



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA,
ANTIFÚNGICA Y GENOTÓXICA DE *GRIAS NEUBERTHII*, EL
ÁRBOL DE “PITUN” EN LA PROVINCIA DE NAPO**

Proyecto de investigación previo a la obtención del título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: ADRIANA NICOLE VINUEZA MEDINA

TUTORA: PhD. SILVIA ALEJANDRA LLERENA GORDILLO

COTUTOR: PhD. FABIÁN ORLANDO AGUILAR MORA

Napo – Ecuador

2023

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD

Yo, ADRIANA NICOLE VINUEZA MEDINA con documento de identidad N° 1500955768, 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 la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.

Tena, 22 de septiembre de 2023



Adriana Nicole Vinueza Medina
CI 1500955768

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Yo, ADRIANA NICOLE VINUEZA MEDINA, con documento de identidad N° 1500955768, en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA Y GENOTÓXICA DE *GRIAS NEUBERTHII*, EL ÁRBOL DE “PITUN” EN LA PROVINCIA DE NAPO, 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. 114 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Tena, 22 de septiembre de 2023



Adriana Nicole Vinueza Medina

C.I: 1500955768

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

Certifico que el Trabajo de Integración Curricular Titulado: Evaluación de la actividad antibacteriana, antifúngica y genotóxica de *Grias neuberthii*, el árbol de “pitun” en la provincia de Napo, en la modalidad: artículo original, fue realizado por: Adriana Nicole Vinueza Medina, 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, 22 de septiembre de 2023

Silvia Alejandra Llerena Gordillo Ph.D
C.I: 1715410625

Fabián Orlando Aguilar Mora Ph.D
C.I: 1717348088

DEDICATORIA

A mis padres Edwin y Mayra quienes confiaron en mí desde el día que obtuve un cupo en esta universidad, solo Dios sabe todo el esfuerzo que hicieron para que yo logre esta meta. A mi hermana Maddy que muchas veces con sus cartas me daba motivación para continuar cuando los días eran cansados y difíciles. A mi abuelita mi mami Marthi sin sus oraciones y bendiciones para mí no habría sido igual. Esta dedicatoria va también para alguien que ya no está y me hace mucha falta, mi papi Gilbert, allá donde estas con papá Dios espero que te sientas orgulloso de tu nieta, no me rendí a pesar de los obstáculos. A los compañeros y amigos que hice a lo largo de estos años, quienes de una u otra manera me han ayudado a crecer como persona y en la carrera.

AGRADECIMIENTOS

A Dios que por sobre todas las cosas me permitió llegar hasta el final de mi carrera.

Como todo lo que es importante en la vida, esta investigación no habría sido posible sin la ayuda y la guía de grandes personas.

A la Dra. Montserrat Rios con quien inicié este trabajo y que lamentablemente no está para verlo materializado. Esta tesis es parte de su legado como docente y el reflejo de su pasión por estudiar y proteger los saberes ancestrales de los pueblos indígenas ecuatorianos. A mi cotutor Ph.D. Fabián Aguilar quien desde el inicio me brindó su apoyo durante todo el proceso de investigación en el laboratorio, aun cuando las cosas se pusieron difíciles. A mi tutora la Ph.D. Silvia Llerena quien se incorporó y asumió el reto de dirigir la escritura y redacción de esta investigación. Gracias por toda su paciencia, los consejos, la constancia y el buen ánimo que tuvieron conmigo, de haber sucedido diferente no lo habría conseguido.

A todos los docentes que hicieron que amara mi carrera, a quienes les debo todo mis conocimientos y las experiencias vividas a lo largo de esta travesía. De manera especial quiero agradecer a la Ing. Nina Espinosa de los Monteros, Técnico Docente del Laboratorio Investigación de Biología Molecular de la Universidad, quien dedicó muchas horas extras de su tiempo para capacitarme y acompañarme durante todo este proceso. Gracias por tu paciencia, por todos los tips que aprendí en el laboratorio y por guiarme en la escritura de esta tesis.

A mis amigas y compañeras Anghe, Vivi, Made y Yuli, con quienes compartí la mayor parte del tiempo de investigación, además de las risas, frustraciones y celebraciones por todo lo logrado.

Al Ing. Juan Betancourt por su ayuda y compañía durante todas las entrevistas realizadas en las comunidades.

A las comunidades Kiwchas de Tena y Archidona que me recibieron con los brazos abiertos, dándome la oportunidad de registrar parte de sus saberes ancestrales, su aporte es invaluable en este trabajo.

A mis roommies Vivi y Made, gracias chicas por la buena compañía y por apoyo fundamental en los días difíciles. Sobre todo gracias Vivi por siempre tener las palabras adecuadas para mí, aparte de una colega, conseguí una amiga para toda la vida.

A mi familia por siempre creer en mí y alentarme para seguir hasta el final, son mi pilar fundamental. Sé que no ha sido fácil pero aquí estamos, los quiero demasiado.

A todos los estudiantes y pasantes del LBM quienes amablemente donaron su sangre para que esta investigación sea posible. Gracias chicos todos esos pinchazos merecieron la pena.

CONTENIDO

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL	iii
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR...	iv
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MÉTODOS	4
2.1 Levantamiento de datos: Conocimiento ancestral y usos de la especie	4
2.1.1 <i>Área de estudio y el valor ancestral medicinal de Grias neuberthii</i>	4
2.2 Extractos metanólicos	5
2.2.1 <i>Recolección de material vegetal</i>	5
2.2.2 <i>Extracto metanólico</i>	5
2.3 Actividad antimicrobiana	6
2.3.1 Preparación de cultivos bacterianos	6
2.3.2 Ensayo exploratorio	6
2.3.3 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	6
2.4 Actividad genotóxica	7
2.4.1 <i>Ensayo Cometa</i>	7
2.5 Análisis de datos	8
3. RESULTADOS	9
3.1 Valor medicinal ancestral	9
3.2 Actividad antimicrobiana	10
3.3 Ensayo Cometa	12
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	15
4.1 Valor medicinal ancestral	15
4.2 Actividad antimicrobiana	15
4.3 Ensayo Cometa	19
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	20

REFERENCIAS
ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-3: Frecuencia de uso y usos terapéuticos de seis comunidades Kichwas.....	9
Tabla 2-3: Media $\pm$ desviación estándar de diámetro de inhibición en (mm) (N=9).	12
Tabla 3-3. Diámetro del núcleo de los linfocitos expuestos al extracto metanólico de <i>Grias neuberthii</i>	13

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-5: Área de estudio. Seis comunidades Kichwa de Bajo Napo.....	4
Figura 2-5: Concentraciones mínimas inhibitorias del extracto metanólico de <i>G. neuberthii</i> contra bacterias patógenas oportunistas.	10
Figura 4-5: Linfocitos expuestos a tres concentraciones de <i>G.neuberthii</i>	13
Figura 5-5: Correlación de Spearman de los diámetros de los núcleos de linfocitos	14

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Entrevistas realizadas en seis comunidades de Bajo Napo

Anexo B. Autorización de Recolección de Especímenes

Anexo C. Ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria

Anexo D. Resultados de Anova y Test de Tukey ($p < 0.05$)

Anexo E. Resultados de Anova y Test de Tukey ($p < 0.05$) de núcleos celulares

Anexo F. Resumen Gráfico

RESUMEN

El “pitun” (*Grias neuberthii*) es un árbol nativo de la cuenca amazónica, empleado por las poblaciones Kichwa y Shuar, como alimento y en la medicina ancestral por sus propiedades depurativas, eméticas y antiinflamatorias. Con base a la importancia etnofarmacológica de la especie, este estudio evaluó la actividad antibacteriana y antifúngica de los extractos metanólicos de las hojas “pitun” en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* (AMP-Resistente), *Pseudomona aeruginosa* (AMP-Resistente) y *Candida albicans*, bacterias y hongos considerados patógenos oportunistas, y los principales causantes de enfermedades infecciosas en los seres vivos. Además, se evaluó el efecto genotóxico del extracto en linfocitos aislados de sangre humana a partir del ensayo cometa. Por último, se determinó el valor ancestral de la especie en seis comunidades Kichwa de Bajo Napo a través de entrevistas estructuradas. Los ensayos de actividad biológica, mediante la técnica de halos de inhibición, demostraron importante actividad antimicrobiana y antifúngica del extracto metanólico contra *Staphylococcus aureus* (CIM=9.4 mg/ml), *Candida albicans*. (CIM=4.6 mg/ml), *Klebsiella pneumoniae* (AMP-Resistente) (CIM=18.8 mg/ml) y *Pseudomona aeruginosa* (AMP-Resistente) (CMI=37.7 mg/ml). En términos de genotoxicidad, no se identificó daño al ADN celular en los linfocitos expuestos al extracto, pero sí una reducción del tamaño del núcleo, causando daño a la morfología celular. En las indagaciones realizadas en la comunidad, el valor ancestral de la especie indica el uso de pitun en el post parto (88%), seguido de analgésico (72%) y como una sustancia emética (64%) entre las primeras categorías. Por lo mencionado se infiere el uso de pitun como posible agente antimicrobiano y antifúngico en microorganismos patógenos oportunistas de importancia clínica.

Palabras clave: medicina ancestral, Lecythidaceae, actividad antimicrobial, extracto metanólico, genotoxicidad

ABSTRACT

The "pitun" (*Grias neuberthii*) is a tree native to the Amazon region, used by the Kichwa and Shuar populations, as food and in ancestral medicine for its purifying, emetic and anti-inflammatory properties. The ethnopharmacological importance of the species, this study evaluated the antibacterial and antifungal activity of methanolic extracts from pitun leaves on *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* (AMP-Resistant), *Pseudomona aeruginosa* (AMP-Resistant) and *Candida albicans*, bacteria and fungi considered opportunistic pathogens, and the main causes of infectious diseases in living beings. Furthermore, the genotoxic effect of the extract on lymphocytes isolated from human blood from the comet assay was evaluated. Finally, the ancestral value of the species was determined in six Kichwa communities of Bajo Napo through structured interviews. Biological activity assays, using the inhibition halo technique, demonstrated significant antimicrobial and antifungal activity of the methanolic extract against *Staphylococcus aureus* (MIC=9.4 mg/ml), *Candida albicans* (MIC=4.6 mg/ml), *Klebsiella pneumoniae* (AMP-Resistant) (MIC=18.8 mg/ml) and *Pseudomona aeruginosa* (AMP-Resistant) (MIC=37.7 mg/ml). In terms of genotoxicity, no damage to cellular DNA was identified in lymphocytes exposed to the extract, but a reduction in the size of the nucleus, causing damage to cell morphology. In the investigations carried out in the community, the ancestral value of the species indicates the use of pitun in the postpartum period (88%), followed by an analgesic (72%) and as an emetic substance (64%) among the first categories. From the aforementioned, the use of pitun as a possible antimicrobial and antifungal agent in opportunistic pathogenic microorganisms of clinical importance is inferred.

Key words: ancestral medicine, Lecythidaceae, antimicrobial activity, methanolic extracts, genotoxicity.

1. INTRODUCCIÓN

Ecuador es un país megadiverso que posee plantas medicinales utilizadas durante milenios por distintos grupos étnicos para curar y prevenir enfermedades (Tirira & Rios, 2018). En el país se han reportado al menos 3 118 especies de plantas pertenecientes a 206 familias usadas con fines medicinales (Tene et al., 2007). En la Amazonía se reconoce el uso de aproximadamente 125 plantas medicinales empleadas en el tratamiento de enfermedades asociadas a microorganismos patógenos, de las cuales solo 56 % poseen información fitoquímica y reportes de actividad biológica (Caballero-Serrano et al., 2019). En esta misma área existen al menos 107 estudios etnobotánicos de plantas medicinales usadas por pobladores indígenas (Caballero-Serrano et al., 2019; Rios et al., 2007). Estas investigaciones han contribuido en el estudio y determinación de metabolitos secundarios con actividad biológica útiles para el desarrollo de fármacos (Armijos et al., 2021). En este contexto se destaca *Grias neuberthii* como una planta de importancia farmacológica por sus diversos usos terapéuticos dentro de los saberes ancestrales (Chapalbay et al., 2020; Rios et al., 2007). A pesar de lo expuesto, es una de las especies del género *Grias* con la menor cantidad de estudios científicos sobre su potencial antibacteriano y antifúngico contra microorganismos de importancia clínica como lo son *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa*, *Candida albicans*. Así mismo, no se reportan estudios sobre citotoxicidad y genotoxicidad en células sanguíneas, esto es necesario para reconocer si una especie puede usada como potencial farmacológico en el tratamiento de enfermedades causadas por las especies mencionadas.

Grias neuberthii es una especie perteneciente al género *Grias* de la familia Lecythidaceae que ha sido ampliamente utilizada en la medicina ancestral (Rios et al., 2007; Saltos et al., 2016). Es un árbol nativo de la cuenca amazónica y se encuentra distribuido en regiones tropicales de América del Sur (The World Flora Online, 2022). En Ecuador *G. neuberthii* está localizado en las provincias de Napo, Orellana, Pastaza y Morona Santiago (Macbride & History., 1931). Esta especie es conocida como “Pitun” por las poblaciones Shuar, Kichwa y mestizas, quienes utilizan las hojas, flores, frutos y corteza del árbol como: alimento, antiséptico, antibacterial, antiinflamatorio, depurativo y emoliente (Chiriboga & Maldonado, 2002). En algunos casos, el fruto es cosechado para ser consumido o comercializado por los Kichwas a mestizos (Saltos et

al., 2016). Las hojas se utilizan como “emético” que es una sustancia que induce al vómito y depura el estómago (Kahn & Moussa, 1997). Además las estructuras morfológicas de *Grias neuberthii* como el tallo y las hojas son usados en rituales de limpieza y depuración realizados específicamente como “tratamiento” post-parto (Bernis C et al., 2017). Las parteras Kichwas o Ashangas realizan decocciones de la corteza y hojas de pitun como parte del ritual a la madre luego de ocho días del alumbramiento (Bernis C et al., 2017). En contraste, con fines abortivos, se utiliza la ralladura de la semilla puesta en agua (Rios et al., 2007).

Los análisis fitoquímicos de la especie, realizados en el fruto, hojas, tallos de *G. neuberthii* han demostrado su importancia farmacológica dentro de los saberes ancestrales (Rios et al., 2007). En el fruto se han aislado y caracterizado ácidos grasos, resultando en 27.36% ácidos grasos saturados, 51.11% de monoinsaturados y 19.90% de ácidos poliinsaturados, además de aceites esenciales (Alva et al., 2002). Con este principio, ha sido posible aislar el ácido linólico y araquidónico del fruto del “pitun” teniendo como resultado la acción inhibitoria del estrés oxidativo del tejido de ratones (García et al., 2011). En el estudio de Guamán y colaboradores del extracto metanólico del tallo se aisló e identificó compuestos triterpenoides como el Lupeol (Guamán-Ortiz et al., 2020). Estos presentan distintas aplicaciones farmacológicas como antitumorales, antiparasitarios, antiinflamatorios y antibacterianos (Liu et al., 2021). Sobre su acción en líneas celulares, se ha logrado probar el mecanismo de muerte celular en líneas celulares tumorales PC-3 (células de cáncer pancreático), D-384 (células de astrocinoma cerebral), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) y HeLa (adenocarcinoma cérvix) (Guamán-Ortiz et al., 2020; Romero, 2017; Salazar et al., 2018; Samaniego, 2017). Las aplicaciones y actividad identificada han sido amplias. Por ejemplo, en los estudios de Vásquez y colaboradores, el extracto metanólico de la corteza mostró fuerte actividad *in vitro* antiprotozoaria en cepas causantes de la malaria, en especial para la cepa *Plasmodium falciparum* que tuvo el porcentaje de citotoxicidad de 100.0 ± 19.7 unidades (Vásquez-Ocmín et al., 2018). Además, en cuanto a las hojas, el perfil fitoquímico obtenido del extracto metanólico de hojas secas de *Grias neuberthii* señala que es positivo a la presencia de carbohidratos, alcaloides, flavonoides, saponinas, quinonas y taninos (Guamán-Ortiz et al., 2020). Estos últimos compuestos están relacionados con mecanismos de defensa antibacterial y antifúngico de la planta (Chiriboga & Maldonado, 2002). Por todo lo mencionado se propone el uso de *G. neuberthii* como posible agente

antibacteriano contra bacterias patógenas oportunistas y bacterias patógenas resistentes a antibióticos.

Por otra parte, las enfermedades infectocontagiosas continúan siendo causa de morbilidad y mortalidad en el mundo (Martinez, 2013). Estas enfermedades son provocadas por microorganismos como virus, bacterias, hongos o protozoos que al entrar en contacto con el organismo desencadenan cuadros de infección que varían según la gravedad y sintomatología. En la actualidad, el control y tratamiento de este tipo de enfermedades, se encuentra amenazada por la resistencia antimicrobiana que han desarrollado algunos de estos microorganismos (Laxminarayan et al., 2016). Así se define a la resistencia antimicrobiana como la capacidad de adaptación que han desarrollado algunos microorganismos patógenos para sobrevivir en presencia de antimicrobianos, medicamentos usados para inhibir el crecimiento de los mismos (Odonkor & Kennedy K, 2012). Uno de los factores que influyen en este fenómeno es el uso inadecuado y desmedido de antibióticos por parte de la población (Jamrozik et al., 2020). Se estima que anualmente fallecen 700 mil personas por enfermedades asociadas a la resistencia bacteriana (WHO, 2021). En Ecuador, en el año 2018 se comprobó que bacterias como *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* desarrollaron resistencia a antibióticos tipo carbapenémicos y β -lactámicos, en pacientes hospitalarios y de UCI (Ministerio de Salud Pública, 2018). En este ámbito, se vuelve prioritario la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos para inhibir el desarrollo y crecimiento de los microorganismos resistentes a antibióticos (Gupta & Birdi, 2017).

En la presente investigación se tomó en consideración el uso de las hojas de “pitun”, mencionado por los entrevistados dentro de los saberes ancestrales, quienes en su mayoría sugirieron el uso de hojas frescas en las categorías identificadas. Por este motivo se prefirió el empleo de hojas frescas para la elaboración de extractos metanólicos. A través de esta metodología se plantea la valorización de los saberes ancestrales a partir del conocimiento científico. En base a lo expuesto, se propone como objetivo general evaluar la actividad biológica de los extractos metanólicos de las hojas de *G. neuberthii*; además de identificar el valor ancestral de “pitun” en seis comunidades Kiwcha; tomando dos objetivos específicos 1) Identificar la actividad antimicrobial del extracto metanólico de *G. neuberthii* contra la inhibición de crecimiento de microorganismos patógenos como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Pseudomona aeruginosa* (Ampicilina-Resistente) y *Klebsiella*

pneumoniae (Ampicilina-Resistente) y 2) evaluar el efecto genotóxico del extracto metanólico de las hojas de *G. neuberthii* en linfocitos aislados de sangre humana.

2. MÉTODOS

2.1 Levantamiento de datos: Conocimiento ancestral y usos de la especie

2.1.1 Área de estudio y el valor ancestral medicinal de *Grias neuberthii*

El estudio se realizó en la provincia de Napo, territorio que comprende un índice poblacional de 56.8% de indígenas de Nacionalidad Kichwa (INEC, 2010). Se realizaron entrevistas estructuradas a personas de seis comunidades Kichwa de Bajo Napo: 27 de Febrero, Puni Bocana, San Francisco, San José, San Pablo y Sinchi Warmi (**Figura 1**). Las personas entrevistadas fueron informadas del propósito del estudio, quienes accedieron a responder voluntariamente. En las entrevistas se realizaron ocho preguntas relacionadas con el uso de *G. neuberthii* en la medicina tradicional (**Anexo A**). Se registraron todos los usos de *G. neuberthii* mencionados por los informantes, luego se organizó la información de acuerdo a las categorías de uso según lo propuesto por Rios y colaboradores y se identificó el uso más mencionado (Rios et al., 2007).

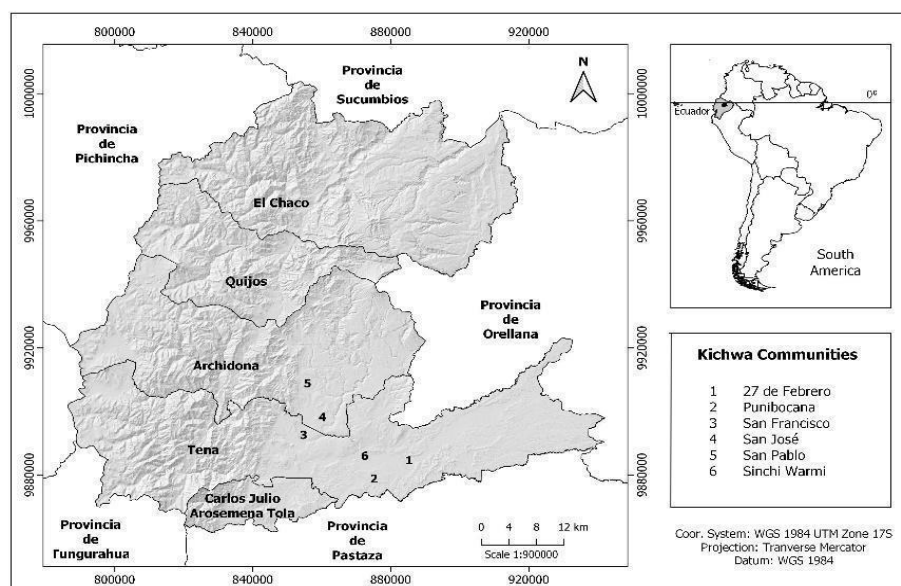


Figura 1-5: Área de estudio. Seis comunidades Kichwa de Bajo Napo
Realizado por: Vinueza Nicole, 2021

2.2 Extractos metanólicos

2.2.1 Recolección de material vegetal

El nombre botánico de la planta se confirmó mediante la base de datos The World Flora Online para su recolección (The World Flora Online, 2022). Se recolectó las hojas frescas y sanas de *Grias neuberthii* J.F. Macbr en Chambira, Tena. Estas fueron colocadas en fundas de papel e inmediatamente trasladadas al Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad Regional Amazónica Ikiám para ser preparadas antes de su uso. Las hojas se lavaron con agua destilada para eliminar rastros de polvo e impurezas y se quitó el exceso de agua con papel absorbente. Estas se almacenaron en fundas de papel y se conservó a temperatura ambiente para su uso inmediato.

La colecta se realizó bajo la autorización de recolección MAATE-ARSFC-2022-2415 emitida por el Ministerio del Ambiente y Agua (**Anexo B**). Además, una muestra del material recolectado fue ingresada en la colección del Herbario ECUAMZ de la Universidad Estatal Amazónica para su respectiva identificación y registro.

2.2.2 Extracto metanólico

Las hojas frescas de *Grias neuberthii* J.F. preparadas en el paso anterior fueron troceadas (66,7 g) y se maceraron con metanol (Scharlau, España) al 96% (660 mL) en recipientes de vidrio de cierre hermético durante cinco días. Las hojas fueron separadas del solvente luego de cinco días y se concentró el extracto usando el rotavapor (Bunchi R-300), a 35 °C y 90-100 mbar, durante seis horas. El solvente metanólico obtenido del rotavapor se incorporó nuevamente a las hojas y se repitió el proceso anterior dos veces más, luego de diez y catorce días. Los concentrados fueron liofilizados a 80°C y 120mTorr (SP VirTis BenchTop) por siete días.

2.3 Actividad antimicrobiana

2.3.1 Preparación de cultivos bacterianos

Las cepas microbianas utilizadas fueron *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, levadura *Candida albicans* ATCC 10231 y cepas clínicas aisladas de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomona aeruginosa* resistentes a ampicilina (AMP-Res). Todas las cepas conservadas previamente en glicerol se inocularon en caldo de cultivo Mueller Hinton (MHB) (Merck Millipore, Alemania) y se incubaron a 37 °C durante 18 h con agitación (150 rpm) (Thermo Scientific MaxQ400). Para los ensayos exploratorios y de concentración mínima inhibitoria se inoculó cada microorganismo en un nuevo caldo MHB y se dejó crecer hasta alcanzar la fase exponencial (10^6 UFC/mL) y la densidad óptica de 0,5-1 en la escala de McFarland.

2.3.2 Ensayo exploratorio

Para determinar la presencia o ausencia de actividad antimicrobiana se empleó un modelo inicial de halos de inhibición. La siembra fue por extensión 100 µL de cada inóculo bacteriano en cajas Petri individuales que contenían agar Mueller-Hinton (Merck Millipore, Alemania). Las cajas Petri se dividieron en cuatro partes para evaluar la actividad en cada sección: extracto metanólico de *G. neuberthii* 200 mg/mL, *G. neuberthii* 300 mg/mL, control negativo y control positivo. Cada sección se perforó tres veces con una pipeta pasteur de vidrio estéril donde se añadió 2 µL de cada control y extractos en la sección correspondiente (Anexo C). El control negativo fue DMSO y los controles positivos fueron ampicilina (0.5 mg/mL) para *E. coli* y *S. aureus*; gentamicina (1 mg/mL) para *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*; y fluconazol (1 mg/mL) para *C. albicans*. Las cajas se incubaron a 37 °C durante 16-18 horas. Aquellos extractos que mostraron zonas de inhibición de crecimiento de microorganismos se registraron como positivos para actividad antimicrobiana.

2.3.3 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

El método de difusión en disco (Balouiri et al., 2016) se empleó para las bacterias que mostraron sensibilidad al extracto en el ensayo anterior. Las cepas en fase exponencial (Sección 2.3.1) se sembraron por extensión en cajas Petri con agar Mueller-Hinton solidificado. En este ensayo, cada caja Petri fue dividida en tres

secciones para aplicar las siguientes soluciones: 1) extracto metanólico de *G. neuberthii*, 2) control negativo (DMSO) usado para disolver el extracto y 3) control positivo (antibiótico o antimicótico). En cada sección se colocaron tres discos de papel Whatman No.1 de 6 mm de diámetro embebidos con 10 µl de cada solución según la sección correspondiente. Se evaluaron diferentes concentraciones del extracto metanólico de *G. neuberthii* preparadas a partir de diluciones seriadas 150, 75, 37.5, 18.8, 9.8, 4.6, 2.3, 1.12 y 0.6 mg/mL. Las placas se incubaron a 37 °C durante 18 horas. El ensayo se repitió tres veces por cada concentración probada. El efecto de inhibición de crecimiento fue registrado mediante fotografías (Canon EOS REBEL T51). En cada fotografía se midió la longitud del halo de inhibición, formado alrededor de los discos, en mm utilizando el software ImageJ (Anexo C) (Schneider et al., 2012).

2.4 Actividad genotóxica

2.4.1 Ensayo Cometa

La genotoxicidad del extracto metanólico de “pitun” se evaluó a partir del ensayo cometa, para lo cual, se utilizó en linfocitos aislados de sangre periférica humana en suspensión. Los pacientes, hombres y mujeres, fueron seleccionados al azar manteniendo un rango de edad de 22 a 25 años. La sangre se extrajo en tubos heparinizados estériles, mismos que fueron centrifugados a 3 500 rpm durante cinco minutos para separar las células de interés del suero y glóbulos rojos. Los leucocitos se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 mL y se lavaron con PBS x1 (Gibco, USA), hasta tres veces. La muestra obtenida se resuspendió en medio RPMI 1640 (Newcell, España) suplementado con 10% de suero fetal bovino, (penicilina/estreptomicina 100 U/mL, L-glutamina 2 mM y fitohemaglutinina 1%). El medio fue filtrado para conservar la esterilidad. En una placa de cultivo celular de seis pocillos se colocó 1 mL de suero suplementado con células añadido 1mL de tratamiento del extracto de *G. neuberthii* en concentraciones de 300 mg/mL, 75 mg/mL y 4.69 mg/mL. En el control positivo se adicionó 1 mL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y en el control negativo 1 mL de medio RPMI 1640. La placa se incubó durante 3h a 37° con 5% de CO₂.

Los linfocitos sometidos al extracto se recuperaron en tubos eppendorf mediante centrifugación a 10 000 rpm y se lavaron con PBS 1x. La muestra se resuspendió con 80 µL agarosa de bajo punto de fusión al 0.5% en PBS 1x. En el portaobjetos, previamente recubierto con 2 capas de agarosa de alto punto de fusión (HMP,

Promega, USA) al 0.6% en PBS 1x, se colocó 40 µL de la mezcla anterior y se dejó solidificar durante 10 minutos a 4°C. Para fijar la muestra se adiciona 20 µL de LMP y se dejó solidificar durante 10 minutos a 4°C. Los portaobjetos preparados se sumergieron en tampón de lisis (pH:10, NaCl (PanReac AppliChem, USA) 2.5 M, sal disódica de EDTA 100 mM, Tris base 10 mM, NaOH 0.3 M (Merck, Alemania), 10% DMSO, 1% tritón x-100, estos dos últimos añadidos 30 min antes de su uso, durante toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo, los portaobjetos se colocaron en un tanque de electroforesis horizontal a la vez que fueron bañados con tampón de electroforesis alcalino (EDTA 1 mM, NaOH 300 mM, pH> 13) a 4°C durante 10 minutos. La electroforesis realizada mantuvo las siguientes condiciones: 25 V, 300 mA por 20 minutos. Al finalizar, cada portaobjeto se lavó con 1 mL de tampón neutralizante (Tris-HCl 400 mM, pH 7,5) refrigerado y se tiñó con Diamond 1x en TBE para su visualización en un microscopio de fluorescencia.

2.5 Análisis de datos

El análisis de datos se realizó mediante el software R Studio e InfoStat versión 2020. Para los ensayos de actividad antimicrobiana, las diferencias estadísticas entre las zonas de inhibición por concentraciones probadas fueron obtenidas a partir del análisis de la Varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey. El nivel de significación se fijó en $p < 0,05$. Para los datos no paramétricos con variables organizadas en rangos, se aplicó la correlación de Spearman para determinar la fuerza de asociación de ambas variables (Mendivelso, 2021). Para los resultados de genotoxicidad se realizó el mismo análisis del ensayo antimicrobial, tomando la media del diámetro del núcleo celular $\pm$ desviación estándar para tres concentraciones de extracto.

3. RESULTADOS

3.1 Valor medicinal ancestral

De las entrevistas realizadas -se categorizaron 18 usos para *Grias neuberthii*, de los cuales- 10 usos medicinales emplean solo las hojas de “pitun” en decocciones, infusiones y baños calientes y el resto de usos emplean otras estructuras (flores, fruto y corteza). La mayoría de mujeres entrevistadas registraron el uso medicinal en la categoría de postparto (84%), seguida de analgésico (72%), emético y abortivo (64%). Mientras que la categoría menos registrada corresponde a antiofídico (4%). Las demás categorías medicinales recopiladas tratan afecciones gastrointestinales actuando como antiespasmódico, emético y depurativo (64%); así mismo para curar infecciones del tracto respiratorio como anti bronquítico (52%), antigripal (44%), antitusivo (32%) y antiséptico (28%) (Tabla 1).

Tabla 1-3: Frecuencia de uso y usos terapéuticos de seis comunidades Kichwas

Usos terapéuticos	Hombres	Mujeres	Frecuencia de uso
Cuidados de Postparto	2	19	84,00
Analgésico	8	10	72,00
Emético	9	7	64,00
Abortivo	7	9	64,00
Antiespasmódico	1	13	56,00
Depurativo	6	8	56,00
anti bronquítico	3	10	52,00
Antigripal	8	3	44,00
Vasoconstrictor	3	6	36,00
Antidiarreico	3	6	36,00
Febrífugo	3	6	36,00
Antitusivo	2	6	32,00
Antiséptico	3	4	28,00
Antiinflamatorio	3	3	24,00
Emoliente	3	3	24,00
Antiparasitario	1	2	12,00
Hipoglicémico		3	12,00
Antiofídico	1		4,00

Realizado por: Vinueza, Nicole, 2023

3.2 Actividad antimicrobiana

Los resultados del ensayo de actividad antimicrobiana se expresaron como el valor de la media $\pm$ desviación estándar de los diámetros de inhibición obtenidos en cada concentración de extracto para cada bacteria. Los datos obtenidos a partir de las variables de estudio no tuvieron una distribución normal y continua. Estos mostraron una tendencia no paramétrica o monótonas con variables ordinales organizadas en rangos, como son las concentraciones del extracto, por lo que se aplicó la correlación de Spearman para determinar la fuerza de asociación de ambas variables (Mendivelso, 2021).

En el ensayo exploratorio se demostró que los extractos metanólicos de hojas de *G. neuberthii* poseen actividad antimicrobiana para las cepas *S. aureus*, *C. albicans*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *E. coli* en la concentración de 300 mg/mL (Figura 2). Así se obtuvo un diámetro de inhibición de 10.41 ± 0.49 mm para *S. aureus*, siendo la bacteria más sensible al extracto (Tabla 2) al presentar halos de inhibición en las nueve concentraciones probadas para determinar la CMI.

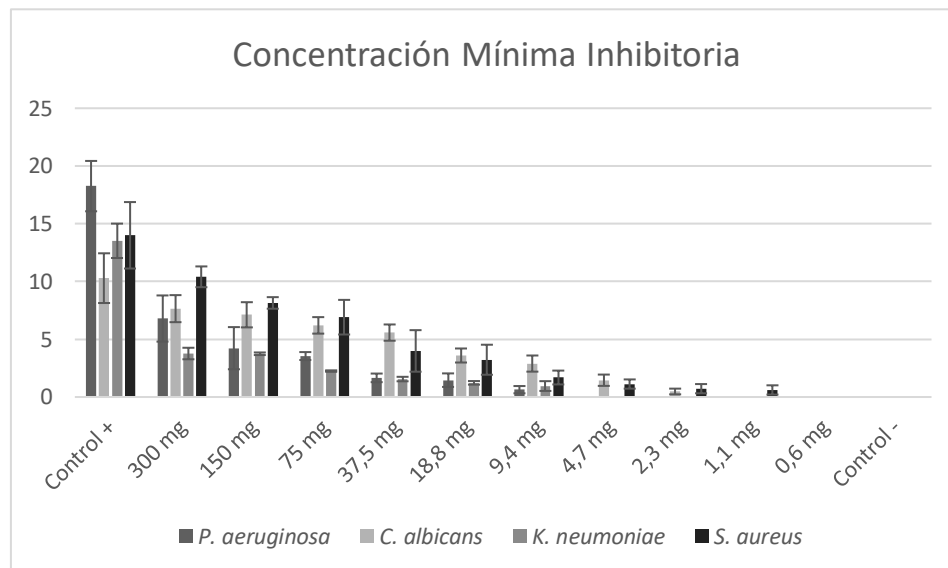


Figura 2-5: Concentraciones mínimas inhibitorias del extracto metanólico de *G. neuberthii* contra bacterias patógenas oportunistas.

Realizado por: Vinueza Nicole, 2023

Las medias de longitudes de los diámetros de inhibición de cada concentración probada mostraron diferencias significativas, no similares, dependiendo del microorganismo usado. En todos los casos, la correlación entre las variables de concentración del extracto y las zonas de inhibición de crecimiento fue positiva y fuerte (*S. aureus* y *C. albicans*: $r=0.95$; $p= 2.2e^{-16}$, *K. pneumoniae*: $r=0.84$; $p= 1.3e^{-15}$ y *P. aeruginosa* $r=0.92$; $p= 2.2e^{-12}$) lo que indica que a mayor concentración del extracto mayor es el diámetro de inhibición (Figura 3).

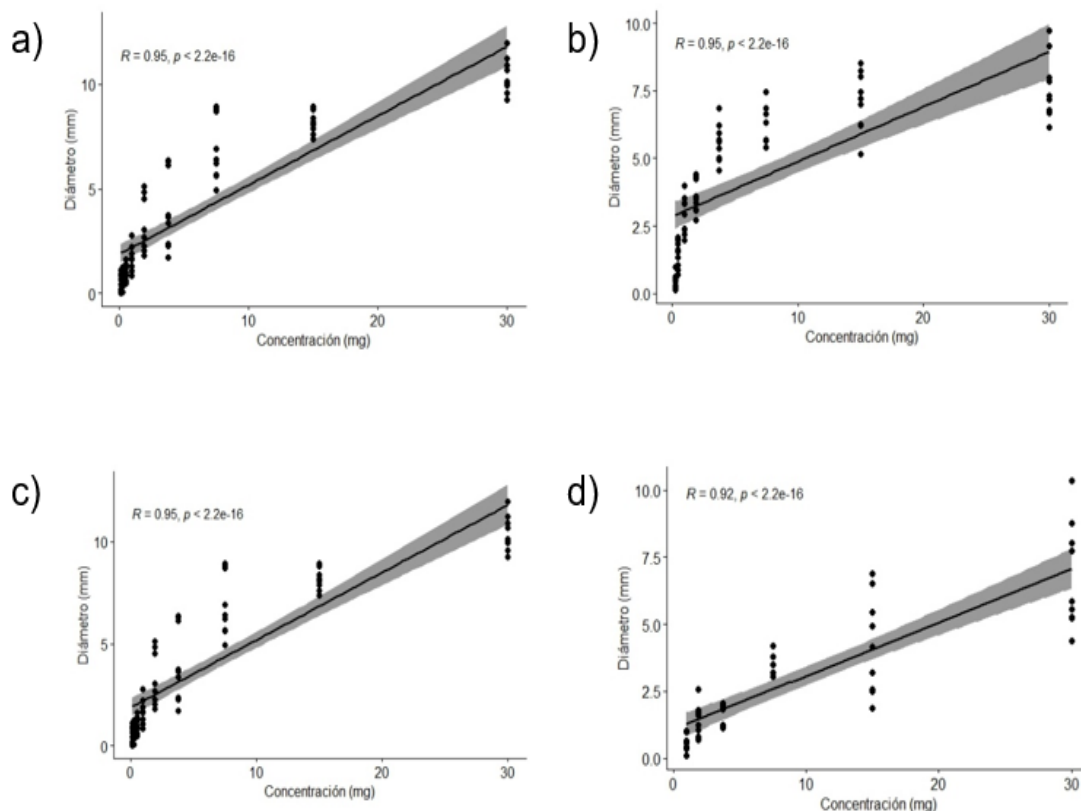


Figura 3-5: Correlación de Spearman entre variables del extracto y bacteria
Realizado por: Vinuesa Nicole, 2023

De la evaluación de las diferencias de las medias del diámetro de inhibición fueron significativas en las siguientes concentraciones: en el caso de *S. aureus* la concentración más alta (300 mg/mL), con un diámetro de inhibición de 10.41 ± 0.49 mm, la diferencia con las demás concentraciones fue estadísticamente significativa (Anexo D 1). Para *C. albicans* se obtuvo los diámetros de inhibición 7.6 ± 0.6 mm y 7.1 ± 0.5 en las dos concentraciones más altas de 300 mg y 150 mg, estas dos concentraciones no fueron diferentes, al igual que las zonas de inhibición de 1.5 ± 0.2 mm y 0.6 ± 0.1 mm en las concentraciones más bajas de 4.6 mg y 2.3 mg (Anexo D, 2). En los resultados para *K. pneumoniae* se obtuvo los diámetros de inhibición $3.7 \pm$

0.4 mm y 3.6 ± 0.3 mm en las dos primeras concentraciones, no mostraron diferencias, al igual que las zonas de inhibición de 1.6 ± 0.6 mm y 1.2 ± 0.1 mm en las concentraciones más bajas de 37.5 mg/mg y 18.8 mg/ml (Anexo D, 3). Por último, en *P. aeruginosa* se obtuvo los diámetros de inhibición 6.7 ± 0.5 mm en la concentración de 300 mg, que fue significativamente diferente respecto las demás concentraciones, pero en los diámetros de inhibición de 1.6 ± 0.6 mm y 1.5 ± 0.2 mm obtenidas de las concentraciones de 37.5 mg/ml y 18.8 mg/ml no mostraron diferencias.

Tabla 2-3: Media $\pm$ desviación estándar de diámetro de inhibición en (mm) (N=9).

Concentración [mg/ml]	Diámetro de inhibición[mm]			
	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>
300	10.4 ± 0.5^a	7.7 ± 0.6^a	3.7 ± 0.4^a	6.8 ± 0.6^a
150	8.1 ± 0.4^b	$7.1 \pm 0.5^{a,b}$	3.6 ± 0.3^a	4.2 ± 0.4^b
75	6.9 ± 0.5^b	$6.2 \pm 0.3^{b,c}$	2.2 ± 0.3^b	3.5 ± 0.3^b
37.5	4.0 ± 0.4^c	5.6 ± 0.6^c	$1.6 \pm 0.6^{b,c}$	1.7 ± 0.5^c
18.8	3.2 ± 0.3^c	3.6 ± 0.2^d	1.2 ± 0.2^c	1.5 ± 0.2^c
9.4	1.7 ± 0.3^d	2.9 ± 0.2^d	0.9 ± 0.13^c	0.6 ± 0.3^c
4.6	1.1 ± 0.1^d	1.5 ± 0.1^e		
2.3	0.7 ± 0.2^d	0.5 ± 0.1^e		
1.2	0.6 ± 0.1^d			

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

Realizado por: Vinueza Nicole, 2023

3.3 Ensayo Cometa

En el ensayo cometa no mostró señales de fragmentación de ADN visualizado a través de la formación de cometas en las concentraciones probadas de 300 mg, 76 mg y 4.6 mg de extracto de *G. neuberthii* (Figura 4). En el control positivo se tuvo la formación de cometas debido a la adición de peróxido de hidrógeno. Por el contrario, en el control negativo los núcleos de las células permanecieron intactos. Si bien no hubo la fragmentación de ADN de los linfocitos, se mostró la disminución del diámetro de los núcleos de los linfocitos a mayor cantidad del extracto (Tabla 3). El coeficiente de correlación entre las variables de concentración del extracto y el tamaño de los linfocitos fue de $r = -0.56$; $p = 9.3e^{-10}$, lo cual indica una correlación inversa que supone que a mayor concentración menor es el tamaño del núcleo celular.

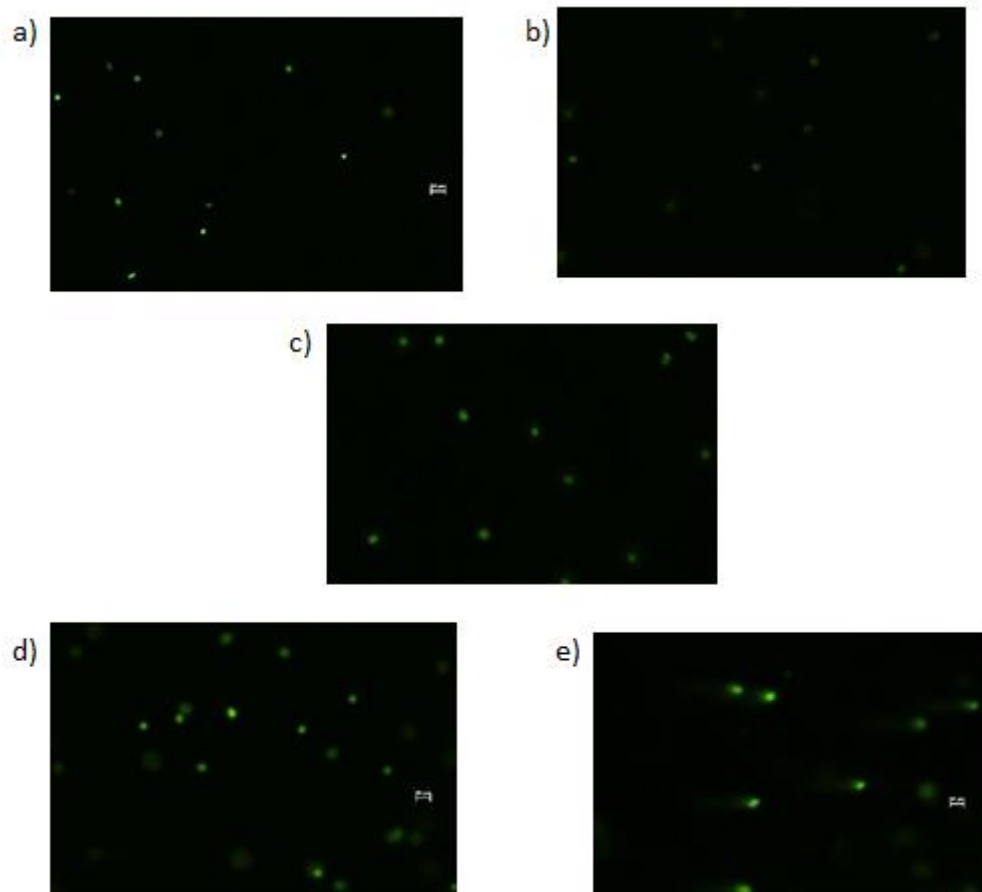


Figura 4-5. Linfocitos expuestos a tres concentraciones de *G.neuberthii*.
Realizado por: Vinueza Nicole, 2023

Tabla 3-3. Diámetro del núcleo de los linfocitos
expuestos al extracto metanólico de

Concentraciones (mg/ml)	Diámetro del núcleo (mm)
300	13,48
76	16,66
4,6	18,47

Realizado por: Vinueza Nicole, 2023

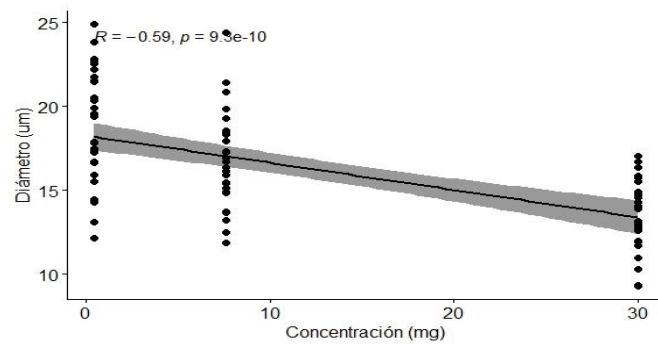


Figura 5-5: Correlación de Spearman de los diámetros de los núcleos de linfocitos
Realizado por: Vinueza Nicole, 2023

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Valor medicinal ancestral

La especie de *Grias neuberthii* ha sido ampliamente utilizada en la medicina ancestral de la población Kichwa y Shuar, de las cuales difiere la manera de uso del material vegetal, más no las enfermedades a tratar (Rios, 2007). Así, la población Shuar utiliza emplastos de las hojas para tratar dolores estomacales. En cambio, los Kichwas beben la infusión de la corteza como emético, que es una sustancia que induce al vómito (Lescure et al., 1987). A través de las entrevistas a pobladores Kichwa se logró identificar un uso principal de las hojas. Este corresponde a la categoría de postparto, ya que ocho de cada diez entrevistados señalan el uso de *Grias neuberthii* como bebida curativa y depurante para las mujeres luego del alumbramiento (Tabla 1). Esta categoría de uso también posee relación con usos rituales, puesto que según lo mencionado por Berni et al., (2019) la decocción y el baño caliente con hojas y corteza de “pitun” se realizan luego de ocho días del nacimiento, con la finalidad de hacer una limpieza corporal, anímica y mental (Rios et al., 2007).

Otro uso mencionado es como analgésico, los entrevistados señalan que cuando sienten dolor físico o fatiga, beben la infusión de las hojas y así recuperar su vitalidad y continuar con sus labores cotidianas. Esta información puede ser comparada con la descrita por Vacas y colaboradores que señalan que los Kichwas beben la infusión de la corteza de pitun ayuda a combatir el dolor corporal causado por fatiga (Vacas et al., 2015). En otros usos mencionados que no involucran a las hojas se usa la corteza, la ralladura de la semilla y fruto contra el paludismo, la fiebre, el dolor y malestar estomacal, la diarrea y vómito. En los reportes de Lescure y colaboradores mencionan el uso de la ralladura de la semilla es abortivo y la infusión de las hojas actúan como febrífugo (Lescure et al., 1987).

4.2 Actividad antimicrobiana

Grias neuberthii presentó actividad antimicrobiana para todas las bacterias mencionadas en este estudio, aunque se registró mayor sensibilidad al extracto en *S. aureus*. En cuanto a *E. coli*, los halos formados mostraron la presencia de colonias, por lo que se consideró como bacteria resistente y no se realizó la determinación de la

CMI. Cabe recalcar que no existe una cantidad relevante de estudios para la especie utilizada en esta investigación, sin embargo, los resultados obtenidos fueron comparados con las investigaciones similares realizadas en diferentes especies de la familia Lecythidaceae. Tal es el caso de los estudios efectuados en los extractos metanólicos de la especie *Planchonia careya* donde obtuvieron un CMI de 9 mg/ml para *S. aureus*, concentración similar a la obtenida en este estudio, ya que se obtuvo una CMI 9.4mg/ml para la misma bacteria. En cuanto a las Gram negativas, en este estudio la actividad antibacteriana del extracto metanólico de *G. neuberthii* mostró un CMI de 18,8 mg/ml (1.6 ± 0.6 mm) y 37.7 mg/ml (1.7 ± 0.5 mm) para *K. pneumoniae* (AMP-Res) y *P. aeruginosa* (AMP-Res) respectivamente (Tabla 2), considerando las diferencias significativas obtenidas en la prueba de Tukey.

Para la evaluación de la actividad antifúngica, *G. neuberthii* mostró un CMI de 4.6 mg/ml (1.5 ± 0.1 mm) contra *C. albicans*. Estos resultados pueden ser comparados con los de Ramos y colaboradores, quienes probaron los extractos acuosos de *Eschweilera pedicellata* (Lecythidaceae) contra diferentes cepas de *Candida spp.* obteniendo actividad antifúngica con CMI de 0.50 mg/ml para *C. albicans* (Ramos et al., 2014). Así mismo, estudios realizados por Navya y Anitha probaron la actividad antifúngica del extracto metanólico de la corteza de *Careya arborea* (Lecythidaceae), obteniendo un CMI de 50 mg/ml para *C. albicans* (Navya & Anitha, 2018). Otros estudios, como los de Rahman et al. (2005) realizados en los extractos metanólicos de corteza seca y pulverizada de *Barringtonia acutangula* (Lecythidaceae) señalan un CMI de 200 ug/ml para *C. albicans*. Así, en los estudios de Hussin y colaboradores señalan que los extractos metanólicos de las hojas de *Barringtonia racemosa* (Lecythidaceae) poseen fuerte actividad antifúngica contra siete especies de hongos, incluida *Candida spp.* En el perfil fitoquímico de las hojas de esta planta se determinó la presencia de ácidos fenólicos y flavonoides, metabolitos secundarios producidos en respuesta al estrés ambiental y en defensa al ataque de microorganismos (Hussin et al., 2009). Los flavonoides de la familia Lecythidaceae no han sido estudiados en su totalidad, pero entre los principales hallados en varias especies de la familia se encuentra la quercetina, compuesto conocido por su actividad antioxidante y antiinflamatoria (Iwashina & Kokubugata, 2016). Aunque aún no se ha demostrado el mecanismo de acción antifúngica, se cree que estos compuestos poseen la capacidad de inhibir la germinación de esporas de los hongos patógenos (Dhiman et al., 2011).

En cuanto a las bacterias usadas en este estudio, se puede inferir que el extracto metanólico a partir de hojas frescas de *G. neuberthii* tiene cierta afinidad por las bacterias Gram positivas en comparación con las Gram negativas. Esto podría deberse a la composición de la pared celular, puesto que, las bacterias Gram negativas tienen una membrana doble de peptidoglicano, la cual sería una barrera para el ingreso de los metabolitos presentes en el extracto metanólico de hojas frescas (Breijyeh et al., 2020; Raghanvedra et al., 2017). En las bacterias Gram negativas este polímero se encuentra en constante estado de recambio, lo que quiere decir que pequeños fragmentos de la envoltura celular son desplazados o reemplazados, lo que imposibilitaría una unión efectiva entre el sitio activo de la pared celular y el agente antimicrobiano (Fisher & Mobashery, 2014).

La actividad antibacteriana hallada en los extractos de especies de *Careya arborea* y *Barringtonia asiatica* (Lecythidaceae) contra Gram positivas contrasta con los resultados de Chah et al., (2006), quienes probaron 20 mg/ml de extracto metanólico de hojas secas de *Napoleonaea imperialis*, encontrando mayor actividad antimicrobiana para bacterias Gram negativas. La principal diferencia con este estudio es el tipo de material inicial utilizado, para lo cual es importante recordar que los tipos de metabolitos secundarios que se obtengan de un extracto depende en gran cantidad del estado del material vegetal y la polaridad del disolvente usado en la extracción; y a su vez la polaridad del disolvente depende el grado de solubilidad de los fitoconstituyentes (Alabi et al., 2012). Por otra parte, la eliminación del agua de la muestra puede influir en la eficacia de actividad biológica del extracto y en la conservación y durabilidad del extracto a través del tiempo (Kozłowska et al, 2021).

Entonces, una caracterización fitoquímica de la composición de cada extracto, es esencial para poder conocer de mejor manera las potenciales moléculas responsables de la actividad biológica. Como ejemplo de esta aplicación, tenemos McRae y colaboradores aislaron cuatro compuestos del extracto metanólico de hojas frescas de *Planchonia careya*: ácido alfa-dimefólico (ácido graso), ácido hiptático-A (triterpeno oleanólico) y ácido 3B-O-cis-p-cumaroiltormentético y ácido 3B-O-trans-p-cumaroiltormentético que es una mezcla inseparable de triterpenos de tipo ursano acilados como posibles responsables de la actividad antimicrobial (McRae et al., 2008). Estos presentaron una concentración de CMI más baja que el extracto metanólico crudo, siendo 0.1-1 mg/ml al probarlos sobre algunas bacterias Gram positivas. En el mismo estudio se probó la actividad antimicrobiana de los extractos

acuosos y metanólicos crudos para *S. aureus* resistente a meticilina, *S. aureus* (ATCC 25923) y *Mycobacterium fortuitum*. Los autores señalan que la potencia antimicrobiana del extracto metanólico fue mayor que el extracto acuoso en bacterias Gram positivas y micobacterias, en relación con las Gram negativas. Así, el extracto metanólico dio un CMI de 9 mg/ml tanto para *S. aureus* (ATCC 25923) como *S. aureus* resistente a meticilina, cantidades que son similares a las concentraciones de CMI obtenidas en este estudio.

En los estudios de Tsukasa y colaboradores se aislaron diferentes compuestos fenólicos de las hojas de *Barringtonia asiatica* (Lecythidaceae). Los autores caracterizaron por primera vez flavonoides como el kaempferol y la quercetina, compuestos de importancia farmacológica por su actividad antimicrobiana, antiinflamatoria y antioxidante (Iwashina & Kokubugata, 2016). Los flavonoides constituyen un gran número de metabolitos secundarios no nutricionales, que cumplen con la función de proteger a la planta de factores externos que causen estrés (Hernandez et al., 2012). Este estrés puede ser ocasionado por la exposición a altos niveles de radiación UV, temperatura, el ataque de microorganismos patógenos, por lo que se puede asumir que los extractos de las hojas de la mayoría de las especies de Lecythidaceae, poseen actividad antifúngica y antibacteriana.

Así mismo, Chah y colaboradores evaluaron la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de hojas secas de *Napoleona imperialis* (Lecythidaceae), en bacterias multirresistentes aisladas de heridas cutáneas infectadas. Estas especies incluyen *S. aureus* (4 cepas), *E. coli* (2 cepas), *P. aeruginosa* (1 cepa) y *Proteus ssp* (3 cepas). La concentración probada del extracto metanólico de las hojas fue de 20 mg/ml, donde todas las cepas, tanto Gram positivas como Gram negativas, mostraron señales de actividad antimicrobiana con la formación de zonas de inhibición de crecimiento, con diámetros de 16-18 mm (Chah et al., 2006).

Por otro lado, Raghanvedra junto a sus colaboradores usaron extractos metanólicos de hojas secas y pulverizadas de *Couroupita guianensis* (Lecythidaceae), para probar la actividad antimicrobiana de esta especie. En ambos estudios se emplearon bacterias como *S. aureus*, *S. epidermis*, *B. subtilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Salmonella typhi*, siendo el extracto efectivo tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. Así, los autores señalan un CIM de 25 ug/ml para *S. aureus* en ambos estudios (Bhuvaneswari et al., 2014; Raghanvedra et al., 2017). Por último, es

necesario recordar que la diferencia de actividad biológica de esta investigación, con algunos de los estudios presentados anteriormente, puede darse por la naturaleza del extracto probado y las cepas probadas en los mismos.

4.3 Ensayo Cometa

El ensayo cometa, o también conocido como ensayo de electroforesis en gel de células individuales, se emplea para evaluar el daño a nivel de ADN provocado por algún agente genotóxico. Estos agentes pueden causar la rotura de las hebras de ADN en células nucleadas (Liao et al., 2009). En esta investigación se emplearon linfocitos humanos, y aun cuando no se identificó la formación de un cometa, se observó una relación inversamente proporcional entre la concentración del extracto y el tamaño del núcleo, debido a que a medida que la concentración de extracto aumentó, el tamaño del núcleo de los linfocitos disminuyó. De esta manera, el tamaño del núcleo de los linfocitos expuestos a 4.6 mg/ml de extracto fue de 18.46 mm, a 76 mg/ml fue de 16.66 mm y por último 300 mg/ml el tamaño del núcleo fue de 13.44 mm (Tabla 3).

Los linfocitos poseen una envoltura nuclear esférica, que cuando está en circulación es rígido para proteger del daño por el estrés mecánico y cuando migra a los tejidos y órganos es deformable. Por otro lado, el núcleo es un orgánulo dinámico que almacena la cromatina, el cual puede variar su morfología y actividad dependiendo del entorno de la célula. Es así que la morfología del núcleo puede estar determinada por los componentes del espacio extracelular (Brown et al., 2001; Skinner y Johnson, 2017). Con esto en cuenta, se puede inferir que el extracto de *G. neuberthii* causa estrés a los linfocitos, evidenciando un cambio en la morfología celular a causa del contacto entre el extracto metanólico y la envoltura nuclear de los linfocitos, lo que ocasionaría que la cromatina se compacte y, por lo tanto, el tamaño núcleo disminuya. A partir de estos supuestos se podría inferir que los extractos de *Grias neuberthii* poseen actividad citotóxica, aunque sería necesario realizar más análisis, según lo expuesto en los estudios de (Celik, 2011). Para *Grias neuberthii* no se han reportado ensayos de genotoxicidad pero sí de citotoxicidad en líneas celulares tumorales, los cuales señalan mecanismos de muerte celular por apoptosis (Samaniego, 2017; Romero, 2017; Guaman-Ortiz et al., 2020).

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En esta tesis se reporta a *G. neuberthii* como una especie usada por comunidades Kichwas en 18 categorías de usos medicinales, siendo la más mencionada Postparto o cuidados de postparto (84%), seguida de analgésico y emético, malestares que podrían estar relacionados por la presencia de agentes infecciosos como hongos y bacterias.

En cuanto a la actividad antimicrobiana, el extracto metanólico de las hojas frescas de *G. neuberthii* posee mayor actividad antibacteriana contra Gram positivas como *S. aureus* con un CMI de 9.4 mg/ml; seguido de Gram negativas como: *K. pneumoniae* (AMP-res) con un CMI de 18.8 mg/ml y *P. aeruginosa* (AMP-res) con un CMI de 37.7 mg/ml; y actividad antifúngica contra *C. albicans* con un CMI de 4.6 mg/ml. Sobre la genotoxicidad del extracto no se encontró la formación de cometas, lo cual indicaría que no hay daño a nivel del ADN, pero sí una notoria reducción del núcleo celular de los linfocitos conforme se incrementa la concentración del mismo.

Con base a esta información, es necesario enfocar nuevos estudios en los cuales se realice la caracterización fitoquímica, aísle e identifique los metabolitos de la actividad antimicrobial, presentes en el extracto metanólico de hojas frescas de “pitun”. También sería necesario evaluar esta actividad empleando otros tipos de solventes con distintas polaridades como extractos acuosos, etanol, acetona, éter o hexano que podrían ampliar la actividad antimicrobial. Además, es necesario evaluar la citotoxicidad de esta especie en líneas celulares para comprobar si existe o no un daño real en las células expuestas al extracto.

En esta investigación se demuestra el potencial de la especie *G. neuberthii* como fuente de agentes antibacterianos contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* (AMP-Res) y *K. pneumoniae* (AMP-Res), patógenos resistentes de importancia mundial.

REFERENCIAS

- Alabi, O., Haruna, M., Anokwuru, C., Abia, H., & Okegbe, V. (2012). Comparative studies on antimicrobial properties of extracts of fresh and dried leaves of *Carica papaya* (L) on clinical bacterial and fungal isolates. *Pelagia Research*, 3(5), 3107–3114.
- Alva, A., Vásquez, O., Cuniberti, R., del Castillo, A., & Guerra, W. (2002). EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS DE LA ESPECIE *Grias neuberthii* Macht (Sachamango). *Revista Amazónica de Investigación*, 1(2), 103–106.
- Armijos, C., Ramírez, J., Salinas, M., Vidari, G., & Suárez, A. I. (2021). Pharmacology and Phytochemistry of Ecuadorian Medicinal Plants: An Update and Perspectives. *Pharmaceuticals* 2021, Vol. 14, Page 1145, 14(11), 1145. <https://doi.org/10.3390/PH14111145>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2015.11.005>
- Bernis C, Schwarz A, Varea C, & Shiguango MA. (2017). *La Ashanga de las parteras Kichwas del Alto Napo, Ecuador*.
- Bhuvaneswari, S., Aravind, K. R., Ramkumar, B., Vinod Raja, N., Neelakandan, A., Mukesh Kumar, P., & Udaya Prakash, N. K. (2014). Studies on the phytochemistry and bioactivity of leaves of trees in Chennai - I. *International Journal of ChemTech Research*, 6(9), 4078–4083.
- Brejijeh, Z., Jubeh, B., & Karaman, R. (2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*, 25(6), 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00524>
- Celik, T. (2011). Potencial Genotóxico and Cytotoxic effects of Plant Extracts. In *A Compendium of Essays on Alternative Therapy* (pp. 212–224).
- Chah, K. F., Eze, C. A., Emuelosi, C. E., & Esimone, C. O. (2006). Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 104(1–2), 164–167. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.070>
- Chapalbay, R., Ramírez, P., & Murgueytio, A. (2020). *La Chakra Kichwa Amazónica: Gobernanza local y resiliencia climática en la provincia de Napo*. 35–42.
- Chiriboga, X., & Maldonado, M. (2002). *Etnomedicina: progresos italo-latinoamericanos*. Investigación Fitoquímica de *Schistocarpa* Aff *Eupatorioides* y *Grias Neuberthii* Mc Bride. https://books.google.com.ec/books?id=y8giqaQvK00C&pg=PA44&hl=es&source=gbs_toc_r&cad=4#v=onepage&q&f=false

- Dhiman, A., Nanda, A., Ahmad, S., & Narasimhan, B. (2011). In vitro antimicrobial activity of methanolic leaf extract of *Psidium guajava* L. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(2), 226–229. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.80776>
- Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2014). The sentinel role of peptidoglycan recycling in the β -lactam resistance of the Gram-negative Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic Chemistry*, 56, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2014.05.011>
- García, D., Sotero, V., Mancini, D., Pavan, R., & Mancini Filho, J. (2011). Evaluación de la actividad antioxidante “In vivo” de tres frutos de la amazonía: *Gustavia augusta* L., *Grias neuberthii* Macbr y *Theobroma bicolor*. In *UNAP-Iquitos-Perú*. (pp. 44–55). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2011000100005&script=sci_arttext
- Guamán-Ortiz, L. M., Romero-Benavides, J. C., Suarez, A. I., Torres-Aguilar, S., Castillo-Veintimilla, P., Samaniego-Romero, J., Ortiz-Diaz, K., & Bailon-Moscoso, N. (2020). Cytotoxic Property of *Grias neuberthii* Extract on Human Colon Cancer Cells: A Crucial Role of Autophagy. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1565306>
- Gupta, P. D., & Birdi, T. J. (2017). Development of botanicals to combat antibiotic resistance. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 8(4), 275. <https://doi.org/10.1016/J.JAIM.2017.05.004>
- Hernandez, S., Marino, L., Isern, D., & Coria, I. (2012). Flavonoides: Aplicaciones medicinales e industriales. *Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas - CONICET.*, 2010, 11–27.
- Hussin, N. M., Ahmad, S. A., Wesly, J., Raja, M., Haji, A., & Shukor, Y. (2009). Antifungal activity of extracts and phenolic compounds from *Barringtonia racemosa* L. *Lecythidaceae*) Article in *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 70. <https://doi.org/10.5897/AJB09.450>
- Iwashina, T., & Kokubugata, G. (2016). *Flavonoid properties in the leaves of Barringtonia asiatica (Lecythidaceae)*. 42(1), 41–47.
- Jamrozik, E., Selgelid, M. J., Jamrozik, E., & Selgelid, M. J. (2020). *Drug-Resistant Infection: Causes, Consequences, and Responses*. 3–18. https://doi.org/10.1007/978-3-030-27874-8_1
- Kahn, F., & Moussa, F. (1997). Uso y Manejo de Recursos Vegetales: Memorias del Segundo Simposio Ecuatoriano de Etnobotánica y Botánica Económica. *Uso y Manejo de Recursos Vegetales*, 83–100. https://www.researchgate.net/publication/283122891_Uso_y_manejo_de_recursos_vegetales_en_el_Ecuador_Memorias_del_Segundo_Simposio_Ecuatoriano_de_Etnobotanica_y_Botanica_Economica
- Laxminarayan, R., Matsoso, P., Pant, S., Brower, C., Røttingen, J. A., Klugman, K., & Davies, S. (2016). Access to effective antimicrobials: a worldwide challenge. *The Lancet*, 387(10014), 168–175. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00474-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00474-2)
- Lescure, J., Baslsev, H., & Alarcon, R. (1987). *Enciclopedia de plantas útiles de la Amazonía ecuatoriana*.
- Liao, W., McNutt, M. A., & Zhu, W.-G. (2009). The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. *Methods*, 48(1), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.02.016>

- Liu, K., Zhang, X., Xie, L., Deng, M., Chen, H., Song, J., Long, J., Li, X., & Luo, J. (2021). Lupeol and its derivatives as anticancer and anti-inflammatory agents: Molecular mechanisms and therapeutic efficacy. *Pharmacological Research*, 164, 105373. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105373>
- Macbride, J. F. (James F., & History., F. M. of N. (1931). *Spermatophytes, mostly Peruvian. III : Vol. v.11:no.1*. Field Museum of Natural History,. <https://www.biodiversitylibrary.org/item/19792>
- Martinez, J. (2013). Biología de los microorganismos patógenos. *Departamento de Biotecnología Microbiana*. www.cnb.csic.es/index.php/es/home/biotecnologia-microbiana/patogenos-opportunistas.html
- McRae, J. M., Yang, Q., Crawford, R. J., & Palombo, E. A. (2008). Antibacterial compounds from *Planchonia careya* leaf extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(3), 554–560. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.01.007>
- Mendivelso, F. (2021). Prueba no paramétrica de correlación de Spearman. *Revista Sanitas*, 24(1). doi.org/10.26852/01234250.578
- Ministerio de Salud Pública. (2018). *REPORTE DE DATOS DE RESISTENCIA A LOS ANTIMICROBIANOS*. 1–10.
- Navya, A., & Anitha, S. (2018). Comparative studies on phytochemical and antimicrobial activity on aerial parts of *Careya arborea*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(2), 1384–1390.
- Odonkor, S. T., & Kennedy K, A. (2012). *Bacteria resistance to antibiotics: recent trends and challenges*. 2(4), 1204–1210. papers3://publication/uuid/D08CCDB8-8E18-469F-87E3-2704311AC78B
- Raghanvedra, H., Prashith Kekuda, R., Shilpa, M., Petkar, T., & Pushpavathi, D. (2017). Antimicrobial, radical scavenging, and insecticidal activity of leaf and flower extracts of *Couroupita guianensis* Aubl. *International Journal of Green Pharmacy*, 11(3), 171–177.
- Ramos, D., Rodrigues, K., Carrion, L., Cursino, L., & Jefreys, M. (2014). Antifungal Activity of Brazilian Plants Extracts Againsts some Species of *Candida* spp. *International Journal of Phytopharmacology*, 5(6), 445–453.
- Rios, M., Koziol, M. J., Borgtoft Pedersen, H., & Granda, G. (2007). *Plantas útiles del Ecuador: aplicaciones, retos y perspectivas/Useful plants of Ecuador: Applications, challenges, and perspectives*. Corporación Sociedad para la Investigación y Monitoreo de la Biodiversidad Ecuatoriana (SIMBIOE).
- Romero, L. (2017). *Mecanismos de muerte celular inducidos por el extracto metanólico de *Grias neuberthii* en varias líneas celulares*.
- Salazar, L., Vallejo López, M. J., Grijalva, M., Castillo, L., & Maldonado, A. (2018). Biological Effect of Organically Coated *Grias neuberthii* and *Persea americana* Silver Nanoparticles on HeLa and MCF-7 Cancer Cell Lines. *Journal of Nanotechnology*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9689131>
- Salto, R., Vásquez, T., Lazo, J., Banguera, D., Guayusamín, P., Vargas, J., & Peñas, I. (2016). The use of medicinal plants by rural populations of the Pastaza province in the Ecuadorian Amazon. *Acta Amazonica*, 46(4), 355–366. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201600305>

- Samaniego, J. (2017). *Citotoxicidad de los extractos de Grias neuberthii y Grias peruviana sobre líneas celulares*. [https://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/20.500.11962/21259/1/Samaniego Romero%2C Jimmy Patricio..pdf](https://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/20.500.11962/21259/1/Samaniego_Romero%2C_Jimmy_Patricio..pdf)
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 2012 9:7, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Tene, V., Malagón, O., Finzi, P. V., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(1), 63–81. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2006.10.032>
- The World Flora Online. (2022). *Grias neuberthii* J.F.Macbr. <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000775429>
- Tirira, D., & Rios, M. (2018). Uso de flora y fauna por el pueblo Waorani, Amazonía del Ecuador. In *Monitoreo Biológico Yasuní*. Ecuambiente Consulting Group.
- Vacas, O., Narvaez, A., Navarrete, H., & Villota, S. (2015). *Grias neuberthii*. In *Bioconocimiento de la flora ecuatoriana. Algunas plantas medicinales y sus usos* (pp. 50–51).
- Vásquez-Ocmín, P., Cojean, S., Rengifo, E., Suyyagh-Albouz, S., Amasifuen Guerra, C. A., Pomel, S., Cabanillas, B., Mejía, K., Loiseau, P. M., Figadère, B., & Maciuk, A. (2018). Antiprotozoal activity of medicinal plants used by Iquitos-Nauta road communities in Loreto (Peru). *Journal of Ethnopharmacology*, 210, 372–385. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.08.039>
- WHO. (2021). *Antimicrobial Resistance*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

ANEXOS

Anexo A. Entrevistas realizadas en seis comunidades de Bajo Napo.

“Pitun”

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

1.	_____	_____	_____
2.	_____	_____	_____
3.	_____	_____	_____
4.	_____	_____	_____
5.	_____	_____	_____

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

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

4. Cuando necesita el “pitun” ¿en qué lugar lo encuentra?

5. ¿En qué meses del año está disponible el fruto del “pitun”?

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

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

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

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

Anexo B. Autorización de Recolección de Especímenes

AUTORIZACIÓN DE RECOLECCION DE ESPECIMENES DE ESPECIES DE LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA No. 2415

ESTUDIANTES E INVESTIGADORES (SIN FINES COMERCIALES)

1.- AUTORIZACIÓN DE RECOLECTA DE ESPECÍMENES DE ESPECIES LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA

2.- CÓDIGO

MAATE-ARSFC-2022-2415

3.- DURACIÓN DEL PROYECTO

FECHA INICIO	FECHA FIN
2022-08-25	2023-02-25

4.- COMPONENTE A RECOLECTAR

Plantae

El Ministerio del Ambiente y Agua, en uso de las atribuciones que le confiere la Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre autoriza a:

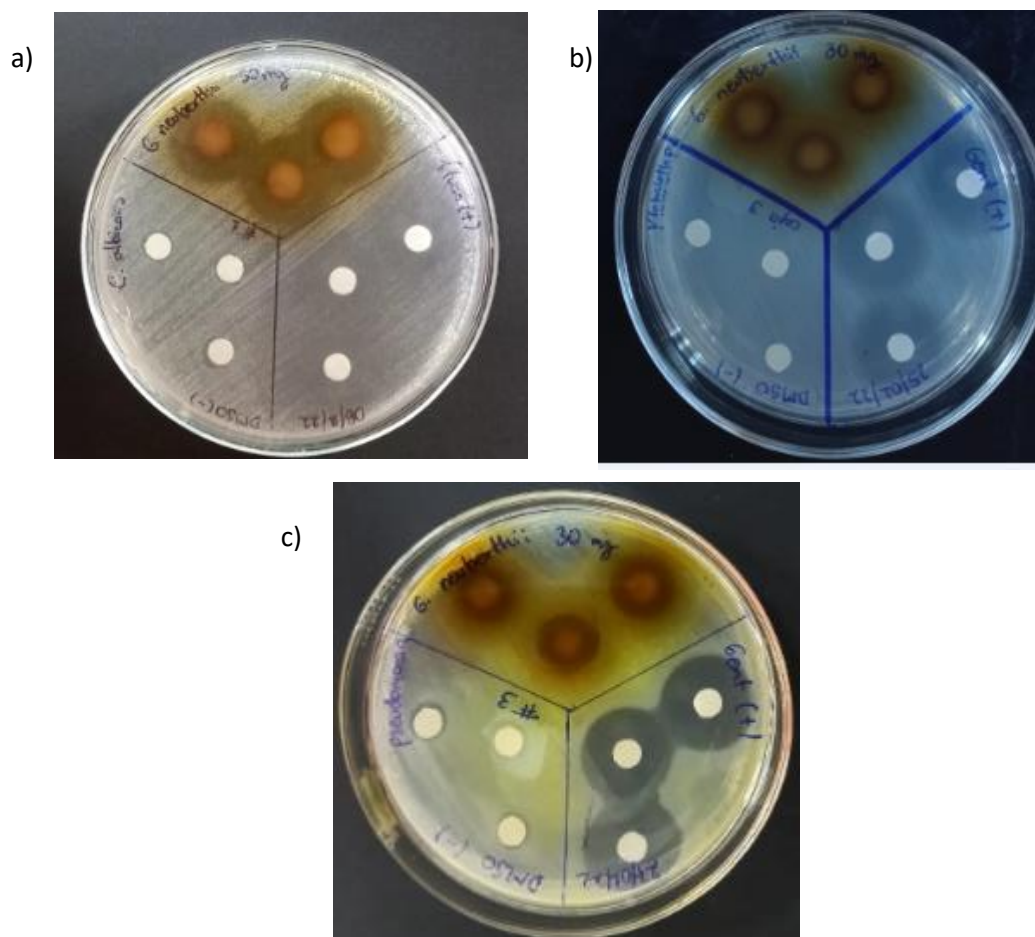
5.- INVESTIGADORES /TÉCNICOS QUE INTERVENDRÁN EN LAS ACTIVIDADES DE RECOLECCION

Nº de C.I/Pasaporte	Nombres y Apellidos	Nacionalidad	Nº REGISTRO SENESCYT	EXPERIENCIA	GRUPO BIOLÓGICO
1717348088	AGUILAR MORA FABIAN ORLANDO	Ecuatoriana	1006-2017-1877520	ninguna	Equisetopsida;Magnoliopsida

6.- PARA QUE LLEVEN A CABO LA RECOLECCION DE ESPECIMENES DE ESPECIES LA DIVERSIDAD BIOLÓGICA:

Nombre del Proyecto: Actividad antimicrobiana de muestras botánicas del cantón Tena provincia

Anexo C. Ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria del extracto en placas contra *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*



Realizado por: Vinuesa Nicole, 2023

Anexo D. Resultados de Anova y Test de Tukey ($p < 0.05$)

1)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro (mm)	81	0,93	0,92	24,68

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	927,83	8	115,98	113,83	<0,0001
Concentracion (mg)	927,83	8	115,98	113,83	<0,0001
Error	73,36	72	1,02		
Total	1001,19	80			

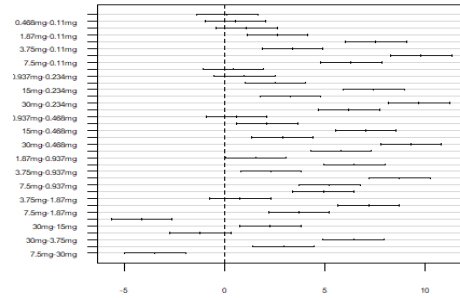
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,52172

Error: 1,0189 gl: 72

Concentracion (mg)	Medias	n	E.E.
30,00	10,41	9	0,34 A
15,00	8,14	9	0,34 B
7,50	6,91	9	0,34 B
3,75	3,99	9	0,34 C
1,88	3,23	9	0,34 C
0,96	1,69	9	0,34 D
0,48	1,12	9	0,34 D
0,24	0,72	9	0,34 D
0,12	0,61	9	0,34 D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

95% family-wise confidence level



Differences in mean levels of Concentración

2)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro (mm)	72	0,92	0,91	17,58

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	445,96	7	63,71	107,99	<0,0001
Concentracion (mg)	445,96	7	63,71	107,99	<0,0001
Error	37,76	64	0,59		
Total	483,72	71			

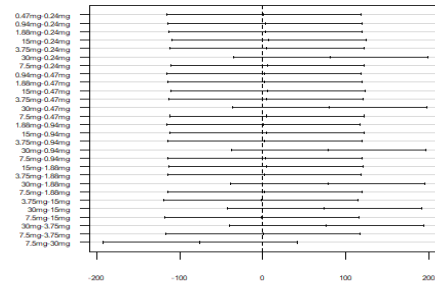
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,13451

Error: 0,5899 gl: 64

Concentracion (mg)	Medias	n	E.E.
30,00	7,65	9	0,26 A
15,00	7,12	9	0,26 A B
7,50	6,20	9	0,26 B C
3,75	5,58	9	0,26 C
1,88	3,59	9	0,26 D
0,96	2,89	9	0,26 D
0,48	1,45	9	0,26 E
0,24	0,48	9	0,26 E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

95% family-wise confidence level



Differences in mean levels of Concentración

3)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro (mm)	54	0,78	0,76	28,47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	69,66	5	13,93	34,03	<0,0001
Concentracion (mg)	69,66	5	13,93	34,03	<0,0001
Error	19,65	48	0,41		
Total	89,31	53			

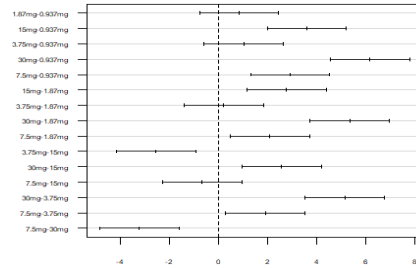
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,89518

Error: 0,4094 gl: 48

Concentracion (mg)	Medias	n	E.E.
30,00	3,76	9	0,21 A
15,00	3,74	9	0,21 A
7,50	2,25	9	0,21 B
3,75	1,55	9	0,21 B C
1,88	1,23	9	0,21 C
0,96	0,95	9	0,21 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

95% family-wise confidence level



Differences in mean levels of Concentración

4)

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
diametro (mm)	54	0,79	0,76	38,01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	236,75	5	47,35	35,46	<0,0001
concentracion (mg)	236,75	5	47,35	35,46	<0,0001
Error	64,10	48	1,34		
Total	300,84	53			

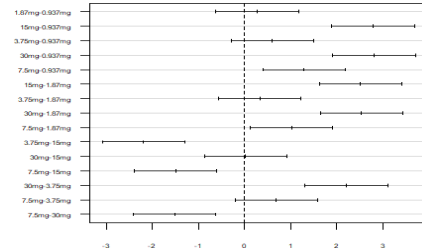
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,61675

Error: 1,3354 gl: 48

concentracion (mg)	Medias	n	E.E.
30,00	6,79	9	0,39 A
15,00	4,23	9	0,39 B
7,50	3,55	9	0,39 B
3,75	1,66	9	0,39 C
1,88	1,46	9	0,39 C
0,96	0,56	9	0,39 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

95% family-wise confidence level



Differences in mean levels of Concentración

Realizado por: Vinueza Nicole, 2023

Anexo E. Resultados del Anova y Test de Tukey ($p < 0.05$) de núcleos celulares

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro (um)	90	0,36	0,34	17,43

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	381,91	2	190,96	23,95	<0,0001
Concentracion	381,91	2	190,96	23,95	<0,0001
Error	693,78	87	7,97		
Total	1075,69	89			

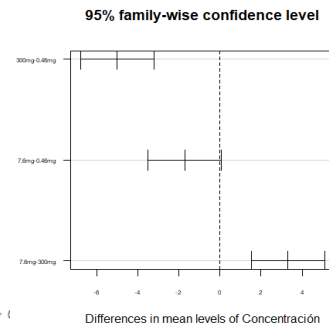
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,73860

Error: 7,9745 gl: 87

Concentracion Medias n E.E.

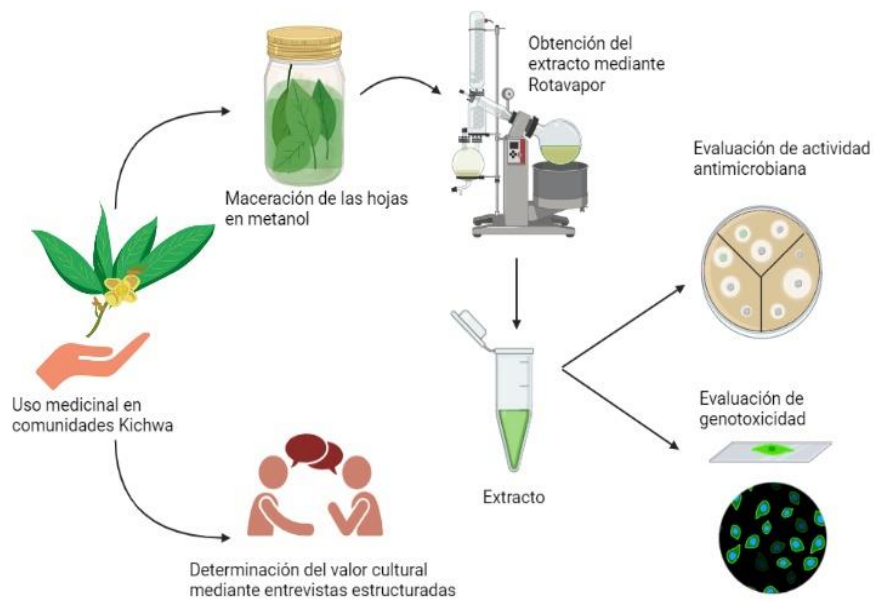
Concentracion	Medias	n	E.E.	
0,46	18,47	30	0,52	A
7,60	16,66	30	0,52	B
30,00	13,48	30	0,52	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 1$)



Realizado por: Vinueza Nicole, 2023

Anexo F. Resumen gráfico



Realizado por: Vinueza Nicole, 2023