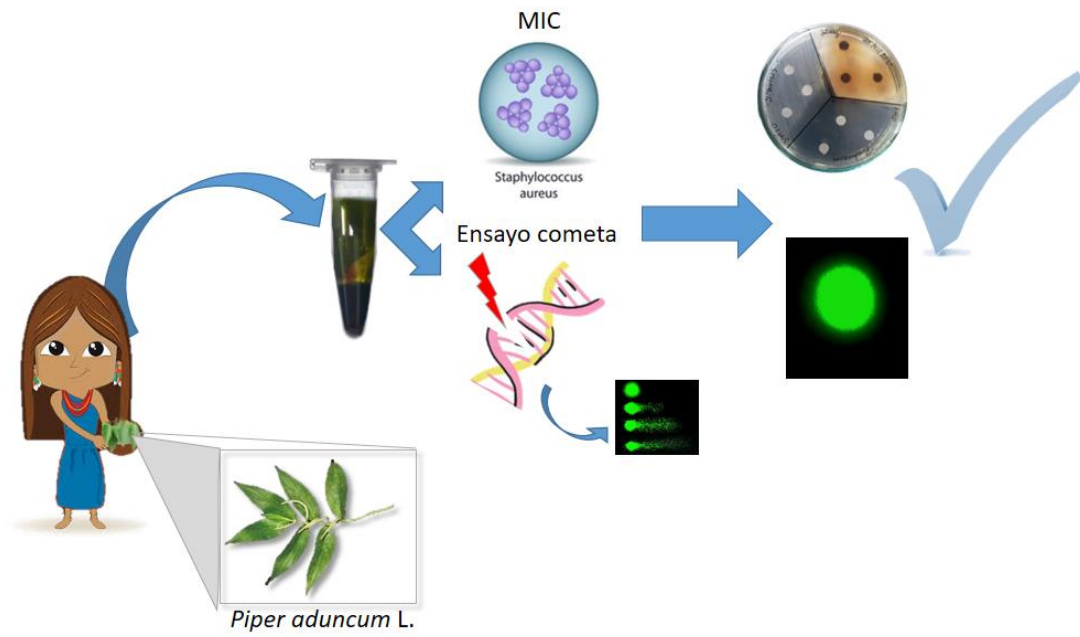
Palabras clave: medicina tradicional, enfermedades respiratorias, matico de monte, *S. aureus*, genotoxicidad.

ABSTRACT

One of the main causes of death in the world are diseases of the respiratory tract. Added to this are the mechanisms of resistance of bacteria to antibiotics that endanger the ability to treat infectious diseases. The plants used in traditional medicine are an alternative to manage these conditions, especially *Piper aduncum* (Piperaceae) which has shown great potential. This study aims to analyze the cultural value of *P. aduncum* in seven Napo communities, evaluate its biological activity against pathogenic microorganisms and determine genotoxicity. Structured interviews were conducted in seven Kichwa communities of the Bajo Napo to corroborate the traditional use of the species and the fidelity index (FI). Biological activity was investigated in the exploratory assay with *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* and was supplemented by the minimal inhibitory concentration (MIC) assay. Genotoxicity was determined by means of the comet assay on lymphocytes. We observed that the IF was higher for antibronchial use with 83%. The methanolic extract of *P. aduncum* showed biological activity against *S. aureus* with a MIC of 0.58mg/mL ($p < 0.05$), but not for the other microorganisms. No damage to the genetic material was found, but there was a reduction in the size of the lymphocyte nuclei. In conclusion, the methanolic extract of *P. aduncum* presented biological activity against *S. aureus* and does not cause genetic damage in lymphocytes, which is why it is recommended as an effective alternative in respiratory diseases and also supports the ancestral use of the plant.

Keywords: traditional medicine, respiratory diseases, matico de monte, *S. aureus*, genotoxicity.

GRAPHICAL ABSTRACT



1. INTRODUCCIÓN

Ecuador tiene el mayor número de registros de plantas medicinales en la región amazónica (Rios, et al., 2007). En el pueblo Waorani, por ejemplo, se registraron 1182 especies vegetales manejadas para diferentes tratamientos (Tirira & Rios, 2018). Entre las familias con mayor número de especies con propiedades medicinales se encuentra la familia Piperaceae, que se caracteriza por ser rica en aceites esenciales (Abreu, et al., 2012). Esta familia se distribuye en el Paleotrópico y Neotrópico (Fredeen & Field, 1996) con 2015 especies, 500 de las cuales se han registrado como plantas útiles y empleadas en medicina (Delgado-Paredes, et al., 2012). En Ecuador se encuentran cuatro géneros de la familia con 450 especies. En la Costa y Amazonía, al menos 114 especies son utilizadas por los pueblos indígenas: Awa, Kichwa, Shuar y Waorani (Betancourt, 2006); (Callejas, et al., 2017); y (Tirira & Rios, 2018).

Para los Waorani *Piper arboreum* (nabucan) y *P. aduncum* L. (namucan o matico de monte) son las más utilizadas (Betancourt, 2006). Además, se utiliza también en la medicina tradicional de los pueblos indígenas Kichwa y Shuar (Tirira & Rios, 2018); (Tropicos.org, 2021) como analgésico, antigripal, antihemorrágico, antiinflamatorio, antiofídico, antiulceroso, antitusígeno, diurético y febrífugo (Rios, et al., 2007); (Tirira & Rios, 2018). El modo de preparación de mayor frecuencia en los pueblos tradicionales es la infusión, las hojas frescas de “matico de monte” son hervidas y bebidas para tratar las diferentes dolencias, en algunas ocasiones son usadas en conjunto con plantas como el maíz (*Zea mays*) o bebida con alcohol (de la Torre, et al., 2008). La estructura morfológica de la planta de mayor uso en infusiones es la hoja, aunque también se utiliza el cogollo, la flor y el tallo (CESA, 1992); La caracterización química del extracto indica la presencia de metabolitos secundarios tales como: alcaloides, fenoles, flavonoides, terpenoides (Nigam & Purohit, 1962), cromenos, lignanos y policétidos (Pino, et al., 2004). La investigación fitoquímica basada en información etnofarmacológica se considera un enfoque eficaz en el descubrimiento de nuevos agentes antiinfecciosos de plantas superiores (Lafi, et al., 2022).

En el aceite esencial de *P. aduncum* se encontraron 45 compuestos químicos en hojas y 10 en frutos (Pino, et al., 2004). En extractos alcohólicos se reportó la presencia de alcaloides, flavonoides, fenoles y proantocianinas (Arroyo, et al., 2011), metabolitos a los que se les atribuye propiedades antibacteriales, antifúngicas y bacteriostáticas

(Calvo & Martínez-Martínez, 2009). Adicionalmente se ha probado que los flavonoides disminuyen un 33% la incidencia de infecciones respiratorias asociadas a humanos, reduciendo significativamente los síntomas y los días de prevalencia de la infección (Somerville, et al., 2016).

Las infecciones respiratorias afectan a las vías respiratorias las cuales se encuentran divididas en superiores que constan de fosas nasales, laringe y faringe, mientras que las vías respiratorias inferiores o bajas consta de pulmones, tráquea y bronquios (Sánchez & Concha, 2018). Las enfermedades respiratorias de las vías bajas representaron el 4,5% de las causas de muerte en el continente americano, durante el año 2016 (WHO, 2018). En concordancia con lo reportado para Ecuador, en esta misma época, la neumonía e influenza figuraban como la quinta causa de mortalidad (MSP, 2017). En el caso del cantón Tena, provincia de Napo, la neumonía por organismos no especificados fue la primera causa de morbilidad y la tercera causa de mortalidad en 2016 (MSP, 2017). Estas enfermedades son causadas por bacterias, hongos, micoplasmas, rickettsias y virus (Sahadulla, 2018), que atacan al tracto respiratorio por ser un sistema orgánico que comunica de forma directa con el ambiente externo (Somogyi, et al., 1998).

Los nuevos mecanismos de resistencia a los antibióticos, por parte de los microorganismos, ponen en peligro la capacidad para tratar enfermedades infecciosas como la neumonía y la tuberculosis debido a la pérdida de eficiencia de los antibióticos (WHO, 2018). Ross y colaboradores (2020), demostraron que las cepas de aislados clínicos de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* de una zona rural de Ecuador, fueron los microorganismos más comunes al presentar multiresistencia a antibióticos de primera línea tales como penicilina V y amoxicilina. Así la resistencia a los antimicrobianos por patógenos comunes del tracto respiratorio constituye una preocupación local.

A nivel científico se ha reportado la actividad antimicrobiana con extractos etanólicos de *P. aduncum* en bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus lentus*, los cuales son peligrosos agentes de infecciones nasocomiales (Brazao, et al., 2014). También se ha encontrado que son efectivos para bacterias Gram positivas como *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus pyogenes* (Kloucek, et al., 2005). La composición de los metabolitos secundarios se ve afectado por el geoclima local, las características del suelo, cambio

climático, temperatura, altitud, factores estacionales y características ambientales generando evolución de diferentes variantes químicas o quimiotipos. Como consecuencia las mismas especies tienen diferentes usos dependiendo la región en la que se han desarrollado (Linde, et al., 2015).

La medicina tradicional es una alternativa para desarrollar estrategias sostenibles para mantener la salud combinado con la conservación de recursos biológicos y vinculados al conocimiento tradicional (Bussmann & Sharon, 2015). Para fortalecer y validar este conocimiento, es prioritario investigar la eficiencia de la medicina herbal, diseccionar los efectos favorables de los adversos, identificar los principios activos en las plantas medicinales y prohibir las plantas venenosas o nocivas para el ser humano (Efferth & Karina, 2011). El problema de consumir la medicina herbal es el escaso conocimiento sobre las sustancias tóxicas presentes en las plantas (Phillips & Arlt, 2009).

Así es necesario el estudio de las especies vegetales de acuerdo con la región donde los pueblos originarios la utilizan. Existen investigaciones sobre la especie en países tales como Brasil, Cuba y Perú (Brazao, et al., 2014); (Gutiérrez, et al., 2016); (Kloucek, et al., 2005), mientras que en Ecuador los estudios son escasos y no contemplan ensayos de toxicidad. Por lo tanto, *P. aduncum* es un candidato idóneo para la investigación sobre el efecto en microorganismo patógenos y la toxicidad que presenta.

Debido al potencial reportado por *P. aduncum* L. en la medicina tradicional, en este estudio se tiene como objetivo general analizar el valor cultural de *P. aduncum* y evaluar su actividad biológica, para alcanzar esto se tienen los siguientes objetivos específicos: 1) determinar el valor cultural de la especie vegetal en siete comunidades de Napo 2) la actividad biológica contra microorganismos patógenos tales como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae* y 3) determinar la posible genotoxicidad de la especie vegetal.

2. MÉTODOS

2.1 Colección de datos: Conocimiento local y uso de la especie medicinal

2.1.1 Área de estudio

El estudio se desarrolló en la provincia de Napo, ubicada en la región Amazónica al norte del Ecuador, con una extensión de 12524,89 km² y representa el 4,41% del territorio nacional (SENPLADES, 2015). La provincia se divide en dos zonas de acuerdo con el Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial, la primera es Alto Napo y la segunda Bajo Napo (Prefectura-de-Napo,, 2019). Las entrevistas estructuradas se realizaron en siete comunidades Kichwas de Bajo Napo, tres en el cantón Archidona que son: Nokuno, Nueva estrella y San Pablo y cuatro en el cantón Tena: 27 de febrero, Punibocana, San Francisco, y Tambayacu (Figura 1). Las localidades se encuentran entre 359 m y 798 m de altitud y la población varía de 100 a 600 habitantes que hablan Kichwa y castellano.

Las comunidades poseen escuela primaria y muy pocas cuentan con secundarias, por lo que deben trasladarse hasta la ciudad más cercana para continuar con su educación. Los indígenas Kichwa, asentados en estas comunidades, son dueños de terrenos con bosque secundario donde cultivan cacao, café, maíz y plátano (de la Torre, et al., 2008). Sus recursos vegetales más vendidos son plátano y yuca que son comercializados en la ciudad de Tena. La dieta básica consumida por los pobladores en estas comunidades son bebidas conocidas como chicha de yuca, chonta o maíz; frutas como plátano, yuca y orito complementada con pescados que provienen de piscicultura como “tilapia” o pesca de “cachama” (Zurita-Benavides, et al., 2021). En la medicina utilizan plantas provenientes del bosque o de la chacra que son utilizadas para tratar trastornos físicos como: cortes, heridas, sarpullidos, erupciones en la piel, trastornos gastrointestinales, respiratorios, reumáticos, enfermedades del cuerpo y mente tales como el estrés, fatiga y depresión, y enfermedades culturales como el “susto, espanto o mal de ojo” (Aguirre, et al., 2016).

2.1.2 Entrevistas semiestructuradas

Se realizaron 24 entrevistas (Anexo 1) a personas clave dentro de las comunidades Kichwas como: jefes de las comunidades, mujeres conocedoras de medicina tradicional y chamanes. Se realizaron las entrevistas en las comunidades: 27 de febrero, Nokuno, Nueva Estrella, Punibocana, San Francisco, San Pablo y Tambayacu. No se realizó un número determinado de entrevistas por comunidad; debido a las pocas personas que conocen sobre medicina ancestral en algunas comunidades. Las entrevistas fueron realizadas bajo el consentimiento libre e informado con la organización Rukullacta, organización que engloba a todas las comunidades entrevistadas.

2.1.3 Valor cultural: Índice de fidelidad

Para determinar el valor cultural de la especie, se utilizó el cálculo del índice de fidelidad (IF), el cual demuestra en porcentaje, el uso específico de una planta. La fórmula es la siguiente (Friedman, et al., 1986):

$$FL = \left(\frac{lp}{lu} \right) * 100$$

Donde, *lp* es el número de personas que mencionan un uso específico, *lu* es el número total de personas entrevistadas (Friedman *et al.* 1986). Las categorías medicinales fueron interpretadas y adaptadas con las propuestas por Rios y colaboradores (2007).

2.2 Extractos metanólicos

2.2.1 Recolección del material vegetal

La identificación de la especie se realizará bajo la Autorización de Recolección de Especímenes de la Diversidad Biológica Sin Fines Comerciales para Investigación Científica No. MAATE-ARSFC-2022-2415, emitido por el Ministerio del ambiente, agua y transición ecológica. La planta será recolectada en el mismo lugar en la que se recolectó al inicio de la investigación con el fin de reproducibilidad de la investigación. Las hojas frescas de *P. aduncum* fueron colectadas únicamente en la comunidad de Muyuna (Figura 1) del cantón Tena a las cinco de la mañana. La hora de colecta se

estableció de acuerdo con la información sugerida por los colaboradores claves. El material vegetal fue trasladado al laboratorio de biología molecular y bioquímica de la Universidad Regional Amazónica Ikiam, donde se lavaron con agua destilada previo a su procesamiento.

2.2.2 Preparación del extracto vegetal

Se recolectó 200 g de hojas frescas de *P. aduncum* que fueron trituradas y colocadas en un frasco de vidrio de cierre hermético con 1000 mL de metanol al 98% como solvente. Se dejó reposar durante cinco, nueve y trece días a temperatura ambiente. El extracto metanólico de cada uno de esos días fue filtrado con un embudo y un algodón, para posteriormente ser concentrado en el rotaevaporador Buchi R-300 a 37°C, 100 rpm y 100 mbar. Finalmente fue llevado al liofilizador SP VirTis Bench Top por siete días y se almacenó a -20°C (Jorgensen & Sahm, 1995).

2.3 Actividad antimicrobiana

2.3.1 Microorganismos

Los microorganismos utilizados fueron: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 10231 provenientes del laboratorio de investigación de la Universidad Regional Amazónica Ikiam. Los aislados clínicos resistentes a ampicilina *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron donados por la Universidad Técnica del Norte (UTN). Las cepas se cultivaron en medio Muller Hilton. La etapa de crecimiento de los tres primeros microorganismos se midió con la escala de Mc Farland de 0.5 y con los aislados clínicos se realizó una curva de crecimiento por 10 horas cada 15 minutos para determinar el tiempo de crecimiento.

2.3.2 Ensayo exploratorio

Para el ensayo antimicrobial exploratorio se utilizó el método de difusión en agar propuesto por Jorgensen y colaboradores ya que se puede determinar la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos, para esto se inoculó 100 µL del microorganismo en 20 mL de agar Mueller Hilton (MHA) en cajas Petri estériles. En las placas solidificadas, utilizando discos de papel Whatman No. 1, se añadió 10 µL de 30 mg de

extracto disuelto en 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) sobre cada disco. Así mismo se realizó para el control positivo, en el que se colocó ampicilina y gentamicina en concentración del 0.5 g/ml y fluconazol en concentración de 1 g/ml. Finalmente para el control negativo se utilizó el disolvente del extracto DMSO. Las placas fueron incubadas a 37°C por 16 h (Jorgensen & Sahm, 1995). Se realizó tres repeticiones con la misma concentración por caja Petri y el ensayo se hizo por triplicado. Se tomaron fotos a cada caja Petri y el halo de inhibición se midió en milímetros (mm) con el programa Image J (Abramoff, et al., 2004).

2.3.3 Concentración Mínima Inhibitoria

En los microorganismos que presentaron halos de inhibición como muestra de actividad antimicrobiana, se realizó el ensayo para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC). Se siguió el mismo procedimiento del ensayo exploratorio, pero esta vez utilizando 12 diluciones seriadas del extracto en DMSO en proporción 1:2. Se utilizó 300 mg/ml como concentración inicial y 0.147 mg/mL como concentración final.

2.4 Ensayo Cometa

Para realizar los ensayos de genotoxicidad con extractos de *P. aduncum* se requirió de sangre donada voluntariamente y con previo conocimiento de los ensayos, por técnicos del laboratorio de investigación de la Universidad Regional Amazónica Ikiam. Se realizó el método propuesto por Singh *et al.* (1988) con modificaciones. La sangre se colectó en tubos heparinizados que fueron centrifugados a 3500 rpm, por cinco minutos a temperatura ambiente. La sangre se separó en tres fases; la primera fase es el suero, la segunda es una capa de linfocitos y la tercera de glóbulos rojos. La capa de linfocitos fue extraída y lavada tres veces con PBS 1X estéril, con el fin de obtener únicamente los linfocitos sin impurezas.

Paralelamente, se preparó medio RPMI suplementado (10% SFB, 100 U/mL de penicilina-estreptomicina, 2 mM de L-glutamina y 1 % de fitohemaglutinina) en un tubo falcon de 15 mL y conservado a baño maria a 37 °C. Los linfocitos son colocados en el tubo falcon con el medio suplementado para ser mezclado y homogenizado. Se colocó 1 mL del medio suplementado que contenía células en un pocillo de la placa junto con 1 mL de extracto en concentración de 300 mg/mL, 75 mg/mL y 4.68 mg/mL. Al control positivo se añadió 1 mL de H_2O_2 y para el control negativo se añadió medio de cultivo.

La placa se incubó por 3 horas a 37 °C y 5 % de CO_2 . Después de incubar se recolectó el contenido de los pocillos en tubos de 2 mL. Los tubos fueron centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente; el sobrenadante fue retirado y las células se resuspendieron con 85 µL de agarosa low melting point (LMP).

Las células resuspendidas con agarosa, fueron colocadas en portaobjetos recubiertos con dos capas de agarosa de alto punto de fusión, formando una tercera capa de agarosa con células. Sobre esta última capa se colocó una cuarta capa de agarosa LMP sin células para formar un sandwich. Los portaobjetos fueron colocados a 4 °C durante 10 minutos para solidificar las capas de agarosa. Posteriormente fueron colocados en buffer de lisis (2.5 M de NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris base y 0.3 M NaOH a pH 10) por una noche. Al día siguiente los portaobjetos se retiraron del buffer, para ser aclimatados por 20 minutos en buffer de electroforesis (1 mM Na₂EDTA y 300 mM NaOH a pH >13). La corrida electroforética se realizó por 20 minutos a 25 V y 300 Amp. Los portaobjetos se retiraron de la cámara de electroforesis y lavados con buffer de neutralización (400 mM Tris base a pH 7.5). Cada portaobjeto fue teñido por 15 minutos con 1 mL de solución de tinción (Diamond die 1X). Finalmente se observó presencia o ausencia de cometas utilizando el microscopio de fluorescencia.

2.5 Análisis estadístico

Con el fin de evaluar las diferencias entre las concentraciones utilizadas del extracto sobre el halo de inhibición se realizó un ANOVA unidireccional con prueba de Tukey. Utilizando el software InfoStat versión 2020 (Di Renzo, et al., 2020). La medida de los núcleos del ensayo cometa se analizaron con la correlación de Pearson entre la concentración del extracto metanólico y el diámetro de los núcleos para determinar la relación en la disminución de los núcleos. Para esto se utilizó el software InfoStat versión 2020.

3. RESULTADOS

3.1 Valor cultural

Las entrevistas estructuradas mostraron que *P. aduncum* es conocida comúnmente como “matico de monte” o “matico”. Además, la especie es utilizada en la localidad para el tratamiento de 13 usos terapéuticos (Tabla 1). El índice de fidelidad mostró que la especie en las siete comunidades entrevistadas es usada principalmente como antibronquítico con un 83%, seguido de analgésico y febrífugo con 45% y 33% respectivamente. La estructura morfológica de mayor uso son las hojas, seguidos de la raíz, el tallo y las inflorescencias. La preparación mayoritaria es en decocción, infusiones y zumo que son bebidos; pero en algunos casos, se emplea en baños calientes y como emplastos dependiendo de la dolencia. Se recomienda tener precauciones al momento de ingerir el zumo de *P. aduncum*, debido a que en las entrevistas informan sobre desorientación y mareo causado por el consumo en cantidades excesivas no recomendadas. Se evidenció un uso y conocimiento similar entre hombres y mujeres.

3.2 Actividad antimicrobiana

Los resultados preliminares del ensayo exploratorio indicaron que el extracto metanólico de *P. aduncum* no es efectivo contra bacterias como: *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. auriginosa* en concentración de 300 mg/mL al no presentar halos de inhibición. Por otro lado, presentó actividad antimicrobiana contra la cepa *S. aureus* ATCC 25923 y se complementó con el ensayo de concentración mínima inhibitoria (MIC). Se encontró que el MIC del extracto fue de 0.58 mg/mL. A concentraciones menores no se registró halo de inhibición. Además, se observó una correlación positiva entre concentración y radio inhibitorio ($r=1$, $p<0,05$), pues la concentración más alta del extracto presenta el mayor halo de inhibición (Figura 2).

Las concentraciones de 150 mg/mL y 75 mg/mL, no mostraron diferencias significativas, aunque si entre las concentraciones de 18.8 mg/mL, 9.4 mg/mL, 4.8 mg/mL y 2.3 mg/mL (Tabla 2).

3.3 Ensayo cometa

El ensayo de genotoxicidad no reportó daño genotóxico producido por el extracto vegetal en concentraciones de 300 mg/mL, 75 mg/mL y 4.7 mg/mL (Figura 3). El control negativo (Figura 3a) muestra núcleos celulares sin daño genético, mientras que el control positivo (Figura 3b) muestra el daño genético mediante los cometas formados, producto de la exposición de los núcleos al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Los tratamientos (Figuras 3c, 3d, 3e) no muestran daño genético, sin embargo, se observa que los núcleos presentan reducción de su tamaño, en comparación con el control negativo (Tabla 3). Se evidenció, además, una correlación inversa ($r = -0,41$; $p < 0,05$) con el tamaño de los núcleos y la concentración del extracto. A mayor concentración menor es el tamaño del núcleo.

4. DISCUSIÓN

Las comunidades entrevistadas mostraron gran diversidad de usos medicinales dados a “matico de monte” al tratar afecciones del tracto respiratorio, dolores localizados, ataques de serpientes e infecciones de la piel. El índice más alto de valor cultural registrado durante las entrevistas fue el uso como antibronquítico, seguido de analgésico en conjunto con dolores localizados que afectan a las regiones como cabeza, abdomen y garganta. Se observa que los usos dados para “matico de monte” son síntomas comunes de la gripe o resfriado; entre los que se encuentran febrífugo, dolor de cabeza y de garganta, antitusígeno y antigripal. Las dolencias de menor uso son dermatológicas, dolor de huesos, como antiofídico y para el catarro. Se puede evidenciar que los usos dados a matico de monte por los pueblos indígenas del Ecuador son similares para otras regiones del mundo (Aguirre, et al., 2016). Por ejemplo, en Indonesia usan las hojas para tratar la picadura de insectos, vendar llagas, cortes y sarna; en Perú el extracto de las partes aéreas es utilizado para las afecciones reumáticas, como astringente y antiséptico (Durant-Archibold, et al., 2018). En Brasil las hojas se usan para tratar enfermedades del tracto digestivo, gripe y como repelente de insectos (Durant-Archibold, et al., 2018). El mayor uso de *P. aduncum* registrado en las entrevistas fue como antibronquítico (83%) y se atribuye a ser utilizado para tratar síntomas de la gripe sea un candidato idóneo para combatir infecciones por virus. Durante la pandemia del Covid-19, *P. aduncum* fue muy utilizado dentro de la medicina tradicional para combatir el ataque del virus (Sirén, et al., 2020).

El uso de plantas medicinales depende de covariables como el género, hay especies vegetales que son preparadas únicamente por mujeres, pero también hay las que son preparadas solo por hombres (Medina, et al., 2011). Sin embargo, se observó que no existe una relación de género al utilizar *P. aduncum*, dado que es preparado y consumido por hombres y mujeres por igual. El uso de plantas se ha visto influenciado por el rol que cumplen en el hogar, las mujeres suelen tener mayor conocimiento de plantas medicinales al ser asociadas con el cuidado del hogar (Khadka, et al., 2021), mientras que los hombres al encontrarse más en el bosque utilizan árboles, en contraste con mujeres que al permanecer en casa utilizan hierbas y plantas que se encuentran en el jardín (Duque, 2008). Los rápidos cambios ambientales, socioeconómicos y culturales debido a la globalización han conllevado al alejamiento

de la naturaleza por parte de las diferentes culturas y tradiciones milenarias dejando atrás los conocimientos de sus ancestros (Sanchez-Robles & Torres-Muros, 2020). Un ejemplo de este alejamiento es la no relación de genero registrada durante las entrevistas como consecuencia de la pérdida de tradición puesto que, los hombres ya no salen al bosque, su rol de traer comida al hogar ya no se basa principalmente en la caza o pesca (Sanchez-Robles & Torres-Muros, 2020). Con la modernización aparece la agricultura de monocultivo, la educación moderna y se agudiza la aculturación indígena provocando el abandono de la lengua, los conocimientos, las costumbres y los ritos propios (Mendizábal, 2013).

En las comunidades entrevistadas se reportó el uso del extracto en decocción, infusión y zumo realizados con hojas frescas, en algunas ocasiones antes de ser consumido es mezclada con una bebida alcohólica. Esta forma de uso se lo traduciría a extracto acuoso y alcohólico. Así pues, en el presente estudio se realizó un extracto alcohólico al utilizar metanol como disolvente, mismo que fue expuesto a cinco microorganismos patógenos. Estudios antibacterianos reportan que el aceite esencial de *P. aduncum* es efectivo contra *S. aureus*, *E. coli* y *P. auriginosa* ((Nair & Burke, 1990); (Orjala, et al., 1993); (Orjala, et al., 1994); (Okunade, et al., 1997)). Sin embargo, el extracto metanólico de *P. aduncum*, únicamente presentó actividad biológica contra *S. aureus*. Kloukec *et al.* en (2005), presento los mismo resultados obtenidos en este estudio al mencionar la actividad antimicrobiana en bacterias Gram positivas como lo es *S. aureus* para esto se realizó la extracción del aceite esencial con una concentración inicial de 16 mg/mL para el MIC, mientras que en el presente estudio se realizó extracción total con metanol y el MIC con una concentración de 30 mg/mL, aunque la concentración fue mayor, también se obtuvo halos de inhibición considerables. El estudio realizado por Brazao *et al.* (2014) utilizó el aceite esencial de *P. aduncum* y se obtuvo un MIC en 500 µg/mL, concentración similar a la de esta investigación. Así se pudo mostrar la actividad antimicrobiana de *P. aduncum* sobre *S. aureus*.

La inactividad del extracto para las otras cuatro cepas puede deberse a la pérdida de los constituyentes del aceite esencial que se da en los extractos metanólicos. Estudios han demostrado que existen diferencias entre los solventes como el cloroformo, etanol, metanol y éter que son utilizados para la extracción de metabolitos especializados de los extractos. Se ha encontrado mejores resultados en la extracción de metabolitos secundarios con diferentes solventes para diferentes tipos de plantas (Rengifo, 2009). Además, es importante recalcar que los extractos en investigaciones

anteriores fueron realizados con hojas secas, mientras que en este estudio se realizó con hojas frescas siendo esto un factor que puede estar influyendo en la calidad del extracto.

Por otra parte, la inactividad del extracto metanólico de *P. aduncum* sobre las cepas de *E. coli* y *P. auriginosa* a pesar de que mostraron actividad en las investigaciones realizadas por (Orjala, et al., 1993); (Orjala, et al., 1994) y (Okunade, et al., 1997) en Papua Nueva Guinea y Mississippi respectivamente podría estar dado por una variabilidad genética que es reflejado en el contenido de especies químicas. Se ha encontrado que la especie contiene dos quimiotipos variables de acuerdo con la región donde se desarrolle la planta. Uno de ellos produce fenilpropanoide dilapiol, mientras que el segundo genera nerolidol y linalool. Además, en el estudio de Gutiérrez *et al.* (2016), probaron el aceite esencial proveniente de Cuba contra *C. albicans* en el que no se encontró presencia de actividad antifúngica y que además encontraron diferencias constitucionales entre las muestras tomadas en lugares diferentes del país. En otro estudio realizado por Braga *et al.* (2007), con extractos metanólicos de Brasil, se encontró actividad antifúngica de la planta contra la levadura. Navickiene *et al.* (2006) menciona que los metabolitos presentes en una especie vegetal se deben mayoritariamente a las propiedades del suelo, el clima y las condiciones de recolección del material, puesto que se ha encontrado que no presentan un mismo perfil cromatográfico cuando estas condiciones son diferentes; un ejemplo de esto son las muestras provenientes de otros países (Vila, et al., 2005).

La interacción planta suelo es un importante proceso ecológico y evolutivo al que se asocia cambios en el fenotipo y aptitud de la planta al interactuar en el metabolismo vegetal (Saldanha, et al., 2020). Los cambios en la composición del suelo pueden afectar en la producción de metabolitos generando los quimiotipos característicos de cada región donde se encuentra la especie vegetal. Las características del suelo en Muyuna, lugar de recolección, presenta suelos saturados en bases y con pH ácido de baja fertilidad y esponjosos, suelo arcillo-limoso con baja capacidad de drenaje (GAD-Muyuna, 2015). Se ha encontrado que los suelos ricos en K, Mg, Cu y Ca tienen mayor producción de flavonoides, mientras que las cromonas y el ácido carboxílico son producidos mayoritariamente con temperaturas altas (Saldanha, et al., 2020). Estos estudios muestran diferencias en la composición química de los extractos dependiendo de la región en la que es recolectado el material vegetal. Se recomienda realizar un análisis fitoquímico de las hojas frescas de *P. aduncum* en Napo.

El extracto metanólico de *P. aduncum* no mostró potencial genotóxico, esto se confirma con el estudio de Santin *et al.* (2011) que fue realizado con aceite esencial. Es importante mencionar que se observa la disminución en el diámetro del núcleo celular a medida que va aumentando la concentración de extracto metanólico. Este cambio morfológico observado puede deberse a varios factores de estrés en la célula que ha afectado al tamaño del núcleo. Entre los factores se encuentra el estrés oxidativo como causa de cambios morfológicos (Ciccoli, et al., 2012). El extracto metanólico total mantiene grandes concentraciones de metabolitos lo que podría estar causando el estrés oxidativo en las células y se traduce en la reducción del tamaño de los núcleos. Se ha comprobado que el estrés oxidativo causa cambios en la morfología en células sanguíneas como alteraciones en la membrana plasmática y una superficie irregular. En un estudio realizado a lechones destetados con extractos de plantas y plasma porcino atomizado se observó cambios en la morfología celular del intestino, en células inmunitarias de los tejidos intestinales y la sangre (Nofrarías, et al., 2006). Se recomienda emplear microscopia de barrido para detectar cambios a más detalle (Arif, et al., 2021)

Es importante mencionar que a pesar de existir especies vegetales utilizadas desde hace miles de años por poblaciones originarias, no garantiza seguridad y especialmente en genotoxicidad debido a signos y síntomas que no son fácilmente reconocidos por la población (Souza-Brito & Souza-Brito, 1993). Entre las precauciones mencionadas en las entrevistas se debe tomar únicamente la dosis recomendada del zumo de las hojas de “matico de mote” si se ingiere en mayor cantidad podría causar mareo. Esto podría deberse a un efecto citotóxico que presenta la especie en grandes concentraciones.

5. CONCLUSIONES

Los pobladores de las comunidades Kichwa de Napo conocen al menos trece usos terapéuticos de *P. aduncum*. En la investigación se ha corroborado la importancia de la especie vegetal al presentar actividad antimicrobiana contra *S. aureus* convirtiéndolo en un candidato prometedor para el estudio de nuevas biomoléculas activas. Sin embargo, no presentó efectos sobre los microorganismos *E. coli*, *K. pneumonia*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* al menos con extracto metanólico. Se debe probar con extractos de hojas secas para determinar si puede ser más efectivo contra cepas resistentes de patógenos respiratorios, así como también implementar otros solventes como agua, mezclas hidroalcohólicas, glicoles o disolventes orgánicos. Además, “matico de monte” no registró daño genético en el uso de esta planta, pero es necesario tener precaución dado que en el consumo excesivo causa mareo y desorientación, por lo que, podría causar estrés oxidativo lo que generaría citotoxicidad y malformación celular. Se recomienda realizar estudios fitoquímicos del extracto de hojas frescas de *P. aduncum* de la región. Así como del consumo excesivo de la especie podría causar citotoxicidad de acuerdo con los indicios presentados en esta investigación.

REFERENCIAS

- Abramoff, M. D., Magalhaes, P. J. & Ram, S. J., 2004. Procesamiento de imagenes con ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7), pp. 36-42.
- Abreu, O., Rodriguez, A., Morgado, M. & Cao, L., 2012. Farmacognosia, Farmacobotánica, Farmacogeografía y Farmacoloetimología del platanillo de Cuba (*Piper aduncum* subespecie *ossanum*). *Revista cubana de Plantas Medicinales*, 17(2), pp. 181-193.
- Aguirre, J. M. L., Cruz, S. M. & Verdezoto, M. A. Z., 2016. Etnobotánica de plantas medicinales en el catón Tena, para contribuir al conocimiento, conservación y valoración de la diversidad vegetal de la Región Amazónica. *Dominio de las Ciencias*, 2(2), pp. 26-52.
- Arif, A., R., Q. & Mahmood, R., 2021. Bioallethrin enhances generation of ROS, damages DNA, impairs the redox system and causes mitochondrial dysfunction in human lymphocytes.. *Scientific Reports*, 11(1).
- Arroyo, J., Bonilla, P., Tomás, C. & Huaman, J., 2011. Estudio Fitoquímico dle extrato etanólico y de las fracciones de las hojas de *Piper aduncum* "Matico". *Revista peruana de Química e ingeniería Química*, 14(1 y 2), pp. 62-67.
- Betancourt, 2006. ethnobotany of the Huaorani communities in the Ecuadorian Northwest Lyonia. *Ethnobotany and Forest*, 10(2).
- Braga, F. G. y otros, 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil.. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(2), p. 396–402.
- Brazao, M. A. B., Brazao, F. V., Guilherme, J. & Monteiro, M. C., 2014. Antibacterial activity of the *Piper aduncum* oil and Dilapiole, its main constituent, against multidrug-resistant strains. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(6), pp. 517-526.
- Bussmann, R. W. & Sharon, D., 2015. Plantas Medicinales de los Andes y la Amazonia. *La flora M+agica y medicinal del Norte de Perú*, p. 292.
- Callejas, R., Santiana, J. & Tye, A., 2017. *Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador*. [En línea] Available at: <https://bioweb.bio/floraweb/librorojo/ListaEspeciesPorFamilia/500354> [Último acceso: 04 09 2020].
- Calvo, J. & Martínez-Martínez, L., 2009. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 27(1), pp. 44-52.
- CESA, 1992. Usos Tradicionales de las Especies Forestales Nativas en el Ecuador. *FEPP*, Volumen 2.
- Ciccoli, L. y otros, 2012. Morphological changes and oxidative damage in Rett Syndrome erythrocytes.. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1820(4), pp. 511-520..
- de la Torre, L. y otros, 2008. *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.. Quito: s.n.
- Delgado-Paredes, G. y otros, 2012. Cultivo de tejidos de *Piper* sp. (Piperaceae): Propagación, organogénesis y conservación de germoplasma in vitro. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), pp. 49-60.
- Di Renzo, J. A. y otros, 2020. InfoStat versión 2020. En: Argentina: Centro de transferencia InfoStat FCA.

- Duque, D. S., 2008. Diferencia en el uso de plantas entre hombres y mujeres en una comunidad de pie de monte del norte del Ecuador. *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 2(2), pp. 1295-1308.
- Durant-Archibold, A. A., Santana, A. L. & Gupta, M. P., 2018. Usos etnomédicos y actividades farmacológicas de las especies mas prevalentes del género Piper en Panamá: una revisión. *Diario de Etnofarmacología*, Volumen 217, pp. 63-82.
- Efferth, T. & Karina, B., 2011. Toxicities by herbal medicine with emphasis to tradicional Chinese medicine. *Curr Drug Metab*, 12(10), p. 989.
- Fredeen, A. & Field, C. B., 1996. Ecophysiological constraints on the Distribution of Piper Species. *Tropical Forest Plant Ecophysiology*. Springer, pp. 597-618.
- Friedman, J., Yaniv, Z., Dafni, A. & Palewitch, D. A., 1986. Preliminary classification of the healing potential of medicinal plants, based on a rational analysis of an ethnopharmacological field survey among Bedouins in the Negeev Desert Israel.. *Journal Ethnopharmacology*, Volumen 16, pp. 275-287.
- GAD-Muyuna, 2015. *Gobierno descentralizado parroquial rural "San Juan de Muyuna". Plan de desarrollo y ordenamiento territorial del GAD parroquial de Muyuna*. [En línea] Available at: <https://odsterritorioecuador.ec/wp-content/uploads/2019/04/PDOT-PARROQUIA-MUYUNA-2014-2019.pdf> [Último acceso: 12 octubre 2022].
- Gutiérrez, Y. y otros, 2016. Chemodiversity associated with cytotoxicity and antimicrobial activity of Piper aduncum var. ossanum. *Chemestry & Biodiversity*, 13(12), pp. 1715-1719.
- Jorgensen, J. & Sahm, D., 1995. Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, consideraciones generales.. En: P. Murray, E. Baron & M. Pfaller, edits. Washington DC: Sociedad Americana de Microbiología.
- Khadka, D. y otros, 2021. The uses of medicinals plants to prevent COVID-19 in Nepal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 17(1).
- Kloucek, P. y otros, 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria Distrit. *Journal of Ethnopharmacology*, 15(1), pp. 309-312.
- Lafi, Z., Aboalhaja, N. & Afifi, F., 2022. Ethnopharmacological importance of local flora in the tradicional medicine of Jordan. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(1), pp. 132-144.
- Linde, G. A., Colauto, N. B., Albertó, E. & Gazim, Z. C., 2015. Quimiotipos extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de Lippia alba. *Revista Brasileña de Plantas Medicinales*, Volumen 18, pp. 191-200.
- Medina, B. V., Corona, B. M., Fernández, M. M. A. & Contreras, A. A., 2011. Uso y conocimiento de plantas medicinales por hombres y mujeres en dos localidades indígenas en Coyomeapan, Puebla, México.. *Interciencia*, 36(7), pp. 493-499.
- Mendizábal, A., 2013. Conocimiento ancestral, desarrollo comunitario y universidades indígenas.. *Amazonía investiga*, 2(3), pp. 130-145.
- MSP, 2017. *Ministerio de Salud publica. Principales causas de morbilidad 2016*. [En línea] Available at: <https://www.salud.gob.ec/informacion-estadistica-de-produccion-de-salud/> [Último acceso: 2021].
- Nair, M. G. & Burke, B. A., 1990. Antimicrobial Piper metabolite and related compounds.. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volumen 38, pp. 1093-1096.

- Navickiene, H. y otros, 2006. Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Quim. Nova*, Volumen 29, pp. 467-470.
- Nigam, S. & Purohit, R., 1962. Chemical examination of the essential oil of the leaves of *Piper betle*. *Riechstoffe Aromen*, Volumen 12, pp. 185-190.
- Nofrarías, M. y otros, 2006. (2006). Effects of spray-dried porcine plasma and plant extracts on intestinal morphology and on leukocyte cell subsets of weaned pigs1.. *Journal of Animal Science*, 84(10), pp. 2735-2742.
- Okunade, A. L., Hufford, C. D., Clark, A. M. & Lentz, D., 1997. Antimicrobial properties of the constituents of *Piper aduncum*.. *Phytotherapy Research*, Volumen 11, pp. 142-144.
- Orjala, J. y otros, 1993. 5 new prenylated p-hydroxybenzoic acid-derivatives with antimicrobial and molluscicidal activity from *Piper aduncum* leaves. *Planta Medica*, Volumen 59, pp. 546-551.
- Orjala, J. y otros, 1994. Cytotoxic and antibacterial dihydrochalcones from *Piper aduncum*. *Journal of Natural Products*, Volumen 57, pp. 18-26.
- Phillips, D. H. & Arlt, V. M., 2009. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. Volumen 99, pp. 87-110.
- Pino, J. A., Marbot, R., Bello, A. & Urquiola, A., 2004. Essential Oils of *Piper peltata* (L.) Miq and *Piper aduncum* L. from Cuba. *Journal of Essential oil Research*, 16(2), pp. 124-126.
- Prefectura-de-Napo,, 2019. *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial Napo 2020-2023*, Napo: s.n.
- Rengifo, R., 2009. *Determinación de la actividad antimicrobiana, in vitro de los extractos de hoja de Piper aduncum sobre Staphylococcus aureus y staphylococcus pyogenes*. s.l.:s.n.
- Rios, M., Koziol, M., Borgotft Perdersen, H. & Granda, G., 2007. *Plantas útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas*. Quito: Corporación Sociedad para la Investigación y Monitoreo de la Biodiversidad Ecuatoriana (SIMBIOE).
- Ross, J. y otros, 2020. Evolución de la resistencia a los antibióticos en una zona rural de Ecuador. *Práctica Familiar Rural*, 5(1), p. 10.
- Sahadulla, M., 2018. Infections of the Respiratory System. In *Concise Handbook of Infections Diseases*.. *Jaypee Brothrs Medical Publishers*, p. 65.
- Saldanha, L. L. A. P. M. A. A. d. M. F. M. L. Q. E. F. y otros, 2020. Metabolomics of *Myrcia bella* Populations in Brazilian Savanna Reveals Strong Influence of Environmental Factors on its Specialized Metabolism. *Molecules*, 25(12), p. 2954.
- Sanchez-Robles & Torres-Muros, 2020. Educación, etnobotánica y rescate de saberes ancestrales en el Ecuador.. *Revista ESPACIOS*.
- Sánchez, T. & Concha, I., 2018. Estructura y funcioness del sistema respiratorio. *Neumología pediátrica*, 13(3), pp. 101-106.
- Santin, S. M. C. C. B. F. & M., 2011. Evaluation of the acute toxicity, genotoxicity and mutagenicity of ethanol extract of *Piper aduncum*.. *Journal of Medicinal Plants Research*, , 5(18), pp. 4475-4480.
- SENPLADES, 2015. *Secretaria Nacional de Planificación y DEsarrollo Agenda Zonal*
ZONA 2-Centro Norte. [En línea]
Available at: <https://www.planificacion.gob.ec/>
[Último acceso: 17 Abril 2021].
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. & Schneider, E. L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in cells. *Expl Cell Res. PubMed*, 175(1), pp. 91-184.

- Sirén, A. y otros, 2020. Resiliencia contra la pandemia de covid-19 en comunidades indígenas kichwa en la Amazonía ecuatoriana. *Mundos Plurales-Revista Latinoamericana de Políticas y Acción Pública*, 7(2), pp. 101-107.
- Somerville, V. S., Braakhuis, A. J. & Hopkins, W. G., 2016. Effect of flavonoids on upper respiratory tract infections and immune function: a systematic review and meta-analysis.. *Advances in nutrition*, 7(3), pp. 488-497.
- Somogyi, T., Alfaro, W., Herrera, M. L. & Herrera, J. F., 1998. Infecciones del Tracto respiratorio: etiología bacteriana y viral en una población pediátrica. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 33(1-2), pp. 5-18.
- Souza-Brito, A. & Souza-Brito, A. A., 1993. Cuarenta años de investigación en plantas medicinales brasileñas.. *Diario de Etnofarmacología*, 39(1), p. 53-67..
- Tirira, D. & Rios, M., 2018. *Monitoreo biológico Yasuni*. Quito: Ecuambiente Consulting Group.
- Tropicos.org, 2021. *Tropicos*. [En línea].
- Vila, R. y otros, 2005. Unusual composition of the essential oils from the leaves of *Piper aduncum*.. *Flavour Fragr. J.*, Volumen 20, pp. 67-69.
- WHO, 2018. *World Health Organization Projections of mortality and causes of death 2016 to 2060*. [En línea] Available at: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos> [Último acceso: 2021].
- WHO, O. W. H., 2018. *Projections of mortality and causes of death, 2016 to 2060*. [En línea] Available at: https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/
- Zurita-Benavides, M. G., Schawarz, A., Monteros-Altamirano, A. & Peñuela-Mora, M. C., 2021. Tradiciones alimentarias: Usos de la tierra, plantas y dietas entre los kichwas de Tena. En: N. Rebai, y otros edits. *Patrimonios Alimentarios en américa Latina Recursos locales, actores y globalización*. s.l.:s.n.

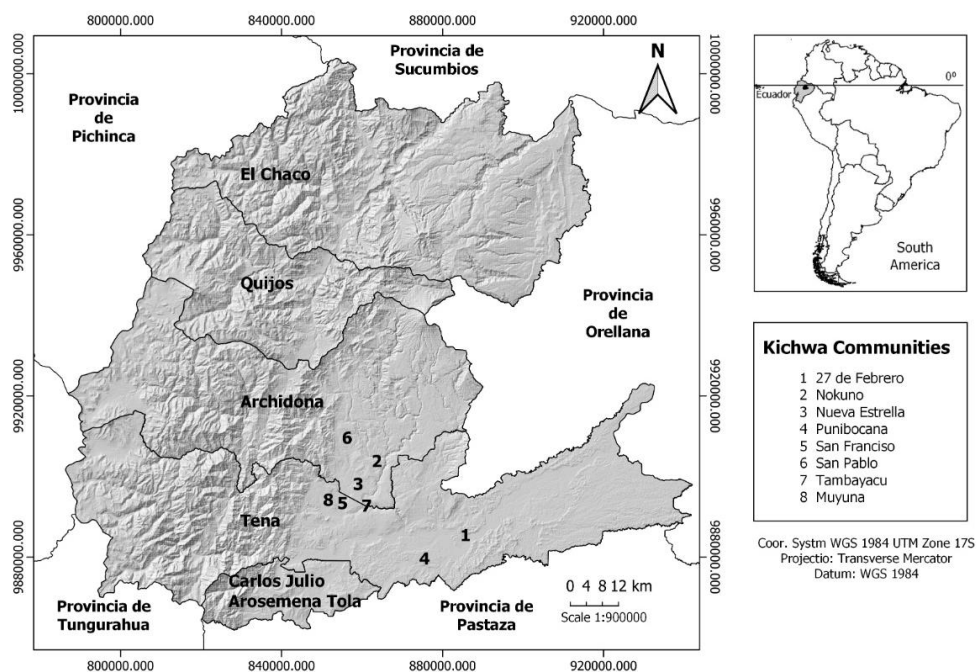


Figura 1. Área de estudio. Siete comunidades Kichwas de Bajo Napo, Ecuador y lugar de toma de muestras.
Realizado por: Monar Madelyn, 2021.

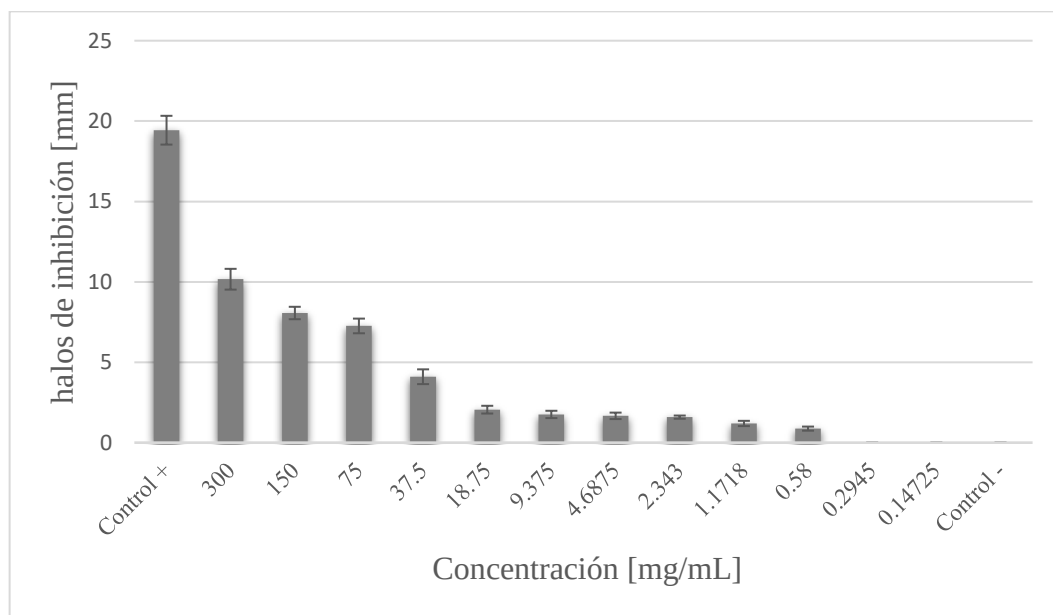


Figura 2. Concentración mínima inhibitoria del extracto de *P. aduncum* contra *S. aureus*.
Realizado por: Monar Madelyn, 2022.

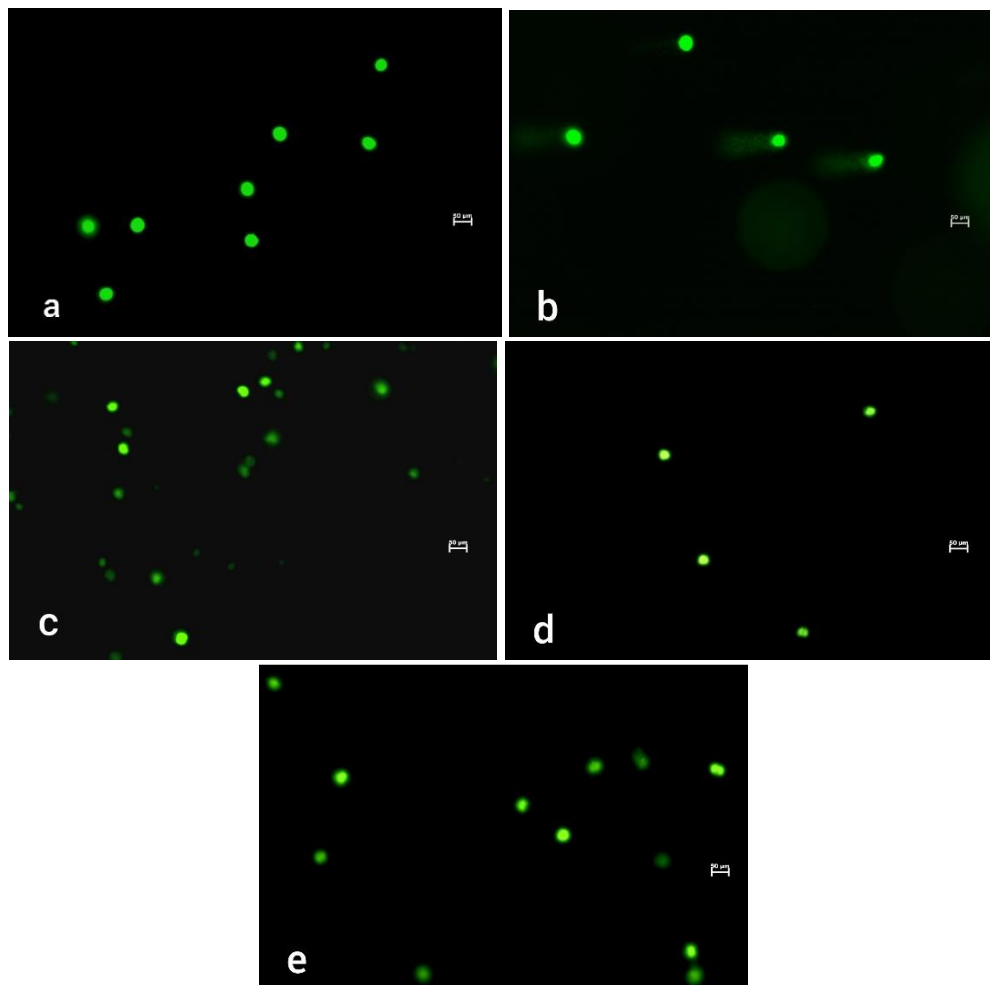


Figura 3. Linfocitos humanos expuestos a tres concentraciones del extracto de *P. aduncum*. a, control (-); b, control (+); c, 300 mg/mL; d, 7.5 mg/mL y e, 0.47 mg/mL.

Realizado por: Monar Madelyn, 2022.

Tabla 1. Índice de fidelidad (FL) y usos terapéuticos en siete comunidades Kichwas de la provincia de Napo.

Usos terapéuticos	H	M	Total	FL [%]
Analgésico	7	5	12	50
Antibronquítico	9	12	21	87.50
Antidiarreico	2		2	8.33
Antigripal	6	1	7	29.17
Antiofídico		1	1	4.17
Antitusígeno	1	2	3	12.50
Catarro	1	1	2	8.33
Dermatológico		1	1	4.17
Dolor de huesos		1	1	4.17
Dolor de la rodilla	1		1	4.17
Mal aire		2	2	8.33
Febrífugo	5	3	8	33.33
Dolor de cabeza	3		3	12.50
Dolor de garganta	1		1	4.17
Dolor de estomago		1	1	4.17

H, hombre; M, mujer; FL, índice de fidelidad en sus siglas en inglés.

Realizado por: Monar Madelyn, 2021.

Tabla 2. Media $\pm$ desviación estándar de radio inhibitorio (mm) según concentración de extracto metanólico (mg/mL) (N=9).

Concentración [mg/ml]	Radio inhibitorio[mm]
300	10.25 $\pm$ 0.56 ^a
150	7.79 $\pm$ 0.72 ^b
75	7.3 $\pm$ 0.91 ^b
37.5	4.1 $\pm$ 0.46 ^c
18.8	2.05 $\pm$ 0.24 ^d
9.4	1.76 $\pm$ 0.23 ^d
4.7	1.97 $\pm$ 0.27 ^{d,e}
2.3	1.61 $\pm$ 0.09 ^{d,e}
1.2	1.19 $\pm$ 0.16 ^{e,f}
0.6	0.87 $\pm$ 0.13 ^f

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$, test de Tukey).

Realizado por: Monar Madelyn, 2022.

Tabla 3. Correlación entre el diámetro del núcleo (mm) y concentraciones del extracto metanólico de *P. aduncum* (mg/mL). N=40

Variable	Concentración
Diámetro	-0.41*

*p < 0.05

Realizado por: Monar Madelyn, 2022.

Anexo 1. Entrevistas estructuradas realizadas en las siete comunidades del Bajo Napo, Ecuador.

Matico de monte

1. ¿Qué usos medicinales importantes tiene el “matico de monte”, qué parte usa y cómo utiliza?

1.			
2.			
3.			
4.			
5.			

2. ¿Qué precaución se debe tener al utilizar el “matico de monte” en las curaciones?

3. ¿De quién aprendió a utilizar el árbol de “matico de monte” y qué edad tenía usted?

4. Cuando necesita el “matico de monte” ¿en qué lugar lo encuentra?

5. ¿En qué meses del año está disponible el fruto del “matico de monte”?

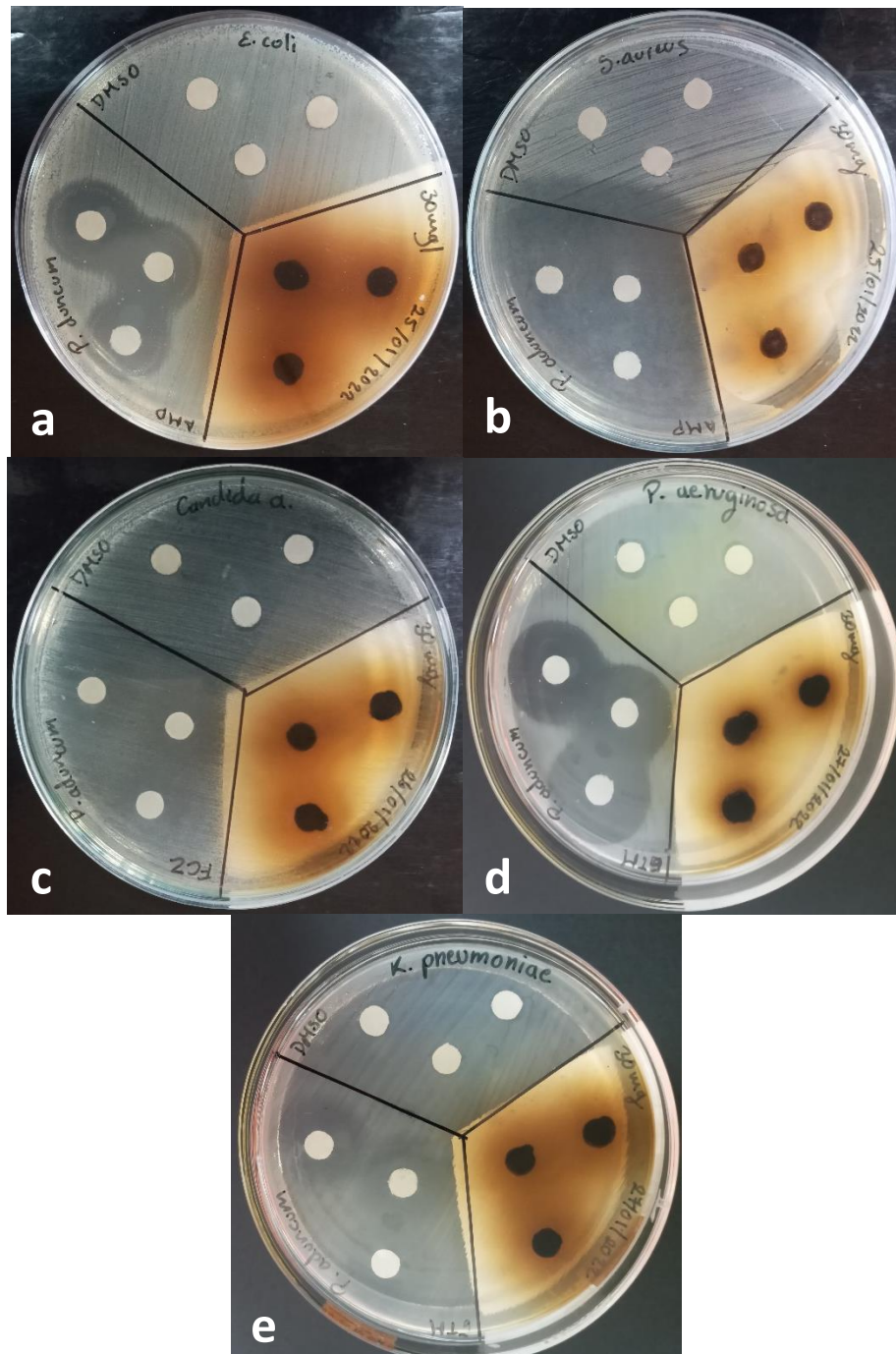
E F M A M J J A S O N D

6. ¿Usted siembra el árbol de “matico de monte”, dónde y cómo?

7. ¿Cómo reconoce usted el árbol de “matico de monte”?

8. ¿Conoce alguna leyenda, cuento o historia sobre el árbol de “matico de monte”?

Anexo 2. Ensayo exploratorio sobre cinco microorganismos patógenos.



Extracto metanólico de hojas frescas de *P. aduncum* en agar sólido Muller Hilton; a. *E. coli*; b. *S. aureus*; c. *C. albicans*; d. *P. aeruginosa*; e. *K. pneumoniae*

Realizado por: Monar Madelyn, 2022.

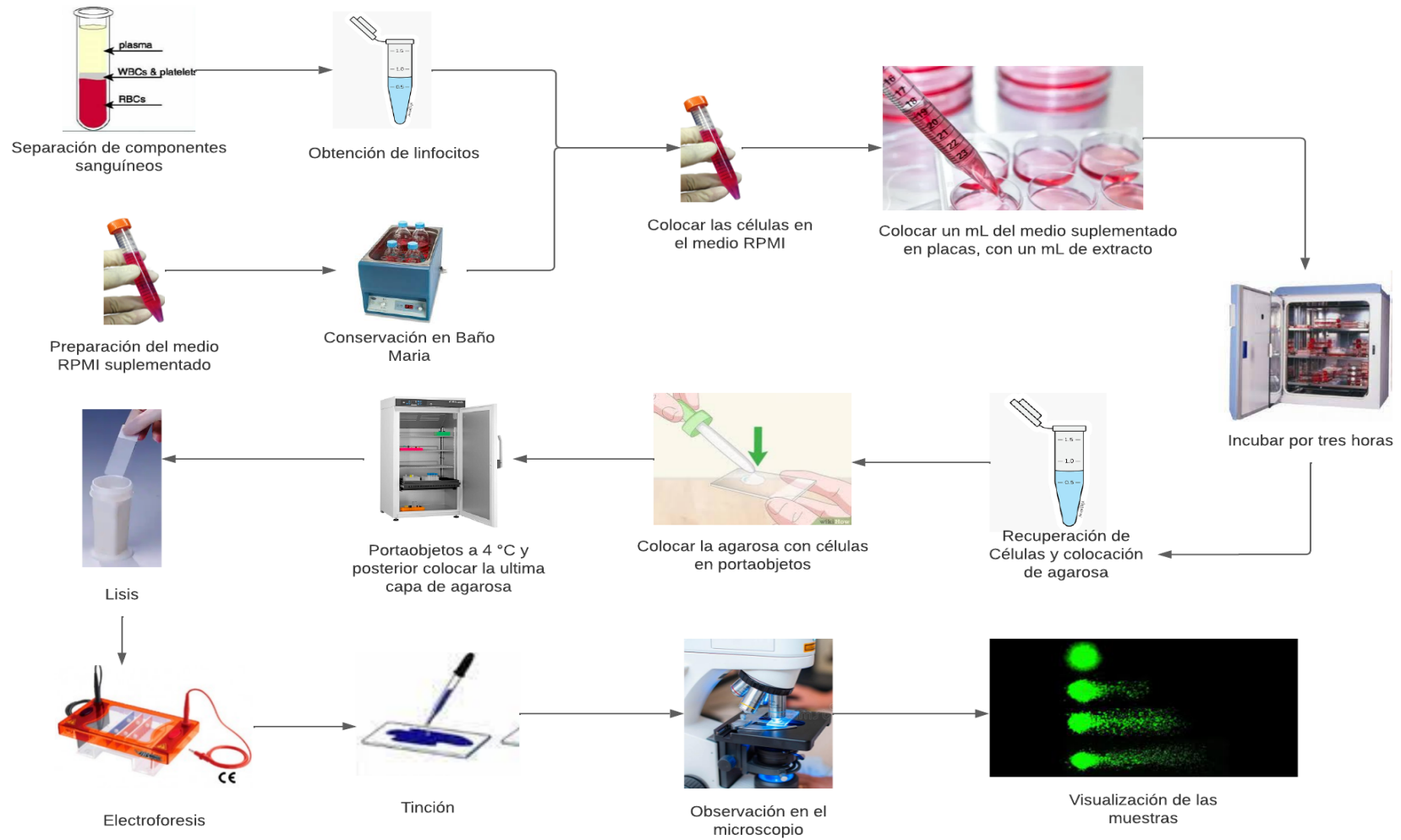
Anexo 3. Información colectada durante las entrevistas organizado por comunidades.

N° de Colaboradores Clave	Comunidad	Estructura morfológica usada	Categoría medicinal	Aplicación	Administración terapéutica	Descripción
5	Nokuno	Hoja, tallo, inflorescencias	Febrífugo, analgésico, antigripal, antibronquítico, dolor de cabeza	Decocción	Oral	Hoja: alargada, ancha al inicio. Tallo; delgado con presencia de nudos. Inflorescencia: Son como lombrices que se encuentran en el centro de color blanco amarillento
3	Nueva estrella	Hoja	Analgésico, febrífugo, antibronquítico	Decocción	Oral	Hoja; alargada y delgada. Tallos; Parecido al bejuco con nudos. Inflorescencia: Se parece a las vainitas de fréjol
3	San Francisco	Raíz, tallo, hoja	Febrífugo, analgésico, antibronquítico	Decocción, tópico, zumo	Oral, emplasto	Hoja: verde amarillenta, el tallo tiene nudos grandes; olor como el anís; Flor: larga, redonda, color blanco como la cola de un ratón y sale directo del tallo.
3	San Pablo	Hoja	Febrífugo, Analgésico, antiofídico, antibronquítico	Decocción	oral, baño caliente, vaporización	Liana: La planta tienen pelitos blancos, rasposa al tacto; Inflorescencia: es blanca como colita de ratón

4	Tambayacu	Hoja, tallo	Dolor de cabeza, analgésico, antibronquítico, febrífugo, antitusígeno, antigripal	Decocción	Oral	Es un bejuco que crece y se enrolla con otras plantas, la hoja es delgada y pequeña, y el tallo es flaco.
3	Punibocana	Hoja, tallo	Antidiarreico, analgésico, dolor de rodillas, antibronquítico	Decocción	Oral, baño caliente	Las hojas son largas, tienen pelusitas y es muy verde. El tallo es como la guadua, pero muy delgado.
3	27 de Febrero	Hoja, tallo, raíz	Febrífugo, dermatológico, antigripal, antitusígeno, Dolor de huesos	Decocción	Baño caliente, vaporización, Oral	Las hojas tienen pelusas blancas, son anchas y finas al final. La inflorescencia es como un cable de color blanco amarillento.

Realizado por: Monar Madelyn, 2022.

Anexo 4. Flujograma del Ensayo Cometa.



Realizado por: Monar Madelyn, 2022.