

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERO/A EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE CÁPSULAS DE EXTRACTO FLUIDO DE *Vaccinium floribundum kunth* (MORTIÑO); EN INFECCIONES AGUDAS DEL TRACTO URINARIO.

AUTORES:

SEBASTIÁN DANIEL VARELA VILLARROEL

GILSON ALEXIS MUSUÑA ROJAS

TUTORA:

MARÍA ELENA MALDONADO RODRÍGUEZ


Quito, febrero 2020

Cesión de derechos de autor.

Nosotros, Sebastián Daniel Varela Villarroel con documento de identificación N° 1718948720 y Gilson Alexis Musuña Rojas con documento de identificación N° 1723591192, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo de titulación titulado: “Evaluación de la eficacia antimicrobiana *in vitro* de cápsulas de extracto fluido de *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño); en infecciones agudas del tracto urinario”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero/a en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en nuestra condición de autores nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, febrero del 2020



Sebastián Daniel Varela Villarroel

C.I. 1718948720



Gilson Alexis Musuña Rojas

C.I. 1723591192

Declaración de coautoría del docente tutor/a

Yo, María Elena Maldonado Rodríguez, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “Evaluación de la eficacia antimicrobiana *in vitro* de cápsulas de extracto fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño); en infecciones agudas del tracto urinario”, realizado por Sebastián Daniel Varela Villarroel y Gilson Alexis Musuña Rojas, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, febrero del 2020



María Elena Maldonado Rodríguez

C.I. 1707743157

Dedicatoria

El presente trabajo se lo dedico a Dios, a mis padres Carlos Varela y Sandra Villarroel, mis pilares fundamentales en la vida, quienes con su aliento, consejo, confianza y amor forman parte esencial de este logro, ya que soy y vivo por ellos. Al amor de mi vida Alejandra Medrano quien siempre me apoyo y ayudo incondicionalmente en todo este proceso. A mi hermano David Varela quien siempre ha estado presente y pendiente en esta trayectoria.

Gracias a todos por creer en mí y apoyarme de diversas formas en mis sueños, los amo infinitamente, siempre estaré agradecido, los cuidare y ayudare en todo,

Sebastián Daniel Varela Villarroel

El presente trabajo de titulación lo dedico a mis padres José Musuña y María Rojas, por haber sido el pilar fundamental en este logro universitario, ya que con su amor y apoyo en los momentos buenos y adversos me enseñaron a valorar cada momento de la vida y afrontar cualquier dificultad que se presente. También va dedicado a mis hermanos: Fabricio, Cristian y Joao porque cuando más los necesite siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y darme ánimos, lo cual me fue de gran ayuda para poder culminar mi etapa universitaria.

Dios mediante, en un futuro pueda compensarles todo el tiempo dedicado hacia mí y sin duda este logro también es de ustedes, estoy infinitamente agradecido.

Gilson Alexis Musuña Rojas

Agradecimientos

A la Universidad Politécnica Salesiana por habernos otorgado las herramientas y oportunidades necesarias para convertirnos en excelentes profesionales. También estamos muy agradecidos con los docentes de la carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales por compartirnos y enseñarnos sus conocimientos y experiencias a lo largo de nuestros estudios.

A nuestra tutora, María Elena Maldonado, Ph.D. por confiar en nosotros y darnos la oportunidad de ser colaboradores en el Grupo de Investigación BIOARN, por su guía, sinceridad, consejos, conocimientos, apoyo incondicional, paciencia y formación los cuales nos ayudaron a el desarrollo del presente trabajo.

A la Ing. Alejandra Medrano por su inmensa colaboración desde el inicio hasta el fin del trabajo y al profesor Paco Noriega, Ph.D. quien aportado en la interpretación de los resultados de la investigación realizada.

Yo, Sebastián Varela agradezco a mis padres Sandra Villarroel y Carlos Varela por todo el sacrificio y apoyo incondicional brindado durante toda mi vida universitaria y a la Ing. Alejandra Medrano por su apoyo, amistad y amor presentes en todo momento.

Yo, Alexis Musuña agradezco a mi amigo y compadre Andrés Granada por brindarme sus consejos, pero sobre todo por una amistad sincera. A mis amigos de la universidad que de una u otra forma fueron participes en mi vida universitaria. Por último, agradecer a mi compañero de tesis Sebastián Varela, quien por su esfuerzo y dedicación en el trabajo de titulación hizo posible haber cumplido este logro tan importante.

Índice General

<i>Introducción</i>	1
<i>Capítulo I</i>	6
<i>1. Marco conceptual</i>	6
1.1 Género <i>Vaccinium</i>	6
1.2 Especie <i>Vaccinium floribundum kunth</i> (Mortiño).....	6
1.2.1 Ubicación geográfica.....	6
1.2.2 Descripción botánica.....	7
1.2.3 Composición química.....	8
1.2.4 Usos de <i>Vaccinium floribundum Kunth</i> (mortiño).....	12
1.3 Extracto fluido.....	12
1.3.1 Definición.....	12
1.3.2 Elaboración.....	13
1.4 Granulación húmeda.....	14
1.4.1 Definición.....	14
1.4.2 Etapas de granulación húmeda.....	14
1.5 Cápsulas.....	14
1.5.1 Cápsulas de gelatina dura.....	15
1.6 Métodos de cuantificación.....	17
1.6.1 Método Folin-Ciocalteu (FC).....	17
1.6.2 Método pH diferencial.....	18
1.7 Infecciones del tracto urinario (ITU).....	19
1.7.1 Clasificación de infecciones de tracto urinario.....	19

1.7.2 Bacterias uropatógenas.....	21
1.8 Cantidad mínima inhibitoria (CMI).	23
1.8.1 Definición.....	23
1.8.2 Microdilución.....	23
<i>Capítulo II</i>	24
2. Metodología	24
2.1. Diseño experimental	24
2.2 Recolección.....	25
2.3 Localización del estudio.....	26
2.4 Elaboración del extracto fluido	26
2.5 Formulación de cápsulas duras con 3 concentraciones: 150, 200 y 250 mg de extracto fluido de mortiño.....	27
2.5.1 Elaboración del granulado.....	27
2.5.2 Encapsulación	28
2.5.3 Pruebas control de calidad.	29
2.6 Cuantificación de compuestos bioactivos	32
2.6.1 Cuantificación de fenoles totales.	32
2.7 Evaluación de la actividad antimicrobiana (concentración mínima inhibitoria) contra bacterias uropatógenas <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922TM y <i>Staphylococcus</i> <i>saprophyticus</i> ATCC 1535D-5TM	36
2.7.1 Preparación de soluciones de granulados.....	36
2.7.2 Reactivación de cepas.	36
2.7.2 Preparación de soluciones madre.....	37

2.7.2 Microdilución en caldo.	37
<i>Capítulo III</i>	40
3. Resultados y Discusión	40
3.1. Extracto fluido.....	40
3.2. Granulados de 150, 200 y 250 mg	41
3.2.1 Cuantificación de fenoles totales de granulados.	41
3.2.2 Cuantificación de Antocianinas	43
3.3. Encapsulación	44
3.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	47
3.4.1 <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922TM.....	47
3.4.2 <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 1535D-5TM	53
Conclusiones	59
Referencias	59
Anexos	69

Índice de tablas

Tabla 1. Composición química <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth (mortiño).	9
Tabla 2. Principales antocianinas en las plantas superiores	11
Tabla 3. Técnicas para extracción de fluidos vegetales	13
Tabla 4. Técnicas para extracción de fluidos vegetales	14
Tabla 5. Tamaños de cápsulas de gelatina dura	15
Tabla 6. Frecuencia de microorganismos uropatógenos en la ITU.....	19
Tabla 7. Formulación farmacéutica de cápsulas duras de extracto fluido de <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth (mortiño).....	28
Tabla 8. Contenido de buffers (pH 1-4,5) empleados en la técnica de pH diferencial	35
Tabla 9. Absorbancia vs concentración para curva de calibración de ácido gálico para fenoles totales.....	42
Tabla 10. Concentración de fenoles totales de los 3 granulados.....	43
Tabla 11. Concentración de Antocianinas totales de los 3 granulados	44
Tabla 12. Forma farmacéutica de cápsulas de extracto fluido de <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth (mortiño) en sus 3 presentaciones	45
Tabla 13. Peso y longitud promedio de las cápsulas.....	45
Tabla 14. Recuento de microorganismos	46
Tabla 15. Porcentaje de Inhibición de granulados de 150, 200 y 250 mg de extracto fluido de <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth (mortiño), contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922TM.....	48
Tabla 16. Porcentaje de Inhibición de granulados de 150, 200 y 250 mg de extracto fluido de <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth (mortiño), contra <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 1535D-5TM.	54

Índice de figuras

Figura N° 1. Planta de mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth); A: hojas de la planta de mortiño, B: flores de la planta de mortiño.....	8
Figura N° 2. Estructura química de antocianina, A y C: un benzopirilio y B un anillo fenólico.....	11
Figura N° 3. Reacción química de antocianinas a diferentes niveles de pH.....	18
Figura N°4. Diagrama experimental.	25
Figura N°5. Diagrama de elaboración de extracto fluido alcohólico de mortiño	27
Figura N°6. Elaboración de granulado.....	28
Figura N° 7. Diagrama de encapsulación de los granulados.	29
Figura N° 8. Evaluación microbiológica de las cápsulas de mortiño	31
Figura N° 9. Pruebas de control de calidad.....	32
Figura N° 10. Reactivación de cepas uropatógenas, (A = cepas comerciales ATCC; B = reactivación de cepas en TSB; C = CRIOBANK de cada una de las cepas).....	37
Figura N° 11. Curva de calibración de ácido gálico para fenoles totales	42
Figura N° 12. Porcentaje de inhibición de granulados de extracto fluido contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922TM.....	52
Figura N° 13. Porcentaje de inhibición de granulados de extracto fluido contra <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 1535D-5TM	58

Índice de anexos

Anexo No.1. Estándares de ácido gálico para curva de calibración (A = blanco; B = 1 ppm; C = 2 ppm; D = 10 ppm; E = 20 ppm; F = 50 ppm; G = 80 ppm).....	69
Anexo No.2. Mediciones de muestras de granulados para cuantificación de fenoles totales, (A = blanco; B = 150 mg; C = 200 mg; D = 250 mg).	70
Anexo No.3. Cuantificación de antocianinas en extracto fluido y granulados de extracto fluido de <i>Vaccinium floribundum Kunth</i> (mortiño), por el método de pH diferencial.....	71
Anexo No.4. Distribución del contenido de cada microplaca para la microdilución.	72
Anexo No.5. Resultados de cuantificación de fenoles totales: Absorbancias y concentraciones en diferentes unidades de medida.....	73
Anexo No.6. Resultados de cuantificación de antocianinas: Absorbancias y concentraciones en diferentes unidades de medida.....	74
Anexo No.7. Análisis estadístico de cuantificación de fenoles totales: Análisis de varianza y test de Tukey al 5 %	75
Anexo No.8. Análisis estadístico de cuantificación de antocianinas: Análisis de varianza y test de Tukey al 5 %	76
Anexo No.9. Control de calidad de cápsulas de extracto fluido, pruebas microbiológicas después de 24 horas de incubación.....	77
Anexo No.10. Control de calidad de cápsulas de extracto fluido de <i>Vaccinium floribundum Kunth</i>	78
Anexo No.11. Lectura de absorbancias de la MIC obtenidas mediante el equipo Microplate Reader para el granulado de 150 mg de extracto fluido de <i>Vaccinium floribundum Kunth</i> contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922TM.	82

Anexo No.12. Lectura de absorbancias de la MIC obtenidas mediante el equipo Microplate Reader para el granulado de 200 mg de extracto fluido de <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922TM.	83
Anexo No.13. Lectura de absorbancias de la MIC obtenidas mediante el equipo Microplate Reader para el granulado de 250 mg de extracto fluido de <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth contra <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922TM.	84
Anexo No.14. Lectura de absorbancias de la MIC obtenidas mediante el equipo Microplate Reader para el granulado de 150 mg de extracto fluido de <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth contra <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 1535D-5TM.....	85
Anexo No.15. Lectura de absorbancias de la MIC obtenidas mediante el equipo Microplate Reader para el granulado de 200 mg de extracto fluido de <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth contra <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 1535D-5TM.....	86
Anexo No.16. Lectura de absorbancias de la MIC obtenidas mediante el equipo Microplate Reader para el granulado de 250 mg de extracto fluido de <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth contra <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ATCC 1535D-5TM.....	87
Anexo No.17. Promedio de las 8 repeticiones de cada microdilución	88
Anexo No.18. Control de extracto fluido de <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth.....	89
Anexo No.19. Control de calidad de granulados de 150 mg, 200 mg y 250 mg de extracto fluido de <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth.....	90

Resumen

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son frecuentes en hombres y mujeres de todo el mundo, en el Ecuador, 4 de cada 10 habitantes las presentan con mayor incidencia en mujeres, las principales bacterias uropatógenas son *Escherichia coli* y *Staphylococcus saprophyticus*. *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño) ha sido empleado en la medicina tradicional para combatir las ITU; por lo que, para evaluar su eficacia antimicrobiana *in vitro*, primero se elaboró un extracto fluido a partir del cual se formularon granulados de 150, 200 y 250 mg en los cuales se realizó la cuantificación de fenoles totales y antocianinas, finalmente se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada granulado frente a las cepas *E. coli* ATCC 25922TM y *S. saprophyticus* ATCC 1535D-5TM. En la MIC para el granulado de 150 mg contra *E. coli* ATCC 25922TM es de 90 μ L (65,15 %) y para *S. saprophyticus* ATCC 1535D-5TM es de 90 μ L (50,48 %); en el granulado de 200 mg contra *E. coli* ATCC 25922TM es 70 μ L (90,31 %) y para *S. saprophyticus* ATCC 1535D-5TM es de 70 μ L (91,17 %), en el granulado de 250 mg contra *E. coli* ATCC 25922TM es de 50 μ L, (87,51 %) y para *S. saprophyticus* ATCC 1535D-5TM es de 50 μ L (86,56 %).

Los granulados de 200 y 250 mg alcanzan inhibiciones del 100 %, lo cual evidencia que el mortiño es eficaz como alternativa para las infecciones del tracto urinario.

Palabras claves: ITU, extracto fluido fenoles totales, antocianinas, MIC.

Abstract

Urinary tract infections (UTIs) are common in men and women around the world, in Ecuador, 4 out of 10 inhabitants present them with a higher incidence in women, the main uropathogenic bacteria are *Escherichia coli* and *Staphylococcus saprophyticus*. *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño) has been used in traditional medicine to combat ITU; Therefore, to evaluate its antimicrobial efficacy in vitro, a fluid extract was first made from which 150, 200 and 250 mg granules were formulated in which the quantification of total phenols and anthocyanins was made, finally the minimum concentration was determined inhibitory (MIC) of each granulate against *E. coli* ATCC 25922TM and *S. saprophyticus* ATCC 1535D-5TM strains. In the MIC for the 150 mg granulate against *E. coli* ATCC 25922TM it is 90 μ L (65,15 %) and for *S. saprophyticus* ATCC 1535D-5TM it is 90 μ L (50,48 %); in the 200 mg granulate against *E. coli* ATCC 25922TM it is 70 μ L (90,31 %) and for *S. saprophyticus* ATCC 1535D-5TM is 70 μ L (91,17 %), in the 250 mg granule against *E. coli* ATCC 25922TM is 50 μ L, (87,51 %) and for *S. saprophyticus* ATCC 1535D-5TM is 50 μ L (86,56 %).

The 200 and 250 mg granules reach 100 % inhibitions, which shows that the death is effective as an alternative for urinary tract infections.

Keywords: ITU, total phenolic fluid extract, anthocyanins, MIC

Introducción

El tracto urogenital es generalmente una fuente de infección, los uropatógenos causantes son similares en hombres y mujeres, las infecciones agudas del tracto urinario (ITU) se pueden clasificar en dos categorías anatómicas generales: infecciones del tracto inferior de la vejiga (cistitis) y del tracto superior del riñón (pielonefritis). Las ITU son más frecuentes en las mujeres debido a los pocos centímetros que deben recorrer los microorganismos para llegar a la vejiga (Blanco et al. 2016; Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2013; Pigrau, 2013; Wurgaft, 2016). Se presentan en todos los grupos etarios: en edades tempranas tienen un mayor predominio en niños, por la aparición de fimosis en los niños que favorece la colonización del meato urinario y la uretra; mientras que en adultos es más frecuente en las mujeres con edad entre 20 y 56 años. Se estima que entre 40 y 50 % de las mujeres presenta infecciones en algún momento de su vida y de éstas, 11 % tendrá al menos una infección por año; contrario a la situación de los hombres menores de 50 años, presentan una baja prevalencia. La mayor prevalencia en mujeres se ha explicado por condiciones anatómicas, básicamente el corto tamaño de uretra y su cercanía al ano, por ende se aumenta el riesgo de infección por enterobacterias (Andreu et al. 2011; Andreu and Planells 2016; Blanco et al. 2016; Pigrau, 2013).

En el Ecuador el 4 de cada 10 habitantes fueron reportadas en el año 2009 con ITU, según los datos del Ministerio de Salud Pública, las estadísticas demuestran que, las ITU afectan al 20 % de las mujeres y a varones afectan al 0,10 % entre las edades de 20 y 50 (Aranda, 2016; INEC, 2013; Martínez, 2018; Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2013). Actualmente es evidente el alto grado de resistencia de los microorganismos a los antibióticos de uso farmacéutico, que se da cuando sufren cambios que hacen que los medicamentos utilizados para combatirlos dejen de ser eficaces. Este hecho es muy preocupante porque las infecciones por

microorganismos resistentes pueden causar la muerte del paciente y transmitirse a otras personas (Andreu et al. 2011; Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2013; OMS, 2017). La resistencia a los antimicrobianos se produce por el uso inadecuado de los medicamentos, como por ejemplo, al tomar antibióticos para tratar infecciones víricas, no tomar la dosis completa, automedicarse, o al utilizar medicamentos vencidos o adulterados (Andreu et al. 2011; Chindembele et al. 2017; Gonzalez, Rodríguez, and Delgado, 2019; OMS, 2017; Yagui, 2018).

Para la prevención y tratamiento de las ITU, en norte América desde 1914 se ha utilizado el jugo de arándano, varios autores establecen que el género *Vaccinium* presenta grandes cantidades de fenoles, flavonoides, en especial antocianinas que actúan sobre las bacterias causantes de la enfermedad, se ha estudiado y comprobado, *in vitro*, en modelos celulares y *en vivo*, el beneficio del extracto de arándano rojo americano (*Vaccinium macrocarpon*) y arándano azul (*Vaccinium corymbosum*) en la prevención y tratamiento de ITU, se debe al efecto inhibitorio de las antocianidinas sobre la adhesión bacteriana de *Escherichia coli* (mayor causante de ITU), principalmente de las fimbrias (Ramirez and Chiroque Sánchez, 2017; Aranda, 2016; Barnoiu et al. 2015; Bueno, 2019; Mendes, 2019; Olszewski, 2017).

Hoy en día se encuentran disponibles en el mercado farmacológico y natural, productos derivados de estas dos especies, en diferentes presentaciones, cápsulas, comprimidos, polvos; sin embargo, los cuales en Ecuador al ser importados llegan a tener precios que varían entre 40-80 USD (Mercadolibre, 2019), siendo este un costo que no está al alcance de todos.

De esta manera, la presente investigación pretende evaluar ¿Qué tan eficaces son las cápsulas de extracto fluido de *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño) especie nativa de Ecuador; contra infecciones agudas del tracto urinario?

En Ecuador existe un familiar de los arándanos rojo y azul que son comercializados a nivel mundial con fines medicinales; el mortiño *Vaccinium floribundum Kunth* es conocido por su alta presencia de antocianinas y compuestos fenólicos, los cuales le confieren características antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes por lo que es un candidato ideal para combatir las infecciones urinarias (Ayala, 2017; Vasco, 2009; Vizúete et al. 2016). A través de los años la medicina tradicional y natural han promovido el consumo de *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño), por producir efectos positivos para la salud, una de las funciones del uso del mortiño en la medicina natural es prevenir y tratar las infecciones del tracto urinario (Aranda, 2016; Garrido, 2014; Wojnicz et al. 2012).

El uso de la fitoterapia se basa en el empleo terapéutico de plantas medicinales como sustitutas de las medicinas sintetizadas en laboratorios farmacológicos o en combinación; vale recalcar que los principios activos de síntesis fueron obtenidos de plantas; los medicamentos herbarios son: plantas o partes de ellas, estos medicamentos formaron parte del primer grupo terapéutico que disponía el hombre para tratar enfermedades, sin embargo, desde los principios del hombre existen escritos de cómo las plantas fueron utilizadas en diferentes formas de preparados, como: infusiones, extractos, jarabes, emplastos y cataplasmas, con diferentes finalidades como: conservación, potenciar su efecto, forma de aplicación u ocultar características organolépticas no deseadas, varias de las ventajas de esta medicina son: sus costos bajos, margen terapéutico amplio y los reducidos índices de toxicidad (Gallegos, 2016; OMS, 2017).

En la actualidad, los fármacos de síntesis presentan una serie de contraindicaciones como, la resistencia por parte de los microorganismos que tienen que atacar y efectos indeseables como alergias y toxicidad, lo que no sucedía al usar remedios ancestrales o medicina natural. Agregado a esto, gran parte de la población no puede acceder a la medicina alopática por sus

costos elevados, la dificultad de conseguir una cita médica en servicios de la seguridad social y hospitales públicos (Cesoniene, Jasutiene, and Sarkinas, 2009; Gonzalez, Rodríguez, and Delgado, 2019; Vizuite et al. 2016).

Muchos de los compuestos bioactivos del género *Vaccinium* tienen un potencial uso terapéutico, son eficaces en el tratamiento de múltiples enfermedades y tienen la ventaja de no producir efectos secundarios como: reacciones alérgicas, al contrario de algunos fármacos de síntesis; para la demostración de la actividad antimicrobiana se han utilizado diversas técnicas y pruebas microbiológicas donde se utilizan derivados de plantas como: tinturas o extractos (Fisher et al. 2012; Sotomayor, 2013; Yagui, 2018).

Las plantas de *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño), crecen naturalmente en las tierras altas de los Andes de Ecuador, las principales provincias productoras de mortiño son: Carchi, Imbabura, Pichincha, Tungurahua Chimborazo, Azuay y producen una fruta morada (baya), dulce con un sabor agradable. Las bayas del género *Vaccinium* tales como los arándanos rojos y azules se conocen en la actualidad como superfrutas, esto se debe a su alta concentración de compuestos bioactivos mencionados anteriormente, que les confieren muchas propiedades, entre ellas: antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, analgésicas (Coba, Coronel, et al., 2012; Llivisaca et al. 2018; Vasco et al. 2009; Vizuite et al. 2016).

Este estudio representa un beneficio investigativo en campo médico y revaloriza este fruto andino silvestre en riesgo de extinción, ya que no existen estudios referentes a la inhibición de cepas bacterianas uropatógenas por cápsulas de *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño).

Por lo tanto el objetivo de la presente investigación es evaluar eficacia antimicrobiana *in vitro* de cápsulas de extracto fluido de *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño); en infecciones

agudas del tracto urinario y para el cumplimiento del mismo se obtuvo un extracto fluido de mortiño, se formuló cápsulas duras con 3 concentraciones: 150, 200 y 250 mg de extracto fluido de mortiño, se cuantificó los principios activos que proporcionan la capacidad antimicrobiana y se evaluó la actividad antimicrobiana (cantidad mínima inhibitoria) contra bacterias uropatógenas *Escherichia coli* ATCC 25922TM y *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM, la hipótesis del trabajo es la siguiente, las cápsulas de extracto fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño) producen inhibición de *Escherichia coli* ATCC 25922TM y *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM, bacterias uropatógenas.

Capítulo I

1. Marco conceptual

1.1 Género *Vaccinium*.

La familia Ericácea tiene 4500 especies a nivel mundial, dentro de ella se encuentra el género *Vaccinium*, que cuenta con 400 a 450 especies descubiertas aproximadamente, y que están distribuidas por todo el mundo. Se caracteriza por tener especies herbáceas o arbustivas, de entre 2 a 4 m de altura; hojas coriáceas y alternas; flores axilares o terminales con 8 a 10 estambres con anteras y ovario ínfero (Abdelnour y Jiménez, 2018; León, González, y Rivero, 2017; Medina et al. 2016).

Los frutos del género *Vaccinium* son bayas esféricas, generalmente poseen de 8 a 18 semillas blandas en su interior, agradable sabor, con gran cantidad de polifenoles, y que se caracterizan por ser colorantes y antioxidantes. Además, poseen: diferentes tipos de glucosidos, lípidos, fibras, vitaminas, antocianinas, fenoles, minerales, benzenoides, ácido hidroxicinámico, flavonoides y fenilpropanoides. Estudios realizados demuestran que dietas ricas en estos compuestos tienen efecto positivo frente a enfermedades cardiovasculares, vías urinarias, degenerativas y ciertos tipos de cáncer; además, otras investigaciones afirman que los arándanos silvestres pueden inhibir la etapa de iniciación de la carcinogénesis (Abdelnour y Jiménez, 2018; León, González, y Rivero, 2017; Medina et al. 2016).

1.2 Especie *Vaccinium floribundum kunth* (Mortño)

1.2.1 Ubicación geográfica.

Vaccinium floribundum Kunth (mortño) se encuentra en los páramos andinos del Ecuador, en la Cordillera Andina que cruza toda la sierra ecuatoriana, se registra la presencia del mortño en alturas comprendidas entre los 2500 y 3200 m.s.n.m. abundante en bosques húmedos

montanos, crece de manera silvestre y no requiere tratamiento ni cuidados especiales, produce frutos anualmente, donde la cosecha frecuentemente es en el mes de octubre hasta diciembre; los páramos de la provincia de Pichincha e Imbabura son los mayores productores de mortiño; el desarrollo ideal se da en climas fríos y templados, en temperaturas entre los 8 y 16 °C (Guzmán, 2017; Idrovo, 2015; Llivisaca et al., 2018).

“Los nombres vulgares con los cuales se conoce al *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño) en Ecuador son: mortiño, uva de los Andes, manzanilla de cerro, raspadura quemada, uva de monte” (Coba et al., 2012).

1.2.2 Descripción botánica.

Según su taxonomía pertenece al Reino Plantae, Filo Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Orden Ericales, Familia Ericaceae, Nombre Científico *Vaccinium floribundum*, Sinonimia *Vaccinium mortinia* (Freire, 2004).

Es un arbusto caducifolio de 0,20 a 2,50 m de altura, presenta un crecimiento vertical, sus hojas son coriáceas, elípticas, ovaladas u ovaladas lanceoladas de 2 cm de largo, su base redonda semi cuneada, su ápice es ligeramente redondeado acuminado, y su margen es aserrado y a su vez cuneado sus inflorescencias axilares son racimos de 6 a 10 flores, su fruto es redondo, de un color azulado a negro, cuyo diámetro está entre los 5 a 8 mm, contiene gran cantidad de semillas que habitualmente son difíciles de detectar debido a su pequeño tamaño (Abril, Ruiz, & Cumbal, 2018; Flores, 2017). En el estudio realizado por Coba et al. (2012) mencionan que “en el Ecuador se encuentran registradas tres especies de mortiño, la cuales son: *V. Crenatum*, *V. distichum* y *V. floribundum*, siendo ésta última la especie más común”.

Planta de mortiño en su hábitat natural



Figura N° 1. Planta de mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*);
A: hojas de la planta de mortiño, B: flores de la planta de
mortiño
Fuente: (Hoskovec, 2017)

1.2.3 Composición química.

Para Vizuite et al. (2016) el mortiño es conocida por su alta actividad antioxidante, antimicrobiana y antiinflamatoria debido a la presencia de antocianinas y compuestos fenólicos.

En la tabla 1 se presenta la composición química del mortiño.

Tabla 1.Composición química *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño).

Componente	Cantidad
Análisis proximal	
Humedad (g/100g)	81,00±2,00
Grasa (g/100g)	1,00±0,04
Proteína (g/100g)	0,70±0,02
Ceniza (g/100g)	0,40±0,03
Carbohidratos totales (g/100g)	16,90±0,10
Fibra dietética total (g/100g)	7,60±2,20
Fibra dietética soluble (g/100g)	1,20±1,00
Fibra dietética Insoluble (g/100g)	6,50±2,50
Azúcares solubles	
Fructosa (g/100g)	4,40±0,40
Glucosa (g/100g)	2,60±0,30
Valor Calórico (Kcal/100Gpf)	84±0,40
Ácidos orgánicos	
Ácido cítrico (mg/100g)	3142±614
Ácido málico (mg/100g)	1823±274
Minerales	
Fe (mg/100g)	0,64±0,20
K (mg/100g)	607±73,00
Ca (mg/100g)	17,00±2,30
Mg (mg/100g)	10,20±1,10
Cu (mg/100g)	0,12±0,02
Zn (mg/100g)	0,13±0,02
Componentes antioxidantes	
Ácido ascórbico (mg/100g)	9,00±2,00
B-caroteno (µg/100g)	36,00±6,00
Contenido fenólico soluble total (mg AG/100g)	882±38
Capacidades antioxidantes TEAC (mg Trolox/100g)	1203 ±94
Antocianinas (cianidina-3-O-glucosídica) (mg/100g PF)	345

Nota: Descripción del contenido químico presente en el mortino.**Fuente:** (Garrido, 2015; Vasco et al. 2009).

1.2.3.1 Fenoles totales

Los fenoles totales o polifenoles están formados por un anillo aromático, el cual se encuentra unido un grupo fenol a un grupo oxhidrilo, la estructura de ácido benzoico es una de las más sencillas, sin embargo con otros sustituyentes en el anillo aromático tienen la capacidad de

formar ácidos fenólicos como por ejemplo el ferúlico, cumárico y cinámico (Bedascarrasbure, Maldonado, Álvarez, y Rodríguez, 2004).

Se usan en las industrias: agrícolas, nutricionales, cosméticas y de alimentos puesto que son estructuras complejas, que pueden llegar a tener cerca de 8000 sustancias clasificadas acorde a su estructura (Cabrera, Salinas, Velázquez, y Espinosa, 2009; S. Zapata, Piedrahita, y Rojano, 2014).

1.2.3.2 Antocianinas

Las antocianinas pertenecen al grupo de los flavonoides, son antioxidantes que permiten disminuir el daño oxidativo provocado por radicales libre, relacionándose con la actividad anticancerígena, antiinflamatoria y antitumoral. Estos compuestos se caracterizan por ser pigmentos hidrosolubles, además de ser las responsables de la coloración rosada, morada, roja, azul, etc. en los tejidos vegetales de flores, frutos y hojas (Deroles, 2008; Guerrero y Castañeda 2015).

1.2.3.2.1 Estructura química

Están constituidas por una molécula de antocianidina, la misma que es aglicona, la cual se encuentra unida a un azúcar por medio de un enlace β -glucosídico. Las agliconas están conformadas por un ion flavilio, conocido también como 2-fenil-benzopirilio, que tiene dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A y C) y un anillo fenólico (B) (ver figura No 2), estos dos se encuentran unidos por una cadena constituida por tres átomos de carbono (Aguilera et al., 2011).

Estructura química general de las antocianinas

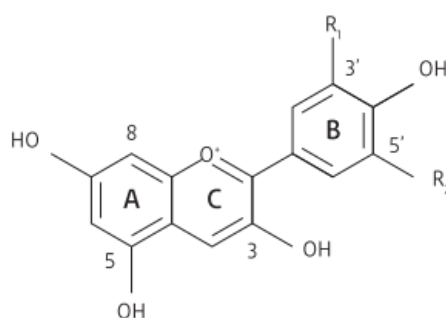


Figura N° 2. Estructura química de antocianina, A y C: un benzopirilio y B un anillo fenólico

Fuente: (Estévez & Mosquera, 2009)

1.2.3.2.2 Clasificación

En la actualidad se han identificado cerca de 635 antocianinas, que se diferencian en la naturaleza por las sustituciones glicosídicas en las posiciones 3' y 5' o 5' y 7' con mono, di o trisacáridos, los cuales cumplen un rol en incrementar o disminuir la solubilidad (Guerrero y Castañeda, 2015; L. Zapata 2014).

Existen seis antocianinas más frecuentes según la estructura del anillo B, estas antocianinas son la pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina y delphinidina (Guerrero y Castañeda, 2015, p. 28), las mismas que a una cierta absorbancia se puede distinguir diferentes colores (Tabla 2).

Tabla 2.

Principales antocianinas en las plantas superiores

Aglicona	Substitución		Amáx (nm)
	R ₁	R ₂	Espectro visible
Pelargonidina	H	H	494 (naranja)
Cianidina	OH	OH	506 (naranja-rojo)
Delfinidina	OH	OH	508 (azul-rojo)
Peonidina	OCH ₃	H	506 (naranja-rojo)
Petunidina	OCH ₃	OH	508 (azul-rojo)
Malvinidina	OCH ₃	OCH ₃	510 (azul-rojo)

Nota: Tomado de clasificación de antocianinas según el espectro

Fuente: (Garzón, 2008).

1.2.4 Usos de *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño).

En el Ecuador es utilizada generalmente para fines gastronómicos como la elaboración de la colada, postres, mermeladas, jaleas, harina, vinos y bebidas no fermentadas (Ayala, 2017; Vasco et al., 2009).

Se reportan usos en medicina tradicional para: personas con bajos niveles de azúcar en la sangre, infecciones a las vías urinarias, problemas digestivos, reumatismo, fiebre, cólicos, gripe, dolencias del hígado y pulmonares; el follaje es utilizado como: fuente de leña y floristería; además, se reporta su uso en la antigüedad, como tinte natural de ropa, pues su color morado oscuro es duradero. En el Ecuador, no existen cultivos comerciales de la especie, el desconocimiento de las propiedades de este fruto ha hecho que la especie desaparezca de los mercados y de su estado natural, la comercialización y explotación está basado en la recolección informal de este fruto realizada por los denominados busca mortiños. Actualmente existen proyectos de desarrollo como: “Hombro a hombro” que impulsa a la comunidad de Sigchos ubicada en la provincia de Cotopaxi a la producción de derivados de mortiño, como: mermeladas y vinos (Coba et al., 2012; Flores, 2017; Ortiz et al. 2013; Vasco 2017; Vizúete et al. 2016).

1.3 Extracto fluido.

1.3.1 Definición.

Los extractos fluidos también denominados extractos líquidos, contienen alcohol como disolvente principal o como preservante para preparaciones de drogas vegetales, dicha preparación garantiza que cada mililitro contenga los constituyentes extraídos de 1 gramo del material vegetal empleada (Solís et al., 2003).

Estas preparaciones son ajustadas, de tal manera que satisfagan los requerimientos para el contenido de solvente y donde sea aplicable (Gennaro, Remington y Belluci, 2003).

1.3.2 Elaboración.

El extracto se puede producir por percolación, maceración, infusión, extracción continua en caliente (Soxhlet) y decocción (Tabla 3), donde se concentrará hasta la consistencia indicada evitando siempre la acción prolongada del calor y temperaturas altas, generalmente se debe realizar a temperatura inferior a 50 °C, dependiendo del grado de ebullición del solvente (ANMAT, 2013).

Existen algunos parámetros que se deben tener en cuenta al momento de obtener los extractos vegetales, estos pueden ser: tipo de solvente, naturaleza química del material vegetal, relación que puede existir sólido-líquido, temperatura, viscosidad del medio y tiempo de extracción (Amaguaña y Churuchumbi, 2018).

Tabla 3.

Técnicas para extracción de fluidos vegetales

Pasos	Descripción
Percolación	Es el procedimiento en el que se permite que el disolvente fluya continuamente a través del material vegetal (molido) que se encuentra en un percolador (un recipiente con un flujo de salida en el extremo inferior).
Maceración	Consiste en mezclar la fuente vegetal molida adecuadamente con el solvente y permitir que la mezcla permanezca a una temperatura determinada durante un período de tiempo definido, agitando según sea necesario.
Infusión	Procedimiento de extracción en el que se vierte agua hirviendo sobre la materia vegetal para producir una preparación líquida diluida. Por lo general se deja reposar (generalmente de 5 a 20 minutos).
Decocción	Método más común en medicina tradicional, implica hervir la fuente vegetal en agua, tiempo durante el cual los componentes químicos se disuelven. Este procedimiento es adecuado para extraer componentes activos solubles y termoestables.
Extracción con fluidos supercríticos	Es una técnica moderna que utiliza la propiedad de solvatación de un fluido en su estado supercrítico (dióxido de carbono es el solvente supercrítico más común) para disolver los constituyentes químicos en los materiales herbales.

Fuente: (World Health Organization WHO, 2018)

Elaborado por: Los Autores, 2019

1.4 Granulación húmeda

1.4.1 Definición.

La granulación húmeda es el proceso por el cual se adiciona un aglutinante en un diluyente, aquí los compuestos se unen formando estructuras de un tamaño determinado y homogéneas; las cuales contendrán la misma cantidad de extracto en cada parte de aglutinante (Arndt et al., 2018; Rajniak et al. 2009).

1.4.2 Etapas de granulación húmeda

Las etapas que intervienen en la granulación húmeda son (Tabla 4):

Tabla 4.

Técnicas para extracción de fluidos vegetales

Etapas	Procedimiento
Mezclado:	El fármaco se mezcla con las sustancias que lo acompañarán, como mínimo debe encontrarse un diluyente. Se puede utilizar mezclador de cuerpo móvil o mezclador orbital.
Granulación:	Se añade a la mezcla activa un aglutinante, el cual permitirá la unión de los componentes involucrados, de manera que se forma una granulación irregular
Tamizaje inicial:	La masa mezclada se pasa por tamices de diámetro específico, y se obtiene un granulado homogéneo
Desecación:	Consiste en la eliminación del líquido añadido en el amasado, por tal razón el líquido debe ser volátil. Es primordial el control de humedad, generalmente la humedad para todos los granulados es de 2-3 %.
Tamizaje final:	Una vez seco, se debe tamizar hasta obtener el granulado del tamaño deseado.

Fuente: (Abraham y Casillas, 2014)

Elaborado por: Los Autores, 2019

1.5 Cápsulas

Son formas farmacéuticas sólidas que son administradas por vía oral, formadas por gelatina o mezclas de gelatina y glicerina. Su presentación puede ser de diferentes tamaños. Existen dos formas de clasificar a las cápsulas: cápsulas duras o rígidas y cápsulas flexibles o de gelatina blanda (Alpizar, 2009).

1.5.1 Cápsulas de gelatina dura

Se componen de mezclas de gelatinas A y B con un máximo del 0,15 % de dióxido de azufre (para prevenir la descomposición de la gelatina), agua purificada, colorantes aprobados y cuando se requiere cápsulas que impidan el paso de la luz para proteger al fármaco, se adiciona dióxido de titanio como opacificante (Sánchez, 2014).

La capacidad de la cápsula dependerá de la densidad del polvo o granulado a dosificar, en la tabla 5 se indica ciertas especificaciones.

Tabla 5.

Tamaños de cápsulas de gelatina dura

Cápsula	Capacidad (mL)	Capacidad en mg del material con diferentes densidades			
		$\delta=0,6$ g/mL	$\delta=0,8$ g/mL	$\delta=1,0$ g/mL	$\delta=1,2$ g/mL
000	1,37	822	1096	1370	1644
00	0,95	570	760	950	1140
0	0,68	408	544	680	816
1	0,50	300	400	500	600
2	0,37	222	296	370	444
3	0,30	180	240	300	360
4	0,21	126	168	210	262
5	0,10	78	104	130	156

Nota: Tomado de guía para cápsulas duras

Fuente: (Sánchez, 2014)

1.5.1.1 Pruebas de control de calidad de cápsulas

Las pruebas de control de calidad son muy importantes ya que determinan si el producto que será ingerido o usado por el ser humano es apto, inocuo y seguro, en productos farmacéuticos los controles de calidad son aun mas importantes y rigurosas ya que la salud del paciente dependerá de que el producto farmacéutico haya pasado por los controles necesarios.

Según Hernandez et al., (2014) en extractos alcohólicos o extractos fluidos se deben realizar los siguientes controles: características organolépticas como: aspecto, consistencia, color, olor

impurezas visibles y no hacer pruebas de sabor ya que el alcohol no es para el consumo humano, además de pruebas de sólidos totales. En granulados y cápsulas de grado farmacéutico según (ANMAT, 2013; Benites et al., 2007) debe realizarse las siguientes pruebas de control de calidad: tamaño y peso de cápsulas, porcentaje de humedad de granulado, análisis organoléptico de granulado y un riguroso análisis microbiológico siguiendo los límites permisibles de cada microorganismo.

Control microbiológico de cápsulas: Los productos farmacéuticos como las cápsulas han sido estudiados minuciosamente desde que comenzó su comercialización puesto que, existen microorganismos como las levaduras, hongos y bacterias que generalmente se adhieren a estos productos ya sean en productos terminados o no terminados y que generalmente provocan la pérdida de calidad, su valor comercial, pero sobre todo pueden llegar a causar daños contra la salud humana. Las fuentes de contaminación pueden ser, el agua, el personal operario, aire, material de empaque, u otros factores que no se encuentren esterilizados (Cerra et al., 2013).

Para el control de calidad de las cápsulas existen algunas técnicas como las Placas Petrifilm y MC-Media Pad que facilitan el conteo del número de bacterias, hongos, levaduras, aerobios y coliformes totales; ambas técnicas se basan en el tipo de color que emiten para determinados microorganismos.

MC-Media Pad: Denominados medios de cultivo convenientes, que se destacan por la rapidez para el conteo y la detección de los microorganismos presentes en las cápsulas, productos alimenticios y bebidas. Su mecanismo de acción radica en la utilización de una almohadilla, la cual está recubierta con un medio de cultivo, colores (rojo en aerobios, azul/azul verdoso en coliformes, azul/verde azulado en *Escherichia coli* y coliformes, rojo en levaduras y mohos, azul claro/azul en *Staphylococcus aureus*) y sustrato específico para el crecimiento de los

contaminantes, además la almohadilla se caracteriza por la capilaridad que tiene incluida (Millipore, 2017).

Pruebas microbiológicas para *Pseudomona aeruginosa*: Esta bacteria tiene un metabolismo aerobio (estricto oxidativo), no fermenta carbohidratos, oxidasa positiva, catalasa positiva y sus requerimientos nutricionales son sencillos. Secreta metabolitos secundarios que dan los siguientes colores: piocina (azul), pioverdina (fluorescencia en UV), piorrubina (rojo), piomelanina (marrón), por lo tanto, al sembrar en un medio de cultivo BD Pseudosel Agar (cetrmide agar), se puede observar bajo luz UV, la fluorescencia de la bacteria, lo cual nos indica la presencia o ausencia de esta bacteria en la muestra.

1.6 Métodos de cuantificación

1.6.1 Método Folin-Ciocalteu (FC).

Es una técnica analítica conveniente para la determinación de polifenoles totales en materiales biológicos. La precisión de los resultados obtenidos con este método está determinada por los estándares equivalentes utilizados y el reactivo Folin-Ciocalteu, que contiene Molibdeno VI. Los compuestos fenólicos se determinan en función de la reducción de Mo_6^+ a Mo_5^+ , que es azul y se puede medir ópticamente a 730 nm (Chen, Cheng, y Liang, 2015).

Para (Espinosa, Garzón, y Medina, 2016, p. 112), el reactivo Folin-Ciocalteu tiene el ácido gálico como molécula referencia, es una solución acuosa de color amarillo que contiene fosfotungstato-molibdatos que son capaces de capturar uno o dos electrones redox y formar especies de color azul (por ejemplo, el $(PMoW_{11}O_{40})_4^-$).

El método FC puede sufrir ciertas alteraciones al encontrarse en presencia de azúcares, aminas aromáticas, dióxido de azufre, ácido ascórbico, ácidos orgánicos y hierro (II), además de otras

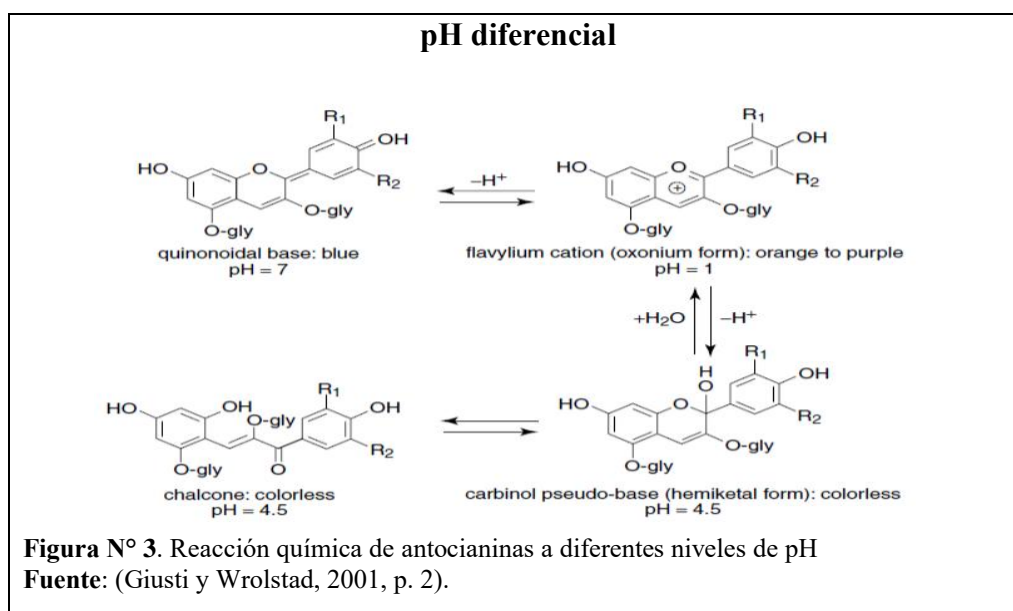
sustancias como enediones y reductonas. Por lo tanto, es necesario corregir las sustancias que interfieren para evitar el sesgo debido a la presencia de estas (Prior, Xu, y Schaich, 2005).

1.6.2 Método pH diferencial.

Para Paredes (2019) es un método basado en la reacción de dos buffers y permite una medida exacta de antocianinas, debido a que las antocianinas experimentan una transformación reversible con los cambios de pH generando distintas absorbancias.

Los pigmentos de antocianinas pueden experimentar algunas transformaciones estructurales reversibles mediante un cambio en el pH, en donde a un pH 1,0 el ion oxonio (hidronio) se colorea, mientras que a un pH 4,5 la forma hemiacetal se torna incolora. Por lo tanto, el método de pH diferencial es una técnica de medición precisa y rápida de las antocianinas totales. (Giusti y Wrolstad, 2001).

En la figura N° 3 se puede ver los colores que tomarían ciertos compuestos en presencia de diferentes pH.



“El método de pH diferencial es el procedimiento más utilizado para la cuantificación de antocianinas monoméricas” (Giusti y Wrolstad, 2001).

1.7 Infecciones del tracto urinario (ITU).

Estas infecciones se definen como: la presencia, multiplicación e invasión de microorganismos (Tabla 6) en el tracto urinario (incluye vejiga y uretra), ocasionando daño e infección a los tejidos, existen dos tipos de infecciones: cistitis y pielonefritis mencionados anteriormente; si no son tratadas correctamente y a tiempo pueden dar lugar a una infección renal (Andreu et al., 2011; Aranda, 2016).

Tabla 6.

Frecuencia de microorganismos uropatógenos en la ITU

Microorganismo aislado	Porcentaje (%)
<i>Escherichia coli</i>	69,5
<i>Staphylococcus saprophyticus.</i>	9,5
<i>Proteus mirabilis</i>	6,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,8
<i>Estafilococos</i> Coagulasa Negativos	4,8
<i>Morganella morganii</i>	2,9
<i>Citrobacter</i> spp.	0,9
<i>Enterobacter</i> spp.	0,9

Fuente: (Roca y Pajuelo, 2008)

1.7.1 Clasificación de infecciones de tracto urinario.

Dentro de la clasificación se puede dividir en dos grupos que son: infecciones complicadas e infecciones no complicadas. Se diferencia las infecciones no complicadas por el mínimo riesgo de invasión tisular que puede llegar a presentar el paciente y de un tratamiento de corto tiempo (3 días), mientras que las complicadas son tratamientos a largo plazo y generalmente causan daños renales.

1.7.1.1 Infecciones de tracto urinario (ITU) no complicadas.

También conocida como: “ITU agudas, esporádicas o recurrentes inferiores (cistitis sin complicaciones) y/o superior (pielonefritis no complicada), limitada a mujeres premenopáusicas no embarazadas sin anomalías anatómicas y en hombres limitada a menores de edad” (Morena, Rodríguez, y Martínez, 2017).

1.7.1.2 Infecciones de tracto urinario (ITU) complicadas.

Estas infecciones se presentan en personas que tienen condiciones heterogéneas que aumentan el riesgo de la infección o ineficacia del tratamiento, estas condiciones pueden ser: alteraciones anatómicas o funcionales de las vías urinarias, enfermedades predisponentes como: diabetes, inmunodepresión y presencia de uropatógenos resistentes. También se consideran como ITU complicadas a la cistitis y pielonefritis que presentan una sintomatología extendida y aumentada (Buitrago, 2013; Morena, Rodríguez, y Martínez 2017).

1.7.1.3 Infecciones de tracto urinario recurrentes.

Son aquellas que tienen una frecuencia de por lo menos tres episodios anuales o en ciertas ocasiones dos episodios semestrales, se caracteriza por una ITU inferior y una ITU superior, desarrollándose cistitis y pielonefritis respectivamente (Morena et al., 2017).

1.7.1.4 Infecciones de tracto urinario en pacientes con sonda.

“Ocurren en personas en cuyas vías urinarias se colocan sondas en las últimas 48 horas” (Morena et al., 2017).

1.7.1.5 Urosepsis.

Es una infección que es catalogada como una infección complicada, característico por presentar un síndrome infeccioso general y afectación multisistémico, así como una mortalidad elevada

que va del 20 al 42 %. Esta clase de infección suele presentarse en mayor proporción en hombres que en mujeres, además, la severidad dependerá mucho de los factores del huésped, en donde generalmente son más propensos las personas diabéticas, ancianos e inmunosuprimidos (Buitrago, 2013).

1.7.2 Bacterias uropatógenas.

Las bacterias Gram negativas causan la mayoría de ITU. Algunas se adquieren por vía hematológica, pero el 95 % de las infecciones se producen por el ascenso de bacterias desde el introito vaginal y la uretra colonizada hacia la vejiga y, en los casos de pielonefritis aguda no complicada, por vía uretral hacia el riñón. Aunque existen varias bacterias Gram negativas que son recurrentes en ITU (Aranda, 2016; Roca y Pajuelo, 2008; Wurgaft, 2016).

2.7.2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli, es un bacilo gramnegativo, no exigente, oxidasa negativo, catalasa positivo, anaerobio facultativo, cuya temperatura de crecimiento preferentemente es 37 °C, fimbriado y comúnmente es móvil por flagelos peritricos, es la causa más frecuente de ITU, alcanzando entre el 70,0 y 90,0 % según los estudios, tanto en adultos como en la población pediátrica (Aranda, 2016; Scharf et al. 2019).

En *E. coli* se han identificado cuatro grupos filogenéticos que son los responsables de las afectaciones en las personas, a los que se denominan A, B1, B2 y D. Las cepas en su gran mayoría derivan de los grupos A y B1, y poseen pocos factores de virulencia.

2.7.2.1.1 *Escherichia coli* ATCC 25922™™

Designación: cepa de la FDA Seattle 1946 [DSM 1103, NCIB 12210]

Deposited Name: *Escherichia coli* (Migula) Castellani y Chalmers

Propiedades antigénicas: biotipo 1, serotipo O6

Este microorganismo es una cepa control de ITU, pruebas de susceptibilidad, no produce verotoxina, referenciada para pruebas de sensibilidad a antibióticos utilizados en infecciones del trato urinario; Biosafety Level:1, se deben realizar BPL apropiadas para esta cepa designados por el Departamento de Salud y Servicios Humanos Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de Institutos Nacionales (ATCC, 2019)

2.7.2.3 *Staphylococcus saprophyticus*.

Es un coco Gram positivo, coagulasa negativa, es un anaerobio facultativo, no forman cápsula, no forman espora y es inmóvil. Es oxidasa negativa y catalasa positiva. Sintetizan la enzima ureasa y se adhiere con facilidad a las células epiteliales de las vías urinarias o tracto urogenital; se manifiesta como una causa significativa de ITU; responsable en baja medida de pielonefritis aguda, uretritis, epididimitis y prostatitis (Argemi et al., 2019; Roca y Pajuelo 2008).

Los motivos por los cuales las personas contraen una infección por *Staphylococcus saprophyticus* es porque tienen antecedentes de infecciones urinarias recurrentes, ser generalmente de sexo femenino, embarazo, relaciones sexuales recientes, vejiga neurogénicas, catéter permanente e hipertrofia prostática benigna (Ehlers y Merrill, 2019).

2.7.2.3.1 *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM™

Designación: NCTC 7292 [ATCC 19701, NCIB 8711, S41]

Deposited Name: *Staphylococcus saprophyticus* (Fairbrother) Shaw et al.

Este microorganismo es una cepa accionante de las ITU, utilizado para: pruebas de susceptibilidad, representante Gram positivos referenciada para pruebas de sensibilidad a antibióticos utilizados en infecciones del trato urinario; Biosafety Level:1, se deben realizar

BPL apropiadas para esta cepa designados por el Departamento de Salud y Servicios Humanos Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de Institutos Nacionales (ATCC, 2019).

1.8 Cantidad mínima inhibitoria (CMI).

1.8.1 Definición.

La CMI es interpretada como la concentración de antimicrobiano, que inhibe el crecimiento visible de la bacteria (Campos y López, 2017; Quintana et al. 2005).

1.8.2 Microdilución

La microdilución es una técnica basada en la actividad inhibitoria de crecimiento de microorganismos transcurridas 24 horas de incubación; para la previa incubación los microorganismos se deben pasar a una escala de 0,5 McFarland que nos da un total de $1-2 \times 10^8$ UFC₂ / mL. La microdilución se realiza en una placa de poliestireno que contiene 96 celdillas o microplaca. Una microplaca puede contener de 7 a 8 diluciones de 12 diferentes agentes antibacterianos, usando una celdilla como control negativo (caldo + inóculo), otra como blanco (sólo caldo) y también como control positivo un antibiótico general. (Balouiri et al., 2016, p.76). Con este método, los resultados son más rápidos, dando la posibilidad de un cambio oportuno de terapia antibacteriana, lo que se traduce en una importante reducción de costos totales en cuanto a días de hospitalización y exámenes de laboratorio, también confiere un control de estandarización y reproducibilidad de los resultados. La microdilución, actualizada por el National Committee for Clinical Institute (NCCIS), permite un informe selectivo de los antibacterianos (Bustamante, Ortiz, y Moya, 2015; Galvis et al., 2017; Gil et al., 2016; NCCIS, 2015).

Capítulo II

2. Metodología

2.1. Diseño experimental

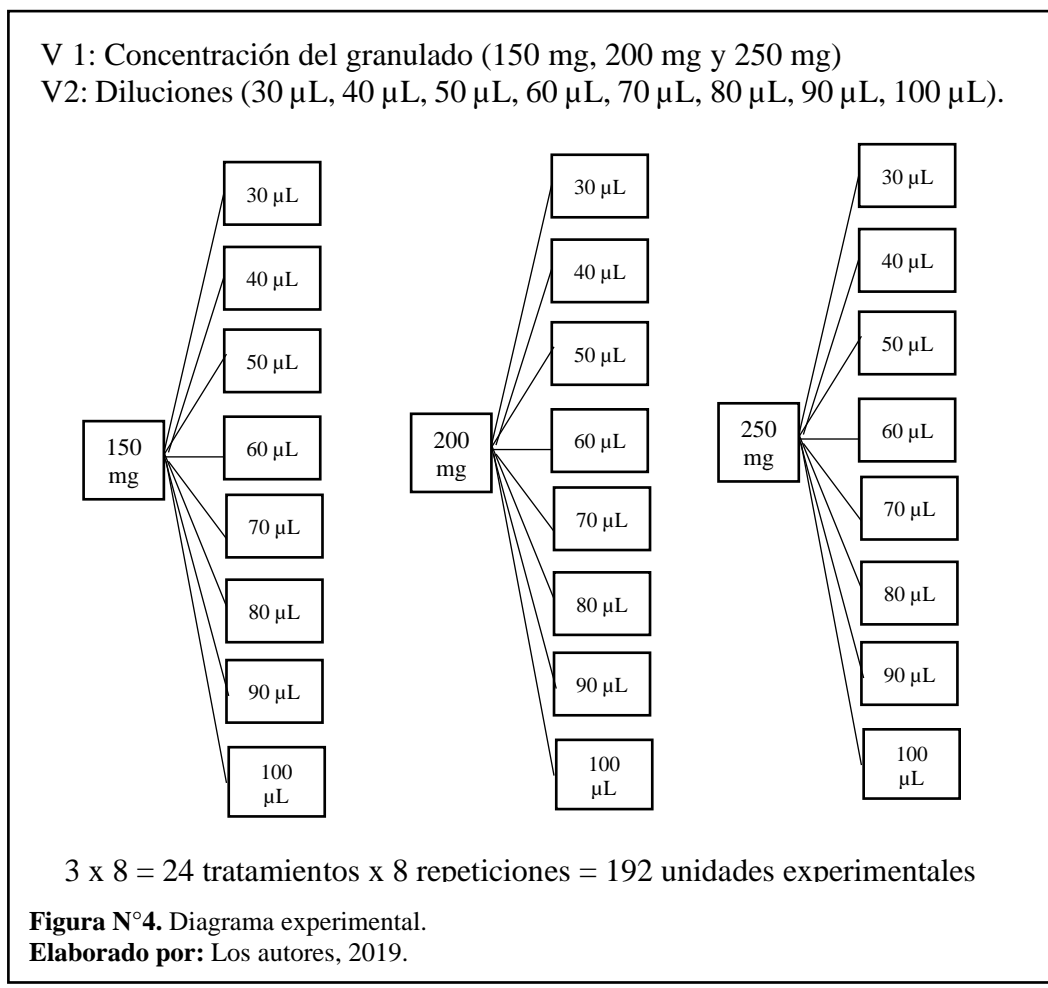
En cuanto a la cantidad de antocianinas y fenoles que se obtuvieron de las diferentes concentraciones de granulado, se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para conocer si existe diferencia significativa y se aplicó la prueba Post Hoc de Tukey al 5 % para conocer rangos de significancia.

Para la cantidad mínima inhibitoria (MIC) intervinieron dos variables que son: tres concentraciones del granulado y ocho diluciones de cada granulado, por lo que se empleó un análisis factorial "3*8" dando como resultados 24 tratamientos para cada bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922TM y *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM y 8 repeticiones dando un total de 192 unidades experimentales, más un control positivo en el que usó un antibiótico comercial y un control negativo que contenía únicamente el cultivo bacteriano (Figura N° 4).

Diseño factorial adecuado para conocer la cantidad mínima inhibitoria y determinar que concentración de granulado es más efectivo contra el crecimiento de las dos bacterias urupatógenas.

A los resultados obtenidos se les realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para conocer si existe diferencia significativa entre la concentración de granulados, las diluciones o en su interacción y se aplicó la prueba Post Hoc de Tukey al 5 % para conocer rangos de significancia.

En el siguiente diagrama se explica el diseño experimental usado:



2.2 Recolección

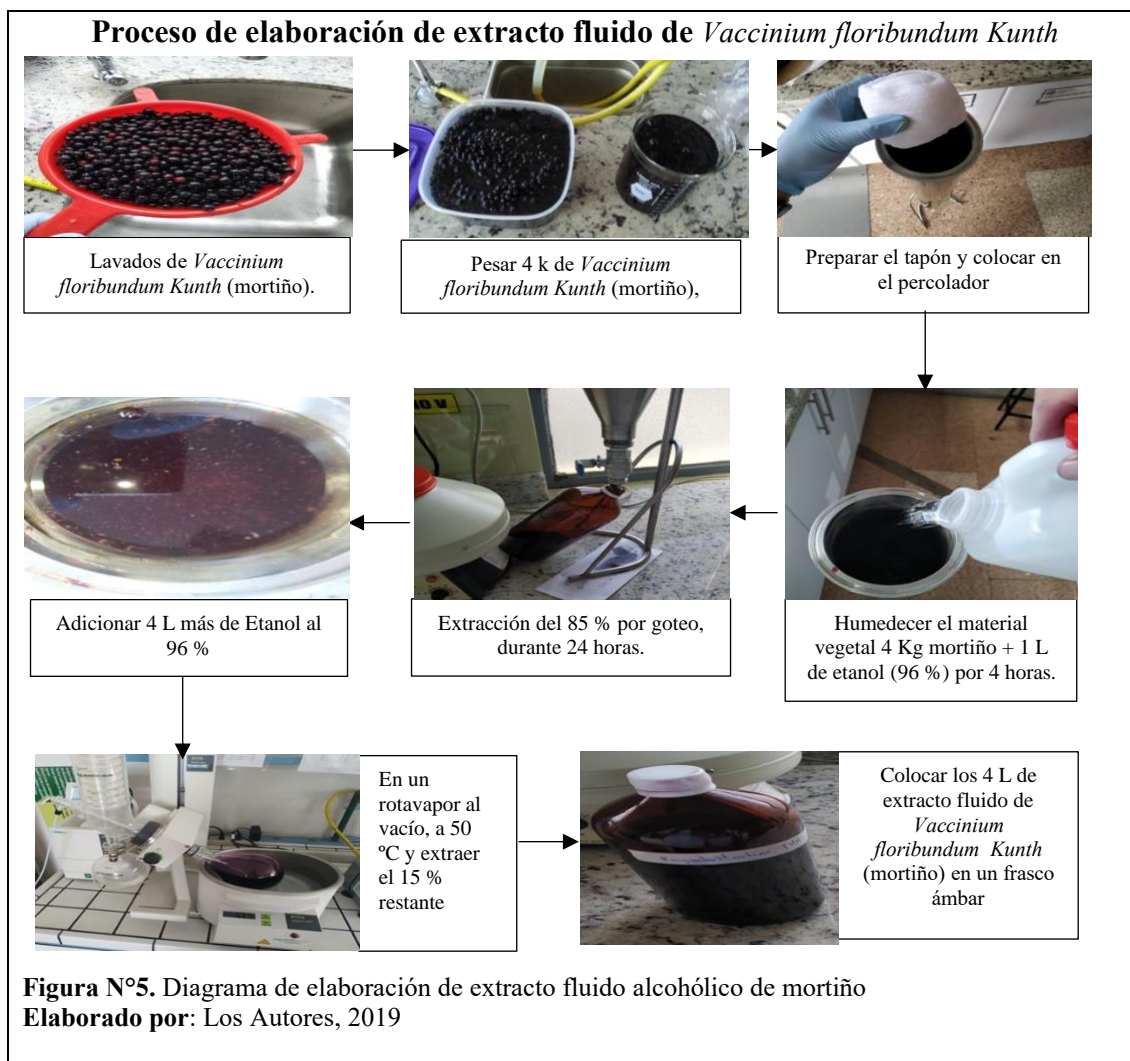
Las bayas de mortiño son procedentes de la ciudad de San Miguel de Ibarra, cabecera cantonal del Cantón Ibarra y capital de la provincia de Imbabura. Se seleccionó bayas sin machas, heridas y mordeduras de insectos, desechando aquellas que presenten daño alguno, se lavó con agua corriente para eliminar impurezas como la tierra y se dejó reposar en agua destilada para disolver cualquier soluto dejado del agua potable, se eliminó el agua y se congeló a -7 °C en un recipiente forrado con papel aluminio, evitando que llegue la luz y exista degradación de compuestos bioactivos (Coba et al., 2012; Flores, 2017).

2.3 Localización del estudio.

El estudio se realizó en los laboratorios de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana campus el Girón, ubicado en Av. Isabel la Católica N.23-52 y Madrid, Quito - Pichincha (UPS, 2019).

2.4 Elaboración del extracto fluido

Para la elaboración del extracto fluido de *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño), se utilizó un percolador cilíndrico de 8 L de capacidad, previamente lavado, en su interior se colocó una torunda del tamaño adecuado al sifón de drenaje para que permita la salida del extracto por goteo; inicialmente se humedeció el material vegetal en un recipiente adicional donde se colocó 4 kg de *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño) descongelados previamente y 1 L de solvente (etanol 96 %), y se dejó reposar por 4 horas aproximadamente. Una vez transcurrido el tiempo, se colocó en el percolador el material vegetal húmedo y se añadió 4 L de etanol (96 %) y se extrajo por goteo el 85 % de el volumen final (4 L) durante 24 horas; posterior a este proceso, en el percolador se añadió 4 L más de etanol y se dejó reposar por 24 horas más, después se extrajo todo el volumen del percolador y este se concentró al vacío a 50 ° C, en un rotavapor (marca BUCHI, modelo B-100). De este concentrado se obtuvo el 15 % restante para alcanzar el volumen final deseado (4 L) de extracto fluido de *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño) (figura N° 5).



2.5 Formulación de cápsulas duras con 3 concentraciones: 150, 200 y 250 mg de extracto fluido de mortiño.

2.5.1 Elaboración del granulado

En la elaboración del granulado se utilizó almidón de maíz, marca Ingredion™, número de lote: 3212219249, el almidón se caracteriza por mantener unidas las partículas de polvos, aumentar el volumen con el fin de obtener partículas uniformes y facilita la liberación de ingredientes activos, haciéndole actuar como aglutinante, diluyente y desintegrante al mismo tiempo (Gad, 2007). Para la formulación de los granulados se realizaron cálculos para: cápsulas duras de tamaño 1 (400 mg de capacidad) y un total de 1500 cápsulas para cada formulación; en una mezcladora (marca KitchenAid, modelo Classic Series 4.5 Quart) se añadió aglutinante

y se fue añadiendo gradualmente la cantidad de extracto fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño), indicadas en la tabla 7 y se mezclaron durante 20 minutos hasta obtener una mezcla de color y consistencia homogénea.

Tabla 7.

Formulación farmacéutica de cápsulas duras de extracto fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño).

Concentración	Total de cápsulas	Aglutinante (g)	Extracto fluido (mL)
150 mg	1500	600	225
200 mg	1500	600	300
250 mg	1500	600	375

Elaborado por: Los Autores, 2019

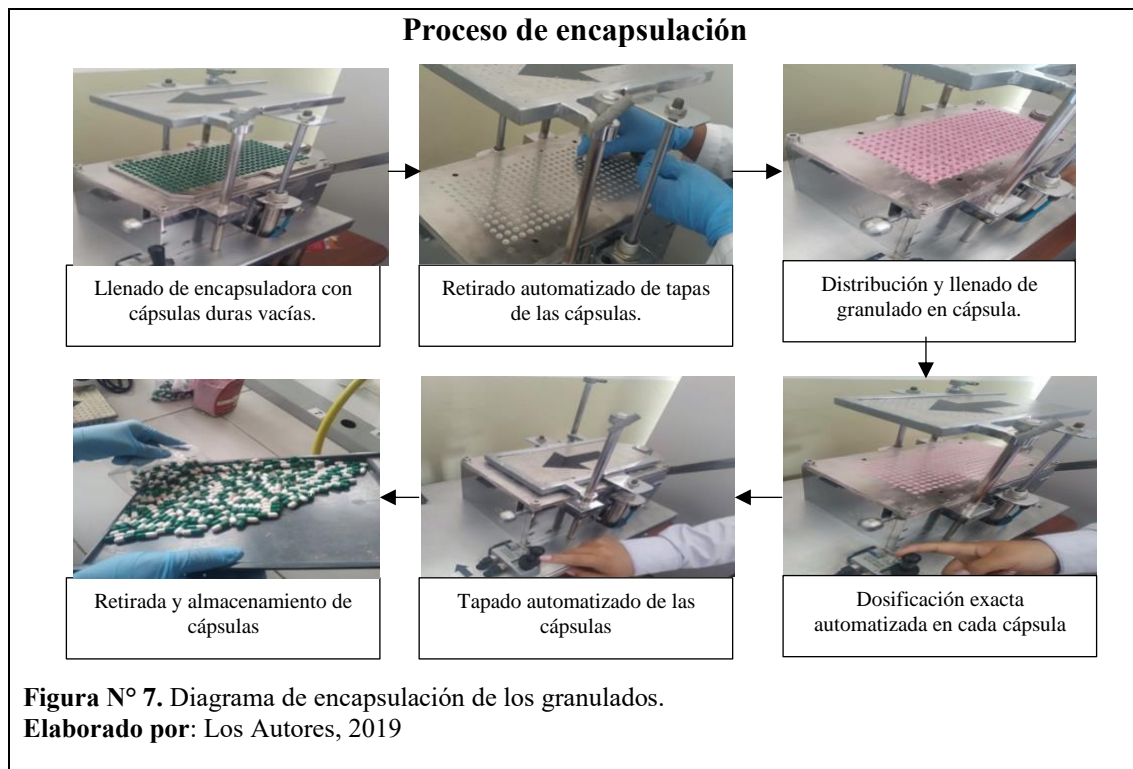
Posteriormente, se colocaron los granulados en bandejas de aluminio y se sometieron al proceso de secado a 60 ° C por 48 horas en una estufa marca: Binder, modelo BD 5, así se garantizó la eliminación del etanol para que las cápsulas sean aptas para el consumo humano y la conservación de los principios activos del mortino, posteriormente se tamizaron los 3 granulados en mallas N°: 100, 140 y 150 dejando al final granulados uniformes (Figura N° 6).



2.5.2 Encapsulación

Se elaboraron 1500 cápsulas duras de cada una de las concentraciones establecidas, se utilizaron cápsulas de gelatina dura vacías comerciales número 1. En una encapsuladora semi- automática de acero inoxidable (capacidad de llenado 300 cápsulas), se procedió a la elaboración de las

cápsulas de cada concentración; esta encapsuladora garantiza que todas las cápsulas tengan la misma cantidad es decir 400 mg en cada una y que los excesos de granulado sean desechados, además de asegurar un cierre efectivo y sin manipulación (Figura N° 7).



2.5.3 Pruebas control de calidad.

Para el control organoléptico se evaluaron los siguientes parámetros, en el extracto fluido: aspecto, olor, color basados en la paleta de color rosa de BBPF (2019), impurezas y debido a que es un extracto alcohólico no se evaluó el parámetro de sabor; para el granulado: aspecto, olor, color basados en la paleta de color rosa de BBPF (2019), sabor, consistencia e impurezas.

Para la determinación de sólidos totales se colocó en un crisol previamente preparado y secado 0,005 L de extracto fluido, se pesó el crisol sin y con muestra y se dejó a 105 °C en una estufa de secado durante 2 horas, transcurrido el tiempo se sacó el crisol y se dejó enfriar en un

deseCADOR de vidrio, una vez frÍo se procedió a pesar el crisol (el procedimiento se realizó por triplicado). Para la determinación de sÓlidos totales se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Sólidos totales} = \frac{(\text{Peso final del crisol con la muestra} - \text{peso inicial del crisol}) (g)}{\text{Volumen de la muestra desecada (L)}} * 1000$$

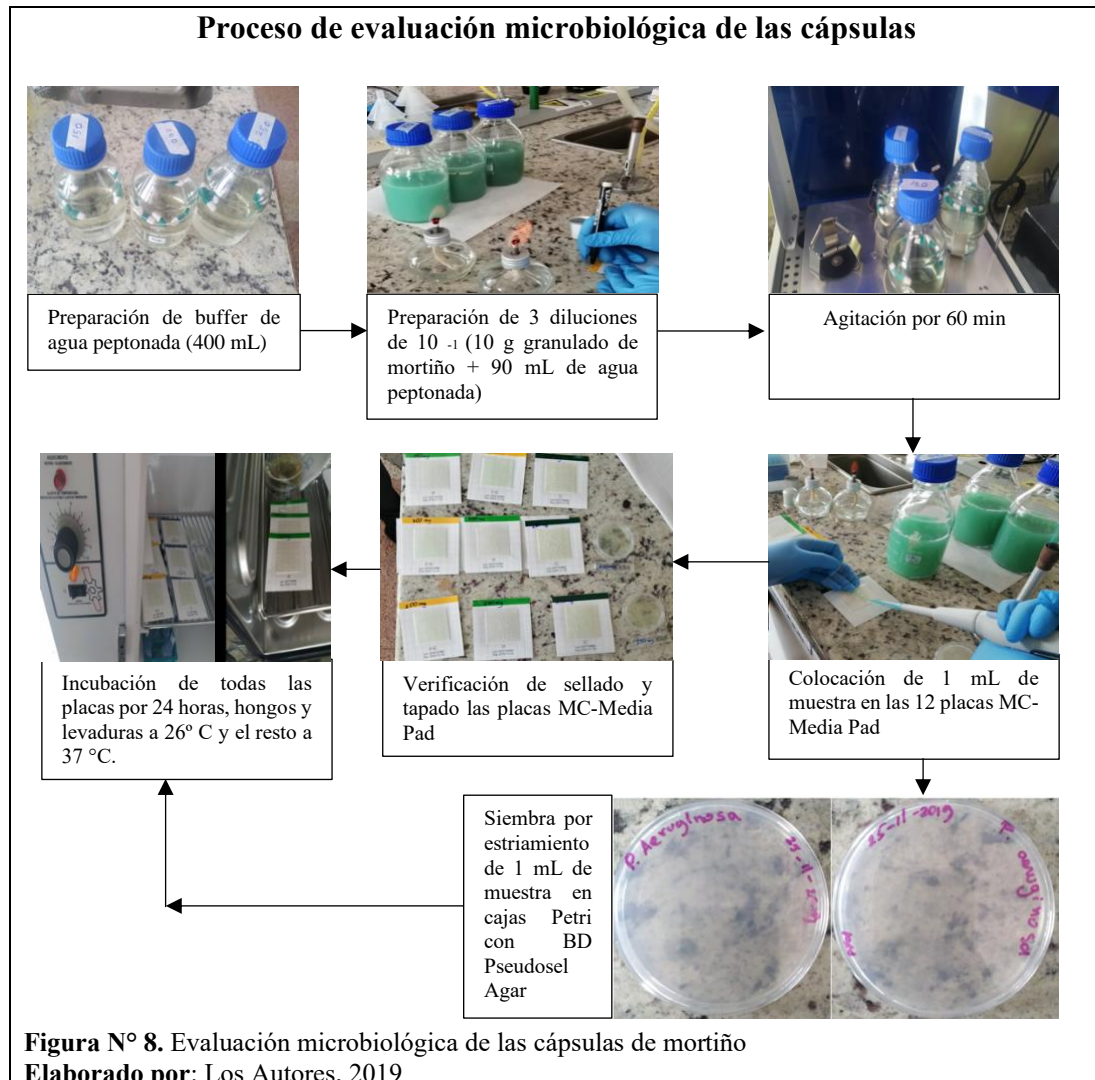
Para la determinación de porcentaje de humedad en los granulados se pesó un crisol previamente preparado y secado en el cual se pesó 3 g del granulado respectivo y se dejó a 105 °C en una estufa de secado durante 24 horas, transcurrido el tiempo se sacó el crisol y se dejó enfriar en un desecador de vidrio, una vez frÍo se procedió a pesar el crisol (el procedimiento se realizó por triplicado para cada granulado). Para la determinación del porcentaje de humedad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(\text{Peso final del crisol con la muestra} - \text{peso inicial del crisol}) (g)}{\text{Peso final del crisol con la muestra (g)}} * 100$$

Para el control microbiológico de las cápsulas se utilizó placas de pruebas microbiológicas marca: MC-Media Pad que evalúan la presencia de los siguientes microorganismos (1. *Escherichia coli* / coliformes totales, 2. Aerobios totales, 3. *Staphylococcus aureus*, 4. Levaduras y mohos), para (5. *Pseudomona aeruginosa*) se utilizó medio de cultivo BD Pseudosel Agar (cetrimide agar), cada prueba se realizó por triplicado en cada granulado, estas pruebas son necesarias para el control de calidad de productos farmacéuticos. Se realizó una dilución 10⁻¹ que contenían: 90 mL de buffer de agua peptonada y 10 g de granulado de mortiño (25 cápsulas). Las soluciones se colocaron en un agitador orbital marca TECNAL® modelo TE-420 por 60 minutos hasta conseguir que las cápsulas se diluyan en su totalidad.

En cada una de las placas MC-Media Pad 1. *Escherichia coli* / coliformes, 2. Aerobios totales, 3. *Staphylococcus aureus*, 4. Levaduras y mohos; con una micropipeta se colocó 1 mL de las diluciones, teniendo en cuenta que recubra toda la almohadilla de la placa, para 5. *Pseudomona*

aeruginosa se añadió 1 mL de las disoluciones y se sembró por estriamiento. Por último, se dejó incubar por 24 horas a: 37 °C las placas de las pruebas: (1, 2, 3, 5) y las placas de la prueba: (4) a 28 °C, ver Figura 8.



Para las pruebas de estabilidad se siguieron las directrices mencionadas por European Medicines Agency (2006), y se colocaron cápsulas en cajas Petri de vidrio estériles, posteriormente estas cajas pasaron a un desecador de vidrio a una temperatura de $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ y humedad relativa de $65\% \pm 5\%$ y se observaron durante 72 horas. Finalmente se introdujeron las cápsulas de cada concentración en frascos específicos para este tipo de forma farmacéutica (Figura N° 9).



2.6 Cuantificación de compuestos bioactivos

2.6.1 Cuantificación de fenoles totales.

La cuantificación de fenoles totales de los distintos granulados y del extracto de *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño), se realizó siguiendo el método de Folin-Ciocalteu, gracias a la propiedad colorimétrica del reactivo de Folin-Ciocalteu, utilizando un espectrofotómetro UV a 765 nm.

2.6.1.1 Elaboración de la curva de calibración.

Se preparó un volumen de 10 mL de solución madre de ácido gálico con una concentración de 2000 ppm, en etanol al 96 %. a partir de la cual se obtuvieron seis diluciones, a las concentraciones de: (1, 2, 10, 20, 50 y 80) ppm.

En balones ámbar de 5 mL: se colocaron 0,05 mL de cada dilución de ácido gálico, 3,95 mL de agua destilada, 0,25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se reposó por 2 minutos y se añadió 0,75 mL de carbonato de sodio al 20 % v/v. Para la solución blanco en un balón ámbar, se añadió 4 mL de agua destilada 0,25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se dejó reposar por 2 minutos y se añadió 0,75 mL de carbonato de sodio al 20 % v/v. Todas las muestras incluyendo

el blanco se sometieron a ultrasonido por 5 min en un sonicador marca BRANSON, modelo: 1510 series, se dejaron reposar a temperatura ambiente y a oscuridad por 2 horas.

En celdas de cuarzo para espectrofotometría se colocó una cantidad aproximada de 3 mL de cada solución preparada donde se midieron las absorbancias de cada una de las muestras a 765 nm en un espectrofotómetro marca UV-VIS, modelo: jasco V730. Con los datos de las absorbancias obtenidas, se elaboró un gráfico de linealidad entre concentración de ácido gálico contra absorbancia, obteniendo la curva de calibración (Anexo No. 1).

2.6.1.2 Cuantificación de fenoles totales en extracto fluido y granulados de extracto

fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño).

En balones ámbar se prepararon 4 soluciones con un volumen final de 10 mL, cada solución fue preparada con 1000 mg de granulados de cada una de las concentraciones (150, 200 y 250) mg y para la cuarta 10 mL de extracto fluido de mortino, estas muestras se realizaron por triplicado, teniendo un total de 12 muestras. Se sometieron a ultrasonido por 30 min en un sonicador marca BRANSON, modelo: 1510 series y se filtraron en jeringuillas de 5 mL con filtros PDVF de 45 µm.

En frascos ámbar se tomó 0,05 mL de cada muestra, 3,95 mL de agua destilada, 0,25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se dejó reposar por 2 minutos y se añadió 0,75 mL de carbonato de sodio al 20 % v/v. Para la solución blanco en otro frasco ámbar, se añadió 4 mL de agua destilada, 0,25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, se dejó reposar por 2 minutos y se añadió 0,75 mL de carbonato de sodio al 20 % v/v. Todas las muestras se sometieron a ultrasonido por 5 min en un sonicador marca BRANSON, modelo: 1510 series, se dejó reposar en oscuridad y temperatura ambiente y a por 2 horas.

En celdas de cuarzo para espectrofotometría se colocó una cantidad de 3 mL de cada solución preparada donde se midieron las absorbancias de cada una de las muestras a 765 nm en un espectrofotómetro marca UV-VIS, modelo: jasco V730, teniendo 12 mediciones (Anexo 2).

Con los datos de las absorbancias obtenidas, se interpoló en la curva de calibración de ácido gálico, obteniendo la cuantificación de fenoles totales representados en (mgAG/mL), presentes en cada uno de los granulados y el extracto fluido.

2.6.2. Cuantificación de antocianinas por método de pH diferencial.

2.6.2.1 Preparación de muestras.

Se pesó 2,7305 g de los tres tipos de granulados de extracto fluido de mortiño, se añadió 10 mL de etanol al 96 %. Además, se tomaron 2 mL del extracto fluido junto con 2 mL de etanol al 96 %, todas estas muestras se realizaron en balones ámbar aforados de 50 mL para evitar la degradación de antocianinas frente a un contacto directo con la luz (Castañeda & Guerrero, 2015). El proceso se hizo por triplicado obteniendo un total de 12 muestras, se sometieron a ultrasonido por 30 min en un sonicador marca: BRANSON, modelo: 1510 series.

Transcurrido el tiempo las muestras se filtraron en jeringuillas de 5 mL con filtros PDVF de 45 μm , se colocaron en tubos Falcon (50 mL) forrados con papel aluminio para evitar la penetración de la luz, seguidamente con la ayuda de HCl 2 M se ajustó a un pH de 2,3 cada una de las muestras, pasando por vórtex durante 1 minuto, luego se dejó en reposo y oscuridad durante 5 horas, agitando cada 2 horas. Por último, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm por 30 minutos.

2.6.2.2 Técnica del pH Diferencial.

Se utilizó la técnica descrita por (Giusti & Wrolstad, 2001) con pequeñas variaciones. Para esta técnica se prepararon buffers de pH 1 y pH 4,5 descritas en la tabla 8.

Tabla 8.

Contenido de buffers (pH 1-4,5) empleados en la técnica de pH diferencial

Buffer pH 1	Buffer pH 4,5
0,076 g de cloruro de potasio	2,27 g de acetato de sodio
40 mL de agua destilada	40 mL de agua destilada

Para ambos buffers utilizar HCl 2 M para bajar el pH

Nota: Compuestos y cantidades necesarias para la preparación de los buffers.

Elaborado por: Los Autores, 2019.

Se tomó 0,5 mL del sobrenadante de los 12 tubos Falcon pasados por la centrífuga y se colocaron en 24 frascos ámbar (12 frascos de pH 1 y 12 frascos de pH 4,5), los mismos que deben contener 4,5 mL de los buffers correspondientes y se dejó en reposo y oscuridad por 45 minutos.

Para la medición por espectrofotometría se tomó en cuenta lo mencionado por (Giusti & Wrolstad, 2001), en donde las absorbancias fueron medidas en un rango de 510 nm – 700 nm, además se partió de las siguientes ecuaciones para la cuantificación de antocianinas (Ver anexo No3; esquema del proceso).

$$\text{Ecuación 1: } A = (A_{\lambda_{\text{vismax}}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH1}} - (A_{\lambda_{\text{vismax}}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH4,5}}$$

$$\text{Ecuación 2: } AT\left(\frac{\text{mg}}{\text{L}}\right) = \frac{\Delta A * PM * FD * 1000}{E1}$$

Donde: AT (antocianinas totales); ΔA (variación de absorbancia); PM (peso molecular de cianidina-3-glucósido, 449,2 g/mol); FD (factor de dilución); E (coeficiente molar de cianidina-3-glucósido, 26900); 1000 (conversión de gramos a miligramos).

2.7 Evaluación de la actividad antimicrobiana (concentración mínima inhibitoria) contra bacterias uropatógenas *Escherichia coli* ATCC 25922TM y *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM

2.7.1 Preparación de soluciones de granulados.

De cada granulado (150, 200, 250 mg), en balones aforados de 20 mL, se pesó 2 mg de cada granulado y se los diluyó en 20 mL de DMSO (Merck Alemana Dormstads Max 0,5 % H₂O, Lote K229047331) al 10 % (por triplicado), se sometieron a ultrasonido por 60 min en un sonicador marca: BRANSON, modelo: 1510 y posteriormente se filtró en frascos ámbar con jeringuillas de 5 mL aditadas con filtros PDVF de 45 µm.

2.7.2 Reactivación de cepas.

Se reactivaron las cepas comerciales de *Escherichia coli* ATCC 25922TM y *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM en medio de cultivo Trypticasa Soya Agar (TSA) y se incubó por 24 horas a 37 °C, transcurrido el tiempo se verificó el crecimiento de las bacterias y que no exista contaminación por parte de otros microorganismos (Figura N° 10). Para su almacenamiento se utilizó CRIOBANK siguiendo la metodología descrita por el fabricante (American Type Culture Collection (ATCC), 2019; MBM, 2019) .

Cepas uropatógenas

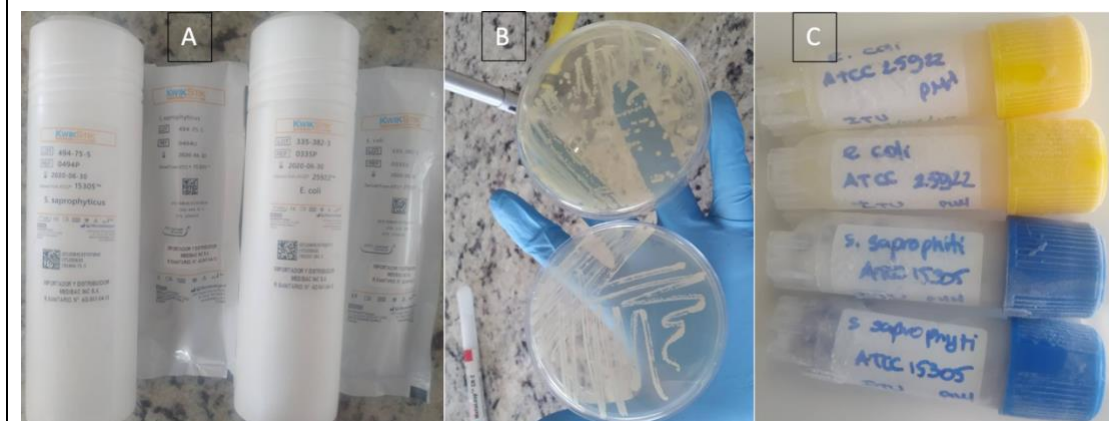


Figura N° 10. Reactivación de cepas uropatógenas, (A = cepas comerciales ATCC; B = reactivación de cepas en TSB; C = CRIOBANK de cada una de las cepas).

Elaborado por: Los Autores, 2019.

2.7.2 Preparación de soluciones madre.

Se prepararon dos frascos con 500 mL de medio de cultivo Trypticase Soya Broth (TSB) cada uno y se esterilizaron. En cada uno de los frascos con TSB se colocó 4 perlas de CRIOBANK de *Escherichia coli* ATCC 25922TM y *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM respectivamente, se incubó por 24 horas a 37 °C.

2.7.2 Microdilución en caldo.

Se utilizó microplacas de poliestireno con tapa, estériles que poseen 12 columnas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12) y 8 filas (A, B, C, D, E, F, G, H) con un total de 96 pocillos de la marca VWR®; con la ayuda de micropipeta multicanal de 12 canales se colocaron las muestras con una cantidad de 250 µL en cada uno de los pocillos. Para cada concentración de granulado de extracto fluido de mortiño (150, 200 y 250 mg) y bacterias ((*Escherichia coli* ATCC 25922TM y *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM),) se utilizó una placa teniendo un total de 6 microplacas (150 mg/ *Escherichia coli*; 200 mg/ *Escherichia coli*; 250 mg/ *Escherichia coli*;

150 mg/ *Staphylococcus saprophyticus*; 200 mg/ *Staphylococcus saprophyticus*; 250 mg/ *Staphylococcus saprophyticus*).

Dos horas antes del proceso de microdilución, se preparó soluciones equivalentes a: $1-2 \times 10^8$ UFC / mL, se tomó un tubo estéril con suero fisiológico y el cultivo de *Escherichia coli* y *Staphylococcus saprophyticus* respectivamente, se mezclaron hasta que los rangos de absorbancia de las soluciones estén entre: 0,08 – 0,10.

En cada una de las 6 microplacas se realizó el siguiente procedimiento respectivamente (anexo No 4.):

Columna 1 (A1 a H1): 100 µL de solución 0,5 McFarland de la bacteria respectiva + 125 µL de TSB estéril (control negativo).

Columna 2 (A2 a H2): 100 µL de solución 0,5 McFarland de la bacteria respectiva + 50 µL de TSB estéril + 75 µL de DMSO al 10 %.

Columna 3 (A3 a H3): 225 µL de TSB estéril (blanco).

Columna 4 (A4 a H4): 100 µL de TSB estéril + 125 µL de gentamicina (control positivo).

Columna 5 (A5 a H5): 100 µL de solución 0,5 McFarland de la bacteria respectiva + 95 µL de TSB estéril + 30 µL de solución de granulado respectivamente.

Columna 6 (A6 a H6): 100 µL de solución 0,5 McFarland de la bacteria respectiva + 85 µL de TSB estéril + 40 µL de solución de granulado respectivamente.

Columna 7 (A7 a H7): 100 µL de solución 0,5 McFarland de la bacteria respectiva + 75 µL de TSB estéril + 50 µL de solución de granulado respectivamente.

Columna 8 (A8 a H8): 100 µL de solución 0,5 McFarland de la bacteria respectiva + 65 µL de TSB estéril + 60 µL de solución de granulado respectivamente.

Columna 9 (A9 a H9): 100 μ L de solución 0,5 McFarland de la bacteria respectiva + 55 μ L de TSB estéril + 70 μ L de solución de granulado respectivamente.

Columna 10 (A10 a H10): 100 μ L de solución 0,5 McFarland de la bacteria respectiva + 45 μ L de TSB estéril + 80 μ L de solución de granulado respectivamente.

Columna 11 (A11 a H11): 100 μ L de solución 0,5 McFarland de la bacteria respectiva + 35 μ L de TSB estéril + 90 μ L de solución de granulado respectivamente.

Columna 12 (A12 a H12): 100 μ L de solución 0,5 McFarland de la bacteria respectiva + 25 μ L de TSB estéril + 100 μ L de solución de granulado respectivamente.

Al finalizar el procedimiento los 96 pocillos tendrán un volumen final de 225 μ L, se tapó cada una de sus microplacas en papel aluminio y se llevó a incubación en una incubadora con agitación marca: (TECNAL® TE-420) durante 24 horas a 25 RPM y con una temperatura de 37 °C.

Posteriormente a las 24 horas de incubación de las 6 microplacas, se procedió a la aplicación del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 1 % preparado con anticipación, se colocaron 25 μ L de TTC en los 96 pocillos de cada placa y se llevó a incubación en una incubadora con agitación marca: (TECNAL® TE-420) durante 40 min a 50 RPM, a temperatura de 37 °C. Una vez obtenida la coloración se realizó la lectura de la absorbancia de cada uno de los pocillos de todas las microplacas en un Lector ELISA marca: Microplate.

Capítulo III

3. Resultados y Discusión

3.1. Extracto fluido

Se obtuvo un extracto fluido *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño), que presenta las siguientes características organolépticas: aspecto totalmente líquido, color rosa A700 código #C51162, olor a mortiño con alcohol, sin impurezas visibles y un pH ácido de 3,80; además de un promedio de sólidos totales de 4,44 g/L (Anexo No. 18).

La cuantificación de fenoles totales por el método Folin-Ciocalteu, dio un promedio de valores de absorbancias de: $1,14 \pm 0,00$, que al interpolar los datos en la curva de calibración de ácido gálico (Figura N° 10.), se obtuvo una concentración de fenoles totales de: $243,99 \pm 0,02$ mgAG/g (anexo No 5.), los datos obtenidos en el estudio están por encima a los publicados por Castillo y Janon (2019), que tienen una concentración de fenoles totales de: $71,68 \pm 1,55$ mgAG/g de muestra seca, esto puede ser porque ellos secaron los frutos, en lugar de utilizar frutos frescos en la obtención del extracto fluido de *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño). Al contrario los datos obtenidos por Ortiz (2018) corroboran nuestros resultados teniendo un contenido de fenoles totales de $266,22 \pm 0,82$ mgAG/g de extracto fluido, a partir de fruto fresco de *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño). En estudios similares realizados en la especie *Vaccinium corymbosum* (arándano azul), Zapata et al. (2014) presentan resultados similares a los obtenidos en este estudio, con $273,68 \pm 5,00$ mgAG/g en frutos frescos de arándano azul.

La cuantificación de antocianinas realizada por el método de pH diferencial se realizó en 6 muestras de extracto fluido de *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño), los valores de las absorbancias a diferentes pH y diferentes longitudes de onda obtenidos por la ecuación 1, dieron un promedio de valor de absorbancia total (A) de: $5,69 \pm 0,02$ y al aplicar los valores de la

absorbancia total (A) en la ecuación 2 se obtuvo una concentración de antocianinas de: $35,20 \pm 0,12$ mg de antocianinas/ g (Anexo No 6). Los datos obtenidos en el presente estudio son similares a los obtenidos por: Dalgo et al. (2014); Castillo y Janon (2019), que obtuvieron un total de antocianinas de: $32,87 \pm 0,30$ mg de antocianinas/g y $33,91 \pm 2,53$ respectivamente, los estudios fueron realizados en *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño), por lo tanto estos datos corroboran nuestra investigación. Por otro lado Zapata et al. (2014), en un estudio realizado en la especie *Vaccinium corymbosum* (arándano azul) obtienen un promedio de: $8,79 \pm 0,13$ mg de antocianinas/g, el cual es mucho menor a la del mortiño por lo que lo hace un mejor candidato para uso medicinal.

3.2. Granulados de 150, 200 y 250 mg

Se obtuvieron granulados con las siguientes características organolépticas: un aspecto de solido con consistencia de polvo fino y uniforme, olor a mortiño, sin sabor, sin impurezas visibles y color: para el granulado de 150 mg un color rosa 50 código #FCE4EC, para el granulado de 200 mg un color rosa 100 código #F8BBD0, para el granulado de 250 mg un color rosa A100 código #FF80AB, los cuales presentan un promedio de porcentaje de humedad $11,10 \pm 0,39$ % (Anexo 19), la ANMAT,(2013) establece que productos farmacéuticos como granulados deberán tener un porcentaje de humedad menor al 15 % por lo tanto nuestros granulados cumplen las especificaciones establecidas. Se obtuvo un total de 1200 g de cada granulado (150, 200 y 250 mg), tienen un aspecto de polvo fino de color rosado, con olor a mortiño en los cuales están presentes los compuestos bioactivos de la baya.

3.2.1 Cuantificación de fenoles totales de granulados.

Los datos de absorbancia observados en la Tabla 9 permitieron elaborar una gráfica de absorbancia vs concentración (curva de calibración) figura N° 11, la cual permitió interpolar

los datos de absorbancias de las muestras para calcular la cantidad de fenoles totales presentes en cada uno de los granulados.

Tabla 9.

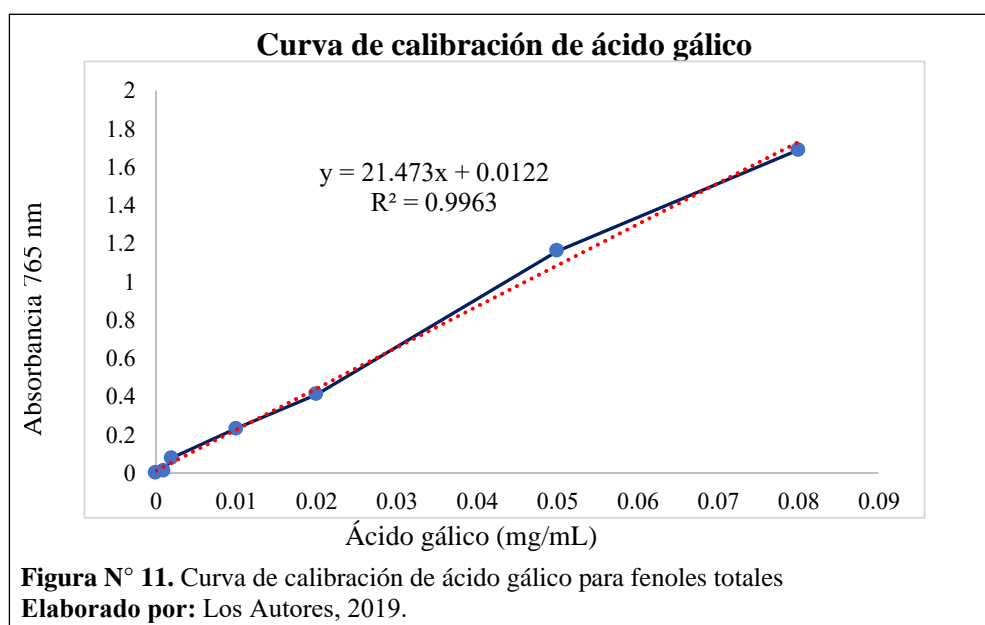
Absorbancia vs concentración para curva de calibración de ácido gálico para fenoles totales.

Estándar	Absorbancia 765 nm	Concentración de ácido gálico (mg/mL)
E0	0	0
E1	0,012	0,001
E2	0,079	0,002
E3	0,232	0,01
E4	0,411	0,02
E5	1,162	0,05
E6	1,689	0,08

Nota: Absorbancia vs concentración de ácido gálico

Elaborado por: Los Autores, 2019.

Al interpolar los datos en la curva de calibración se obtendrá una concentración de fenoles totales basados en la unidad de medida mgAG/mL.



La curva de calibración de ácido gálico presenta una regresión lineal (R) de 0,9963 el cual es aceptable y por lo tanto se podrá utilizar la ecuación de la recta: $y = 21,473x + 0,0122$, para el

cálculo de concentración de fenoles totales detallado en la Tabla 10, se realizó un análisis de varianza encontrando diferencias altamente significativas en cuanto a concentración de fenoles totales entre los tres granulados, se obtuvo un F de 1410,31 y un p-valor de $< 0,0001$ ver (anexo No 7). Mediante la prueba Tukey al 5 % se evidenció que las tres concentraciones de granulados son diferentes en los que los compuestos fenólicos van aumentando conforme aumenta la concentración de los granulados, presentando una mayor concentración de fenoles totales ($6,69 \pm 0,15$ mgAG/g) en el granulado de 250 mg.

Tabla 10.

Concentración de fenoles totales de los 3 granulados

Muestra	Concentración de granulado (mg)	Absorbancias		Concentración mgAG/g		Rangos
G1	150	0,0105 ±	0,0001	2,37 ±	0,01	A
G2	200	0,0223 ±	0,0004	4,91 ±	0,09	B
G3	250	0,0306 ±	0,0007	6,69 ±	0,15	C

Nota: Medias con letras distintas evidencian que son significativamente diferentes según la prueba Tukey 5 %, las muestras G1, G2, G3 corresponden a las medias de 3 repeticiones

Elaborado por: Los Autores, 2019.

3.2.2 Cuantificación de Antocianinas

Al aplicar las ecuaciones de la metodología de pH diferencial se obtuvieron las concentraciones de las antocianinas en la unidad de mg/g de los tres granulados como se evidencia en la Tabla 11.

Tabla 11.

Concentración de Antocianinas totales de los 3 granulados

Muestra	Concentración de granulado (mg)	Absorbancias		Concentración mg/g	Rangos
G1	150	0,0273	± 0,0012	1,27 ± 0,01	A
G2	200	0,0353	± 0,0011	1,9 ± 0,01	B
G3	250	0,0679	± 0,0003	2,51 ± 0,01	C

Nota Los valores indicados que corresponden a absorbancias son: producto de la ecuación 1 y promedio de tres repeticiones. Las concentraciones corresponden al resultado de la aplicación de la ecuación 2. Medias con letras distintas evidencian que son significativamente diferentes según la prueba Tukey 5 %, las muestras G1, G2, G3 corresponden a las medias de 3 repeticiones.

Elaborado por: Los Autores, 2019.

Se realizó un análisis de varianza encontrando diferencias altamente significativas en cuanto a concentración de antocianinas entre los tres granulados, se obtuvo un F de 18612,56 y un p-valor de < 0,0001 ver (anexo No 8). Mediante la prueba Tukey al 5 % se evidenció que las tres concentraciones de granulados son diferentes en los que las antocianinas van aumentando conforme aumenta la concentración de los granulados presentándose una mayor concentración de antocianinas ($2,51 \pm 0,01$ mg/g) en el granulado de 250 mg.

3.3. Encapsulación

Se encapsuló un total de 4500 cápsulas de gelatina dura de N° 1, color de la tapa verde y de cuerpo blanco, 1500 cápsulas de cada concentración del extracto en los granulados de (150,200 y 250 mg), cuya forma farmacéutica es la siguiente (Tabla 12):

Tabla 12.

Forma farmacéutica de cápsulas de extracto fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño) en sus 3 presentaciones

Cápsula (c/u)	150 mg	200 mg	250 mg
Extracto fluido de <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth (mortiño).	150 µL	200 µL	250 µL
Excipientes	csp.	csp.	csp.

Nota: csp. es la cantidad suficiente para llegar a los 400 mg de contenido de cada cápsula.

Elaborado por: Los Autores, 2019.

El procedimiento se realizó en una encapsuladora semi automática de acero inoxidable elaborada en la Universidad Politécnica Salesiana.

Después de las pruebas de control de calidad se obtuvieron los siguientes resultados:

(Tabla 13 y anexo No.10), además de los resultados de control microbiológico (Tabla 14 y anexo No.9).

Tabla 13.

Peso y longitud promedio de las cápsulas

Peso de las cápsulas					
Granulados	(n)	(X) mg	(σ) mg	Min (mg)	Max (mg)
150 mg	60	415,10	± 2,83	409	419
200 mg	60	415,20	± 2,92	409	419
250 mg	60	415,28	± 2,81	410	419
Longitud de las cápsulas					
Granulados	(n)	(X) mm	(σ) mm	Min (mg)	Max (mg)
150 mg	60	18,53	± 0,13	18,3	18,7
200 mg	60	18,53	± 0,13	18,3	18,7
250 mg	60	18,53	± 0,13	18,3	18,7

Elaborado por: Los Autores, 2019.

Tabla 14.

Recuento de microorganismos

Cápsulas	<i>Escherichia coli</i> / coliformes. UFC/g.	Aerobios totales. UFC/g.	<i>Staphylococcus aureus</i> . UFC/g.	Levaduras y hongos. UFC/g.	<i>Pseudomona aeruginosa</i> UFC/g.
150 mg	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
200 mg	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
250 mg	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Elaborado por: Los Autores, 2019.

Las cápsulas presentan un promedio de porcentaje de humedad de $11,10 \% \pm 0,01 \%$ el cual es óptimo ya que para este tipo de productos farmacéuticos, la (ANMAT, 2013) establece que el porcentaje de humedad para cápsulas de gelatina dura deberá ser menor al 15 %.

Los pesos de las cápsulas no presentan diferencia significativa y no tienen una desviación estándar mayor o menor a ± 10 mg, las longitudes de las cápsulas no presentan diferencia significativa y no tienen una desviación estándar mayor o menor a ± 10 mm por lo tanto el proceso de llenado y encapsulado automático de la encapsuladora es el correcto ya que se tienen pesos y longitudes homogéneas.

Al realizar el recuento de microorganismos y no tener presencia de ninguna bacteria, hongo o levadura (anexo No 9) en las pruebas microbiológicas, se puede determinar que las cápsulas son inocuas y aptas para continuar las pruebas farmacológicas, el resultado también se puede deber a que el contenido de las cápsulas tiene propiedades antimicrobianas el cual inhibió el crecimiento de cualquier microorganismo presente en la dilución (10-1). En la farmacopea Argentina la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica ANMAT (2013) establece que los límites de aceptabilidad para los productos farmacéuticos según la Disposición ANMAT 7667/10 son los siguientes:

- Recuento de microorganismos aerobios totales: 10^3 UFC/g.

- Recuento combinado de hongos filamentosos y levaduras: 10² UFC/g.
- Microorganismos específicos: Ausencia de *Staphylococcus aureus*, ausencia de *Escherichia coli* / coliformes.

Por lo tanto, los resultados son óptimos ya que cumplen con todos los requerimientos microbiológicos establecidos por las autoridades.

En las pruebas de control de humedad, se determinó que el porcentaje de humedad es el idóneo para evitar que las cápsulas se disuelvan o favorezcan al crecimiento de hongos o levaduras.

3.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

3.4.1 *Escherichia coli* ATCC 25922TM.

Se obtuvo 0 % de inhibición en los controles negativos de las tres concentraciones de granulado (150 mg, 200 mg y 250 mg), mientras que los controles positivos tuvieron 100 % de inhibición, ver anexos (11, 12, 13).

En la Tabla 15 se presenta los porcentajes de inhibición obtenidos a partir de las diluciones (30 µL, 40 µL, 50 µL, 60 µL, 70 µL, 80 µL, 90 µL y 100 µL) de granulado.

Tabla 15.

Porcentaje de Inhibición de granulados de 150, 200 y 250 mg de extracto fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño), contra *Escherichia coli* ATCC 25922TM.

Granulados	Diluciones	%		Σ	Rangos
150 mg	30 μ L	0	\pm	0	A
150 mg	40 μ L	0	\pm	0	A
150 mg	50 μ L	0	\pm	0	A
150 mg	60 μ L	0	\pm	0	A
150 mg	70 μ L	0	\pm	0	A
150 mg	80 μ L	0	\pm	0	A
150 mg	90 μ L	65,15	\pm	5,4	D
150 mg	100 μ L	89,05	\pm	3,56	E
200 mg	30 μ L	0	\pm	0	A
200 mg	40 μ L	0	\pm	0	A
200 mg	50 μ L	0	\pm	0	A
200 mg	60 μ L	13,07	\pm	7,66	C
200 mg	70 μ L	90,31	\pm	2,99	E
200 mg	80 μ L	99,59	\pm	0,2	F
200 mg	90 μ L	99,61	\pm	0,22	F
200 mg	100 μ L	100	\pm	0	A
250 mg	30 μ L	0	\pm	0	A
250 mg	40 μ L	4,53	\pm	1,31	B
250 mg	50 μ L	87,51	\pm	3,6	E
250 mg	60 μ L	99,46	\pm	0,22	F
250 mg	70 μ L	99,5	\pm	0,26	F
250 mg	80 μ L	100	\pm	0	F
250 mg	90 μ L	100	\pm	0	F
250 mg	100 μ L	100	\pm	0	F

Nota: % es el promedio de los porcentajes de inhibición y σ es el promedio de las desviaciones estándar; medias con una letra común (A a la F) no son significativamente diferentes.

Elaborado por: Los Autores, 2019.

Existe diferencia altamente significativa para las variables: concentraciones de granulados con un p valor $< 0,0001$ y F 9364,62; diluciones de granulados con un p valor $< 0,0001$ y F 6262,99 y la interacción entre concentraciones y diluciones presenta un p valor $< 0,0001$ y F 1381,73. Se presentan 6 rangos de significancia (A), (B), (C), (D), (E) y (F), mediante la prueba Tukey al 5 %. En el rango de significancia A se encuentran las diluciones de 30, 40 50, 60, 70 y 80 μL del granulado de 150 mg de extracto fluido, las diluciones de 30, 40 y 50 μL del granulado de 200 mg de extracto fluido y la dilución de 30 μL del granulado de 250 mg de extracto fluido, los cuales presentan un porcentaje de inhibición del 0 %; en el rango de significancia B se encuentra la dilución de 40 μL del granulado de 250 mg de extracto fluido con un porcentaje de inhibición de 4,53 %; en el rango de significancia C se encuentra la dilución de 60 μL del granulado de 200 mg de extracto fluido con un porcentaje de inhibición de 13,07 %; en el rango de significancia D se encuentran la dilución de 90 μL del granulado de 150 mg de extracto fluido con un porcentaje de inhibición de 65,15 %; en el rango de significancia E se encuentran la dilución de 100 μL del granulado de 150 mg de extracto fluido, la dilución de 70 μL del granulado de 200 mg de extracto fluido y la dilución de 50 μL del granulado de 250 mg de extracto fluido, los cuales presentan un porcentaje de inhibición de 87,51 %, 89,05 % y 90,31 % respectivamente y en el rango de significancia F se encuentran las diluciones de 80, 90 y 100 μL del granulado de 200 mg de extracto fluido y las diluciones de 70, 80, 90 y 100 μL del granulado de 250 mg de extracto fluido, con un porcentaje de inhibición mayor al 99,46 %, como se puede observar en la Figura N° 12.

Si bien los porcentajes de dilución obtenidos son muy variados, en algunos estudios realizados con arándanos se han podido observar cierta similitud con los resultados alcanzados en la presente investigación. Es así que en un estudio realizado por Tempera et al. (2010) utilizaron arándano para contrarrestar la cistitis, y obtuvieron inhibición del 50,9 % a partir de extracto de arándano, resultado que se asemeja al 65,15 % de inhibición obtenida en 90 μL de dilución del

granulado 150 mg en la presente investigación; de igual manera Pinzón-Arango, Liu, and Camesano (2009), en su trabajo reportaron porcentajes de inhibición contra *Escherichia coli* de 50,2 %, para ello utilizaron cápsulas de arándano que contenían 64, 128 y 345,8 µg de proantocianidinas/mL.

Los porcentajes de inhibición (13,07 % y 4,53 %) pertenecientes a 60 µL de dilución y 40 µL de dilución de 200 y 250 mg de granulados respectivamente, son los que se encuentran por debajo del 50 % de inhibición, datos que a pesar de ser inferiores son similares a los obtenidos por Risco et al. (2010) donde evaluaron la capacidad de adherencia de *Escherichia coli* a la vejiga y donde utilizaron cápsulas de arándano americano con concentraciones de 5, 25 y 75 mg de proantocianinas /mL reportando un número bajo de bacterias adheridas a células epiteliales de la vejiga en un 25 %, 36 % y 54 % respectivamente, lo cual indica que es proporcional el grado de inhibición según la concentración que se utilice.

Por otro lado, los granulados de 200 mg y 250 mg tienen porcentajes de inhibición que superan el 85 % a partir de 70 µL y 50 µL de dilución respectivamente, por lo que se puede evidenciar que son datos equivalentes a los presentados por Lavigne et al. (2008) donde utilizaron cápsulas de *Vaccinium macrocarpon* (arándano) que contenían 36 mg de extracto logrando una inhibición bacteriana en un 75,10 %.

El grado de inhibición de granulados de 200 y 250 mg es evidentemente superior a los diversos estudios citados ya que la mayoría presenta cerca del 100 % de inhibición, la razón seguramente se da por la gran cantidad de fenoles y antocianinas que existen en el extracto de *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño) por lo que la acción de estas puede suprimir la supervivencia de la *Escherichia coli*. Además, algunos estudios mencionan que el mecanismo de inhibición que presentan los extractos del género *Vaccinium* por la presencia de fenoles, no permite la adherencia de las fimbrias y la activación de la proteína adhesina que utiliza la *Escherichia coli* para la adhesión al tejido de la vejiga (Hooton, 2001). Otro mecanismo de actividad que pueden

presentar en contra de la *Escherichia coli* es la reducción *in vitro* de la expresión de p-fimbrias al cambiar la conformación de las moléculas de superficie (Liu et al., 2008). Lavigne et al. (2008) también coinciden en la no expresión de fimbrias de tipo 1 de *Escherichia coli*. En la Figura 12 se pudo observar que los granulados de 200 y 250 mg de extracto fluido a menor dilución presentan los porcentajes de inhibición más altos llegando al 100 % frente a *Escherichia coli* ATCC 25922TM.

Representación en barras del porcentaje de inhibición de granulados del extracto fluido contra *Escherichia coli* ATCC 25922 TM

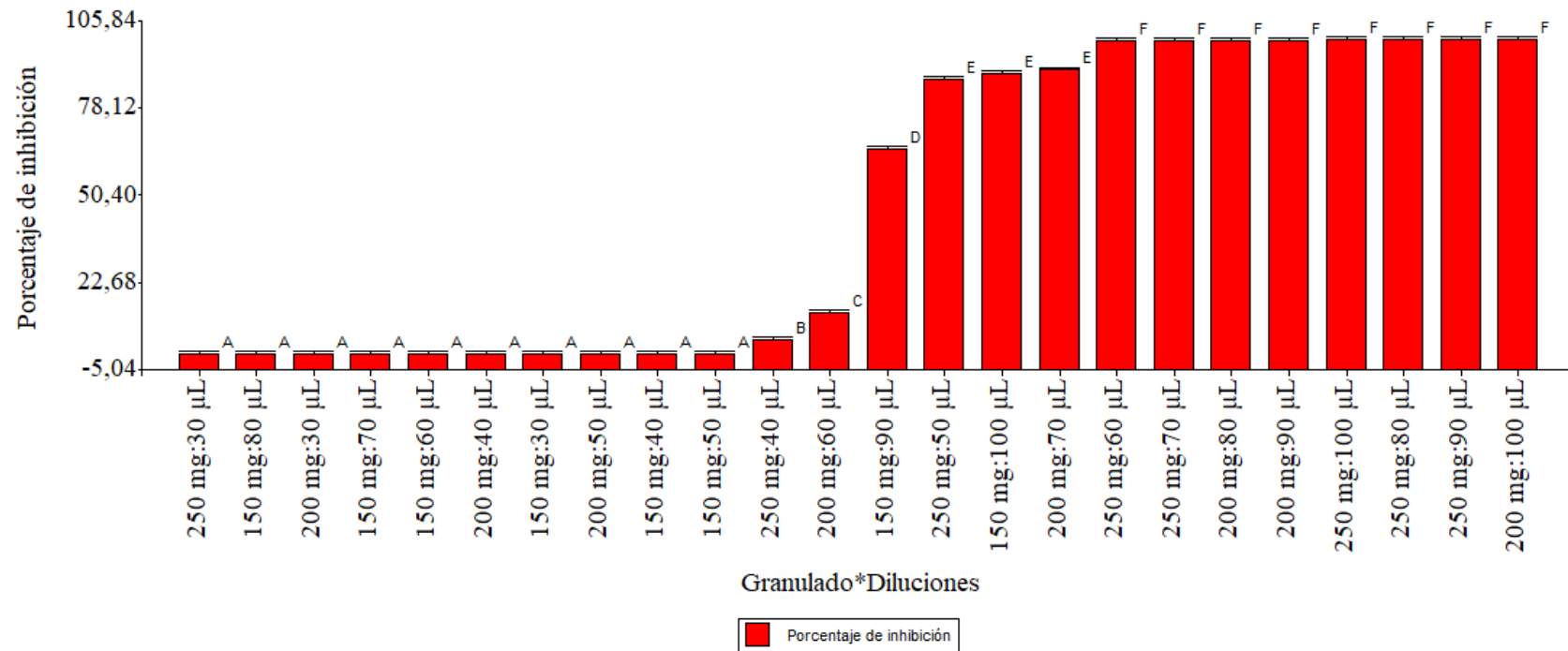


Figura N° 12. Porcentaje de inhibición de granulados de extracto fluido contra *Escherichia coli* ATCC 25922TM
Elaborado por: Los Autores, 2019

3.4.2 *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM

En los controles negativos de las tres concentraciones de granulado (150mg, 200mg y 250 mg) se obtuvieron 0 % de inhibición, mientras que los controles positivos presentaron 100 % de inhibición, ver anexos (14,15 y 16).

En la Tabla 16 se presenta los porcentajes de inhibición obtenidos a partir de las diluciones (30 μ L, 40 μ L, 50 μ L, 60 μ L, 70 μ L, 80 μ L, 90 μ L y 100 μ L) de granulado de extracto fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño).

Tabla 16.

Porcentaje de Inhibición de granulados de 150, 200 y 250 mg de extracto fluido de *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño), contra *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM.

Granulados	Diluciones	%	±	Σ	Rango
150 mg	30 µL	0	±	0	A
150 mg	40 µL	0	±	0	A
150 mg	50 µL	0	±	0	A
150 mg	60 µL	0	±	0	A
150 mg	70 µL	0	±	0	A
150 mg	80 µL	5,02	±	1,05	A
150 mg	90 µL	50,48	±	10,78	C
150 mg	100 µL	81,34	±	1,95	D
200 mg	30 µL	0	±	0	A
200 mg	40 µL	0	±	0	A
200 mg	50 µL	0	±	0	A
200 mg	60 µL	35,97	±	7	B
200 mg	70 µL	91,17	±	8,21	E F
200 mg	80 µL	99,46	±	0,21	G
200 mg	90 µL	99,53	±	0,25	G
200 mg	100 µL	100	±	0	G
250 mg	30 µL	0	±	0	A
250 mg	40 µL	3,78	±	1,45	A
250 mg	50 µL	86,56	±	2,68	D, E
250 mg	60 µL	93,27	±	1,72	F
250 mg	70 µL	99,44	±	0,22	G
250 mg	80 µL	100	±	0	G
250 mg	90 µL	100	±	0	G
250 mg	100 µL	100	±	0	G

Nota: % es el promedio de los porcentajes de inhibición y σ es el promedio de las desviaciones estándar; medias con una letra común (A a la G) no son significativamente diferentes.

Elaborado por: Los Autores, 2019

Se presentan 7 rangos de significancia (A), (B), (C), (D), (E), (F) y (G) mediante la prueba Tukey al 5 %. En el rango de significancia A se encuentran las diluciones de 30, 40, 50, 60, 70 y 80 μL del granulado de 150 mg de extracto fluido, las diluciones de 30, 40 y 50 μL del granulado de 200 mg de extracto fluido y las diluciones de 30 y 40 μL del granulado de 250 mg de extracto fluido, los cuales presentan un porcentaje de inhibición del 0 al 5,02 %; en el rango de significancia B se encuentra la dilución de 60 μL del granulado de 200 mg de extracto fluido con un porcentaje de inhibición de 35,97 %; en el rango de significancia C se encuentra la dilución de 90 μL del granulado de 150 mg de extracto fluido con un porcentaje de inhibición de 50,48 %; en el rango de significancia D se encuentran las diluciones de 100 μL del granulado de 150 mg de extracto fluido con un porcentaje de inhibición de 81,34 % y 50 μL del granulado de 250 mg de extracto fluido con un porcentaje de inhibición de 86,56 %; en el rango de significancia E se encuentran las diluciones de 70 μL del granulado de 200 mg de extracto fluido con un porcentaje de inhibición de 91,17 % y 50 μL del granulado de 250 mg de extracto fluido con un porcentaje de inhibición de 86,56 %, en el rango de significancia F se encuentran las diluciones de 70 μL del granulado de 200 mg de extracto fluido con un porcentaje de inhibición de 91,17 % y 60 μL del granulado de 250 mg de extracto fluido con un porcentaje de inhibición de 93,17 % y en el rango de significancia G se encuentran las diluciones de 80, 90 y 100 μL del granulado de 200 mg de extracto fluido y las diluciones de 70, 80, 90 y 100 μL del granulado de 250 mg de extracto fluido, con un porcentaje de inhibición mayor al 99,44 %, como se puede observar en la Figura N° 13

Al igual que la evaluación de *Escherichia coli* en infecciones del tracto urinario, también existen investigaciones en donde se han utilizado arándanos como mecanismo de inhibición para contrarrestar el crecimiento de *Staphylococcus saprophyticus*.

Además, los porcentajes de inhibición dependerán de la cantidad de extracto o concentraciones que se utilicen en la formulación de cápsulas. De esta manera tenemos que para las diluciones de 70 μ L de granulado de 200 mg y 50 μ L de granulado de 250 mg de extracto fluido presentan un porcentaje de inhibición de 91,17 % y 86,56 % respectivamente, lo cual corrobora con los resultados obtenidos por Dong et al. (2018) quienes utilizaron cápsulas de 500mg de extracto de arándano presentando un grado de inhibición del 91 % y que es similar al obtenido en nuestro estudio. De igual forma Laplante et al. (2012) en su estudio de evaluación de extractos de arándano y la producción de biopelículas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus saprophyticus* mencionan que la utilización de arándanos evita la formación de biopelículas en las células epiteliales del sistema del tracto urinario reduciendo considerablemente el riesgo de padecer afectaciones urinarias.

Por otro lado, Barbosa et al. (2010) reportan un porcentaje de inhibición frente a *Staphylococcus saprophyticus* relativamente bajo que es de 5,8 %, este resultado es semejante a ciertos porcentajes de inhibición obtenidos en nuestra investigación y que hacen referencia a las diluciones de 30, 40 50, 60, 70 y 80 μ L del granulado de 150 mg de extracto fluido, las diluciones de 30, 40 y 50 μ L del granulado de 200 mg de extracto fluido y las diluciones de 30 y 40 μ L del granulado de 250 mg de extracto fluido, los cuales presentan un porcentaje de inhibición que van del 0 al 5,02 %.

En la figura 13 se puede apreciar que los granulados de 200 y 250 mg de extracto fluido a menor dilución presentan los porcentajes de inhibición más altos llegando al 100 % frente a *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM.

El mecanismo de acción que ejerce este tipo de extractos es por el daño que provoca en la estructura de la pared celular de *Staphylococcus*, específicamente en el peptidoglucano, así lo pudieron constatar en el trabajo realizado por Diarra et al.

(2013). Igualmente, Vasileiou et al. (2013) en el estudio realizado mencionan que la producción no enzimática de óxido nítrico en condiciones ácidas puede activar la nitrato reductasa bacteriana ocasionando una la inflamación que conduce a una actividad bacteriostática dentro del tracto urinario provocando la muerte de la *Staphylococcus saprophyticus*.

Representación en barras del porcentaje de inhibición de granulados del extracto fluido contra *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535E-5TM

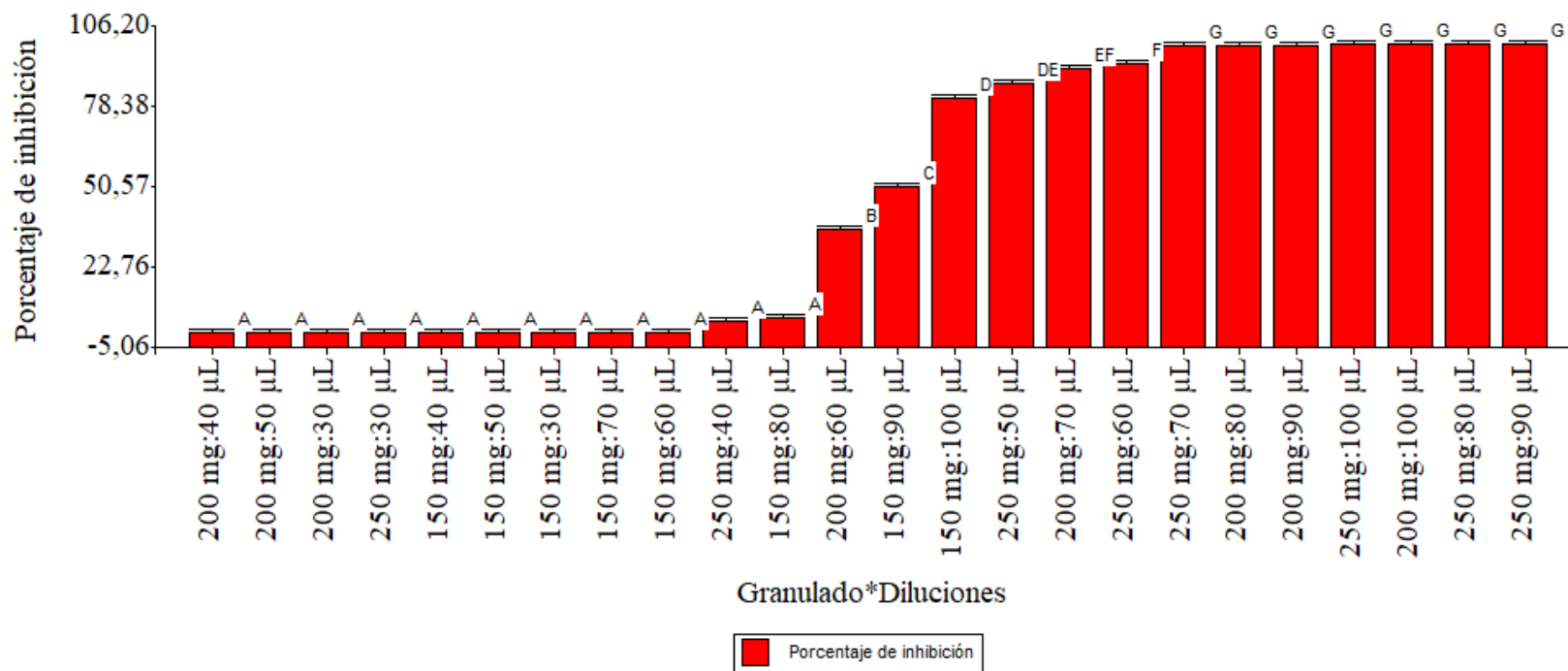


Figura N° 13. Porcentaje de inhibición de granulados de extracto fluido contra *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM
Elaborado por: Los Autores, 2019

Conclusiones

Se obtuvo un extracto fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño), el cual cumple con los controles fisico-químicos y microbiológicos, a partir del cual se formularon los granulados de las concentraciones establecidas en este trabajo, los cuales también cumplen con los controles antes mencionados.

La cuantificación de fenoles totales por el método Folin–Ciocalteu nos dió como resultados: en el extracto fluido una concentración de 243,99 mgAG/g, en el granulado de 150 mg una concentración de 2,37 mgAG/g, en el granulado de 200 mg una concentración de 4,91 mgAG/g y en el granulado de 250 mg se presentan los promedios más altos, con una concentración de 6,69 mgAG/g.

La cuantificación de antocianinas por el método de pH diferencial nos dió como resultados: en el extracto fluido una concentración 35,20 mg/g, en el granulado de 150 mg una concentración de 1,27 mg/g, en el granulado de 200 mg una concentración 1,90 mg/g y en el granulado de 250 mg se presentan los promedios más altos, con una concentración de 2,52 mg/g.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada granulado frente a las dos cepas uropatógenas (*Escherichia coli* ATCC 25922™ y *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5™), se tomó en cuenta inhibiciones mayores al 50 % resultando:

Para el granulado de 150 mg de extracto fluido contra *Escherichia coli* ATCC 25922™ presenta una MIC de 90 µL, la cual ejerce una inhibición de 65,15 % y para *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5™ presenta una MIC de 90 µL, la cual

ejerce una inhibición de 50,48 %; para el granulado de 200 mg de extracto fluido contra *Escherichia coli* ATCC 25922TM presenta una MIC de 70 μ L, la cual ejerce una inhibición de 90,31 % y para *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM presenta una MIC de 70 μ L, la cual ejerce una inhibición de 91,17 %, para el granulado de 250 mg de extracto fluido contra *Escherichia coli* ATCC 25922TM presenta una MIC de 50 μ L, la cual ejerce una inhibición de 87,51 % y para *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM presenta una MIC de 50 μ L, la cual ejerce una inhibición de 86,56 %.

En base a los resultados obtenidos se evidencia que los tres granulados de extracto fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño) presentan diferencia altamente significativa y son eficaces para inhibir las cepas uropatógenas de *Escherichia coli* ATCC 25922TM y *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM, siendo los granulados de 200 y 250 los más eficientes ya que alcanzan inhibiciones del 100 %, por lo tanto tales resultados *in vitro* corroboran que se puede emplear a *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño), un fruto endémico del Ecuador, como una alternativa efectiva para el tratamiento de infecciones del tracto urinario.

Referencias

- Abdelnour, A., y Jiménez, V. (2018). Micropropagation protocol for a native blueberry from Costa Rica (*Vaccinium consanguineum*). *Revista Tecnología En Marcha*, 31(1), 144–159. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i1.3504>
- Abraham, C., y Casillas, D. (2014). “Elaboración de un vídeo para la operación unitaria de granulación” (Universidad Autónoma de México). Retrieved from https://www.zaragoza.unam.mx/portal/wp-content/Portal2015/Licenciaturas/qfb/tesis/tesis_abraham_resendiz.pdf
- Abril, M., Ruiz, H., y Cumbal, L. H. (2018). Biosynthesis of multicomponent nanoparticles with extract of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) Berry: Application on heavy metals removal from water and immobilization in soils. *Journal of Nanotechnology*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9504807>
- Adrianzen Ramirez, J. J., y Chiroque Sánchez, J. A. (2017). Efecto in vitro del zumo de *Vaccinium corymbosum* sobre *Escherichia coli*. *Universidad Nacional de Trujillo*. Retrieved from <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/5841>
- Aguilera, M., Reza, M., Chew, R., y Meza, J. (2011). Propiedades funcionales de las antocianinas. *Revista de Ciencias Biológicas y de La Salud*, XIII, 16–19.
- Alpizar, M. (2009). *Formas farmacéuticas sólidas* (2a ed; 2009 México, DF:Facultad de Wuímica, UNAM, Ed.).
- Amaguaña, F., y Churuchumbi, E. (2018). *Estandarización fitoquímica del extracto de caléndula* (Universidad Politécnica Salesiana). Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/16149/1/UPS-QT13324.pdf>
- American Type Culture Collection (ATCC). (2019). Retrieved October 29, 2019, from https://www.atcc.org/About/About_ATCC/Who_We_Are.aspx
- Andreu, A., Cacho, J., Coira, A., y Lepe, J. A. (2011). Diagnóstico microbiológico de las infecciones del tracto urinario. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(1), 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2010.06.008>
- Andreu, A., y Planells, I. (2016). Etiología de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad y resistencia de *Escherichia coli* a los antimicrobianos de primera línea. Estudio nacional multicéntrico. *Medicina Clínica*, 130(13), 481–486. <https://doi.org/10.1157/13119488>
- ANMAT. (2013). Farmacopea Argentina. Retrieved July 1, 2019, from http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/Farmacopea_Vol_IV/files/assets/basic-html/page235.html
- Aranda, J. (2016). Infección del tracto urinario por *Escherichia coli* resistente a antibióticos tratada con *Vaccinium macrocarpon* (arándano rojo): reporte de caso. *Revista Peruana de Medicina Integrativa*, 1(2), 50. <https://doi.org/10.26722/rpmi.2016.12.19>
- Argemi, X., Hansmann, Y., Prola, K., y Prévost, G. (2019). Coagulase-negative *Staphylococci* pathogenomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5). <https://doi.org/10.3390/ijms20051215>
- Arndt, O.-R., Baggio, R., Adam, A. K., Harting, J., Franceschinis, E., y Kleinebudde, P. (2018). Impact of different dry and wet granulation techniques on granule and tablet properties: A comparative study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107(12), 3143–3152. <https://doi.org/10.1016/J.XPHS.2018.09.006>
- ATCC. (2019a). *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers ATCC ® 25922&tra. Retrieved November 4, 2019, from <https://www.atcc.org/products/all/25922.aspx>

- ATCC. (2019b). *Staphylococcus saprophyticus subsp* (Fairbrother) Shaw. Retrieved November 4, 2019, from <https://www.atcc.org/products/all/15305D-5.aspx>
- Ayala, K. (2017). Caracterización morfológica del mortño *Vaccinium floribundum* Kunt en la sierra norte del Ecuador. Quito.
- Balouiri, M., Sadiki, M., y Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2015.11.005>
- Barbosa, C., Brown, M., Buxton, M., Zhang, L., DeBusscher, J., y Foxman, B. (2010). Cranberry juice fails to prevent recurrent urinary tract infection: results from a randomized placebo-controlled trial. *Clinical Infectious Diseases*, 23–30.
- Barnoiu, O. S., Sequeira-García Del Moral, J., Sanchez-Martínez, N., Díaz-Molina, P., Flores-Sirvent, L., y Baena-González, V. (2015). American cranberry (proanthocyanidin 120mg): Its value for the prevention of urinary tracts infections after ureteral catheter placement. *Actas Urológicas Españolas*, 39(2), 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.acuro.2014.07.003>
- BBPF. (2019). Color - Material Design - Desarrollador Android. Retrieved February 5, 2020, from Material Design color palettes website: <https://desarrollador-android.com/material-design/disenio-material-design/estilo/color/>
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Álvarez, A., y Rodríguez, E. (2004). Contenido de fenoles y flavonoides del propoleos argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23(3), 369–372. Retrieved from http://www.latamjpharm.org/trabajos/23/3/LAJOP_23_3_2_2_50A9K8V7K9.pdf
- Benites, M., Miranda, J., Cavero, L., Huatay, L., Revilla, Á., Portilla, A., ... Castro, M. (2007). Pruebas de control de calidad para cápsulas selladas de Iridio-192 con clasificación 63515, según las normas ISO-2919 / 9978 y su implementación en la Planta de Producción de Radioisótop. *IPEN*.
- Blanco, V. M., Maya, J. J., Correa, A., Perenguez, M., Muñoz, J. S., Motoa, G., ... Villegas, M. V. (2016). Prevalencia y factores de riesgo para infecciones del tracto urinario de inicio en la comunidad causadas por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido en Colombia. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(9), 559–565. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.11.017>
- Bueno, L. P., (2019). Avaliação da capacidade antioxidante e antimicrobiana dos compostos fenólicos presentes em cranberry *Vaccinium macrocarpon* desidratada e em medicamento fitoterápico usado na prevenção de infecções do trato urinário. Retrieved from <http://bdm.ufmt.br/handle/1/923>
- Buitrago, C. (2013). Infección del tracto urinario. In *Nefrología Básica 2* (pp. 404–413). Retrieved from <http://asocolnef.com/wp-content/uploads/2018/03/Cap41.pdf>
- Bustamante, S., Ortiz, V., y Moya, M. (2015). Revista cubana de farmacia. In *Revista Cubana de Farmacia* (Vol. 49). Retrieved from <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=65758>
- Cabrera, M., Salinas, Y., Velázquez, G., y Espinosa, E. (2009). Contenido de fenoles solubles e insolubles en las estructuras del grano de maíz y su relación con propiedades físicas. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v43n8/v43n8a6.pdf>
- Campos, C. J., y López, L. C. (2017). Efecto inhibitorio in vitro del extracto acuoso de *Allium sativum* L “ajo” frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii* multirresistentes aisladas del Hospital Regional de Lambayeque.

- Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo*. Retrieved from <http://repositorio.unprg.edu.pe/handle/UNPRG/995>
- Castillo, M., y Janon, M. (2019). *Caracterización y microencapsulación de compuestos bioactivos del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth), en la sierra norte del Ecuador*. Retrieved from <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/10240>
- Cerra, H., Aversa, N., Carbone, N., Carnevali, S., Chiesa, C., Covo, M., ... Zaresky, A. (2013). *Manual de Microbiología aplicada a las industrias farmacéutica, cosmética y de productos médicos*.
- Cesoniene, L., Jasutiene, I., y Sarkinas, A. (2017). Phenolics and anthocyanins in berries of European cranberry and their antimicrobial activity. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 45(12), 992–999. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20173403>
- Chen, L.-Y., Cheng, C.-W., y Liang, J.-Y. (2015). Effect of esterification condensation on the Folin–Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chemistry*, 170, 10–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.038>
- Chindembele, C., Romeu, B., Chivela, M., y Rojas, N. (2015, July 25). Evaluación de la resistencia antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* causantes de infecciones urinarias en la provincia de Huambo, Angola. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 4(2), 71-77 pp. Retrieved from <http://www.rccb.uh.cu/index.php/RCCB/article/view/172>
- Coba, Pablo, Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M., Yugsi, E., & Huachi, L. (2012). Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *La Granja. Revista de Ciencias de La Vida*, 16(2), 5–13.
- Dalgo, M. A., Jose, M., Cuvi, A., y Guerrero, C. M. (2014). Relación del desarrollo del color con el contenido de antocianinas y clorofila en diferentes grados de madurez de mortiño (*Vaccinium floribundum*) (Development relationship of color with anthocyanins and chlorophyll content in diferent degrees of maturi. *Universidad Tecnológica Equinoccial*, 2, 14–28. Retrieved from <http://scielo.senescyt.gob.ec/pdf/enfoqueute/v5n2/1390-6542-enfoqueute-5-02-00014.pdf>
- Deroles, S. (2008). Anthocyanin biosynthesis in plant cell cultures: A potential source of natural colourants. In *Anthocyanins* (pp. 108–167). https://doi.org/10.1007/978-0-387-77335-3_5
- Diarra, M. S., Block, G., Rempel, H., Oomah, B. D., Harrison, J., McCallum, J., ... Malouin, F. (2013). In vitro and in vivo antibacterial activities of cranberry press cake extracts alone or in combination with β -lactams against *Staphylococcus aureus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-90>
- Dong, B., Zimmerman, R., Dang, L., y Pillai, G. (2018). *Cranberry for the Prevention and Treatment of Non-Complicated Urinary Tract Infections*. <https://doi.org/10.15226/2374-6866/6/1/00193>
- Ehlers, S., y Merrill, S. A. (2019). *Staphylococcus saprophyticus*. In *StatPearls*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29493989>
- Espinosa, W., Garzón, L., y Medina, O. (2016). Validación de una metodología analítica para la cuantificación de polifenoles totales, en procesos de extracción asistida por microondas sobre frutos de la especie colombiana *Vaccinium meridionale*. *Rev. Colombiana Ciencia Química Farmacéutica*, 45, 109–126. <https://doi.org/150003>

- Estévez, L., & Mosquera, R. A. (2009). Conformational and substitution effects on the electron distribution in a series of anthocyanidins. *The Journal of Physical Chemistry A*, *113*(36), 9908–9919. <https://doi.org/10.1021/jp904298z>
- European Medicines Agency. (2006). Stability data package for registration applications in climatic zones III and IV. Retrieved November 26, 2019, from <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q1f-stability-data-package-registration-climatic-zones-iii-iv>
- Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L., y Gurr, S. J. (2018). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, *484*(7393), 186–194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>
- Flores, J. (2017). Colección y caracterización morfológica in situ del mortiño (*Vaccinium floribundum* kunt) en la sierra. Retrieved from http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2585/1/T-ESPE-IASA_I-003248.pdf
- Freire, A. (2004). *Botánica sistemática Ecuatoriana*. Retrieved from <https://www.worldcat.org/title/botanica-sistemica-ecuatoriana/oclc/55232774>
- Gad, S. C. (2007). Pharmaceutical manufacturing handbook: Production and processes. In *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes*. <https://doi.org/10.1002/9780470259818>
- Gallegos, M. (2016). Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *Anales de La Facultad de Medicina*, *77*(4), 327. <https://doi.org/10.15381/anales.v77i4.12647>
- Galvis, J. C., Rodríguez, M. X., Pulido, A. del P., Castañeda, R., Celis, A. M., y Linares, M. Y. (2017). Actividad antifúngica in vitro de azoles y anfotericina B frente a *Malassezia furfur* por el método de microdilución M27-A3 del CLSI y Etest®. *Revista Iberoamericana de Micología*, *34*(2), 89–93. <https://doi.org/10.1016/J.RIAM.2016.05.004>
- Garrido, V. (2015). Arándano rojo *Vaccinium macrocarpon*. *Reduca (Biología)*. *Serie Botánica*, *7*(2), 100–112. Retrieved from <http://eol.org>
- Garzón, G. A. (2008). *Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión*.
- Gennaro, A. R., Remington, J. P. (Joseph P., y Belluci, S. (2003). *Remington farmacia*. Editorial Médica Panamericana.
- Gil, Y., Regodón, M., Wilhelmi de Cal, I., López, F., y Gómez, J. L. (2016). Valoración de 2 técnicas automatizadas de microdilución frente a dilución en agar en la determinación de la sensibilidad a fosfomicina en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *34*(7), 406–408. <https://doi.org/10.1016/J.EIMC.2015.09.019>
- Giusti, M., y Wrolstad, R. (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, *2–2*, 13. <https://doi.org/10.1002/0471709085.ch18>
- Gonzalez, B. D., Rodríguez, I. G., y Delgado, M. M. D. (2019). Caracterización de gestantes con urosepsis y resistencia antimicrobiana de *Escherichia coli*, Hospital General Docente “Dr. Agostinho Neto”, Guantánamo Characterization. *Revista Información Científica*, *98*(2), 184–195. Retrieved from <http://revinfcientifica.sld.cu/index.php/ric/article/view/2144>
- Guerrero, A., y Castañeda, J. (2015). Pigmentos en frutas y hortalizas rojas_antocianinas. *Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental de La Universidad de Las Américas Puebla*, *9*. Retrieved from

- <http://web.udlap.mx/tsia/files/2016/05/TSIA-9-Castaneda-Sanchez-et-al-2015.pdf>
- Guzmán, A. (2017). *Evaluación de un extracto de mortiño rico en polifenoles para disminuir la gluconeogénesis en células hepáticas de rata*. <https://doi.org/UDLA-EC-TIB-2017-24>
- Hernandez, S., Lozo, S., Junot, M., Arancibia, M., Flores, S., Valencia, A., y Valenzuela, V. (2014). Características organolépticas y físico-químicas de propóleos de la provincia de Ñuble, VIII Región-Chile. *Ohmic Heating in Food Processing*, 321–329. <https://doi.org/10.1201/b16605>
- Hooton, T. M. (2001). Recurrent urinary tract infection in women. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(4), 259–268. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(00\)00350-2](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(00)00350-2)
- Hoskovec, L. (2017). *Vaccinium floribundum* Kunth – brusnice / brusnica | BOTANY.cz. Retrieved September 10, 2019, from 19-noviembre.2017 website: <https://botany.cz/cs/vaccinium-floribundum/>
- Idrovo, N. (2015). *Investigación del mortiño, beneficios nutricionales y su aplicación a la repostería*. Retrieved from http://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/11803/1/53331_1.pdf
- INEC. (2013). *Anuario de estadísticas hospitalarias camas y egresos 2013*. Retrieved from http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_Sociales/Camas_Egresos_Hospitalarios/Publicaciones-Cam_Egre_Host/Anuario_Camas_Egresos_Hospitalarios_2013.pdf
- Institute National Committe for Clinical, I. (2015). *M07-A10 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Retrieved from www.clsi.org.
- Laplante, K. L., Sarkisian, S. A., Woodmansee, S., Rowley, D. C., y Seeram, N. P. (2012). Effects of cranberry extracts on growth and biofilm production of *Escherichia coli* and *staphylococcus sp.* *Phytotherapy Research*, 26(9), 1371–1374. <https://doi.org/10.1002/ptr.4592>
- Lavigne, J. P., Bourg, G., Combescure, C., Botto, H., y Sotto, A. (2008). In-vitro and in-vivo evidence of dose-dependent decrease of uropathogenic *Escherichia coli* virulence after consumption of commercial *Vaccinium macrocarpon* (cranberry) capsules. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(4), 350–355. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01917.x>
- León, J., González, T. R., y Rivero, A. E. G. (2017). Fitogeografía y morfología de los *Vaccinium* (Ericaceae) “arándanos nativos” del Perú. *INDES Revista de Investigación Para El Desarrollo Sustentable*, 3(1), 43-52 Doi:10.25127/indes.201501.004. <https://doi.org/10.25127/indes.20153.133>
- Liu, Y., Gallardo, A. M., Pinzon, P. A., Reynolds, Y., Rodriguez, G., y Camesano, T. A. (2008). Cranberry changes the physicochemical surface properties of *E. coli* and adhesion with uroepithelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65(1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.02.012>
- Llvisaca, S., Manzano, P., Ruales, J., Flores, J., Mendoza, J., Peralta, E., y Cevallos-Cevallos, J. M. (2018). Chemical, antimicrobial, and molecular characterization of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) fruits and leaves. *Food Science & Nutrition*, 6(4), 934–942. <https://doi.org/10.1002/fsn3.638>
- Martinez, S. (2018). Proceso de atención de enfermería en paciente de 26 años con diagnostico de infección de vias urinarias (ivu) en el centro de salud la venus. (UTB). Retrieved from <http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/49000/4489/6/E-UTB-FCS-ENF-000082.pdf>

- MBM, D. (2019). Productos diagnósticos CRYOBANK. Sistema de conservación de cultivos bacterianos. Retrieved October 17, 2019, from CRYOBANK website: <http://www.mbm.com.mx/t-cryobank.php>
- Medina, E. L., León, J. M., Coico, F. M., Morales, C. A. D., Castillo, J. D. L. C., Barrantes, M. Y. R., ... Carnero, A. G. (2016). Registro del género *Vaccinium* en el norte del Perú. *Pueblo Continente*, 25(2), 73–80. Retrieved from <http://journal.upao.edu.pe/PuebloContinente/article/view/264/232>
- Mendes, A. da C. (2019). *Vaccinium macrocarpon* : evidência científica na clínica. In *Universidade de de Coimbra*. Retrieved from <https://estudogeral.sib.uc.pt/handle/10316/81872>
- Millipore. (2017). *MC-Media Pad A convenient and approved method for counting contaminants in food and beverage products*.
- Ministerio de Salud Publica del Ecuador. (2013). *Guía de práctica clínica (GPC) Infección de vías urinarias en el embarazo*. Retrieved from www.salud.gob.ec
- Morena, S., Rodríguez, S., & Martínez, N. (2017). Infecciones urinarias. *Boletín Farmacoterapéutico de Castilla La Mancha*, XVIII, 11. Retrieved from https://sescam.castillalamancha.es/sites/sescam.castillalamancha.es/files/documentos/farmacia/bft_infecciones_urinarias.pdf
- Olszewski, R. (2017). Cranberries *Vaccinium macrocarpon* na nutrição de cães: influência na digestibilidade, palatabilidade e no curso de infecções do trato urinário (Universidade Federal do Paraná). Retrieved from <https://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/47438/R - D - VANESSA REGINA OLSZEWSKI.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- OMS. (2017). La resistencia a los antimicrobianos, Organización Mundial de la Salud. Retrieved June 12, 2019, from <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/es/>
- Ortiz, J. (2018). *Obtención de un extracto rico en polifenoles a partir del residuo de la pulpa de mortiño*.
- Ortiz, Jacqueline, Marín-Arroyo, M.-R., Noriega-Domínguez, M.-J., Navarro, M., y Arozarena, I. (2013). Color, phenolics, and antioxidant activity of blackberry (*Rubus glaucus* Benth.), Blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth.), and apple wines from Ecuador. *Journal of Food Science*, 78(7), C985–C993. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12148>
- Pigrau, C. (2013). *Infección del tracto urinario*. Retrieved from <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/otrosdeinteres/seimc-dc2013-LibroInfecciondeltractoUrinario.pdf>
- Pinzón-Arango, P. A., Liu, Y., y Camesano, T. A. (2009). Role of cranberry on bacterial adhesion forces and implications for *Escherichia coli*-uroepithelial cell attachment. *Journal of Medicinal Food*, 12(2), 259–270. <https://doi.org/10.1089/jmf.2008.0196>
- Prior, R., Xu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. <https://doi.org/10.1021/JF0502698>
- Quintana, H., Silva, M., Taboada, V., y Ortiz T. (2005). Revista médica herediana : órgano oficial de la Facultad de Medicina, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru. In *Revista Medica Herediana* (Vol. 16). Retrieved from http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2005000100007
- Rajniak, P., Stepanek, F., Dhanasekharan, K., Fan, R., Mancinelli, C., y Chern, R. T. (2009). A combined experimental and computational study of wet granulation in a Wurster fluid bed granulator. *Powder Technology*, 189(2), 190–201.

<https://doi.org/10.1016/J.POWTEC.2008.04.027>

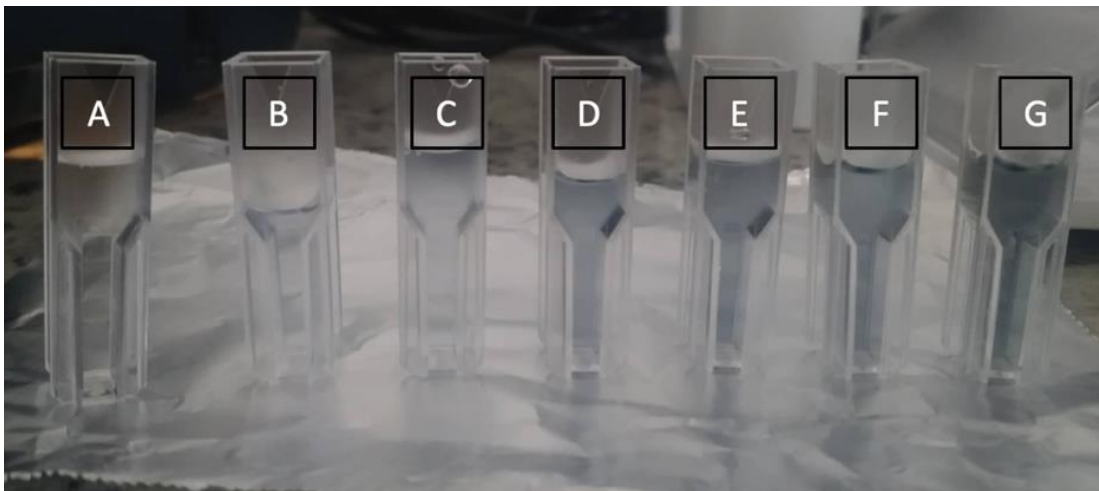
- Risco, E., Miguélez, C., Sanchez de Badajoz, E., & Rouseaud, A. (2010). Effect of american cranberry (Cysticlean) on *Escherichia coli* adherence to bladder epithelial cells. In vitro and in vivo study. *Archivos Espanoles de Urologia*, 63(6), 430. <https://doi.org/10.4321/S0004-06142010000600003>
- Roca, A., y Pajuelo, D. (2008). Frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de patógenos aislados en infección del tracto urinario. *Rev Biomed*, 19, 110–115. Retrieved from <http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb081925.pdf>
- Sánchez, S. L. (2014). Investigación de la adulteración y falsificación en cápsulas de *Calea urticifolia* (Juanislama), comercializadas en 7 mercados del área metropolitana de San Salvador. *Universidad Del Salvador*, 1–179.
- Scharf, B., Sendker, J., Dobrindt, U., y Hensel, A. (2019). Influence of cranberry extract on tamm-horsfall protein in human urine and its antiadhesive activity against uropathogenic *Escherichia coli*. *Planta Medica*, 85(02), 126–138. <https://doi.org/10.1055/a-0755-7801>
- Solís, P. N., Guerrero de Solís, N., Gattuso, S., Cáceres, A., y Fitoterápicos, P. (2003). Manual de caracterización y análisis de drogas vegetales y productos fitoterapéuticos. <https://doi.org/615.321M294m>
- Sotomayor, R. (2013). Extraction and quantification of anthocyanins from the grain of *Zea mays* L. or purple corn. *Ciencia y Desarrollo*, 16(1), 74. <https://doi.org/10.21503/CienciayDesarrollo.2013.v16i1.06>
- Tempera, G., Corselloi, S., Genovese, C., Carusoi, F. E., Nicolosi, D., y Tempera, G. (2010). Inhibitory activity of cranberry extraction on the bacterial adhesiveness in the urine of women: An ex-vivo study. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 23(2), 611–618.
- UPS. (2019). Universidad Politécnica Salesiana. Retrieved July 9, 2019, from <https://www.ups.edu.ec/>
- Vasco, C. (2017). Phenolic compounds in Ecuadorian fruits. In *Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Dept. of Food Science*.
- Vasco, C., Riihinen, K., Ruales, J., y Kamal-Eldin, A. (2009). Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño *Vaccinium floribundum* kunth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8274–8281. <https://doi.org/10.1021/jf9013586>
- Vasileiou, I., Katsargyris, A., Theocharis, S., y Giaginis, C. (2013, August). Current clinical status on the preventive effects of cranberry consumption against urinary tract infections. *Nutrition Research*, Vol. 33, pp. 595–607. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2013.05.018>
- Vizuete, K. S., Kumar, B., Vaca, A. V, Debut, A., y Cumbal, L. (2016). Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) berry assisted green synthesis and photocatalytic performance of Silver–Graphene nanocomposite. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 329, 273–279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2016.06.030>
- Wojnicz, D., Sycz, Z., Walkowski, S., Gabrielska, J., Aleksandra, W., Alicja, K., ... Hendrich, A. (2015). Study on the influence of cranberry extract Žuravit S·O·S® on the properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains, their ability to form biofilm and its antioxidant properties. *Phytomedicine*, 19(6), 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.12.013>
- World Health Organization (WHO). (2018). *Annex 1 WHO guidelines on good herbal processing practices for herbal medicines*. Ginebra.
- Wurgaft, K. (2016). Infecciones del tracto urinario. *Revista Médica Clínica Las*

- Condes*, 21(4), 629–633. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70579-4](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70579-4)
- Yagui, M. (2018). Resistencia antimicrobiana: nuevo enfoque y oportunidad. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35(1), 7. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3594>
- Zapata, L., Heredia, A., Quinteros, C., Malleret, A., Clemente G, y Carcel, J. (2014). *Optimización de la extracción de antocianinas de arándanos*. 25, 166–192. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14532635008>
- Zapata, Luz. (2014). *Obtención de extracto de antocianinas a partir de arándanos para ser utilizado como antioxidante y colorante en la industria alimentaria* (Universidad Politécnica de Valencia). Retrieved from [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/39105/Versión 3 Tesis Luz Marina Zapata.pdf %281%29.PDF?sequence=21](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/39105/Versión%203%20Tesis%20Luz%20Marina%20Zapata.pdf%281%29.PDF?sequence=21)
- Zapata, S., Piedrahita, A., y Rojano, B. (2014). Capacidad atrapadora de radicales de oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas. In *Perspectivas en Nutrición Humana*. Retrieved from <http://aprendeonline.udea.edu.co/revistas/index.php/nutricion/article/view/20310/17161>

Anexos

Anexo No.1.

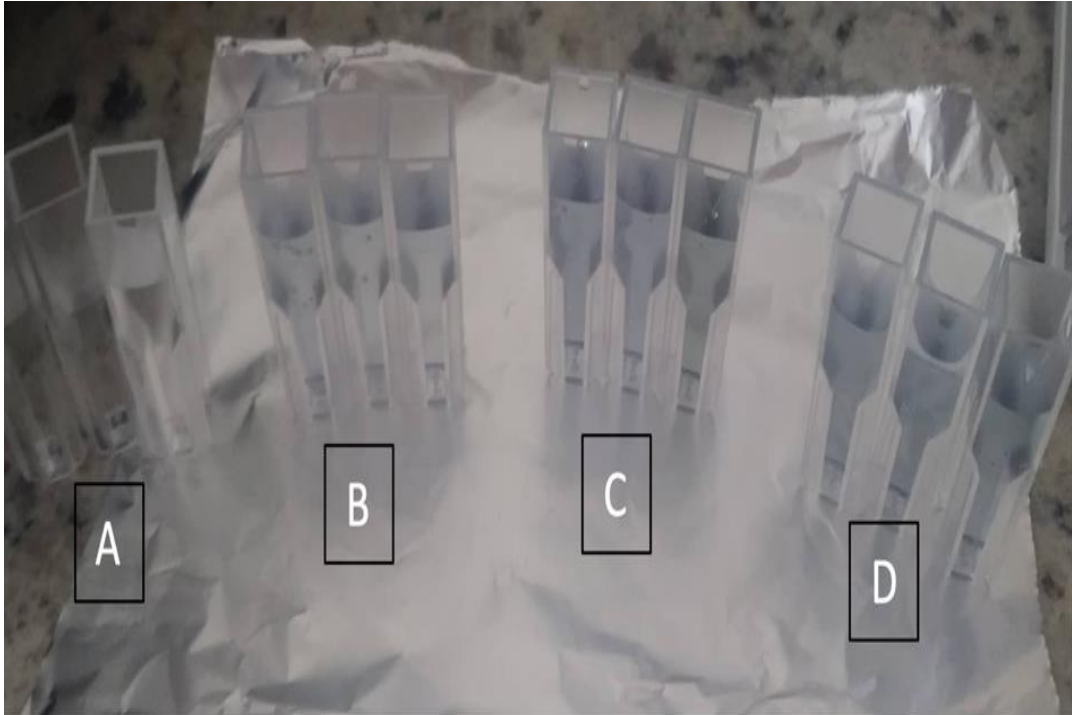
Estándares de ácido gálico para curva de calibración (A = blanco; B = 1 ppm; C = 2 ppm; D = 10 ppm; E = 20 ppm; F = 50 ppm; G = 80 ppm).



Elaborado por: Los Autores, 2019.

Anexo No.2.

Mediciones de muestras de granulados para cuantificación de fenoles totales, (A = blanco; B = 150 mg; C = 200 mg; D = 250 mg).



Elaborado por: Los Autores, 2019.

Anexo No.3.

Cuantificación de antocianinas en extracto fluido y granulados de extracto fluido de *Vaccinium floribundum Kunth* (mortiño), por el método de pH diferencial.



Anexo No.4.

Distribución del contenido de cada microplaca para la microdilución.

	H	G	F	E	D	C	B	A
	100 µL de solución McFarland de la bacteria respectiva + 125 µL de TSB estéril (control negativo)-							
	100 µL de solución McFarland de la bacteria respectiva + 50 µL de TSB estéril + 75 µL de DMSO al 10 % (control negativo DMSO).							
	225 µL de TSB estéril (blanco).							
	100 µL de TSB estéril + 125 µL de Antibiótico (control positivo).							
	100 µL de solución McFarland de la bacteria respectiva + 95 µL de TSB estéril + 30 µL de solución de granulado respectivamente.							
	100 µL de solución McFarland de la bacteria respectiva + 85 µL de TSB estéril + 40 µL de solución de granulado respectivamente.							
	100 µL de solución McFarland de la bacteria respectiva + 75 µL de TSB estéril + 50 µL de solución de granulado respectivamente).							
	100 µL de solución McFarland de la bacteria respectiva + 65 µL de TSB estéril + 60 µL de solución de granulado respectivamente.							
	100 µL de solución McFarland de la bacteria respectiva + 55 µL de TSB estéril + 70 µL de solución de granulado respectivamente.							
	100 µL de solución McFarland de la bacteria respectiva + 45 µL de TSB estéril + 80 µL de solución de granulado respectivamente.							
	100 µL de solución McFarland de la bacteria respectiva + 35 µL de TSB estéril + 90 µL de solución de granulado respectivamente.							
	(A12 a H12): 100 µL de solución McFarland de la bacteria respectiva + 25 µL de TSB estéril + 100 µL de solución de granulado respectivamente.							

Elaborado por: Los Autores, 2019.

Anexo No.5.

Resultados de cuantificación de fenoles totales: Absorbancias y concentraciones en diferentes unidades de medida

Muestra	Repeticiones	Absorbancia	Concentraciones				
			mgAG/mL	mgAG/100 mL	mgAG/L	gAG/L	mgAG/g
Extracto fluido	1	1,1352	24,3883	2438,8350	24388,3496	24,3883	243,8835
Extracto fluido	2	1,1354	24,3926	2439,2644	24392,6442	24,3926	243,9264
Extracto fluido	3	1,1348	24,3798	2437,9760	24379,7604	24,3798	243,7976
150 mg	1	0,0104	0,2355	23,5519	235,5192	0,2355	2,3552
150 mg	2	0,0105	0,2377	23,7667	237,6665	0,2377	2,3767
150 mg	3	0,0105	0,2377	23,7667	237,6665	0,2377	2,3767
200 mg	1	0,0227	0,4996	49,9637	499,6371	0,4996	4,9964
200 mg	2	0,0219	0,4825	48,2459	482,4587	0,4825	4,8246
200 mg	3	0,0223	0,4910	49,1048	491,0479	0,4910	4,9105
250 mg	1	0,0298	0,6521	65,2095	652,0954	0,6521	6,5210
250 mg	2	0,0311	0,6800	68,0010	680,0103	0,6800	6,8001
250 mg	3	0,0309	0,6757	67,5716	675,7157	0,6757	6,7572

Elaborado por: Los Autores, 2019.

Anexo No.6.

Resultados de cuantificación de antocianinas: Absorbancias y concentraciones en diferentes unidades de medida.

Muestra	Repeticiones	Buffer pH 1		Buffer pH 4.5		Absorbancia Total (A)	Concentración de antocianinas			
		510nm	700nm	510nm	700nm		mg/L	mg / 10mL	mg/kg (ppm)	mg/g
Extracto fluido	1	3,9881	0,0161	0,3073	2,0501	5,7148	9543,0787	95,4308	35344,7358	35,3447
Extracto fluido	2	3,9691	0,0160	0,3077	2,0504	5,6958	9511,2840	95,1128	35226,9777	35,2270
Extracto fluido	3	3,9489	0,0319	0,2822	2,0326	5,6674	9463,9259	94,6393	35051,5776	35,0516
150 mg	1	0,1879	0,0391	0,0694	0,1259	0,2053	342,8281	3,4283	1269,7337	1,2697
150 mg	2	0,1875	0,0387	0,0690	0,1256	0,2054	342,9951	3,4300	1270,3522	1,2704
150 mg	3	0,1881	0,0389	0,0683	0,1265	0,2074	346,3349	3,4633	1282,7217	1,2827
200 mg	1	0,2805	0,0399	0,0783	0,1447	0,3070	512,5723	5,1257	1898,4158	1,8984
200 mg	2	0,2771	0,0396	0,0733	0,1453	0,3095	516,8305	5,1683	1914,1870	1,9142
200 mg	3	0,2773	0,0398	0,0737	0,1425	0,3063	511,4868	5,1149	1894,3957	1,8944
250 mg	1	0,3695	0,0382	0,0868	0,1619	0,4064	678,5759	6,7858	2513,2440	2,5132
250 mg	2	0,3697	0,0392	0,0865	0,1613	0,4053	676,7223	6,7672	2506,3789	2,5064
250 mg	3	0,3728	0,0397	0,0855	0,1591	0,4067	679,1436	6,7914	2515,3468	2,5153

Elaborado por: Los Autores, 2019.

Anexo No.7.

Análisis estadístico de cuantificación de fenoles totales: Análisis de varianza y test de Tukey al 5n %

Análisis de varianza

Variable	N	R ₂	R ₂ Adj	CV
Concentración mgAG/g	9	1,00	1,00	2,15

Elaborado por: Los Autores & Infostat, 2019.

Cuadro de análisis de varianza

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo	28,32	2	14,16	1410,31	<0,0001
Concentración de granulado	28,32	2	14,16	1410,31	<0,0001
Error	0,06	6	0,01		
Total	28,38	8			

Elaborado por: Infostat y Los Autores, 2019.

Test: Tukey Alfa = 0,05

Concentración de granulado	Medias	n	Error Experimental	
150 mg	2,37	3	0,06	A
200 mg	4,91	3	0,06	B
250 mg	6,69	3	0,06	C

Elaborado por: Infostat y Los Autores, 2019.

Nota: Las tres concentraciones (150,200 y 250) son significativamente diferentes en cuanto a concentración de fenoles.

Anexo No.8.

Análisis estadístico de cuantificación de antocianinas: Análisis de varianza y test de Tukey al 5%

Análisis de varianza

Variable	N	R ₂	R ₂ Adj	CV
Antocianinas en la droga	9	1,00	1,00	1,17

Elaborado por: Infostat y Los Autores, 2019.

Cuadro de análisis de varianza

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo	0,11	2	0,05	5405,08	<0,0001
Concentración de granulado	0,11	2	0,05	5405,08	<0,0001
Error	5,95E-0,5	6	9,9E-06		
Total	0,11	8			

Elaborado por: Infostat y Los Autores, 2019.

Test: Tukey Alfa = 0,05

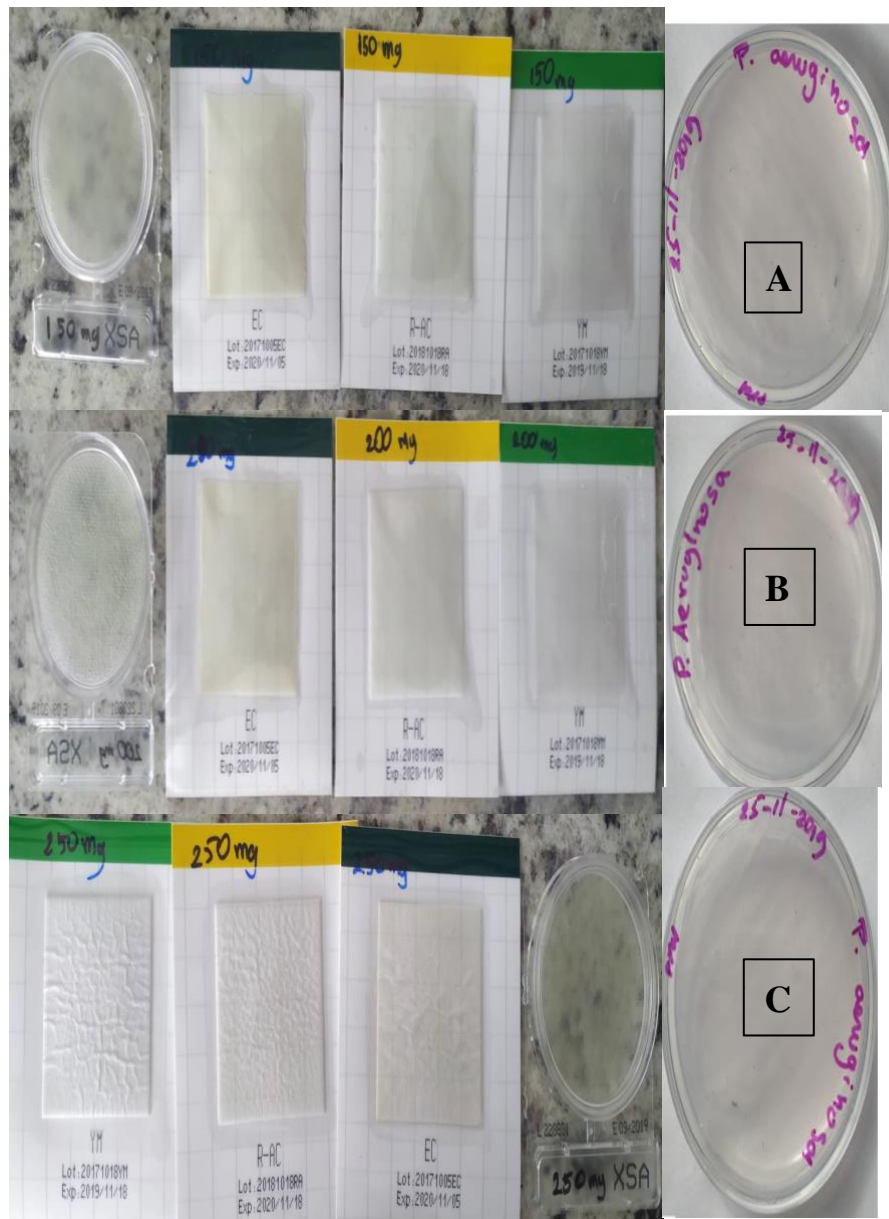
Concentración de granulado	Medias	n	Error Experimental	
150 mg	0,17	3	1,8E-03	A
200 mg	0,22	3	1,8E-03	B
250 mg	0,42	3	1,8E-03	C

Elaborado por: Infostat y Los Autores, 2019.

Nota: Las tres concentraciones (150,200 y 250) son significativamente diferentes en cuanto a concentración de fenoles.

Anexo No.9.

Control de calidad de cápsulas de extracto fluido, pruebas microbiológicas después de 24 horas de incubación.



Nota: A. Pruebas microbiológicas en granulados de 150 mg de extracto fluido, B. Pruebas microbiológicas en granulados de 200 mg de extracto fluido, C. Pruebas microbiológicas en granulados de 250 mg de extracto fluido

Elaborado por: Los Autores, 2019.

Anexo No.10.

Control de calidad de cápsulas de extracto fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth
 Porcentaje de humedad

Muestra	Peso crisol (mg)	Muestra de granulado (g)	Peso crisol + muestra (mg)	Peso (mg)crisol después del desecado	Porcentaje de Humedad (%)
150 A	21,1893	3004,9	24,19	23,90	10,723
150 B	23,5787	3009	26,59	26,30	10,678
150 C	26,0646	3004,4	29,07	28,78	10,651
200 A	21,438	3007,7	24,45	24,14	11,269
200 B	22,8406	3003,6	25,84	25,55	11,039
200 C	21,6861	3000,5	24,69	24,39	11,035
250 A	22,6375	3005	25,64	25,33	11,412
250 B	23,1948	3002,7	26,20	25,88	11,666
250 C	23,9933	3006,6	27,00	26,69	11,616
Promedio					11,1 ± 0,39

Medidas de peso y longitud de cápsulas

150 mg			200 mg			250 mg		
N°	Peso (mg)	Longitud	N°	Peso (mg)	Longitud	N°	Peso (mg)	Longitud
150 mg	419	18,6	200 mg	413	18,3	250 mg	419	18,6

150 mg	419	18,4	200 mg	419	18,7	250 mg	415	18,7
150 mg	417	18,6	200 mg	418	18,5	250 mg	419	18,5
150 mg	410	18,3	200 mg	417	18,6	250 mg	414	18,3
150 mg	413	18,6	200 mg	413	18,5	250 mg	416	18,6
150 mg	409	18,5	200 mg	418	18,5	250 mg	415	18,5
150 mg	410	18,6	200 mg	412	18,7	250 mg	413	18,6
150 mg	419	18,3	200 mg	412	18,4	250 mg	419	18,3
150 mg	413	18,7	200 mg	417	18,6	250 mg	415	18,5
150 mg	416	18,6	200 mg	415	18,5	250 mg	417	18,7
150 mg	415	18,7	200 mg	409	18,5	250 mg	419	18,5
150 mg	413	18,3	200 mg	410	18,3	250 mg	410	18,6
150 mg	419	18,7	200 mg	415	18,5	250 mg	417	18,6
150 mg	415	18,5	200 mg	419	18,6	250 mg	410	18,6
150 mg	419	18,6	200 mg	419	18,5	250 mg	411	18,7
150 mg	412	18,5	200 mg	417	18,4	250 mg	413	18,5
150 mg	417	18,5	200 mg	412	18,7	250 mg	418	18,3
150 mg	410	18,7	200 mg	415	18,5	250 mg	416	18,5
150 mg	419	18,4	200 mg	413	18,4	250 mg	417	18,4
150 mg	411	18,6	200 mg	419	18,7	250 mg	415	18,7
150 mg	413	18,6	200 mg	415	18,7	250 mg	415	18,6
150 mg	413	18,3	200 mg	419	18,3	250 mg	419	18,7
150 mg	411	18,3	200 mg	414	18,6	250 mg	417	18,7
150 mg	416	18,5	200 mg	412	18,6	250 mg	416	18,3
150 mg	417	18,4	200 mg	416	18,7	250 mg	417	18,6

150 mg	418	18,6	200 mg	417	18,4	250 mg	410	18,6
150 mg	415	18,3	200 mg	417	18,5	250 mg	413	18,5
150 mg	414	18,6	200 mg	416	18,5	250 mg	410	18,3
150 mg	415	18,5	200 mg	412	18,5	250 mg	417	18,6
150 mg	414	18,5	200 mg	418	18,6	250 mg	415	18,4
150 mg	417	18,7	200 mg	415	18,5	250 mg	415	18,7
150 mg	414	18,4	200 mg	416	18,3	250 mg	419	18,3
150 mg	419	18,5	200 mg	418	18,7	250 mg	417	18,4
150 mg	413	18,5	200 mg	413	18,4	250 mg	416	18,3
150 mg	415	18,3	200 mg	414	18,6	250 mg	416	18,6
150 mg	414	18,6	200 mg	418	18,4	250 mg	413	18,4
150 mg	418	18,7	200 mg	419	18,7	250 mg	414	18,5
150 mg	415	18,6	200 mg	419	18,7	250 mg	411	18,7
150 mg	413	18,6	200 mg	412	18,7	250 mg	418	18,4
150 mg	419	18,5	200 mg	415	18,5	250 mg	416	18,5
150 mg	418	18,7	200 mg	412	18,5	250 mg	411	18,5
150 mg	417	18,5	200 mg	413	18,6	250 mg	416	18,7
150 mg	413	18,4	200 mg	413	18,6	250 mg	417	18,4
150 mg	418	18,6	200 mg	417	18,6	250 mg	419	18,3
150 mg	412	18,3	200 mg	419	18,7	250 mg	416	18,6
150 mg	412	18,6	200 mg	410	18,5	250 mg	415	18,7
150 mg	417	18,5	200 mg	417	18,3	250 mg	419	18,5
150 mg	415	18,4	200 mg	410	18,6	250 mg	411	18,7
150 mg	414	18,7	200 mg	411	18,5	250 mg	410	18,5

150 mg	419	18,7	200 mg	419	18,6	250 mg	417	18,6
150 mg	413	18,5	200 mg	418	18,3	250 mg	417	18,5
150 mg	418	18,7	200 mg	410	18,5	250 mg	415	18,5
150 mg	415	18,4	200 mg	412	18,3	250 mg	413	18,7
150 mg	418	18,7	200 mg	415	18,6	250 mg	415	18,4
150 mg	416	18,5	200 mg	415	18,7	250 mg	419	18,6
150 mg	417	18,3	200 mg	419	18,3	250 mg	410	18,5
150 mg	410	18,6	200 mg	417	18,4	250 mg	416	18,6
150 mg	417	18,6	200 mg	416	18,4	250 mg	417	18,3
150 mg	416	18,7	200 mg	415	18,6	250 mg	415	18,7
150 mg	413	18,5	200 mg	417	18,6	250 mg	418	18,5
<i>X</i>	415,1	18,53	<i>X</i>	415,2	18,53	<i>X</i>	415,3	18,53
<i>σ</i>	2,83	0,13	<i>σ</i>	2,91	0,12	<i>σ</i>	2,775	0,13

Elaborado por: Infostat y Los Autores, 2019.

Nota: se tomó una muestra de 60 cápsulas de cada granulado.

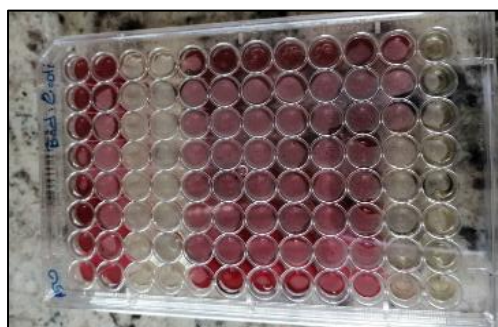
Anexo No.11.

Lectura de absorbancias de la MIC obtenidas mediante el equipo Microplate Reader para el granulado de 150 mg de extracto fluido de *Vaccinium floribundum Kunth* contra *Escherichia coli* ATCC 25922TM.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,500	0,525	0,001	0,000	0,403	0,531	0,450	0,428	0,522	0,163	0,190	0,001
B	0,524	0,585	0,001	0,000	0,545	0,653	0,644	0,685	0,698	0,124	0,138	0,001
C	0,447	0,479	0,002	0,000	0,486	0,504	0,511	0,473	0,613	0,169	0,122	0,002
D	0,428	0,498	0,001	0,000	0,415	0,619	0,543	0,539	0,532	0,137	0,054	0,001
E	0,462	0,523	0,001	0,000	0,427	0,541	0,511	0,561	0,430	0,101	0,047	0,001
F	0,558	0,617	0,001	0,000	0,409	0,664	0,543	0,456	0,498	0,194	0,045	0,001
G	0,436	0,398	0,002	0,000	0,381	0,512	0,490	0,500	0,561	0,128	0,056	0,001
H	0,483	0,425	0,001	0,000	0,487	0,371	0,387	0,548	0,441	0,147	0,051	0,002

Nota: Columna 1: Control negativo; Columna 2: Control negativo DMSO; Columna 3: Blanco; Columna 4: Control positivo; Columna 5: 30 μ L de dilución granulado de 150 mg; Columna 6: 40 μ L de dilución granulado de 150 mg; Columna 7: 50 μ L de dilución granulado de 150 mg; Columna 8: 60 μ L de dilución granulado de 150 mg; Columna 9: 70 μ L de dilución granulado de 150 mg; Columna 10: 80 μ L de dilución granulado de 150 mg; Columna 11: 90 μ L de dilución granulado de 150 mg; Columna 12: 100 μ L de dilución granulado de 150 mg.

Elaborado por: Los Autores, 2019.



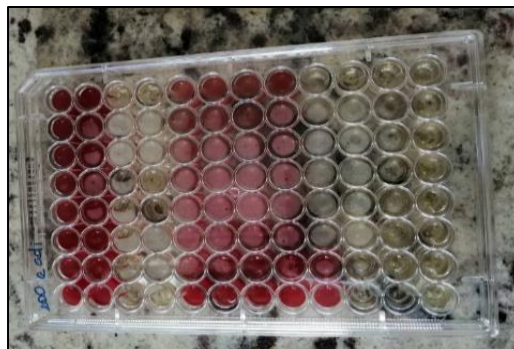
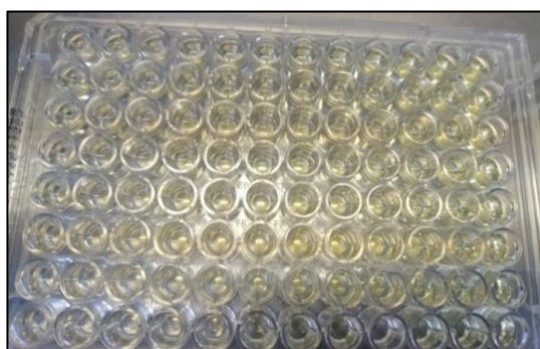
Anexo No.12.

Lectura de absorbancias de la MIC obtenidas mediante el equipo Microplate Reader para el granulado de 200 mg de extracto fluido de *Vaccinium floribundum Kunth* contra *Escherichia coli* ATCC 25922TM.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,274	0,301	0,001	0,000	0,341	0,337	0,311	0,293	0,159	0,001	0,002	0,001
B	0,327	0,396	0,001	0,000	0,347	0,363	0,354	0,306	0,129	0,001	0,001	0,001
C	0,322	0,405	0,001	0,000	0,331	0,375	0,366	0,295	0,132	0,001	0,002	0,001
D	0,338	0,422	0,002	0,000	0,353	0,360	0,379	0,308	0,157	0,002	0,001	0,001
E	0,328	0,333	0,001	0,000	0,341	0,385	0,398	0,312	0,104	0,001	0,001	0,002
F	0,294	0,382	0,001	0,000	0,315	0,379	0,362	0,274	0,132	0,002	0,001	0,002
G	0,287	0,262	0,001	0,000	0,359	0,333	0,314	0,412	0,269	0,061	0,001	0,001
H	0,314	0,313	0,001	0,000	0,327	0,285	0,330	0,345	0,231	0,054	0,002	0,001

Nota: Columna 1: Control negativo; Columna 2: Control negativo DMSO; Columna 3: Blanco; Columna 4: Control positivo; Columna 5: 30 μ L de dilución granulado de 200 mg; Columna 6: 40 μ L de dilución granulado de 200 mg; Columna 7: 50 μ L de dilución granulado de 200 mg; Columna 8: 60 μ L de dilución granulado de 200 mg; Columna 9: 70 μ L de dilución granulado de 200 mg; Columna 10: 80 μ L de dilución granulado de 200 mg; Columna 11: 90 μ L de dilución granulado de 200 mg; Columna 12: 100 μ L de dilución granulado de 200 mg.

Elaborado por: Los Autores, 2019.



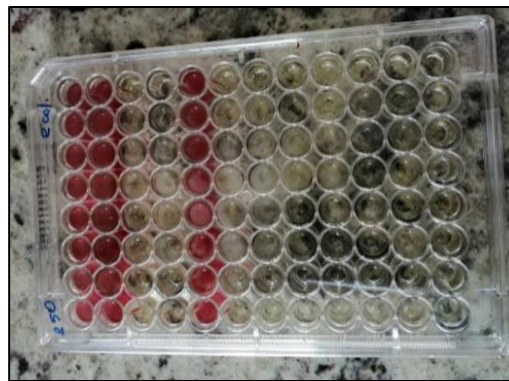
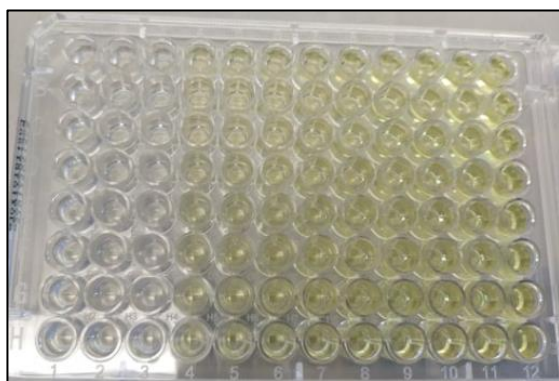
Anexo No.13.

Lectura de absorbancias de la MIC obtenidas mediante el equipo Microplate Reader para el granulado de 250 mg de extracto fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth contra *Escherichia coli* ATCC 25922TM.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,195	0,219	0,001	0,000	0,247	0,055	0,054	0,003	0,001	0,002	0,001	0,001
B	0,285	0,280	0,001	0,000	0,303	0,067	0,049	0,001	0,001	0,001	0,003	0,002
C	0,307	0,386	0,001	0,000	0,457	0,026	0,036	0,003	0,002	0,001	0,003	0,002
D	0,325	0,359	0,001	0,000	0,403	0,039	0,061	0,002	0,002	0,001	0,001	0,002
E	0,332	0,331	0,001	0,000	0,422	0,056	0,044	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001
F	0,308	0,333	0,001	0,000	0,437	0,067	0,024	0,001	0,003	0,003	0,003	0,001
G	0,316	0,325	0,002	0,000	0,369	0,040	0,045	0,003	0,002	0,002	0,003	0,001
H	0,269	0,290	0,002	0,000	0,288	0,049	0,088	0,002	0,003	0,002	0,001	0,001

Nota: Columna 1: Control negativo; Columna 2: Control negativo DMSO; Columna 3: Blanco; Columna 4: Control positivo; Columna 5: 30 μ L de dilución granulado de 250 mg; Columna 6: 40 μ L de dilución granulado de 250 mg; Columna 7: 50 μ L de dilución granulado de 250 mg; Columna 8: 60 μ L de dilución granulado de 250 mg; Columna 9: 70 μ L de dilución granulado de 250 mg; Columna 10: 80 μ L de dilución granulado de 250 mg; Columna 11: 90 μ L de dilución granulado de 250 mg; Columna 12: 100 μ L de dilución granulado de 250 mg.

Elaborado por: Los Autores, 2019.



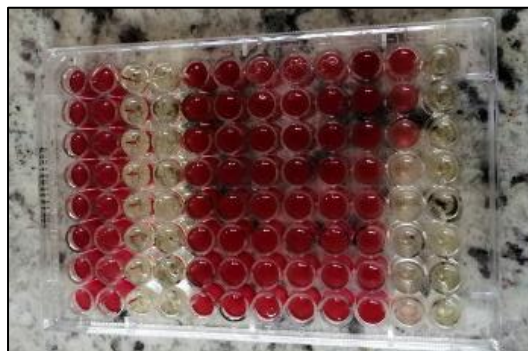
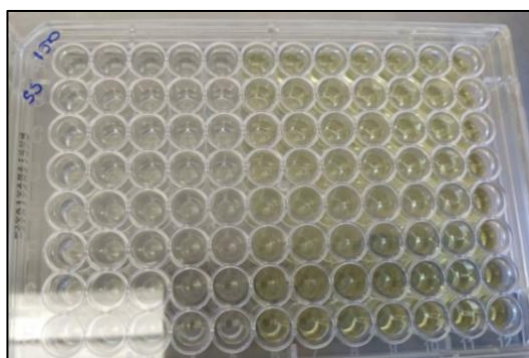
Anexo No.14.

Lectura de absorbancias de la MIC obtenidas mediante el equipo Microplate Reader para el granulado de 150 mg de extracto fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth contra *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,390	0,426	0,002	0,000	0,310	0,323	0,328	0,329	0,345	0,308	0,189	0,003
B	0,385	0,374	0,001	0,000	0,321	0,342	0,303	0,264	0,329	0,323	0,105	0,003
C	0,394	0,405	0,001	0,000	0,287	0,347	0,306	0,338	0,348	0,294	0,111	0,001
D	0,374	0,458	0,001	0,000	0,334	0,350	0,327	0,332	0,325	0,321	0,141	0,002
E	0,386	0,444	0,001	0,000	0,331	0,342	0,306	0,285	0,298	0,322	0,157	0,002
F	0,380	0,426	0,001	0,000	0,347	0,294	0,268	0,263	0,317	0,320	0,176	0,001
G	0,374	0,345	0,001	0,000	0,338	0,270	0,326	0,313	0,335	0,339	0,165	0,001
H	0,376	0,403	0,001	0,000	0,355	0,348	0,328	0,307	0,380	0,370	0,107	0,001

Nota: Columna 1: Control negativo; Columna 2: Control negativo DMSO; Columna 3: Blanco; Columna 4: Control positivo; Columna 5: 30 μ L de dilución granulado de 150 mg; Columna 6: 40 μ L de dilución granulado de 150 mg; Columna 7: 50 μ L de dilución granulado de 150 mg; Columna 8: 60 μ L de dilución granulado de 150 mg; Columna 9: 70 μ L de dilución granulado de 150 mg; Columna 10: 80 μ L de dilución granulado de 150 mg; Columna 11: 90 μ L de dilución granulado de 150 mg; Columna 12: 100 μ L de dilución granulado de 150 mg.

Elaborado por: Los Autores, 2019.



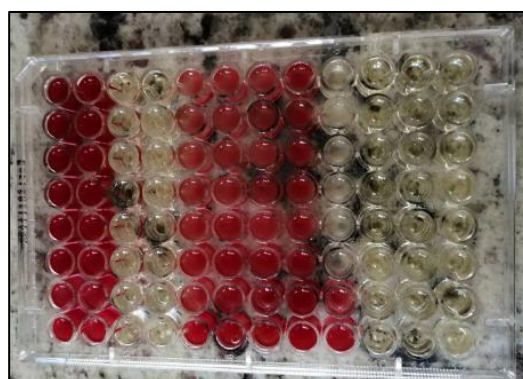
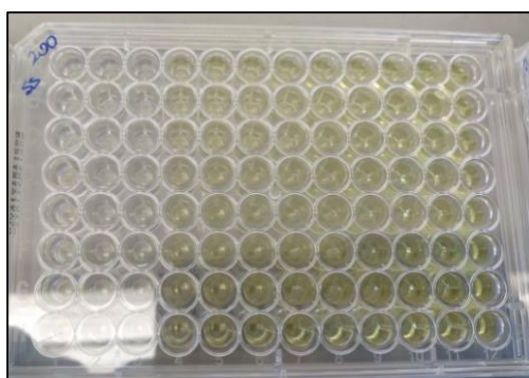
Anexo No.15.

Lectura de absorbancias de la MIC obtenidas mediante el equipo Microplate Reader para el granulado de 200 mg de extracto fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth contra *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,340	0,380	0,001	0,000	0,282	0,283	0,321	0,297	0,149	0,051	0,021	0,001
B	0,384	0,468	0,002	0,000	0,301	0,327	0,332	0,334	0,181	0,052	0,028	0,001
C	0,368	0,403	0,002	0,000	0,317	0,313	0,333	0,323	0,137	0,058	0,023	0,001
D	0,395	0,451	0,001	0,000	0,336	0,333	0,332	0,320	0,134	0,055	0,022	0,001
E	0,347	0,387	0,001	0,000	0,311	0,291	0,336	0,330	0,137	0,057	0,016	0,001
F	0,390	0,430	0,001	0,000	0,340	0,329	0,324	0,341	0,136	0,057	0,023	0,001
G	0,399	0,395	0,002	0,000	0,321	0,315	0,287	0,327	0,116	0,048	0,023	0,001
H	0,375	0,335	0,001	0,000	0,314	0,288	0,262	0,360	0,122	0,053	0,109	0,001

Nota: Columna 1: Control negativo; Columna 2: Control negativo DMSO; Columna 3: Blanco; Columna 4: Control positivo; Columna 5: 30 μ L de dilución granulado de 200 mg; Columna 6: 40 μ L de dilución granulado de 200 mg; Columna 7: 50 μ L de dilución granulado de 200 mg; Columna 8: 60 μ L de dilución granulado de 200 mg; Columna 9: 70 μ L de dilución granulado de 200 mg; Columna 10: 80 μ L de dilución granulado de 200 mg; Columna 11: 90 μ L de dilución granulado de 200 mg; Columna 12: 100 μ L de dilución granulado de 200 mg.

Elaborado por: Los Autores, 2019.



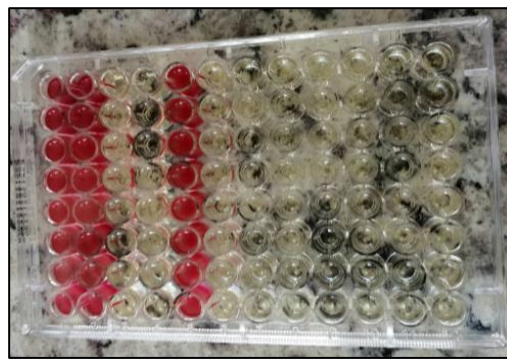
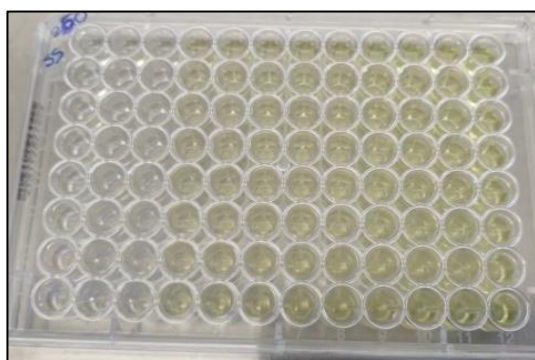
Anexo No.16.

Lectura de absorbancias de la MIC obtenidas mediante el equipo Microplate Reader para el granulado de 250 mg de extracto fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth contra *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,263	0,299	0,001	0,000	0,321	0,039	0,051	0,022	0,003	0,002	0,002	0,001
B	0,316	0,339	0,001	0,000	0,348	0,047	0,056	0,018	0,003	0,003	0,003	0,002
C	0,303	0,362	0,001	0,000	0,331	0,032	0,047	0,025	0,002	0,001	0,002	0,001
D	0,352	0,372	0,002	0,000	0,294	0,056	0,037	0,024	0,002	0,001	0,003	0,001
E	0,322	0,345	0,001	0,000	0,360	0,091	0,054	0,023	0,003	0,002	0,001	0,001
F	0,327	0,340	0,002	0,000	0,291	0,042	0,048	0,024	0,001	0,001	0,002	0,002
G	0,333	0,343	0,001	0,000	0,318	0,049	0,051	0,032	0,002	0,001	0,002	0,001
H	0,345	0,356	0,002	0,000	0,355	0,044	0,052	0,030	0,001	0,003	0,002	0,002

Nota: Columna 1: Control negativo; Columna 2: Control negativo DMSO; Columna 3: Blanco; Columna 4: Control positivo; Columna 5: 30 μ L de dilución granulado de 250 mg; Columna 6: 40 μ L de dilución granulado de 250 mg; Columna 7: 50 μ L de dilución granulado de 250 mg; Columna 8: 60 μ L de dilución granulado de 250 mg; Columna 9: 70 μ L de dilución granulado de 250 mg; Columna 10: 80 μ L de dilución granulado de 250 mg; Columna 11: 90 μ L de dilución granulado de 250 mg; Columna 12: 100 μ L de dilución granulado de 250 mg.

Elaborado por: Los Autores, 2019.



Anexo No.17.

Promedio de las 8 repeticiones de cada microdilución

Granulado: 150 mg												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	C.	C - DMSO	Blanco	C +	0,0764 mg/g	0,1019 mg/g	0,1274 mg/g	0,1529 mg/g	0,1784 mg/g	0,2039 mg/g	0,2293 mg/g	0,2548 mg/g
A1	0,480	0,506	0,001	0,000	0,469	0,549	0,510	0,524	0,537	0,595	0,165	0,052
B1	0,290	0,323	0,001	0,000	0,328	0,327	0,312	0,304	0,335	0,276	0,144	0,054
Granulado: 200 mg												
	C -	C - DMSO	Blanco	C +	0,1141 mg/g	0,1522 mg/g	0,1902 mg/g	0,2282 mg/g	0,2663 mg/g	0,3043 mg/g	0,3424 mg/g	0,3804 mg/g
A2	0,52	0,56	0,00	0,00	0,55	0,60	0,58	0,45	0,05	0,00	0,00	0,00
B2	0,37	0,41	0,00	0,00	0,33	0,33	0,41	0,24	0,03	0,00	0,00	0,00
Granulado: 250 mg												
	C -	C - DMSO	Blanco	C +	0,1507 mg/g	0,2010 mg/g	0,2512 mg/g	0,3014 mg/g	0,3517 mg/g	0,4019 mg/g	0,4522 mg/g	0,5024 mg/g
A3	0,40	0,38	0,00	0,00	0,42	0,38	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
B3	0,38	0,41	0,00	0,00	0,38	0,36	0,05	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00

Nota: A1, A2, A3 hacen referencia a *Escherichia coli* ATCC 25922TM y B1, B2, B3 hacen referencia a *Staphylococcus saprophyticus* ATCC 1535D-5TM

Elaborado por: Los Autores, 2019.

Anexo No.18.

Control de calidad de extracto fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth

Control organoléptico

Parámetro	Resultado
Color	rosa A700 código #C51162,
Olor	mortiño con alcohol
Sabor	-----
pH	3,8
Impurezas visuales	Ninguna
Aspecto	Líquido

Sólidos totales

Muestra	Peso crisol (mg)	Muestra extracto fluido (L)	Peso crisol + muestra (mg)	Peso (mg) crisol después del desecado	Sólidos Totales (mg/L)	Sólidos Totales (g/L)
EF A	26,57	0,005	26,99	26,59	4440	4,44
EF B	16,37	0,005	16,81	16,39	4420	4,42
EF C	22,95	0,005	23,38	22,97	4460	4,46
Promedio					4440 ± 20	4,44 ± 0,02

Nota: EF A, EF B y EF C, corresponden al nombre de las muestras de extracto fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth

Elaborado por: Los Autores, 2019.

Anexo No.19. Control de calidad de granulados de 150 mg, 200 mg y 250 mg de extracto fluido de *Vaccinium floribundum* Kunth

150 mg		200 mg		250 mg	
Parámetro	Resultado	Parámetro	Resultado	Parámetro	Resultado
Color	rosa 50 código #FCE4EC	Color	rosa 100 código #F8BBD0	Color	A100 código #FF80AB
Olor	Mortiño	Olor	Mortiño	Olor	Mortiño
Sabor	Ninguno	Sabor	Ninguno	Sabor	Ninguno
Impurezas visuales	Ninguna	Impurezas visuales	Ninguna	Impurezas visuales	Ninguna
Aspecto	Solido	Aspecto	Solido	Aspecto	Solido
Concistencia	Polvo fino y uniforme	Concistencia	Polvo fino y uniforme	Concistencia	Polvo fino y uniforme

Muestra	Peso crisol (mg)	Muestra de granulado (g)	Peso crisol + muestra (mg)	Peso (mg) crisol después del desecado	Porcentaje de Humedad (%)
150 A	21,1893	3004,9	24,19	23,90	10,723
150 B	23,5787	3009	26,59	26,30	10,678
150 C	26,0646	3004,4	29,07	28,78	10,651
200 A	21,438	3007,7	24,45	24,14	11,269
200 B	22,8406	3003,6	25,84	25,55	11,039
200 C	21,6861	3000,5	24,69	24,39	11,035
250 A	22,6375	3005	25,64	25,33	11,412
250 B	23,1948	3002,7	26,20	25,88	11,666
250 C	23,9933	3006,6	27,00	26,69	11,616
Promedio					11,1 ± 0,39

Nota: Cada muestra de granulado (150, 200 y 250 mg) tiene 3 repeticiones A, B, C
Elaborado por: Los Autores, 2019.