



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

INFORME DE INVESTIGACIÓN SOBRE:

“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Croton lechleri* Y *Maytenus laevis* EN CEPAS DE *Candida albicans* ATCC 10231”

Requisito previo para optar por el Título de Licenciado en Laboratorio Clínico.

Autor: Borja Herrera, Edgar Humberto

Tutor: Lic. MSc. Vilcacundo Córdova, Mario Fernando

Ambato – Ecuador

Septiembre 2019

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de Tutor del Proyecto de Investigación sobre el tema: “ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Croton lechleri* Y *Maytenus laevis* EN CEPAS DE *Candida albicans* ATCC 10231” de Edgar Humberto Borja Herrera, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico, considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometida a la evaluación del jurado examinador designado por el Honorable Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud.

Ambato, Julio 2019

EL TUTOR

.....

Lic. MSc. Vilcacundo Córdova, Mario Fernando

AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO

Los criterios emitidos en el Informe de Investigación “ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Croton lechleri* Y *Maytenus laevis* EN CEPAS DE *Candida albicans* ATCC 10231” como también los contenidos, ideas, análisis y conclusiones son de mi exclusiva responsabilidad, como autor de este trabajo de grado.

Ambato, Julio 2019

EL AUTOR

.....

Borja Herrera Edgar Humberto

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de esta tesis o parte de ella un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación.

Cedo los derechos en línea patrimonial de mi tesis con fines de difusión pública: además apruebo la reproducción de esta tesis, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no su ponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

Ambato, Julio del 2019

EL AUTOR

.....

Borja Herrera Edgar Humberto

APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el Informe de Investigación sobre el tema “ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Croton lechleri* Y *Maytenus laevis* EN CEPAS DE *Candida albicans* ATCC 10231” de Borja Herrera Edgar Humberto estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico.

Ambato, Septiembre 2019

Para constancia firman

.....

.....

.....

PRESIDENTE/A

1^{er} VOCAL

2^{DO} VOCAL

DEDICATORIA

El presente proyecto investigativo dedico a mis padres Edgar por ser mi inspiración de lucha ya que me enseñó que con esfuerzo y dedicación se puede conseguir todo lo que nos proponemos a pesar de las adversidades que se nos presenten en la vida, gracias infinitas padre y maestro de vida ya que desde niño me formaste con reglas y algunas libertades, pero al final de cuentas me fomentaste un valor muy importante que es el amor al trabajo y Sonia por ser mi pilar fundamental ya que con tu confianza, amor y consagración me supo guiar por el camino correcto, apoyándome día a día en mis triunfos y fracasos; infinitas gracias amados padres por su sacrificio y esfuerzo; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. Dedico también este proyecto a mi abuelito Humberto quien me enseñó muchos valores y que con sus consejos siempre me supo guiar y me dejó un legado, que nunca me debo rendir ante los obstáculos que en la vida se presenta y siempre cumplir los sueños y metas; sé que desde el cielo me mandas tus bendiciones y me proteges.

Dedico a mis hermanas, aunque la mayoría de las veces parece que estuviéramos en una batalla hay momentos en los que la guerra cesa y nos unimos para lograr nuestros objetivos, mis compañeras de aventuras, tristezas, alegrías, fracasos y triunfos ustedes han sido mi inspiración y mi motivación para salir adelante y darles el mejor ejemplo para que cumplan también sus metas.

No puedo dejar de mencionar a todos mis familiares que a pesar de que se encuentran un poco lejos nunca faltó una palabra de aliento por parte de ellos y por último a mi compañera de vida Ale por ser la persona que ha estado conmigo incluso en los momentos más turbulentos, este proyecto no fue fácil, pero estuviste motivándome y ayudándome hasta donde tus alcances lo permitieron.

Gared

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, agradezco a Dios por darme salud y vida. Extiendo un sincero agradecimiento a Martin Pérez por abrirme las puertas de su Hostería para la toma de muestra de las plantas y que con su apoyo hizo posible la realización de esta investigación.

Mi más grande agradecimiento a la Universidad Técnica de Ambato, facultad ciencias de la salud, carrera de Laboratorio clínico por brindarme la oportunidad de estudiar y ser un profesional, a los excelentes docentes quienes supieron impartirme sus conocimientos y de manera muy especial al grupo de investigación Desarrollo e Innovación Biomédica de la Universidad Técnica de Ambato, a la Lic. MSc. Elizabeth Proaño por permitirme ser parte de este grandioso proyecto, al Dr. Marco Gudiño que con sus conocimientos y experiencia supo dirigirme de una manera eficaz en cada una de las técnicas aplicadas en el laboratorio. Y de igual manera un eterno agradecimiento a mi tutor Lic. MSc. Mario Vilcacundo quien con su guía y sobretodo paciencia logro direccionarme correctamente para la culminación de mi proyecto.

Son varias las personas que forman parte de mi vida profesional, a mi padre que desde que nací busco maneras de ofrecerme lo mejor, ha trabajado duro y sin importar si llegaba cansado de su trabajo siempre ofrecía lo mejor a su familia, su carácter fuerte hizo de mí a temprana edad un hombre seguro, responsable y con objetivos firmes, a mi madre quien ha inculcado en mí valores que me servirán para toda la vida y se ha esforzado día a día para mi superación, los amo y no habrá manera de devolverles todo lo que me han ofrecido.

Marina y Humberto más que mis abuelos fueron las personas después de mis padres que más se preocupaban por mí, sus canas son sinónimos de sabiduría me enseñaron muchas cosas vitales para la vida y tengo la dicha de tener un angelito que me cuida desde el cielo.

Finalmente quiero agradecer a mi enamorada Ale por ser la persona que me motiva e incentiva a nunca renunciar a mis sueños y metas, hemos compartido tantas cosas que

ahora esto es un peldaño más en el cual estás caminando conmigo en este día tan importante para mí, solo quiero darte las gracias por brindarme tu amor que entre risas y enojos hemos culminado esta investigación, te amo.

No fue fácil pero imposible jamás, para todos ustedes muchas gracias y que Dios les bendiga.

Gared

ÍNDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE GRADO.....	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL JURADO EXAMINADOR	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	ix
ÍNDICE DE CUADRO.....	xi
RESUMEN.....	xiii
SUMMARY	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 Antecedentes Investigativos	3
1.2 Objetivos:.....	7
CAPÍTULO II.....	10
METODOLOGÍA	10
2.1 Materiales, equipos, reactivos y casas comerciales de reactivos	10
2.1.4 Casa comercial de reactivos	11
2.2 Método.....	11
2.2.2 Población.....	12
2.2.3 Criterios de inclusión	13

2.2.5 Descripción de la intervención y procedimientos para la recolección de información	13
2.2.5.2 Plan de Procesamiento de la información.	14
CAPÍTULO III	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
3.1 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	21
3.2 Hipótesis	34
CAPÍTULO IV	35
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	35
4.2 Recomendaciones:	36
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	37
Bibliografía:	37
Linkografía:	37
Base de Datos Uta.....	38
ANEXOS	40

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Formación de halos de inhibición en el crecimiento de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 frente a extracto de <i>Croton lechleri</i> en diluciones 1:10000, 1:1000, 1:100	21
Gráfico 2. Formación de halos de inhibición en el crecimiento de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 frente a extracto etanólico de <i>Maytenus laevis</i> en diluciones 1:10000, 1:1000, 1:100.....	22

Gráfico 3 Ensayo de difusión en pocillo para cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 frente a extracto de <i>Croton lechleri</i> al término de 24 horas.....	23
Gráfico 4 Ensayo de difusión en pocillo para cepa de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231 frente a extractos de <i>Maytenus laevis</i> al término de 24 horas.....	24
Gráfico 5. Determinación del crecimiento de <i>Candida albicans</i> 10231 por Densidad Óptica (OD) frente a 100 uL de extracto de <i>Croton lechleri</i> . Primera réplica.....	25
Gráfico 6. Determinación del crecimiento de <i>Candida albicans</i> 10231 por Densidad Óptica (OD) frente a 100 uL de extracto de <i>Croton lechleri</i> . Segunda réplica.....	26
Gráfico 7 Determinación del crecimiento de <i>Candida albicans</i> 10231 por Densidad Óptica (OD) frente a 100 uL de extracto de <i>Croton lechleri</i> . Tercera réplica	27
Gráfico 8 Determinación del crecimiento de <i>Candida albicans</i> 10231 por Densidad Óptica (OD) frente a 200 uL de extracto de <i>Croton lechleri</i> . Primera réplica.....	28
Gráfico 9 Determinación del crecimiento de <i>Candida albicans</i> 10231 por Densidad Óptica (OD) frente a 200 uL de extracto de <i>Croton lechleri</i> . Segunda réplica.....	29
Gráfico 10 Determinación del crecimiento de <i>Candida albicans</i> 10231 por Densidad Óptica (OD) frente a 200 uL de extracto de <i>Croton lechleri</i> . Tercera réplica	30

ÍNDICE DE CUADRO

Cuadro 1. NOMBRE COMÚN, CIENTÍFICO Y CARACTERÍSTICAS DE CADA ESPECIE VEGETAL	15
--	----

ÍNDICE ANEXOS

Anexo 1 Resolución del Proyecto de Investigación “Actividad Antimicrobiana y Estudio de Toxicidad In Vitro de Extractos de Plantas Medicinales”	40
Anexo 2 Resolución y Aprobación del Tema de Investigación, Resolución CD-P-2019-1697.....	41
Anexo 3 Permiso del Ministerio del Ambiente Del Ecuador.....	42
Anexo 4 Permiso del Ministerio del Ambiente del Ecuador Provincia de Pastaza .	44

Anexo 5 Certificado por Parte de Responsable del Laboratorio de Investigación FCS-UTA.	47
Anexo 6 Certificado por Responsable de Laboratorio de Microbiología FCS-UTA.	48
Anexo 7 Certificado del Herbario Misael Acosta Solís de la Universidad Técnica de Ambato.....	49
Anexo 8 Consentimiento de Recolección de Material Biológico Colectivo.....	50
Anexo 9 Consentimiento de Recolección de Material Biológico Individual.	51
Anexo 10 Resultados de los Halos en Milímetros.....	54
Anexo 11 Resultados de Cultivo en Pocillos / Logaritmos.....	57
Anexo 12 Fotografías.....	58

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO

“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Croton lechleri* Y *Maytenus laevis* EN CEPAS DE *Candida albicans* ATCC 10231”.

Autor: Borja Herrera Edgar Humberto

Tutor: Lic. MSc. Vilcacundo Córdova, Mario Fernando

Fecha: Julio, 2019

RESUMEN

Candida albicans es un hongo caracterizando por ser un patógeno oportunista importante, y su incidencia y tratamiento ha causado una alta tasa de resistencia a fármacos. Por tal motivo la presente investigación tiene como objetivo evaluar los principios activos de las plantas medicinales *Croton lechleri* y *Maytenus laevis* obtenidas de la extensa flora del país y utilizada principalmente por shuar del Ecuador.

Se realizó la maceración y liofilización de *Croton lechleri* (látex de la corteza) y *Maytenus laevis* (corteza), para posteriormente preparar los extractos en base de etanol. La actividad anti fúngica se determinó mediante la técnica de difusión en agar (sabouraud) colocando en los pocillos realizados en el medio de cultivo 100uL y 200uL de los extractos en concentración 1/10. Se observó la formación de halos de inhibición en el crecimiento de la levadura frente al extracto de *Croton lechleri*, pero sin formación de halos frente a *Maytenus laevis*. Para verificar los resultados obtenidos se realizó la prueba de sensibilidad en caldo, donde se evidenció nuevamente la inhibición del crecimiento de la levadura frente al extracto de *Croton lechleri* a concentraciones de 10mg/mL y 20mg/mL, pero sin resultados positivos para *Maytenus laevis*. El análisis estadístico de datos se lo realizó utilizando el paquete informático Graph Pad Prism 6, realizando un análisis de varianza (ANOVA) y T de Student.

PALABRAS CLAVE: *CANDIDA ALBICANS*, FITOTERAPIA, CMI, *CROTON LECHLERI* Y *MAYTENUS LAEVIS*.

TECHNICAL UNIVERSITY OF AMBATO

FACULTY OF HEALTH SCIENCES

CLINICAL LABORATORY CAREER

ANTIFUNGAL ACTIVITY FROM THE PLANT EXTRACT *Croton lechleri* Y *Maytenus laevis* IN STRAINS FROM *Candida albicans* ATCC 10231”.

Author: Borja Herrera Edgar Humberto

Tutor: Lic. MSc. Vilcacundo Córdova, Mario Fernando

Date: July 2019

SUMMARY

Candida albicans is a type of fungus mainly known as having an important opportunistic behavior, and because of its increased incidence and treatment, it has become highly resistant to drugs. For this reason, the goal of this research is to evaluate the active substances from the flowering such as *Croton lechleri* and *Maytenus laevis* gotten from the country widespread rainforest and used mainly by the Shuar tribe in Ecuador.

It was performed a maceration and a lyophilization of *Croton lechleri* (latex cortex) y *Maytenus laevis* (cortex), next to prepare the ethanol-based extracts. The antifungal activity was inferred by the agar distribution technique (sabouraud) placing into the bowls in the growing environment 100uL y 200uL from the concentration extracts 1/10. It was observed the inhibition haloes appearance in the growing yeast next to the *Croton lechleri*, but no appearance of haloes next to *Maytenus laevis*. To ensure that the results are consistent, it was performed the sensibility breeding test, where it was evident again the growing inhibition of the yeast next to the *Croton lechleri extract* to concentrations of 10mg/mL y 20mg/mL, with no positive results for *Maytenus laevis*. The statistical data analysis was done using the Graph Pad Prism 6 software, performing a variance analysis (ANOVA) and T de Student.

KEYWORDS: *CANDIDA ALBICANS*, FITOTERAPIA, CMI, *CROTON LECHLERI* Y *MAYTENUS LAEVIS*

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial las infecciones fúngicas han adquirido gran relevancia a lo largo de los últimos años, siendo *Candida albicans* uno de los hongos más comunes tornándose un microorganismo comensal del hombre que coloniza las mucosas, principalmente la vagina y los extremos del tracto digestivo (oro faringe y recto). La *Candida albicans* es un hongo asexual dimórfico que presenta una pared celular compuesta, principalmente, por polisacáridos (30-50%) y diversas proteínas (20-40%) (1). En su pared celular existen estructuras fibrilares que participan en su adhesión celular al huésped. Presenta factores de virulencia de suma importancia que facilitan la colonización y la infección del hospedador. Su incidencia produce infecciones frecuentes en pacientes inmunocomprometidos donde esta levadura desarrolla un mecanismo de resistencia primaria y secundaria frente a medicamentos eficaces e inocuos. Las tasas de resistencias se elevan cada año por lo que se realizan muchas investigaciones para desarrollar medicamentos naturales a base de extractos vegetales para combatir esta problemática, y así obtener una mejor eficacia con los medicamentos de origen vegetal frente a los antibióticos actuales que provocan resistencia a anti fúngicos. (2) (3)

El estudio de plantas medicinales se ha dado desde la antigüedad por nuestros aborígenes que han visto en la tierra una droguería natural, acogiéndose al mayor reto que la humanidad pudo haber recibido de la naturaleza, por lo que hoy en día es necesario tener un conocimiento en referencia a las plantas estudiadas, poco estudiadas y por conocer. (4)

El Ecuador tiene una extensa variedad de plantas medicinales, sin embargo su explotación es mínima. El uso de plantas medicinales en nuestro país se la realiza por las personas nativas de las zonas rurales. La fitoterapia juega un papel muy importante en la actualidad ya que muchas especies de plantas tienen propiedades curativas muy importantes dependiendo del tipo de tejido, edad de la planta, su hábitat y el tipo de suelo, que nos ayuda a curar dolencias, infecciones, problemas musculares, etc. (5)

De acuerdo a la organización mundial de la salud (OMS) cerca de un 80% de habitantes acuden al uso de plantas medicinales para aliviar diferentes malestares de la salud, una de estas plantas es la Sangre de drago conocida científicamente como *Croton lechleri*, es usada con mayor frecuencia por la población por su efecto cicatrizante, actividad anti fúngica, antibacteriano, antiinflamatoria y antiviral; y la Chuchuguasi conocida científicamente como *Maytenus laevis*, nuestros indígenas amazónicos utilizan esta planta como analgésico y antiinflamatorio; dichas plantas se encuentran en la amazonia ecuatoriana. (6) (7)

Considerando que existe pocos hallazgos investigativos sobre los principios activos de *Croton lechleri* y *Maytenus laevis* se lleva acabo el estudio de esta investigación para demostrar la actividad anti fúngica ante la cepa *Candida albicans* ATCC 10231 mediante la difusión en agar y la determinación de actividad antimicrobiana en caldo que evalúan la eliminación de los microorganismos viables después de un tiempo estimado. (8)

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Investigativos

Ever Manuel Vásquez Torrejón, *et al.* En el año 2016, realizaron una investigación sobre **“EFECTO ANTIFÚNGICO IN VITRO DEL LÁTEX DE CROTON LECHLERI (SANGRE DE GRADO) FRENTE A CANDIDA ALBICANS ATCC 10231”** cuyo objetivo fue determinar el efecto anti fúngico in vitro del látex de *Croton lechleri* (sangre de drago) frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Se usó un diseño experimental in vitro. Para determinar la concentración mínima fungicida y la sensibilidad de la *Candida albicans* frente al látex de *Croton lechleri*, se evaluaron cinco concentraciones (16 repeticiones para cada una) del látex de sangre de grado (0%, 25%, 50%, 75% y 100%) mediante extracto etanólico, empleándose fluconazol como control para la prueba de sensibilidad. El recuento de colonias disminuyó al aumentar la concentración del látex cuando la concentración mínima fungicida fue 25% y se observaron diferencias significativas con el grupo control negativo (0%), donde se desarrolló 10^9 ufc/mL de *Candida albicans*. De manera similar, Huapaya y col (2003) encontraron, en un estudio in vitro, que en muestras de látex de sangre de drago procedentes de Moyobamba, Tingo María y Pucallpa (Perú) había recuentos de colonias de *Candida albicans* menores que 10 UFC/mL (negativo) en concentraciones de 50% y 100%. La *Candida albicans* presentó sensibilidad frente a todas las concentraciones estudiadas. Se determinó que el látex de *Croton lechleri* es un agente altamente fungicida para *Candida albicans*. Se sugiere la investigación de este efecto in vivo. (6)

En el año 2017 Milagros Joya, *et al.* publicaron el artículo **“ ACTIVIDAD FUNGISTÁTICA Y FUNGICIDA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE PROPÓLEOS SOBRE EL CRECIMIENTO IN VITRO DE CEPAS DEL**

GÉNERO CANDIDA” cuyo objetivo fue investigar la actividad inhibitoria en todas las especies de *Cándida* con los propóleos comerciales de cuatro regiones examinadas. Los de mayor actividad biológica fueron los procedentes de Alemania e Italia (10,2 mg/mL como promedio de la cepa tipo y estudiadas), seguidos por el extracto etanólico de propóleos de Venezuela (15,6 mg/mL como promedio de la cepa tipo y estudiadas) y finalmente el de España (18,8 mg/mL como promedio de la cepa tipo y estudiadas). Con todos los extractos de propóleos la CMI fue igual para cepas de referencia y estudiadas. Todas las especies de *Cándida* vieron inhibido su crecimiento en consideración a la concentración de extractos etanólicos de propóleos en el siguiente orden: *C. krusei* y *C. guilliermondii* (8,6 mg/mL como promedio de los 4 propóleos), *C. albicans* (12,5 mg/mL como promedio de los 4 propóleos) y *C. tropicalis* (la concentración promedio con todos los extractos etanólicos de propóleos fue de 25 mg/mL). Los extractos etanólicos de los propóleos poseen actividad anti fúngica en diferentes especies de levaduras, propiedad de importancia por ser una opción terapéutica económica y poco toxica respecto a los antimicóticos tradicionales, de particular utilidad sobre especies del complejo *Cándida albicans*, patógeno oportunista. A pesar de que la composición química general del propóleos es similar en las distintas regiones del mundo, su actividad antifúngica no parece serlo. Se concluye que los extractos etanólicos de propóleos tienen efectos fungistáticos y fungicidas sobre las especies del Complejo *C. albicans*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* y *C. tropicalis*; que *C. tropicalis* es la especie más resistente a la acción biológica del propóleos y *C. krusei* y *C. guilliermondii* las más sensibles; que los propóleos de Alemania e Italia son los más efectivos contra las especies de *Candida* aisladas de pacientes venezolanas. (9)

En la ciudad de la Habana cuba en el año 2010, María T. Illnait-Zaragoz, *et al.* Realizar su investigación sobre **“EFECTO ANTIFÚNGICO DE UN EXTRACTO DE PETIVERIA ALLIACEA L”** cuyo objetivo fue investigar el efecto anti fúngico in vitro de un extracto hidroalcohólico de esta planta (EHAPAL) en 11 cepas de levaduras. (*Candida albicans* ATCC 64548 y ATCC 64550, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. lusitaniae* ATCC 200951, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763, *Rhodotorula mucilaginosa* LMIPK

0282, *Trichosporom asahii* LMIPK 0293, *Cryptococcus neoformans var. grubii* LMIPK 0291 y LMIPK 0292). La actividad anti fúngica in vitro fue evaluada mediante procedimientos de difusión en agar y dilución en caldo. La concentración final de células en el medio (Sabouraud) con EHAPAL al 0; 0,5; 2,5; 5 y 10 % fue de 0.5×10^3 Levaduras/ml. Se definió como concentración mínima inhibitoria (CMI) la menor concentración del extracto que inhibiera al menos el 50 % del crecimiento al compararlo con el control de crecimiento de cada cepa. De las 11 cepas estudiadas, 9 fueron totalmente inhibidas en presencia del extracto al 10 % y seis con él al 7.5 %. El 100 % de las cepas alcanzó la CMI50 a concentraciones entre 5 y 7,5 % de EHAPAL. Concentraciones más bajas del extracto solo produjeron inhibición débil del crecimiento. Los resultados demuestran el efecto anti fúngico in vitro del anamú en todas las cepas de levaduras estudiadas, sugiriendo que el extracto de esta planta pudiera ser potencialmente empleado en el tratamiento de las infecciones causadas por estos agentes. (10)

Natalia Saravia-León, *et al.* De la Universidad de San Martín de Porres. Lima, Perú, en el año 2012, publicaron un artículo acerca de: **“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO DE ETANOL SCHINUS MOLLE Y EL FLUCONAZOL SOBRE CANDIDA ALBICANS”** con el objetivo determinar la actividad anti fúngica del extracto de etanol Schinus molle y fluconazol sobre *Candida albicans*. El extracto de Schinus molle mostró actividad anti fúngica con 25µg/ml, con un halo de inhibición ≥ 20 mm, y el fluconazol con 25 µg/ml con un halo de inhibición de ≥ 31 mm. ($p=0.0001$). El extracto etanólico de Schinus molle utilizando las hojas de la planta con 25 µg/ml presentó un halo de inhibición de ≥ 20 mm mostrando así actividad anti fúngica frente a cepas clínicas de *Candida albicans* ATCC 10231. obteniendo al extracto de Schinus molle actividad anti fúngica con 25µg/ml, con un halo de inhibición ≥ 20 mm, y el fluconazol con 25µg/ml con un halo de inhibición de ≥ 31 mm. Se observa que el menor halo de inhibición es 14mm con frecuencia 2, y la máxima es de 31mm con frecuencia 1, la moda es 30mm con frecuencia 9. Se observa que el menor halo de inhibición es 10mm con frecuencia de 1, y la máxima es de 20mm con frecuencia 1, la moda es 15mm con frecuencia 10. En la prueba T student podemos interpretar que hay significancia entre el extracto de etanol schinus

molle y el fluconazol teniendo diferencias significativas ($p < 0,00$), mostrando así que el fluconazol presentó mayor actividad anti fúngica, con un halo de 31mm y el Schinus molle presentó actividad anti fúngica con un halo de inhibición de 20mm pero en menor cantidad. (11)

Br. Karina Fernanda Flores Colcha, en el año 2017 realiza un estudio acerca de: **“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA “IN VITRO” DE ACEITE ESENCIAL Y EXTRACTO ALCOHÓLICO DE *Mentha piperita* “HIERBA BUENA” SOBRE *Candida albicans* CEPA ATCC 10231”**. El objetivo es comparar la actividad anti fúngica “In vitro”, de aceite esencial y extracto alcohólico de *Mentha piperita* (Hierba buena), mediante un estudio microbiológico sobre cepas de *Candida albicans* ATCC10231. Se realizó una investigación de tipo experimental, comparativa, in vitro, de aceite esencial y extracto alcohólico de *Mentha piperita* (Hierba buena) a diferentes concentraciones, aplicado sobre cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231 cultivadas en cajas Petri, realizando una siembra de aceite esencial y extracto alcohólico de *Mentha piperita* a través de la técnica de barrido con la ayuda de un hisopo, colocando las cajas Petri en incubadora por 48 horas a 37° C para la posterior lectura del halo de inhibición. En cuanto al extracto alcohólico de la *Mentha piperita* el promedio del halo de inhibición fue menor a 3 mm. La comparación de la actividad anti fúngica derivada del extracto alcohólico y el aceite esencial de la *Mentha piperita*, sobre cepas de *Candida albicans*, demostró que el efecto anti fúngico del aceite es mejor que el obtenido con el extracto alcohólico, esto en función del diámetro del halo de inhibición reportado. (12)

En la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, María Elena Huamaní Achata, *et al.* en el año 2005 realizan una investigación denominada: **“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA CONTRA *CANDIDA ALBICANS* Y *ASPERGILLUS NIGER* DE 10 PLANTAS MEDICINALES DE 3 DEPARTAMENTOS DEL PERÚ”** donde el objetivo principal fue determinar la actividad anti fúngica in vitro de doce extractos etanolicos correspondientes a diez plantas medicinales peruanas; *Annona cherimolia* Mill. (hojas),

*Annonamuricata*L.(corteza y hojas), *Bidens pilosa*L.(partes aéreas), *Hypericum laricifolium*L.(partes aéreas), *Juglans neotropica*Diels(corteza), *Piper spp.*(hojas),*Plantago major*L.(hojas),*Psidium guajava*L.(hojas),*Schinus molle*L.(corteza y hojas) y *Spartium junceum*L. (Planta entera). Las especies fueron recolectadas en el departamento de Amazonas, excepto *Schinusmolle*L. (Apurímac) y *Annona muricata*L. (Lima), donde la actividad anti fúngica se evaluó mediante los métodos de difusión en agar y dilución en placa para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Los microorganismos de prueba utilizados fueron las levaduras *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida albicans* cepa clínica, así como, el hongo filamentoso *Aspergillus niger* ATCC 16404; las cepas fueron proporcionadas por la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. De doce extractos investigados, seis presentaron actividad anti fúngica consistente con un diámetro de halos de inhibición #18mm (Prueba de Difusión en agar) frente a *Cándida albicans* ATCC 10231. Ningún extracto mostró actividad consistente frente a la cepa clínica de *Candida albicans* y *Aspergillus niger* ATCC 16404. La CMI de los extractos que presentaron actividad consistente frente a *Candida albicans* ATCC 10231, fue de 250 µg/mL para *Hypericum laricifolium*L., *Juglans neotropica* Diels,*Psidium guajava* L. y *Schinus molle* L. (un extracto de corteza y uno de hojas) y de 500µg/mL para *Piperspp.* (13)

1.2 Objetivos:

1.2.1 Objetivo general:

- Determinar la actividad anti fúngica de extractos de las plantas *Croton lechleri* y *Maytenus laevis* en *Candida albicans* ATCC 10321.

1.2.2 Objetivos específicos:

- Recolectar las plantas *Croton lechleri* y *Maytenus laevis* en la zona amazónica del Ecuador.

- Preparar los extractos de las plantas *Croton lechleri* y *Maytenus laevis*.
- Evaluar la efectividad anti fúngica de los extractos de las plantas *Croton lechleri* y *Maytenus laevis* frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

1.2.3. Cumplimiento de objetivos

El objetivo general de este proyecto de investigación fue determinar si los extractos *Croton lechleri* y *Maytenus laevis* tenían actividad anti fúngica frente a la cepa *Candida albicans* ATCC 10231. Se evidenció una mejor actividad anti fúngica por parte del extracto de *Croton lechleri* (Sangre de drago) en relación al extracto de *Maytenus laevis* (Chuchuguasi); el mismo que presentó una mínima actividad anti fúngica frente a *Candida albicans*, sin embargo, queda a disposición el estudio posterior de este extracto para determinar sus propiedades medicinales.

Al momento de recolectar las plantas medicinales en la zona amazónica del Ecuador no se presentaron inconvenientes puesto que contábamos con el respectivo permiso del ministerio del ambiente y posteriormente el permiso del dueño de la finca para recolectar y transportar al sitio de estudio. Los dos tipos de plantas las encontramos en la misma zona, cabe recalcar que para la toma de muestra de la *Maytenus laevis* tuvimos que caminar aproximadamente una hora y media hacia la selva virgen; por último, se tomó su latitud y longitud para un adecuado estudio y conservación.

La investigación tiene un pilar fundamental en la elaboración de los extractos de *Croton lechleri* y *Maytenus laevis*. Estos fueron preparados correctamente siguiendo el protocolo establecido, para el caso de Chuchuguasi (*Maytenus laevis*) se realizó una limpieza minuciosa de la corteza de la planta y posterior su maceración, filtración y liofilización para evitar la alteración de sus principios activos; para la sangre de drago (*Croton lechleri*) se realizó la congelación (-80°C) y luego la posterior liofilización, por su consistencia líquida no fue necesario realizar el proceso de macerado.

Evaluamos la actividad anti fúngica mediante dilución en caldo y difusión en agar, obteniéndose los mejores resultados con el extracto de *Croton lechleri*. y determinando una baja actividad anti fúngica con el extracto de *Maytenus laevis*.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1 Materiales, equipos, reactivos y casas comerciales de reactivos

2.1.1 Material para la investigación

- Tubos Eppendorfs
- Placa de micro titulación
- Agua destilada
- Cajas Petri
- Probetas 500 mL
- Vasos de precipitación 50-100 mL
- Balón 500 mL
- Papel whatman 1
- Matraz quita salto
- Corcho
- Botellas ambar
- Fundas y recolectores herméticos
- Papel aluminio
- Toallas desechables
- Puntas Azules y Amarillas
- Asas calibradas
- Asas de digralsky

2.1.2 Equipos

- Bomba al vacío para filtración WELCH
- Lector de placa de ELISA.
- Balanza Analítica Mettler Toledo
- Balanza técnica

- Rotavapor ELEYA
- Incubadora
- pHmetro Thermo Scientific
- Estufa
- Cabina de PCR
- Vortex
- Congelador -80°

2.1.3 Reactivos

- Etanol 95-96%
- Fluconazol
- Agar Sabouraud
- Caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón)
- DMSO 0,1%
- PBS

2.1.4 Casa comercial de reactivos

- Human
- Wiener Lab

2.2 Método

2.2.1 Nivel o tipo de investigación

2.2.1.1 Estudio experimental:

Se utilizaron procedimientos para la obtención de los extractos de las plantas medicinales y técnicas microbiológicas ejecutadas en los laboratorios para

comprobar la actividad anti fúngica del extracto, realizando un bioensayo a través de experimentos consecutivos y sus respectivas réplicas.

2.2.1.2 Asociación entre variables:

Se relaciona la variable dependiente con la independiente. La variable dependiente, inhibición de crecimiento de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 y la variable independiente la concentración de los extractos de plantas *Croton lechleri* y *Maytenus laevis*.

2.2.1.3 Estudio de laboratorio:

En el presente estudio de investigación se realizó la preparación en los laboratorios de la facultad del extracto vegetal empleando método de maceración, posteriormente liofilización para obtener una conservación de los metabolitos de las dos plantas en estudio. También se realizó la determinación de la actividad anti fúngica en medios de cultivos, diluciones y su sensibilidad de los extractos frente a *Candida albicans*.

2.2.1.4 Estudio bibliográfico:

Se realizó una revisión bibliográfica de los antecedentes escritos sobre la actividad de los extractos frente a cepas de *C. albicans*, así como también se investigó las propiedades de *Croton lechleri* y *Maytenus laevis* para sustentar la parte científica de manera eficiente.

2.2.2 Población

Se trabajó con los dos tipos de extractos: Sangre de drago (*Croton lechleri*) y *Chuchuguasi* (*Maytenus laevis*) pertenecientes a la zona tropical del Ecuador Pastaza con una latitud (1° 4' 0" S, 78° 0' 4") para evaluar la actividad anti fúngica frente a una cepa de *Candida albicans*.

2.2.3 Criterios de inclusión

- Plantas que se hayan certificado por un experto que se trataba de Sangre de drago (*Croton lechleri*) y Chuchuguasi (*Maytenus laevis*).
- Plantas que no hayan sufrido daño organoléptico luego de su llegada al laboratorio.
- Plantas medicinales Sangre de drago (*Croton lechleri*) y Chuchuguasi (*Maytenus laevis*) transportadas de manera adecuada desde el sitio de recolección hasta el laboratorio.
- Extractos que hayan tenido un procesamiento adecuado en cada uno de los pasos.

2.2.4 Criterios de exclusión

- Plantas medicinales que no cumplan los requerimientos botánicos para la recolección, transporte y almacenamiento, y que se encuentren fuera de los parámetros geográficos señalados por el Ministerio del Ambiente.
- Extractos no viables para ejecutar el bioensayo.

2.2.5 Descripción de la intervención y procedimientos para la recolección de información

2.2.5.1 Pasos de la investigación

La presente investigación se realizó en torno a protocolos establecidos en los Laboratorios de la Carrera de Ingeniería de Alimentos y los Laboratorios de la Facultad Ciencias de la Salud (FCS) de la Universidad Técnica de Ambato, campus Querochaca, en el periodo de Marzo 2019 – Agosto 2019. Durante este lapso de tiempo se realizaron diferentes técnicas y procedimientos para el cumplimiento de los objetivos planteados.

Se procedió de la siguiente manera:

- Tener el permiso solicitado por el Ministerio del Ambiente (colectivo e individual).
- Identificar e investigar las propiedades físico – químicas de los extractos de plantas que posean actividad anti fúngica conocida por comunidades ancestrales del Ecuador y que no hayan sido estudiadas a profundidad, para evaluar la efectividad de las mismas o descartar un uso inadecuado.
- Obtención del extracto vegetal por el método de maceración en etanol a 96% y se congelaron las muestras a -80°C para su conservación tomando en cuenta que *Croton lechleri* solo se la congela 48 horas para su posterior liofilización en el equipo VirTis Sp. Los extractos obtenidos correctamente con todos sus metabolitos se disuelven en DMSO al 0,1% estéril y se someten a procesos de vortex para ser homogenizados y disueltos en su totalidad para posteriormente ser usados en el bioensayo.
- Se preparó los medios de cultivo a ser utilizados en el bioensayo aptos para la cepa como son: Agar Sabouraud, Caldo Infusión cerebro corazón (BHI).
- Se verifico la fase logarítmica de *Candida albicans* ATCC 10231.
- Determinación de la actividad anti fúngica de los extractos *Croton lechleri* y *Maytenus laevis* mediante lecturas a 600nm para llegar a una absorbancia de 0,250.

2.2.5.2 Plan de Procesamiento de la información.

Se registró la información en un cuaderno de registros con sus respectivas tablas, en Microsoft Excel, posteriormente se utilizó un programa para medición de halos ImageJ y por último se tabulo los datos en el programa GraphPad Prims 6.

2.2.6 Procedimiento

2.2.6.1 Recolección del material vegetal

Se realizó en la Provincia de Pastaza, Cantón Puyo, Parroquia Tarqui (Vía a Tarqui Km 3) donde se recolecto *Maytenus laevis*, 3 días antes del inicio de la experimentación. En el área de recolección obtuvimos su localización a Latitud -

1.509928 (S1°30'35.74054") y Longitud (LONG) -78.010016 (W78°0'36.057472) su clima es cálido-húmedo y la temperatura oscila entre los 18° C y 24° C. *Croton lechleri* se recolecto en la Provincia de Pastaza, Cantón Puyo, Parroquia Indichuris 3 días antes del inicio de la experimentación. Su localización a Latitud -1.510172 y Longitud -78.010431 con una temperatura oscila entre los 18° C y 24° C

Las especies recolectadas fueron identificadas con: nombre común, nombre científico, características y parte de la planta donde se va usar el extracto. (14)

Cuadro 1. NOMBRE COMÚN, CIENTÍFICO Y CARACTERÍSTICAS DE CADA ESPECIE VEGETAL

Nombre Común	Nombre Científico	Parte a usarse	Características
Sangre de drago	<i>Croton lechleri</i>	Corteza – Látex	Color: Rojiza Textura: Liquida Olor: Sin olor
Chuchuhuasi	<i>Maytenus laevis</i>	Corteza	Color: Anaranjada Textura: Rustica Olor: Sin olor

Elaborado por: Edgar Borja

2.2.6.2 Método de desecación de material vegetal

Para la desecación del material vegetal se utilizó el procedimiento estandarizado para el grupo de investigación de la UTA, donde primero se obtuvo el material vegetal de: *Croton lechleri* y *Maytenus laevis* en la provincia de Pastaza, mismas que fueron evaluadas e identificadas por personal especializado, tomando en cuenta que no presentarán alteraciones organolépticas. Se seleccionó la corteza de las plantas a tratar, posteriormente se transportó hasta el Laboratorio de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos (FCIAL), donde se lavó con agua destilada y se colocó en la estufa para el desecado por 24 horas con una ventilación de 30% y una temperatura de 40°C para deshidratar el material vegetal. Transcurrido este periodo de tiempo se tritura todo el material vegetal para ser pesado en la balanza mod: EQ-510, después se realiza un cálculo 1:15 (Peso/Volumen), donde el material vegetal corresponde al soluto (peso – g.) y el etanol al 96% representa el disolvente (Volumen – mL.) (14) (6)

En el caso de sangre de drago (*Croton lechleri*) o extractos de plantas que no son sólidos se hará directamente la liofilización, luego la re suspensión en DMSO al 0,1%.

2.2.6.3 Maceración en Etanol 96% y Liofilización

La corteza, hojas, raíces o tallos triturados son colocados en un recipiente de color ámbar con etanol al 96% y se los deja reposar a temperatura ambiente durante 7 días sin exposición de la luz solar o artificial. Después se realiza la filtración al vacío en el Equipo WELCH, utilizando papel filtro Whatman #1, realizando dos filtrados para obtener todos los principios activos de la materia vegetal. Luego se procede a colocar la materia prima en el rota vapor ELEYA N-1100 Series, el cual se utiliza para concentrar los extractos con una presión reducida de 61 hepto Pascal (hPa) y a una temperatura de 40°C, tras la evaporación del disolvente (etanol al 96°) se mide el pH de cada extracto utilizando el pHmetro *Thermo Scientific*, se almacenan los extractos en recipientes estériles de boca ancha envueltos en papel aluminio. Para evitar la degradación de los principios activos se los conserva en congelación (-80°C). Al momento de liofilizar se coloca los extractos (-80°C) en el Liofilizador *Virtis Sp*, a una presión de 500 miliTorr (mT) y -42°C durante 24 horas, en este tiempo se produce una separación del agua por sublimación. Este proceso ayuda a preservar las características organolépticas y principios activos. (14) (6)

2.2.6.3 Reconstitución de la cepa *Candida albicans* ATCC 10231

La vivificación de levaduras se realizó bajo la metodología establecida por Pedroza *et al.* (2007) con algunos cambios. El primer día se colocó en 5 ml caldo de enriquecimiento Brain Heart Infusión (BHI) dos colonias de la cepa seleccionada con un asa estéril dejándola en la incubadora a 37°C por 24 horas. El segundo día se preparó un matraz con 250 mL de caldo de enriquecimiento Brain Heart Infusión (BHI) estéril y se añadió los 5 mL incubados el día anterior con la cepa, dejándose nuevamente por 24 horas más a 37°C. Posteriormente al tercer día se preparó un matraz con 200 mL de caldo de enriquecimiento Brain Heart Infusión (BHI) homogenizando el matraz del segundo día y

pipeteando 50 mL al matraz de 200 mL para luego este ser homogenizado y medir la absorbancia a 600 nm en espectrofotómetro. La lectura se realizó hasta que la suspensión de la levadura represente una absorbancia de 0,250 equivalente al patrón 0,5 de MacFarland, para proceder a la siembra. (14)

2.2.6.4 Diluciones de la cepa ATCC 10231

A partir de la cepa reactivada y verificando su turbidez al 0,5 de MacFarland, se prepararon diluciones 1:100, 1:1000, 1:10000. Para su posterior siembra sobre placas de agar sabouraud. (15)

2.2.6.5 Sensibilidad por difusión en agar

Del inóculo estandarizado se colocó 100 uL en agar Sabouraud en forma homogénea con asa digralsky. De las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , se colocó 100uL de cada una dentro de pocillos elaborados en la placa de agar sabouraud, utilizando también como control negativo DMSO al 0,1%. Se rotuló y se llevó a incubación por 24 horas a 37°C. Pasado el tiempo de incubación se procedió a medir en milímetros los halos establecidos de cada pocillo impregnado con extracto vegetal. (14) **(16)**

2.2.6.6 Sensibilidad con caldo en placas de micro pocillos

Se utilizaron placas de 96 pocillos para realizar esta prueba. En el primer pocillo, como control negativo se utilizó BHI + DMSO. En el segundo pocillo como control positivo se colocó BHI + inóculo estandarizado de *Cándida albicans* ATCC 10231. En un tercer pocillo se colocó solamente el inóculo estandarizado de *Candida albicans* ATCC 10231 para verificar su viabilidad. En un cuarto pocillo se colocó el inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231 + DMSO para verificar que este último no interfiera con el crecimiento; y finalmente se colocó en un quinto pocillo inóculo estandarizado de *Cándida albicans* ATCC 10231 + los extractos etanólicos preparados a partir de las dos plantas seleccionadas para el estudio. Se rotuló las

placas y se llevó a incubación por 24 horas a 37°C. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para verificar los resultados obtenidos. (7) (14) (7).

2.2.7 Aspectos éticos

El trabajo investigativo se llevó a cabo en la Universidad Técnica de Ambato (UTA), bajo el reglamento y parámetros establecidos por la Dirección de Investigación y Desarrollo (DIDE), departamento encargado de evaluar y avalar el respectivo estudio. La experimentación científica del proyecto estuvo conducida a la normativa de los artículos relacionados al desarrollo sostenible a la biodiversidad y conservación de los saberes ancestrales reportados en la Constitución de la República del Ecuador (2018), donde predominan los siguientes:

Capítulo II - Sección cuarta: Cultura y Ciencia, artículo 25.- “Las personas tienen derecho a gozar de los beneficios y aplicaciones del progreso científico y de los saberes ancestrales.”

Capítulo II - Sección cuarta: Derechos de las comunidades, pueblos y nacionalidades, artículo 57.- “Se reconoce y se garantizara a las comunas, comunidades, pueblos y nacionalidades indígenas, de conforme con la constitución y con los pactos, convenios, declaraciones y demás instrumentos internacionales de derechos humanos”. **Inciso 12.-** “Mantener, proteger y desarrollar los conocimientos colectivos; sus ciencias y tecnologías y saberes ancestrales; los recursos genéticos que contienen la biodiversidad biológica y la agro biodiversidad; sus medicinas y prácticas de su medicina tradicional, con inclusiones del derecho a recuperar, promover y proteger los lugares rituales y sagrados, así como plantas, animales, minerales y ecosistemas dentro de su territorio; y el conocimiento de los recursos y propiedades de la flora y la fauna”.

Capítulo II - Sección séptima: Derechos de la naturaleza, artículo 71. “El Estado incentivará a las personas naturales y jurídicas, y a los colectivos, para que protejan la naturaleza y promoverá el respeto a todos los elementos que forman un ecosistema”.

Título VII - Sección segunda: Salud, artículo. 363. El estado será responsable de: **Inciso cuatro:** “Garantizar las prácticas de salud ancestral y alternativa mediante el reconocimiento, respeto y promoción del uso de sus conocimientos, medicinas e instrumentos” e **Inciso siete:** “Garantizar la disponibilidad y acceso a medicamentos de calidad, seguros y eficaces, regular su comercialización y promover la producción nacional y la utilización de medicamentos genéricos que respondan a las necesidades epidemiológicas de la población. En el acceso a medicamentos, los intereses de la salud pública prevalecerán sobre los económicos y comerciales.”

Título VII- Sección octava: Ciencia, Tecnología, innovación y saberes ancestrales, artículo 385. El sistema nacional de ciencia, tecnología, innovación y saberes ancestrales, en el marco del respeto al ambiente, la naturaleza, la vida, las culturas y la soberanía, tendrán como finalidad: **Inciso uno:** “Generar adaptar y difundir conocimientos científicos y tecnológicos.” **Inciso dos:** “Recuperar, fortalecer y potenciar los saberes ancestrales.” **Inciso tres:** “Desarrollar tecnologías e innovaciones que impulsen a la producción nacional, eleven la eficiencia y productividad, mejoran la calidad de vida y contribuyan a la realización del buen vivir”.

Título VII- Sección octava: Ciencia, Tecnología, innovación y saberes ancestrales, artículo 386. “El sistema comprenderá programas, políticas, recursos, acciones, e incorporará a instituciones del Estado, universidades y escuelas politécnicas, institutos de investigación públicos y particulares, empresas públicas y privadas, organismos no gubernamentales y personas naturales o jurídicas, en tanto realizan actividades de investigación, desarrollo tecnológico, innovación y aquellas ligadas a los saberes ancestrales”.

El proyecto de investigación en general se encuentra acogido bajo los permisos correspondientes sobre manejo de flora en investigación científica otorgado por El Ministerio del Ambiente de Ecuador correspondiente a la resolución **N°024-2018-IC-FLO-DNB/MAE (Anexo 3)**, él mismo que es de conocimiento público, en especial para los integrantes del macro proyecto, así como los respectivos tutores involucrados en la investigación, por otra parte adjuntando al protocolo de permisos correspondientes para poder trabajar con las muestras se acoge al permiso **AC-FLO-**

DPAP/MAE-2019-006 (Autorización de investigación científica de flora y fauna) (Anexo 4).

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1.1 RESULTADOS

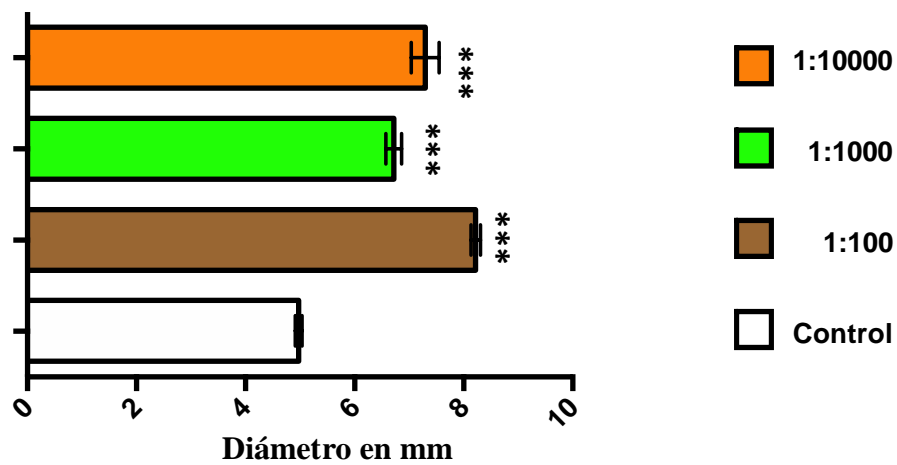


Grafico 1 Formación de halos de inhibición en el crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231 frente a extracto de *Croton lechleri* en diluciones 1:10000, 1:1000, 1:100

Autor: Edgar Borja H.

Fuente: Registro de resultados de laboratorio de investigación FCS-UTA

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Al exponer la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 a 100 uL de las diluciones 1:100, 1:1000, 1:10000 del extracto de *Croton lechleri*, se observa que tanto en la dilución más baja (1:100) como en la más alta (1:10000) se produjo la formación de halos de inhibición mayores a la del pocillo control (8 mm, 7 mm y 7,5 mm respectivamente), por lo que este extracto podría contener algún principio activo que produce la inhibición del crecimiento de la levadura.

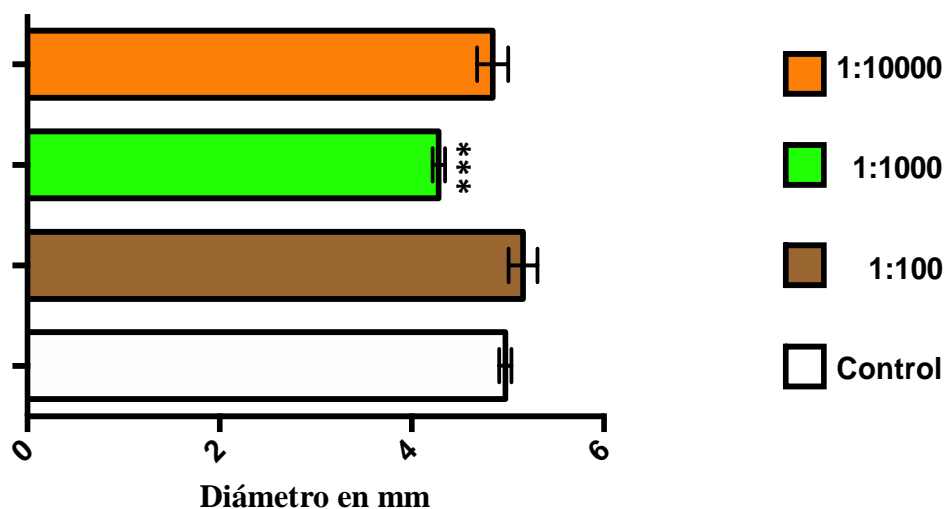


Grafico 2. Formación de halos de inhibición en el crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231 frente a extracto etanólico de *Maytenus laevis* en diluciones 1:10000, 1:1000, 1:100

Autor: Edgar Borja H.

Fuente: Registro de resultados de laboratorio de investigación FCS-UTA

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Al exponer la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 a 100 uL de las diluciones 1:100, 1:1000, 1:10000 del extracto etanólico de *Maytenus laevis*, no se observó la formación de halos de inhibición en relación al pocillo control, por lo que se deduce que este extracto no contiene ningún principio activo que pudiera inhibir el crecimiento de la levadura a las concentraciones utilizadas. Se debe señalar que el menor diámetro observado en la dilución 1:1000 en relación al pocillo control, se debe a que el pocillo realizado para esta dilución, fue de menor diámetro.

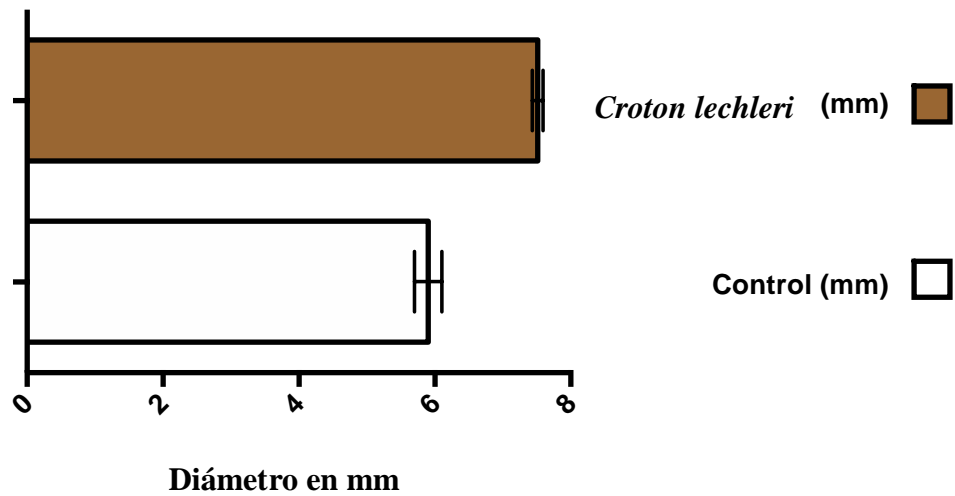


Grafico 3 Ensayo de difusión en pocillo para cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 frente a extracto de *Croton lechleri* al término de 24 horas.

Autor: Edgar Borja H.

Fuente: Registro de resultados de laboratorio de investigación FCS-UTA

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Para verificar el efecto inhibitor del crecimiento del extracto de *Croton lechleri* frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, sobre una caja de agar sabouraud previamente plaqueada con la levadura, se realizó dos pocillos: uno para el control negativo (DMSO al 0.1%), y otro para el extracto (100mg/ml) en volumen 100uL. Se observó que hubo la formación de un halo de inhibición con una diferencia de 2 mm con respecto al control negativo, lo que sugiere que el extracto tiene actividad anti fúngica. Por esta razón se procedió más adelante a realizar la prueba de inhibición de crecimiento en caldo.

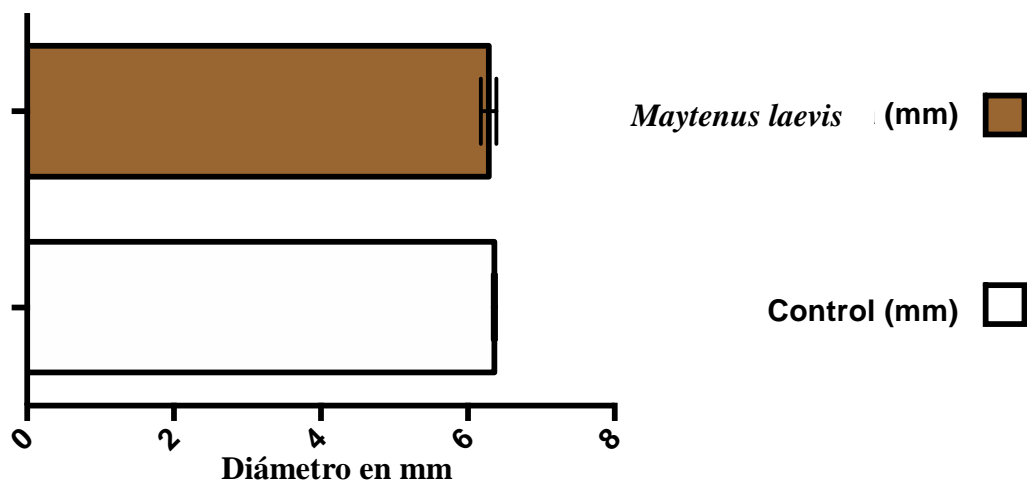


Grafico 4 Ensayo de difusión en pocillo para cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 frente a extractos de *Maytenus laevis* al término de 24 horas.

Autor: Edgar Borja H.

Fuente: Registro de resultados de laboratorio de investigación FCS-UTA

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Para verificar el efecto inhibitor del crecimiento del extracto de *Maytenus laevis* frente a la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, sobre una caja de agar sabouraud previamente plaqueada con la levadura, se realizó dos pocillos: uno para el control negativo (DMSO al 0.1%), y otro para el extracto (100mg/ml) en volumen 100uL . Se observó que no hubo la formación de un halo de inhibición con respecto al control negativo, lo que sugiere que el extracto no tiene actividad anti fúngica. Por esta razón la experimentación con este extracto no fue más allá, y no se vio conveniente realizar la prueba de inhibición del crecimiento en caldo.

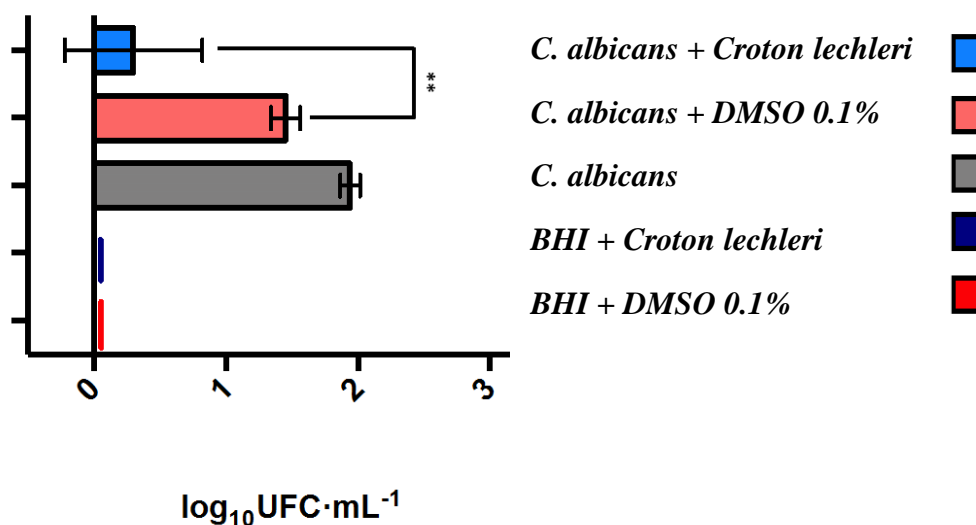


Grafico 5. Determinación del crecimiento de *Candida albicans* 10231 por Densidad Óptica (OD) frente a 100 uL de extracto de *Croton lechleri*. Primera réplica

Autor: Edgar Borja H.

Fuente: Registro de resultados de laboratorio de investigación FCS-UTA

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la primera experimentación, se pudo observar que el crecimiento de la cepa de *Candida albicans* 10231 fue inhibido ante la presencia de 100 uL del extracto de *Croton lechleri*. Los controles negativos utilizados no presentaron crecimiento ni tampoco interferencia en la turbidez, garantizando la esterilidad del BHI y el DMSO al 0.1%. Los controles positivos permitieron evidenciar la viabilidad de la levadura y que el DMSO al 0.1% no inhibe su crecimiento. Pese a que la levadura junto con el DMSO al 0.1% presenta una D.O más baja que la cepa sola, es significativa la disminución en el crecimiento, que va desde 2.0 log₁₀ UFC* mL⁻¹ a 0.4 log₁₀ UFC* mL⁻¹, lo que hace suponer que este extracto presenta componentes con actividad anti fúngica.

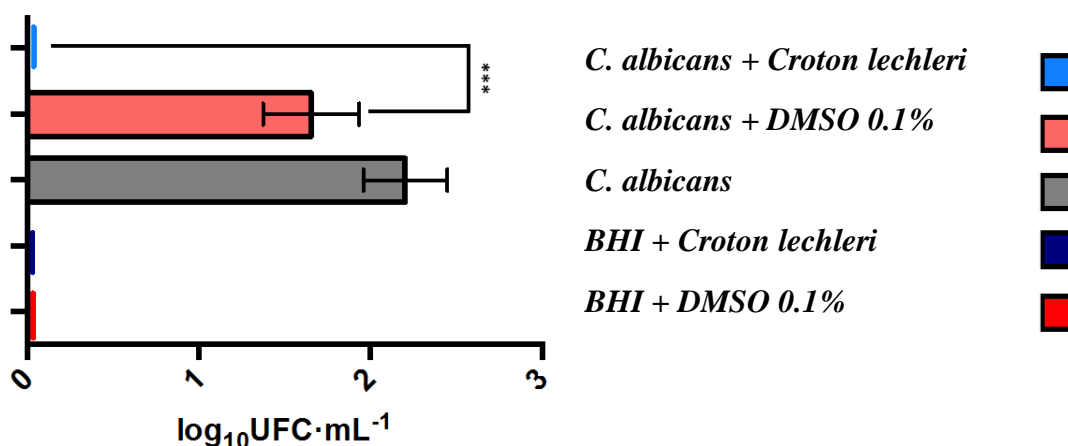


Grafico 6. Determinación del crecimiento de *Candida albicans* 10231 por Densidad Óptica (OD) frente a 100 uL de extracto de *Croton lechleri*. Segunda réplica

Autor: **Edgar Borja H.**

Fuente: Registro de resultados de laboratorio de investigación FCS-UTA

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la segunda experimentación, se pudo observar nuevamente que el crecimiento de la cepa de *Candida albicans* 10231 fue inhibido ante la presencia de 100 uL del extracto de *Croton lechleri*. Los controles negativos y positivos volvieron a comportarse de la misma manera que en la primera experimentación. El crecimiento de la levadura en presencia del extracto fue inhibido significativamente, reduciéndose el crecimiento de $2.2 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ a $0.1 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ lo que hace suponer que este extracto presenta componentes con actividad anti fúngica.

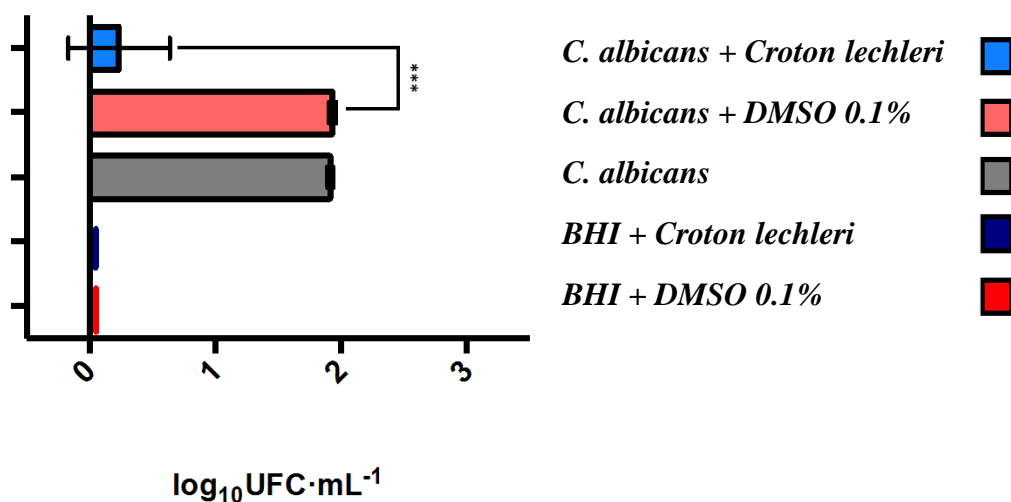


Grafico 7 Determinación del crecimiento de *Candida albicans* 10231 por Densidad Óptica (OD) frente a 100 uL de extracto de *Croton lechleri*. Tercera réplica

Autor: **Edgar Borja H.**

Fuente: Registro de resultados de laboratorio de investigación FCS-UTA

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la tercera experimentación, se confirmaron los resultados obtenidos en las dos experimentaciones anteriores. Se pudo observar nuevamente que el crecimiento de la cepa de *Candida albicans* 10231 fue inhibido ante la presencia de 100 uL del extracto de *Croton lechleri*. Los controles negativos y positivos volvieron a comportarse de la misma manera que en las experimentaciones anteriores. El crecimiento de la levadura en presencia del extracto fue inhibido significativamente, reduciéndose el crecimiento de $2.0 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$ a $0.3 \log_{10} \text{UFC} \cdot \text{mL}^{-1}$, lo que hace suponer que este extracto presenta componentes con actividad anti fúngica.

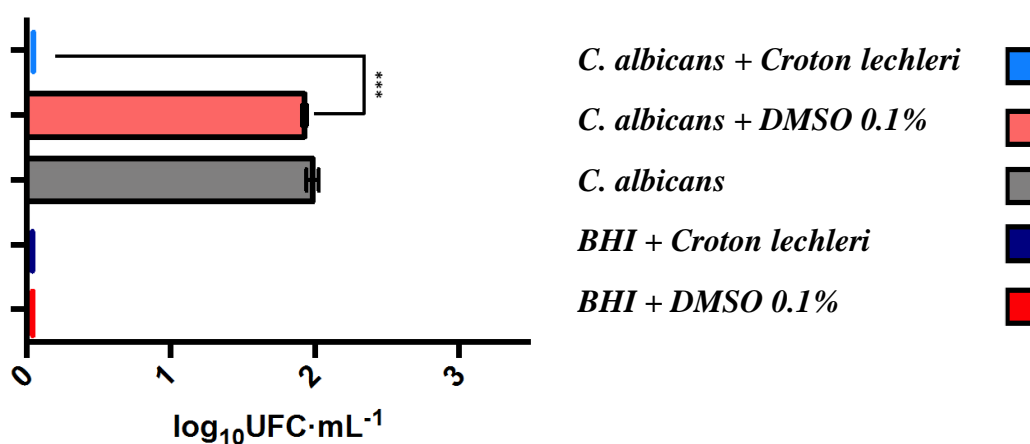


Grafico 8 Determinación del crecimiento de *Candida albicans* 10231 por Densidad Óptica (OD) frente a 200 uL de extracto de *Croton lechleri*. Primera réplica

Autor: Edgar Borja H.

Fuente: Registro de resultados de laboratorio de investigación FCS-UTA

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la primera experimentación, se pudo observar que el crecimiento de la cepa de *Candida albicans* 10231 fue inhibido ante la presencia de 200 uL del extracto de *Croton lechleri*. La inhibición presentada fue mayor que con los 100 uL utilizados en las experimentaciones anteriores. Los controles negativos utilizados no presentaron crecimiento ni tampoco interferencia en la turbidez, garantizando la esterilidad del BHI y el DMSO al 0.1%. Los controles positivos permitieron evidenciar la viabilidad de la levadura y que el DMSO al 0.1% no inhibe su crecimiento. La disminución en el crecimiento fue mucho más evidente, reduciéndose el crecimiento de la levadura desde 2.0 log₁₀ UFC* mL⁻¹ a 0.1 log₁₀ UFC* mL⁻¹, lo que hace suponer que *Croton lechleri* posee componentes que le dan actividad anti fúngica.

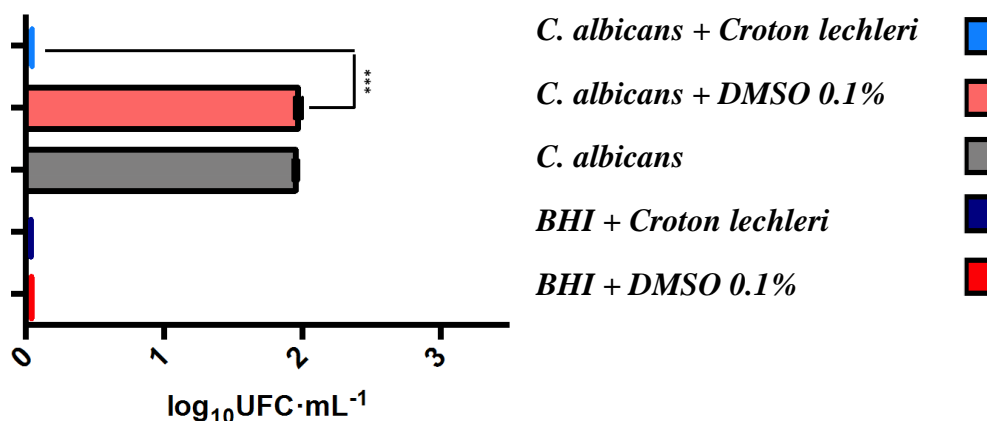


Grafico 9 Determinación del crecimiento de *Candida albicans* 10231 por Densidad Óptica (OD) frente a 200 uL de extracto de *Croton lechleri*. Segunda réplica

Autor: Edgar Borja H.

Fuente: Registro de resultados de laboratorio de investigación FCS-UTA

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la segunda experimentación, se pudo observar nuevamente que el crecimiento de la cepa de *Candida albicans* 10231 fue inhibido ante la presencia de 200 uL del extracto de *Croton lechleri*. Los controles negativos y positivos volvieron a comportarse de la misma manera que en la primera experimentación. El crecimiento de la levadura en presencia del extracto fue inhibido significativamente y en la misma proporción que en la primera experimentación, reduciéndose el crecimiento de $2.0 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{ mL}^{-1}$ a $0.1 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{ mL}^{-1}$, lo que hace suponer que este extracto presenta componentes con actividad anti fúngica.

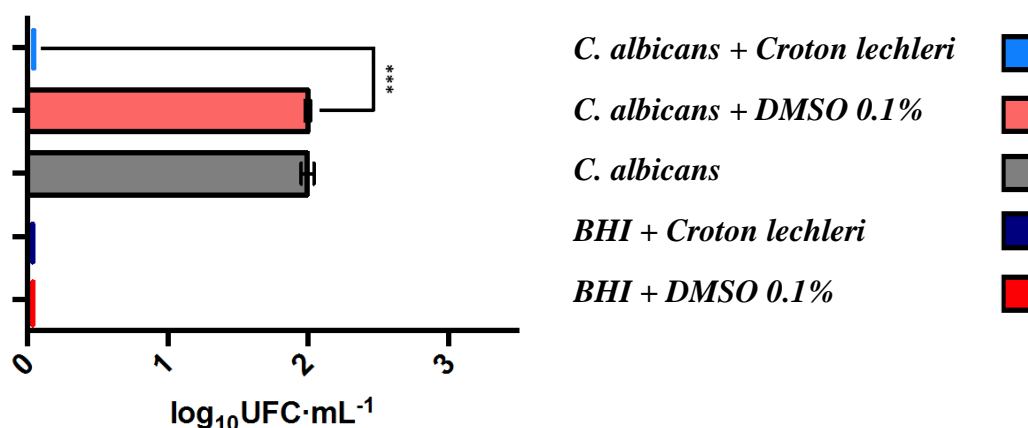


Grafico 10 Determinación del crecimiento de *Candida albicans 10231* por Densidad Óptica (OD) frente a 200 uL de extracto de *Croton lechleri*. Tercera réplica

Autor: **Edgar Borja H.**

Fuente: Registro de resultados de laboratorio de investigación FCS-UTA

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

En la tercera experimentación, se confirmaron los resultados obtenidos en las dos experimentaciones anteriores. Se pudo observar nuevamente que el crecimiento de la cepa de *Candida albicans 10231* fue inhibido ante la presencia de 200 uL del extracto de *Croton lechleri*. Los controles negativos y positivos volvieron a comportarse de la misma manera que en la primera experimentación. El crecimiento de la levadura en presencia del extracto fue inhibido significativamente y en la misma proporción que en la primera y segunda experimentación, reduciéndose el crecimiento de $2.0 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{ mL}^{-1}$ a $0.1 \log_{10} \text{ UFC} \cdot \text{ mL}^{-1}$, lo que hace suponer que este extracto presenta componentes con actividad anti fúngica.

3.1.2 Discusión

Al observar el incremento de enfermedades causadas por hongos que constituyen un factor de riesgo para la salud, las infecciones por *Candida albicans* en los últimos años han desarrollado una resistencia a los fármacos. Esta problemática crea la necesidad de realizar varios estudios en busca de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de *Candida albicans*.

En las últimas décadas el uso de plantas medicinales se asocia a la demanda de productos biotecnológicos que han despertado un gran interés en las industrias farmacéuticas, cosmetológicas y alimentarias.

La propuesta de experimentar con plantas medicinales *Croton lechleri* y *Maytenus laevis* tiene la finalidad de determinar algún tipo de actividad anti fúngica frente a *Candida albicans* ATCC 10231. En la amazonia del Ecuador el consumo de Sangre de drago (*Croton lechleri*) se ha ido incrementando debido a su alto efecto cicatrizante, Existen varias técnicas para obtener extractos de plantas como percolación, maceración en hidroalcohólicos, decocción y maceración en etanol. El método más adecuado para obtener el extracto de la planta *Maytenus laevis* es la maceración en etanol, ya que la corteza de esta planta se solubiliza completamente y conserva sus propiedades. Por este motivo, en esta investigación se obtuvo un macerado completo el cual pudo ser liofilizado y reconstituido adecuadamente para determinar su actividad anti fúngica frente a *Candida albicans*, usando como disolvente DMSO al 0,1% alcanzando una concentración de 100mg/mL del extracto. Se realizaron dos técnicas para determinar la actividad anti fúngica de los extractos frente a *Candida albicans* ATCC 10231: difusión en agar e inhibición de crecimiento en caldo. Se expuso 100 uL de la cepa de *Candida albicans* ATCC 10231 a una turbidez del 0,5 Mac Farland, a 100uL del extracto de *Croton lechleri* y *Maytenus laevis* en diluciones 1:100, 1:1000, 1:10000. Se observó que en el extracto *Croton lechleri* en las tres diluciones utilizadas, produjo formación de halos de inhibición de 7mm, 7.5mm, 8mm respectivamente, los cuales fueron mayores al pocillo control negativo (DMSO 0,1%), por lo que este extracto podría contener principios activos que inhiben el crecimiento de la cepa en estudio. Posteriormente plaqueamos la 100 uL de la levadura en agar sabouraud y colocamos 100 uL del extracto de *Croton*

lechleri (100mg/ml) dentro de pocillos realizados en la placa. Se colocó también como control negativo 100 uL de DMSO 0,1% y se observó que la diferencia entre los halos de inhibición entre el control negativo y el extracto fue de 2 mm, determinando que si existe actividad anti fúngica.

Posteriormente se corroboró con la técnica inhibición de crecimiento en caldo, un método que a diferencia del anterior este nos permitió probar una mayor concentración de los extractos frente a la cepa. Se realizó este proceso por triplicado con controles negativos y positivos. Para los controles negativos trabajamos con BHI, DMSO 0,1% y no presentaron crecimiento ni interferencias analíticas, y los controles positivos nos permitieron evidenciar que la levadura se mantenía viable y que tanto el DMSO como el BHI no inhiben el crecimiento de la misma. Los resultados obtenidos mostraron una disminución del crecimiento de la levadura en contacto con 100 uL del extracto de *Croton lechleri*, con respecto a los controles positivos, que van desde $2.0 \log_{10} \text{ UFC}^* \text{ mL}^{-1}$ a $0.4 \log_{10} \text{ UFC}^* \text{ mL}^{-1}$, lo que hace suponer que este extracto presenta componentes con actividad anti fúngica.

Se repitió la experiencia anterior, esta vez utilizando 200uL de extracto *Croton lechleri*, y los resultados mostraron una inhibición mucho más evidente respecto a los 100uL anteriormente utilizados. Se observó una disminución en el crecimiento de la levadura con respecto a los controles positivos que va desde $2.0 \log_{10} \text{ UFC}^* \text{ mL}^{-1}$ a $0.1 \log_{10} \text{ UFC}^* \text{ mL}^{-1}$, lo que se confirma la posibilidad de que el extracto de *Croton lechleri* posee principios activos con propiedades anti fúngicas.

Estos hallazgos son similares a los presentados en un estudio realizado por Vásquez Torrejon *et al.* (2016) en el que indica que las propiedades medicinales de *Croton lechleri* se encuentran principalmente en la corteza del árbol, y que los lignanos y poli fenoles (proantocianidina SP-303, 1, 3,5-trimetoxibenceno y el 2,4,6-trimetoxifenol) presentes, pueden desnaturalizar las enzimas responsables del inicio de la gemación, así como también, debido a su carácter hidrofóbico interactúan con los lípidos de la membrana citoplasmática causando la pérdida de la integridad y la pérdida de material celular, tales como los iones, ATP y ácidos nucleicos, logrando la muerte del hongo.

Los resultados expuestos en la investigación publicada por Vásquez Torrejon *et al.* (2016) muestran que el mayor efecto anti fúngico de *Croton lechleri* fue a concentraciones del 100% obteniéndose un halo de inhibición de 14,19 mm siendo el mayor halo de inhibición presentado frente a *Candida albicans* ATCC 10231, resultado cercano encontrado en la presente investigación, en donde se observaron halos de inhibición de 9mm, demostrando que posee actividad anti fúngica.

De manera similar, Huapaya y col (2003) determinaron, en un estudio in vitro, que muestras de látex de sangre de drago procedentes de Moyobamba, Tingo María y Pucallpa (Perú) presentaron actividad anti fúngica frente a cepas de *Candida albicans*, en concentraciones de 50% y 100%, siendo estos hallazgos similares a los encontrados en el presente estudio.

En el estudio realizado por Milagros Joya, *et al.* En el año 2017 realizaron la actividad fungistática y fungicida de propóleos de diferentes zonas: Alemania, Italia, Venezuela, Italia. Los resultados obtenidos sobre la cepa de *Candida albicans* fueron similares a los encontrados en la presente investigación, siendo los propóleos provenientes de Italia y Alemania los que presentaron mayor efecto fungicida y fungistático.

Al exponer la cepa *Candida albicans* ATCC 10231 a 100 uL al extracto etanólico de *Maytenus laevis* (100mg/ml) en las diluciones 1:100, 1:1000, 1:10000 por la técnica difusión en agar, no se observó la formación de halos de inhibición en relación al control negativo (6mm), lo que indicaría que este extracto no contiene ningún principio activo capaz de inhibir el crecimiento de la levadura. Para corroborar los resultados, sobre una caja de agar sabouraud previamente plaqueada con la levadura, se colocó dentro de pocillos realizados en el medio de cultivo 100 uL del extracto a una concentración de 100mg/ml, y se utilizó como control negativo en otro pocillo 100 uL de DMSO al 0,1%. Se observó que no hubo la formación de un halo de inhibición con respecto al control negativo, por este motivo corroborando los anteriores resultados se sugiere que el extracto etanólico *Maytenus laevis* no tiene actividad anti fúngica. En vista de estos resultados, no se realizó la prueba de inhibición de crecimiento en caldo. Cabe acotar que por las pocas fuentes

investigativas encontradas sobre esta planta frente a *Candida albicans* no se puede realizar un análisis comparativo, dejando abierta la posibilidad de que en estudios posteriores y mediante metodologías diferentes, se pueda corroborar los resultados obtenidos en la presente investigación.

3.2 Hipótesis

3.2.1 Hipótesis nula

Los extractos de *Croton lechleri* y *Maytenus laevis* no presentan actividad anti fúngica en *Candida albicans* ATCC 10231.

3.2.2 Hipótesis alternativa

Los extractos de *Croton lechleri* y *Maytenus laevis* presentan actividad anti fúngica en *Candida albicans* ATCC 10231.

3.2.3 Verificación de hipótesis

Para la verificación de la hipótesis se utilizó la prueba T de Student en el caso de los resultados obtenidos por el método de difusión en placa, y la prueba de Tukey (ANOVA) y en el caso de la prueba de inhibición de crecimiento el caldo.

Debido a la diferente actividad presentada por cada uno de los extractos, la verificación se la realizó de manera individual para cada extracto. Así:

- Para el extracto de *Croton lechleri* se observó la formación de halos de inhibición significativos con respecto a los controles utilizados, y de igual manera, la inhibición de crecimiento de la levadura en caldo fue evidente, obteniéndose un valor $p = 0.001$, por lo que se valida la hipótesis alterna.
- Para el extracto de *Maytenus laevis* los resultados fueron distintos. No se observó la formación de halos de inhibición en ningún de las concentraciones del extracto utilizadas, obteniéndose un valor $p > 0.05$, por lo que se rechaza la hipótesis alterna y se valida la hipótesis nula.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones:

- La actividad anti fúngica se determinó por medio de la prueba de Sensibilidad por difusión en agar y posteriormente mediante la prueba de sensibilidad en caldo, realizándose cada experimentación por triplicado. El extracto de Sangre de drago (*Croton lechleri*) frente a *Candida albicans* ATCC 10231 presentó la formación halos de inhibición 7mm, 8mm y 9mm, en concentraciones de 1:100, 1:1000 y 1:10000, utilizando volúmenes de 10 y 20 uL. De igual manera se evidenció la reducción en el crecimiento de la levadura por medio de la prueba en caldo, por lo que se considera que este extracto presenta dentro de su composición algún principio activo que le da la capacidad anti fúngica. El extracto de Chuchuguasi (*Maytenus laevis*) frente a *Candida albicans* ATCC 10231 no presento la formación de halos de inhibición interpretándose que no presenta actividad anti fúngica.
- La recolección de las plantas vegetales se la realizó en la provincia de Pastaza, parroquia Tarqui a Latitud -1.509928 (S1°30'35.74054") y Longitud -78.010016 (W78°0'36.057472), cantón Puyo; y otro sitio de recolección fue en parroquia Canelos a Latitud -1.510172 con Longitud -78.010431 comunidad Indichuris, siguiendo los protocolos de recolección establecidos en la metodología y con todas las medidas de bioseguridad, difiriéndose a las áreas de la selva virgen donde se encuentran las plantas medicinales. La Sangre de drago (*Croton lechleri*) se obtuvo de la corteza del árbol que contiene el látex, por medio de goteo realizando en la corteza un corte transversal en la corteza y recolectando en un frasco estéril boca ancha para su posterior transporte en refrigeración mediante un cooler. Para la planta de Chuchuguasi (*Maytenus laevis*) se obtuvo el extracto de la corteza de la planta, esta recolección fue un poco más extensa por el motivo del gran tamaño del árbol. Se tomó fragmentos de la corteza para su respectivo transporte en congelación mediante un cooler.

- Se preparó extractos etanolicos al 96% de la planta *Maytenus leavis*, aplicando el método de maceración de la corteza siguiendo los lineamientos del protocolo asignado por Tona et al. obteniendo de *Chuchuguasi (Maytenus laevis)* un volumen final concentrado del extracto de 24 mL con un pH 5,2. La planta de Sangre de drago (*Croton lechleri*, al ser líquida, no se realizó el procedimiento anterior utilizando etanol al 96%, solamente se realizó la congelación a -80 grados centígrados para su posterior liofilización, con un volumen final 120mL con un pH 5,3.

4.2 Recomendaciones:

- Realizar la determinación de los principios activos de *Maytenus laevis* frente a otros microorganismos.
- Continuar con la investigación de *Maytenus laevis* y *Croton lechleri* para la determinación de nuevos compuestos microbianos de interés que actúen frente a otros patógenos de importancia clínica.
- Realizar un estudio de los extractos *Croton lechleri* y *Maytenus laevis* con otros disolventes para obtener mejor resultados al momento disolverlos.
- La Universidad Técnica de Ambato siga apoyando este tipo de proyectos investigativos, ya que son de gran ayuda para la comunidad en donde las personas van a obtener por medio de la fitoterapia tratamientos de bajo costo y naturales y sobretodo trabajar con la flora Ecuatoriana de nuestro país que es muy extensa para combatir con la mayoría de microorganismos presentes en el país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Bibliografía:

1. Bonifaz, A. *Micología Médica Básica*. Quinta ed. Bernal, M., editor. México: McGraw-Hill Education; 2015. (3)
2. Murray R. *Microbiología Médica*. sexta ed. Barcelona: ELSEVIER; 2009. (2)

Linkografía:

1. Aguillar, K. repositorio.ucv. [Online].; 2016 [cited 2019. Available from: http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/536/aguiar_ck.pdf;sequence=1.
2. CARGUA, R. Repositoriuniandes. [Online].; 2018 [cited 2019. Available from: <http://dspace.uniandes.edu.ec/bitstream/123456789/8788/1/PIUAMFCH020-2018.pdf>. (1)
3. Espinosa, E. RepositorioUTA. [Online].; 2019 [cited 2019. Available from: <http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/29295/2/TESIS%20ANTI-BIOFILM%20FINAL.pdf>. (14)
4. Gallardo, G. Scielo. [Online].; 2015 [cited 2019. Available from: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-74332015000100003. (8)
5. Huamani, M. R. unmsm. [Online].; 2005 [cited 2019. Available from: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/1278/huamani_am.pdf?sequence=1. (13)
6. Joya, M. G. Scielo. [Online].; 2016 [cited 2019. Available from: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v30n3/0379-3982-tem-30-03-00003.pdf>. (9)
7. Illnait, M. B. RevistaCenic. [Online].; 2010 [cited 2019. Available from: <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/articulos/efecto-antifungico-de-un-extracto-de-petiveria-alliacea-l>. (10)
8. Proaño, M. RepositorioUTA. [Online].; 2016 [cited 2019. Available from: <http://repo.uta.edu.ec/handle/123456789/27728>. (6)
9. Reinoso, S. F. UNACH. [Online].; 2017 [cited 2019. Available from: <http://dspace.unach.edu.ec/handle/51000/4482>. (12)

- 10 .Rojas.J V. ula.ve. [Online].; 2017 [cited 2019. Available from: <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/42920>. (15)
- 11 .Salas.A. revistaepgunapuno. [Online].; 2015 [cited 2019. Available from: <http://www.revistaepgunapuno.org/index.php/investigaciones/article/view/31>.
- 12 .Saravia.N. KIRU. Revista de la Facultad de Odontología; Vol 9, No 1 (Año 2012). [Online].; 2012 [cited 2019. Available from: https://www.redib.org/recursos/Record/oai_articulo1097650-actividad-antifungica-extracto-etanol-schinus-molle-fluconazol-candida-albicans. (11)
- 13.Shiva.C. [Online].; 2007 [cited 2019. Available from: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/5606/cmsr1de1.pdf?sequence=>.
- 14.Vallego.M. RepositorioUCE. [Online].; 2018 [cited 2019. Available from: Actividad Antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de la planta *Cassia reticulata* sobre *Cándida Albicans*. Estudio In Vitro”. (5)

Base de Datos Uta

1. **PROQUEST** Velásquez J, Toro ME, Rojas L. Actividad antifúngica in vitro de los extractivos naturales de especies latifoliadas de la guayana venezolana. *Revista Madera y Bosques*. 12(1), 2006. México, D.F.: Red Instituto de Ecología A.C.; 2006. Available from: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/utasp/detail.action?docID=3207434>(17)
2. **SPRINGER** Alonso, R.F., García, M.E.G., García, J.F. et al. *Clin Transl Oncol* (2005) 7: 377. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF02716583>(18)
3. **SPRINGER** Urdaneta, E., Benaím Pinto, V. & Gavaller, B. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* (1961) 15: 317. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF02136336>(19)
4. **EBOOK CENTRAL** Lozano Chiu M. Efecto postantifungico y actividad fagocítica de leucocitos sobre *cándida albicans* tratada previamente con varios antifungicos. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2006. ProQuest Ebook Central. Available from:

<https://ebookcentral.proquest.com/lib/utasp/detail.action?docID=3163476>.(20
)

5. **EBOOK CENTRAL** Zampini IC, Cudmani N, Islas MI. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. Buenos Aires: Red Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana; 2009.ProQuest Ebook Central. Available from: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/utasp/detail.action?docID=3176785>.

(21)

ANEXOS

Anexo 1 Resolución del Proyecto de Investigación “Actividad Antimicrobiana y Estudio de Toxicidad In Vitro de Extractos de Plantas Medicinales”



Universidad Técnica de Ambato Consejo Universitario

Av. Colombia 02-11 y Chile (Cda. Ingahurco) - Teléfonos: 593 (03) 2521-081 / 2822960 - Fax: 2521-084
Ambato – Ecuador

RESOLUCIÓN: 0249-CU-P-2017

El Honorable Consejo Universitario de la Universidad Técnica de Ambato, en sesión ordinaria efectuada el martes 31 de enero de 2017, vista y analizada la Resolución CONIN-P-017-2017-Res, del 25 de enero de 2017, suscrita por el Doctor Freddy del Pozo, Presidente Encargado del Consejo de Investigación; solicitando se autorice la reforma a la Resolución 1590-CU-P-2016 del 09 de agosto del 2016; por medio del cual se aprueba el Proyecto de Investigación "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ESTUDIO DE TOXICIDAD IN VITRO DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES"; en la parte pertinente al coordinador del proyecto; por lo tanto se designe a la Licenciada María Elizabeth Proaño Pérez, Docente de la Facultad de Ciencias de la Salud, como Coordinadora Principal del Proyecto en mención, en reemplazo del Doctor Julio Portal, quien fue designado Director Académico de la Institución y cede su condición de coordinador; en uso de sus atribuciones contempladas en el Artículo 21 del Estatuto Universitario, y demás normativa legal aplicable para el efecto:

RESUELVE:

1. Bajo estricta responsabilidad del Consejo requirente, reformar la Resolución 1590-CU-P-2016 del 09 de agosto del 2016; por medio del cual se aprueba el Proyecto de Investigación "ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ESTUDIO DE TOXICIDAD IN VITRO DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES", en la parte pertinente al coordinador del proyecto; por lo tanto se designa a la Licenciada María Elizabeth Proaño Pérez, Docente de la Facultad de Ciencias de la Salud, como Coordinadora Principal del Proyecto en mención, en reemplazo del Doctor Julio Portal, cuya designación se deja sin efecto ya que fue designado Director Académico de la Institución y cede su condición de coordinador.
2. La Dirección de Investigación y Desarrollo, será la responsable de tomar todas las acciones que sean necesarias para que esta nueva designación se la ejecute en legal y debida forma para lo cual tomará todas las acciones que sean necesarias en coordinación con las demás Unidades Académicas y Administrativas.
3. En lo no contemplado en la presente Resolución se estará a lo dispuesto en la originaria.

Ambato enero 31, 2017

Ing. MSc. Jorge León Mantilla
PRESIDENTE (E) DEL H. CONSEJO
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

copias: Rectorado, VAC, CONIN, DIDE, DIFIN, FCS, Auditoría Interna

JLR/AM

Ab. MSc. José Romo Santana
SECRETARIO GENERAL

Anexo 2 Resolución y Aprobación del Tema de Investigación, Resolución CD-P-2019-1697.

CONSEJO DIRECTIVO
FCS

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Ambato, 06 de mayo de 2019
Resolución CD-P-2019-1697

Licenciado Mg.
Mario Vilcacundo Córdova
COORDINADOR
Carrera de Laboratorio Clínico
Facultad de Ciencias de la Salud
Presente.


De mi consideración:

El H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud, en Sesión ordinaria del 06 de mayo de 2019, en conocimiento del acuerdo UTA-UAT-FCS-2019-0344-A, suscrito por el Dr. Esp. Jesús Chicaiza Tayupanta, Presidente de la Unidad de Titulación, sugiriendo se apruebe la **PROPUESTA DE TRABAJO DE TITULACIÓN** del/la estudiante **BORJA HERRERA EDGAR HUMBERTO** de la carrera de **Laboratorio Clínico**, al respecto.

CONSEJO DIRECTIVO, RESUELVE:

- **APROBAR AL/A SEÑOR/ITA BORJA HERRERA EDGAR HUMBERTO, ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO, EL TEMA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN "ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Croton lechleri* Y *Maytenus laevis* EN CEPAS DE *Candida albicans* ATCC 10231 ", PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE LICENCIADO/A EN LABORATORIO CLÍNICO.**
- **DESIGNAR COMO TUTOR DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN O TITULACIÓN, AL LICENCIADO MG. MARIO FERNANDO VILCACUNDO CÓRDOVA, DEBERÁ PRESENTAR UN INFORME BIMENSUAL DE SU AVANCE Y UNO AL FINAL, DE CONFORMIDAD CON EL ART. 14 DEL REGLAMENTO DE GRADUACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO TERMINAL DE TERCER NIVEL EN LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.**
- **AUTORIZAR AL/A SEÑOR/ITA ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO LA ELABORACIÓN DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN O TITULACIÓN EN LOS PLAZOS ESTABLECIDOS EN LA DISPOSICIÓN GENERAL, INCISO TERCERO Y CUARTO DEL REGLAMENTO DE RÉGIMEN ACADÉMICO.**

Atentamente,


Dr. Marcelo Ochoa Egas
Presidente



Anexo
c.c.

acuerdo UTA-UAT-FCS-2019-0344-A (DOCUMENTACIÓN CORRESPONDIENTE)
CARPETA ESTUDIANTE LICENCIADO/A (LICENCIADO/A)
LICENCIADO MG. MARIO FERNANDO VILCACUNDO CÓRDOVA, (TUTOR)

Anexo 3 Permiso del Ministerio del Ambiente Del Ecuador



AUTORIZACION DE INVESTIGACION CIENTÍFICA

N° 024-2018-IC-FLO-DNB/MAE

FLORA X FAUNA

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

Investigador/es	C./I Pasaporte	Nacionalidad	Actividad
Elizabeth Proaño Pérez	1803000569	Ecuatoriana	Investigador
Marco Esteban Gudiño	1002392882	Ecuatoriana	Investigador
Alberto Bustillos Ortiz	1804001061	Ecuatoriana	Investigador
Mario Vilcacundo Córdova	1802932580	Ecuatoriana	Investigador
Mirari Arancibia Soria	1802142461	Ecuatoriana	Investigador
Julio Portal Pineda	1754710356	Ecuatoriana	Investigador
Yajaira Rueda	1600947624	Ecuatoriana	Tesista
Pamela Bustos	1804288338	Ecuatoriana	Tesista
Espinosa Erika	1501217812	Ecuatoriana	Tesista
Maritza Canseco	1804585741	Ecuatoriana	Tesista
Juan Cortez	1804436291	Ecuatoriana	Tesista
Núñez Erika	1805212154	Ecuatoriana	Tesista
Edgar Borja	0503502999	Ecuatoriana	Tesista

Para que lleven a cabo la investigación científica **“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ESTUDIO DE TOXICIDAD IN VITRO DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES”**.

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

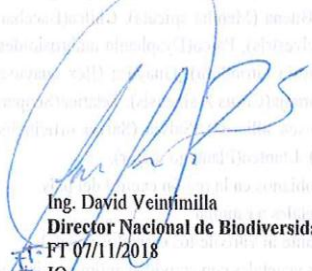
- Solicitud de: Elizabeth Proaño Pérez- Profesor investigador FCS –UTA.
- Auspicio de Institución Científica Nacional: Universidad Técnica de Ambato.
- Contraparte del Ministerio del Ambiente: Coordinadores de Patrimonio Natural, Responsables de Vida Silvestre de las Direcciones Provinciales y DNB establecidas en la parte inferior de esta Autorización.
- Inicio y final de investigación: Noviembre 07 de 2018 hasta Noviembre 07 de 2019.
- Entrega de informe final: 07 de noviembre de 2019.
- Valoración técnica del proyecto: Fanny Tello
- Esta Autorización **NO HABILITA LA MOVILIZACIÓN DE FLORA / FAUNA O MICROORGANISMOS**. Competencia de cada una de las direcciones provinciales del MAE, y que deberá gestionarse en cada dependencia.
- Esta Autorización **NO HABILITA EXPORTACIÓN DE FLORA/FAUNA O MICROORGANISMOS**, sin la correspondiente autorización de la Dirección Nacional de Biodiversidad o cada uno de los Centros de Tenencia y Manejo de Flora/Fauna (Herbarios/ Museos de Historia Natural) que cuente con patente vigente emitida por la Autoridad Ambiental.
- Estas muestras recolectadas no podrán ser utilizadas en actividades de **BIOPROSPECCIÓN NI ACCESO AL RECURSO GENÉTICO**, sin la correspondiente Autorización de esta Cartera de Estado.

Complementos autorizados para llevar a cabo la Investigación en campo.

- Recolecciones de las plantas medicinales se realizarán en senderos vecinos de los cantones de Píllaro, Patate, Quero, Tisaleo, Salcedo, Pujilí, Latacunga, Alausí, Guano, Pallatanga Puyo, Santa Clara, Mera, Chimbo, San Miguel, Guaranda y por ende no habrá afectación al ecosistema. Se recolectará solo las hojas de las plantas medicinales
- Recolección de tres kilogramos de cada planta medicinal para la obtención de extractos.
- Análisis organoléptico: Incluyen olor, color, sabor y textura.
- Extracción sólida – líquido y líquido – líquido: Pulverización
- Método Kirby-Bauer: Antibiograma

La falta de entrega de los resultados finales en los formatos indicados será causa suficiente para que el investigador no pueda continuar con las actividades de investigación en el país.

- EXPRESADOS EN LA PROPUESTA TÉCNICA TANTO EN TAXONES COMO EN NUMERO DE INDIVIDUOS.
32. PARA EL INGRESO A AREAS DE PROPIEDAD PRIVADA LOS INVESTIGADORES DEBERAN CONTAR CON LA AUTORIZACIÓN DEL RESPECTIVO PROPIETARIO.
 33. SE PROHÍBE EL INGRESO A LAS ÁREAS NATURALES DEL ESTADO ETILICO, PORTANDO ARMAS, EXPLOSIVOS, TÓXICOS, CONTAMINANTES, MATERIAL VEGETATIVO, ESPECIES ANIMALES Y EN GENERAL TODO AQUELLO QUE ATENTE A LA INTEGRIDAD DEL ÁREA.
 34. ESTA AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA PODRÁ SER RENOVADA ANUALMENTE PREVIO AL CUMPLIMIENTO DE LAS OBLIGACIONES CONTRAÍDAS POR EL INVESTIGADOR, ENTREGA Y APROBACIÓN DE INFORMES PARCIALES O FINALES EN LAS FECHAS INDICADAS.
 35. SE SOLICITARÁ PRÓRROGA QUINCE DÍAS ANTES DE LA FECHA DE VENCIMIENTO QUE INDICA ESTE DOCUMENTO.
 36. TODO USO INDEBIDO DE ESTA AUTORIZACIÓN, ASÍ COMO EL INCUMPLIMIENTO DE ASPECTOS LEGALES, ADMINISTRATIVOS O TÉCNICOS ESTABLECIDOS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS DE ACUERDO A LA CODIFICACIÓN A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE AREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE Y AL TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA. Y DEMAS NORMATIVA PERTINENTE.
 37. EL INCUMPLIMIENTO DE CUALQUIERA DE ESTAS DISPOSICIONES ASÍ COMO EL USO INDEBIDO DE ESTE DOCUMENTO, O EL INCUMPLIMIENTO DE LAS DISPOSICIONES LEGALES, ADMINISTRATIVAS O TÉCNICAS ESTABLECIDAS EN LA MISMA, SERÁN SANCIONADOS CONFORME A LA LEY FORESTAL Y DE CONSERVACIÓN DE ÁREAS NATURALES Y VIDA SILVESTRE CODIFICADA, TEXTO UNIFICADO DE LA LEGISLACIÓN AMBIENTAL SECUNDARIA Y CON LA SUSPENSIÓN INMEDIATA DE LA PRESENTE AUTORIZACIÓN.
 38. TASA POR AUTORIZACIÓN: 20 VEINTE DÓLARES NO REEMBOLSABLES DEPOSITADOS EN LA CUENTA BANK ECUADOR 0010000785, CÓDIGO SUB LÍNEA 190499



Ing. David Veinimilla
Director Nacional de Biodiversidad (Encargado).
FT 07/11/2018
JO

CC: Coordinadores de Patrimonio Natural.
Responsables de Vida Silvestre.

Nombre	Cargo	Fecha

La falta de entrega de los resultados finales en los formatos indicados será causa suficiente para que el investigador no pueda continuar con las actividades de investigación en el país.

Anexo 4 Permiso del Ministerio del Ambiente del Ecuador Provincia de Pastaza

MINISTERIO DEL AMBIENTE

EL GOBIERNO DE TODOS

DIRECCION PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE PASTAZA

AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE FLORA Y FAUNA

AC-FLO-DPAP/MAE-2019-006

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

Sr. Edgar Humberto Borja Herrera. C.C. 050350299-9

Para que lleven a cabo el proyecto de investigación "**ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Croton lechleri* y *Maytenus laevis* EN CEPAS DE *Candida albicans* ATCC 10231**"

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

- 1.- Solicitud del ingresada** por Sr. Edgar Humberto Borja Herrera. C.C. 050350299-9.
- 2.- Valoración técnica del proyecto:** Lic. Víctor Curicama, Responsable de Biodiversidad de la DPAP.
- 3.- Institución Científica Extranjera:** Ninguna
- 4.- Institución científica:** **UNIVERSIDAD TECNICA DE AMBATO.**
- 5.- Contraparte del Ministerio del Ambiente:** Dirección Provincial del Ambiente de Pastaza.
 - Director. Ing. Jimmy Guerrero
 - Responsable de Biodiversidad: Lic. Víctor Curicama
- 6.- Complementos autorizados de la Investigación:** NINGUNA.
- 7.- Cantidad de especímenes a colectarse:** Flora *Croton lechleri*; 100ml y *Maytenus laevis*; 50gr.
Se realizarán colecciones botánicas.
- 8.- Vigencia:** La vigencia de este permiso de investigación es de un año calendario desde su fecha de expedición que es desde el 27 de junio del 2019 hasta el 27 de junio del 2020.
- 9.- Obligaciones del Investigador:**
 - a) Entregar tres (3) copias de formato impreso y digital (formato PDF) de los resultados finales del investigador en idioma castellano.
 - b) Entregar copias de las fotografías (impreso y digital) y/o video que formen parte de la investigación en el trabajo final.
 - c) Entregar al Ministerio del Ambiente el registro de las especies objeto de su investigación, en formato digital incluyendo la localización exacta de los especímenes observados o muestras colectadas en coordenadas UTM WGS 84 17 SUR.
- 10.- Obligaciones de la Institución Científica Nacional Responsable:**
 - a) Cumplir con los plazos de entrega de informes finales o parciales.
 - b) Informar a las dependencias correspondientes del Ministerio del Ambiente sobre irregularidades cometidas por el investigador.

DIRECCION PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE PASTAZA
Dirección: González Suárez y Av. Ciudad Morán
Pastaza - Ecuador
Código Postal: 080100
Teléfono: (08) 2 284602 / 284603
www.dpac.gov.ec



11.- Del cumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales 6, 7, 8, 9, 10, de respetar y hacer cumplir los aspectos legales, administrativos y técnicos a los que el investigador este obligado a ejecutar, se responsabiliza al: Sr. Edgar Humberto Borja Herrera. C.C. 050350299-9

12.- Plazo para la entrega del informe final de investigación: de 13 de junio del 2020.

13.- Estas muestras no podrán ser utilizadas en cualquier actividad de Bioprospección ni Acceso al Recurso Genético sin la correspondiente Autorización del Ministerio del Ambiente del Ecuador.


Ing. Jimmy Ivan Guerrero Naranjo

DIRECTOR PROVINCIAL DEL
AMBIENTE DE PASTAZA



**GUÍA DE MOVILIZACIÓN DE ESPECÍMENES DE FLORA Y
FAUNA SILVESTRE
Nro. DPAP-UPN-VC-2019-038**

Fecha de emisión: 27/junio/2019

Fecha de movilización: 28/junio/2019 - 08h00 Válido hasta: 29/junio/2019 - 08h00

La Dirección Provincial de Pastaza, Autoriza al Sr. Edgar Humberto Borja Herrera. Investigador. La Movilización de muestras florales, Desde la ciudad del Puyo, Provincia Pastaza, Hasta: Herbario Misael Acosta Solis de la Universidad Técnica de Ambato, con el siguiente listado.

Lista de muestras colectadas,

Numero	Familia	Especie	Localidad	Coordenadas	
MACA001	Celastráceas	<i>Maytenus laevis</i>	Tarqui	X -1.509928	Y -78.010016
MACA002	Euphorbiaceae	<i>Croton lechleri</i>	Pomona	X -1.510172	Y -78.010431

Observaciones:

Las muestras biológicas serán movilizadas en:

Responsable de la movilización: Sr. Edgar Humberto Borja Herrera con C.C.

050350299-9

Vehículo:...

Placas: TGB-2627. Color: Rojo.

Los especímenes van en calidad de:

- Traslado de centro de manejo ()
- Comercio: ()
- Investigación: (X)

“ACTIVIDADES ANTIFUNGICAS DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Croton lechleri*, y *Maytenus laevis* EN CEPAS DE *Candida albicans* ATCC 10231”

Blgo. Víctor Curicama
Responsable de Biodiversidad DPAP.
C.I. 1719099028



Sr. Edgar Borja Herrera
Responsable de la movilización
C.C. 050350299-9

Anexo 5 Certificado por Parte de Responsable del Laboratorio de Investigación FCS-UTA.



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
Facultad de Ciencias de la Salud
Laboratorio de Biología Molecular y Celular

CERTIFICADO

A quien interese

Yo, Diana Carolina González Palacios con número de cédula de identidad 1802443984, responsable del Laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Salud, certifico que el señor Edgar Humberto Borja Herrera portador de la cédula de identidad 0503502999, estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, carrera de Laboratorio Clínico, realizó la parte experimental del Trabajo de Titulación, bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, con el tema: **“ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Croton lechleri* Y *Maytenus laevis* EN CEPAS DE *Cándida albicans* ATCC 10231”** en el Grupo de Investigación, desarrollo e innovación biomédica (GIDiB), con resolución CDP-2019-1697, bajo la supervisión de MSc. Mario Vilcacundo, durante el período comprendido desde el 5 de noviembre de 2018 hasta el 24 de mayo del presente año, demostrando durante su permanencia responsabilidad, honestidad y dedicación en las labores que le fueron encomendadas.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad, pudiendo el interesado hacer uso del presente documento en lo que estimare conveniente.

Ambato, 11 de junio de 2019

Atentamente:

Ing. Diana González Palacios



Anexo 6 Certificado por Responsable de Laboratorio de Microbiología FCS-UTA.



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

Facultad de Ciencias de la Salud

Calle Salvador y México (Cda. Ingahurco) Teléfono: 2521134 Ext. 114
Ambato-Ecuador

MEMORANDO No. TDLC-FCS-33-2018

FECHA: Ambato, 18 de junio de 2019
PARA: Lic. Mg. Mario Vilcacundo, Coordinador Carrera de Laboratorio Clínico
ASUNTO: CERTIFICACIÓN DE REALIZACIÓN DE TRABAJO PRÁCTICO DE TITULACIÓN.

Con un atento y cordial saludo me dirijo a usted para **CERTIFICAR** que el Sr. **Edgar Humberto Borja Herrera** con CI: 050350299-9, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad Ciencias de la Salud, realizó la parte práctica de su trabajo de graduación titulado "**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS Croton lechleri Y Maytenus laevis EN CEPAS DE Cándida albicans ATCC 10231**". El estudiante tuvo el apoyo del Bqf. Mg. Víctor Guangasig Técnico docente de la Carrera de Laboratorio Clínico, desde el 5 de noviembre del 2018 al 24 de mayo del 2019, perteneciente al periodo académico septiembre 2018 – febrero 2019 y marzo 2019 – agosto 2019. El proyecto tiene como resolución de aprobación CD-P-2019-1697.

El señor ha cumplido con la normativa vigente de los laboratorios de docencia de la Facultad de Ciencias de la Salud campus Querochaca y particularmente del laboratorio de Microbiología en donde realizo el desarrollo experimental de su investigación y a la fecha **NO ADEUDA** ningún monto en lo relacionado a reactivos, material y otros.

Los registros de su asistencia al laboratorio de Microbiología en el campus Querochaca están disponibles en el laboratorio bajo la responsabilidad de la Lic. Lilian Medina, responsable del Laboratorio de Microbiología.

Atentamente,

Bqf. Mg. Víctor Hernán Guangasig
TÉCNICO DOCENTE C.L.C.
Tlf. 0983162224
E-mail: victorhguangasig@uta.edu.ec



UNIVERSIDAD
TÉCNICA DE AMBATO

Cda. Ingahurco Teléfono (03) 3 730 268 Ext. 5209 www.uta.edu.ec

Anexo 7 Certificado del Herbario Misael Acosta Solís de la Universidad
Técnica de Ambato.



Ambato, 10 de julio del 2019

Of. 04-AMAS-2019

Ing.
Diego Bastidas
DIRECTOR PROVINCIAL DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE DE TUNGURAHUA
Presente.-

De mis consideraciones:

Primeramente permítame saludarle y desearle éxitos en sus funciones que acertadamente desempeña en beneficio del medio ambiente de nuestro país. Por intermedio del presente me permito informar que el Lcdo. Mario Vilcacundo Investigador del Proyecto "Actividad antifúngica e los extractos de plantas *Croton lechleri* y *Maytenus laevis* en cepas de *Candida albicans* ATCC 10231". Realiza la entrega a través de su estudiante Sr. Edgar Humberto Borja Herrera integrante de su grupo de investigación de un duplicado de las siguientes colecciones botánicas: *Croton lechleri* y *Maytenus laevis* al Herbario Ambato Misael Acosta Solís (AMAS) de la Universidad Técnica de Ambato. Material que se mantendrá bajo la custodia de nuestra institución.

Sin otro particular, agradezco y suscribo.

Atentamente,


PhD. José Homero Vargas López
CURADOR HERBARIO (AMAS)



Anexo 8 Consentimiento de Recolección de Material Biológico Colectivo.



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

Consentimiento de recolección de material biológico

Yo, **Jorge Martin Pérez Casco** con cédula de ciudadanía número **180163603-4** propietario del inmueble ubicado en la parroquia Tarqui , Vía a Tarqui Km3, Puyo 160150 Cantón Pastaza, perteneciente a la provincia de Pastaza autorizo a los estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias de la Salud y al estudiante de la Carrera de Bioquímica de la Universidad Técnica de Ambato, a que realicen la recolección de muestras de hojas, tallos, corteza de las plantas de: **Sangre de drago, Chuchuhuasi, Uña de gato y Guayusa** que se utilizarán en el proyecto de investigación titulado: "Actividad antimicrobiana y estudios de toxicidad *in vitro* de plantas medicinales" coordinado por el **Doctor Marco Esteban Gudiño Gómezjurado**. Al firmar acepto que el señor no ha causado ningún daño a las plantas y que se me informará sobre los resultados que se obtengan de esa investigación con las especies recolectadas de mi propiedad de los estudiantes

Borja Herrera Edgar Humberto	050350299-9
Cáceres Navas Juan Carlos	180393073-2
Canseco Arrunategui Maritza Angelica	180458574-1
Cortez Pinto Juan Carlos	180443629-1

Para que conste

..... Dr. Marco Esteban Gudiño Sr. Edgar Borja Herrera Sr. Cáceres Juan Carlos

..... Srta. Canseco Arrunategui Maritza Sr. Cortez Pinto Juan

.....
Sr. Jorge Martin Pérez Casco

En caso de existir alguna duda por favor contactar con el Dr. Marco Gudiño. Carrera de Laboratorio Clínico- Facultad de Ciencias de la Salud (UTA). me.gudino@uta.edu.ec



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

Consentimiento de recolección de material biológico

Yo, **Jorge Martin Pérez Casco** con cédula de ciudadanía número **180163603-4** propietario del inmueble ubicado en la parroquia Tarqui , Vía a Tarqui Km3, Puyo 160150 Cantón Pastaza, perteneciente a la provincia de Pastaza autorizo al señor **Borja Herrera Edgar Humberto** con cedula de ciudadanía número **050350299-9**, estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica de Ambato, a que realicen la recolección de muestras de hojas, tallos, corteza de las plantas de: **Sangre de drago y Chuchuhuasi** que se utilizarán en el proyecto de investigación titulado: "Actividad antimicrobiana y estudios de toxicidad *in vitro* de plantas medicinales" coordinado por el **Doctor Marco Esteban Gudiño Gómezjurado**. Al firmar acepto que el señor no ha causado ningún daño a las plantas y que se me informará sobre los resultados que se obtengan de esa investigación con las especies recolectadas de mi propiedad.

Para que conste

.....
Dr. Marco Esteban Gudiño G.

.....
Sr. Edgar Borja Herrera

.....
Sr. Jorge Martin Pérez Casco

En caso de existir alguna duda por favor contactar con el Dr. Marco Gudiño. Carrera de Laboratorio Clínico- Facultad de Ciencias de la Salud (UTA). me.gudino@uta.edu.ec



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

Consentimiento de recolección de material biológico

Yo, **Jorge Custodio Vargas Vargas** con cédula de ciudadanía número **160000287-5** propietario del inmueble ubicado en la comunidad Quichua , Vía a Pomona Km 35 , cerca del Puyo Cantón Pastaza, perteneciente a la provincia de Pastaza autorizo a los estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias de la Salud y al estudiante de la Carrera de Bioquímica de la Universidad Técnica de Ambato, a que realicen la recolección de muestras de hojas, tallos, corteza de las plantas de: **Sangre de drago, Chuchuhuasi, Uña de gato y Guayusa** que se utilizarán en el proyecto de investigación titulado: "Actividad antimicrobiana y estudios de toxicidad *in vitro* de plantas medicinales" coordinado por el **Doctor Marco Esteban Gudiño Gómezjurado**. Al firmar acepto que el señor no ha causado ningún daño a las plantas y que se me informará sobre los resultados que se obtengan de esa investigación con las especies recolectadas de mi propiedad de los estudiantes

Borja Herrera Edgar Humberto	050350299-9
Cáceres Navas Juan Carlos	180393073-2
Canseco Arrunategui Maritza Angelica	180458574-1
Cortez Pinto Juan Carlos	180443629-1

Para que conste


.....
Dr. Marco Esteban Gudiño


.....
Sr. Edgar Borja Herrera


.....
Sr. Cáceres Juan Carlos


.....
Srta. Canseco Arrunategui Maritza


.....
Sr. Cortez Pinto Juan


.....
Sr. Jorge Custodio Vargas Vargas

En caso de existir alguna duda por favor contactar con el Dr. Marco Gudiño. Carrera de Laboratorio Clínico-
Facultad de Ciencias de la Salud (UTA). me.gudino@uta.edu.ec



Consentimiento de recolección de material biológico

Yo, **Jorge Custodio Vargas Vargas** con cédula de ciudadanía número **160000287-5** propietario del inmueble ubicado en la comunidad Quichua , Vía a Pomona Km 35 , cerca del Puyo Cantón Pastaza, perteneciente a la provincia de Pastaza autorizo al señor **Borja Herrera Edgar Humberto** con cedula de ciudadanía número **050350299-9**, estudiantes de la Carrera de Laboratorio Clínico de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Técnica de Ambato, a que realicen la recolección de muestras de hojas, tallos, corteza de las plantas de: **Sangre de drago y Chuchuhuasi** que se utilizarán en el proyecto de investigación titulado: "Actividad antimicrobiana y estudios de toxicidad *in vitro* de plantas medicinales" coordinado por el **Doctor Marco Esteban Gudiño Gómezjurado**. Al firmar acepto que el señor no ha causado ningún daño a las plantas y que se me informará sobre los resultados que se obtengan de esa investigación con las especies recolectadas de mi propiedad.

Para que conste



Dr. Marco Esteban Gudiño G.



Sr. Edgar Borja Herrera



Sr. Jorge Custodio Vargas Vargas

En caso de existir alguna duda por favor contactar con el Dr. Marco Gudiño. Carrera de Laboratorio Clínico- Facultad de Ciencias de la Salud (UTA). me.gudino@uta.edu.ec

Anexo 10 Resultados de los Halos en Milímetros

RESULTADOS OBTENIDOS CON HALOS

PRIMER PROTOCOLO

PRIMERA REPETICION SANGRE DE DRAGO TRIPICADO						
1.100	HALO	1-1000	HALO	1-10000	HALO	CONTROL
1	8.267	1	7.124	1	6.143	4.560
2	7.945	2	6.205	2	6.228	4.876
3	7.864	3	6.568	3	6.496	4.980

SEGUNDA REPETICION SANGRE DE DRAGO TRIPICADO						
1.100	HALO	1-1000	HALO	1-10000	HALO	CONTROL
1	8.550	1	6.044	1	7.687	5.121
2	8.452	2	7.036	2	7.918	5.098
3	8.384	3	6.438	3	7.776	4.986

TERCERA REPETICION SANGRE DE DRAGO TRIPICADO						
1.100	HALO	1-1000	HALO	1-10000	HALO	CONTROL
1	8.450	1	6.818	1	7.735	4.926
2	8.204	2	6.931	2	7.735	5.019
3	7.883	3	7.306	3	7.965	5.215

RESULTADOS OBTENIDOS CON HALOS

PRIMER PROTOCOLO

PRIMERA REPETICION CHUCHUGUASI TRIPICADO						
1.100	HALO	1-1000	HALO	1-10000	HALO	CONTROL
1	4.567	1	4.225	1	4.298	4.560
2	4.567	2	4.226	2	4.228	4.876
3	4.749	3	4.312	3	4.255	4.980

SEGUNDA REPETICION CHUCHUGUASI TRIPICADO						
1.100	HALO	1-1000	HALO	1-10000	HALO	CONTROL
1	5.772	1	4.128	1	5.287	5.121
2	5.556	2	4.195	2	5.569	5.098
3	5.586	3	4.291	3	4.970	4.986

SEGUNDA REPETICION CHUCHUGUASI TRIPICADO

1.100	HALO	1-1000	HALO	1-10000	HALO	CONTROL
1	5.069	1	4.024	1	5.107	4.926
2	5.282	2	4.675	2	5.068	5.019
3	5.287	3	4.470	3	4.816	5.215

EXTRACTO 100uL- LEVADURA 100uL - DMSO CONTROL

CHUCHUGUASI TRIPPLICADO

1	2	3	CONTROL	4	5	6	7	8
HALO	HALO	HALO	CONTROL	HALO	HALO	HALO	HALO	HALO
5.580	5.466	6.230	6.339	6.828	6.633	6.467	5.672	6.524
66.522	6.522	6.212	6.384	5.924	6.407	6.604	6.619	6.215

EXTRACTO 100uL- LEVADURA 100uL - DMSO CONTROL PRIMERA

REPLICA

SANGRE DE DRAGO

CHUCHUGUASI

1	2	3	CONTROL	4	5	6
7.120	7.974	7.551	6.358	4.869	5.727	5.889
8.228	7.986	8.192	6.596	6.453	6.994	6.381

EXTRACTO 100uL- LEVADURA 100uL - DMSO CONTROL SEGUNDA

REPLICA

SANGRE DE DRAGO

CHUCHUGUASI

1	2	3	CONTROL	4	5	6
7.278	7.221	6.924	5.227	5.148	5.181	5.214
8.362	6.852	7.642	5.963	5.144	5.201	5.962

EXTRACTO 100uL- LEVADURA 100uL - DMSO CONTROL

PRIMERA REPLICA SANGRE DE DRAGO TRIPICADO

1	2	3		4	5	6	7	8
HALO	HALO	HALO	CONTROL	HALO	HALO	HALO	HALO	HALO
7.553	7.729	8.356	6.667	7.375	7.045	8.044	8.028	8.849
7.705	7.209	7.701	6.121	7.866	7.373	7.879	8.218	8.345
7.217	7.544	7.322	5.571	7.319	7.217	7.292	7.319	7.429

EXTRACTO 100uL- LEVADURA 100uL - DMSO CONTROL

SEGUNDA REPLICA SANGRE DE DRAGO TRIPICADO

1	2	3		4	5	6	7	8
HALO	HALO	HALO	CONTROL	HALO	HALO	HALO	HALO	HALO
8.862	8.016	8.830	6.103	8.005	8.382	8.464	8.097	8.837
6.049	6.319	6.959	4.789	6.669	6.631	6.574	7.182	6.410
6.852	6.725	6.169	5.518	6.703	6.736	6.299	6.448	7.010

EXTRACTO 100uL- LEVADURA 100uL - DMSO CONTROL

TERCERA REPLICA SANGRE DE DRAGO TRIPICADO

1	2	3		4	5	6	7	8
HALO	HALO	HALO	CONTROL	HALO	HALO	HALO	HALO	HALO
7.553	7.729	8.356	6.667	7.375	7.045	8.044	8.028	8.849
7.705	7.209	7.701	6.121	7.866	7.373	7.879	8.218	8.345
7.217	7.544	7.322	5.571	7.319	7.217	7.292	7.319	7.429

Anexo 11 Resultados de Cultivo en Pocillos / Logaritmos

Resultados UFC/mL							
Siembra de la dilucion 10-5							
Primera replica				Logaritmo			
3,3 * 10-6 UFC de Candida albicans con 10 mg de extracto				0,51851394			
Segunda Replica							
3,2 * 10-6 UFC de Candida albicans con 10 mg de extracto				0,505149978			
Tercera Replica							
3,5 * 10-6 UFC de Candida albicans con 10 mg de extracto				0,544068044			
Cultivo en Pocillos							
Siembra de la dilucion 10-6							
PRIMERA REPLICIA							
Con 100uL de extractos de sangre de drago							
BHI + DMSO	BHI + EXTRACTO	LEVADURA	LOGARITMO	LEVADURA + DMSO	LOGARITMO	LEVADURA + EXTRACTO	LOGARITMO
C1: 0	C2: 0	C3: 74	1,86923172	C4: 24	1,380211242	C5: 0	0
E1: 0	E2: 0	E3: 86	1,934498451	E4: 38	1,579783597	E5: 8	0,903089987
H1: 0	H2: 0	H3: 105	2,021189299	H4: 25	1,397940009	H5: 0	0
Cultivo en Pocillos							
Siembra de la dilucion 10-6							
SEGUNDA REPLICIA							
Con 100uL de extractos de sangre de drago							
BHI + DMSO	BHI + EXTRACTO	LEVADURA	LOGARITMO	LEVADURA + DMSO	LOGARITMO	LEVADURA + EXTRACTO	LOGARITMO
C1: 0	C2: 0	C3: 213	2,328379603	C4: 41	1,612783857	C5: 0	0
E1: 0	E2: 0	E3: 230	2,361727836	E4: 90	1,954242509	E5: 0	0
H1: 0	H2: 0	H3: 84	1,924279286	H4: 25	1,397940009	H5: 0	0

Cultivo en Pocillos							
Siembra de la dilucion 10-6							
TERCERA REPLICIA							
Con 100uL de extractos de sangre de drago							
BHI + DMSO	BHI + EXTRACTO	LEVADURA	LOGARITMO	LEVADURA + DMSO	LOGARITMO	LEVADURA + EXTRACTO	LOGARITMO
C1: 0	C2: 0	C3: 87	1,939519253	C4: 92	1,963787827	C5: 0	0
E1: 0	E2: 0	E3: 81	1,908485019	E4: 84	1,924279286	E5: 1	0
H1: 0	H2: 0	H3: 78	1,892094603	H4: 80	1,903089987	H5: 5	0,69897
Cultivo en Pocillos							
Siembra de la dilucion 10-6							
PRIMERA REPLICIA							
Con 200uL de extractos de sangre de drago							
BHI + DMSO	LEVADURA+DMSO	LOGARITMO	LEVADURA	LOGARITMO	LEVADURA+EXTRACTO	LOGARITMO	LOGARITMO
C1: 0	C2: 85	1,929418926	C3: 86	1,934498451	C4: 0	0	0
E1: 0	E2: 82	1,913813852	E3: 102	2,008600172	E4: 0	0	0
H1: 0	H2: 88	1,944482672	H3: 103	2,012837225	H4: 0	0	0
Cultivo en Pocillos							
Siembra de la dilucion 10-6							
SEGUNDA REPLICIA							
Con 200uL de extractos de sangre de drago							
BHI + DMSO	LEVADURA+DMSO	LOGARITMO	LEVADURA	LOGARITMO	LEVADURA+EXTRACTO	LOGARITMO	LOGARITMO
C1: 0	C2: 92	1,963787827	C3: 93	1,968482949	C4: 0	0	0
E1: 0	E2: 89	1,949390007	E3: 86	1,934498451	E4: 0	0	0
H1: 0	H2: 101	2,004321374	H3: 90	1,954242509	H4: 0	0	0

Cultivo en Pocillos							
Siembra de la dilucion 10-6							
TERCERA REPLICIA							
Con 200uL de extractos de sangre de drago							
BHI + DMSO	LEVADURA+DMSO	LOGARITMO	LEVADURA	LOGARITMO	LEVADURA+EXTRACTO	LOGARITMO	LOGARITMO
C1: 0	C2: 99	1,995635195	C3: 105	2,021189299	C4: 0	0	0
E1: 0	E2: 95	1,977723605	E3: 88	1,944482672	E4: 0	0	0
H1: 0	H2: 104	2,017033339	H3: 105	2,021189299	H4: 0	0	0

Anexo 12 Fotografías

RECOLECCIÓN DE MATERIA VEGETAL

Croton lechleri



Maytenus laevis



LAVADO DE ESPECIE VEGETAL



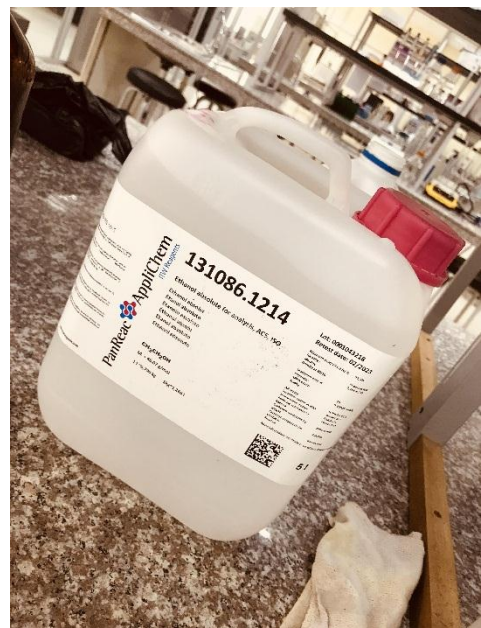
CONGELACIÓN A -80°C



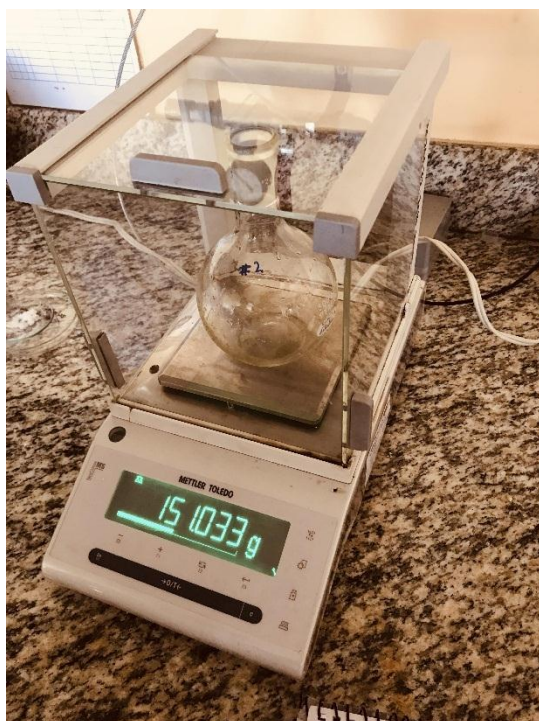
DESECACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL



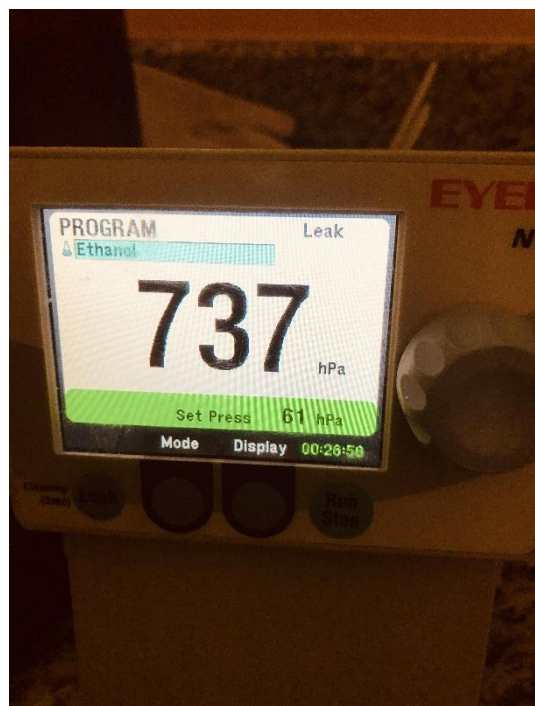
MACERACIÓN EN ETANOL 96%



FILTRADO AL VACÍO



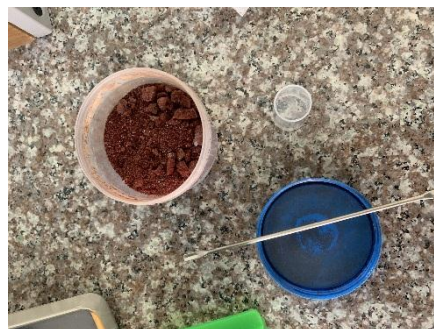
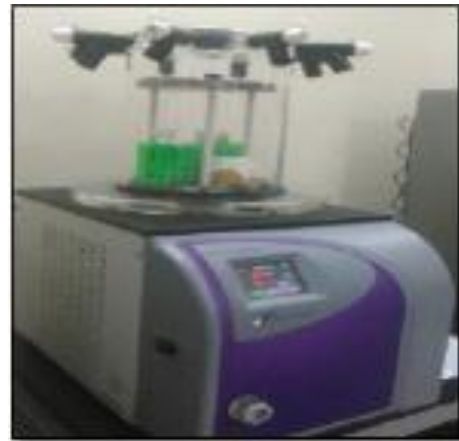
ROTA EVAPORACIÓN Y CONCENTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS



DETERMINACIÓN DEL pH DE CADA EXTRACTO



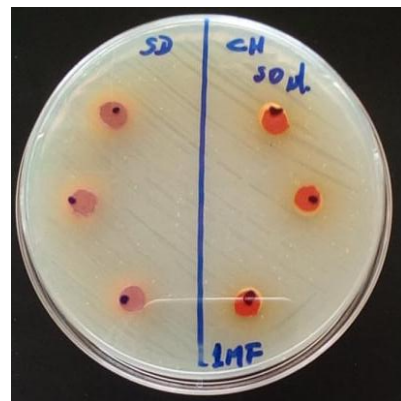
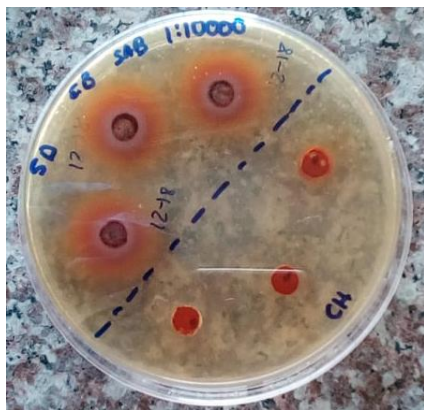
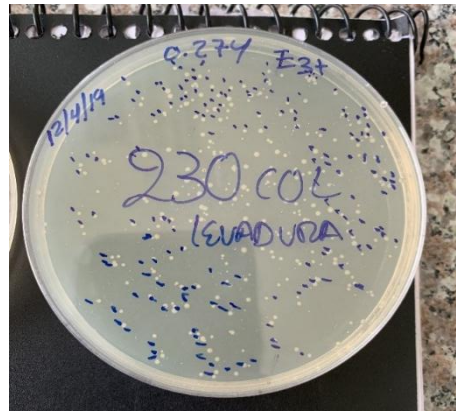
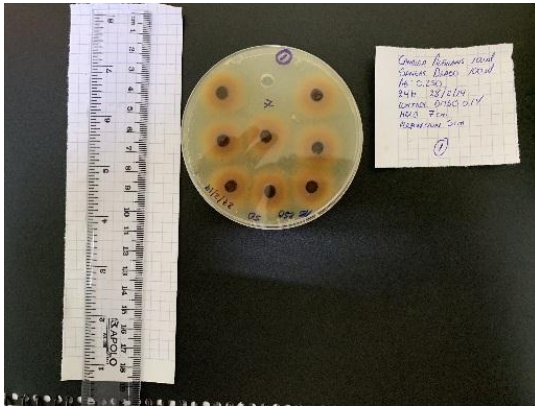
LIOFILIZACIÓN DE LOS EXTRACTOS



VIVIFICACIÓN DE *Candida albicans* ATCC 10231

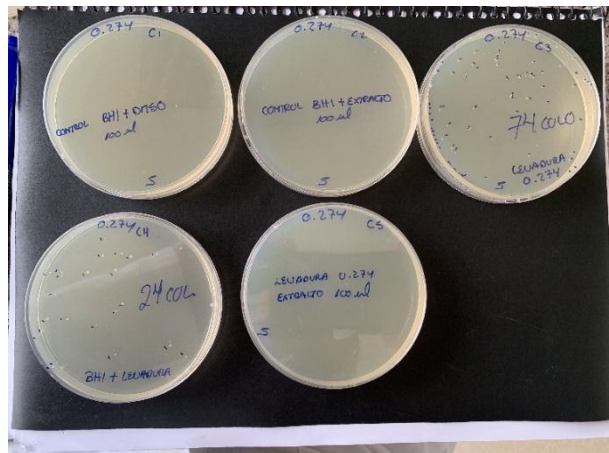
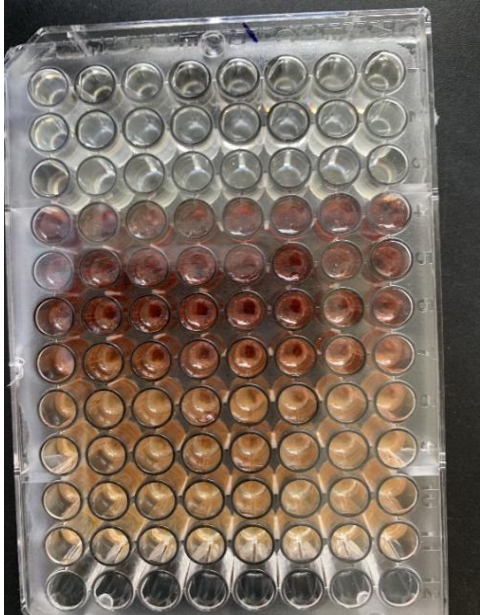


SENSIBILIDAD POR DIFUSIÓN EN AGAR



SENSIBILIDAD CON CALDO EN PLACAS MULTI POCILLOS





VERIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD FÚNGICA

