

UNIVERSIDAD NACIONAL

Campus Omar Dengo

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD EN LA CONCENTRACIÓN DE LOS ALCALOIDES
EMETINA, CEFANELINA Y TOTALES, PRESENTES EN LA RAÍZ DE *Carapichea*
ipecacuanha EN DIFERENTES ESTADOS DE MADURACIÓN, CON LA FINALIDAD DE
OPTIMIZAR EL TIEMPO DE COSECHA Y SU POTENCIAL ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA

Trabajo sometido a consideración del Tribunal Examinador de la Escuela de Química, como
requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Química Industrial

B.Q.I. Marco Antonio Rodríguez Víquez

Ph.D. Gerardo Rodríguez Rodríguez, Tutor

M.Sc. Víctor Álvarez Valverde, Asesor

M.Sc. Randall Syedd León, Asesor

Heredia, Costa Rica

Marzo, 2022

“Este trabajo de graduación fue APROBADO por el Tribunal Examinador de la Escuela de Química de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Química Industrial”

Miembros del Tribunal Examinador del Trabajo Final de Graduación:

	NOMBRE	FIRMA
Representante del Decano	Dr. Manuel Sandoval Barrantes	<hr/>  <p>JUAN JOSE ARAYA BARRANTES (FIRMA) Firmado digitalmente por JUAN JOSE ARAYA BARRANTES (FIRMA) Fecha: 2022.03.21 17:00:01 -06'00'</p>
Representante del Director de la Escuela	Dr. Juan José Araya Barrantes	<hr/>
Tutor	Ph.D. Gerardo Rodríguez Rodríguez	 <hr/>
Asesor	M.Sc. Víctor Álvarez Valverde	<p>Firmado por VICTOR ADRIAN ALVAREZ VALVERDE (FIRMA) PERSONA FISICA, CPF-01-1328-0745. Fecha declarada: 21/03/2022 04:49 PM</p> <hr/>
Asesor	M.Sc. Randall Syedd León	 <p>RANDALL FABIO SYEDD LEON (FIRMA) Firmado digitalmente por RANDALL FABIO SYEDD LEON (FIRMA) Fecha: 2022.03.22 15:36:46 -06'00'</p>
Lector	M.Sc. Henry Borbón Alpízar	 <hr/>
Proponente	B.Q.I Marco Rodríguez Víquez	 <p>MARCO RODRIGUEZ V.</p>

RESUMEN

En años recientes ha aumentado el interés de la población de la zona norte de nuestro país en la siembra y exportación de la famosa raicilla (*C. ipecacuanha*). Esta planta medicinal es exportada a Europa y su precio depende del contenido de sus alcaloides isoquinoleínicos. Con la raíz de esta planta se preparan jarabes con propiedades eméticas muy efectivas. Desafortunadamente se desconoce por parte de los productores el momento ideal de cosecha de la raicilla, para obtener la mayor concentración de emetina y cefaelina. Esta es la razón por la cual se hizo el presente estudio, para determinar el mejor momento de cosecha de la *C. ipecacuanha* (raicilla o ipecacuana). La obtención de las muestras fue mediante un muestreo aleatorio. Se muestrearon plantas de 1 año de sembradas durante 9 meses a intervalos aproximados de 1,5 meses. Se analizó la raíz de la planta, parte en la cual se acumulan los alcaloides responsables de sus efectos medicinales.

Para el secado de las raíces se emplearon dos métodos (al sol y al horno), en donde se observó que ambos métodos presentan resultados estadísticamente semejantes, por lo tanto, se establece el primer método como el idóneo por ser más simple, rápido y económico.

La extracción de los alcaloides se realizó mediante tres extracciones sucesivas con éter etílico en medio básico y la determinación de la concentración se hizo por medio de dos métodos; mediante una valoración ácido-base y mediante la técnica de UHPLC. En ambos casos tomando el alcaloide emetina como referencia, se observó que el tercer punto de muestreo fue el de mayor concentración de alcaloides, momento en el cual las plantas tenían 16,5 meses de edad.

Se efectuó un análisis de la actividad antibiótica utilizando el método Kirby-Bauer modificado, con el extracto crudo de los alcaloides totales. Se emplearon seis bacterias con resistencia comprobada hacia los antibióticos comunes, categorizadas con el acrónimo ESKAPE. El resultado más relevante fue la obtención de halos de inhibición formados por el extracto en el medio con la bacteria *Acinetobacter baumannii*, para el cual el control positivo no formó halo de inhibición.

Analizando los resultados en esta investigación se recomienda cosechar las plantas de ipecacuana a partir de los 15 meses y hasta los 19 meses de edad. Además, se recomienda la posibilidad de analizar el efecto antibiótico con mayor profundidad para el posible tratamiento de bacterias resistentes y la manera de mejorar dicho efecto mediante una combinación con otros extractos que muestren efectos semejantes.

DEDICATORIA

Gracias a DIOS por brindarme salud y energía para emprender nuevos retos y darme el regalo más importante que podría tener, mis padres. Gracias por estar siempre a mi lado y toda mi familia por brindarme el apoyo que me ha permitido finalizar este proceso y agradezco infinitamente la paciencia y esfuerzo que siempre han puesto en mí.

Para aquellos que han confiado en mí y han aportado conocimiento, tiempo y esfuerzo incondicional con el puro propósito de ser una guía en mi crecimiento, un medio para desarrollar las herramientas necesarias para expandir mis límites fuera de las fronteras de la vida estudiantil.

AGRADECIMIENTOS

Gracias infinitas a Gerardo Rodríguez Rodríguez por abrirme las puertas de mi amado laboratorio LAFIT, por ser mi tutor, profesor, compañero y amigo, una fuente de conocimiento que siempre ha estado presente a lo largo de esta etapa en mi vida, a quien admiro por sus logros personales y académicos. Haciendo frente a las adversidades para brindarle a tantos otros como a mí la oportunidad y las herramientas para realizar un proyecto financiado con el esfuerzo del equipo LAFIT.

Lo cual me da paso para mencionar a mi exprofesor, asesor y amigo Víctor Álvarez Valverde, el cual se convirtió en un guía más en mi caminar por mi Licenciatura y por LAFIT, quién con méritos propios ha logrado forjar su carrera profesional y ganarse un puesto que ha permitido y permanecerá ayudando a muchos otros estudiantes, de los cuáles formo parte, siendo así merecedor de mi respeto, admiración y cariño.

A Randall Syedd León por aceptar formar parte de mi equipo sin tener mayores antecedentes míos, brindándome su confianza y apoyo, que se transformarían luego en esfuerzo y tiempo invertido para finalizar con éxito este proyecto. Gracias por siempre querer aportar con sus ideas y experiencia con el afán de ayudarme a mejorar.

Al incansable Abad Rodríguez Rodríguez, tenaz, colaborador, siempre atento y servicial. Gracias por los consejos, ayuda y experiencia, facilitándome así la tarea de desarrollar el último de mis objetivos, pero no así menos interesante o importante.

Agradezco a los productores de ipecacuana por las muestras brindadas, por su tiempo y generosidad brindada en las giras y todo este tiempo.

GRACIAS, gracias a todos a los que me topé en mi licenciatura. Y digo mía, porque así la hice y logré disfrutarla al máximo, 9 cursos, 6 profesores, nuevas experiencias cada clase, laboratorios (aún recuerdo el de los sábados) y giras.

Profesores, compañeros, amigos y conocidos les deseo lo mejor.

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
RESUMEN.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes y justificación.....	1
1.2 Marco teórico.....	3
1.2.1 Metabolitos extraídos de fuentes naturales	3
1.2.2 Generalidades del género <i>Carapichea</i>	5
1.2.3 Alcaloides	6
1.2.4 Patógenos y su relación con ESKAPE.....	10
1.2.5 Generalidades de la actividad antibiótica	11
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	14
3.1 Preparación de las muestras.....	14
3.2 Determinación del contenido de alcaloides totales presentes en la raíz de <i>C. ipecacuanha</i> , empleando el método ácido-base.....	14
3.3 Determinación del número óptimo de extracciones de la muestra para la cuantificación del de alcaloides, empleando el método de UHPLC.	15
3.4 Caracterización de alcaloides por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC)	16

3.5 Evaluación de la actividad antibiótica de los extractos de alcaloides de <i>C. ipecacuanha</i> empleando el método de Kirby-Bauer modificado.....	18
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1 Determinación del contenido de alcaloides totales presentes en la raíz de <i>C. ipecacuanha</i> , empleando el método ácido-base.....	21
4.2 Determinación del número óptimo de extracciones de emetina y cefaelina, presentes en las muestras de raíz de ipecacuana, para su cuantificación por UHPLC.	24
4.3 Caracterización del contenido de alcaloides empleando la técnica de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC).....	25
4.4 Evaluación de la actividad antibiótica por el método Kirby-Bauer modificado	28
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS.....	39
1. Medición de masas para las pruebas.....	39
2. Medición de absorbancias de las muestras.....	43
3. Determinación de concentraciones de las muestras.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del distrito de Pocosol de San Carlos, el punto rojo indica el sitio conocido como La Guaria, lugar en donde se encuentran las fincas, escala 1:137.00015.	2
Figura 2. Porcentaje de medicamentos producidos según su fuente ²⁷	4
Figura 3. Foto de una plantación, de una planta y de la raíz de ipecacuana en proceso de secado, la raíz es la parte de la planta en donde se acumulan los alcaloides y es la parte que se comercializa (fuente propia).	6
Figura 4. Estructura química de los alcaloides colchicina (A) y piperina (B) ³²	6
Figura 5. Núcleos de algunos alcaloides característicos ¹¹	8
Figura 6. Estructura química de los alcaloides emetina (A) y cefaelina (B), presentes en la raíz de ipecacuana ³²	9
Figura 7. Espectro de absorción de 210 a 350 nm del alcaloide cefaelina, presente en la raíz de la <i>C. ipecacuana</i>	18
Figura 8. Halo de inhibición de crecimiento producido por el cloranfenicol en cultivo de la bacteria <i>P. aeruginosa</i> (fuente propia).	19
Figura 9. Resultados del contenido de alcaloides totales solubles en éter, mediante el método ácido-base y expresados como porcentaje de emetina.	21
Figura 10. Resultados de los promedio de los seis muestreos de la comparación del método de secado (horno y sol) sobre la concentración de los alcaloides totales solubles en éter mediante el método ácido-base, expresado en porcentaje de emetina.	22
Figura 11. Resultados de la variación en la concentración de los alcaloides totales solubles en éter mediante el método ácido-base durante los muestreos realizados, comparando ambas fincas, expresado en porcentaje de emetina.	23
Figura 12. Resultados de la prueba del número de extracciones de emetina y cefaelina presentes en la raíz de <i>C. ipecacuana</i> utilizando éter etílico como disolvente. Las letras diferentes sobre las columnas significa que las extracciones son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).	24
Figura 13. Cromatograma de UHPLC en fase reversa correspondiente al patrón de los alcaloides cefaelina y emetina, detectados a 285 nm.	26
Figura 14. Cromatograma en fase reversa de UHPLC correspondiente a los dos alcaloides presentes en la muestra de raíz de ipecacuana, detectada a 285 nm.	26

Figura 15. Resultados del contenido de los alcaloides cefaelina y emetina presentes en la raíz de <i>C. ipecacuanha</i> , empleando la técnica de UHPLC.	27
Figura 16. Resultados de la comparación del método de secado de la raíz de <i>C. ipecacuanha</i> (horno y sol), sobre la concentración de los alcaloides cefaelina y emetina empleando la técnica de UHPLC.	27
Figura 17. Resultados de la medición de los diámetros de los halos de inhibición de las bacterias <i>E. coli</i> (izquierda) y <i>P. aeruginosa</i> (derecha), empleando extracto de raíz de <i>C. ipecacuanha</i> , expresados en mm.	28
Figura 18. Resultados de la medición de los diámetros de halos de inhibición de las bacterias <i>S. aureus</i> (izquierda) y <i>E. faecium</i> (derecha), empleando extracto de raíz de <i>C. ipecacuanha</i> , expresados en mm.	29
Figura 19. Resultados de la medición de los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento de las bacterias <i>A. baumannii</i> (izquierda) y <i>K. pneumoniae</i> (derecha), empleando extracto de raíz de <i>C. ipecacuanha</i> , expresados en mm.	29
Figura 20. Resultados de la medición de los halos de inhibición de crecimiento de las bacterias empleando, control positivo (penicilina estreptomicina (1000 µg/mL)) vs extracto de raíz de <i>C. ipecacuanha</i> , expresado en mm.	30
Figura 21. Resultados del %PRDZI en los seis muestreos para las bacterias empleadas, excepto <i>A. baumannii</i>	31
Figura 22. Curva de calibración para el análisis de los alcaloides cefaelina y emetina mediante UHPLC, expresado en mg/mL.	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Gradiente propuesto en la separación de los alcaloides presentes en la raíz de <i>C. ipecacuanha</i> , empleando el método de UHPLC.	17
Tabla 2. Medición de las masas de una muestra de ipecacuana en gramos (g) para la extracción de los alcaloides y determinación del número óptimo de extracciones.	39
Tabla 3. Medición de las masas de las muestras de ipecacuana en gramos (g) para la determinación de los alcaloides totales solubles en éter por el método ácido-base.	39
Tabla 4. Medición de las masas de las muestras de ipecacuana en gramos (g) para la determinación de los alcaloides emetina y cefaelina, mediante UHPLC.	40
Tabla 5. Medición de la masa de los patrones de cefaelina y emetina en gramos (g), volumen de disolución y alícuota en (μ L) tomada para la elaboración de la curva de calibración en la determinación de dichos alcaloides, mediante UHPLC.	42
Tabla 6. Medición de las masas, volumen y concentración de las muestras de ipecacuana para la determinación de la actividad antibiótica por el método Kirby-Bauer modificado.	42
Tabla 7. Absorbancias de los extractos de ipecacuana, utilizando éter como disolvente, a una longitud de onda de 285 nm.	43
Tabla 8. Relación absorbancia/masa de las extracciones realizadas con éter para determinar el número óptimo de extracciones, datos analizados con Minitab.	44
Tabla 9. Determinación de la concentración de alcaloides totales solubles en éter mediante el método ácido-base, expresada en porcentaje de emetina en mg en la muestra.	44
Tabla 10. Determinación de la concentración teórica de los patrones de cefaelina y emetina en (mg/mL) de la curva de calibración para el análisis de las muestras de ipecacuana, mediante UHPLC.	46
Tabla 11. Determinación de la concentración del alcaloide cefaelina mediante UHPLC, expresada en mg en la muestra.	46
Tabla 12. Determinación de la concentración del alcaloide emetina mediante UHPLC, expresada en mg en la muestra.	48
Tabla 13. Medición de los halos de inhibición formados por las muestras de ipecacuana para la determinación de la actividad antibiótica por el método Kirby-Bauer modificado.	50
Tabla 14. Determinación del %PRDZI de las seis bacterias empleadas en la prueba de actividad antibiótica.	51

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes y justificación

El uso de plantas para el tratamiento de enfermedades o padecimientos crónicos es bien conocido en las regiones tropicales¹. En América del Sur, ha existido un fuerte interés en el uso de plantas de la familia Rubiaceae, entre ellas una conocida popularmente como raicilla, ipeca o ipecacuana (*Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson)², la cual ha sido identificada a lo largo de Centro y Sudamérica³ y cuya expansión ha llegado a abarcar el continente europeo^{4,5}.

Según los autores Camargo de Assis y Giulietti el nombre correcto para estas poblaciones es *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes; sin embargo, el nombre aceptado para las especies y utilizado en este trabajo es *C. ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson, según de Boer y Thulin por la gran variedad de nombres en la zona para esta especie^{3,6,7,8}.

A la especie *C. ipecacuanha* se le atribuyen propiedades eméticas, amebicidas, diaforéticas y expectorantes^{9,10}, conocidas desde el siglo XX por su gran beneficio en la medicina tradicional. Esta especie es también conocida en el tratamiento de la disentería amebiana causada por *Entamoeba histolytica*. Los beneficios antes mencionados se deben a la producción de alcaloides aromáticos, emetina y cefaelina, los cuales son del tipo isoquinolécicos monoterpénicos derivados de la fenilalanina y tirosina^{11,12}.

En el período de 1980-1990, Costa Rica y Nicaragua representaban el 20% y 32% de la producción mundial de raicilla respectivamente¹³. El resto de la producción la proveían otros países, entre ellos de la región americana, Colombia y Brasil¹³, en este periodo de tiempo según el Centro Internacional de Comercio¹³ se estimó que la demanda mundial de ipecacuana rondaba las 100 toneladas anuales.

Las principales plantaciones de esta especie se han ubicado en la región Huetar Norte, como se muestra en la figura 1, la cual cubre un área de alrededor de 10.000 km²¹⁴ considerando la distribución original del territorio, de la cual no toda el área ha sido cultivable.

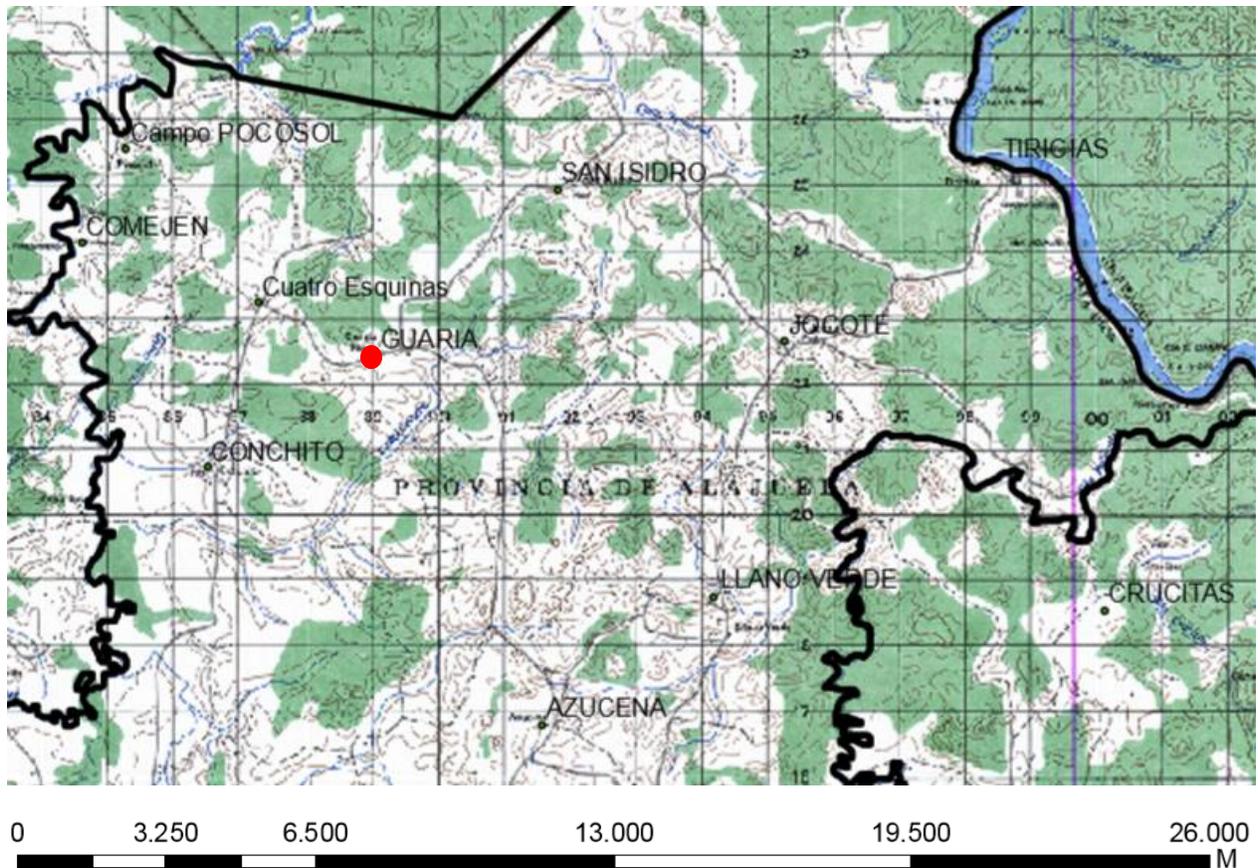


Figura 1. Mapa del distrito de Pocosol de San Carlos, el punto rojo indica el sitio conocido como La Guaria, lugar en donde se encuentran las fincas, escala 1:137.00015.

En la década de 1980, el período de mayor auge en la producción de raicilla, se instalaron varios centros en la región norte del país. Un estudio realizado en el 2007, demuestra que en el distrito de Cutris perteneciente al cantón San Carlos, se encuentra la mayor concentración de cultivos de ipecacuana, de la cual dependen 43 familias¹⁴. Otras áreas donde se cultiva la raicilla son los cantones de Upala, Los Chiles y Guatuso¹⁶.

Entre 1961 y 1985, las exportaciones anuales de raicilla fluctuaron entre 11,5 toneladas y 30 toneladas, con un promedio de 20 ton/año. Desde entonces, el comportamiento en las exportaciones de este producto ha sido oscilante, pero con un patrón de ascenso, para 1988, 1993 y 1996 las exportaciones alcanzaron entre 100 ton/año y 200 ton/año, y para el 2017 la producción llegó a 12,1 toneladas con un valor que representa 1,8 millones de dólares¹⁷. Al igual que las exportaciones, los precios en el mercado también han sufrido considerables aumentos, en 1976 los

precios FOB (Free On Board) cambiaron de \$4,6 a \$38, y en 1980 el precio llegó a alcanzar \$66 por kg¹⁸. El precio entre el 2015 y el 2018, en el mercado costarricense, ha rondado entre \$85 y \$114 por kg, influenciado este valor por la oferta, la demanda y la producción¹⁹. Los mercados principales de este producto son China, Hong Kong, India, Alemania, Bélgica, Inglaterra y Francia, entre otros^{17,20}.

Al determinar el momento idóneo de madurez de la planta para cosecharla se pretende maximizar la producción²¹, y a su vez mejorar el ingreso económico de las familias productoras que es proporcional a la concentración de alcaloides en la raíz seca.

Con este trabajo se pretende establecer los parámetros mínimos para el cultivo óptimo de esta planta en el país y así, suministrar una herramienta más a los productores de ipecacuana de Costa Rica, que les permita superarse. Por tanto, se plantea realizar el estudio de la determinación de la concentración de alcaloides de la raíz de ipecacuana en función del tiempo y determinar el mejor momento de cosecha.

1.2 Marco teórico

1.2.1 Metabolitos extraídos de fuentes naturales

En el siglo XXI, se empezó a gestar un cambio en el uso de productos naturales, hacia la síntesis de análogos de los compuestos de las plantas. Esta ruta fue considerada muy promisoría para el descubrimiento y producción de nuevas drogas. A pesar de estos esfuerzos por sintetizar los compuestos, la utilización de las plantas en la prevención y tratamiento de enfermedades es muy amplia, especialmente en los países en vías de desarrollo²².

La búsqueda de la cura para enfermedades en personas, animales y plantaciones ha motivado el estudio y desarrollo de la química de productos naturales^{22,23}. Sean estas sustancias provenientes de microorganismos, animales vertebrados e invertebrados o plantas. Estas fuentes asemejan pequeñas fábricas bioquímicas especializadas para la biosíntesis de metabolitos, tanto primarios como secundarios.

Los metabolitos secundarios son producidos por muchos microorganismos debido al papel fundamental que tienen a nivel ecológico. Estos metabolitos participan activamente en la interacción de los organismos con el medio que les rodea. Los metabolitos secundarios se

diferencian de los primarios pues su distribución es más restringida en el organismo y en las especies. En las plantas, por ejemplo, estos metabolitos secundarios son de suma importancia para su supervivencia. Los mismos son utilizados como mecanismo de defensa ante posibles depredadores, para atraer especies polinizadoras beneficiosas para la planta, e incluso para contrarrestar infecciones de patógenos microbianos^{22,23,24}.

Entre las funciones de los metabolitos secundarios, pueden señalarse las funciones fisiológicas como sucede con las pectinas que poseen la capacidad de transportar nitrógeno tóxico, así como ciertos compuestos de almacenamiento. Por otro lado, metabolitos como los compuestos fenólicos, en particular los flavonoides, pueden cumplir funciones protectoras contra los rayos ultravioleta²⁵. Por ende, los metabolitos secundarios son una importante fuente de principios activos para medicamentos y productos químicos de gran interés por su alto valor agregado²⁶.

A pesar, que la mayoría de los medicamentos son producidos por síntesis química, sus estructuras están basadas en productos naturales. Por ejemplo, como se muestra en la figura 2, 44% de la producción mundial de nuevos medicamentos es a base de productos naturales, con su respectiva distribución.

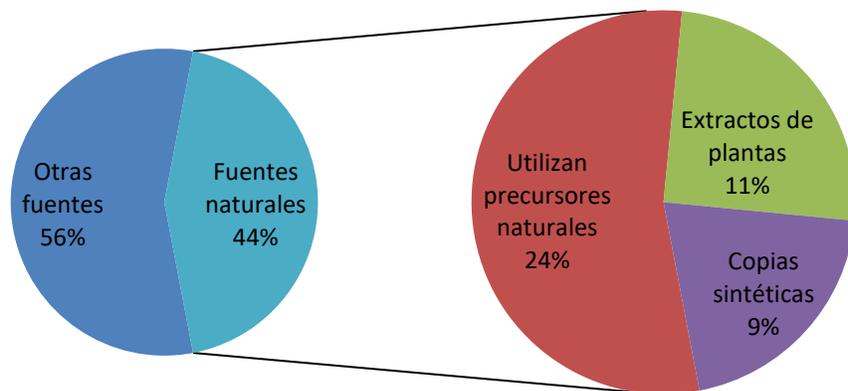


Figura 2. Porcentaje de medicamentos producidos según su fuente²⁷.

Además, cabe mencionar que el 25% de los medicamentos en países desarrollados son derivados de plantas²⁷. Por la importancia de los productos naturales o derivados de estos, abarcan cerca del 60% de los compuestos anticancerígenos y el 75% de los medicamentos para tratar enfermedades infecciosas²⁸.

Por tanto, es de gran interés el desarrollo de metodologías y materiales confiables y efectivos, para el aislamiento y la investigación de los mecanismos de acción en el organismo. Además, para lograr un mayor aprovechamiento de las propiedades farmacológicas (antioxidantes, antiinflamatorias, antibacterianas, anticancerígenas, entre otras) de las sustancias presentes en las plantas²⁹.

1.2.2 Generalidades del género *Carapichea*

El género *Carapichea* pertenece a la familia Rubiaceae, y se puede encontrar en las zonas tropicales. El género *Carapichea* por lo general, está ampliamente distribuido a bajas elevaciones de 0 a 500 metros sobre el nivel del mar, y en algunas excepciones se han encontrado e identificado incluso sobre los 1.570 metros³⁰. La especie *C. ipecacuanha* se ha encontrado principalmente en el bosque lluvioso de Centroamérica desde Nicaragua, Costa Rica y extendiéndose hasta la zona este de Brasil. La distribución geográfica fragmentada, hace que exista una gran diversidad química y genética en las diferentes poblaciones³¹.

La planta, también conocida como raicilla es herbácea, cuenta con un tallo semileñoso, delgado y de forma retorcida, mide entre 20 cm y 30 cm de largo; con flores pequeñas y de inflorescencia terminal. Su fruto es una baya pequeña y carnosa, de coloraciones que van desde anaranjado, rojo, rojo oscuro, azul y púrpura oscuro a negro (figura 3)³⁰.

El rizoma de esta planta es tuberoso y posee una envoltura arrugada y áspera de alrededor de un centímetro de grosor y unos veinte centímetros de longitud, el cual una vez que se cosecha tiende a perder gran parte de su grosor y peso en agua, pero mantiene su característica forma anillada y retorcida (figura 3).

La ipecacuana resiste poco la luz solar directa (alta intensidad luminosa), y es por esto considerada una planta esciófita, este motivo hace que los cultivadores hagan uso de plantas que den sombra para protegerlas o estructuras creadas con este fin, además requieren temperaturas cálidas y una humedad relativa alta, por ejemplo en el bosque y debajo de plantaciones de cacao¹⁸.



Figura 3. Foto de una plantación, de una planta y de la raíz de ipecacuanha en proceso de secado, la raíz es la parte de la planta en donde se acumulan los alcaloides y es la parte que se comercializa (fuente propia).

1.2.3 Alcaloides

Estos metabolitos pueden ser clasificados como alcaloides verdaderos y alcaloides falsos o pseudoalcaloides, los verdaderos tienen que cumplir con la característica de contener al menos un átomo de nitrógeno dentro de su estructura de anillos. Generalmente la estructura molecular del compuesto es compleja con al menos un átomo de nitrógeno básico, son fisiológicamente activos, y la fuente de procedencia puede ser vegetal o animal, siendo ésta última la menos común¹¹.

Recientemente se han hecho algunas excepciones a las reglas donde se han incluido compuestos donde el átomo de nitrógeno forma parte de una amida, ejemplo de esto es la figura 4.

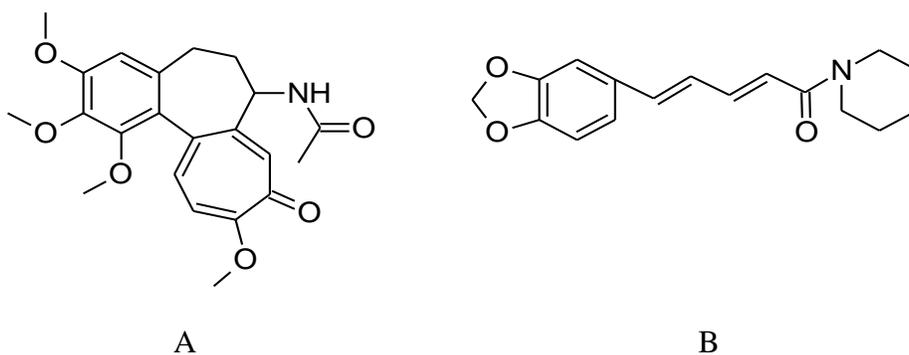


Figura 4. Estructura química de los alcaloides colchicina (A) y piperina (B)³².

Se estima que en la familia de la especie *C. ipecacuanha*, el 15% contiene alcaloides. Particularmente en las Rubiaceae (~450 alcaloides), y se ha estimado que las principales fuentes de alcaloides se encuentran en las semillas, hojas o la corteza y la raíz¹¹.

Al considerar que las plantas son un organismo en crecimiento, tanto la edad como la localización (tipo de suelo y clima) son factores que afectan el contenido total y relativo de alcaloides, por ello se deben tomar en cuenta para el cultivo y cosecha estos factores²¹.

Los alcaloides por su gran variedad de estructuras y su naturaleza básica pueden estar en las plantas en varias formas, tales como sales de ácidos orgánicos. Algunas piridinas básicas pueden encontrarse en estado libre. Algunos pocos alcaloides se encuentran unidos a un azúcar simple como glucosa, ramnosa o galactosa en forma de glucósidos. En otros casos pueden presentarse en forma de ésteres de ácidos orgánicos, sales cuaternarias, óxidos de aminas terciarias y amidas²³.

No se ha determinado con exactitud la función específica que los alcaloides cumplen en las plantas. Sin embargo, diferentes opiniones consideran que estos cubren ciertas funciones como; agentes venenosos protectores de la planta contra depredadores o patógenos y productos de desintoxicación. Algunas funciones inclusive son reserva de nutrientes, factores de crecimiento y subproducto de su metabolismo^{11,23}.

Los alcaloides se pueden clasificar de varias maneras, una de ellas es de acuerdo con su origen biosintético, el cual toma en cuenta los tipos de compuestos precursores usados por los organismos para la síntesis de compuestos mucho más complejos. Un ejemplo de la clasificación anterior es el caso de alcaloides indólicos complejos que derivan del triptófano. Otra forma de clasificarlos es respecto a su uso farmacológico. Esta clasificación se basa en la actividad farmacológica que posee el alcaloide, ya sea, que cumple una función como analgésico, cardiovascular, antitumoral, entre otros. La clasificación según la taxonomía es aquella que considera solo la fuente de donde proviene el compuesto, sin tomar en cuenta su naturaleza química. Finalmente, según su estructura química, en particular de acuerdo con las características cíclicas del anillo. Algunos ejemplos de estructuras químicas son los mostrados en la figura 5²³.

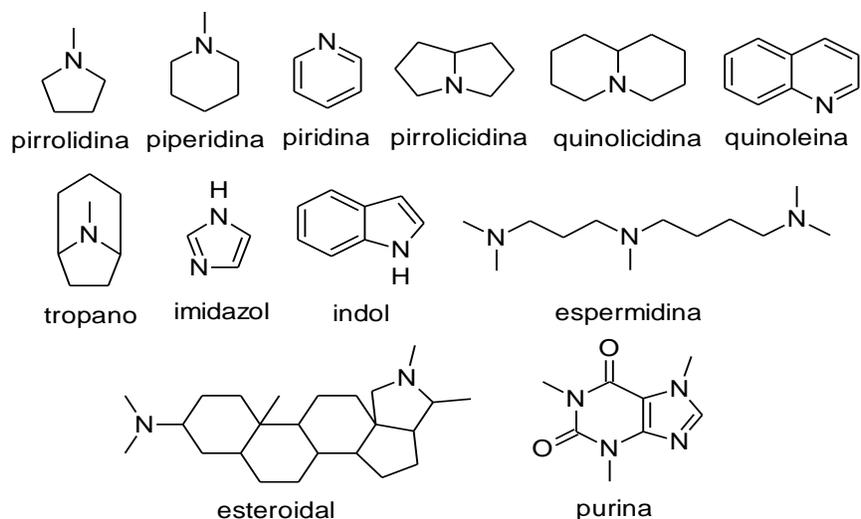


Figura 5. Núcleos de algunos alcaloides característicos¹¹.

Los alcaloides que produce la raíz de ipecacuana han sido reconocidos como medicinales en el conocimiento tradicional¹². Han sido utilizados como un eficaz emético, expectorante, amebicida, diaforético y contra la disentería amebiana causada por *E. histolytica*⁹. Según otras fuentes, además, combate la bronquitis, lombrices intestinales, leucemia, desordenes en la sangre, cáncer y alivia el malestar en los niños cuando les comienza a salir los dientes^{6,7}. Estas propiedades mencionadas anteriormente se atribuyen a los alcaloides emetina, cefaelina, psicotrina, emetamina y éter metílico de psicotrina, que corresponden al contenido total de alcaloides (2% a 2,5%) en este tipo de planta. La emetina es el componente bioactivo encontrado en mayor proporción (60% a 70% de los alcaloides totales), seguido por la cefaelina (25% de los AT), y los demás antes mencionados en menor proporción¹¹. La estructura de ambos alcaloides se muestra en la figura 6.

La emetina actúa inhibiendo las actividades y síntesis de las proteínas, del ADN y ARN ribosomales y mitocondriales, determinado según algunos ensayos realizados en células de mamífero, levaduras y vegetales³³. En otra fuente se reportó que la emetina posee actividad antiviral significativa contra el virus del dengue³⁴.

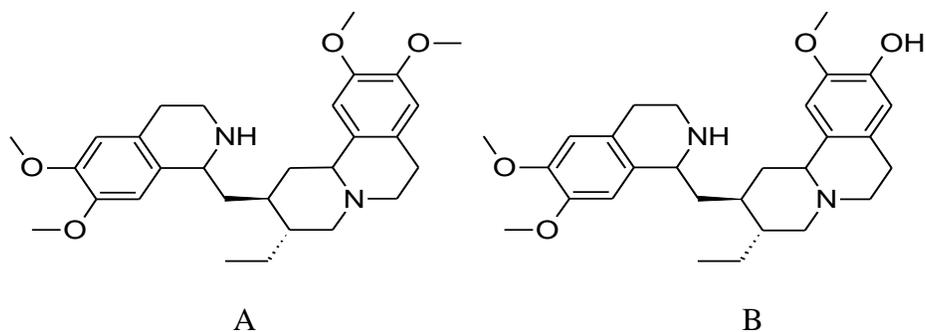


Figura 6. Estructura química de los alcaloides emetina (A) y cefaelina (B), presentes en la raíz de ipecacuana³².

1.2.3.1 Propiedades físicas y químicas de los alcaloides

Los alcaloides son en su mayoría sólidos cristalinos incoloros no volátiles, aunque existen algunos alcaloides que son coloreados como la berberina con coloración amarilla. La mayoría son insolubles en agua, a excepción de la nicotina, pero solubles en solventes orgánicos polares como metanol, cloroformo, éter, entre otros. Se caracterizan por su sabor amargo y su actividad óptica que les permite ser diferenciados en mezclas racémicas²³.

Los alcaloides al ser básicos forman sales con los ácidos inorgánicos. De esta manera ganan solubilidad en solventes polares, y caso contrario en solventes orgánicos no polares. Conocer estas propiedades permite variar su solubilidad para aislarlos.

Los alcaloides al reaccionar con ciertos compuestos (soluciones de ácido molíbdico, pícrico, y otros) forman precipitados coloreados. Para su detección pueden usarse ciertos reactivos especiales, como el de Mayer (ioduro de mercurio y potasio), Wagner (iodo disuelto en ioduro de potasio), Dragendorff (ioduro de bismuto y potasio), Hager (solución saturada de ácido pícrico en agua), ácido cloroplátinico (H_2PtCl_6), reactivo de Frohde (ácido molíbdico), por mencionar algunos. El precipitado obtenido en las reacciones anteriores puede ser cristalino o amorfo y con variedad de colores. Ejemplos de colores en los precipitados son crema (Meyer), amarillo (Hager) y rojizo-rosáceo-marrón (Wagner y Dragendorff). Existen algunas excepciones como la cafeína y otros alcaloides que no presentan precipitados como los descritos anteriormente^{11,23}.

Los efectos de los alcaloides en el organismo son muy variados a nivel celular, algunos pueden afectar el sistema nervioso central, otros la síntesis de proteínas, el transporte de membrana e

incluso la actividad enzimática³⁵, debido a la alta variedad de actividades biológicas de casi 12000 alcaloides, es que son utilizados en narcóticos, productos farmacéuticos y venenos³⁶. Entre los ejemplos de alcaloides con usos medicinales que se han aislado de plantas y se han utilizado extensivamente en todo el mundo destacan vincristina, vinblastina y camptotecina que son utilizados como anticancerígenos; colchicina como supresor de gota; morfina y codeína como analgésicos; y escopolamina como sedante³⁷.

1.2.4 Patógenos y su relación con ESKAPE

Existe una alta incidencia de casos de pacientes que contraen infecciones nosocomiales o intrahospitalarias, causadas por una gran diversidad de organismos, entre ellos se pueden citar: bacterias, hongos, parásitos, virus, u otros agentes. Esta categoría se refiere a las infecciones contraídas debido al ingreso a instalaciones médicas o entrar en contacto con personal relacionado, pudiendo existir así fuentes de contagio exógenas y endógenas, dependiendo si el contacto fuese directo o indirecto con la fuente (pacientes, objetos contaminados, visitantes o inclusive diversas fuentes ambientales)^{38,39}.

Un estudio realizado en Estados Unidos de Norte América en el año 2011 por Magill. S. S. y colaboradores reveló que es un asunto de suma importancia con más de 721.000 casos reportados de pacientes que sufren por este tipo de afecciones médicas y cerca de 99.000 muertes asociadas⁴⁰.

La palabra ESKAPE es el acrónimo para el grupo de bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas que representan un problema sanitario el cual también se ve reflejado en un alto costo económico a nivel mundial. Este grupo está compuesto por las especies *Enterobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterococcus faecium*, y se caracteriza por la resistencia que han adquirido ante los antibióticos comúnmente utilizados, incluyendo efectos como alta mortalidad, incertidumbre al momento del diagnóstico y elevación en los costos de tratamientos infecciosos, lo que conlleva a la desconfianza en los métodos ortodoxos y en la búsqueda de nuevas alternativas, entre ellas la medicina natural.

1.2.4.1 Mecanismos de resistencia de los patógenos ESKAPE

Existen múltiples mecanismos de acción que poseen los microorganismos para contrarrestar los efectos de los antibióticos. Ya sea mediante genes en alguna de sus zonas como por ejemplo en el cromosoma, plásmidos o transposones que les otorgan resistencia; o mediante mecanismos de resistencia a drogas. De los anteriormente mencionados se pueden citar: **1)** alteración o inactivación de la droga, un ejemplo es la producción de enzimas como la β -lactamasa, que modifican irreversiblemente los antibióticos y los inactivan, en este caso los genes que codifican este tipo de enzimas poseen una alta tasa de mutación, lo cual genera una gran diversidad de estas enzimas, que se traduce en un aumento en la resistencia a antibióticos⁴¹; **2)** modificación de los sitios de unión, mediante la alteración de las enzimas ligadas a la membrana la célula obtiene una baja afinidad hacia los antibióticos β -lactámicos, como es el caso de *S. aureus*, por mencionar un ejemplo⁴². **3)** reducción de concentración intracelular, la susceptibilidad de un microorganismo por cierta sustancia en particular, está determinada por el balance que existe entre la entrada y salida de dicha sustancia, para disminuir dicha susceptibilidad las bacterias han desarrollado ciertos medios, como por ejemplo la pérdida de moléculas de antibiótico por medio de porinas especializadas, que son canales que comunican el interior de la célula con el exterior, otro medio para la excreción de sustancias son las bombas de expulsión activa, que mediante una acción similar a las porinas eliminan los antibióticos que se acumula en el compartimento intracelular⁴³. **4)** formación de una biopelícula, está formada por polisacáridos, proteínas, lípidos, entre otras sustancias generadas por las bacterias, la matriz dentro de la biopelícula le otorga a las bacterias un extra de protección mecánica y bioquímica, generando las condiciones que atenúan el accionar de los antibióticos (baja disponibilidad de agua, oxígeno, pH bajo, acumulación de dióxido de carbono), este proceso está dividido en tres pasos, adhesión, crecimiento/maduración y desacople⁴⁴.

1.2.5 Generalidades de la actividad antibiótica

Un antibiótico es una sustancia química producida por un microorganismo. Los antibióticos tienen la capacidad de inhibir el desarrollo de otros microorganismos en su entorno. Los antibióticos a pesar de haber sido parcialmente modificados químicamente siguen siendo considerados como tales⁴⁵. Un agente antimicrobiano puede proceder de fuentes naturales como microorganismos o de una síntesis de laboratorio⁴⁶.

Existen dos grandes grupos en los cuales se pueden categorizar los antibióticos, ya sea por su capacidad de inhibir el crecimiento microbiano, llamados bacteriostáticos; o por su capacidad de matar a los microorganismos que se encuentren presentes en su medio, conocidos como bactericidas. Estos últimos tienen la capacidad de ejercer una acción irreversible y letal sobre los microorganismos que le rodean, ejemplo de estos son fosfomicida, rifampicina, quinoleínas, vancomicina, entre muchos otros. Por el otro lado los bacteriostáticos no matan a los microorganismos, sino que inhiben su crecimiento, por tanto, al impedir su reproducción terminan muriendo. Este efecto menos drástico permite que el huésped con sus propias defensas combata y elimine a los microorganismos invasores, como por ejemplo la tetraciclina y el cloranfenicol, entre otros^{47,48}.

1.2.5.1 Medición de la actividad antibiótica por el método del halo de inhibición

Existen múltiples métodos para medir la sensibilidad bacteriana ante los antibióticos, cada uno de ellos con sus respectivas variantes. Sin importar el método elegido, lo que se mantiene sin variación son las características del medio de cultivo^{49,50}. Este medio debe permitir el desarrollo óptimo de aquellos microorganismos a los cuales se les quiere determinar su sensibilidad bacteriana. Además el medio no debe tener efecto inhibitorio alguno sobre la actividad antibacteriana de los antibióticos utilizados⁴⁵.

El método de disco de papel es uno de los más populares, sin embargo, con la variante del método de Kirby-Bauer en donde se perforan unos pocillos equidistantes en el medio de cultivo para inocular muestra, controles positivo y negativo, se mejora la difusividad de la muestra en el medio⁵¹. En esta variante se propone utilizar una concentración fija de antibiótico y medir el diámetro del halo de inhibición formado. Con esta medición, se pretende comparar el tamaño del halo del antibiótico con el tamaño del halo formado por cada uno de los extractos de la muestra. Finalmente, obtener un porcentaje que representa la relación entre la zona de inhibición de la muestra y la zona de inhibición del antibiótico⁴⁷.

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer la variabilidad en la concentración de los alcaloides emetina, cefaelina y totales, presentes en la raíz de *C. ipecacuanha* en diferentes estados de maduración, con la finalidad de optimizar el tiempo de cosecha y su potencial actividad antibiótica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar las condiciones de preparación de la raíz de *C. ipecacuanha* para una extracción eficiente de la emetina, cefaelina y alcaloides totales.
2. Evaluar la concentración de la emetina, cefaelina y alcaloides totales presentes en *C. ipecacuanha* en seis estados de maduración, empleando los métodos de UHPLC y ácido-base, como parámetro relevante en la elección del mejor tiempo de cosecha.
3. Caracterizar la actividad antibiótica del extracto crudo de la raíz de *C. ipecacuanha* sobre las bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii* y *Klebsiella pneumoniae* como estrategia para la búsqueda de antibióticos de origen natural.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1 Preparación de las muestras

Las muestras de raíz de *C. ipecacuanha* en seis estados de maduración, fueron muestreadas en intervalos de mes y medio aproximadamente, mediante un muestreo aleatorio y dependiente de la existencia, pues todo el material vegetal fue una contribución gratuita por parte de los productores colaboradores interesados en el análisis, a partir de plantas de un año de siembra o “edad”. Las plantas cosechadas son procedentes de dos fincas ubicadas en La Guaria de Pocosol de San Carlos.

Las raíces, la parte utilizada de la planta se limpiaron de residuos de suelo y separaron en dos grupos para proceder a su respectivo secado. Un grupo fue secado al horno a una temperatura aproximada de 40°C durante cuatro días; y el otro grupo al sol, durante el mismo periodo de tiempo, hasta que la humedad de las raíces fuera lo suficientemente baja para que se quebraran con facilidad (debido a que este es el método utilizado por los agricultores para determinar el secado óptimo), este tiempo de secado fue solamente en horas de sol y sombra, antes de llover se recogían. Las muestras fueron resguardadas en el laboratorio durante las noches.

Luego de la etapa de secado, las muestras fueron molidas en un molino de cuchillas Thomas Wiley con un tamiz de 1 mm. Finalmente, las muestras se almacenaron dentro de un refrigerador a 4°C, hasta que fueron analizadas para determinar si hubo diferencia en la concentración del contenido de alcaloides a causa de los métodos de secado seleccionados.

3.2 Determinación del contenido de alcaloides totales presentes en la raíz de *C. ipecacuanha*, empleando el método ácido-base

Se analizaron seis muestreos de raíz de *C. ipecacuanha* con un intervalo aproximado a los 45 días cada uno, con el objetivo de determinar el momento de mayor concentración de alcaloides y evaluar el efecto del método de secado sobre la concentración de estos.

En un erlenmeyer de 125 mL se adicionó la masa de 3,75 g aproximadamente de raíz de *C. ipecacuanha* finamente molida (1 mm), se agregó 50 mL de éter etílico (en adelante llamado éter) y luego fue agitado durante cinco minutos en agitador orbital a 400 rpm. Luego de la agitación, se agregó 2,5 mL de hidróxido de amonio diluido (6 N) y se agitó durante una hora en un agitador orbital a 400 rpm.

Terminada la agitación, se agregó 2,5 mL agua y se agitaron enérgicamente los erlenmeyers de manera alternada de forma tal que todos fueron bien agitados al menos tres veces. Se dejaron en reposo por unos minutos y se transfirió la parte etérea (superior) a un erlenmeyer de 125 mL empleando un embudo mediano de espiga corta y algodón como filtro (el filtro lo más pequeño y homogéneo posible). El residuo fue lavado dos veces con 15 mL de éter, se filtró y el segundo filtrado fue más exhaustivo logrando filtrar todo el éter, al final se lavó el embudo con 5 mL de éter para lograr una filtración cuantitativa.

Combinadas las fases etéreas, estas se evaporaron hasta sequedad utilizando un baño maría en una capilla de extracción de gases. Se disolvió el residuo en 2,5 mL de etanol al 97% v/v, calentado levemente hasta disolución completa y en el baño maría levemente y se agregaron 7,5 mL de disolución de ácido sulfúrico 0,1 N.

La cuantificación del contenido de alcaloides totales se llevó a cabo mediante una titulación ácido-base por retroceso, en donde se empleó una base fuerte (NaOH) 0,1 N para neutralizar el exceso de ácido fuerte (H_2SO_4) 0,1 N adicionado al extracto de la muestra de ipecacuana extraído con éter. Para esto se adicionó a la disolución anterior 15 mL de agua destilada, cinco gotas de indicador, compuesto de una mezcla de 100 mg de rojo de metilo y 50 mg de azul de metileno en 100 mL de etanol al 97% v/v, se hicieron lavados a la pared del erlenmeyer para no tener muestra ni indicador que pudiera no haber sido valorada, el punto final se observa al cambiar el indicador de rojizo a verde-amarillo. Cada mililitro de ácido sulfúrico 0,1 N equivale a 24,03 mg de alcaloides totales, calculados como emetina^{52,53}.

3.3 Determinación del número óptimo de extracciones de la muestra para la cuantificación de alcaloides, empleando el método de UHPLC

El método utilizado en el apartado anterior fue modificado para ser utilizado en la cuantificación de emetina y cefaelina empleando el método cromatográfico de UHPLC. Para esto se procedió a determinar el número óptimo de extracciones de la muestra. Se realizaron por triplicado la serie de extracciones de 2 mL de éter etílico y 0.5 mL de amoníaco 6N (la base se adiciona una única vez) sobre 0,1 g de las muestras hasta obtener un volumen máximo de 10 mL, es decir, este proceso se realizó de una a cinco veces con diferentes muestras. El volumen final se almacenó en un balón

aforado de 10 mL. Para su análisis, una alícuota de 1 mL fue evaporada a sequedad y reconstituida con igual volumen de metanol^{54,55,56}.

Para la prueba del número óptimo de extracciones de la muestra se midió la concentración de los alcaloides empleando la técnica cromatográfica de UHPLC y la serie de datos obtenidos fueron analizados mediante el programa estadístico Minitab, considerando una significancia de 0,05. Se realizó la prueba ANOVA a los datos con más de dos variables para evaluar los diferentes factores que se tomaron en cuenta para el análisis y la obtención de los diferentes resultados que respondieran las incógnitas⁵⁷.

3.4 Caracterización de alcaloides por cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC)

Los solventes requeridos para las extracciones fueron grado analítico; y para los análisis en UHPLC, de grado HPLC, metanol, acetonitrilo, ácido tricloroacético y etanol; el agua utilizada fue provista por un sistema Milli-Q, y el éter utilizado para las extracciones fue de grado para análisis.

Se utilizó un UHPLC marca Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 acoplado a varios módulos, bomba con desgasificador modelo LPG-3400RS, auto muestreador modelo WPS-3000RS, detector de arreglo de diodos modelo DAD-3000RS y el compartimiento con control de temperatura para la columna modelo TCC-3000RS. La metodología utilizada fue la descrita por Han Gui-ru y colaboradores⁵⁸, con algunas modificaciones. La columna que se utilizó fue una C18 (Thermo Scientific™ Acclaim™ 120) analítica, con un tamaño de (250 x 4,6) mm y 5 µm de tamaño de partícula, equivalente a la descrita por la metodología.

De las muestras molidas de raíz de *C. ipecacuanha* se tomó 0,1 g en un tubo de ensayo con tapa y se le adicionó 3 mL de éter y 500 µL de disolución de amoníaco 6 N (adición única). Luego el tubo se colocó en un baño ultrasónico por 10 min. Se centrifugó el tubo durante 15 min a 2200 rpm y el líquido sobrenadante fue removido a un balón aforado de 10 mL con la ayuda de una pipeta Pasteur, el proceso de extracción se repitió varias veces (ver resultados) y el volumen del balón llevado a la marca de aforo con éter. Las extracciones se realizaron por triplicado. Finalmente se tomó una alícuota de 1 mL de la disolución del balón a un vial de HPLC y se evaporó a sequedad. El sólido fue reconstituido con 1 mL de metanol para realizar las corridas en el cromatógrafo.

La fase móvil estuvo compuesta por agua acidificada al 0,08% con ácido trifluoroacético, y acetonitrilo, en una elución en gradiente (ver Tabla 1), con un flujo de 0,6 mL/min.

Tabla 1. Gradiente propuesto en la separación de los alcaloides presentes en la raíz de *C. ipecacuanha*, empleando el método de UHPLC.

Tiempo (min.)	Flujo (mL/min.)	Agua (%)	Acetonitrilo (%)
0,000	0,6	100	0
0,50	0,6	90	10
1,25	0,6	80	20
2,50	0,6	50	50
3,75	0,6	30	70
4,00	0,3	20	80
4,50	0,3	100	0
6,00	0,3	100	0
6,50	0,6	100	0
7,00	0,6	100	0

El efluente de salida fue analizado por un detector de arreglo de diodos, a una longitud de onda de 285 nm (ver figura 7); la temperatura de la columna se estableció en 40 °C, la cantidad de muestra inyectada fue de 5 µL y la duración de la corrida fue de 7 minutos⁵⁸.

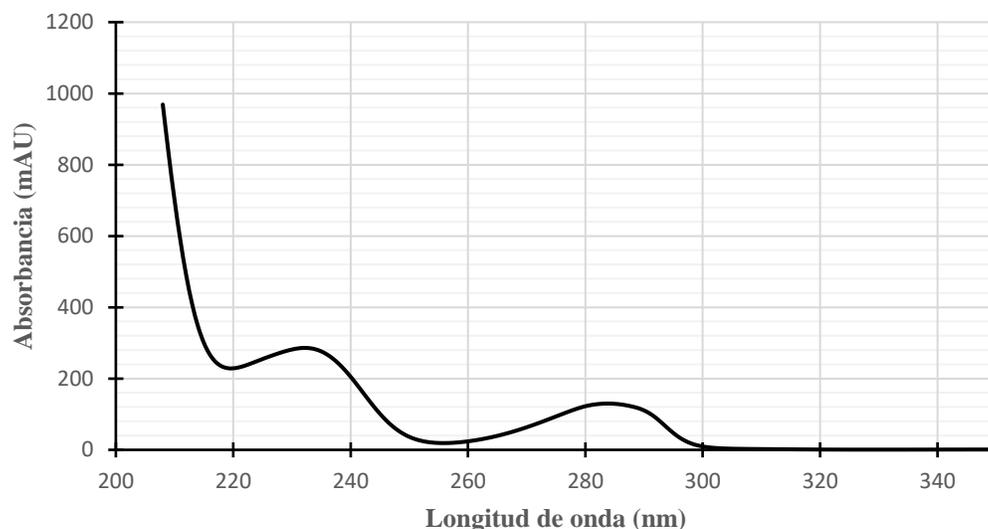


Figura 7. Espectro de absorción de 210 a 350 nm del alcaloide cefaelina, presente en la raíz de la *C. ipecacuanha*.

3.5 Evaluación de la actividad antibiótica de los extractos de alcaloides de *C. ipecacuanha* empleando el método de Kirby-Bauer modificado

Se empleó el método de Kirby-Bauer conocido comúnmente como ensayo del halo de inhibición. En esta prueba se utilizaron placas Petri con agar Müller Hinton como medio de cultivo y las bacterias seleccionadas fueron las del grupo ESKAPE. Fueron unas cepas específicas, cuatro Gram Negativas, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Acinetobacter Baumannii* ATCC 19606, *Klebsiella Pneumoniae* ATCC 13883, y dos Gram Positivas, *Enterococcus Faecium* ATCC 6056, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, las cuales son patógenas para los humanos y crean resistencia con gran facilidad⁵⁹, en donde *E. coli* fue la representante del grupo de las Enterobacterias³⁸.

Se prepararon 5,5 L de medio conteniendo 38 g de agar Müller Hinton por litro de agua destilada. Luego de homogenizado todo el medio, se procedió al trasvase a tubos de ensayo, depositando 30 mL en cada uno. Éstos se esterilizaron durante 15 min a 121 °C y 15 libras de presión y posteriormente se vertió el medio en placas Petri de 94 x16 mm para obtener un grosor de medio de 4 mm. Luego de estar tanto medio como instrumentos esterilizados, se procedió con el estudio de la actividad antibiótica⁶⁰.

Para la inoculación de las bacterias seleccionadas, se preparó la concentración de los microorganismos a 0,5 en la escala de McFarlan ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL)⁶¹. Para esto, se utilizó 1 mL de solución salina estéril al 0,85 % de cloruro de sodio, se resuspendieron las colonias necesarias utilizando un asa bacteriológica, mediante el raspado del cultivo del microorganismo de interés, y se homogenizó la nueva disolución hasta obtener la concentración deseada. La concentración se confirmó con el equipo DensiCHEK plus de la marca BIOMÉRIEUX. Posteriormente, se vertió una alícuota de 100 μ L de la disolución de bacterias a cada una de las placas Petri, dicha disolución se homogenizó con todo el medio agitando las placas en forma de 8 y se dejó solidificar dentro de la cámara de flujo laminar para realizar las perforaciones al medio.

La preparación de las muestras consistió en medir 60 mg de cada muestra (extractos) a evaluar y se disolvió en 1 mL de metanol, de esta disolución se tomó una alícuota de 50 μ L y se depositó dentro del pocillo realizado en el medio. Se empleó penicilina estreptomycin (1000 μ g/mL) como control positivo y metanol como control negativo en un pocillo. El análisis fue realizado por triplicado. Un ejemplo del halo de inhibición formado, en este caso el cloranfenicol en un cultivo de la bacteria *P. aeruginosa* se muestra en la siguiente figura.



Figura 8. Halo de inhibición de crecimiento producido por el cloranfenicol en cultivo de la bacteria *P. aeruginosa* (fuente propia).

Posterior al paso de llenado de los pocillos, las placas se invirtieron y se colocaron dentro de una incubadora durante 18 h a 37 °C⁶². Transcurrido el tiempo de incubación, las placas fueron

inspeccionadas en busca de los halos de inhibición formados, y la actividad antibiótica se cuantificó mediante la fórmula siguiente:

$$\%PRDZI = \frac{\text{DZI muestra} - \text{DZI control negativo}}{\text{DZI control positivo}} * 100\%$$

Donde %PRDZI es el porcentaje relativo del diámetro del área de inhibición, y DZI es el diámetro del área de inhibición. Dicha fórmula permite establecer una relación entre la muestra evaluada y el antibiótico utilizado como control positivo para el halo de inhibición del crecimiento microbiano⁶¹.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Determinación del contenido de alcaloides totales presentes en la raíz de *C. ipecacuanha*, empleando el método ácido-base.

Las plantas de *C. ipecacuanha* se empezaron a muestrear aleatoriamente en intervalos de mes y medio aproximadamente desde que tenían un año de haberse sembrado por lo que al observar la figura 9, se aprecia que el tercer muestreo genera la mayor concentración de alcaloides totales en la muestra. Estos resultados nos indican que el momento óptimo de cosecha de las plantas de *C. ipecacuanha* es aproximadamente a los 16,5 meses de edad.

Las letras en la figura 9 representan el análisis estadístico realizado, letras diferentes indican valores diferentes, en caso contrario, los valores serán iguales, con la salvedad que estos datos son no paramétricos, y se utilizó la desviación estándar para expresar las barras de error.

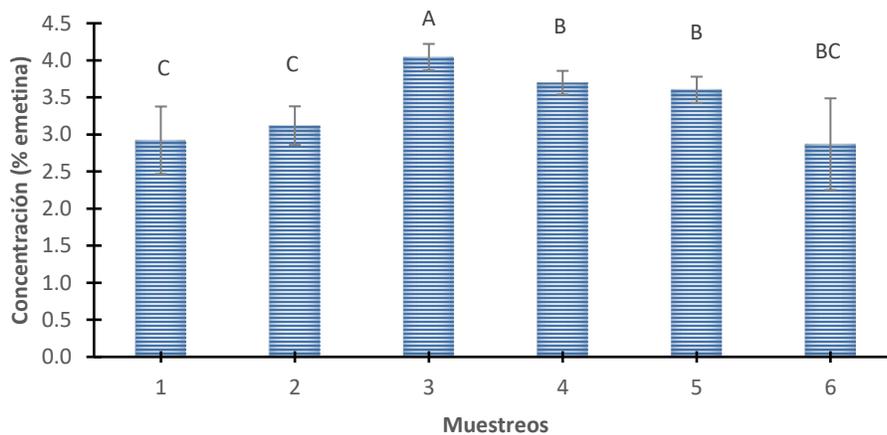


Figura 9. Resultados del contenido de alcaloides totales solubles en éter, mediante el método ácido-base y expresados como porcentaje de emetina.

Como se observa en la figura anterior y según la estadística de Kruskal-Wallis se determinó que hay diferencia entre los muestreos, resaltando así el tercer muestreo como el momento de mayor concentración de alcaloides. En Costa Rica la raicilla seca se exporta a Europa, la cual es pagada por el contenido de alcaloides. Aquellas muestras con un contenido de alcaloides totales iguales o superiores al 3% como emetina se considera de buena calidad para su exportación, por lo tanto y

de acuerdo con la figura anterior, del segundo muestreo y hasta el quinto, se consideran momentos óptimos para su cosecha, siendo el tercer muestreo el momento donde el contenido de alcaloides totales expresados como emetina se obtiene el valor más elevado.

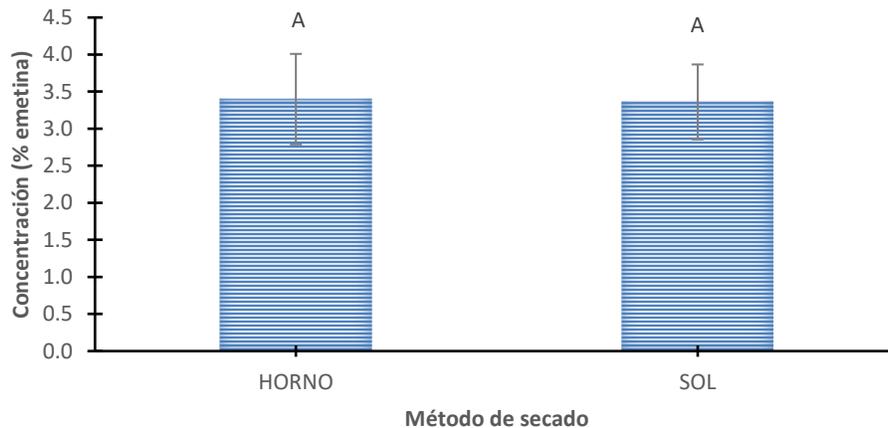


Figura 10. Resultados de los promedio de los seis muestreos de la comparación del método de secado (horno y sol) sobre la concentración de los alcaloides totales solubles en éter mediante el método ácido-base, expresado en porcentaje de emetina.

Los resultados mostrados en la figura anterior evidencian que el método de secado utilizado no tiene efecto significativo sobre la concentración de alcaloides totales solubles en éter, pues la prueba de Kruskal-Wallis efectuada y representada con letras sobre las barras demuestra que ambos valores no difieren uno de otro, estadísticamente hablando. Por lo que el método de secado que brinda mejores resultados en términos económicos, tomando en cuenta la relación requerimientos energéticos/porcentaje de alcaloides, es el método de secado al sol.

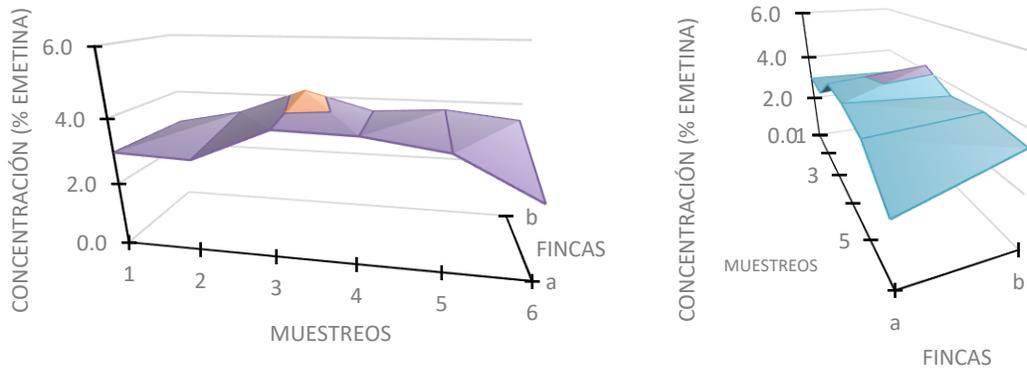


Figura 11. Resultados de la variación en la concentración de los alcaloides totales solubles en éter mediante el método ácido-base durante los muestreos realizados, comparando ambas fincas, expresado en porcentaje de emetina.

Al comparar las medianas de la concentración de alcaloides de los seis muestreos, respecto al método de secado, entre fincas, se obtuvo que no hay una diferencia significativa tal como se observa en la figura 10, datos que permiten caracterizar mejor así el biotipo de raicilla de la región en estudio. Dicho análisis muestra un punto de vista que proporciona información valiosa, que se transforma en una herramienta útil para los productores, de tal manera que puedan hacer las comparaciones y correcciones necesarias con miras en aumentar sus rendimientos; así como también poder presentar una visión general hacia el mercado consumidor de raicilla y la denotación de concentración promedio de la zona.

De igual manera, se puede notar en la figura 11 como en ambas fincas el máximo de concentración se encuentra en el tercer muestreo (febrero), según la literatura se ha encontrado una relación entre las características del suelo y el contenido de metabolitos secundarios⁶³, se puede pensar en una posible relación entre la época del año y la concentración de alcaloides, debido a que el suelo y sus características propias se pueden modificar al pasar de una estación a otra, debido a las alteraciones en los niveles de humedad y concentración en el sustrato que puedan surgir.

4.2 Determinación del número óptimo de extracciones de emetina y cefaelina, presentes en las muestras de raíz de ipecacuana, para su cuantificación por UHPLC.

Basados en el método anterior para alcaloides totales, se procedió a modificarlo con el fin de convertirlo en un método cuantitativo y exclusivo para los alcaloides emetina y cefaelina. Para esto se procedió a determinar el número óptimo de extracciones necesarias para una extracción cuantitativa de los alcaloides, mediante una serie de extracciones continuas, hasta completar una serie de cinco extracciones, que nos permitiera obtener estadísticamente el número óptimo de extracciones de la muestra. A continuación, se observan los resultados obtenidos en una figura de barras, en donde cada una representa el número de extracciones realizadas sobre la muestra y es el promedio de tres repeticiones.

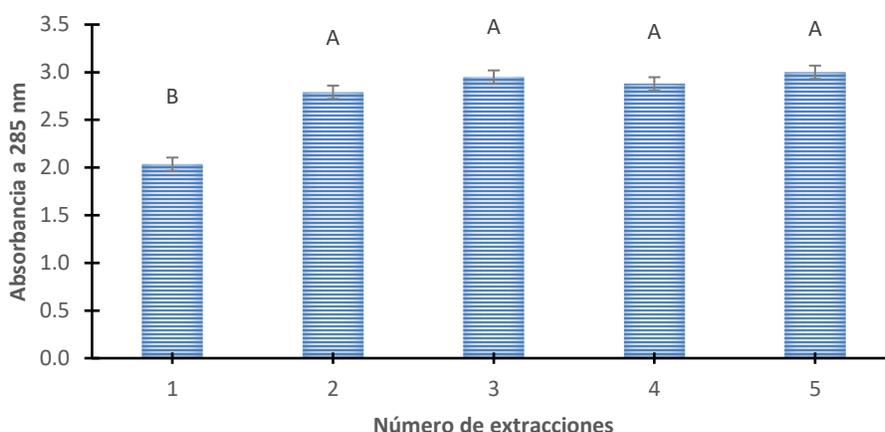


Figura 12. Resultados de la prueba del número de extracciones de emetina y cefaelina presentes en la raíz de *C. ipecacuana* utilizando éter etílico como disolvente. Las letras diferentes sobre las columnas significa que las extracciones son estadísticamente diferentes según la prueba de Tukey ($P \leq 0,05$).

Los resultados de la prueba de Tukey con un 95% de confianza se representan en la figura 12 mediante el uso de letras. En esta prueba se representan los valores estadísticamente distintos con letras distintas sobre las columnas, en caso contrario con letras iguales. Cada columna representa una serie de extracciones sobre la misma muestra, como se observa, se obtuvo que a partir de la

segunda extracción las letras son iguales, lo que significa que no hay diferencia estadística significativa a partir de la segunda extracción de la muestra.

Tomando en cuenta la información estadística de la prueba anterior, muestra que dos extracciones de la muestra de ipecacuana serían suficientes para el análisis emetina y cefaelina; sin embargo, por recomendación se decidió que tres extracciones de la muestra serían mejor para asegurar una extracción cuantitativa de los alcaloides presentes.

Haciendo mención de la extracción cuantitativa de los metabolitos y su importancia en los análisis, cabe mencionar que como factores adicionales para dicho cometido, se encuentran las características del disolvente, tamaño de partícula de la muestra, tiempo de contacto entre muestra y disolvente, y no por último menos importante el uso del baño ultrasónico y su efecto destructivo sobre las paredes celulares, lo que asegura que el proceso de extracción de metabolitos secundarios sea lo más efectivo posible en términos de tiempo y cantidad de disolvente a emplear⁶⁴.

4.3 Caracterización del contenido de alcaloides empleando la técnica de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC)

Se realizó la cuantificación de los alcaloides mediante el uso del software del UHPLC, el cual midió el área total del pico de la muestra correspondiente a los alcaloides, identificados utilizando un patrón de ambos alcaloides tomando en cuenta el tiempo de retención. En las figuras 13 y 14 se muestran los cromatogramas correspondientes a la muestra y el patrón, se puede observar cómo los tiempos de retención corresponden en ambos casos, con las variaciones esperadas al estar en una matriz más compleja.

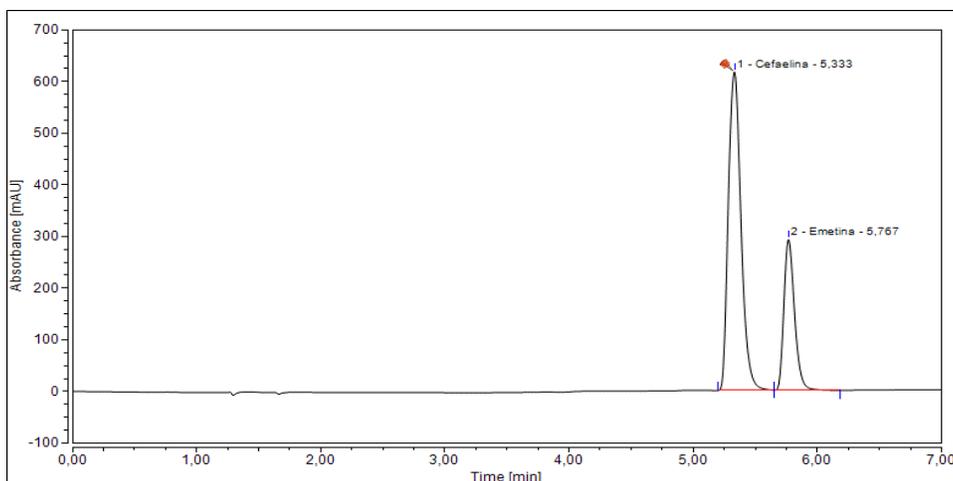


Figura 13. Cromatograma de UHPLC en fase reversa correspondiente al patrón de los alcaloides cefaelina y emetina, detectados a 285 nm.

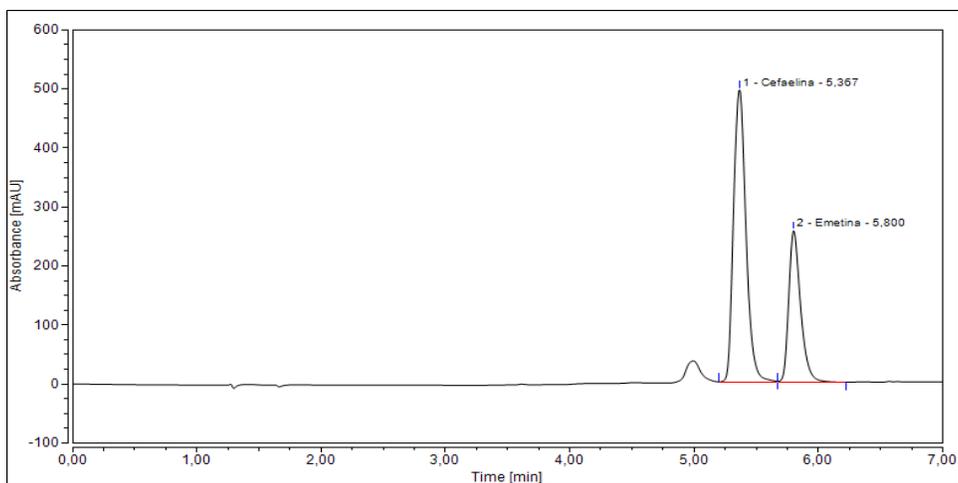


Figura 14. Cromatograma en fase reversa de UHPLC correspondiente a los dos alcaloides presentes en la muestra de raíz de ipecacuana, detectada a 285 nm.

Los resultados correspondientes a la cantidad de los alcaloides (cefaelina y emetina) presentes en la muestra de raíz de ipecacuana y al método de secado se muestran en las figuras 15 y 16. Dichos resultados fueron calculados en base a la curva de calibración, representada en la figura 22 (Anexo 3) realizada utilizando patrones de ambos alcaloides y haciendo uso del software especializado del equipo de UHPLC, ver Anexo 1.

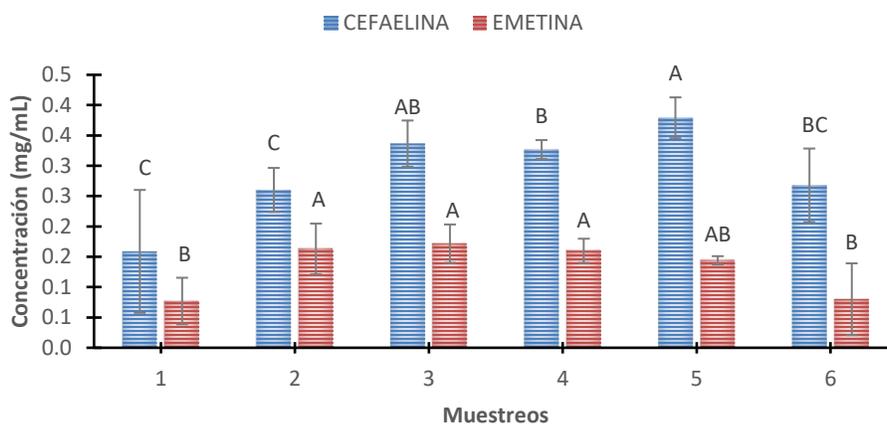


Figura 15. Resultados del contenido de los alcaloides cefaelina y emetina presentes en la raíz de *C. ipecacuanha*, empleando la técnica de UHPLC.

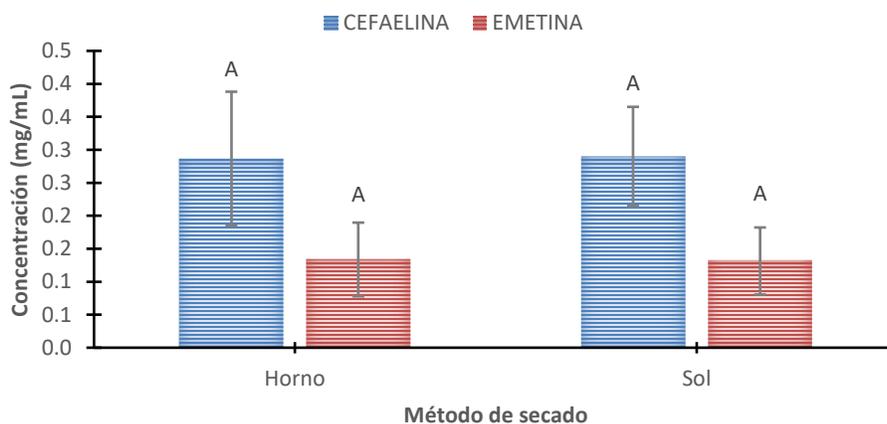


Figura 16. Resultados de la comparación del método de secado de la raíz de *C. ipecacuanha* (horno y sol), sobre la concentración de los alcaloides cefaelina y emetina empleando la técnica de UHPLC.

En la figura 15 se observa cómo se mantiene la tendencia de concentraciones en los muestreos al igual que con el análisis de alcaloides totales, en donde el tercer punto es el que presenta la mayor concentración en el alcaloide emetina. En el caso de cefaelina el quinto punto parece ser anómalo, cortando así la tendencia que se observa en puntos anteriores.

En la figura 16 se muestran los resultados de la comparación entre los métodos de secado en ambos alcaloides estudiados, y se observa que nuevamente el método de secado no presenta una diferencia significativa.

4.4 Evaluación de la actividad antibiótica por el método Kirby-Bauer modificado

Los resultados de la actividad antibiótica producida por los extractos de la raíz de *C. ipecacuanha* se muestran a continuación para los seis muestreos y para las seis bacterias empleadas.

En las figuras 17-19 se observan los resultados de los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento de las bacterias utilizadas en este estudio. Los resultados corresponden al promedio de tres repeticiones, cada placa contiene 100 μL de una disolución salina de bacterias de 1.5×10^8 UFC/mL y en cada pocito se adicionó en 50 μL de metanol, 3 mg del extracto crudo de raíz de *C. ipecacuanha* rico en alcaloides.

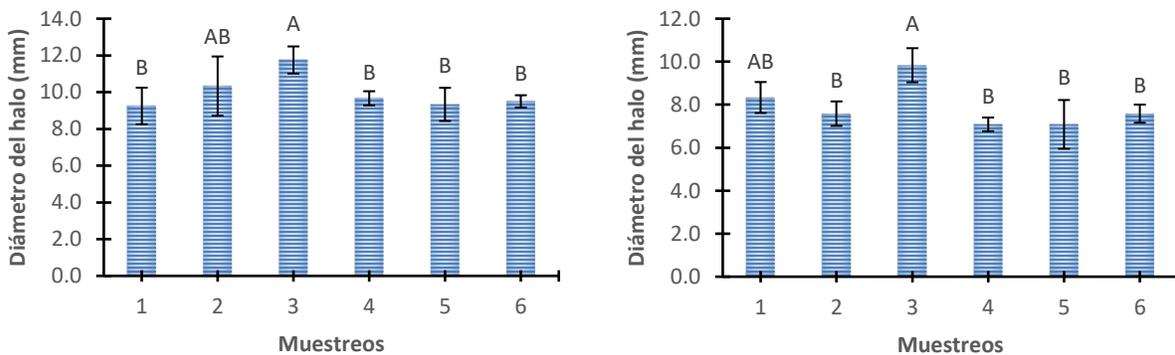


Figura 17. Resultados de la medición de los diámetros de los halos de inhibición de las bacterias *E. coli* (izquierda) y *P. aeruginosa* (derecha), empleando extracto de raíz de *C. ipecacuanha*, expresados en mm.

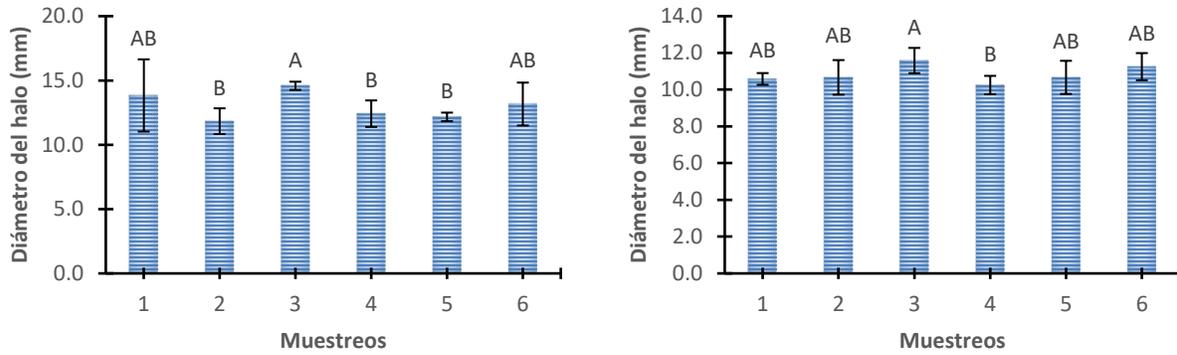


Figura 18. Resultados de la medición de los diámetros de halos de inhibición de las bacterias *S. aureus* (izquierda) y *E. faecium* (derecha), empleando extracto de raíz de *C. ipecacuanha*, expresados en mm.

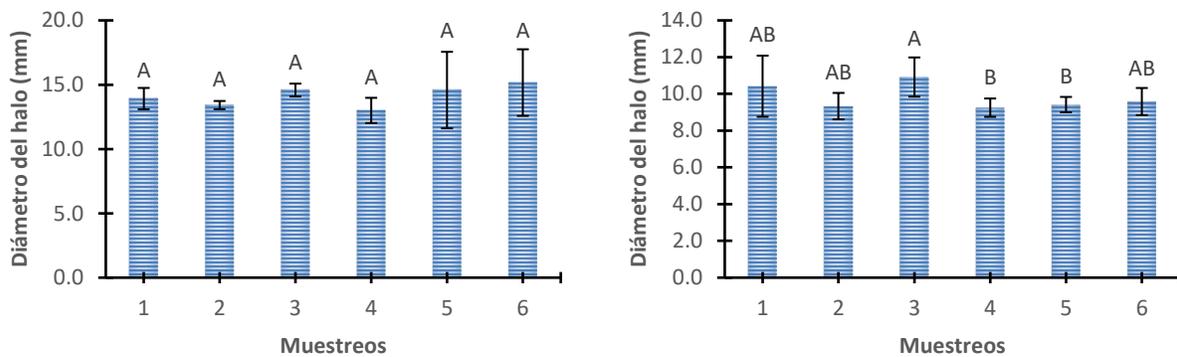


Figura 19. Resultados de la medición de los diámetros de los halos de inhibición de crecimiento de las bacterias *A. baumannii* (izquierda) y *K. pneumoniae* (derecha), empleando extracto de raíz de *C. ipecacuanha*, expresados en mm.

Los resultados muestran al igual que en las secciones anteriores que hay una tendencia en el máximo de la actividad antibiótica. Por ejemplo, en el muestreo 3 se obtuvo el máximo de actividad sobre las bacterias, a excepción de *A. baumannii*, que mostró su máximo de actividad antibiótica, en el último muestreo. Este comportamiento se ajusta con la tendencia del punto 3 que muestra la mayor concentración de alcaloides presentes en la muestra, lo que sugiere una relación directa entre la concentración de alcaloides y su efecto inhibitor en el crecimiento de las bacterias.

Estos resultados de inhibición son de gran importancia ya que las cepas de las bacterias empleadas en este estudio presentan una problemática en el ámbito de la salud nacional, debido a su resistencia comprobada ante los antibióticos comúnmente empleados. En los resultados obtenidos la bacteria *S. aureus* seguida de la *E. coli* mostraron la mayor respuesta inhibitoria en su crecimiento ante el antibiótico utilizado, mientras que la bacteria *A. baumannii* mostró cero inhibición ante el mismo antibiótico, como se observa en la figura 20. Es por esta razón la presencia de una sola barra en la bacteria *A. baumannii* (la cual representa el promedio de los halos de inhibición del extracto), es un resultado relevante y muy prometedor, pues el extracto crudo de la raíz de ipecacuana mostró una inhibición en el crecimiento de la bacteria del 100% bajo las condiciones del experimento.

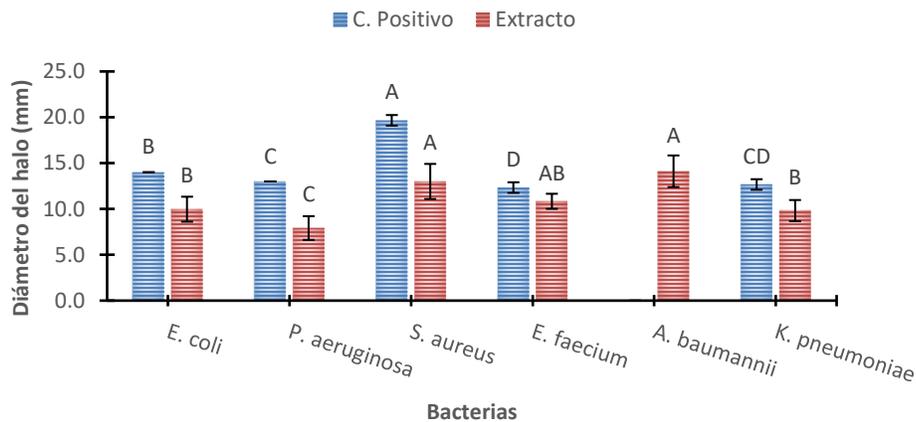


Figura 20. Resultados de la medición de los halos de inhibición de crecimiento de las bacterias empleando, control positivo (penicilina estreptomocina (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)) vs extracto de raíz de *C. ipecacuanha*, expresado en mm.

De igual manera en la determinación del %PRDZI se encontró una tendencia semejante al efecto de los halos de inhibición con el tercer muestreo como el punto de máximo efecto sobre el crecimiento bacteriano (las barras color verde con tendencia al punto máximo).

Con base en los resultados mostrados en la figura 21 se puede observar que la bacteria *A. baumannii* es la más afectada por el extracto de alcaloides de *C. ipecacuanha*, pues en el %PRDZI es la que muestra los valores más elevados, seguida de *E. faecium* y *K. pneumoniae*.

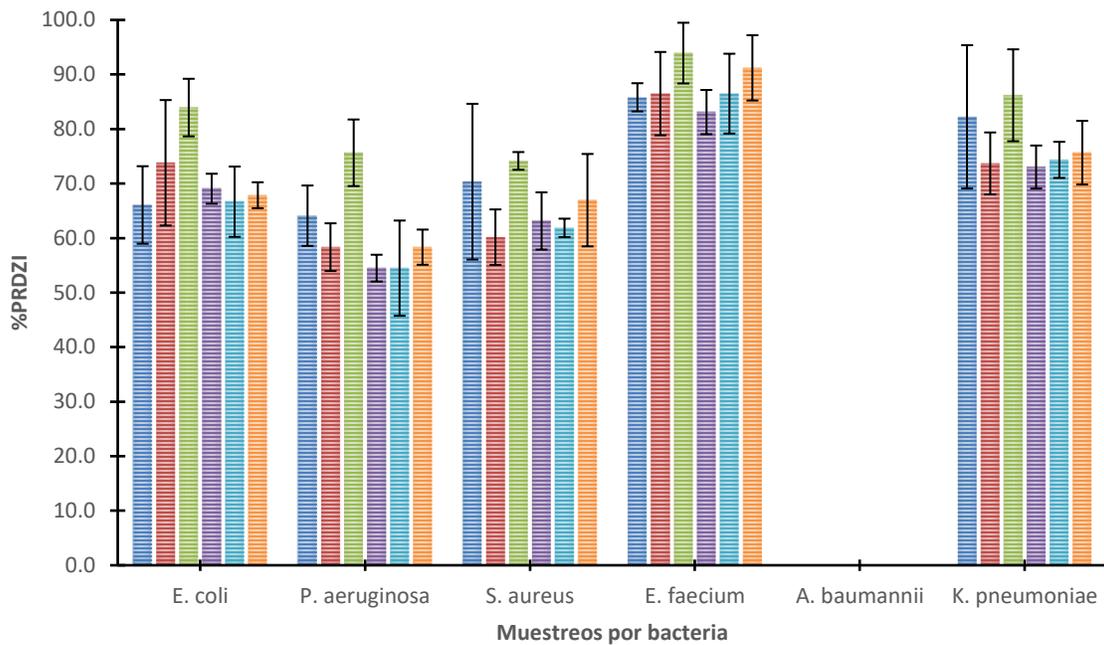


Figura 21. Resultados del %PRDZI en los seis muestreos para las bacterias empleadas, excepto *A. baumannii*.

En esta parte se evalúa el efecto del extracto, comparándolo con el efecto de la penicilina estreptomycinina, para así tener un parámetro de comparación en base a una sustancia que previamente se sabe posee efecto antimicrobiano. Lo que lleva a concluir que el extracto de *C. ipecacuanha* posee el mayor efecto antimicrobiano en relación con el antibiótico sobre la bacteria *A. baumannii*.

Se obtuvo una actividad anhibitoria del extracto de alcaloides totales sobre las bacterias ESKAPE con un promedio de 70% de actividad, respecto al antibiótico penicilina estreptomycinina.

CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

-Se estableció el uso de éter etílico y medio básico junto con el uso del baño ultrasónico como las condiciones óptimas para la extracción de los alcaloides presentes en la raíz de *C. ipecacuanha*.

-Se comprobó el método de secado al sol de las muestras como el más adecuado, debido al ahorro energético que representa para los productores de raicilla, y por la falta de efectos negativos sobre la concentración de alcaloides en la raíz de *C. ipecacuanha* que puedan evidenciarse estadísticamente.

-Se determinó 16,5 meses de edad de la planta como el momento de mayor concentración de alcaloides en la raíz de *C. ipecacuanha*, y por ende el mejor tiempo de cosecha.

-A pesar de la disolución del antibiótico utilizado en el análisis, en todas las muestras excepto una, el extracto posee un elevado %PRDZI, esto significa que comparado con dicho antibiótico el extracto de *C. ipecacuanha* es promisorio como alternativa para combatir y contrarrestar el crecimiento de colonias de estas bacterias.

-Se recomiendan más puntos de muestreo para poder caracterizar la región de Cutris de San Carlos y poder evaluar la diferencia que pudiera existir en la concentración de los alcaloides respecto a las variaciones, evaluando la época del año y la edad de la planta.

-Se recomienda hacer futuros análisis con control de los parámetros del suelo si se desea corroborar la tendencia que se observa en el comportamiento fluctuante de la concentración de los alcaloides, respecto a la época del año.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Ortiz Crespo, F. I. La Cinchona antes y después del Virreinato del Conde de Chinchón. *Interciencia* **1994**, 19 (3), 130–136.
- (2) De Boer, H.; Thulin, M. Lectotypification of *Callicocca ipecacuanha* Brot. and Neotypification of *Cephaelis acuminata* H.Karst., with Reference to the Drug Ipecac. *Taxon* **2005**, 54 (4), 1080–1082.
- (3) Camargo de Asis, M.; Giuliatti, A. M. Diferenciação Morfológica e Anatômica Em Populações de “Ipecacuanha” - *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). *Revta Bras. Bot.* **1999**, 22 (2), 205–216.
- (4) Flückiger, F. A.; Hanbury, D. *Histoire Des Drogues D'origine Végétale.*, 1st ed.; O. Doin, 1878.
- (5) Ferreira Júnior, W. S.; Cruz, M. P.; Dos Santos, L. L.; Medeiros, M. F. T. Use and Importance of Quina (*Cinchona* Spp.) and Ipeca (*Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson): Plants for Medicinal Use from the 16th Century to the Present. *J. Herb. Med.* **2012**, 2 (4), 103–112. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2012.07.003>.
- (6) De Albuquerque, U. P.; Monteiro, J. M.; Ramos, M. A.; De Amorim, E. L. C. Medicinal and Magic Plants from a Public Market in Northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, 110 (1), 76–91.
- (7) Möller, M.; Herzer, K.; Wenger, T.; Herr, I.; Wink, M. The Alkaloid Emetine as a Promising Agent for the Induction and Enhancement of Drug-Induced Apoptosis in Leukemia Cells. *Oncol. Rep.* **2007**, 18 (3), 737–744.
- (8) de Oliveira, L.; Martins, E. R. A Quantitative Assessment of Genetic Erosion in Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*). *Genet. Resour. Crop Evol.* **2002**, 49 (6), 607–617.
- (9) Souza, M. M.; Martins, E. R.; Pereira, T. N. S.; Oliveira, L. O. de. Reproductive Studies in Ipecac (*Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes; Rubiaceae): Pollen Development and Morphology. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* **2008**, 51 (5), 981–989. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000500015>.

- (10) Medeiros, M. F. T.; de Albuquerque, U. P. The Pharmacy of the Benedictine Monks: The Use of Medicinal Plants in Northeast Brazil during the Nineteenth Century (1823–1829). *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *139* (1), 280–286.
- (11) Arango Acosta, G. J. Alcaloides y Compuestos Nitrogenados, Universidad de Antioquía, Facultad de Química Farmacéutica, Medellín, Junio 2008.
- (12) Fahradpour, M.; Keov, P.; Tognola, C.; Perez-Santamarina, E.; McCormick, P. J.; Ghassempour, A.; Gruber, C. W. Cyclotides Isolated from an Ipecac Root Extract Antagonize the Corticotropin Releasing Factor Type 1 Receptor. *Front. Pharmacol.* **2017**, *8* (SEP), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00616>.
- (13) UNCTAG/GATT, I. T. C. *International Trade Centre. UNCTAG/GATT. 1982. Marker for Selected Medicinal Plants and Their Derivates.*; Génova-Italia, 1982.
- (14) Ocampo, R. Ipecacuana . Un Producto No Maderable Cultivado Bajo El Bosque En Costa Rica. 1980-2000. *Agron. Costarric.* **2007**, *31* (1), 113–119.
- (15) www.munisc.go.cr https://www.munisc.go.cr/documentos/Secciones/9/Mapa_San_Carlos_Detallado.pdf (accessed Jul 2, 2018).
- (16) Instituto Nacional, de E. y C. *Anuario Estadístico de Costa Rica 1993-1998*; San José. Costa Rica, 2000.
- (17) PROCOMER, P. del C. E. de C. R. Portal Estadístico de Comercio Exterior 2017.
- (18) Ocampo, R. Agrotecnología Para El Cultivo de Ipecacuana o Raicilla. In *Fundamentos de Agrotecnología de cultivo de plantas medicinales Iberoamericanas*; Convenio Andrés Bello y CYTED: Santafé de Bogotá D. C., Colombia, 2000.
- (19) Sánchez Soto, D. G. Exportador Autorizado Por El MAG. **2018**.
- (20) Palma, T.; Gadea Baltodano, A.; Chaves, A. El Cultivo de La Raicilla Psychotria Ipecacuanha. **2000**.
- (21) Castro, S. Abordagens Biotecnológicas Para a Obtenção de Substâncias Ativas. *Farmacogn. da planta ao Medicam. Porto Alegre/florianóp. Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSR* **2000**.
- (22) Raskin, I.; Ribnicky, D. M.; Komarnytsky, S.; Ilic, N.; Poulev, A.; Borisjuk, N.; Brinker,

- A.; Moreno, D. A.; Ripoll, C.; Yakoby, N.; O'Neal, J. M.; Cornwell, T.; Pastor, I.; Fridlender, B. Plants and Human Health in the Twenty-First Century. *Trends Biotechnol.* **2002**, *20* (12), 522–531. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(02\)02080-2](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(02)02080-2).
- (23) Bhat, S. V.; Nagasampagi, B. A.; Sivakumar, M. Chemistry of Natural Products. In *Chemistry of Natural Products*; Narosa Publishing House, 2013; pp 237–258.
- (24) Taiz, L.; Zeiger, E. Fisiología Vegetal. In *Fisiología vegetal*; Ciènces experimentals; Universitat Jaume I: Massachusetts, 2006; pp 558–559.
- (25) Wink, M. Bioprospecting: The Search for Bioactive Lead Structures from Nature. *Med. Plant Biotechnol. From Basic Res. to Ind. Appl.* **2007**, 97–116.
- (26) Goossens, A.; Häkkinen, S. T.; Laakso, I.; Seppänen-Laakso, T.; Biondi, S.; De Sutter, V.; Lammertyn, F.; Nuutila, A. M.; Söderlund, H.; Zabeau, M. A Functional Genomics Approach toward the Understanding of Secondary Metabolism in Plant Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100* (14), 8595–8600.
- (27) Hostettmann, K.; Marston, A.; Ndjoko, K.; Wolfender, J.-L. The Potential of African Plants as a Source of Drugs. *Curr. Org. Chem.* **2000**, *4* (10), 973–1010.
- (28) Cragg, G. M.; Newman, D. J. Biodiversity: A Continuing Source of Novel Drug Leads. *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77* (1), 7–24. <https://doi.org/10.1351/pac200577010007>.
- (29) Ross, I. A. Chemical Constituents, Traditional and Modern Medicinal Uses. In *Medicinal Plants of the world*; Humana Press Inc.: New Jersey, 2005; Vol. 3, pp 9–19.
- (30) Taylor, C. M.; Gereau, R. E. The Genus *Carapichea* (Rubiaceae, Psychotrieae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* **2013**, *99* (1), 100–127. <https://doi.org/10.3417/2011064>.
- (31) De Oliveira, L. O.; Bandini Rossi, A. A.; Ronie Martins, E.; De Carvalho Batista, F. R.; Santos Silva, R. Molecular Phylogeography of *Carapichea ipecacuanha*, an Amphitropical Shrub That Occurs in the Understory of Both Semideciduous and Evergreen Forests. *Mol. Ecol.* **2010**, *19* (7), 1410–1422. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04591.x>.
- (32) Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3rd ed.; John Wiley and Son: United Kingdom, 2009. <https://doi.org/10.1002/9780470742761>.
- (33) S. Akinboye, E. Biological Activities of Emetine. *Open Nat. Prod. J.* **2011**, *4* (1), 8–15.

<https://doi.org/10.2174/1874848101104010008>.

- (34) Yin Low, J. S.; Chen, K. C.; Wu, K. X.; Mah-LeeNm, H. Antiviral Activity of Emetine Dihydrochloride against Dengue Virus Infection. *J Antivir Antiretrovir* **2009**, *1* (1), 062–071.
- (35) Yao, L. H.; Jiang, Y. M.; Shi, J.; Tomas-Barberan, F. A.; Datta, N.; Singanusong, R.; Chen, S. S. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. *Plant foods Hum. Nutr.* **2004**, *59* (3), 113–122.
- (36) Hesse, M. Alkaloids: Nature’s Curse or Blessing?; John Wiley & Sons: Ochsenfurt-Hohestad, Alemania, 2002; pp 303–313.
- (37) Crozier, A.; Clifford, M. N.; Ashihara, H. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet; Wiley: Oxford, United Kingdom, 2006; pp 102–131.
- (38) Santajit, S.; Indrawattana, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *BioMed Research International*. Hindawi Limited 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2475067>.
- (39) National action plan to prevent healthcare-associated infections: roadmap to elimination. Washington, DC: Department of Health and Human Services http://www.hhs.gov/ash/initiatives/hai/exec_summary.html (accessed Jul 1, 2021).
- (40) Klevens, R. M.; Edwards, J. R.; Richards, C. L.; Horan, T. C.; Gaynes, R. P.; Pollock, D. A.; Cardo, D. M. Estimating Health Care-Associated Infections and Deaths in U.S. Hospitals, 2002. *Public Health Rep.* **2007**, *122* (2), 160–166. <https://doi.org/10.1177/003335490712200205>.
- (41) Zhao, W.-H.; Hu, Z.-Q. Epidemiology and Genetics of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamases in Gram-Negative Bacteria. *Crit. Rev. Microbiol.* **2013**, *39* (1), 79–101. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691460>.
- (42) Pucci, M. J.; Dougherty, T. J. Direct Quantitation of the Numbers of Individual Penicillin-Binding Proteins per Cell in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **2002**, *184* (2). <https://doi.org/10.1128/JB.184.2.588-591.2002>.
- (43) Fukuoka, T.; Ohya, S.; Narita, T.; Katsuta, M.; Iijima, M.; Masuda, N.; Yasuda, H.; Trias,

- J.; Nikaido, H. Activity of the Carbapenem panipenem and Role of the OprD (D2) Protein in Its Diffusion through the Pseudomonas Aeruginosa Outer Membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, 37 (2). <https://doi.org/10.1128/AAC.37.2.322>.
- (44) Sharma, G.; Rao, S.; Bansal, A.; Dang, S.; Gupta, S.; Gabrani, R. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: Potential Therapeutic Targets. *Biologicals* **2014**, 42 (1). <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2013.11.001>.
- (45) Martos, P. G.; Del Barrio, M. T. F.; Salido, F. P. *Microbiología Clínica Aplicada*; Ediciones Díaz de Santos: España, 1996; pp 105–122.
- (46) Anderson, D. M.; Elliot, M. A.; Keith, J.; Novak, P. D. *Diccionario Mosby Medicina, Enfermería y Ciencias de La Salud*; Elsevier,: Madrid, España, 2003; pp 107–108.
- (47) Pérez, A. M. C.; Ureña, J. L.; Louzao, J. L. *Microbiología Oral*; McGraw-Hill-Interamericana de España: Madrid, España, 2002; pp 115–122.
- (48) Garcia, R. M. G. *Agentes Bactericidas/Bacteriostaticos a Partir de Sorbato de Potasio, Carvacrol y Timol*, Universidad de las Américas Puebla, 2005.
- (49) Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibsouda, S. K. Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *J. Pharm. Anal.* **2016**, 6 (2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- (50) Valgas, C.; De Souza, S. M.; Smânia, E. F. A.; Smânia, A. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Brazilian J. Microbiol.* **2007**, 38 (2), 369–380. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000200034>.
- (51) Magaldi, S.; Mata-Essayag, S.; Hartung De Capriles, C.; Perez, C.; Colella, M. T.; Olaizola, C.; Ontiveros, Y. Well Diffusion for Antifungal Susceptibility Testing. *Int. J. Infect. Dis.* **2004**, 8 (1), 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2003.03.002>.
- (52) United States, P. C. (Estados U. *USP NF 38: Farmacopea de Los Estados Unidos de América: Formulario Nacional; Compendios de Normas Oficiales*; United States Pharmacopeial Convention, 2015.
- (53) Argentina, C. permanente de la F. FARMACOPEA ARGENTINA. In *Farmacopea Argentina*; 2003; Vol. 1, pp 2030–2032.

- (54) Zamora Natera, F.; García López, P.; Ruiz López, M.; Salcedo Pérez, E. Composición de Alcaloides En Semillas de *Lupinus mexicanus* (Fabaceae) y Evaluación Antifúngica y Alelopática Del Extracto Alcaloideo. *Agrociencia* **2008**, *42* (2), 185–192.
- (55) Cipriani, I.; Rivera, M. Detección de Alcaloides En La Piel de Cuatro Especies de Anfibios Ecuatorianos (*Anura dentrobatidae*). *Rev. Ecuat. Med. Cienc. Biol.* **2009**, *30* (1y2), 42–49.
- (56) Valentin Feyns, L.; Grady, L. T. Emetine Hydrochloride. *Anal. Profiles Drug Subst. Excipients* **1981**, *10* (C), 289–335. [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(08\)60643-7](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60643-7).
- (57) Castañeda, M. B.; Cabrera, A. F.; Navarro, Y.; De Vries, W. *Procesamiento de Datos y Análisis Estadísticos Utilizando SPSS: Un Libro Práctico Para Investigadores y Administradores Educativos*, 1st ed.; Edipucrs: Porto Alegre, 2010.
- (58) Han, G., Wang, Y., Feng, S., Jia, Y. Simultaneous Determination of Cephaeline and Emetine in Ipecac and Its Preparations Using RP-HPLC. *Chinese Herb. Med.* **2013**, *5* (4), 286–291. [https://doi.org/10.1016/S1674-6384\(13\)60042-8](https://doi.org/10.1016/S1674-6384(13)60042-8).
- (59) Daglia, M. Polyphenols as Antimicrobial Agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2012**, *23* (2), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>.
- (60) Muñoz Arrieta, R. A. Bioprospección Fitoquímica de Dos Variedades de Fruta de Cas (*Psidium friedrichsthalianum* Ndz y *Psidium guijeejse* Sw) Oriundas de Costa Rica. Tesis de Licenciatura, Universidad de Costa Rica, Heredia, Octubre, 2014.
- (61) Rojas, J. J.; Ochoa, V. J.; Ocampo, S. A.; Muñoz, J. F. Screening for Antimicrobial Activity of Ten Medicinal Plants Used in Colombian Folkloric Medicine: A Possible Alternative in the Treatment of Non-Nosocomial Infections. *BMC Complement. Altern. Med.* **2006**, *6*, 1–6. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-2>.
- (62) Rojas, J. J.; García, A.; López, A. Evaluación de Dos Metodologías Para Determinar La Actividad Antimicrobiana de Plantas Medicinales. *Boletín Latinoam. y del Caribe Plantas Med. y Aromáticas* **2005**, *4* (2), 28–32. <https://doi.org/0717-7917>.
- (63) Arámbula, J.; Ibarra, B.; González, R.; Muñoz, O.; Hernández, H. Variación Estacional de Compuestos Fenólicos Foliares En *Quercus sideroxylla* En Diferentes Tipos de Suelo. *Madera y bosque* **2010**, *16* (3), 49–59.

- (64) Vilkuh, K.; Manasseh, R.; Mawson, R.; Ashokkumar, M. Ultrasonic Recovery and Modification of Food Ingredients; 2011; pp 345–368. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-7472-3_13.

ANEXOS

1. Medición de masas para las pruebas.

Tabla 2. Medición de las masas de una muestra de ipecacuana en gramos (g) para la extracción de los alcaloides y determinación del número óptimo de extracciones.

1 Extracción	2 Extracciones	3 Extracciones	4 Extracciones	5 Extracciones
0,1004	0,1003	0,1004	0,1004	0,1003
0,1004	0,1005	0,1004	0,1002	0,1002
0,1006	0,1003	0,1003	0,1003	0,1009

Tabla 3. Medición de las masas de las muestras de ipecacuana en gramos (g) para la determinación de los alcaloides totales solubles en éter por el método ácido-base.

Código de muestra	Masa (g) Repetición	Masa (g) Repetición	Masa (g) Repetición
	1	2	3
OCEH	3.7525	3.7528	3.7557
OCES	3.7500	3.7505	3.7510
OCVH	3.7505	3.7513	3.7513
OCVS	3.7515	3.7509	3.7518
DIEH	3.7506	3.7501	3.7507
DIES	3.7509	3.7509	3.7501
DIVH	3.7506	3.7511	3.7512
DIVS	3.7504	3.7506	3.7502

FEEH	3.7502	3.7509	3.7505
FEES	3.7517	3.7516	3.7518
FEVH	3.7515	3.7506	3.7504
FEVS	3.7505	3.7503	3.7506
MAEH	3.7506	3.7512	3.7515
MAES	3.7501	3.7539	3.7505
MAVH	3.7522	3.7516	3.7512
MAVS	3.7517	3.7514	3.7515
ABEH	3.7503	3.7512	3.7506
ABES	3.7550	3.7515	3.7556
ABVH	3.7515	3.7515	3.7518
ABVS	3.7510	3.7512	3.7525
JUEH	3.7507	3.7523	3.7518
JUES	3.7508	3.7514	3.7512
JUVH	3.7508	3.7511	3.7519
JUVS	3.7518	3.7508	3.7513

Tabla 4. Medición de las masas de las muestras de ipecacuana en gramos (g) para la determinación de los alcaloides emetina y cefaelina, mediante UHPLC.

Código de muestra	Masa (g) Repetición 1	Masa (g) Repetición 2	Masa (g) Repetición 3
OCEH	0.1012	0.1017	0.1005
OCES	0.1015	0.1004	0.1025
OCVH	0.1007	0.1006	0.1012

OCVS	0.1013	0.1012	0.1012
DIEH	0.1009	0.1012	0.1025
DIES	0.1008	0.1009	0.1025
DIVH	0.1008	0.1019	0.1010
DIVS	0.1013	0.1016	0.1008
FEEH	0.1005	0.1010	0.1009
FEES	0.1011	0.1005	0.1009
FEVH	0.1003	0.1010	0.1008
FEVS	0.1009	0.1005	0.1006
MAEH	0.1010	0.1011	0.1015
MAES	0.1035	0.1014	0.1022
MAVH	0.1016	0.1024	0.1015
MAVS	0.1029	0.1018	0.1042
ABEH	0.1015	0.1026	0.1011
ABES	0.1018	0.1011	0.1026
ABVH	0.1030	0.1031	0.1030
ABVS	0.1027	0.1027	0.1027
JUEH	0.1020	0.1013	0.1018
JUES	0.1010	0.1020	0.1017
JUVH	0.1014	0.1028	0.1029
JUVS	0.1021	0.1024	0.1021

Tabla 5. Medición de la masa de los patrones de cefaelina y emetina en gramos (g), volumen de disolución y alícuota en (μL) tomada para la elaboración de la curva de calibración en la determinación de dichos alcaloides, mediante UHPLC.

Patrón	Masa (g)		Volumen (μL)		
	Cefaelina	Emetina	Cefaelina	Emetina	Metanol
madre	0.005533	0.001745			2500
1			250	250	0
2			250	250	250
3			250	250	500
4			250	250	750
5			50	50	400

Tabla 6. Medición de las masas, volumen y concentración de las muestras de ipecacuana para la determinación de la actividad antibiótica por el método Kirby-Bauer modificado.

Código de muestra	Masa (g)	Volumen (mL)	Concentración (g/mL)
OCEH	0.0797	1.328	0.0600
OCES	0.0886	1.477	0.0600
OCVH	0.0574	0.957	0.0600
OCVS	0.0906	1.510	0.0600
DIEH	0.0848	1.413	0.0600
DIES	0.0953	1.588	0.0600
DIVH	0.0627	1.045	0.0600
DIVS	0.0929	1.548	0.0600
FEEH	0.0613	1.022	0.0600
FEES	0.0609	1.015	0.0600
FEVH	0.0616	1.027	0.0600

FEVS	0.0612	1.020	0.0600
MAEH	0.0626	1.043	0.0600
MAES	0.0626	1.043	0.0600
MAVH	0.095	1.583	0.0600
MAVS	0.0636	1.060	0.0600
ABEH	0.0612	1.020	0.0600
ABES	0.093	1.550	0.0600
ABVH	0.0905	1.508	0.0600
ABVS	0.0891	1.485	0.0600
JUEH	0.0722	1.203	0.0600
JUES	0.0691	1.152	0.0600
JUVH	0.0959	1.598	0.0600
JUVS	0.0607	1.012	0.0600

2. Medición de absorbancias de las muestras.

Tabla 7. Absorbancias de los extractos de ipecacuana, utilizando éter como disolvente, a una longitud de onda de 285 nm.

1 Extracción	2 Extracciones	3 Extracciones	4 Extracciones	5 Extracciones
0,143	0,285	0,294	0,279	0,295
0,207	0,284	0,304	0,300	0,309
0,202	0,271	0,290	0,287	0,300

Tabla 8. Relación absorbancia/masa de las extracciones realizadas con éter para determinar el número óptimo de extracciones, datos analizados con Minitab.

1 Extracción	2 Extracciones	3 Extracciones	4 Extracciones	5 Extracciones
1,4243	2,8415	2,9283	2,7789	2,9412
2,0618	2,8259	3,0279	2,9940	3,0838
2,0080	2,7019	2,8913	2,8614	2,9732
Promedio	Promedio	Promedio	Promedio	Promedio
2,0349	2,7898	2,9492	2,8781	2,9994
Desviación estándar				
0,0380	0,0765	0,0707	0,1085	0,0748

3. Determinación de concentraciones de las muestras.

Tabla 9. Determinación de la concentración de alcaloides totales solubles en éter mediante el método ácido-base, expresada en porcentaje de emetina en mg en la muestra.

Código de muestra	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio y desviación
OCEH	3.074	3.010	2.975	3.020±0.050
OCES	2.948	2.915	2.915	2.926±0.019
OCVH	2.275	2.274	2.242	2.264±0.019
OCVS	3.523	3.492	3.427	3.480±0.049
DIEH	3.01128	3.01168	3.01148	3.01148±0.00020
DIES	2.819	2.723	2.755	2.766±0.049
DIVH	3.364	3.331	3.331	3.342±0.019

DIVS	3.332	3.364	3.268	3.321±0.049
FEEH	4.069	3.876	3.972	3.972±0.096
FEES	3.843	3.811	3.779	3.811±0.032
FEVH	4.196	4.229	4.165	4.196±0.032
FEVS	4.229	4.229	4.132	4.197±0.056
MAEH	3.876	3.812	3.811	3.833±0.037
MAES	3.845	3.873	3.812	3.843±0.030
MAVH	3.650	3.651	3.619	3.640±0.018
MAVS	3.523	3.459	3.459	3.480±0.037
ABEH	3.556	3.523	3.524	3.534±0.019
ABES	3.488	3.459	3.487	3.478±0.016
ABVH	4.00	3.81	3.81	3.88±0.11
ABVS	3.620	3.491	3.458	3.523±0.085
JUEH	2.338	2.337	2.306	2.327±0.019
JUES	2.274	2.242	2.274	2.263±0.019
JUVH	3.652	3.651	3.619	3.641±0.019
JUVS	3.299	3.171	3.267	3.246±0.066

Tabla 10. Determinación de la concentración teórica de los patrones de cefaelina y emetina en (mg/mL) de la curva de calibración para el análisis de las muestras de ipecacuana, mediante UHPLC.

Patrón	Concentración (mg/mL)	
	Cefaelina	Emetina
1	1.106600	0.349000
2	0.737733	0.232667
3	0.553300	0.174500
4	0.442640	0.139600
5	0.221320	0.069800

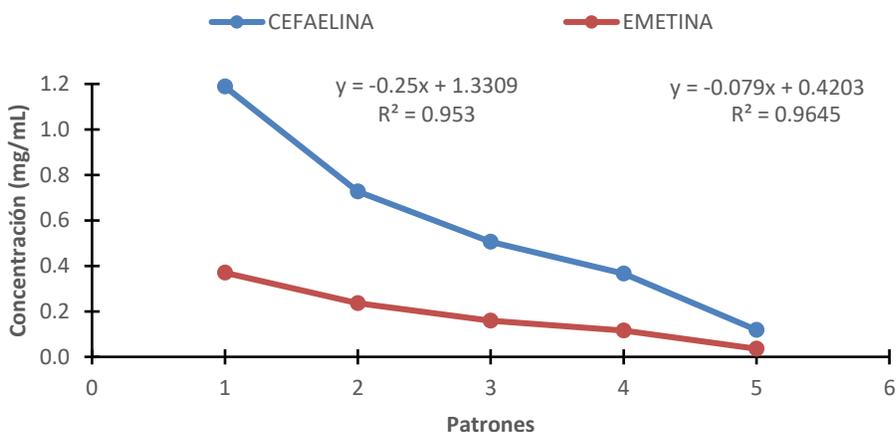


Figura 22. Curva de calibración para el análisis de los alcaloides cefaelina y emetina mediante UHPLC, expresado en mg/mL.

Tabla 11. Determinación de la concentración del alcaloide cefaelina mediante UHPLC, expresada en mg en la muestra.

Código de muestra	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio y desviación
OCEH	0.1273	0.1333	0.1297	0.1301±0.0030
OCES	0.152	0.102	0.105	0.120±0.028

OCVH	0.025	0.059	0.127	0.070±0.052
OCVS	0.331	0.336	0.279	0.315±0.031
DIEH	0.256	0.259	0.226	0.247±0.018
DIES	0.2150	0.2017	0.2183	0.2117±0.0088
DIVH	0.2863	0.3007	0.2853	0.2908±0.0086
DIVS	0.2923	0.3007	0.2813	0.2914±0.0097
FEEH	0.375	0.383	0.352	0.370±0.016
FEES	0.2830	0.2873	0.2703	0.2802±0.0088
FEVH	0.342	0.364	0.376	0.361±0.017
FEVS	0.3373	0.3283	0.3413	0.3357±0.0067
MAEH	0.3197	0.3220	0.3260	0.3226±0.0032
MAES	0.295	0.323	0.313	0.310±0.014
MAVH	0.321	0.343	0.354	0.339±0.017
MAVS	0.3383	0.3420	0.3237	0.3347±0.0097
ABEH	0.350	0.337	0.358	0.348±0.011
ABES	0.369	0.386	0.421	0.392±0.026
ABVH	0.414	0.441	0.406	0.420±0.018
ABVS	0.3637	0.3550	0.3483	0.3557±0.0077
JUEH	0.2173	0.2093	0.2210	0.2159±0.0060
JUES	0.2017	0.2080	0.2050	0.2049±0.0032
JUVH	0.306	0.332	0.329	0.322±0.014
JUVS	0.3330	0.3250	0.3267	0.3282±0.0042

Tabla 12. Determinación de la concentración del alcaloide emetina mediante UHPLC, expresada en mg en la muestra.

Código de muestra	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Promedio y desviación
OCEH	0.05333	0.05300	0.05200	0.05278±0.00069
OCES	0.0473	0.0407	0.0377	0.0419±0.0049
OCVH	0.068	0.074	0.092	0.078±0.013
OCVS	0.1303	0.1407	0.1360	0.1357±0.0052
DIEH	0.1217	0.1263	0.1200	0.1227±0.0033
DIES	0.1240	0.1227	0.1343	0.1270±0.0064
DIVH	0.2133	0.2163	0.2163	0.2153±0.0017
DIVS	0.193	0.194	0.175	0.187±0.011
FEEH	0.1697	0.1647	0.1623	0.1656±0.0037
FEES	0.1283	0.1270	0.1210	0.1254±0.0039
FEVH	0.1920	0.2077	0.2047	0.2014±0.0083
FEVS	0.1983	0.1853	0.1987	0.1941±0.0076
MAEH	0.187	0.165	0.171	0.174±0.011
MAES	0.1790	0.1827	0.1820	0.1812±0.0020
MAVH	0.1413	0.1500	0.1503	0.1472±0.0051
MAVS	0.13667	0.13600	0.13767	0.13678±0.00084
ABEH	0.14933	0.14800	0.14767	0.14833±0.00088
ABES	0.1453	0.1283	0.1387	0.1374±0.0086
ABVH	0.1463	0.1473	0.1360	0.1432±0.0063
ABVS	0.1543	0.1460	0.1417	0.1473±0.0064

JUEH	0.0250	0.0260	0.0223	0.0244±0.0019
JUES	0.0227	0.0207	0.0247	0.0227±0.0020
JUVH	0.1263	0.1347	0.1360	0.1323±0.0052
JUVS	0.1433	0.1460	0.1323	0.1406±0.0072

Tabla 13. Medición de los halos de inhibición formados por las muestras de ipecacuana para la determinación de la actividad antibiótica por el método Kirby-Bauer modificado.

Muestra	Metanol	Escherichia Coli				Pseudomona Aeruginosa				Staphylococcus Aureus				Enterococcus Faecium				Acinetobacter Baumannii				Klebsiella Pneumoniae			
		1	2	3	Prom	1	2	3	Prom	1	2	3	Prom	1	2	3	Prom	1	2	3	Prom	1	2	3	Prom
OCEH	NO	10	11	10	10.33	9	7	8	8.00	19	18	17	18.00	10	10	11	10.33	15	15	15	15.00	12	12	12	12.00
OCES	NO	9	10	10	9.67	8	8	7	7.67	13	13	13	13.00	11	11	11	11.00	14	14	14	14.00	11	12	12	11.67
OCVH	NO	8	8	8	8.00	10	9	9	9.33	12	12	12	12.00	10	10	11	10.33	13	13	15	13.67	8	8	10	8.67
OCVS	NO	9	9	9	9.00	9	9	7	8.33	13	12	12	12.33	10	11	11	10.67	13	13	13	13.00	9	9	10	9.33
DIEH	NO	10	10	10	10.00	9	8	8	8.33	13	12	12	12.33	10	10	10	10.00	13	13	14	13.33	10	10	10	10.00
DIES	NO	9	10	10	9.67	7	7	7	7.00	11	11	11	11.00	10	11	11	10.67	13	14	14	13.67	9	7	9	8.33
DIVH	NO	10	14	14	12.67	8	8	7	7.67	13	13	13	13.00	12	12	12	12.00	13	13	13	13.00	9	10	10	9.67
DIVS	NO	8	9	10	9.00	7	8	7	7.33	11	11	11	11.00	10	10	10	10.00	13	14	14	13.67	9	9	10	9.33
FEEH	NO	13	12	11	12.00	10	11	9	10.00	14	15	15	14.67	11	11	11	11.00	15	15	15	15.00	11	11	13	11.67
FEES	NO	10	13	13	12.00	12	11	8	10.33	15	15	15	15.00	12	13	12	12.33	15	15	15	15.00	11	11	12	11.33
FEVH	NO	12	13	12	12.33	11	10	10	10.33	15	15	13	14.33	11	11	11	11.00	14	14	14	14.00	11	11	12	11.33
FEVS	NO	10	12	10	10.67	9	9	8	8.67	15	14	14	14.33	12	12	12	12.00	14	14	15	14.33	10	9	9	9.33
MAEH	NO	10	10	10	10.00	7	7	8	7.33	14	13	13	13.33	10	10	10	10.00	13	13	15	13.67	10	10	10	10.00
MAES	NO	10	10	10	10.00	7	7	6	6.67	13	13	13	13.00	10	10	10	10.00	12	12	12	12.00	9	9	9	9.00
MAVH	NO	9	9	10	9.33	7	7	8	7.33	11	11	11	11.00	10	10	10	10.00	12	12	13	12.33	9	9	9	9.00
MAVS	NO	9	10	9	9.33	6	7	8	7.00	13	12	12	12.33	11	11	11	11.00	14	14	14	14.00	9	9	9	9.00
ABEH	NO	10	11	11	10.67	9	8	9	8.67	12	12	12	12.00	10	10	11	10.33	19	19	19	19.00	8	10	10	9.33
ABES	NO	8	9	9	8.67	6	6	6	6.00	12	12	12	12.00	10	10	10	10.00	13	14	14	13.67	9	10	9	9.33
ABVH	NO	9	9	9	9.00	7	7	7	7.00	12	12	12	12.00	10	10	11	10.33	13	13	13	13.00	10	10	10	10.00
ABVS	NO	9	9	9	9.00	7	7	6	6.67	13	12	13	12.67	12	12	12	12.00	12	13	13	12.67	9	9	9	9.00
JUEH	NO	9	9	9	9.00	8	8	8	8.00	14	14	14	14.00	11	12	12	11.67	19	19	19	19.00	9	10	9	9.33
JUES	NO	10	10	9	9.67	8	7	8	7.67	14	14	14	14.00	11	11	11	11.00	14	14	15	14.33	10	9	9	9.33
JUVH	NO	9	10	10	9.67	7	7	7	7.00	14	14	4	10.67	10	11	10	10.33	13	13	14	13.33	11	11	10	10.67
JUVS	NO	9	10	10	9.67	8	8	7	7.67	14	14	14	14.00	12	12	12	12.00	13	14	15	14.00	9	9	9	9.00

Tabla 14. Determinación del %PRDZI de las seis bacterias empleadas en la prueba de actividad antibiótica.

	Escherichia	Pseudomona	Staphylococcus	Enterococcus	Acinetobacter	Klebsiella
Muestra	Coli	Aeruginosa	Aureus	Faecium	Baumannii	Pneumoniae
OCEH	73.8095	61.5385	91.5254	83.7838	15000.0000	94.7368
OCES	69.0476	58.9744	66.1017	89.1892	14000.0000	92.1053
OCVH	57.1429	71.7949	61.0169	83.7838	13666.6667	68.4211
OCVS	64.2857	64.1026	62.7119	86.4865	13000.0000	73.6842
DIEH	71.4286	64.1026	62.7119	81.0811	13333.3333	78.9474
DIES	69.0476	53.8462	55.9322	86.4865	13666.6667	65.7895
DIVH	90.4762	58.9744	66.1017	97.2973	13000.0000	76.3158
DIVS	64.2857	56.4103	55.9322	81.0811	13666.6667	73.6842
FEEH	85.7143	76.9231	74.5763	89.1892	15000.0000	92.1053
FEES	85.7143	79.4872	76.2712	100.0000	15000.0000	89.4737
FEVH	88.0952	79.4872	72.8814	89.1892	14000.0000	89.4737
FEVS	76.1905	66.6667	72.8814	97.2973	14333.3333	73.6842
MAEH	71.4286	56.4103	67.7966	81.0811	13666.6667	78.9474
MAES	71.4286	51.2821	66.1017	81.0811	12000.0000	71.0526
MAVH	66.6667	56.4103	55.9322	81.0811	12333.3333	71.0526
MAVS	66.6667	53.8462	62.7119	89.1892	14000.0000	71.0526
ABEH	76.1905	66.6667	61.0169	83.7838	19000.0000	73.6842
ABES	61.9048	46.1538	61.0169	81.0811	13666.6667	73.6842
ABVH	64.2857	53.8462	61.0169	83.7838	13000.0000	78.9474
ABVS	64.2857	51.2821	64.4068	97.2973	12666.6667	71.0526
JUEH	64.2857	61.5385	71.1864	94.5946	19000.0000	73.6842
JUES	69.0476	58.9744	71.1864	89.1892	14333.3333	73.6842
JUVH	69.0476	53.8462	54.2373	83.7838	13333.3333	84.2105
JUVS	69.0476	58.9744	71.1864	97.2973	14000.0000	71.0526