



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO**

INFORME DE INVESTIGACIÓN SOBRE:

**“ACTIVIDAD ANTI-BIOFILM DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Urtica dioica* L., *Ilex guayusa* Y *Uncaria tomentosa* EN *Staphylococcus aureus*.”**

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

**Autora:** Espinosa Caiza, Erika Pamela

**Tutor:** Lic. MSc. Vilcacundo Córdova, Mario Fernando

Ambato – Ecuador

Enero 2019

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

En mi calidad de Tutor del Trabajo de Investigación sobre el tema:

**“ACTIVIDAD ANTI-BIOFILM DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Urtica dioica L., Ilex guayusa* Y *Uncaria tomentosa* EN *Staphylococcus aureus*.”** de Espinosa Caiza Erika Pamela, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico, considero que reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del jurado calificador designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencias de la Salud.

Ambato, Diciembre de 2018

**EL TUTOR**

.....  
**Lic. MSc. Vilcacundo Córdova, Mario Fernando**

## AUTORÍA DE TRABAJO DE GRADO

Los criterios emitidos en el Informe de Investigación:

**“ACTIVIDAD ANTI-BIOFILM DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Urtica dioica* L., *Ilex guayusa* Y *Uncaria tomentosa* EN *Staphylococcus aureus*.”** como también resultados, conclusiones y análisis son de mi exclusiva responsabilidad, como autora de éste Trabajo de Grado.

Ambato, Diciembre de 2018

### LA AUTORA

.....

Espinosa Caiza, Erika Pamela

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este proyecto de investigación o parte del mismo un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación. Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Proyecto de investigación con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este proyecto de investigación, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando se realice respetando mis derechos de autora.

Ambato, Diciembre de 2018

## **LA AUTORA**

.....

Espinosa Caiza, Erika Pamela

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR**

Los miembros del Tribunal Examinador aprueban el Informe de Investigación sobre el tema: “**ACTIVIDAD ANTI-BIOFILM DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Urtica dioica L., Ilex guayusa Y Uncaria tomentosa EN Staphylococcus aureus.***” de Espinosa Caiza Erika Pamela, estudiante de la Carrera de Laboratorio Clínico.

Ambato, Enero 2019

Para constancia firman

.....  
**PRESIDENTE/A**

.....  
**1ER VOCAL**

.....  
**2DO VOCAL**

## DEDICATORIA

*A mi madre le debo y le dedico todo lo que soy, nunca me cansaré de agradecerles a mis padres y hermana por todo el apoyo y las herramientas que me dieron para poder hoy dirigirme a ese gran sueño. Ustedes son parte de todos mis logros y son también parte de esta fuerza que me ayuda a mantenerme de pie. De verdad gracias por creer en ustedes mismos, si ustedes no hubieran sido fuertes yo no estaría donde estoy ahora.*

*Gracias por soportar mis buenos y malos ratos en el transcurso de este proyecto. Infinitas gracias a mi hermosa madre Marilú por todo su apoyo y por ser el más grande ejemplo de lucha y superación, inculcándome los mejores valores con su ejemplo y dedicación. Gracias a mi hermana Móni por ser el principal motor para alcanzar mis metas. Infinitas gracias al sr. Marco por ser como mi padre y amigo desde que tengo memoria, gracias por enseñarme a ser una guerrera en la vida haciendo el mayor esfuerzo y poniéndolo todo en las manos de Dios, de igual forma a mi pa Pablo por todo el apoyo en el transcurso de mi carrera ya que sin su apoyo incondicional nada de esto sería posible ya que cuando todo lo malo vino sobre mí usted me dio la llave del éxito.*

*Los amo con todo mi corazón.*

Con amor, Pame.

## AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento profundo y sentido a la Lcda. Mg. Elizabeth Proaño por confiar en mí y permitirme ser parte de su magnífico grupo de investigación, por su paciencia y valiosa amistad, por impulsarme a diario a la difusión científica mismos que me ayudaron adquirir grandes conocimientos y destrezas útiles para mi formación como profesional.

Gracias al Lcdo. MSc. Mario Vilcacundo por su tiempo, consejos y más que eso la responsabilidad como el mejor tutor en el desarrollo de este estupendo trabajo, demostrando que la experimentación no es un ensayo de velocidad ni tampoco de resistencia sino de aprendizaje, constancia y mucha paciencia; a su vez gracias por donarme las cepas de *S. aureus* indispensables para el desarrollo del bioensayo.

Infinitas gracias a todos quienes conforman el Grupo de Investigación, Desarrollo e Innovación Biomédica de la Universidad Técnica de Ambato, especialmente para la Ing. Dianita quien ha sido mi salvación, más que una madre desde que me incorporé al Laboratorio gracias por el apoyo, paciencia y comprensión siempre, al Dr. Bustillos porque a más de jefe del laboratorio demostró ser amigo y consejero, gracias a Juank por ser un apoyo incondicional en el transcurso de este proyecto y compartir tantas alegrías junto a mí; gracias a mis compañeros Ing. Jenny, Michael y amigas tesistas ahora Lcdas. Pame y Yaja quienes me han extendido su apoyo durante la redacción de mi tesis, a los compitas de la promo. 2018 de la mejor carrera de la UTA, Diana, Pame, Michu, Andre, Eve; muchísimas GRACIAS a todos el ambiente ha sido muy ameno, enriquecedor y divertido.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

<b>PORTADA</b> .....	<b>i</b>
<b>APROBACIÓN DEL TUTOR</b> .....	<b>ii</b>
<b>AUTORÍA DE TRABAJO DE GRADO</b> .....	<b>iii</b>
<b>DERECHOS DE AUTOR</b> .....	<b>iv</b>
<b>APROBACIÓN DEL TRIBUNAL EXAMINADOR</b> .....	<b>v</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>vi</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS</b> .....	<b>xi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xiv</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>xv</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1. TEMA</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:</b> .....	<b>3</b>
1.2.1. Contextualización: .....	<b>3</b>
1.2.2. Formulación del Problema:.....	<b>6</b>
<b>1.3. JUSTIFICACIÓN:</b> .....	<b>6</b>
<b>1.4. OBJETIVOS:</b> .....	<b>7</b>
1.4.1. Objetivo General:.....	<b>7</b>
1.4.2. Objetivos Específicos: .....	<b>7</b>



CAPÍTULO II .....	8
<b>2.1. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS:.....</b>	<b>8</b>
<b>2.2. FUNDAMENTO TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
2.2.1. Plantas de uso medicinal en el Ecuador.....	15
2.2.2. Extractos Vegetales .....	17
2.2.3. Descripción del Extracto Vegetal de Ortiga ( <i>Urtica dioica L.</i> ).....	20
2.2.4. Descripción del Extracto Vegetal de Guayusa ( <i>Ilex guayusa</i> ) .....	24
2.2.5. Descripción del Extracto Vegetal de Uña de Gato ( <i>Uncaria tomentosa</i> )	28
2.2.6. Biofilms .....	30
2.2.7. Staphylococcus aureus.....	35
2.2.8. Biofilm de Staphylococcus aureus.....	39
<b>2.3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>40</b>
<b>2.4. SEÑALAMIENTO DE LAS VARIABLES. ....</b>	<b>40</b>
CAPÍTULO III .....	41
<b>3.1. NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>41</b>
<b>3.2. MODALIDAD BÁSICA DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>41</b>
<b>3.3. SELECCIÓN ÁREA O ÁMBITO DE ESTUDIO.....</b>	<b>42</b>
<b>3.4. POBLACIÓN- DISEÑO MUESTRAL .....</b>	<b>42</b>
<b>3.4.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN .....</b>	<b>43</b>
<b>3.5. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....</b>	<b>44</b>
<b>3.6. DESCRIPCIÓN DE LA INTERVENCIÓN Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN. ....</b>	<b>46</b>
<b>3.7. PROCEDIMIENTO .....</b>	<b>46</b>
3.7.1. MÉTODO DE DESECACIÓN DE MATERIAL VEGETAL .....	46
3.7.2. MACERACIÓN EN ETANOL 96% .....	47
3.7.3. PARA LIOFILIZAR LOS EXTRACTOS OBTENIDOS.....	47

3.7.4.PARA LA RECONSTITUCIÓN DE LA CEPA UTASABF001.....	48
3.7.5.PREPARACIÓN DE PRE-CULTIVOS PARA EVALUAR INHIBICIÓN BACTERIANA .....	48
3.7.6. PARA LA FORMACIÓN DEL BIOFILM .....	49
3.7.7. PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-BIOFILM .....	49
3.8. ASPECTOS ÉTICOS.....	50
CAPÍTULO IV.....	52
4.1. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS .....	52
4.2. VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS .....	62
4.3. DISCUSIÓN.....	68
CAPÍTULO V .....	71
5.1. CONCLUSIONES .....	71
5.2. RECOMENDACIONES .....	72
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ILEX GUAYUSA(51)</b> .....	24
<b>TABLA 2. TAXONOMÍA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.</b> .....	35
<b>TABLA 3. FASES DE LA PATOGENIA DE LAS INFECCIONES POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y FACTORES DE VIRULENCIA INVOLUCRADOS. (79)</b> .....	38
<b>TABLA 4. ENSAYO DE DIFUSIÓN EN POCILLO PARA CEPA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS FRENTE A EXTRACTOS DE ORIGEN VEGETAL AL TÉRMINO DE 24 HORAS.</b> .....	54
<b>TABLA 5. ANÁLISIS DESCRIPTIVO DEL BIOENSAYO EN LA FORMACIÓN DE BIOFILM DE S. AUREUS, SEGÚN OD 595 NM.</b> .....	62
<b>TABLA 6. ANÁLISIS NO PARAMÉTRICO DE VARIANZA UNILATERAL EN LA FORMACIÓN DE BIOFILM</b> .....	63
<b>TABLA 7. COMPARACIONES MÚLTIPLES MÉTODO HSD TUKEY ENTRE CONTROL POSITIVO Y LOS TRATAMIENTOS ESTABLECIDOS.</b> .....	64

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>GRÁFICO 1. MEDIA DEL VOLUMEN CONCENTRADO DE LOS EXTRACTOS VEGETALES ILEX GUAYUSA, UNCARIA TOMENTOSA, URTICA DIOICA.</b> .....	52
<b>GRÁFICO 2. DETERMINACIÓN DE EFECTO ANTIMICROBIANO SEGÚN LECTURA DE LA DENSIDAD ÓPTICA (OD) PARA EL CRECIMIENTO DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS FRENTE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LOS EXTRACTOS VEGETALES ILEX GUAYUSA, UNCARIA TOMENTOSA, URTICA DIOICA.</b> .....	56
<b>GRÁFICO 3. CINÉTICA DEL DESARROLLO DE BIOFILM DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS FRENTE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LOS EXTRACTOS VEGETALES AL TÉRMINO DE 24 HORAS.</b> .....	58
<b>GRÁFICO 4. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA FORMACIÓN DE BIOFILM UTILIZANDO COMPUESTOS DE ORIGEN NATURAL.</b> .....	60
<b>GRÁFICO 5. CINÉTICA DE FORMACIÓN DE BIOFILM FRENTE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ETANÓLICO DE I. GUAYUSA, U. TOMENTOSA, U. DIOICA AL TÉRMINO DE 24 HORAS.</b> .....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1. CATEGORÍAS MÉDICAS DE LAS PLANTAS MEDICINALES DEL ECUADOR.</b>	16
<b>FIGURA 2. PARTES MÁS UTILIZADAS DE LAS PLANTAS MEDICINALES DEL ECUADOR.</b> .....	16
<b>FIGURA 3. HOJA DE URTICA DIOICA.</b> .....	20
<b>FIGURA 4. METABOLITOS SECUNDARIOS DE U. DIOICA</b> .....	22
<b>FIGURA 5. HOJA DE ILEX GUAYUSA.</b> .....	24
<b>FIGURA 6. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE ILEX GUAYUSA.</b> .....	25
<b>FIGURA 7. PLANTAS CON CONTENIDO DE CAFEÍNA.</b> .....	25
<b>FIGURA 8. CONTENIDO DE PROPIEDADES FITOQUÍMICAS EN DIFERENTES PLANTAS.</b> .....	27
<b>FIGURA 9. CORTEZA JOVEN Y MADURA DE UNCARIA TOMENTOSA.</b> .....	28
<b>FIGURA 10. ETAPAS DE FORMACIÓN DEL BIOFILM.</b> .....	34
<b>FIGURA 11. COLONIAS PIGMENTADAS Y B -HEMOLÍTICAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN UN MEDIO DE AGAR SANGRE.</b> .....	36

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>FOTOGRAFÍA 1. PRUEBA DE SENSIBILIDAD PARA <i>S. AUREUS</i> CON COMPUESTOS DE ORIGEN VEGETAL, MEDIANTE LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN POCILLO KIRBY BAUER, AL TÉRMINO DE 24H.</b> .....	54
<b>FOTOGRAFÍA 2. CRECIMIENTO BACTERIANO EN AGAR MUELLER-HINTON EVALUANDO EFECTO BACTERICIDA DE U. TOMENTOSA FRENTE <i>S. AUREUS</i>.</b> .....	54

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. RESOLUCIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN “ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA Y ESTUDIO DE TOXICIDAD IN VITRO DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES” .....	86
ANEXO 2. RESOLUCIÓN Y APROBACIÓN DEL TEMA DE INVESTIGACIÓN. ....	87
ANEXO 3. PERMISO DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE DEL ECUADOR. ...	88
ANEXO 4. PERMISO DE INGRESO A LOS LABORATORIO DE LA FCIAL-UTA .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
ANEXO 5. CERTIFICADO POR PARTE DE RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN FCS-UTA.....	90
ANEXO 6. CERTIFICADO POR RESPONSABLE DE LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA FCS-UTA.....	91
ANEXO 7. FOTOGRAFÍAS .....	92

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

**“ACTIVIDAD ANTI-BIOFILM DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Urtica dioica* L., *Ilex guayusa* Y *Uncaria tomentosa* EN *Staphylococcus aureus*.”**

**Autora:** Espinosa Caiza, Erika Pamela.

**Tutor:** Lic. MSc. Vilcacundo Córdova, Mario Fernando.

**Fecha:** Diciembre del 2018

**RESUMEN**

*Staphylococcus aureus* que forma parte de la microbiota habitual de piel y mucosas, a menudo genera infecciones bacterianas en pacientes que portan dispositivos biomédicos incrementando la tasa de resistencia a antibióticos por la capacidad para producir biofilm o biopelículas gracias a la presencia de proteínas *Bap*, por tal motivo el presente trabajo se centra en evaluar las propiedades de plantas medicinales encontradas en la extensa flora del Ecuador. Para el ensayo *in vitro*, se trabajó a partir de extractos etanólicos obtenidos por maceración de 3 plantas medicinales: *Ilex guayusa* (hojas), *Uncaria tomentosa* (corteza) y *Urtica dioica* (hojas). La actividad antimicrobiana se determinó mediante la técnica de difusión en pozo, obteniendo halos de inhibición de 7mm, 9mm y 7mm, respectivamente y se correlaciona en placas de microtitulación evaluando su inhibición en base a concentraciones de 80 mg/mL para *I. guayusa*, 50 mg/mL para *U. tomentosa* y *U. dioica* mostrando al término de 24 h. una diferencia significativa en cuanto a la inhibición de crecimiento de la bacteria.

Para evaluar la actividad anti-biofilm de los extractos frente a *S. aureus* productor de biofilm, se realizó mediante la tinción con cristal violeta 1% donde 2 de las 3 plantas en estudio inhiben su formación con un porcentaje superior a 50%, en concentraciones de 5; 2,5 y 1,25 mg/ $\mu$ L. El análisis estadístico de datos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) y prueba Tukey utilizando el paquete de datos SPSS, obteniendo una significancia  $<0,05$  lo que nos permite aceptar la hipótesis alterna.

**PALABRAS CLAVES:** ACTIVIDAD ANTI-BIOFILM, EXTRACTO ETANÓLICO, I. GUAYUSA, U. TOMENTOSA, U. DIOICA, S. AUREUS.

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

**“ANTI-BIOFILM ACTIVITY OF PLANT EXTRACTS *Urtica dioica* L., *Ilex guayusa* AND *Uncaria tomentosa* IN *Staphylococcus aureus*.”**

**Author:** Espinosa Caiza, Erika Pamela.

**Tutor:** Lic. MSc. Vilcacundo Córdova, Mario Fernando.

**Date:** December del 2018

**SUMMARY**

Staphylococcus aureus, which is part of the habitual microbiota of skin and mucous membranes, often generates bacterial infections in patients carrying biomedical devices, increasing the rate of resistance to antibiotics due to the ability to produce biofilm or biofilms thanks to the presence of Bap proteins, reason the present work focuses on evaluating the properties of medicinal plants found in the extensive flora of Ecuador. For the in vitro test, we worked from ethanolic extracts obtained by maceration of 3 medicinal plants: *Ilex guayusa* (leaves), *Uncaria tomentosa* (bark) and *Urtica dioica* (leaves). The antimicrobial activity was determined by means of the well diffusion technique, obtaining halos of inhibition of 7mm, 9mm and 7mm, respectively and it is correlated in microtiter plates evaluating its inhibition based on concentrations of 80 mg/mL for *I. guayusa*, 50 mg/mL for *U. tomentosa* and *U. dioica* showing at the end of 24 h. a significant difference in the inhibition of bacterial growth.

To evaluate the anti-biofilm activity of the extracts against *S. aureus* producing biofilm, it was carried out by staining with 1% violet crystal, where 2 of the 3 plants under study inhibited their formation with a percentage higher than 50%, in concentrations of 5; 2.5 and 1.25 mg/ML. Statistical analysis of data was performed using an analysis of variance (ANOVA) and Tukey test using the SPSS data package, obtaining a significance <0.05 which allows us to accept the alternative hypothesis.

**KEY WORDS:** ANTI-BIOFILM ACTIVITY, ETHANOLIC EXTRACT, *I. GUAYUSA*, *U. TOMENTOSA*, *U. DIOICA*, *S. AUREUS*.

## INTRODUCCIÓN

Un dilema para la Salud Pública año tras año son las altas tasas de resistencia a los antimicrobianos que sumada a la evasión de las defensas del huésped incrementan el desarrollo de biofilm o biopelículas asociadas a infecciones humanas y en la actualidad son de mucha atención debido a que se ha venido haciendo referencia únicamente a un tratamiento adecuado para bacterias en estado planctónico y según lo menciona el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos y Europa; más del 80% de infecciones humanas y el 65% adquiridas en el ámbito hospitalario son causadas por biofilm en países en desarrollo y responden pobremente a los tratamientos antibióticos.(1)

La presencia de biofilm en dispositivos biomédicos son la forma de vida más extendida en la naturaleza presentando varias evidencias epidemiológicas sobretodo en pacientes inmunocomprometidos presentando episodios de infección recurrentes pues una biopelícula al no contar con suficientes nutrientes empiezan a embeberse en una matriz extracelular y a adherirse fuertemente a una superficie, según lo estipulada J.W. Costerton por primera vez en 1978, tomando en cuenta que una bacteria productora de biofilm presenta un metabolismo, expresión génica y producción de proteínas alterado.(2)

*Staphylococcus aureus* que es integrante de la flora habitual de la zona nasofaríngea y zonas húmedas como pliegues de axila e ingle se ha convertido en un patógeno oportunista perjudicial para el ser humano afectando a la piel y tejidos blandos, causando bacteremias asociadas a catéter venoso central, neumonía asociada a una ventilación mecánica, así como también endocarditis, septicemias y osteomielitis todo esto cuando se comenzó a utilizar implantes biomédicos debido a la presencia de proteínas asociadas a Biofilm (*Bap*), así como la presencia de la adhesina intracelular de polisacáridos (PIA/PNAG) responsables de la secreción de más del 85% de exopolisacáridos, sintetizados a su vez por 4 proteínas organizadas en un solo operón (icaADBC) en mencionada bacteria (3)(4).

El desarrollo de biofilm al cabo de 2 a 4 horas induce a una respuesta inflamatoria crónica prolongando así la cicatrización en pacientes y conforme va



madurando al cabo de 2 a 3 días precisamente por el déficit de los nutrientes necesarios, un ambiente pobre en oxígeno y sus factores de virulencia que le permiten sobrevivir en ambientes hostiles del hospedero, frecuente en pacientes con diabetes y sometidos a un tratamiento con inmunosupresores creando como consecuencia una resistencia antimicrobiana al no poder penetrar completamente los antibiótico que más del 99% de fármacos comercializados tiene eficacia en bacterias que se encuentran en estado de crecimiento exponencial y no actúan cuando las bacterias están en fase estacionaria como lo está en el caso de biofilm, lo que constituye una amenaza para la salud pública a nivel mundial, por consiguiente se considera que lo más ideal es la remoción física y la aplicación de una nueva alternativa con extracto de plantas medicinales de la manera más rápido, como posible alternativa terapéutica con actividad anti-biofilm.(5)

Ecuador posee una extensa flora, por lo que el uso de las hierbas o plantas medicinales para el tratamiento de diferentes enfermedades se remonta al propio surgimiento del hombre, dentro de los fines para los que han sido usadas se encuentra el tratamiento a las infecciones agudas o crónicas, sin embargo pocos estudios aparecen en la literatura científica destinados a comprobar esas propiedades atribuidas por los antepasados.(6)

En el presente trabajo se propone un bioensayo *in vitro* con ciertos extractos de plantas medicinales como la corteza de *Uncaria tomentosa* y hojas frescas de *Ilex guayusa* y *Urtica dioica* que han demostrado tener múltiples beneficios para la salud, sin embargo las investigaciones de dichas plantas como alternativa para erradicar formación de biofilm son escasamente conocidos. Por tal motivo, la presente investigación centra sus experimentos en la determinación de actividad anti-biofilm frente a *Staphylococcus aureus* con la finalidad de aportar en la búsqueda de nuevos recursos terapéuticos avalados científicamente.

## CAPÍTULO I

### 1. EL PROBLEMA

#### 1.1. TEMA

“ACTIVIDAD ANTI-BIOFILM DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Urtica dioica L.*, *Ilex guayusa* Y *Uncaria tomentosa* EN *Staphylococcus aureus*.”

#### 1.2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

##### 1.2.1. Contextualización:

Existen países tropicales y en desarrollo de América Latina que con frecuencia aumentan las tasas de morbi-mortalidad debido a enfermedades infecciones, donde se estima que más de 2 millones de personas están infectadas por patógenos bacterianos cada año, siendo los individuos hospitalizados y/o inmunodeprimidos frecuentemente afectados (7) sin embargo en los últimos años, estudios demuestran que las infecciones son también contagiadas desde la comunidad por los mecanismos de virulencia que presentan los microorganismos y que se suman a la resistencia antimicrobiana.

Un microorganismos patógeno que se encuentra fácilmente en el ambiente es *Staphylococcus aureus*, considerado el primer causante de infecciones de tejidos blandos adquiridos en la comunidad y la segunda de bacteriemias nosocomiales en Norte América y Colombia. (8) La bacteria en mención están frecuentemente implicada en infecciones en catéteres y en implantes ortopédicos, mamarios; prótesis, sondas vesical, nasogástrico, marcapaso, dispositivos médicos permanentes que son colocados en los pacientes reemplazando un tejido vivo que por circunstancias han sido deteriorados o perdidos, lamentablemente el biomaterial al no ser compatible produce una infección bacteriana o procesos inflamatorios debido a la microflora cutánea del sitio de inserción. (9)(10)

Las bacterias utilizan como medio de supervivencia la formación de biofilm que consiste en la agrupación de colonias sésiles rodeados de matriz de exopolisacáridos afectando un sinnúmero de dispositivos médicos lo que incrementa la presencia de resistencia a los antibióticos debido a las adhesinas como la Adhesina Intracelular de Polisacárido (PIA) en *S. aureus* sintetizada por el operón *icaADBC* que facilitan su formación, causan infecciones crónicas persistentes por tal motivo el Instituto Nacional de Salud de EE.UU. manifiesta que en países desarrollados más del 60% de todas las infecciones microbianas son causadas por la formación de biofilm así como también existe una alta incidencia de infecciones nosocomiales, llegando a afectar la economía y estadía del paciente hospitalizado al ser sometido a largos períodos de tratamiento. (1)(11).

Epidemiológicamente hay registros que en casi todos los hospitales del mundo las infecciones urinarias ocupan más de un tercio de las infecciones nosocomiales, seguidas de las que están asociadas a catéteres o heridas quirúrgicas y posteriormente las infecciones respiratorias que ocuparía alrededor del 25%, (12) dicho análisis puede ser causado por el agente patógeno traído desde la comunidad, es decir externo o que habite en el hospital y el vector es el personal de salud, donde con frecuencia se encuentra *S. aureus* resistente a meticilina mostrando una viabilidad de 7 días a 7 meses en objetos inanimados, mientras que el tiempo de incubación entre el contacto y la infección es de 3 días.

Según estadísticas de la Organización Panamericana de Salud, América Latina ha aumentado los problemas en los hospitales por *Staphylococcus aureus* Resistentes a Meticilina (MRSA), demostrando una prevalencia en el año 2004: Argentina 42%, Bolivia 36%, Chile 80%, Colombia 47%, Honduras 12%, Nicaragua 20%, Ecuador 25%, Guatemala 64%, Paraguay 44%, Perú 80%, Uruguay 59%, Venezuela 25% y de acuerdo con estimaciones realizadas por la Asociación Panamericana de Enfermedades Infecciosas, la frecuencia se incrementará de manera considerable para el año 2019. (8)

En el Ecuador, la tasa mortalidad por infecciones nosocomiales es sumamente alta, pues expresan similitud con países latinoamericanos como Colombia, Perú o

Brasil según lo detalla el especialista Salgado para la REDACCIÓN MÉDICA en un estudio realizado con 776 pacientes de dos Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) privados de Quito, donde la neumonía nosocomial es más frecuente, seguido de infecciones de vías urinarias, catéteres intravenosos y contaminación sanguínea por el ambiente hospitalario o alguna transmisión cruzada.(13)

Según el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) en el año 2014, la influenza y la neumonía constituía la cuarta causa de muerte general, mientras las septicemias y la tuberculosis se ubicaron en la posición diecisiete y veintiuno respectivamente. (14)

Para un tratamiento oportuno de las enfermedades se emplea el uso de antibióticos en diferentes dosis, pero desfavorablemente el uso y el abuso de estos antimicrobianos han producido multirresistencia perdiendo de esta manera la eficacia de los fármacos. Un estudio en la Universidad de Cuenca reporta resultados del antibiograma para *S. aureus* mostrando resistencia para ampicilina y penicilina y sensibilidad para amoxicilina-ácido clavulánico y clindamicina. (15). Sumada a ésta, existen más evidencias científicas que muestran la necesidad de continuar en la búsqueda incesante de nuevas sustancias con actividad anti-biofilm aprovechando la riqueza botánica y sus propiedades.

En el año 2012 se publicó un estudio realizado en la Universidad Nacional de Loja, de la Dra. Claudia Cruz y colaboradores, donde se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto etanólico al 70% de las especies vegetales *Piper pseudochurumayo* y *Olyra latifolia*, recolectadas en la Provincia de Zamora Chinchipe, y utilizadas tradicionalmente por sanadores para el tratamiento de infecciones respiratorias agudas. Se utilizó diluciones de los extractos para evaluar la actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar Kirby-Bauer modificado frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Escherichia coli* (ATCC 25922); *Pseudomona aeruginosa* (ATCC 27853); *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883); y el hongo *Cándida albicans* (ATCC 26790); pero no se obtuvo un resultado esperado. (17)

Se considera de importancia, determinar la utilidad de las plantas medicinales de cada región, perteneciente a Ecuador para conocer el grado de amenaza y recuperar sus poblaciones si fuese necesario (16) pues muchas de las enfermedades han sido tratadas con medicina natural al ser estudiada las propiedades terapéuticas.

### **1.2.2. Formulación del Problema:**

¿En qué porcentaje los extracto de plantas *Urtica dioica L.*, *Ilex guayusa* y *Uncaria tomentosa* influyen en la actividad anti-biofilm frente a *Staphylococcus aureus*?

### **1.3. JUSTIFICACIÓN:**

En la región Andina las tasas de morbi-mortalidad por infecciones nosocomiales han incrementado, por ende existe una alta tendencia de automedicación por antimicrobianos de uso común, lo que conlleva al desarrollo resistencia bacteriana considerando importante determinar nuevos avances terapéuticos que contribuyan a una profilaxis anti-biofilm aprovechando las múltiples especies vegetales que las comunidades rurales aún la utilizan pero que sus propiedades fitoquímicas no están avaladas científicamente.

La literatura científica del país muestra escasas investigaciones en cuanto a la aparición de biofilm como un dilema de salud pública, esto se debe a la presencia de proteínas que coadyuvan a la adherencia para su formación, generando resistencia antimicrobiana y deficiencia en la inmunidad del huésped; por ello el presente estudio investigativo causa gran impacto a la sociedad y más aún al personal de salud de la zona central del Ecuador, al brindar un aporte sobre la eficacia de la actividad anti-biofilm de los extractos de *Urtica dioica L.* (ortiga), *Ilex guayusa* (guayusa) y *Uncaria tomentosa* (uña de gato) ampliando un arsenal terapéutico para mejorar, preservar y controlar el bienestar del paciente; es por ello que existe un compromiso para trabajar de manera adecuada y obtener excelentes resultado.

Según revisiones bibliográficas el uso de plantas medicinales para tratar diferentes dolencias surge desde los antepasados, ampliándola de generación en generación, por tal motivo al llegar a concluir el trabajo experimental se contará con

un valioso número de beneficiarios que presenten patologías diversas, sean pacientes hospitalizados/inmunocomprometidos de la localidad, del país y porque no extenderlo a nivel mundial un trabajo ecuatoriano de excelente calidad, presentando productos naturales novedosos a costos reducidos y con menos efectos secundarios.

#### **1.4. OBJETIVOS:**

##### **1.4.1. Objetivo General:**

- Determinar la actividad anti-biofilm de los extractos de plantas *Urtica dioica L.*, *Ilex guayusa* y *Uncaria tomentosa* en *Staphylococcus aureus*.

##### **1.4.2. Objetivos Específicos:**

- Obtener los extractos de plantas *Urtica dioica L.*, *Ilex guayusa* y *Uncaria tomentosa* mediante el método de maceración.
- Evaluar la eficacia antimicrobiana de los extractos de plantas *Urtica dioica L.*, *Ilex guayusa* y *Uncaria tomentosa*.
- Determinar la actividad anti-biofilm de los extractos obtenidos frente a *Staphylococcus aureus*, mediante el ensayo en microplacas de 96 pocillos mediante la tinción con cristal violeta.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1. ANTECEDENTES CIENTÍFICOS:

Cruz Martínez, *et al.* de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca, en el año 2016, realizaron un estudio acerca de: **Distribución de genes de adhesión y regulación de biofilm en *Staphylococcus aureus*** mostrando los genes que codifican proteínas de adhesión para la formación de biofilm en cepas resistentes y sensibles de *S. aureus* tomando 106 aislados de muestras sólidas y líquidas del hospital de México, mediante el ensayo en placas de poliestireno con cristal violeta al 0,1% para determinar la formación de biofilm, utilizando como cepa de referencia a *S. epidermidis* ATCC 12228 como control negativo es decir no formando la capa de biofilm, obteniendo como resultado un 83% de la formación de biofilm para SARM, es decir el 50% de todas las muestras obtenidas eran formadoras y en cepas SASM el 28% eran formadoras de biofilm con un valor de significancia de  $p < 0,05$ . En el análisis mediante PCR se encontró 9 genes de adhesión y 2 de regulación de biofilm *icaA*, *icaD* destacando que la síntesis del polisacárido de adherencia intercelular (PIA) es importante para la producción de exopolisacáridos mediada por los *locus* en mención; adicional se describe que para SASM la formación de biofilm esta mediana por PIA dependiente a diferencia de SARM por PIA independiente, es decir requiere o no la proteína para su formación. (18).

Shukla & Bhatena, del Departamento de Microbiología en India, realizan una investigación en el año 2015 en búsqueda de nuevos agentes anti-biofilm denominada, **Sustained release of a purified tannin component of *Terminalia chebula* from a Titanium Implant Surface Prevents Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus***; para lo cual se trabajó con tres aislamientos codificados como: SaK1, MR2 y

MR3 de *S. aureus*, tomadas del hospital KEM, donde dos de las tres cepas ya presentaban resistencia a la Meticilina mediante el método modificado de Peng *et al.* (2011) para medir los efectos de las concentraciones sub-inhedoras (SCI) de la Fracción 7 (*Terminalia chebula*) en la formación de biofilm en un material de implante de titanio, teniendo una CMI muy baja de 0.015625; los resultados reportan que hay una reducción de la formación de biofilm más del 90% en los aislamientos SaK1 y MR2, mientras que en MR3 era aproximadamente 60% a la misma concentración indicando que en los 3 aislamientos inhiben la formación de biofilm más del 50%. Estos hallazgos indican que la Fracción 7 puede inhibir formación de biofilm en una superficie de implante, incluso en concentraciones muy por debajo de las CIM y es por lo tanto un buen agente anti-biofilm. (19)

Sarkar *et al.* de la Universidad de Jadavpur en India, en el año 2014 realizan un estudio acerca de **Anti-biofilm activity of Marula, a study with the standardized bark extract**, considerando a la marula como medicina alternativa para el tratamiento de diarrea, disentería y otras infecciones leves por lo que analizan la importancia de la actividad anti-biofilm frente a *P. aeruginosa*, donde el mayor interés de la investigación fue combatir la emergencia de la resistencia antimicrobiana a menudo asociado con biofilms bacterianos evaluando con el ensayo de cristal violeta 1% y removido con ácido acético glacial 33% y una Densidad Óptica (OD) de 492 nm, donde el extracto metanólico de la corteza de *Sclerocarya birrea* produjo una reducción de 41.27, 63.21, 75.43 y 87.45% respectivamente a concentraciones (25, 50, 100 y 200 mg/mL) en biofilm producida por *Pseudomonas aeruginosa*, además se incorporó al ensayo ciprofloxacina, conocida por inhibir la formación de biofilms, a una concentración sub-letal mostrando una mejor actividad anti-biofilm (58.35%; 0.125 µg/mL)(20).

Torstein Grønseth *et al.* en el año 2017 publican en International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, el estudio sobre: **Lugol's solution eradicates Staphylococcus aureus biofilm in vitro.**, teniendo como objetivo primordial: evaluar la eficacia antibacteriana contra la formación de biofilm de la bacteria, se trabajó con 30 cepas hospitalarias, el ensayo se realizó en una placa de microtitulación de 96 pocillos midiendo la densidad óptica en 595 nm. arrojando los siguientes resultados:



al aplicar la solución de Lugol a una concentración de 1% se redujo significativamente la formación de biofilm en las 30 cepas, a una concentración de 0.1% se evidenció una reducción significativa (30/30), y a una concentración 0.05% (26/30) concluyendo que llegan a inhir eficazmente frente a biofilm de *S. aureus* pudiendo ser una alternativa a los antibióticos tópicos, lo que no sucedió con el ácido acético y bórico. (21).

En China el Dr. Xiaolin Chen *et al.* de la Escuela de Ciencias, en el año 2015 destacan su investigación sobre: **Ethanol extract of *Sanguisorba officinalis* L. inhibits biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an ica-dependent manner**, principalmente por las propiedades terapéuticas atribuidas a *Sanguisorba officinalis* L. para el tratamiento de quemaduras, escaldaduras y hemorragias internas, por ello en su artículo evaluaron el efecto antibacteriano frente a una cepa denominada SA3 en leche de vaca que presentaba mastitis mediante el crecimiento y la capacidad de formar biofilm, dando como resultado que con el aumento en la concentración de *S. officinalis* L., la tasa de supervivencia de la cepa SAR3 SARM disminuyeron. Cuando la concentración de *S. officinalis* alcanzó 10 mg/mL de CMI, la tasa de supervivencia de las células disminuyó al 10%. Estos datos indicaron que *S. officinalis* tiene actividad antibacteriana contra *S. aureus* pero solo en altas concentraciones. De igual forma para conocer si *S. officinalis* tiene actividad anti-biofilm se realizó ensayos biofilm, luego de la coloración con cristal violeta se evidenció que las cepas del grupo de control sin extracto de etanol de *S. officinalis* formaron biofilms claramente, mientras que con el aumento de la concentración de *S. officinalis* la formación de biofilms de la bacteria disminuyó significativamente, y cuando la concentración de *S. officinalis* alcanzó 5 mg/ml, no se erradicó totalmente el biofilm. (22).

En la Universidad Estatal de Maringa, Alessandra Marjorie de Oliveira *et al.* en el año 2018 publican el artículo: **Inhibition and removal of staphylococcal biofilms using *Moringa oleifera* Lam. aqueous and saline extracts**; donde el objetivo principal fue evaluar la actividad del extracto de moringa (*Moringa oleifera* Lam) frente a la formación de biofilm de *S. aureus* en cepas aislados de una industria láctea (SAE4, SS5) y *S. aureus* ATCC 292913 como cepa control dentro de 24 y 48 horas, se evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos acuosos y salinos de *M.*

*oleifera* donde la concentración de 3.125 µg/mL fue la concentración mínima que fue capaz de eliminar los aislados de los biofilm maduros, con una disminución en los recuentos de células viables alrededor de 2 log CFU/9cm<sup>2</sup>, es decir el  $\geq 50\%$  en *S. aureus* y más del 65% en estafilococos coagulasa negativo. (23).

Otra investigación realizada por Amir Modarresi-Chahardehi *et al.* de la Universidad de Malaysia en el 2012 denominado: **Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*** usada tradicionalmente como medicina herbaria en Asia. Se lo realizó a partir de nueve extractos crudos que fueron preparado con diferentes disolventes orgánicos, obtenidos a partir de dos métodos de extracción: el extractor Soxhlet (Método I), que incluía el uso de cuatro solventes con acetato de etilo y hexano, o las particiones secuenciales (Método II) con un sistema de cinco solventes (butanol). Se probaron las actividades antibacterianas y antifúngicas de extractos crudos contra 28 bacterias, tres cepas de levadura y siete aislamientos de hongos. La amoxicilina se usó como control positivo para cepas de bacterias, y metanol puro (v/v) como control negativo. El extracto de acetato de etilo y hexano del método de extracción I (EA I y HE I) mostraron la mayor inhibición contra algunas bacterias patógenas tales como *Bacillus cereus*, MRSA y *Vibrio parahaemolyticus*. El estudio mostró que 47.06% de los extractos inhibieron Gram-negativos y 63.63% inhibieron bacterias Gram-positivas; además, la frecuencia de actividad antimicrobiana fue 13.45% es decir el 21.71% pertenece a los extractos de actividad antimicrobiana del método de extracción I y 6.82% del método de extracción II. Sin embargo, los extractos brutos del método I exhibieron mejor actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram-positivas que las bacterias Gram-negativas. (24).

Saraswathi *et al.* en un estudio realizado en el Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad VIT, India, denominado **Biofilm inhibition formation of Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* mutans, photocatalytic activity of azo dye and GC- MS analysis of leaves of *Lagerstroemia speciosa***; la investigación se realizó para analizar los compuestos bioactivos de la hoja de los extractos de *L. speciosa* por cromatografía de gases y espectroscopía de masas (GC-MS) pues los aborígenes utilizaban las decocciones de hojas como medicina tradicional para mejorar la condición hiperglucémica en Filipinas, además que tiene propiedades como

anticonceptivo, antifibróticos, antidiarreicos y en la actualidad existen pocos estudios revelando su importancia para lo cual la actividad antibacteriana se evaluó frente a cepas clínicas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* y *Salmonella typhi* mediante una técnica de difusión de pocillos, posteriormente el ensayo biofilm realizado mediante cubreobjetos se observó la morfología del patógeno utilizando microscopía electrónica de barrido (SEM), se observa que el biofilm en *P. aeruginosa* se inhibió a  $93.0 \pm 2\%$  y  $91 \pm 2\%$  a mayor concentración respecto al ensayo de efecto antimicrobiano ( $1000 \mu\text{g/mL}$ ) para extracto metanólico y etanólico respectivamente, por lo tanto se revela el efecto anti-biofilm debido a los fitoconstituyentes presentes en la hoja de los extractos.(25).

Ruiz *et al.* del Instituto de Investigación en Química Biológica, UNMSM 2013, en su artículo denominado **ACTIVIDAD ANTIESTAFILOCÓCCICA Y ANTIBIOPELÍCULA DE LOS EXTRACTOS DE *Juglans neotropica* DIELS, *Piper lineatum* RUIZ&PAV. Y *Terminalia catappa* L.** trabaja con extractos etanólicos e hidroalcohólicos de 3 plantas medicinales peruanas, los microorganismos utilizados fueron las bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, presentando una actividad significativa frente a ambas bacterias, con una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 125 a  $500 \mu\text{g/mL}$  para *Staphylococcus aureus*, teniendo mayor actividad el extracto etanólico de *Juglans neotropica* Diels, y de 250 a  $500 \mu\text{g/mL}$  para *Staphylococcus epidermidis*, teniendo mayor actividad el extracto hidroalcohólico de *Piper lineatum*, en el estudio de la actividad antibiofilm se efectuó por el método de microdilución en placa modificado, utilizando cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* productoras de biofilm, donde solamente los extractos etanólicos e hidroalcohólicos de hojas de *Piper lineatum* L. poseen actividad significativa con CMIB de  $500 \mu\text{g/mL}$  para ambas cepas. (26)

En la ciudad de Machala, la autora Azuero *et al.* en el año 2016 publican en la Revista Ciencia UNEMI la investigación: **Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador**, con la finalidad de obtener extractos vegetales a partir de *Lippia citriodora* K. (cedrón), *Ambrosia artemisifolia* L. (altamisa), *Taraxacum officinale* Weber (diente de león), *Ageratum conyzoides* L

(mastrante), *Piper carpunya Ruiz & Pav* (guaviduca), *Borago officinalis L* (borraja), *Coriandrum sativum L* (cilantro), *Melissa officinalis L* (toronjil), *Cymbopogon citratus S.* (hierba luisa), *Artemisia absinthium L.* (ajenjo), *Momordica charantia L.* (achochilla) y *Moringa oleífera Lam.* (moringa), para evaluar el efecto antibacteriano y antifúngico fue uno de los objetivos de la investigación, se utilizó la técnica de difusión en agar, según la metodología descrita por Bauer *et al.* (1966) contra cepas Gram (+) *Staphylococcus aureus*; Gram (-) *E. coli* y *P. aeruginosa*, y para hongos *C. albicans* ATCC. Los resultados obtenidos muestran que todos los extractos metanólicos a excepción de *L. citriodora* y *A. conyzoides*, disminuye la acción bactericida. *L. citriodora* (cedrón) mostró un efecto antibacteriano mediano contra *E. coli* y *P. aeruginosa*; no obstante, *S. aureus* no presentó sensibilidad frente a el extracto de esta especie.(27).

De Araujo *et al.* del Centro de Investigación de Plantas Medicinales en el año 2015, reportan datos del artículo: **Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic activities of Terminalia fagifolia Mart. extract (EtE) and fractions (AqF, HaF y WSF)**, en este contexto, las especies de *Terminalia* han sido objeto de investigación para muchas actividades farmacológicas, con respecto a la actividad de anti-biofilm, después de haber realizado el ensayo con cristal violeta a 0,1% y enjuagados con agua destilada; la formación de la biofilm fue evaluada añadiendo 100 µL de etanol al 95% a los pocillos, y sometidos a una lectura espectrofotométrica de 630 nm, según Stepanovic *et al.* mostrando inhibición significativa de la formación del biofilm, con una reducción de más del 80% para algunas cepas, entre ellas *S. aureus*. Además señala que los EtE y fracciones mostraron una citotoxicidad moderada en la viabilidad de la línea celular NIH/3T3 y actividad antitumoral potencial en línea celular de cáncer de mama humano MCF-7. (28)

Santos *et al.*, de la Universidad de Ceuma, São Luís en el año 2017, publican un estudio: **Himatanthus drasticus Leaves: Chemical Characterization and Evaluation of Their Antimicrobial, Antibiofilm, Antiproliferative Activities** teniendo como objetivo analizar actividad antimicrobiana, anti-biofilm, citotoxicidad y los potenciales antiproliferativos del extracto y las fracciones de las hojas de *Himatanthus drasticus* que en Brasil lo utilizan para tratar inflamación, gastritis,

úlceras, cáncer e incluso infertilidad; contra varias especies bacterianas como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* y *Klebsiella pneumoniae*, al realizar el ensayo biofilm producida por *K. pneumoniae* todas las muestras fueron capaces de inhibir significativamente la producción de biofilm después de 24 horas de tratamiento, los mejores resultados se observaron con una concentración de 1560 µg/mL. Concluyendo que hay una mayor reducción en la formación de biofilm con fracción extracto hidroetanólico de *Himatanthus drasticus* (HDHE) con aproximadamente el 50%, mientras que en las fracciones HDEAF y HDBF mostraron valores inhibitorios que van desde 28.73% a 53.4% respectivamente. (29)

Kanaan *et al.* del Departamento de Vida y Ciencias de la Tierra de la Universidad Lebanese, en el año 2016 publican: **Screening for antibacterial and antibiofilm activities in *Astragalus angulosus***, evaluando sus posibles actividades antibacterianas in vitro y anti-biofilm contra tres Cepas bacterianas Gram-positivas; *Staphylococcus epidermidis* (CIP444), *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), y *Enterococcus faecalis* (ATCC29212); además de dos cepas Gram-negativas, *Escherichia coli* (ATCC35218) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), luego del ensayo para la formación de biofilm y seguido del tratamiento de los extractos, se concluye que la mayoría de los extractos fueron capaces de erradicar > 50% de biofilm preformada de *S. epidermidis*, donde se obtuvo la mayor actividad con fracción de flor extraída en agua, logrando un 67.7% de erradicación de biofilm a una 0.2 mg/mL CIM. Otros extractos siguieron el mismo patrón, como etanol flor (~ 62.5% a 0.4 mg/mL). Por otro lado, se evidenció que el tallo verde (fracción etanólica) tiene mejor eficacia de erradicación en concentraciones más altas (~ 56.5% en 701.3 mg/mL) y lo mismo ocurre con hojas en estado etanólicas. (30)

## **2.2. FUNDAMENTO TEÓRICO.**

### **2.2.1. Plantas de uso medicinal en el Ecuador.**

#### **2.2.1.1. Generalidades.**

A lo largo del tiempo, el país ha venido recopilando información de la biodiversidad donde José Mejía Lequerica podría ser considerado el padre de la botánica (1775-1813) del Ecuador, pues sus primeros estudios están basados en la utilidad médica de las plantas de la región andina lo que le cataloga un país multidiverso en etnobotánica con más de 5172 especies vegetales distribuidos en los bosques andinos, tropicales subtropicales, donde el 60% lo utilizan como medicina ancestral, el 30% comestible, el 20% para actividades sociales lo que significa que son múltiples los usos que se les atribuye para de alguna forma contribuir al bienestar y supervivencia del hombre.(31)(32)

Al término del siglo XX se ve la importancia de investigar en las propiedades terapéuticas de plantas medicinales que por años han aliviado las dolencias pero sus estudios aún no eran verificados. El Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología (DENAREF) demuestra una colección de 190 germoplasmas de los cuales 32 aún están en proceso de identificación taxonómica. (6).

La información etnomédica en los Andes ecuatorianos de acuerdo a la relieve, clima, suelo y vegetación cuenta con un registro 255 especies tomado como referencia los bosques naturales y áreas protegidas, siendo plantas nativas el 78%, 16.7% introducidas, y tan solo 5.1% endémicas, constituyendo el 64% del total de la vegetación del Ecuador (31); estudios muestran que más de 80 plantas son usadas en caso de inflamaciones, 32 para la circulación, 29 especies para dolores estomacales, 16 para resfríos, 14 de manera cicatrizante. En el mismo estudio muestra dos especies de ortiga conocida científicamente como *Urtica dioica L.* a la ortiga chagra, es una planta medicinal que los ancestros la utilizaban para tratar afección de nervios, cefalea, bronquitis, circulación, artritis, limpiados, inflamación; mientras que la *Urtica leptophylla Kunth* u ortiga macho tiene dos procedencias es silvestre y medicinal se le atribuye propiedades fortificante, artritis, circulación, inflamación, limpiados, cefalea,

corazón, nervios y resfrío según lo afirman Mazón & Castillo, en el año de 1997. (6) (33) (32)

Las plantas medicinales del Ecuador para ser utilizadas se encuentran agrupadas por categorías de acuerdo a los desórdenes que presentan los pacientes siguiendo la clasificación de Cook en 1995, como se muestra en la Figura 1. donde la mitad pertenecían a dolencias que afectaban a los diferentes sistemas u órganos y el resto era para dolencias no específicas incluidas síntomas, signos y síndromes.

<b>Respectivas a sistemas u órganos</b>	<b>Otras</b>
Desórdenes de la piel/tejidos subcutáneos	Anestésicos
Desórdenes del sistema circulatorio	Anormalidades
Desórdenes del sistema digestivo	Contravenenos
Desórdenes del sistema endócrino	Desórdenes de la gestación/parto/posparto
Desórdenes del sistema esquelético-muscular	Desórdenes mentales
Desórdenes del sistema inmune	Desórdenes nutricionales
Desórdenes del sistema metabólico	Heridas/lesiones
Desórdenes del sistema nervioso	Infecciones/infestaciones
Desórdenes del sistema respiratorio	Inflamaciones
Desórdenes del sistema sanguíneo	Tumores y cánceres
Desórdenes del sistema sensorial	Síntomas
Desórdenes del sistema urogenital	

**Figura 1. Categorías médicas de las plantas medicinales del Ecuador.(31).**

Adicionalmente las estadísticas muestran que las partes más utilizadas de las plantas con fines medicinales ocupan un 30% las hojas, el 10% la planta entera y el 6% las flores. (31)

<b>Parte usada</b>	<b>Número de reportes</b>
Hojas	4815
Planta entera	1628
Flores e inflorescencias	1048
Corteza	746
Tallo	722
Raíces	678
Frutos e infrutescencias	622
Exudados	499
Semillas	265
Órganos de almacenamiento	138
Plántulas/semillas germinadas	14
Esporas	1
Partes aéreas no especificadas	180

**Figura 2. Partes más utilizadas de las plantas medicinales del Ecuador.(31)**

### 2.2.1.2. Plantas de uso medicinal en la Región Andina

Las innumerables acciones farmacológicas de plantas medicinales catalogadas por los antepasados de la Región Andina hacen que continúe la búsqueda de nuevas alternativas para combatir infecciones o dolencias ocasionadas de forma natural o sobrenatural para complementar el manejo sostenible y la conservación de especies en la zona.

Según Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), dota de información importante acerca de plantas con poderes curativos de los Andes ecuatorianos pues más del 69% de plantas medicinales son útiles para tratar manifestaciones que el paciente puede o no mostrar; es así que para tratar **dolores estomacales** se utiliza en infusión la menta (*Mentha*), tomillo (*Thymus*), orégano (*Origanum vulgare*), hinojo (*Foeniculum vulgare*), hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), incluye además para **problemas respiratorios** el uso de la salvia (*Salvia officinalis*), borraja (*Borago officinalis*), flores de violeta (*Viola*), para la **fiebre** una afección frecuente en los niños y adultos es recomendable frotar la ortiga (*Urtica dioica*) por todo el cuerpo pues posee propiedades por su circulación, flores de cedrón (*Aloysia citrodora*), verbena (*Verbena litoralis*); para el tratamiento de la **diarrea** del total de especies se utiliza la guayaba (*Psidium guajava*), el jengibre (*Zingiber officinale*) y abuta (*Abuta grandifolia*); para problemas de **hemorragias** tomar zumo de ramas y hojas de ortiga (*Urtica dioica*), ruda (*Ruta graveolens*), flores de violeta (*Viola*), matico (*Buddleja globosa*); para **afecciones hepáticas** las plantas más utilizadas son manzanilla (*Chamaemelum nobile*), ruda (*Ruta graveolens*), orégano (*Origanum vulgare*) son las que destacan entre la lista de dolencias en la cual usan plantas medicinales reemplazando la medicina convencional. (6) (31) (34) (35).

### 2.2.2. Extractos Vegetales

Un extracto vegetal es el que permite obtener de una manera fácil el principio activo, es decir la parte con acción terapéutica de hojas, tallo, raíz, flores e incluso la parte total de las plantas medicinales.(36) Resultan de la maceración de las plantas a un determinado tiempo donde el principio activo pasa a un disolvente pudiendo ser alcohol o metanol y aceites según su polaridad, presentando bajo riesgo de toxicidad.



La OMS indica que más del 25% de fármacos comercializados son gracias a productos vegetales mismos que contienen principios vegetales puros y modificados. (37)(38).

#### **2.2.2.1. Método de Extracción**

Para la extracción se utiliza métodos y técnicas especializadas de acuerdo a las características fitoquímicas de la planta completa o partes específicas de ella, sean flores, hojas, corteza, raíces dependiendo del propósito de la investigación, por lo tanto son vertidas en diferentes solventes orgánicos y con menos reactividad como es el agua, glicerina, propilenglicol, alcohol etílico que es el más eficaz para conservar la mayoría de metabolitos secundarios del material vegetal que varía según su polaridad, posibles beneficios y los metabolitos que se desee extraer de la materia prima. Para proceder a analizarlo, se realiza primero una evaporación a presión reducida y se aplica además un protocolo de liofilización, fraccionamiento, cromatografía líquida entre otros que permite conservar de mejor manera todos los principios obtenidos.

##### **2.2.2.1.1. Clasificación de acuerdo al método empleado:**

Consiste en extraer del material vegetal los principios activos disueltos en los líquidos que impregnan dichos tejidos, se puede realizar con una extracción continua en “Soxhlet” que permite extracción líquido- líquido a temperaturas superiores a la del ambiente, es posible recuperar el solvente después de la extracción utilizando el rota vapor; otro método es por “Reflujo” que consiste en colocar tanto el material vegetal como el disolvente en un balón que tiene acoplado un refrigerante y que a una temperatura adecuada 40° C, el solvente empieza a evaporar hasta obtener únicamente el extracto puro; finalmente destaca el método proporcionado por Tona *et al.* (1998) “Maceración” que consiste en dejar reposar a temperatura ambiente el material vegetal seco triturado en alcohol etílico 96% durante 2-14 días, es un método de elección cuando los principios activos pueden ser alterados por la presencia de calor, aire. (38,39)

##### **2.2.2.2. Mecanismos de Acción de los Extractos Vegetales**

Las características fitoquímicas de los extractos vegetales tienen la propiedad de atenuar la acción de bacterias, virus, hongos, levaduras patógenas que invaden al

humano, debido a la inhibición enzimática que priva los requerimientos necesarios para la supervivencia de microorganismo, según lo menciona Conner (1993), también intervienen de manera simultánea en el rompimiento de la membrana celular para interactuar entre enzimas y proteínas ocasionando un flujo contrario de protones entre ellas, afectando la actividad celular.

Una de las propiedades de los alcaloides provenientes de aminoácidos del extracto es causar una inhibición competitiva con el DNA de los microorganismos patógenos, inhibe la biosíntesis de ácidos nucleicos; así mismo se añade que los efectos de los compuestos fenólicos reducen la tensión superficial al momento de alterar su estructura y composición, ocasionando subsecuentemente la muerte celular y así atribuyéndole propiedades antimicrobianas, citotóxicas y anti-tumorales a varias especies de origen vegetal. (37,40)

### **2.2.2.3. Actividad antimicrobiana de los Extractos Vegetales**

Existe un importante número de plantas, hierbas y especies que en la actualidad se usan para controlar los microorganismos patógenos, pues las múltiples infecciones adquiridas en hospitales se ha convertido un problema de salud a nivel mundial, debido a ello se busca alternativas para disminuir la incidencia de resistencia a los antibióticos de uso común y como es de conocimiento los componentes activos de las sustancias vegetales son de acceso limitado en las entidades de salud por tanto estos aun no pueden desarrollar resistencia a los patógenos ni a su tratamiento antibiótico, llegando a la efectividad cuando los metabolitos secundarios de la planta actúan como mecanismo de defensa es decir sus propiedades quimioterapéuticas como fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas considerados como metabolitos secundarios, enzimas hidrolíticas y proteínas atacando diferentes sitios de las células microbianas inhibiendo el crecimiento de los microorganismos sin presentar efectos adversos, lo que les otorga propiedades antimicrobianas.(41) (38)

### 2.2.3. Descripción del Extracto Vegetal de Ortiga (*Urtica dioica L.*)



**Figura 3. Hoja de *Urtica dioica*.**

#### 2.2.3.1. Clasificación científica.

La ortiga mayor es científicamente denominada *Urtica dioica L.*, del género *Urtica*, de la familia Urticáceas. (42,43).

#### 2.2.3.2. Nombres comunes.

Se la conoce vulgarmente como Ortiga mayor, Ortiga negra, Ortiga Macha, Ortiga verde, Ortiga brava, mala mujer, pica-pica, pringamoza. (42)

#### 2.2.3.3. Descripción botánica

Es una plantas herbácea, perenne, de aspecto tosco que llega a medir de 50-150 cm., el tallo es algo rectangular, erguido, rojizo o amarillento, ramificado con una distribución de hojas ovaladas con un largo peciolo y terminadas en punta, sus bordes son muy dentados, llegando a medir hasta 15 cm. Chiej (1983), describe que a lo largo del tallo se presentan las flores pequeñas en racimo de color amarillentas, así mismo toda la planta está rodeada de pelos urticante, mismos que al tener contacto con la piel de los humanos produce picor debido al líquido irritante (acetilcolina) que presentan.(24,44)(45)

#### 2.2.3.4. Origen y hábitat.

Desde el principio de los tiempos, en el siglo XVI el botánico John Gerad utilizó la ortiga como antídoto para venenos y posterior a ello, el médico inglés Nicholas Culpeper la utilizó para tratar picaduras venenosas, en la actualidad se le atribuye

numerosas propiedades medicinales que ya están científicamente comprobadas. Se menciona que la ortiga es universal que crece en zonas altas y recorre desde Japón hasta los Andes.(46)(45)

En Europa es cultivada en abundancia por sus acciones medicinales, por eso crece de manera fácil en zonas de montaña como donde habita el hombre, bordes de camino, huertos, cercanías de viviendas, jardines, existen casos de que cría como mala hierba cerca de estercoleros, escombros y suelos que son ricos en nitrógeno que pueden ascender hasta 2 metros; es difícil encontrar ortiga en zonas vírgenes o poco contaminadas.

El crecimiento de ortiga regulariza la producción de hierro en el suelo pues esto ayuda a la producción de la clorofila de las plantas que crecen a su alrededor, crecen en suelos húmedos, templados, ricos en materia orgánica. (47)

#### **2.2.3.4.1. Partes más utilizadas**

##### **Hojas**

Las hojas tiernas pueden emplearse como cataplasmas o vendajes y las hojas frescas sirven para regularizar la digestión, eficaces para pacientes con reumatismo, gota, diabéticos, cálculos renales. (46)(45)

##### **Principios activos**

González (1988) menciona que las hojas tienen alto contenido en calcio, potasio, hierro, sílice, azufre por lo que es usada como remineralizante y antianémico. Adicionalmente es rica en vitamina A en forma de betacarotenos, vitamina B y C en pequeñas cantidades.

##### **Composición química**

- Clorofila, betacarotenos (2,5-3%)
- Provitaminas A,B,C y K
- Flavonoides (0,7-1,8%)
- Cumarinas
- Isoquercitrina (0,02%)

- Minerales (20%) como calcio, hierro, azufre, ácido sílico (0,9-1,8%), manganeso, sales potásicas (0,6%), cálcicas y nítricas.
- Mucílagos
- Ácidos orgánicos como gálico, fórmico y acético.
- Aminas: Histamina, Acetilcolina, Serotonina. (42,43)

## Raíz

El consumo de la raíz es eficaz contra la caída del cabello y la caspa y además por su alto contenido de calcio, silicio y hierro es recomendado para la tuberculosis, asma e hidropesía. Entre los principios activos se señala que son indispensables para eliminar el exceso de grasa en la piel y el cabello así como para problemas diarreicos por su alto contenido de taninos.(46)(45)

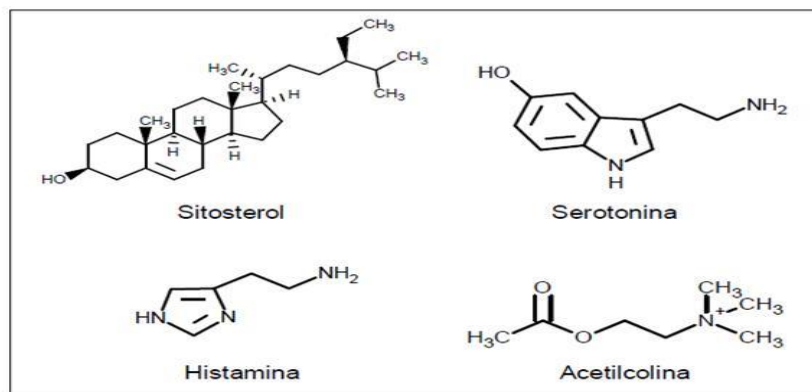
## Composición química

### TANINOS

- Fitosteroles (0,03-0,20%)
- Lectinas
- Lignanás
- Polifenoles

### POLISACÁRIDOS

- Glucanas
- Beta-glucósido (0,003%)
- Glucogalacturonanas.



**Figura 4. Metabolitos secundarios de *U. dioica* (48)**

### **2.2.3.5. Acciones Farmacológicas**

#### **Hojas**

- Se lo utiliza como diurético pues contribuye en la eliminación de cloruros, ácido úrico y urea por su alto contenido de clorofila y ácidos orgánicos eliminando agua y toxinas en la orina. (46)
- Antiadenoma prostático es otra propiedad, aumentando la eliminación de orina y por consiguiente mejora la sintomatología prostática benigna.
- Es vasoconstrictora ligeramente hipotensora. (44)
- Por el contenido de ácido acético en los pelos urticantes actúan en la coagulación de la sangre junto con el calcio, además interviene en procesos de metrorragia, dismenorrea, hemofilia y menopausia.
- Una de las propiedades comprobadas científicamente son ligeramente hipoglucemiantes; siendo depurativa y alcalinizante de la sangre. (35)
- Tiene propiedades antiinflamatorias que ayudan en el proceso sintomático de artritis, artrosis, osteoartritis.
- De uso externo es astringente y analgésico, se afirma que los usos medicinales están aprobados por la Junta Revisora de Productos Farmacéuticos.(46)(49)(45) .

### **2.2.3.6. Efectos adverso de la ortiga**

No se han evidenciado efectos secundarios en dosis recomendadas, pero si en pacientes con tratamientos a dosis altas o en estado crónico, es decir pacientes sumamente sensibles.

En ocasiones puede causar problemas digestivos como gastralgias, úlceras pépticas, problemas dermatológicos o urticaria causando edema cutánea, vesículas cutáneas y enrojecimiento por más de 12 horas. Está contraindicado en casos de pacientes con problemas diuréticos pues ayuda a aumentar la micción u oliguria. Pacientes con problemas diabéticos pues su consumo puede acentuar la acción de la glucosa.(44)(43)

#### 2.2.4. Descripción del Extracto Vegetal de Guayusa (*Ilex guayusa*)



**Figura 5. Hoja de *Ilex guayusa*. (50)**

##### 2.2.4.1. Clasificación científica.

La guayusa pertenece al género *Ilex*, de la familia *Aquifoliaceae*, su especie por tanto es *Ilex guayusa* (Loes) como se muestra en la Tabla 1.

<b>REINO</b>	<i>Plantae</i>
<b>CLASE</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>FAMILIA</b>	<i>Aquifoliaceae</i>
<b>GÉNERO</b>	<i>Ilex</i>
<b>ESPECIE</b>	<i>I. guayusa</i>

**Tabla 1. Clasificación Taxonómica de *Ilex guayusa*(51)**

##### 2.2.4.2. Nombres comunes.

Se lo denomina wais que es un vocablo shuar, wayusa, wayusa panka es en kichua, guayusa o guayusa de monte es un término utilizado en español. (31)

##### 2.2.4.3. Descripción botánica.

ProEcuador conjuntamente con la fundación Runa en el 2016 describen que los árboles de guayusa nativos de la región amazónica tienen a crecer aproximadamente 10 m. sin embargo existen otros que sobrepasan las medidas, presenta hojas simples, dentadas ligeramente, que pueden medir de largo hasta 16 cm. y de ancho hasta 6 cm. son verdes al igual que las flores que son blanca-verdosas. El cultivo alcanza la madurez cada 4 años.

#### 2.2.4.4. Origen y hábitat.

Se origina desde el sur de Colombia, hasta el norte de Perú y crecen a una altura de 200-2500 msnm. En Ecuador de acuerdo a los registros herbarios de Loja se encuentra en la región Andina como la Amazonía: Sucumbíos, Napo, Pastaza, Morona Santiago, Zamora Chinchipe, Pichincha y Tungurahua., su hábitat comprende bosques húmedo tropical con una temperatura de 18 a 26 °C, es cultivada en suelos con un pH de 4.3-5.0. (52)(53)

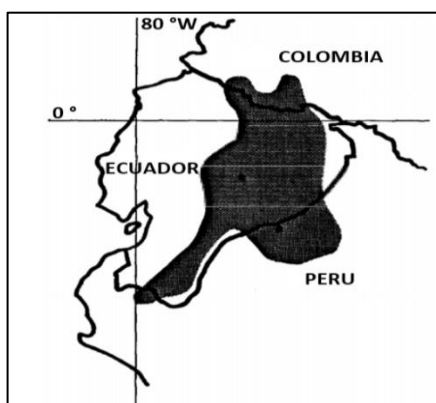


Figura 6. Distribución geográfica de *Ilex guayusa*.(51)

#### Producción de guayusa en el Ecuador.

Según estadistas en ProEcuador, (2016) la producción de guayusa es de gran interés por su alto contenido de cafeína de 2,9-3,8% que equivalen aproximadamente a 8 tazas de café. Es por ello que ha sido fuente de exportación para EE.UU. con un porcentaje de 99,39%, y a otras partes del mundo.

Fuentes de cafeína	Cantidad de cafeína (% cafeína en peso seco)
Hoja de Guaraná ( <i>Paullinia cupana</i> )	2,5 - 5,0 <sup>a</sup>
Hoja de Guayusa ( <i>Ilex guayusa</i> )	2,9 - 3,3 <sup>b</sup> 1,7 - 3,5 <sup>c</sup>
Hoja de Té ( <i>Camellia sinensis</i> )	2,0 - 5,0 <sup>d</sup>
Grano de Café robusta ( <i>Coffea canephora</i> )	2,2 - 3,0 <sup>e,f</sup>
Grano de Café arábica ( <i>Coffea arabica</i> )	1,0 - 1,5 <sup>f</sup>
Hoja de Yerba Mate ( <i>Ilex paraguariensis</i> )	0,5 - 2,2 <sup>g,h</sup>

Figura 7. Plantas con contenido de cafeína.(54)



#### **2.2.4.5. Análisis fitoquímico de la Guayusa.**

Los compuestos fotoquímicos son los principios activos que se encuentran dentro de una o varias partes de la planta y que causan un efecto dentro del organismo humano al ser ingeridas, Garcia-Ruiz, A. *et al.*, (2017) describe que se han identificado y cuantificado 14 nuevos compuestos fenólicos, siendo el ácido clorogénico y la quercetina-3-O-hexosa los principales representantes de los ácidos hidroxicinámicos y flavonoides, respectivamente. Se cuantificaron siete carotenoides, siendo la luteína el compuesto principal por su alta concentración, por tanto revelan que las hojas tienen un alto poder antioxidante. (55) Así mismo un estudio realizado por Carrión (2011) indica que a más de poseer gran cantidad de fenoles, es rica también en alcaloides, saponinas, cumarinas, flavonoides, azúcares reductores, terpenos, quinonas, esenciales para el humano de igual manera con acción antioxidante.(52)

##### **2.2.4.5.1. Composición química**

- Cafeína 3%
- Vitamina C y D, magnesio, calcio, zinc, potasio.
- Aminoácidos esenciales y ácido clorogénico que mantiene el peso y la salud cardiovascular.
- Antioxidantes que previenen el envejecimiento prematuro.
- Contiene además methylxantina alcaloidea, teofilina, teobromina.
- Por tanto es catalogado como un poderoso energizante. (54)

#### **Cafeína**

Es un alcaloide que pertenece al grupo de las xantinas, se considera psicoactivo a nivel mundial, pues actúa a nivel del sistema nervioso autónomo controlando el cansancio, es vasodilatador, es consumida también en casos de migraña y una dosis recomendada de 3 mg. contribuye al control de Alzheimer.(54)(56)

#### **Teobromina**

Pertenece al grupo de las xantinas y su acción es estimulante a nivel del SNA al igual que la cafeína pero en menores concentraciones, su uso es recomendable para problemas diuréticos, influye el ritmo cardíaco, procesos de somnolencia, reduce síntomas de la tos y gripe, más sin embargo el consumo excesivo produce un estado

de agitación. Junto con el ácido clorogénico y la cafeína ayudan al mejorar el cansancio físico y mental. (54).

Muestra	Cafeína	Teobromina	Polifenoles totales	Ácido clorogénico	Capacidad antioxidante
Guaraná	39,5 <sup>11</sup> mg/g	0,30 <sup>11</sup> mg/g	8,43 <sup>17</sup> mg/g	-	3,56 <sup>16</sup> mM trolox/g
Guayusa	26,05 <sup>2</sup> mg/g	0,56 <sup>2</sup> mg/g	54,86 <sup>4</sup> mg/g	24,10 <sup>4</sup> mg/g	1,54 <sup>4</sup> mM trolox/g
Té verde	3,9 <sup>1</sup> mg/g	-	20,69 <sup>8</sup> mg/g	0,29 <sup>3</sup> mg/g	2,07 <sup>8</sup> mM trolox/g
Café	<u>Arábica</u> B 30,70 <sup>13</sup> mg/g	3,10 <sup>14</sup> mg/g	<u>Arábica</u> c 19,84 <sup>15</sup> mg/g	<u>Arábica</u> A 68,77 <sup>12</sup> mg/g	<u>Arábica</u> B 0,25 <sup>13</sup> mM trolox/g
	<u>Robusta</u> B 58,20 <sup>13</sup> mg/g			<u>Robusta</u> A 88,04 <sup>12</sup> mg/g	
Yerba mate	19,22 <sup>7</sup> mg/g	4,84 <sup>7</sup> mg/g	13,46 <sup>8</sup> mg/g	28,0 <sup>5</sup> mg/g	1,50 <sup>6</sup> mM trolox/g

Figura 8. Contenido de propiedades fitoquímicas en diferentes plantas.(54)

#### 2.2.4.6. Acciones Farmacológicas del Extracto de *Ilex guayusa* (Loes).

En un *Boletín del Instituto de Investigación Botánica de la Universidad Central del Ecuador* muestra Barriga en 1975 que mediante un análisis cualitativo se comprobó que el extracto de guayusa reduce los niveles glucosúricos de pacientes diabéticos y por análisis cuantitativos se obtuvo que los niveles de glucemia disminuyen en un 20% al seguir un tratamiento con infusión de *Ilex guayusa*.

Tiene propiedades antioxidantes por tanto es capaz de combatir radicales libres, evitando el envejecimiento prematuro, es digestivo, expectorante, diurético, desinflama vías urinarias, próstata, actúa sobre problemas de infertilidad, regula la menstruación, es un potente energizante combatiendo el cansancio y fatiga mental, así mismo se considera que los compuestos fenólicos de guayusa son inhibidores de  $\alpha$ - $\beta$ -glucosidasa, mismas que están involucradas en el desarrollo de diabetes.(56) (54) (57)(55)

### 2.2.5. Descripción del Extracto Vegetal de Uña de Gato (*Uncaria tomentosa*)



**Figura 9. Corteza joven y madura de *Uncaria tomentosa*.**

#### 2.2.5.1. Clasificación científica.

Fue descrita por el botánico suizo Agustín Pyramé en el año de 1830 con el nombre de *Uncaria tomentosa*, perteneciente a la familia Rubiaceas originaria de Perú. (58–61)(62)(61)

#### 2.2.5.2. Nombres comunes

Los nombres populares varían en diferentes grupos amazónicos en base a las características externas de la planta principalmente a sus espinas y a la forma y tamaño de su tallo, en Panamá conocida como rangaya; en algunas zonas de Colombia como tua juncara o también bejuco de agua. En el Perú se le llama uña de gato, garabato o garabato amarillo, por el color de la corteza. (59);(63).

#### 2.2.5.3. Descripción botánica

La Uña de Gato es una planta trepadora de tronco leñoso y delgado que alcanza los 15 metros de altura. Sus tallos jóvenes están provistos de espinas curvadas en forma de uñas, que sirve para sujetarse a los árboles aledaños. Sus hojas son pecioladas, y recubiertas de una fina pelusa por el envés. Tiene flores de color amarillento que se reúnen en racimos. La cara externa de la corteza muestra rugosidad con estrías longitudinales, sin la presencia de musgo o líquenes; presenta un color café rojizo irregular, con zonas de color más oscuro y otras más claras, al igual que las partes interna e inferior. (61);(63);(60)

#### **2.2.5.4. Origen y hábitat**

Uña de Gato es una hierba curativa originaria del país sudamericano de Perú, entre 200 y 800 m.s.n.m. donde se encuentra la zona central pero se distribuye también a Brasil, Bolivia, Colombia, Nicaragua, Venezuela, Panamá, Guyanas, Trinidad y Ecuador. (59) (64).

#### **2.2.5.5. Análisis fitoquímico de *Uncaria tomentosa***

Lock, (1994) reporta los siguientes componentes:

- Alcaloides oxindólicos penta y tetracíclicos con propiedades inmunoestimulantes.
- Glicósidos del ácido quinóvico, con propiedades antiinflamatorias y analgésicas
- Triterpenos polihidroxiados.
- Polifenoles (Epicatequina, Procianidinas ).
- Esteroles.
- Taninos, actuando como estimulantes del mecanismo inmunológico.
- Flavonoides.
- Saponinas.
- Ácido ursólico y ácido oleanólico. (63) (64)(65)(66)

#### **2.2.5.6. Acciones Farmacológicas del Extracto de *Uncaria tomentosa***

De acuerdo con su composición de metabolitos secundarios cumple con funciones inmunoestimulantes pues activan el sistema defensivo inhibiendo a la vez procesos tumorales por lo que le atribuye propiedades antimutagénica y citostática; así mismo tiene acción antiinflamatoria mejorando problemas de inflamación de órganos internos; se la considera como depuradora del aparato digestivo y renal; inhibidora de la formación de trombos pues previene problemas cardiovasculares; tiene la capacidad de bajar y controlar los niveles de la presión sanguínea, ayuda a prevenir alergias, útil en caso de asma o bronquitis, es considerado un excelente equilibrante hormonal pues es utilizado para tratamientos de prostatitis y reguladora de las fases menstruales en la mujer. (61)(63) (64). (67)(65)

### **2.2.6. Biofilms**

Los microorganismos se presentan en la naturaleza en dos estados: planctónicos es decir que se encuentran aisladas, de libre flotación por tanto son más susceptibles a los factores adversos del medio; y las bacterias que se encuentran en colonias sésiles formando biomasas, biopelículas o biofilm, es decir tan solo el 1% viven en estado planctónico y el 99% formando biofilm. (68)

#### **2.2.6.1. Definición**

Teóricamente el biofilm toma renombre en el año de 1978, sin embargo en el siglo XVI Van Leeuwenhoek lo describe al observar la presencia de pequeños “animálculos” en la superficie de sus propios dientes; para el siglo XX Zobell *et al.* describen la capacidad de las bacterias acuáticas a adherirse a pequeñas superficies y con ello empieza el estudio de la adhesión bacteriana de microorganismos. (11,69) (70)(68)

En 2002, Donlan lo describe como: "una comunidad microbiana sésil, caracterizada por células que están adheridas irreversiblemente a un sustrato o interfase, o unas con otras, encerradas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que ellas han producido, y exhiben un fenotipo alterado en relación con la tasa de crecimiento y transcripción génica". (60)

#### **2.2.6.2. Composición**

Están estructurados por microcolonias sésiles que ocupan entre el 15-20% del volumen total, embebidas en una matriz extrapolimérica o denominada también glicocálix con canalículos bien marcados de agua ubicadas en su interior, ocupando el 75-80% permitiendo el flujo de líquido pues actúan a manera de un sistema circulatorio primitivo para el transporte y difusión de nutrientes y oxígeno a las bacterias.

Se la considera como una estructura completamente hidratada pues le corresponde a más del 95% de agua, tiene también exopolisacáridos (EPS) constituidos por propios microorganismos, y en pequeñas cantidades se encuentran proteínas, ácidos nucleicos, y diversos productos que proceden de la lisis bacteriana. Además, los EPS pueden estar asociados con iones metálicos y cationes bivalentes, lo que les permite interactuar con

distintos antimicrobianos, de forma tal que estos pueden quedar atrapados en la matriz sin capacidad para actuar sobre las bacterias.(68)(71)

Dependiendo del lugar de formación del biofilm, la matriz también se compone de materiales no bacterianos, como cristales de sales minerales, partículas de corrosión y/o de sedimento, o componentes sanguíneos. (11,68,69,72) (70)

### **2.2.6.3. Factores que intervienen en la formación de biofilms.**

#### **2.2.6.3.1. La Superficie**

Las propiedades físicas de una superficie pueden influir de manera simultánea en la adhesión microbiana, es así que la capacidad de adherencia aumente dependiendo de la rugosidad y amplitud de la superficie, a menudo las investigaciones arrojan resultados que la adhesión microbiana es más rápida en superficies hidrófobas como teflón y otros plásticos lo que no sucede sobre materiales hidrofílicos como el vidrio o metales.(11)

#### **2.2.6.3.2. Especies bacterianas**

Las bacterias son libres de colonizar y persistir en ambientes bióticos y abióticos a pesar de ser un proceso complejo, la versatilidad metabólica y la plasticidad genotípica, adicional de la presencia de fimbrias y flagelos y la producción de exopolisacáridos (EPS) influyen en la capacidad de las células microbianas para adherirse, es decir pueden adherirse fácilmente en superficies rugosas, muy hidrófobas, y cubiertas por una película, al contrario de las bacterias inmóviles que es más complicado y tardío su proceso de adherencia y la formación del biofilm. (11)

#### **2.2.6.3.3. Condiciones ambientales**

Se consideran importantes a los factores como el pH, conjunto de nutrientes, cargas iónicas, temperatura y fluidez en la adhesión bacteriana para la formación del biofilm, Ofek y Doyle mencionan que el incremento de la concentración de nutrientes en el medio está relacionado con el incremento del número de células bacterianas adheridas.(11).

#### **2.2.6.4. Etapas de formación:**

##### **2.2.6.4.1. Adhesión primaria**

Consiste en el primer encuentro que se da entre una superficie y una bacteria en estado planctónico, iniciando la formación de una película condicionante que se considera como un estado reversible. Un proceso activo es cuando la bacteria se acerca a la superficie rugosa, mediante corrientes de flujo, quimiotaxis o por movimiento de la propia especie bacteriana, inmediatamente se produce la unión mediante una interacción electrostática con fuerzas atractivas o repulsivas sumado a las condiciones medioambientales como el pH y la temperatura. (11)

Las bacterias Gram-positivas al ser inmóviles se define como una etapa de vital importancia a la participación de proteínas de superficie propias de la bacteria como es la proteína A que una vez que llegan a la superficie pueden desplazarse sobre ella mediante movimientos individuales o grupales y con ello iniciar el proceso de formación de biofilm.(73)

Por otra parte la adhesión es realizada de una forma pasiva mediante factores externos como la gravedad, difusión, precipitación de partículas y dinámica de fluidos con contribuyen a la adhesión de los bacterias, hongos, levaduras en cualquier superficie en condiciones óptimas.(73).

##### **2.2.6.4.2. Adhesión secundaria**

La producción de polímeros y apéndices extracelulares, es decir exopolisacáridos segregados por la misma bacteria es lo que le permite acoplarse de manera compacta a la superficie mediante ligandos específicos de receptores localizados en los pilis, fimbrias y fibrillas de la bacteria, llegando a ser un proceso irreversible donde el microorganismo patógeno queda firmemente unido a una superficie inerte. Se continúan con la unión de bacterias planctónicas unas con otras mediante la co-agregación así como a diferentes especies que ya estén unidas gracias a la co-adhesión, formando las llamadas microcolonias de sustrato.(68,73).

#### **2.2.6.4.3. Maduración**

El momento que las bacterias empiezas a dividirse activamente o en otras palabras a morir, comienza el proceso de maduración, pues la densidad y la complejidad del biofilm aumenta y se forma el glicocálix donde los compuestos extracelulares originados por las bacterias unidas interaccionan con las moléculas orgánicas e inorgánicas del medio, es decir se genera una estructura compleja con canales de agua, poros y redistribución de bacterias en el interior para el crecimiento de biofilm que sin lugar a duda llega a estar limitado por la falta de nutrientes, difusión de nutrientes hasta las células y la eliminación de los productos de desechos; más sin embargo existe un flujo hidrodinámico que atraviesa el biofilm favoreciendo su desarrollo sumado de otros factores que controlan la maduración como el pH, osmolaridad y las fuentes de oxígeno y carbono. (68)(11)(70)

#### **2.2.6.4.4. Desprendimiento activo**

Una vez alcanzado la maduración, el siguiente paso es el desprendimiento o liberación de bacterias resultantes de un biofilm o sustrato, debido a la necesidad de nutrientes o presencia de sustancias nocivas. Allison y colaboradores han demostrado que se genera un proceso biológico de desprendimiento y reducción de EPS en *P. fluorescens* luego de la maduración. Por tanto las células liberadas vuelven a su estado planctónico activas considerando a la formación de biofilm en un ciclo vital completo. (68,69,73)(71)

Esta liberación de bacterias se puede dar por 3 mecanismos: la erosión que es la remoción continua de pequeñas partes del biofilm; la separación es remoción rápida y masiva; y la abrasión una liberación por colisión de partículas suspendidas en el líquido circundante con el biofilm. (73)(11)(74)



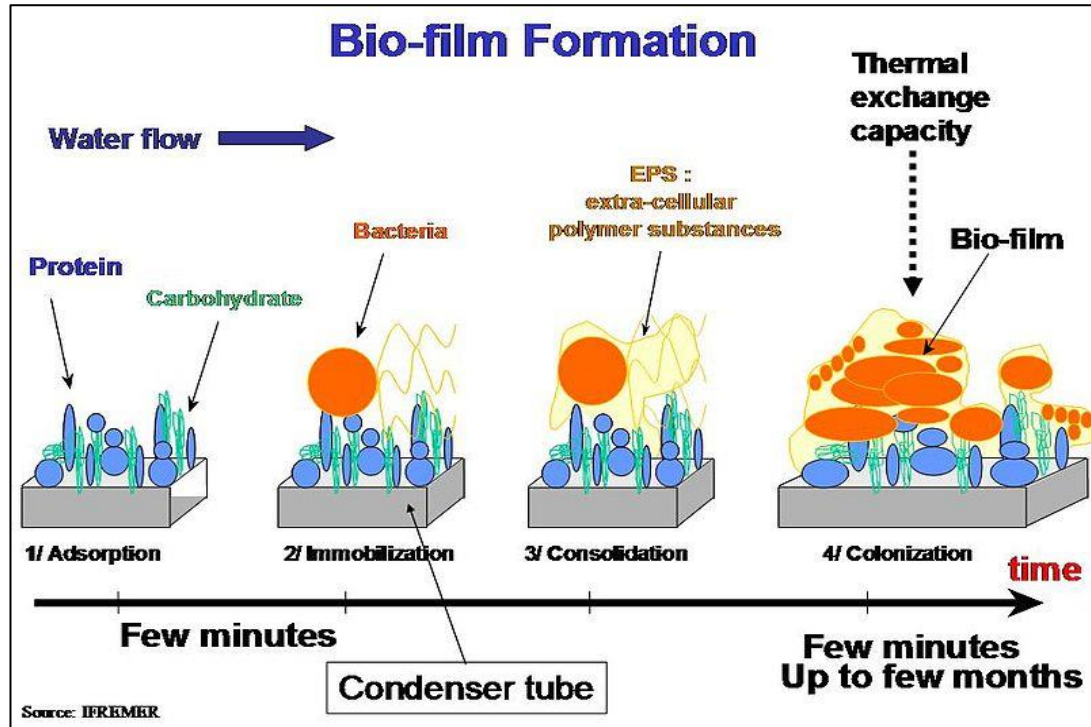


Figura 10. Etapas de Formación del Biofilm. (75)

#### 2.2.6.5. Biofilm está regulado por *Quorum Sensing*.

Recientes investigaciones demuestran que el proceso de formación del biofilm está sincronizada por una amplia cascada de reguladores denominado “*quorum sensing*” o autoinducción misma que van a ser independiente para cada bacteria.

Se describe *Quorum Sensing* a una interrelación que existe entre célula-célula, o aquellas señales químicas coordinadas que les permitan comunicarse entre ellas y es beneficioso para la bacteria pues les permite sentir la presencia de microorganismos vivos. Para bacterias gram-negativas el autoinductor es principalmente acilhomoserina lactona, mientras que en bacterias gram-positivas el autoinductor son péptidos, por tanto se describe que para *S. aureus* el péptido denominado RIP es quien inhibe un sistema de *quorum sensing* y el proceso de formación del biofilm. Así también Valle *et al.*, (2003) han demostrado que un regulador global de virulencia denominado SarA es esencial para el desarrollo del biofilm de esta bacteria. (68) (76)

#### 2.2.6.6. Actividad anti-biofilm

Las múltiples enfermedades causadas por bacterias formadoras de biofilms son en la actualidad un problema de salud a nivel mundial, es por ello que numerosas unidades investigadoras formulan estrategias para inhibir la adhesión primaria o secundaria mediante la alteración de la superficie de los microorganismos patógenos, así como en la innovación de productos o compuestos que rompan la compleja organización multicelular cuando las defensas del huésped no son capaces de resolver una infección y por consiguiente restituir la eficacia de los antibióticos.

Otra propiedad que puede ser beneficiosa son la existencia de enzimas que produzcan reacciones químicas que bloqueen la síntesis de la matriz del biofilm y el empleo de análogos de proteínas y péptidos señalizadores que interfieran con la comunicación célula a célula, indispensable para la formación de un biofilm. (68)(70)

#### 2.2.7. Staphylococcus aureus.

##### 2.2.7.1. Clasificación Científica

<b>Dominio:</b>	Bacteria
<b>Clase:</b>	Bacilli
<b>Orden:</b>	Bacillales
<b>Familia:</b>	<i>Staphylococcaceae</i>
<b>Género:</b>	<i>Staphylococcus</i>
<b>Especie:</b>	<i>S. aureus</i> Rosenbach (1884)

**Tabla 2. Taxonomía de *Staphylococcus aureus*.**

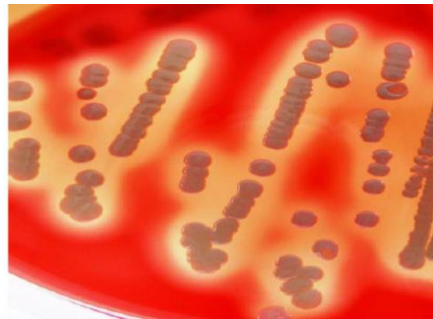
##### 2.2.7.2. Características Microbiológicas

El nombre del género fue designado por Alexander Ogston en 1883, agrupación que presentaban a manera de racimo de uvas, para describir a los cocos responsables de la inflamación y supuración; posteriormente Rosenbach en su obra "*Mikroorganismen beiden Wound-Infections-Krankheiten des Menschen*" la describe formalmente como una bacteria frecuente en las infecciones asociadas a heridas. (77) (78)

*Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo, teniendo afinidad por el cristal violeta en la tinción Gram, inmóviles, no forman esporas, alcanzan a medir hasta 1µm. de diámetro, se agrupan de manera irregular en racimos o tétradas, no tienen cápsula

aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son aeróbios y/o anaerobios facultativos.

Crece fácilmente en agar sangre o chocolate, agar cerebro-corazón (BHI) con la producción de hemólisis  $\beta$  en condiciones favorables, crece a una temperatura de 37°C, un pH próximo a su neutralidad, en altas concentraciones de NaCl por ser resistente al calor y a la desecación, obteniendo el crecimiento de colonias blancas-cremosas, lisas, brillantes y de bordes enteros en 24 h. y colonias amarillentas en un tiempo de 48-72 h, debido a la producción de carotenoides. (10)



**Figura 11. Colonias pigmentadas y  $\beta$ -hemolíticas de *Staphylococcus aureus* en un medio de agar sangre.(79)**

Son identificadas por la presencia de catalasa, coagulasa, DNasa POSITIVO y fermenta el manitol, también una prueba específica para su identificación es la presencia de la proteína mediante aglutinación con anticuerpos monoclonales, así como la detección del *clumping factor*. (40,41,80);(8)

### **2.2.7.3. Estructura de *Staphylococcus aureus***

#### **2.2.7.3.1. Pared celular**

Está conformada por peptidoglicanos que representa la mitad del peso de la pared celular dándole forma y estabilidad al microorganismo; teniendo actividad de tipo endotoxina, por lo que interviene de forma importante en la patogenia de la infección. Formada a su vez por los ácidos teicoicos que representan el 40 % del peso de la pared, que son polímeros compuesto por ribitol y N-acetil-glucosamina (polisacárido A), que median la unión de *Staphylococcus aureus* a las superficies mucosas mediante uniones específicas a la fibronectina. La proteína A se encuentra en la superficie de la pared

bacteriana y se unen a la porción Fc de IgG, inactivándola e impidiendo la fagocitosis, además se va hacia la superficie del estafilococo, recubriéndole y haciendo más difícil su reconocimiento por el sistema inmune.

#### **2.2.7.3.2. Membrana Citoplasmática**

Está formada por un complejo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono y sirve de barrera osmótica para la célula. Se menciona a su vez que existen algunas cepas de *Staphylococcus aureus* están recubiertas por una capa de polisacáridos externos, denominada *slime* o cápsula mucoide, que confiere, en ciertas condiciones, una mayor capacidad de adherencia, así como un aumento del efecto antifagocítico.

#### **2.2.7.4. Factores de Virulencia de la Bacteria**

Los factores de virulencia son moléculas producidas por bacterias que tienen la capacidad de provocar enfermedades en el ser humano. *S. aureus* produce muchos factores de virulencia, como proteasas, factores inmunomoduladores y toxinas tales como hemolisinas, enterotoxinas, leucocidinas, toxinas exfoliativas y adhesinas. (4)(77)(80)

##### **2.2.7.4.1. Toxinas**

Las toxinas alfa, beta, gamma y delta cumplen su función por acción de enzimas degradativas que se encuentran en la superficie celular y producen lisis celular. (81). Las Hemolisinas que son toxinas citolíticas que actúan en la destrucción tisular, especialmente de los eritrocitos, puede depositar fibrina en la superficie de los estafilococos alterando su ingestión por células fagocíticas o su destrucción dentro de estas células. Las enterotoxinas que suprimen la actividad de IgM aumentando la susceptibilidad de padecer un shock. Las enterotoxinas A causan envenenamiento por alimentos, y la F causa complicaciones similares al Shock Tóxico, provocadas por la toxina de su mismo nombre. Por otro lado se encuentra una proteína que destruyen a los leucocitos, Leucocidina que actúa interfiriendo en un importante mecanismo de defensa del huésped. Su producción está codificada principalmente en el cromosoma de la bacteria. La toxina Exfoliativa causa el síndrome de piel escaldada con la separación de tejido intraepidérmico. Considerado también como un factor de virulencia es la acción enzimática, dentro de ellos la Hialuronidasa es quien degrada

el tejido conectivo; la Estafiloquinasa que disuelve los coágulos de fibrina; Catalasa transforma el peróxido de hidrógeno en agua, la Lipasa degrada ácidos grasos de tejido cutáneo sano y la Coagulasa que puede depositar fibrina en la superficie de los estafilococos alterando su ingestión por células fagocíticas o su destrucción dentro de estas células. (81)(79)(8)(80)

<b>Determinante de Patogenicidad</b>	<b>Propiedades</b>	<b>Infecciones asociadas</b>
Componentes de la Pared Celular:	Activación del Complemento.	del Endocarditis, infecciones asociadas a prótesis y catéteres intravasculares, osteomielitis y artritis, Infecciones cutáneas invasivas, neumonías necrotizantes.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peptidoglicanos</li> <li>• Ácidos teicoicos</li> <li>• Proteína A</li> <li>• Cápsula mucoide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antifagocítica</li> <li>• Adherencia</li> </ul>	
Enzimas:	Formación de absceso	Destrucción tisular e infecciones metastásicas.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Coagulasa</li> <li>• Estafiloquinasas</li> <li>• Hialuronidasa</li> <li>• Lipasa</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Destrucción del coagulo</li> <li>• Invasión hística</li> <li>• Colonización</li> </ul>	
Toxinas:	Rotura de membrana celular.	Toxiinfecciones alimentarias, síndrome de <i>shock tóxico</i> , síndrome de la piel escaldada, impétigo y sepsis.
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemolisinas</li> <li>• Leucocidinas</li> <li>• Toxina exfoliativa</li> <li>• Toxina del Shock tóxico</li> <li>• Enterotoxinas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alteración de la permeabilidad celular de fagocitos.</li> <li>• Epidermólisis</li> <li>• Shock</li> </ul>	
	Intoxicación alimentaria.	

**Tabla 3. Fases de la patogenia de las infecciones por *Staphylococcus aureus* y factores de virulencia involucrados. (79)**

#### 2.2.7.5. Localización

*S. aureus* es un patógeno saprófito y pertenece a la microbiota normal del ser humano, a nivel mundial más del 50% de pacientes son portadores de este

microorganismo en fosas nasales y aproximadamente el 30% se encuentra en piel, manos, periné y tracto gastrointestinal.(8)

La colonización en personas sanas las hace más susceptibles a contraer infecciones de piel y tejidos blandos causando celulitis, impétigo, foliculitis, infecciones localizadas como otitis, sinusitis, mastitis, toxinosis. Es la principal bacteria involucrada en bacteremias e infecciones nosocomiales por su mecanismo de transmisión exógena por medio de tejidos contaminados como heridas o quemaduras, la introducción de aparatos biomédicos contaminados en tejidos como que más frecuentan. (8,82) (12)

#### **2.2.8. Biofilm de *Staphylococcus aureus*.**

Para la formación de biofilm, algunas cepas de *S. aureus* utilizan un polímero de N-acetil glucosamina (PNAG), también referido como Adhesina Intracelular de Polisacárido (PIA), que es sintetizado por el operón *ica*; sin embargo, no todas las cepas poseen dicho elemento genético. Cabe indicar que la presencia de deleciones en el operón *ica* no impide que la bacteria forme un biofilm, lo que indica la existencia de una vía independiente del operón *ica*. (4)

*S. aureus* expresa una variedad de adhesinas que le permiten unirse y colonizar un gran número de superficies diferentes. Según se ha descrito la presencia de un grupo de proteínas denominadas Bap (proteínas asociadas a biofilm) participan en este proceso, pues se encuentran ancladas en la pared celular y favorecen la unión de la bacteria al biofilm e interactúan con células vecinas. (83)

Además de los exopolisacáridos y las proteínas, los biofilms poseen ADN extracelular (eADN), y se ha establecido que su presencia proporciona estabilidad estructural al biofilm. Los mecanismos mediante los cuales el eADN se incorpora a la estructura del biofilm incluyen la lisis celular, la participación de hidrolasas de mureína, autolisinas y genes de fagos que permiten la transformación de una etapa lisogénica a una lítica. Se ha demostrado que los biofilms sometidos a tratamiento con ADNasa I afectan su estabilidad, resaltando la importancia de la presencia de este eADN en la arquitectura del biofilm. (4,72)

Indagaciones experimentales demuestran que las bacterias en estado planctónico se adhieren de manera reversible al cabo de minutos, llegan a formar colonias adheridas de manera firme al cabo de 2 a 4 horas, empiezan con la producción de exopolisacáridos como manera de protección a antibióticos, antisépticos en un tiempo de 6 a 12 horas, seguidamente según los requerimientos de crecimiento el biofilm madura siendo considerablemente resistentes a biocidas al tiempo de 2 a 4 días, completando el ciclo de formación y en caso de ser alteradas mecánicamente vuelven a desarrollar biopelículas al término de 24 horas, siendo esta vez más virulentas debido al intercambio génico. (74)

### 2.3. HIPÓTESIS

- **Hipótesis nula (H<sub>0</sub>):** Los extractos de *Urtica dioica L.*, *Ilex guayusa* y *Uncaria tomentosa* no presentan actividad anti-biofilm en *S. aureus*.
- **Hipótesis alterna (H<sub>a</sub>):** Los extractos de *Urtica dioica L.*, *Ilex guayusa* y *Uncaria tomentosa* presentan actividad anti-biofilm en *S. aureus*.

### 2.4. SEÑALAMIENTO DE LAS VARIABLES.

#### 2.4.1. Variable Independiente

Tratamiento para *Staphylococcus aureus*

- Con Extractos de *Urtica dioica L.*, *Ilex guayusa* y *Uncaria tomentosa*

#### 2.4.2. Variable Dependiente

Eficacia de la actividad anti-biofilm mediante los Extractos de *Urtica dioica L.*, *Ilex guayusa* y *Uncaria tomentosa*.

### **CAPÍTULO III**

## **3. MARCO METODOLÓGICO**

### **3.1. NIVEL O TIPO DE INVESTIGACIÓN**

#### **3.1.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN**

El presente trabajo investigativo se plantea un enfoque cuantitativo, tipo prospectivo, de corte transversal, exploratorio pues luego de apreciar una escasa información literaria se procede a desarrollar técnicas para evaluar la actividad anti-biofilm de los extractos de ciertas plantas medicinales por lo que se requiere una manipulación de las variables en el bioensayo a través de experimentos repetitivos para la obtención y comprobación de resultados frente a la cepa en estudio.

#### **3.1.2. NIVEL DE INVESTIGACIÓN**

**APLICADA.** Pues la investigación está realizada en base a una necesidad que presenta la zona en estudio, pues el uso y abuso de antibióticos incrementa las tasas de resistencia antimicrobiana, por lo que se busca alternativas terapéuticas para contribuir a la problemática de salud mediante el empleo de métodos experimentales.

### **3.2. MODALIDAD BÁSICA DE INVESTIGACIÓN**

**DE CAMPO:** Esta investigación nos permitió tener contacto directo con las plantas medicinales distribuidas en la zona central del Ecuador como es Tungurahua y Pastaza, mismas que de acuerdo a las condiciones botánicas establecidas se procedió



a su recolección, almacenamiento y transporte para su posterior extracción del principio activo y metabolitos secundarios.

**DE LABORATORIO:** en el presente estudio se realizó primeramente la obtención del extracto vegetal por el método de maceración, la liofilización para la conservación de los metabolitos de cada planta, la determinación de la actividad antimicrobiana en medios de cultivos y lectura de la formación del Biofilm y su actividad anti-biofilm frente a *S. aureus* en placas de microtitulación.

**DOCUMENTAL:** pues fue basada en la revisión exhaustiva de artículos en Sciencedirect, Redalyc, Elsevier, ProQuest, libros, tesis de grado y postgrado e internet con el propósito de conocer, ampliar y comparar los diferentes fundamentos teóricos, conceptos, metodología de varios autores sobre el tema para respaldar la parte científica de manera eficaz.

### **3.3. SELECCIÓN ÁREA O ÁMBITO DE ESTUDIO**

#### **DELIMITACIÓN TEMPORAL**

El estudio tiene una duración de 10 meses, realizándose en el periodo académico comprendido entre Marzo-Agosto 2018 y Septiembre 2018 – Febrero 2019.

#### **DELIMITACIÓN ESPACIAL**

Se realizó en los Laboratorios de Ingeniería en Alimentos la extracción y en el Laboratorio de Investigación de la FCS-UTA.

### **3.4. POBLACIÓN- DISEÑO MUESTRAL**

Para el presente estudio investigativo únicamente se trabajó con los extractos vegetales de tres plantas medicinales *Urtica dioica L.*, *Ilex guayusa* y *Uncaria tomentosa* pertenecientes a la zona central de Ecuador, Tungurahua con una latitud de (1° 14' 0" S, 78° 37' 0" W) y Pastaza (1° 4' 0" S, 78° 0' 4") para evaluar la actividad anti-biofilm frente a una cepa de *Staphylococcus aureus*.

### **3.4.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

#### **Criterios de inclusión**

- Tener el permiso otorgado por el Ministerio del Ambiente.
- Las plantas medicinales deberán cumplir con los parámetros botánicos de identificación para su recolección, almacenamiento y transporte.
- Extractos vegetales liofilizados viables para realizar el bioensayo.

#### **Criterios de Exclusión**

- No tener el permiso otorgado por el Ministerio del Ambiente.
- Las plantas medicinales no cumplan con los parámetros botánicos de identificación para su recolección, almacenamiento y transporte.
- Extractos no viables para realizar el bioensayo.

### 3.5. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

**VARIABLE INDEPENDIENTE:** Extractos de *Urtica dioica* L., *Ilex guayusa* y *Uncaria tomentosa*.

CONCEPTUALIZACIÓN	CATEGORÍA	INDICADORES	ÍTEMS	TÉCNICAS	INSTRUMENTOS
Obtenidos a partir de plantas medicinales utilizadas por los antepasados y que por su análisis fitoquímico se les otorga propiedades bactericidas o bacteriostáticas, útiles para el tratamiento de varias enfermedades según sea la concentración. (27)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Obtención de los extractos vegetales en estudio.</li> <li>• Actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Material vegetal seco.</li> <li>• Método de maceración por 7 días.</li> <li>• Difusión en agar Mülller Hinton.</li> </ul>	<p>¿Qué cantidad de extracto vegetal se obtendrá?</p> <p>¿Concentración del extracto para su análisis?</p> <p>¿Cultivo en agar de inóculo estandarizado de bacteria agregado extractos vegetales?</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estandarizar el inóculo a escala McFarland.</li> <li>• Liofilización de extractos vegetales para su conservación.</li> <li>• Resuspender extractos en PBS para el bioensayo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cuaderno de notas.</li> <li>• Protocolo de trabajo CLSI.</li> </ul>

**Elaborado:** Pamela Espinosa.

**VARIABLE DEPENDIENTE:** Actividad anti-biofilm en *Staphylococcus aureus*.

CONCEPTUALIZACIÓN	CATEGORÍA	INDICADORES	ÍTEMS	TÉCNICAS	INSTRUMENTOS
Tiene la capacidad de inhibir la adhesión primaria o secundaria mediante la alteración de la superficie de la bacteria, también mediante las reacciones enzimáticas que bloquean la síntesis del biofilm para resolver la infección y así restituir la eficacia de los antibióticos. (68)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Formación de Biofilm</li> <li>• Determinación de la actividad anti-biofilm</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cultivo en pocillos.</li> <li>• Coloración con cristal violeta</li> <li>• Lector de Equipo Víctor X3.</li> </ul>	<p>¿Cuántos <math>\mu\text{L}</math> de caldo (LB), extracto vegetal y cultivo, se colocan en cada pocillo?</p> <p>¿A qué OD se lee en el equipo?</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Observación.</li> <li>• Coloración de cristal violeta en microplaca.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cuaderno de notas.</li> <li>• Protocolo Lector de Elisa.</li> </ul>

**Elaborado:** Pamela Espinosa

### **3.6. DESCRIPCIÓN DE LA INTERVENCIÓN Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN.**

La presente investigación se realizó en los Laboratorios de la Facultad Ciencias de la Salud y FCIAL-UTA en el periodo Marzo-Agosto 2018; Septiembre 2018-Febrero 2019 y para cumplir con los objetivos de la investigación se procedió de la siguiente manera:

- Luego del permiso otorgado por el Ministerio del Ambiente, se seleccionó tres plantas de carácter medicinal pertenecientes a la zona central del Ecuador.
- Se procedió a la extracción de material vegetal por el método de maceración en etanol a 96%.
- Se congelaron las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$  para su conservación, mismas que fueron liofilizadas en el equipo Virtus *Sp.*, para posteriormente empezar el bioensayo.
- Vivificamos la cepa de *S. aureus* en caldo Luria Bertani y posteriormente se prefirió trabajar con un caldo de enriquecimiento Brain Heart Infusion (BHI) pues en los resultados se evita la presencia de un precipitado del extracto observado al trabajar con caldo LB.
- Procedimos a la formación de Biofilm en pre-cultivos en placas de microtitulación de 96 pocillos y por consiguiente el análisis en el equipo Lector Víctor X3 a una OD 595 nm.
- Correlacionar los resultados obtenidos para determinar la presencia de actividad anti-biofilm frente a *S. aureus*, de los diferentes extractos.

### **3.7. PROCEDIMIENTO**

#### **3.7.1. MÉTODO DE DESECACIÓN DE MATERIAL VEGETAL**

Se utilizó el procedimiento descrito por Marín & Rivas Morales (2015) con ciertas modificaciones; donde luego de la recolección de materia prima: *Urtica dioica* L., *Ilex guayusa* y *Uncaria tomentosa* pertenecientes a la zona central del Ecuador; Tungurahua y Pastaza, mismas que fueron evaluadas e identificadas por personal especializado, se tomó aquellas muestras que no presentaban alteraciones organolépticas, seleccionando únicamente las hojas frescas, corteza y raíz; se transportó

hasta el Laboratorio FCIAL-UTA para proceder a lavar con agua destilada, posterior a ello se colocó en la estufa para el desecado por 24 horas a una ventilación de 30%, con una temperatura de 40°C para una completa deshidratación. Seguidamente se tritura todo el material vegetal para ser pesado en la balanza mod:EQ-510, se realizó los cálculos para ver el volumen de etanol se debe poner para cada planta, en una proporción 1:15 (P/V), la proporción del material vegetal en el disolvente se conoce como una relación PESO (g)/VOLUMEN (mL) del extracto, lo que significa 1 parte de material vegetal en 15 partes de líquido (disolvente).

### **3.7.2. MACERACIÓN EN ETANOL 96%**

Todo el material vegetal triturado se coloca en recipientes ámbar que contienen etanol a 96%, se deja reposar por 7 días a temperatura ambiente y sin exposición a la luz solar, de acuerdo al protocolo establecido por Tona *et al.* (1998) con modificaciones. (84) Transcurrido el tiempo se procedió a la filtración al vacío (Equipo WELCH) del extracto vegetal con papel filtro Whatman #1, se realizó dos lavados para obtener todos los metabolitos de las plantas. Posteriormente se concentró en el rotavapor (ELEYA N-1100 Series) que para etanol trabaja a una presión reducida de 61 heptoPascal (hPa) y con una temperatura constante de 40°C. Una vez evaporado el disolvente, se midió el pH de cada extracto, soluto final de las plantas medicinales en un pHmetro (Thermo Scientific). Finalmente se almacenó los extractos en recipientes estériles y envueltos con papel aluminio, con el fin de evitar la degradación de los metabolitos del extracto y fueron llevados al Laboratorio de FCS para ser almacenados a -80°C y su posterior Liofilización (Virtis *Sp*), se los resuspendió en PBS1X, esterilizadas por filtración a través de un filtro de 0,22 micras (Millipore, USA) y conservadas a -20°C hasta su utilización.

### **3.7.3. PARA LIOFILIZAR LOS EXTRACTOS OBTENIDOS.**

Se coloca las muestras de extractos vegetales que están a -80°C en una cámara de vacío (equipo Liofilizador Virtis *Sp*), que trabaja a una presión reducida de 500 miliTorr (mT) y a una temperatura de -42°C que son las condiciones óptimas para que pueda ejercer su función al término de 24 horas, donde se produce una separación del agua por sublimación, esto para eliminar los agentes que descomponen el producto

con la finalidad de la conservación y preservación de características organolépticas y el contenido de los principios activos que presenten los extractos vegetales.

#### **3.7.4. PARA LA RECONSTITUCIÓN DE LA CEPA UTASABF001.**

La vivificación de bacterias se realizó bajo la metodología establecida por Pedroza *et al.* (2007) con ciertas modificaciones, iniciando por colocar 5 mL de caldo LB, recalando que luego se prefiere trabajar con un caldo de enriquecimiento Brain Heart Infusion (BHI) en dos tubos que servirán uno como control y otro para verificar el crecimiento de la bacteria, se toma con el asa de siembra las colonias formadas de una cepa de *S. aureus* formadora de biofilm codificada dentro del laboratorio como UTASAFB001 y se suspenden en uno de los tubos, se lleva a la incubadora (POL-EKO) y se incuban a 37°C por 24 h. El crecimiento bacteriano fue monitorizado en el equipo Nanodrop 2000 (Bio-Rad, USA) a una absorbancia de 600nm y ajustados espectrofotométricamente hasta que la suspensión bacteriana represente una absorbancia entre 0,08 y 0,1, equivalente al patrón 0,5 de MacFarland, para proceder a la siembra.

#### **3.7.5. PREPARACIÓN DE PRE-CULTIVOS PARA EVALUAR INHIBICIÓN BACTERIANA**

Del inóculo estandarizado se colocó 50 µL en agar Mueller Hinton en forma homogénea, mismo que ya se ha diseñado una especie de pocillos de 8 µm. de profundidad para que vaya insertado 10 µL de los extractos vegetales en estudio según la técnica descrita por Rojas J. *et al.* (2004) con modificaciones, se rotuló y se llevó a incubación por 24 h. a 37°C, transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a medir en milímetros los halos formados alrededor de cada pocillo impregnado con el extracto vegetal; posteriormente en una placa de microtitulación de 96 pocillos se colocó 100 µL de caldo BHI con un blanco, para el control positivo se añadió 80 µL de caldo BHI conjuntamente con 20 µL de la dilución bacteriana estandarizada 0,5 Mc Farland y finalmente el bioensayo se realizó con 80 µL de caldo BHI, más 100 µL de extracto vegetal y por consiguiente en diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32, más 20 µL de la dilución de bacterias en los demás pocillos obteniendo un volumen final de 100 µL. Se lee las absorbancias en un lector de placas Victor X3 (PerkinElmer) a un tiempo cero (0) con una OD de 595nm. A continuación se incubó la placa a 37 °C en una

atmósfera húmeda con tensión de oxígeno normal, para correlacionar las absorbancias luego de 24 h.

### 3.7.6. PARA LA FORMACIÓN DEL BIOFILM

Primeramente se realiza una lectura de absorbancias a 24 horas para verificar el crecimiento bacteriano y los controles, para posteriormente emplear la metodología descrita por Christensen *et al.* (1985) con modificaciones en las determinaciones cuantitativas, en la cual se elimina el cultivo de la placa de microtitulación decantando y el resto sobre papel absorbente, lavar 3 veces de manera cuidadosa con agua destilada H<sub>2</sub>O (d) para eliminar las bacterias no adherentes, dejar secar 20 minutos en incubación, añadir 100 µL de cristal violeta por pocillo e incubar a temperatura ambiente por 20 minutos; eliminar el contenido para lavar 3 veces con H<sub>2</sub>O (d) y así eliminar el exceso del colorante, poner 100 µL de etanol 96% e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos, cuantificar la actividad anti-biofilm a una OD595 nm, las pruebas se realizaron por triplicado.

Hay que tener en cuenta que se toma como colorante a cristal violeta 1% puesto que es una tinción simple que se une a moléculas de carga negativa en su superficie y a polisacáridos en la matriz extracelular, por lo tanto los resultados serán directamente proporcional a la formación del Biofilm. (85)(86)(87)

### 3.7.7. PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI-BIOFILM

Una vez realizada la lectura de absorbancias donde se utilizó como blanco el caldo BHI, como control positivo a BHI más *S. aureus* como formadora de biofilm y por consiguiente se incorporó al bioensayo, los pocillos los tratamientos a diferentes concentraciones. Para determinar la actividad anti-biofilm se aplicó la siguiente fórmula:

$$\mathbf{PF} = \frac{\mathbf{BFC} \times 100 \%}{\mathbf{C}} \quad \mathbf{PI} = 100 - \mathbf{PF}$$

- **C** = Biofilm formado por la cepa pura sin la adición de compuestos.
- **BFC** = Resultado de biofilm formado en presencia del compuesto.
- **PF** = Porcentaje de formación.
- **PI** = Porcentaje de inhibición.



## **PLAN DE PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN**

El bioensayo para determinar la actividad anti-biofilm fue realizado por triplicado y los resultados se expresaron como valores medios  $\pm$  error estándar de la media. La diferencia de los potenciales de inhibición de biofilm fueron evaluados por un análisis de varianza no paramétrico y una prueba post hoc de Tukey.

Se consideró un valor de  $p < 0.05$  como estadísticamente significativo.

### **3.8. ASPECTOS ÉTICOS**

El trabajo investigativo se llevó a cabo bajo la normativa otorgada por la Dirección de Investigación y Desarrollo (DIDE) de la Universidad Técnica de Ambato, quien fue el departamento encargado de la evaluación y el aval respectivo al estudio. Así mismo toda la experimentación estuvo regida a aquellos artículos relacionados al desarrollo sostenible, la biodiversidad para sujetar ña recuperación, conservación, protección de los saberes ancestrales reportados en la Constitución de la República del Ecuador (2018), donde se recalcan los expresados a continuación:

En el **Título II - Capítulo séptimo: Derechos de la naturaleza, que consta en el artículo 71.** menciona: “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”.

El **Título II - Capítulo cuarto: de los derechos de las comunidades, pueblos y nacionalidades, en el artículo 57.** se describe lo siguiente: “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”. Dentro del **Punto 12.** Se asegura el “Mantener, proteger y desarrollar los conocimientos colectivos; sus ciencias y tecnologías y saberes ancestrales; los recursos genéticos que contienen la biodiversidad biológica y la agrobiodiversidad; 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”.

De igual forma en el **Título VII – Régimen del buen vivir – Capítulo primero- inclusiones y equidad- Sección segunda- Salud. Art. 363.** El estado será responsable de: **Punto cuatro:** “Garantizar las prácticas de salud ancestral y alternativa mediante el reconocimiento, respeto y promoción del uso de sus conocimientos, medicinas e instrumentos”.

También se encuentran artículos importantes en el **Título VII- Régimen del buen vivir – Capítulo primero- inclusión y equidad – Sección octava: Ciencia, Tecnología, innovación y saberes ancestrales:**

**Art. 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: **Punto uno.** Generar adaptar y difundir conocimientos científicos y tecnológicos. **Punto dos.** Recuperar, fortalecer y potenciar los saberes ancestrales. **Punto 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”.

**Art. 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”.

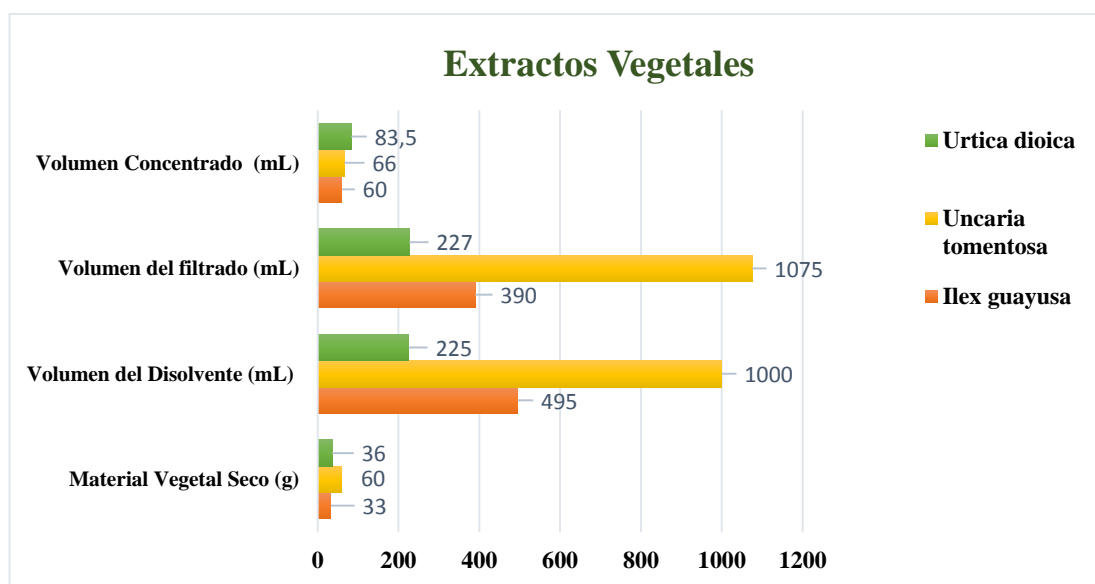
Como es de conocimiento para los integrantes del proyecto investigativo, la recolección y procesamiento de las plantas medicinales útiles para los ensayos, están regidos bajo los permisos sobre manejo de flora en investigación científica otorgado por parte del Ministerio del Ambiente de Ecuador correspondiente al **N°024-2018-IC-FLO-DNB/MAE.** (Anexo 3).

## CAPÍTULO IV

### 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 4.1. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

**Gráfico 1. Media del volumen concentrado de los Extractos vegetales *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa*, *Urtica dioica*.**



**Autora:** Pamela Espinosa C.

**Fuente:** Registro de Resultado de Laboratorio de Investigación, FCS-UTA.

#### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Aprovechando la diversidad de flora que posee el Ecuador y observando la capacidad que posee las plantas medicinales como alternativa de tratamiento de ciertas enfermedades infecciosas descrita dentro de los saberes ancestrales de nuestros antepasados, se procedió a la obtención de extractos etanólicos mediante la recolección

de hojas de *I. guayusa* y la corteza de *U. tomentosa* en la provincia de Pastaza (1°28'S 78°05'O), así como las hojas *U. dioica* de Tungurahua (1°10'33"S 78°33'19"O) para ser desecadas y maceradas siguiendo el protocolo establecido por Tona *et al* (1998) como se observa en el Gráfico 1. La media del volumen concentrado de cada uno de los extractos partiendo del material vegetal seco que se expresó 36 g para *U. dioica*, 60 g *U. tomentosa* y 33 g para *I. guayusa*, mismas que fueron disueltas en etanol 96% y luego de pasar por el Rotavapor (ELEYA N-1100 Series) se obtiene un volumen concretado de 83,5 mL para *U. dioica*, 66 mL de *U. tomentosa* y un valor superior para *I. guayusa* 66 mL, demostrando que existe una mayor concentración de metabolitos secundarios, de igual forma se midió el pH en un pHmetro (Thermo Scientific), reportando resultados neutros para extractos de *U. dioica* y *U. tomentosa* con un pH de 7,4 y 7 respectivamente, mientras que para el extracto de hojas de *I. guayusa* se muestra un pH de 5,6.

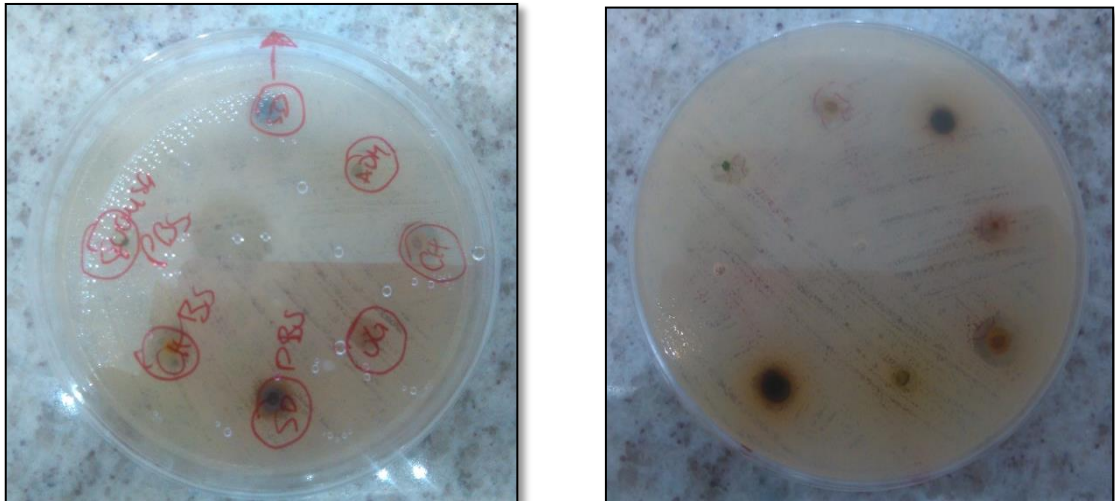
**Tabla 4. Ensayo de difusión en pocillo para cepa de *Staphylococcus aureus* frente a extractos de origen vegetal al término de 24 horas.**

CEPA	<i>I. guayusa</i>	<i>U. tomentosa</i>	<i>U. dioica</i>
UTASABF001	7mm	9mm	7mm

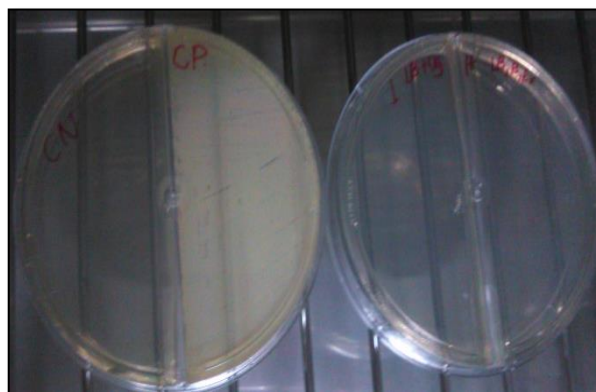
**Autora:** Pamela Espinosa C.

**Fuente:** Registro de Resultado de Laboratorio de Investigación, FCS-UTA.

**Fotografía 1. Prueba de sensibilidad para *S. aureus* con compuestos de origen vegetal, mediante la técnica de difusión en pocillo, al término de 24h.**



**Fotografía 2. Crecimiento bacteriano en agar Mueller-Hinton evaluando efecto bactericida de *U. tomentosa* frente *S. aureus*.**



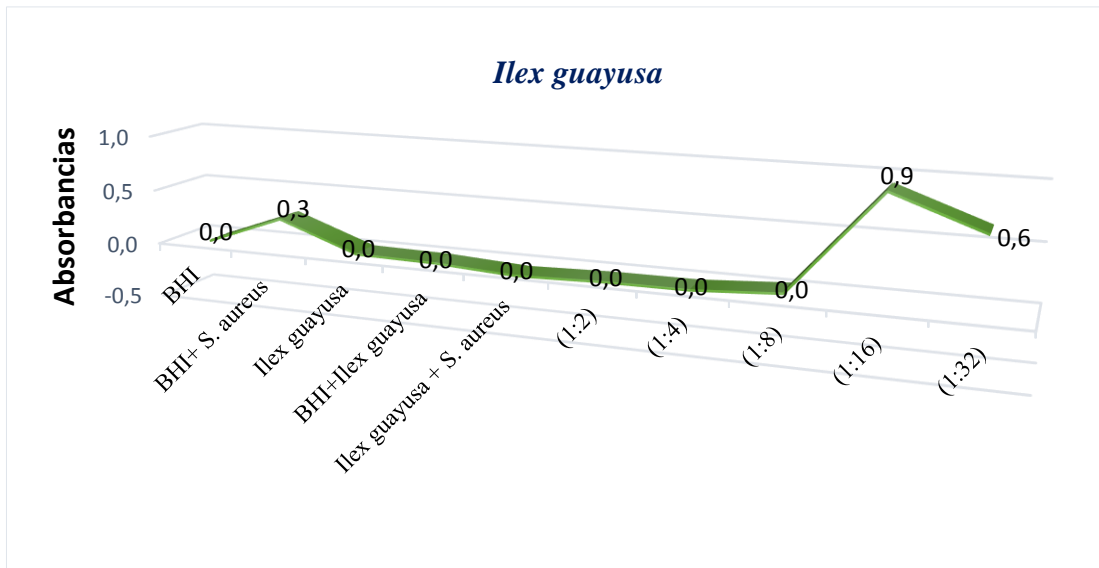
## ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Con la finalidad de determinar la actividad antimicrobiana de los extractos en estudio, fue necesario iniciar con una prueba de sensibilidad mediante la técnica de difusión en pocillo de 6 mm, misma que al añadir 10  $\mu$ L de cada extracto y al término de 24h podemos observar los resultados eficaces frente a la cepa de *S. aureus*, como se muestra en la Tabla 4. los valores de los diámetros medidos en milímetros (mm.) teniendo mayor significancia el extracto de la comúnmente conocida como uña de gato, como un control positivo se añadió un disco de 2 $\mu$ g Clindamicina dando un halo de 22 mm en comparación a las normativas CLSI (2018) (88), cabe indicar que el halo del extracto *U. dioica* no se evidenció claramente pues se observó la presencia de proteínas según muestran investigaciones anteriores que probablemente se menciona no hay presencia de colonias sino la precipitación del extracto(89), y en la Fotografía 1. se evidencia la formación de los halos de inhibición que fueron reportados anteriormente.

En la Fotografía 2. se observa un ensayo sobre el efecto bactericida para el extracto de *U. tomentosa* que fue quien presentó un halo de inhibición mayor comparada con los anteriores, que fue realizado en placas de microtitulación donde se aprecia que en el control positivo no muestra crecimiento bacteriano, el control negativo que es BHI más 20  $\mu$ L de bacteria, existe crecimiento y finalmente para la concentración 50 mg/mL en la dilución 1:2 tampoco se evidencia crecimiento, lo que no sucede en la dilución 1:4 y los posteriores.

**Gráfico 2. Determinación de efecto antimicrobiano según lectura de la Densidad Óptica (OD) para el crecimiento de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes concentraciones de los extractos vegetales *Ilex guayusa*, *Uncaria tomentosa*, *Urtica dioica*.**

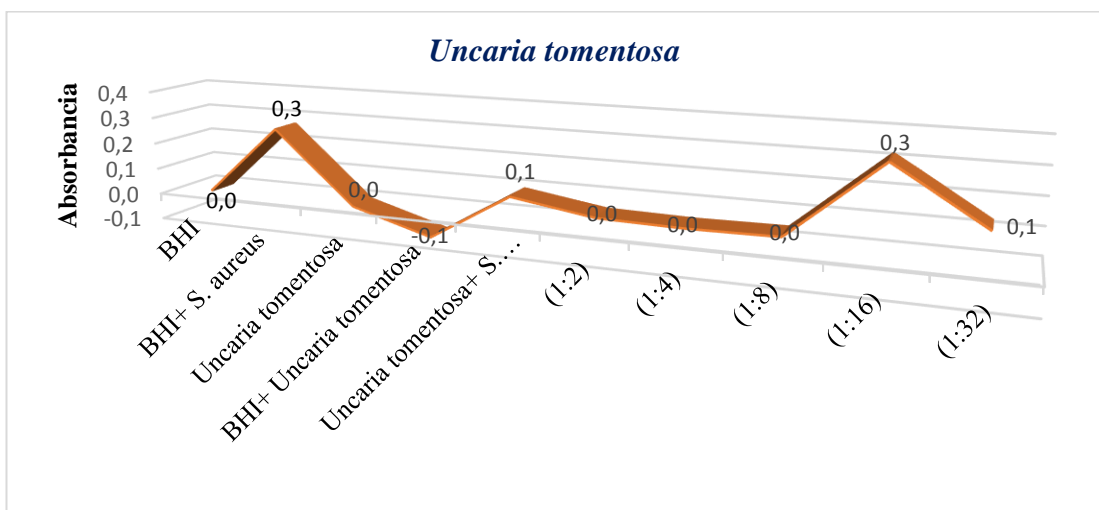
**2.1. Extracto etanólico de *Ilex guayusa***



**Autora:** Pamela Espinosa C.

**Fuente:** Registro de Resultado de Laboratorio de Investigación, FCS-UTA.

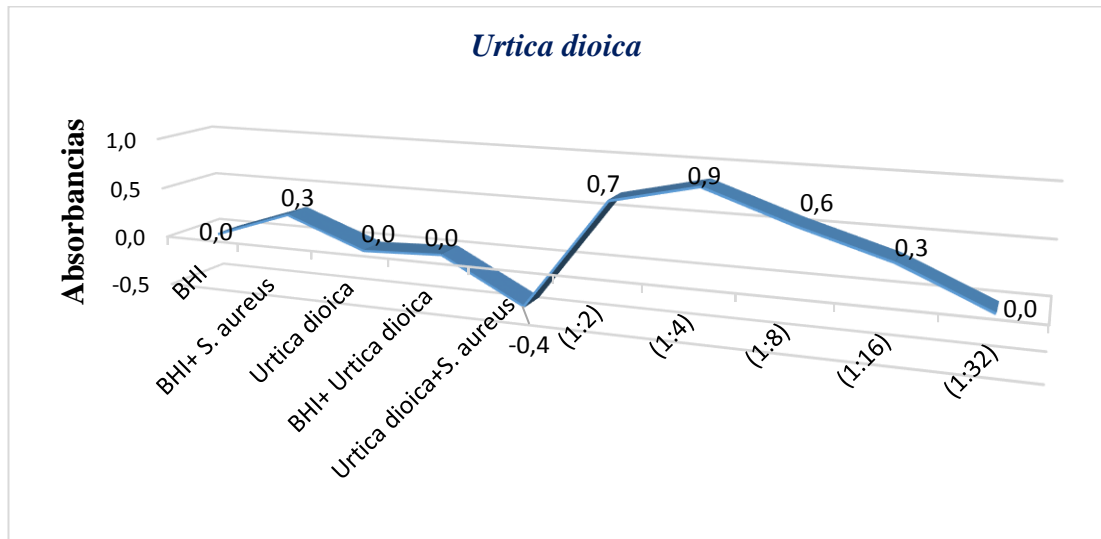
**2.2. Extracto etanólico de *Uncaria tomentosa***



**Autora:** Pamela Espinosa C.

**Fuente:** Registro de Resultado de Laboratorio de Investigación, FCS-UTA.

### 2.3. Extracto etanólico de *Urtica dioica*



**Autora:** Pamela Espinosa C.

**Fuente:** Registro de Resultado de Laboratorio de Investigación, FCS-UTA.

### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

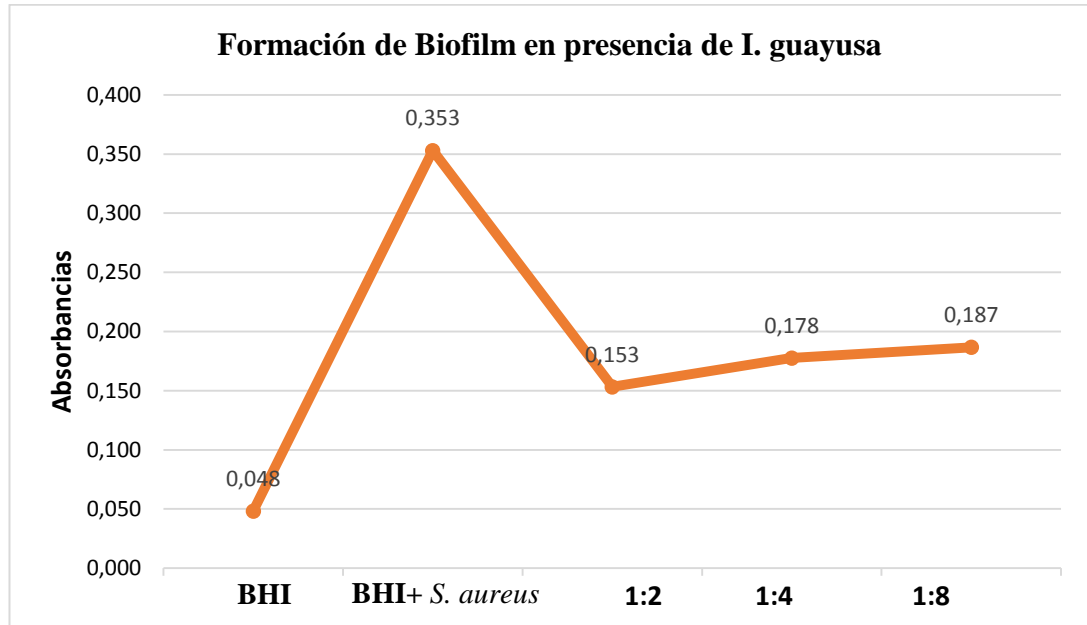
Una vez realizado el bioensayo en la placa de 96 pocillos, se ejecuta una lectura a tiempo cero en el lector de placas *Victor X3* (PerkinElmer) a una OD 595 nm. para corroborar los controles y el experimento en sí al término de 24 horas, de acuerdo a las Gráficas 2.1 y 2.2 nos permitieron establecer la actividad antimicrobiana mediante la concentración mínima inhibitoria para los extractos de *I. guayusa* y *U. tomentosa* en concentración de 80y 50 mg/mL respectivamente, donde el CIM para *I. guayusa* fue de 2mg/μL y para *U. tomentosa* 1,25mg/μL presenciando que hay una inhibición bacteriana.

Para el extracto etanólico de *U. dioica* se observan datos totalmente diferentes al resto, la Gráfica 2.3 muestra una relación que a menor concentración de extracto, mayor la inhibición bacteriana pues la presencia de un precipitado debido a la gran cantidad de metabolitos secundarios como calcio, hierro, potasio según menciona Gonzales (1998) hace que se presente una interferencia y dificulte la interpretación en cuanto a la eficacia de su actividad.



**Gráfico 3. Cinética del desarrollo de Biofilm de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes concentraciones de los extractos vegetales al término de 24 horas.**

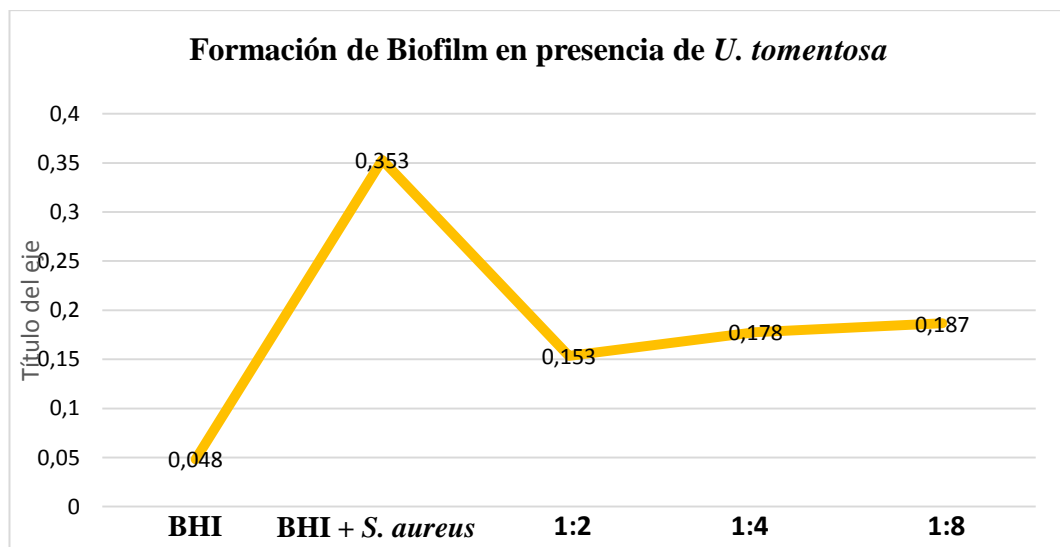
**3.1. Formación de Biofilm en presencia extracto etanólico de *Ilex guayusa***



**Autora:** Pamela Espinosa C.

**Fuente:** Registro de Resultado de Laboratorio de Investigación, FCS-UTA.

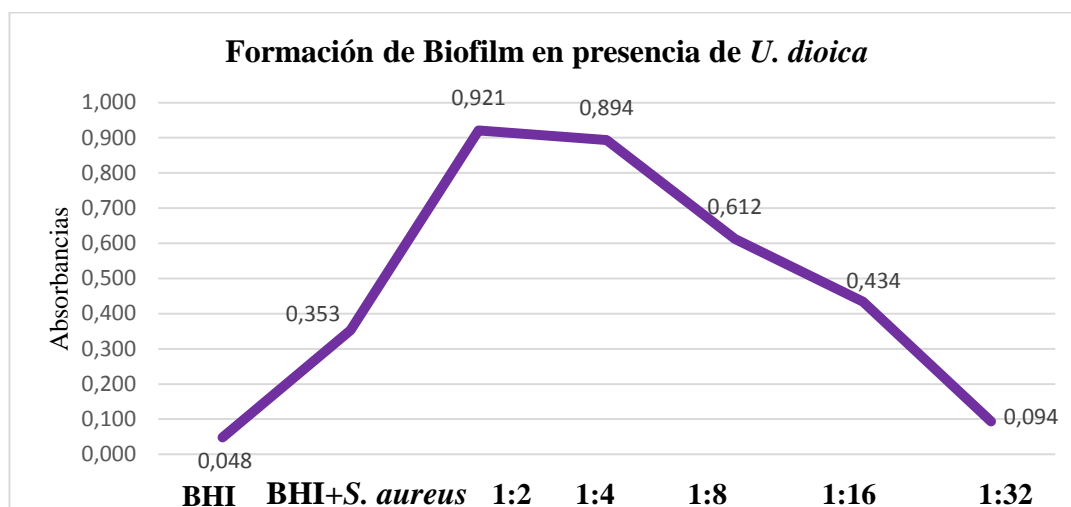
**3.2 Formación de Biofilm en presencia extracto etanólico de *Uncaria tomentosa***



**Autora:** Pamela Espinosa C.

**Fuente:** Registro de Resultado de Laboratorio de Investigación, FCS-UTA.

### 3.3. Formación de Biofilm en presencia extracto etanólico de *Urtica dioica*



**Autora:** Pamela Espinosa C.

**Fuente:** Registro de Resultado de Laboratorio de Investigación, FCS-UTA.

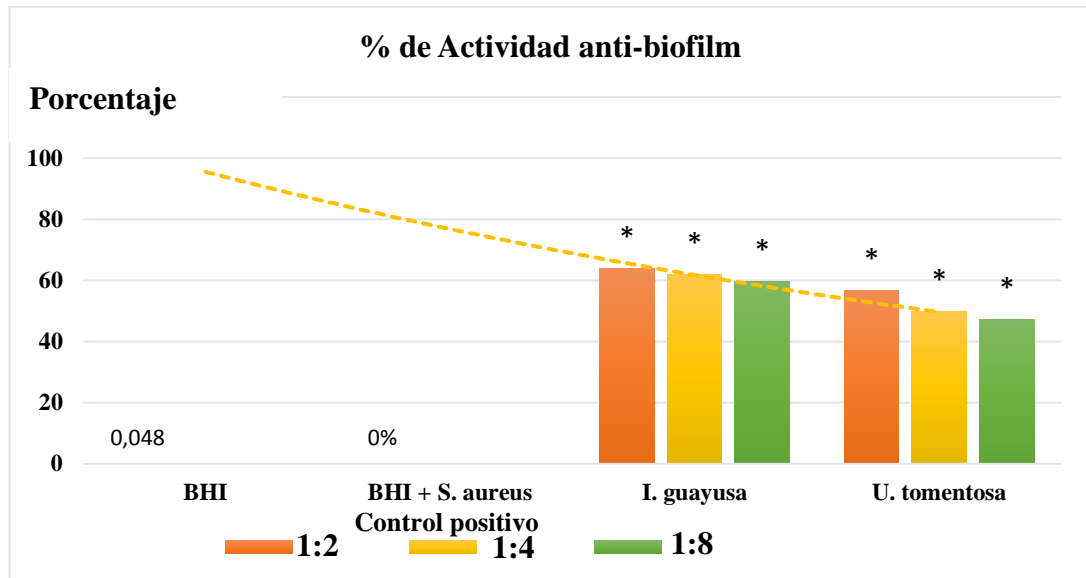
#### ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

La formación de biofilm de *S. aureus* al término de 24 horas es cuantificada por medio de lectura a una OD 595nm. como se observa en la Gráfica 3.1 se parte de un blanco, caldo de BHI con una absorbancia 0,048nm, un control positivo de una cepa formadora de biofilm con un nivel de absorbancia 0,353 nm y a continuación el ensayo con concentraciones del extracto *I. guayusa* que van desde 8; 4; 2 mg/ $\mu$ L hasta donde posteriormente se evidencia actividad significativa, y se determina en la curva que a menor concentración de extracto etanólico mayor fue la formación de biofilm.

Para la Gráfica 3.2 al realizar el ensayo con extracto de *U. tomentosa* se muestran absorbancias significativas con los tratamientos dados a las siguientes concentraciones 5; 2,5 y 1,25 mg/ $\mu$ L con la misma relación que a mayor concentración de extracto, se inhibe la formación de biofilm bacteriano; mientras que en la Gráfica 3.3 los resultados entran en discrepancia ya que el extracto mismo presenta un precipitado al cabo de 24 horas, por lo que dificulta un análisis en las primeras concentraciones por lo tanto no se evidencia si existe o no inhibición a altas concentraciones.

**Gráfico 4. Ensayo de la Actividad Inhibitoria de la formación de Biofilm utilizando compuestos de origen natural.**

**4.1. Actividad anti-biofilm de *I. guayusa* y *U. tomentosa* frente a cepa de *S. aureus***

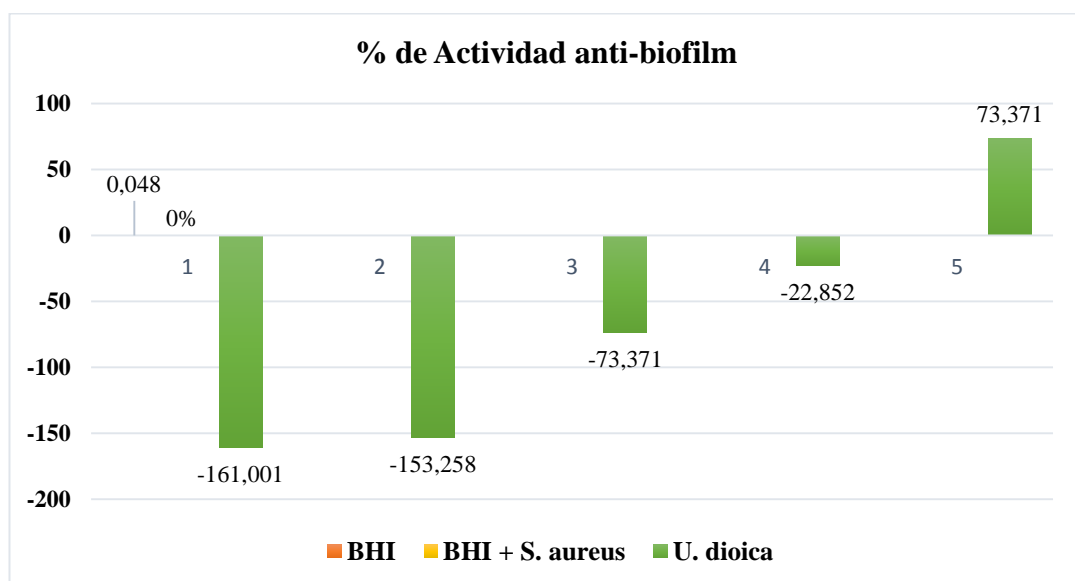


(\*)  $p < 0,05$  significativa.

**Autora:** Pamela Espinosa C.

**Fuente:** Registro de Resultado de Laboratorio de Investigación, FCS-UTA.

**4.2. Actividad anti-biofilm de *U. dioica* frente a cepa de *S. aureus***



**Autora:** Pamela Espinosa C.

**Fuente:** Registro de Resultado de Laboratorio de Investigación, FCS-UTA.

## ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN

Se evaluó la actividad anti-biofilm aplicando un simple cálculo matemático a partir de la formación de biofilm al término de 24h. tomando como referencia el trabajo investigativo de Martínez Y. (2010) y como muestra la Gráfica 4.1. el control positivo, aquel que no recibe tratamiento alguno muestra 0% de inhibición, mientras que a una concentración de 80 mg/mL para el extracto etanólico de hojas de *I. guayusa* el porcentaje para la primera dilución fue de un 63,8%, seguido de un 61,8% para la dilución 1:4 y finalmente para la dilución 1:8 el porcentaje es de 59,5% mientras que para el extracto etanólico de *U. tomentosa* (corteza) se ensayó con una concentración de 50 mg/mL mostrando de igual forma una actividad inhibitoria significativa que va desde un 56,6%; 49,7%; 47,1% en las mismas diluciones.

Como se evidencia en la Gráfica 4.2. el extracto etanólico de *U. dioica* (hojas) en una concentración 50 mg/mL con respecto al control positivo, aquí sucede lo contrario no se observa y no se podría catalogar si hubo o no la inhibición de biofilm, pues al término de 24 horas existe interferencia de precipitado con el extracto y en cierta forma su actividad se logra ver en la dilución 1:32, pero no es significativa, frente a *S. aureus*.

## VERIFICACIÓN DE HIPÓTESIS

### 4.2. VERIFICACIÓN DE LA HIPÓTESIS

Las diferencias significativas en la inhibición de biofilm fueron evaluado por un análisis no paramétrico de varianza unilateral (ANOVA) seguido de una prueba post hoc, la prueba de Tukey que muestra la diferencia significativa de  $p < 0,05$  entre los tratamientos frente a el control positivo.

### PLANTEAMIENTO DE LA HIPÓTESIS

- **Hipótesis nula (H<sub>0</sub>):** Los extractos de *Urtica dioica L.*, *Ilex guayusa* y *Uncaria tomentosa* no presentan actividad anti-biofilm en *S. aureus*.
- **Hipótesis alterna (H<sub>a</sub>):** Al menos uno de los extractos etanólicos en estudio presentan actividad anti-biofilm en *S. aureus*.

### NIVEL DE SIGNIFICANCIA O REGLA DE DECISIÓN

El nivel de significancia es de  $p < 0,05$  con un nivel de confianza de 95%, mediante el Análisis de Varianzas de un factor, ya que son variables cuantitativas la formación de biofilm, frente a cuatro variables cualitativas dadas por el tratamiento.

### ANÁLISIS

**Tabla 5. Análisis descriptivo del bioensayo en la formación de Biofilm de *S. aureus*, según OD 595 nm.**

	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
<b>BHI+S. <i>aureus</i></b>	3	,35300	,050319	,029052	,22800	,47800	,295	,385
<b><i>I. guayusa</i> 1:2</b>	3	,12767	,002309	,001333	,12193	,13340	,125	,129
1:4	3	,13500	,001000	,000577	,13252	,13748	,134	,136
1:8	3	,14300	,001000	,000577	,14052	,14548	,142	,144

<i>U. tomentosa</i> 1:2	3	,15333	,001528	,000882	,14954	,15713	,152	,155
1:4	3	,17767	,001528	,000882	,17387	,18146	,176	,179
1:8	3	,18667	,002082	,001202	,18150	,19184	,185	,189
<i>U. dioica</i> 1:2	3	,92133	,002082	,001202	,91616	,92650	,919	,923
1:4	3	,89400	,002000	,001155	,88903	,89897	,892	,896
1:8	3	,61200	,003000	,001732	,60455	,61945	,609	,615
Total	30	,37037	,308858	,056389	,25504	,48570	,125	,923

**Autora:** Pamela Espinosa C.

**Fuente:** Análisis estadístico IMB SPSS Statistics 25.

**Tabla 6. Análisis no paramétrico de varianza unilateral en la Formación de Biofilm**

#### ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2,761	9	,307	1195,821	,000
Dentro de grupos	,005	20	,000		
Total	2,766	29			

**Autora:** Pamela Espinosa C.

**Fuente:** Análisis estadístico IMB SPSS Statistics 25.

De acuerdo al análisis establecido por ANOVA diseñado en el programa estadístico IMB SPSS Statistics 25 nos reporta que dentro de los grados de libertad (gl), el valor de significancia es inferior a 0,05 por lo tanto se solicita realizar una prueba post-hoc para determinar las diferencias significativas entre tratamientos.

**Tabla 7. Comparaciones múltiples método HSD Tukey entre control positivo y los tratamientos establecidos.**

(I) Bioensayo	(J) Bioensayo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
BHI+S. aureus	<i>Ilex guayusa</i> 1:2	,225333*	,013078	,000	,17902	,27165
	1:4	,218000*	,013078	,000	,17169	,26431
	1:8	,210000*	,013078	,000	,16369	,25631
	<i>U. tomentosa</i> 1:2	,199667*	,013078	,000	,15335	,24598
	1:4	,175333*	,013078	,000	,12902	,22165
	1:8	,166333*	,013078	,000	,12002	,21265
	<i>Urtica dioica</i> 1:2	-,568333*	,013078	,000	-,61465	-,52202
	1:4	-,541000*	,013078	,000	-,58731	-,49469
	1:8	-,259000*	,013078	,000	-,30531	-,21269
BHI+ Ilex guayusa+S. aureus 1:2	BHI+S. aureus	-,225333*	,013078	,000	-,27165	-,17902
	Ilex guayusa 1:4	-,007333	,013078	1,000	-,05365	,03898
	Ilex guayusa 1:8	-,015333	,013078	,969	-,06165	,03098
	Uncaria tomentosa 1:2	-,025667	,013078	,631	-,07198	,02065
	Uncaria tomentosa 1:4	-,050000*	,013078	,028	-,09631	-,00369
	Uncaria tomentosa 1:8	-,059000*	,013078	,006	-,10531	-,01269
	Urtica dioica 1:2	-,793667*	,013078	,000	-,83998	-,74735
	Urtica dioica 1:4	-,766333*	,013078	,000	-,81265	-,72002
	Urtica dioica 1:8	-,484333*	,013078	,000	-,53065	-,43802
BHI+ Ilex guayusa+S. aureus 1:4	BHI+S. aureus	-,218000*	,013078	,000	-,26431	-,17169
	Ilex guayusa 1:2	,007333	,013078	1,000	-,03898	,05365
	Ilex guayusa 1:8	-,008000	,013078	1,000	-,05431	,03831
	Uncaria tomentosa 1:2	-,018333	,013078	,913	-,06465	,02798
	Uncaria tomentosa 1:4	-,042667	,013078	,087	-,08898	,00365
	Uncaria tomentosa 1:8	-,051667*	,013078	,021	-,09798	-,00535
	Urtica dioica 1:2	-,786333*	,013078	,000	-,83265	-,74002
	Urtica dioica 1:4	-,759000*	,013078	,000	-,80531	-,71269
	Urtica dioica 1:8	-,477000*	,013078	,000	-,52331	-,43069
BHI+ Ilex guayusa+S. aureus 1:8	BHI+S. aureus	-,210000*	,013078	,000	-,25631	-,16369
	Ilex guayusa 1:2	,015333	,013078	,969	-,03098	,06165
	Ilex guayusa 1:4	,008000	,013078	1,000	-,03831	,05431
	Uncaria tomentosa 1:2	-,010333	,013078	,998	-,05665	,03598
	Uncaria tomentosa 1:4	-,034667	,013078	,258	-,08098	,01165
	Uncaria tomentosa 1:8	-,043667	,013078	,075	-,08998	,00265
	Urtica dioica 1:2	-,778333*	,013078	,000	-,82465	-,73202

	Urtica dioica 1:4	-,751000*	,013078	,000	-,79731	-,70469
	Urtica dioica 1:8	-,469000*	,013078	,000	-,51531	-,42269
BHI+ Uncaria	BHI+S. aureus	-,199667*	,013078	,000	-,24598	-,15335
tomentosa+S. aureus 1:2	Ilex guayusa 1:2	,025667	,013078	,631	-,02065	,07198
	Ilex guayusa 1:4	,018333	,013078	,913	-,02798	,06465
	Ilex guayusa 1:8	,010333	,013078	,998	-,03598	,05665
	Uncaria tomentosa 1:4	-,024333	,013078	,693	-,07065	,02198
	Uncaria tomentosa 1:8	-,033333	,013078	,302	-,07965	,01298
	Urtica dioica 1:2	-,768000*	,013078	,000	-,81431	-,72169
	Urtica dioica 1:4	-,740667*	,013078	,000	-,78698	-,69435
	Urtica dioica 1:8	-,458667*	,013078	,000	-,50498	-,41235
BHI+ Uncaria	BHI+S. aureus	-,175333*	,013078	,000	-,22165	-,12902
tomentosa+S. aureus 1:4	Ilex guayusa 1:2	,050000*	,013078	,028	,00369	,09631
	Ilex guayusa 1:4	,042667	,013078	,087	-,00365	,08898
	Ilex guayusa 1:8	,034667	,013078	,258	-,01165	,08098
	Uncaria tomentosa 1:2	,024333	,013078	,693	-,02198	,07065
	Uncaria tomentosa 1:8	-,009000	,013078	,999	-,05531	,03731
	Urtica dioica 1:2	-,743667*	,013078	,000	-,78998	-,69735
	Urtica dioica 1:4	-,716333*	,013078	,000	-,76265	-,67002
	Urtica dioica 1:8	-,434333*	,013078	,000	-,48065	-,38802
BHI+ Uncaria	BHI+S. aureus	-,166333*	,013078	,000	-,21265	-,12002
tomentosa+S. aureus 1:8	Ilex guayusa 1:2	,059000*	,013078	,006	,01269	,10531
	Ilex guayusa 1:4	,051667*	,013078	,021	,00535	,09798
	Ilex guayusa 1:8	,043667	,013078	,075	-,00265	,08998
	Uncaria tomentosa 1:2	,033333	,013078	,302	-,01298	,07965
	Uncaria tomentosa 1:4	,009000	,013078	,999	-,03731	,05531
	Urtica dioica 1:2	-,734667*	,013078	,000	-,78098	-,68835
	Urtica dioica 1:4	-,707333*	,013078	,000	-,75365	-,66102
	Urtica dioica 1:8	-,425333*	,013078	,000	-,47165	-,37902
BHI+ Urtica dioica+S.	BHI+S. aureus	,568333*	,013078	,000	,52202	,61465
aureus 1:2	Ilex guayusa 1:2	,793667*	,013078	,000	,74735	,83998
	Ilex guayusa 1:4	,786333*	,013078	,000	,74002	,83265
	Ilex guayusa 1:8	,778333*	,013078	,000	,73202	,82465
	Uncaria tomentosa 1:2	,768000*	,013078	,000	,72169	,81431
	Uncaria tomentosa 1:4	,743667*	,013078	,000	,69735	,78998
	Uncaria tomentosa 1:8	,734667*	,013078	,000	,68835	,78098
	Urtica dioica 1:4	,027333	,013078	,553	-,01898	,07365
	Urtica dioica 1:8	,309333*	,013078	,000	,26302	,35565
BHI+ Urtica dioica+S.	BHI+S. aureus	,541000*	,013078	,000	,49469	,58731
aureus 1:4	Ilex guayusa 1:2	,766333*	,013078	,000	,72002	,81265



	Ilex guayusa 1:4	,759000*	,013078	,000	,71269	,80531
	Ilex guayusa 1:8	,751000*	,013078	,000	,70469	,79731
	Uncaria tomentosa 1:2	,740667*	,013078	,000	,69435	,78698
	Uncaria tomentosa 1:4	,716333*	,013078	,000	,67002	,76265
	Uncaria tomentosa 1:8	,707333*	,013078	,000	,66102	,75365
	Urtica dioica 1:2	-,027333	,013078	,553	-,07365	,01898
	Urtica dioica 1:8	,282000*	,013078	,000	,23569	,32831
BHI+ Urtica dioica+S.	BHI+S. aureus	,259000*	,013078	,000	,21269	,30531
aureus 1:8	Ilex guayusa 1:2	,484333*	,013078	,000	,43802	,53065
	Ilex guayusa 1:4	,477000*	,013078	,000	,43069	,52331
	Ilex guayusa 1:8	,469000*	,013078	,000	,42269	,51531
	Uncaria tomentosa 1:2	,458667*	,013078	,000	,41235	,50498
	Uncaria tomentosa 1:4	,434333*	,013078	,000	,38802	,48065
	Uncaria tomentosa 1:8	,425333*	,013078	,000	,37902	,47165
	Urtica dioica 1:2	-,309333*	,013078	,000	-,35565	-,26302
	Urtica dioica 1:4	-,282000*	,013078	,000	-,32831	-,23569

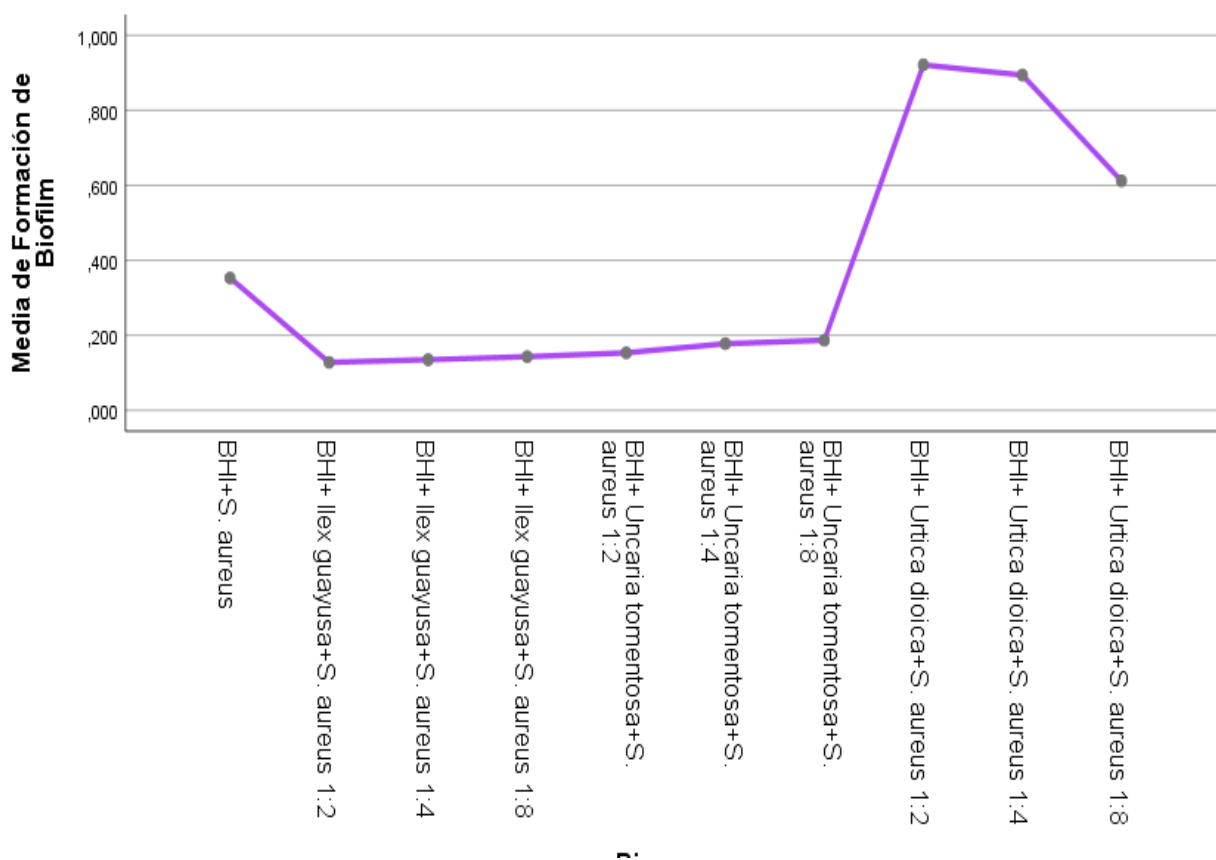
\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

**Autora:** Pamela Espinosa C.

**Fuente:** Análisis estadístico IMB SPSS Statistics 25.

La prueba post-hoc Tukey nos permite evaluar aquellos tratamientos que son significativos en relación al valor  $p < 0,05$  por tanto los valores marcados en amarillo proporciona relevancia a la investigación, mostrando que más de la mitad del experimento tiene un valor significativo, para así determinar la actividad anti-biofilm.

**Gráfico 5. Cinética de formación de Biofilm frente a diferentes concentraciones de extracto etanólico de *I. guayusa*, *U. tomentosa*, *U. dioica* al término de 24 horas.**



**Autora:** Pamela Espinosa C.

**Fuente:** Análisis estadístico IMB SPSS Statistics 25.

Como se describe en los Gráficos 4.1; 4.2; 4.3, en el Gráfico 5. se evidencia claramente como existe una inhibición de la formación de biofilm a las diluciones 1:2, 1:4 y 1:8 en concentraciones de 80mg/mL para *I. guayusa*, *U. tomentosa* con una concentración de 50mg/mL que se relación con el control positivo, aquel que no tiene ningún tratamiento con una media de absorbancia de 0,353 nm.; mientras que para el extracto *U. dioica* a una concentración igual de 50mg/mL se observa que a menor concentración del extracto mayor será la erradicación de biofilm, por lo que se que concluye que dos de los tres extractos en estudio tienen actividad anti-biofilm.

## COMPROBACIÓN DE LA HIPÓTESIS

De acuerdo a los datos obtenidos en ANOVA, para la presente investigación *in vitro* se aprecian que el valor de significancia es un valor  $p < 0,05$  por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la Hipótesis alterna ( $H_a$ ) que manifiesta lo siguiente: “Al menos uno de los extractos etanólicos en estudio presentan actividad anti-biofilm en *S. aureus*.”

### 4.3. DISCUSIÓN

El incremento de padecer infecciones bacterias post-quirúrgicas es sumamente alta en pacientes que reciben implantes biomédicos, debido al desarrollo y formación de biofilm pues la capacidad de las bacterias para adherirse y proliferar en superficies amplias y rugosas es magnífica, este tipo de infecciones han sido reportadas para la mayoría de implantes incluyendo válvulas cardíacas protésicas, implantes ortopédicos, catéteres intravasculares, urinarios, marcapasos cardíacos, entre otros; lo que involucra una extensión en el tratamiento antibiótico afectando las tasas de resistencia antimicrobiana.(9)

La propuesta de experimentar con hojas frescas de *Ilex guayusa* es con la finalidad de determinar algún tipo de actividad inhibitoria en la formación de biofilm de *S. aureus* de manera *in vitro*. Dentro de la zona central del Ecuador la producción de guayusa se lo ha considerado como un potente producto energético por su alto contenido de cafeína, sin embargo un estudio realizado por García-Ruiz *et al.* (2017) muestra que tiene propiedades antioxidantes por su alto contenido en compuestos fenólicos, de igual forma los carotenoides que mejoran la respuesta inmune y reducen el riesgo de enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, cataratas.(55) Resultados que se relacionan en cierta medida con el bioensayo realizado dentro del proyecto en cuanto posee actividad tanto antimicrobiana como anti-biofilm, debido a los compuestos bioactivos presentes en el extracto etanólico a una concentración de 80 mg/mL. Los resultados expuestos en la investigación publicada por Ruiz & Roque (2009) muestran que el extracto etanólico de las hojas de *I. guayusa* muestran un halo de inhibición de 12 mm. frente a *S. aureus*, resultado cercano a lo encontrado en el presente trabajo investigativo con 7 mm. demostrando que posee actividad antimicrobiana; en cuento a la actividad anti-biofilm

actualmente no se encuentran trabajos experimentales, convirtiéndose éste en el primer aporte para la especie en lo que concierne a actividad anti-biofilm pues sus resultados muestran que *Ilex guayusa* inhibe 63,83%; 61,76%; 59,49% en concentraciones 8 mg/ $\mu$ L; 4 mg/ $\mu$ L; 2 mg/ $\mu$ L respectivamente. (90)

La corteza de *Uncaria tomentosa* conocida comúnmente como uña de gato, es una liana trepadora que alcanza hasta los 20 m. de altura, la corteza es amarillenta y presente espinas curvadas, es utilizada como planta medicinal ya que posee principalmente dos grandes grupos de alcaloides como principios activos, los indólicos y los oxidoles que se presentan individualmente en mayor concentración en raíz y corteza lo que le otorga la capacidad de tener actividad antiinflamatoria, efecto antimutágeno y citostático y por supuesto efecto inmunoestimulante, por la presencia de flavonoides (Artochamin C, 5'-Hydroxycudraflavone A y Dihydrocudraflavone B) lo que aumenta la actividad fagocítica de neutrófilos, macrófagos, granulocitos como defensa al huésped, responsables de la actividad antibacteriana y antimicótica.(65) Un estudio realizado por Rojas *et al.* (2016) reflejan resultados positivos para la actividad antimicrobiana con la utilización de extractos metanólicos de la corteza de *U. tomentosa*, mostrando inhibición de crecimiento para *S. aureus* a una dosis de 20 mg/mL(91); relacionando con el bioensayo que se trabajó con extractos etanólicos liofilizados a una concentración de 50 mg/mL, mismas que para determinar su actividad en placas de Mueller-Hinton se impregnó en pocillos 10  $\mu$ L que luego de incubación por 24 horas a 37° C, se observó un halo de inhibición de 9 mm. Con respecto a la actividad anti-biofilm que posee el extracto muestra excelentes resultados con una inhibición del 56,56% en la dilución 5mg/ $\mu$ L, en la dilución 2,5mg/ $\mu$ L hay una inhibición 49,67%, finalmente el porcentaje de inhibición para la dilución 1,25mg/ $\mu$ L presenta 47,12%, datos importantes y relevantes ya que no se evidencian estudios relacionados a una actividad anti-biofilm y que podría estar expuesta para comparaciones en futuras investigaciones.

La población originaria de Perú usualmente utilizaba plantas de *Urtica dioica* como alternativa para el tratamiento de enfermedades infecciosas y dermatológicas ya que presenta tricomas en sus hojas y tallos que contienen un líquido urticante rico en acetilcolina, histamina y ácidos orgánicos, impidiendo de tal forma la síntesis de proteoglicanos fundamental para la formación del exoesqueleto de la membrana

bacteriana, de ahí la importancia de su estudio para beneficiar a la población médico científica con productos a bajo costo y con menos efectos secundarios, donde Fernández (2016) procesa con extracto etanólico de hojas de *U. dioica* demostrando que se encuentra eficacia antimicrobiana en una concentración al 80% con un halo de inhibición de 6,7 mm, pero lamentablemente no es significativa ante *S. aureus* por lo tanto explica que no tiene validez en tratar infecciones leves provocadas por la bacteria, se menciona a su vez que a medida que la concentración de extracto disminuía, aumentaba su actividad antimicrobiana. (89) Otro estudio publicado por Salinas *et al.* (2009) demuestra que el extracto etanólico de hojas de Ortiga muestra actividad antimicrobiana con un valor CMI de 1mg/mL contra bacterias Gram positivas (92) lo que demuestra que de igual manera su concentración sigue siendo bajo al momento de verificar su actividad, así sucedió en el caso del bioensayo expuesto a continuación donde a mayor concentración del extracto, menos inhibición bacteriana se presentó, dando como resultado, que se aprecia actividad a una concentración 0,63 mg/mL y 0,31 mg/mL, presentando un halo de inhibición de 7mm, mientras que el artículo publicado por Gülçin *et al.* (2004) han demostrado que el extracto de agua de hojas de *U. dioica* presenta actividad antimicrobiana, antiulcerosa y analgésica. (93) Para determinar la actividad anti-biofilm con extracto etanólico de *U. dioica* se presenta una interferencia en los resultados al término de 24 horas pues el precipitado formado al fondo de los pocillos dificulta realizar su lectura, dando datos erróneos y con ellos no se afirma si presenta o no actividad.

## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. CONCLUSIONES

- Se han preparado extractos etanólicos de 3 plantas seleccionadas para el estudio, recolectadas en Pastaza, parroquia Canelos a 1°35'05.0''S. 77°45'56.4''W. y en Tungurahua, ciudad Ambato a una latitud 1°14'30''S. 78°37'11''W. donde el método aplicado fue maceración por 7 días a partir de material vegetal desecado, siguiendo lineamientos del protocolo establecido por Tona *et al.*(84), obteniendo un volumen final concentrado del extracto para *Urtica dioica* de 83,5 mL con un pH de 7,4 ; *Ilex guayusa* 60 mL, pH de 5,6 y *Uncaria tomentosa* 66 mL, pH 7.
- La eficacia antimicrobiana se determinó mediante la medición de los halos de inhibición en agar Mueller-Hinton con la técnica de difusión pozo en agar, obteniendo como resultado: *Urtica dioica* 7mm.; *Ilex guayusa* 7mm. y *Uncaria tomentosa* 9mm, frente a *Staphylococcus aureus*, de igual manera se ha evaluado la CMI mediante las lecturas de absorbancia, arrojando resultados significativos en la dilución 1:8 a una concentración de 2mg/μL para *I. guayusa* y 1,25mg/μL *U. tomentosa*.
- Dos de los tres extractos etanólicos preparados, presentan inhibición de la formación de biofilm frente a *S. aureus*, arrojando los siguientes resultados: *Ilex guayusa* 63,83%; 61,76%; 59,49% en concentraciones 8 mg/μL; 4 mg/μL; 2 mg/μL respectivamente; mientras que para el extracto de *Uncaria tomentosa* partiendo de una concentración madre de 50mg/mL se obtuvo 56,56%; 49,67%; 47,12% en las mismas diluciones, demostrando a su vez una alta

inhibición, reporte que no se evidencia estudios posteriores siendo éstos los primeros para la especie, que estarían sujetos a una reproducibilidad posteriormente.

- El experimento *in vitro* realizado con el extracto etanólico de hojas de *Urtica dioica* debido a la interferencia de precipitado en los pocillos no evidenció actividad en la inhibición de biofilm formada por *S. aureus*, al contrario se observa que a mayor concentración del extracto, mayor fue la formación de biofilm según las absorbancias obtenidas, mismas que están directamente proporcional con la cantidad de precipitado formado.

## **5.2. RECOMENDACIONES**

- Desarrollar y aplicar nuevas técnicas de extracción de los principios activos de las diferentes plantas medicinales para verificar la efectividad y por consiguiente tener conocimiento de que metabolito actúa en su inhibición.
- Modificar las concentraciones del extracto etanólico en los pocillos de la placa de microtitulación para comprobar su actividad inhibitoria ya que únicamente se trabajó con 5 y 8 mg/μL.
- Para futuros bioensayo con *U. dioica* se recomienda manejar otro tipo de extracción, otro tipo de solventes y evitar la formación de precipitado mismas que no permitieron establecer correctamente su actividad.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### BIBLIOGRAFÍA

1. Alvarenga S. Establecimiento in vitro y cultivo de células de la uña de gato (*Uncaria tomentosa*) (Willd.) D.C. *Tecnol en Marcha*. 2010;23(5):24–33. (62)
2. Araujo AR De, Quelemes PV, Gómez M, Lima LI De, Sá MC, Moreira H, et al. Antibacterial , antibiofilm and cytotoxic activities of *Terminalia fagifolia* Mart . extract and fractions. *Licens BioMed Cent*. 2015;14:25:1–10. (28)
3. Azuero A, Jaramillo C, San Martin D, Haydelba D. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador Analysis of antimicrobial effect of twelve medicinal plants of ancient use in Ecuador. *Rev Cienc UNEMI*. 2016;9(20):11–8. (27)
4. Ballesteros JL, Bracco F, Cerna M, Vita Finzi P, Vidari G. Ethnobotanical research at the Kutukú Scientific Station, Morona-Santiago, Ecuador. *Biomed Res Int*. 2016;2016. (56)
5. Barriga G. Determinación del contenido de cafeína en infusiones de hoja de guayusa (*Ilex guayusa*) bajo dos condiciones de secado. 2017;523. (54)
6. Bieski I, Oliveira RM De, Ríos F, Macedo M. Utilização de medicamentos fitoterápicos com ênfase na *uncaria tomentosa* will d.c., dispensados em farmácias de manipulação na grande cuiabá – MT. 2014;(March). (63)
7. Calva LPC. Determinación indirecta del contenido de cafeína en el cultivo de guayusa (*Ilex guayusa*), mediante el NDVI. 2018; (51)
8. Castañón-sánchez CA. Patogenia molecular de *Staphylococcus aureus*. *Evid Med Invest Salud*. 2012;5:79–84. (4)



9. Cervantes García E, González RG, María P, Schettino S. Staphylococcus aureus asociado a la comunidad (CA-MRSA). Rev Latinoam Patol Clin Med Lab [Internet]. 2015;62(2):100–11. Available from: [www.medigraphic.com/patologiaclinica%5Cnwww.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.com/patologiaclinica%5Cnwww.medigraphic.org.mx) (8)
  
10. Ciriza JH. Ortiga mayor *Urtica dioica* L. Med Natur. 2007;1(2):131–7. (44)
  
11. David O. Salinas Sánchez, , Gema L. Arteaga Najera , Ismael León Rivera<sup>3</sup> , Oscar Dorado Ramírez, Ma. Guadalupe Valladares Cisneros VMNG. Antimicrobial activity of medicinal plants from the Huautla Sierra Biosphere Reserve in Morelos (Mexico). Polibotánica. 2009;(28):213–25. (92)
  
12. De la Torre L, Navarrete H, Muriel P, Marcia M, Balslev H. Enciclopedia De Plantas Utiles Del Ecuador. Herb QCA la Esc Ciencias Biológicas la Pontífica Univ Católica del Ecuador Herb AAU del Departameto Ciencias Biológicas la Univ Aarhus Quito Aarhus. 2008;1:1–3. (31)
  
13. Diaz C. Descripción de biofilms, desarrollo e importancia de su estudio. Impacto de las técnicas de micronanofabricación en sistemas biológicos. Microbiología. 2011;1–44. (73)
  
14. Donlan RM. Biofilms: Microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis. 2002;8(9):881–90. (69)
  
15. Gallegos-zurita M. Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades de la piel en comunidades rurales de la provincia de Los Ríos - Ecuador Medicinal plants used for treatment of skin diseases in rural communities in Los Ríos. 2017;315–21. (33)
  
16. García C. Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de Staphylococcus aureus con resistencia multiple. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 2006. 1-101 p. (41)

17. González J, Ávila E, Reyna L. Efecto in vitro de extractos Etanólicos del fruto de *Vitis vinífera* ( uva ) Y *Annona muricata* ( guanábana ), en la formación de biofilms *Streptococcus mutans* ATCC 25175 EFFECT OF ETHANOL EXTRACTS in vitro FRUIT OF *Vitis vinifera* ( uva ) and *Annona muricata*. 2015;26:427–40. (85)
  
18. Gülçin I, Küfrevioğlu ÖI, Oktay M, Büyükkuroğlu ME. Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica* L.). *J Ethnopharmacol.* 2004;90(2–3):205–15. (93)
  
19. Herrera A, Atao W, Santillán M, Cascos M. actividad de las hojas y alcaloides de la uña de gato (*uncaria tomentosa* willd dc) en el modelo de inflamación intestinal crónica de yamada *et al.* 2016;(8). (60)
  
20. Instituto Nacional De Investigación En Salud Pública (INSPI). Métodos de obtención Extractos vegetales. 2017. p. 1–5. (39)
  
21. Iñigo Lasa. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *INTERNATIONALMICROBIOLOGY.* 2006;9:21–8. (3)
  
22. Jean B. Patel, PhD D, Robin Patel M, Melvin P. Weinstein M, Sandra S. Richter, MD D, George M. Eliopoulos M, Michael Satlin, MD M, et al. M100 Performance Standards for Antimicrobial. 27th ed. Clinical And Laboratory Standards Institute; 2018. 18 p. (88)
  
23. Kanaan H, El-mestrah M, Sweidan A, As-sadi F, Bazzal A Al, Chokr A. Screening for antibacterial and antibiofilm activities in *Astragalus angulosus*. 2017; (30)
  
24. Lasa I, del Pozo JL., Penadés JR., Leiva J. Biofilms bacterianos e infección Bacterial biofilms and infection. *An Sist Sanit Navar.* 2005;28(2):163–76. (70)

25. Malagon Londoño G, Alvarez Moreno CA. Infecciones hospitalarias. Medica Panamericana; 2010. (12)
26. Mazón M, Castillo R. Las Plantas medicinales de la Sierra Ecuatoriana. Biodiversidad y Usos..pdf. 1997. p. 1–2. (6)
27. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. 8a. Elsevier, editor. Barcelona-España; 2013. 848 p. (81)
28. Obregón LED. Identificación correcta de «Uña de gato» (género Uncaria ). 1995;40:28–30. (59)
29. Ochoa Morales MSi (2014). estudio bibliográfico de las propiedades y aplicaciones medicinales de la ortiga mayor (*Urtica dioica*). 2014; (46)
30. Patel SS, Udayabanu M. *Urtica dioica* extract attenuates depressive like behavior and associative memory dysfunction in dexamethasone induced diabetic mice. Metab Brain Dis. 2014;29(1):121–30. (49)
31. Phillips P, Wolcott R, Fletcher J, Schultz GS. Biofilms. Wounds Int. 2010;1(3):1–6. (74)
32. Priscila Rodas Marquez JV. Epidemiologia de las infecciones hospitalarias. 2010; (15)
33. Ríos M (Montserrat), Cruz R de la., Mora A. Conocimiento tradicional y plantas utiles del Ecuador : saberes y practicas. Ediciones Abya-Yala; 2008. 78 p. (16)
34. Rojas J, Velasco J, Buitrago A, Mender T, Rojas J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales seleccionadas del Jardín Botánico del Orinoco , municipio Heres , Estado Bolívar . Rev Fac Odontol Univ Nac (Cordoba). 2016;58(1)(January):2–10. (91)

35. Rolando Chateauneuf. La Ortiga Mayor, *Urtica dioica* [Internet]. 2015. Available from: <http://www.rochade.cl/la-ortiga-mayor-urtica-dioica-seria-una-de-las-plantas-medicinales-mas-interesantes/> (42)
36. Ruiz J, Roque M. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del nor-oriente peruano. 2009;12(1):41–7. (90)
37. Ruiz JR, Roque M, Salazar ME, Gamarra G, Arias GC, Whu DY, et al. Actividad antiestafilocócica y antibiopelícula de los extractos de *Juglans neotropica* DIELS, *Piper lineatum* RUIZ&PAV. Y *Terminalia catappa* L. 2013;16(1):32–7. (26)
38. Santos C, Castelo J, Aguiar A De, Wakui VG, Rodrigues FS, Monteiro-Neto MOAA de SMV, et al. *Himatanthus drasticus* Leaves: Chemical Characterization and Evaluation of Their Antimicrobial, Antibiofilm, Antiproliferative Activities. 2017; (29)
39. Shukla V, Bhathena Z. Sustained Release of a Purified Tannin Component of *Terminalia chebula* from a Titanium Implant Surface Prevents Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015;175(7):3542–56. (19)
40. Sidali KL, Morocho PY, Garrido-Pérez EI. Food tourism in indigenous settings as a strategy of sustainable development: The case of *Ilex guayusa* Loes. In the Ecuadorian amazon. *Sustain*. 2016;8(10). (53)
41. Silva E Silva Figueiredo CS, Santos JCB, De Aguiar Castro JA, Wakui VG, Rodrigues JFS, Arruda MO, et al. *Himatanthus drasticus* leaves: Chemical characterization and evaluation of their antimicrobial, antibiofilm, antiproliferative activities. *Molecules*. 2017;22(6). (7)

42. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*. 2000;40:175–9. (87)
43. Tona L, Kambu K, Ngimbi N, Cimanga K, Vlietinck AJ. Antiamoebic and phytochemical screening of some Congolese medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 1998;61(1):57–65. (84)
44. Valerio LG, Gonzales GF. Toxicological Aspects of the South American Herbs Cat ' s Claw ( *Uncaria tomentosa* ) and Maca ( *Lepidium meyenii* ) A Critical Synopsis. 2005;24(1):11–35. (66)
45. Villamarín Tss. de los extractos de *Acmella repens* ( Botoncillo ) *Urtica* Esperanza – Imbabura sobre *Staphylococcus aureus* de enfermedades bucofaríngeas . 2010; (40)
46. Zambrano M, Suarez L. Biofilms bacterianos : sus implicaciones en salud y enfermedad Biofilms: implications in health and disease. *Univ Odontol*. 2006;19–25. (11)
47. Zevallos PA, Flores Y. caracterización morfológica de plántulas de “Uña De Gato” *Uncaria tomentosa* (Willdernow ex Roemer & Schultes) D.C. y *U. guianensis* (Aublet) Gmelin del bosque nacional Alexander Von Humboldt. 2003; (61)

## LINKOGRAFÍA

48. Aparna MS, Yadav S. Biofilms: microbes and disease. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. 2008;12(6):526–30. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-86702008000600016&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702008000600016&lng=en&nrm=iso&tlng=en) (71)
49. Barcat JA. BIOFILMS. 2005;369–72. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v65n4/v65n4a18.pdf> (2)

- 50.** Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Timothy Mietzner. Microbiología Médica [Internet]. 25a. McGRAW-HILL INTERAMERICANA, editor. DF-México; 2011. Available from: [http://redlagrey.com/files/Microbiologia\\_Medica\\_Jawetz\\_25\\_www.rinconmedico.smffy.com.pdf](http://redlagrey.com/files/Microbiologia_Medica_Jawetz_25_www.rinconmedico.smffy.com.pdf) (78)
- 51.** Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales de *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab [Internet]. 2014;61(1):28–40. Available from: [www.medigraphic.com/patologiaclinica%5Cnwww.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.com/patologiaclinica%5Cnwww.medigraphic.org.mx) (77)
- 52.** Chen L, Wen Y. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. Int J Oral Sci [Internet]. 2011;3(2):66–73. Available from: <http://www.nature.com/ijos/journal/v3/n2/abs/ijos201111a.html> (1)
- 53.** Chen X, Shang F, Meng Y, Li L, Cui Y, Zhang M, et al. Ethanol extract of *Sanguisorba officinalis* L. inhibits biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an ica-dependent manner. J Dairy Sci [Internet]. 2015;98(12):8486–91. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030215007262> (22)
- 54.** Cruz Martínez, SF; Patrana, GT; Sánchez C. Distribución de genes de adhesión y regulación de biofilm en *Staphylococcus aureus*. Acta Bioquímica Clínica Latinoam [Internet]. 2016;50(4):713–20. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v50n4/v50n4a20.pdf> (18)
- 55.** Cucarella C, Solano C, Valle J. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. J ... [Internet]. 2001;183(9):2888–96. Available from: <http://jb.asm.org/content/183/9/2888.short> (83)
- 56.** De Oliveira AM, Da Silva Fernandes M, De Abreu Filho BA, Gomes RG, Bergamasco R. Inhibition and removal of staphylococcal biofilms using

- Moringa oleifera Lam. aqueous and saline extracts. J Environ Chem Eng [Internet]. 2018;6(2):2011–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.02.043> (23)
- 57.** Dr. Estuardo Salgado. Ecuador con alta tasa de mortalidad por infecciones nosocomiales [Internet]. 28 de Marzo . 2017. Available from: <https://www.redaccionmedica.ec/secciones/salud-publica/ecuador-con-la-mayor-tasa-de-mortalidad-por-infecciones-nosocomiales-89901> (13)
- 58.** Fernández NM de B. Eficacia antimicrobiana del extracto de *Urtica dioica* sobre *Staphylococcus aureus*, estudio in vitro [Internet]. 2016. Available from: <http://repositorio.ucsg.edu.ec/bitstream/3317/7577/1/T-UCSG-PRE-MED-NUTRI-241.pdf> (89)
- 59.** Fitoquímico. Metabolitos secundarios de U. dioica. [Internet]. 2014. Available from: <https://quimiviva.wordpress.com/category/fitoquimica/> (48)
- 60.** Gallegos Zurita M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. An la Fac Med [Internet]. 2016;77(4):327–32. Available from: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-55832016000400002&lang=pt](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832016000400002&lang=pt) (34)
- 61.** García-Ruiz A, Baenas N, Benítez-González AM, Stinco CM, Meléndez-Martínez AJ, Moreno DA, et al. Guayusa (*Ilex guayusa* L.) new tea: phenolic and carotenoid composition and antioxidant capacity. J Sci Food Agric [Internet]. 2017 Sep;97(12):3929–36. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jsfa.8255> (55)
- 62.** Giraldo Quintero SE, Bernal Lizarazú MC, Morales Robayo A, Pardo Lobo AZ, Gamba Molano L. Descripción del uso tradicional de plantas medicinales en mercados populares de Bogotá, D.C.Traditional. Nova [Internet]. 2015;13(23):73–80. Available from:

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1794-24702015000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702015000100007&lng=en&nrm=iso&tlng=es) (47)

- 63.** González Méndez D. Posible relación existente entre la presencia de toxinas y la sensibilidad a antibióticos en cepas de *Staphylococcus aureus*. 2015;324. Available from: [biblioteca.ucm.es/tesis/vet/ucm-t28578.pdf](http://biblioteca.ucm.es/tesis/vet/ucm-t28578.pdf) (80)
- 64.** Grønseth T, Vestby LK, Nesse LL, Thoen E, Habimana O, von Unge M, et al. Lugol's solution eradicates *Staphylococcus aureus* biofilm in vitro. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* [Internet]. 2017;103:58–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2017.09.025> (21)
- 65.** ieS LABO. Extraits végétaux - IES LABO [Internet]. 2018. Available from: <http://www.ieslabo.com/fr/produits/extraits-vegetaux.php> (36)
- 66.** INEC. Principales causas de morbi-mortalidad [Internet]. 2014 [cited 2018 Jun 28]. Available from: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/vdatos/> (14)
- 67.** InfoRed. Uña de gato. 2014;2014. Available from: [http://www.aidsinonet.org/uploaded/factsheets/135\\_spa\\_722.pdf](http://www.aidsinonet.org/uploaded/factsheets/135_spa_722.pdf) (58)
- 68.** Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, et al. Bacterial biofilm and associated infections. *J Chinese Med Assoc* [Internet]. 2018;81(1):7–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012> (72)
- 69.** Joshi BC, Mukhija M, Kalia AN. Pharmacognostical review of *Urtica dioica* L. *Int J Green Pharm* [Internet]. 2014;8(4):201–9. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84908618499&partnerID=40&md5=cf43987cf443e255079b2f58c4ee79d0> (45)
- 70.** Lizcano RAJ, González VLJ. evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales frente a microorganismos patógenos y fitopatógen [Internet]. Pontificia Universidad



Javeriana; 2008. Available from:  
<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis151.pdf> (38)

71. Modarresi-Chahardehi A, Ibrahim D, Fariza-Sulaiman S, Mousavi L. Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*. *Rev Biol Trop* [Internet]. 2012;60(4):1567–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23342511> (24)
72. Morales F, Padilla S, Falconí F. Medicinal plants used in traditional herbal medicine in the province of chimborazo, Ecuador. *African J Tradit Complement Altern Med* [Internet]. 2017;14(1):10–5. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L614087058%5Cnhttp://dx.doi.org/10.21010/ajtcam.v14i1.2> (35)
73. Morocho MVM. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Piper pseudochurumayo* y *Olyra latifolia* por el método de difusión en agar. Prevalencia Brucelosis Bov en la Parroquia Huertas del cantón Zaruma Prov El Oro [Internet]. 2012;1(1):50. Available from: [https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5395/1/TESIS ?PREVALENCIA DE BRUCELOSIS.pdf](https://dspace.unl.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/5395/1/TESIS%20PREVALENCIA%20DE%20BRUCELOSIS.pdf) (17)
74. Navarro CE. cinética del crecimiento y determinacion de la fase de muerte en *Staphylococcus aureus* Cowan I bajo diferentes [Internet]. 2011. 1-90 p. Available from: [http://tesis.luz.edu.ve/tde\\_arquivos/52/TDE-2011-10-11T14:43:45Z-1924/Publico/navarro\\_ocando\\_carlos\\_navarro.pdf](http://tesis.luz.edu.ve/tde_arquivos/52/TDE-2011-10-11T14:43:45Z-1924/Publico/navarro_ocando_carlos_navarro.pdf) (82)
75. Nazar J. Biofilms bacterianos. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA *Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello* [Internet]. 2009;67:61–72. Available from: <http://www.scielo.cl/pdf/orl/v67n1/art11.pdf> (68)
76. Noriega F. Flavonoides y actividad antioxidante en la especie *Ilex guayusa* (Loes.). 2017; Available from: <http://utopia.ups.edu.ec/web/guest/cursos-y-seminarios> (57)

- 77.** Oliveira WF, Silva PMS, Silva RCS, Silva GMM, Machado G, Coelho LCBB, et al. Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis infections on implants. *J Hosp Infect* [Internet]. 2017;98(2):111–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.11.008> (9)
- 78.** Otto M. Biofilms in Disease. In 2014 [cited 2018 Aug 17]. p. 3–13. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-53833-9\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-53833-9_1) (5)
- 79.** Radice M, Vidari G. Caracterización fitoquímica de la especie *Ilex guayusa* Loes . y elaboración de un prototipo de fitofármaco de interés comercial. *La Granja* [Internet]. 2005;(Figura 1):3–11. Available from: <http://lagranja.ups.edu.ec/index.php/granja/article/viewFile/523/378> (52)
- 80.** Ricardo Díaz Mayorga. La ortiga , *Medicina indígena*. 2012; Available from: <http://www.visionchamanica.com/Plantas/ortiga.htm> (43)
- 81.** Rolando Chateaneuf. La Ortiga Mayor, *Urtica dioica* [Internet]. 2015. Available from: <http://www.rochade.cl/la-ortiga-mayor-urtica-dioica-seria-una-de-las-plantas-medicinales-mas-interesantes/> (42)
- 82.** RUNA | Our Story [Internet]. 2018 [cited 2018 Aug 1]. Available from: <http://runa.org/our-story> (50)
- 83.** Saraswathi VS, et al. Biofilm inhibition formation of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* mutans, photocatalytic activity of azo dye and GC–MS analysis of leaves of *Lagerstroemia speciosa*. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.03.007> (25)
- 84.** Sarkar R, et al. Anti-biofilm activity of *Marula* - A study with the standardized bark extract. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2014;154(1):170–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.03.067> (20)

- 85.** SchlurcheBot. Biofilm formation1 [Internet]. 2012. Available from: [https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Biofilm\\_formation1.jpg&oldid=70903448](https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Biofilm_formation1.jpg&oldid=70903448). (75)
- 86.** Shukla SK, Subba T. An Improved Crystal Violet Assay for Biofilm Quantification in 96-Well Microtitre Plate. 2017;1–10. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2017/01/13/100214.full.pdf> (86)
- 87.** Turner IM. A revised conspectus of Uncaria (Rubiaceae). *Webbia* [Internet]. 2018 Jan 2 [cited 2018 May 24];73(1):9–21. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00837792.2018.1445363> (64)
- 88.** Verde-Star MJ, García-González S, Rivas-Morales C, Sánchez-García E, Castillo-Hernández SL, García-Palencia P. Metodología científica para el estudio de plantas medicinales y Actividad antimicrobiana. In: Investigación en plantas de importancia médica [Internet]. 2016. p. 1–40, 77–100. Available from: <http://www.omniascience.com/monographs/index.php/monograficos/issue/view/34> (37)

#### **CITAS BIBLIOGRÁFICAS-BASE DE DATOS UTA.**

- 89. PROQUEST** Dr. Albert Pahissa. Infecciones producidas por *Staphylococcus aureus* [Internet]. ProQuest Ebook Central, editor. ProQuest Ebook Central; 2009. Available from: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/utasp/detail.action?docID=3226048> (79)
- 90. PROQUEST** Gattuso M, O Di Sapio, Gattuso S, E Li Pereyra. Morphoanatomical studies of *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* bark and leaves. 2004;213–23.(ProQuest Ebook Central). Available from: <https://search.proquest.com/docview/205534281/4387AA1C34B2433BPQ/2?accountid=36765> (67)

- 91. EBOOK CENTRAL** Jesús Tamariz, Gertrudis Horna, Elena Tapia. Staphylococcus aureus resistente a meticilina adquirido en la comunidad aislados en tres hospitales de Lima-Perú. Rev Médica Hered [Internet]. 2010;21(1): 4-10(ProQuest Ebook Central). Available from: [https://ebookcentral.proquest.com/lib/utasp/reader.action?docID=3193634&query=\(10\)](https://ebookcentral.proquest.com/lib/utasp/reader.action?docID=3193634&query=(10)) (10)
- 92. SPRINGER** Otto M. Biofilms in Disease. In Springer, Berlin, Heidelberg; 2014 [cited 2018 May 23]. p. 3–13. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-53833-9\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-53833-9_1) (76)
- 93. PROQUEST** Sandoval M, Okuhama NN, Zhang XJ, Condezo LA, et al. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. ProQuest [Internet]. 2002;325–37. Available from: <https://search.proquest.com/docview/205540237/C1324CB6F27644E2PQ/4?accountid=36765> (65)
- 94. EBOOK CENTRAL** Webster GL (Grady L, Rhode RM (Robert M. Plant Diversity of an Andean Cloud Forest : Inventory of the Vascular Flora of Maquipucuna, Ecuador. In ProQuest Ebook Central; 2001 [cited 2018 Apr 28]. p. 211. Available from: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/utaebooks/reader.action?docID=470896&query=Plant+Diversity+of+an+Andean+Cloud+Forest+%3A+Inventory+of+the+Vascular+Flora+of+Maquipucuna%2C+Ecuador> (32)

# 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 (Ctda. 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

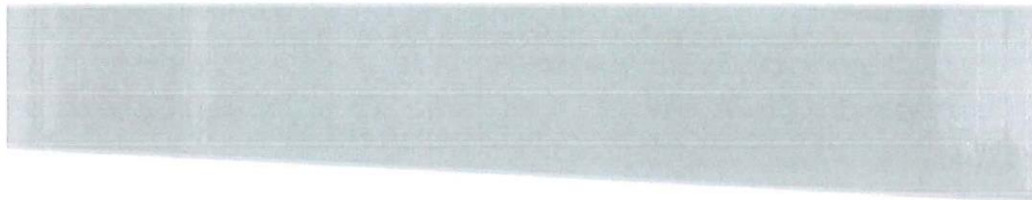
copias: Rectorado, VAC, CONIN, DIBE, DIFIN, FCS, Auditoría Interna

JURIDM

Ab. MSc. José Romo Santana  
SECRETARIO GENERAL



## ANEXO 2. RESOLUCIÓN Y APROBACIÓN DEL TEMA DE INVESTIGACIÓN, RESOLUCIÓN CD-P-2018-1695.



### CONSEJO DIRECTIVO

FCS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DE LA SALUD

Ambato, 21 de mayo de 2018  
Resolución CD-P-2018-1695

Licenciado Mg.  
**Mario Vilcacundo Córdova**  
COORDINADOR (F)  
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 21 de mayo de 2018, en conocimiento del memorando UTA-UYI-FCS-2018-0383-M, suscrito por la Ps. Cl. Verónica Fernanda Flores, Presidente (F) de la Unidad de Titulación de la Facultad de Ciencias de la Salud, solicitando se apruebe la modalidad de titulación mediante **PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**, de la señorita **ESPINOSA CAIZA ERIKA PAMELA**, estudiante del ciclo marzo-agosto 2018, al respecto.

#### CONSEJO DIRECTIVO, RESUELVE:

- AUTORIZAR A LA SEÑORITA **ESPINOSA CAIZA ERIKA PAMELA**, ESTUDIANTE DE LA CARRERA DE LABORATORIO CLÍNICO DEL CICLO MARZO-AGOSTO 2018, OPTAR POR LA MODALIDAD DE GRADUACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CON EL TEMA "ACTIVIDAD ANTI-BIOFILM DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS *Urtica dioica* L., *Illex guayusa* Y *Uncaria tomentosa* EN *Staphylococcus aureus*", PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE LICENCIADA EN LABORATORIO CLÍNICO.
- DESIGNAR COMO TUTOR DEL TRABAJO DE GRADUACIÓN O TITULACIÓN, AL LCDO. MG. **MARIO FERNANDO VILCACUNDO CORDOVA**, QUE DEBERÁ PRESENTAR UN INFORME BIMENSUAL DE SU AVANCE Y USO AL FINAL, DE CONFORMIDAD CON EL ART. 14 DEL REGLAMENTO DE GRADUACIÓN PARA OBTENER EL TÍTULO TERMINAL DE TERCER NIVEL DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO.
- AUTORIZAR A LA SEÑORITA ESTUDIANTE, 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. Mg. Marcelo Ochoa Egas,  
Presidente

Anexo memorando UTA-UYI-FCS-2018-0383-M, documentación correspondiente  
e.c. Carpeta estudiantil  
**LCDO. MG. MARIO FERNANDO VILCACUNDO CORDOVA**, Tutor  
Sra. **ESPINOSA CAIZA ERIKA PAMELA**





### 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:

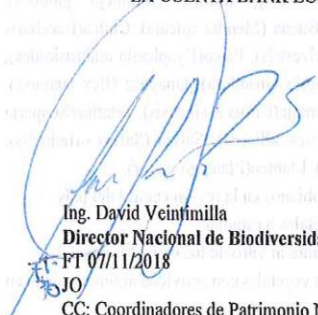
1. Solicitud de: Elizabeth Proaño Pérez- Profesor investigador FCS –UTA.
2. Auspicio de Institución Científica Nacional: Universidad Técnica de Ambato.
3. Contraparte del Ministerio del Ambiente: Coordinadores de Patrimonio Natural, Responsables de Vida Silvestre de las Direcciones Provinciales y DNB establecidas en la parte inferior de esta Autorización.
4. Inicio y final de investigación: Noviembre 07 de 2018 hasta Noviembre 07 de 2019.
5. Entrega de informe final: 07 de noviembre de 2019.
6. Valoración técnica del proyecto: Fanny Tello
7. 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.
8. 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.
9. 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.

10. Recolectores 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
11. Recolectación de tres kilogramos de cada planta medicinal para la obtención de extractos.
12. Análisis organoléptico: Incluyen olor, color, sabor y textura.
13. Extracción sólida – Líquido y Líquido – Líquido: Pulverización
14. 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
  35. INVESTIGADOR, ENTREGA Y APROBACIÓN DE INFORMES PARCIALES O FINALES EN LAS FECHAS INDICADAS.
  36. SE SOLICITARÁ PRÓRROGA QUINCE DÍAS ANTES DE LA FECHA DE VENCIMIENTO QUE INDICA ESTE DOCUMENTO.
  37. 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.
  38. 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.
  39. TASA POR AUTORIZACIÓN: 20 VEINTE DÓLARES NO REEMBOLSABLES DEPOSITADOS EN LA CUENTA BANK ECUADOR 0010000785, CÓDIGO SUB LÍNEA 190499



Ing. David Veintimilla  
Director Nacional de Biodiversidad (Encargado).

FT 07/11/2018

JO

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

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. 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 la señorita Erika Pamela Espinosa Caiza portadora de la cédula de identidad 1501217812, 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 ANTI-BIOFILM DE EXTRACTOS DE PLANTAS *Urtica dioica*, *Ilex guayusa* Y *Uncaria tomentosa* EN *Staphylococcus aureus*”** en el Grupo de Investigación, desarrollo e innovación biomédica (GIDiB) bajo la supervisión de MSc. Mario Vilcacundo, durante el período comprendido desde el 27 de abril hasta el 26 de octubre 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, 15 de noviembre de 2018

Atentamente;

Ing. Diana González Palacios



**ANEXO 4. 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-92-2018**

**FECHA:** Ambato, 27 de noviembre de 2018  
**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 la Srta. **ESPINOSA CAIZA ERIKA PAMELA** con CI: 150121781-2, 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 ANTI-BIOFILM DE EXTRACTOS DE PLANTAS *Urtica dioica*, *Ilex guayusa* y *Uncaria tomentosa* en *Staphylococcus aureus***", bajo la dirección del Bqf. Mg. Víctor Guangasig Técnico docente, desde el 24 de septiembre al 23 de octubre de 2018, perteneciente al periodo académico septiembre 2018 – febrero 2019. El proyecto tiene como resolución de aprobación CD-P-2018-1695.

La señorita ha cumplido con la normativa vigente en los laboratorios de docencia de la Facultad 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 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 CARRERA LABORATORIO CLÍNICO**  
Tlf. 0983162224  
E-mail: [victorhguangasig@uta.edu.ec](mailto:victorhguangasig@uta.edu.ec)



UNIVERSIDAD  
TÉCNICA DE AMBATO

Cda. Ingahurco Teléfono (03) 3 730 268 Ext. 5209 [www.uta.edu.ec](http://www.uta.edu.ec)

**ANEXO 5. FOTOGRAFÍAS**

**RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL**

*Urtica dioica* L.



*Ilex guayusa*



*Uncaria tomentosa*





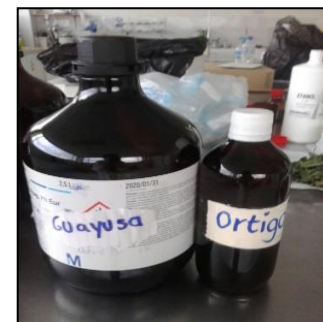
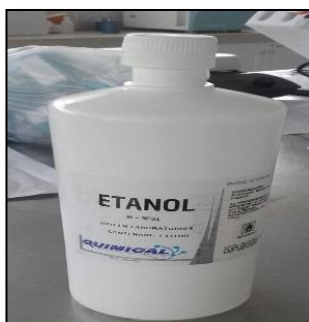
## SELECCIÓN Y LAVADO DE ESPECIES VEGETALES



## DESECACIÓN DE MATERIAL VEGETAL



## MACERACIÓN CON ETANOL 96%



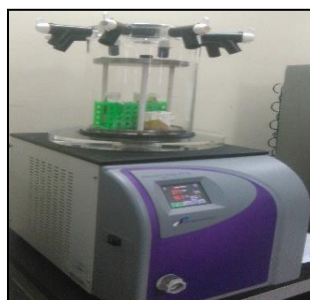
## FILTRADO AL VACÍO



Extractos obtenidos



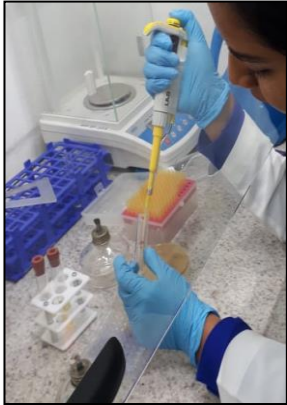
## LIOFILIZACIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES



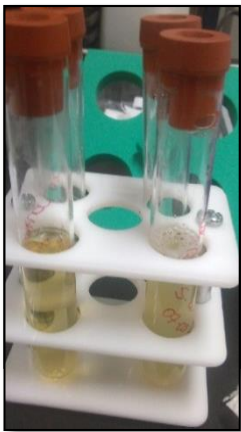
Extractos congelados -80°



## VIVIFICACIÓN DE *Staphylococcus aureus*



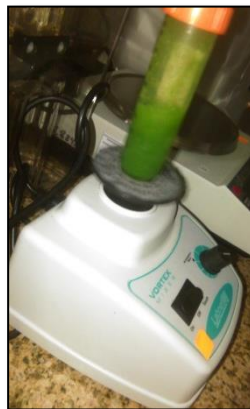
## PROTOCOLO DE FORMACIÓN DE BIOFILM



Luego de 24 horas.

Medición de absorbancia en Nanodrop

Dilución en PBS



Pesaje de extractos vegetales

Vórtex

Pipeteo de extracto

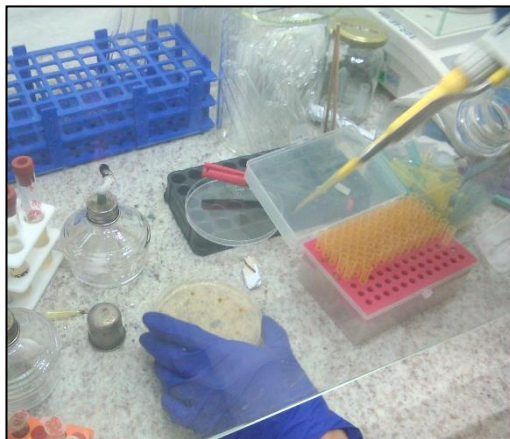
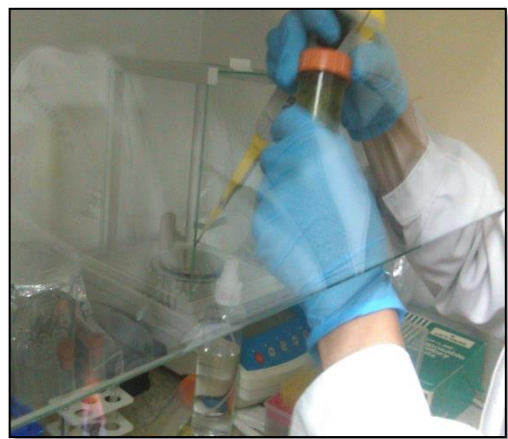
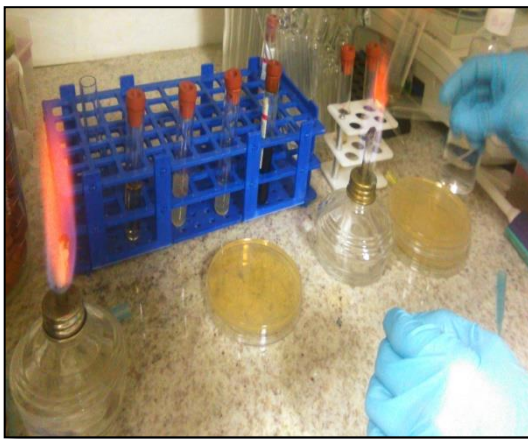


Colocación de *S. aureus*

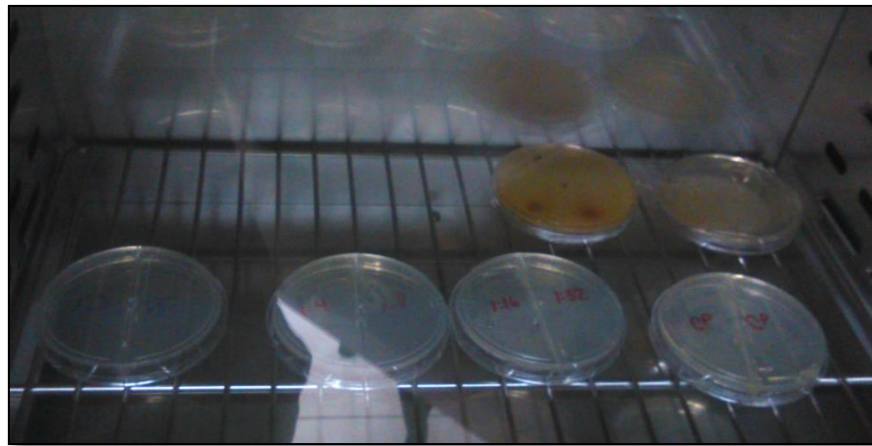


Incubación a 37 ° C por 24 h.

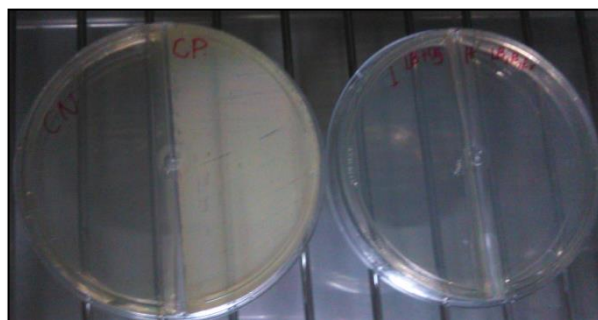
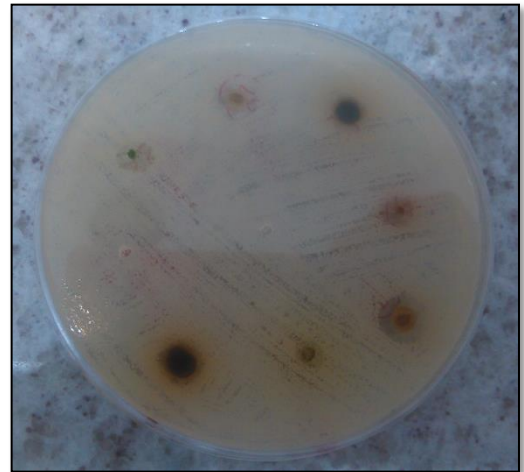
### ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA







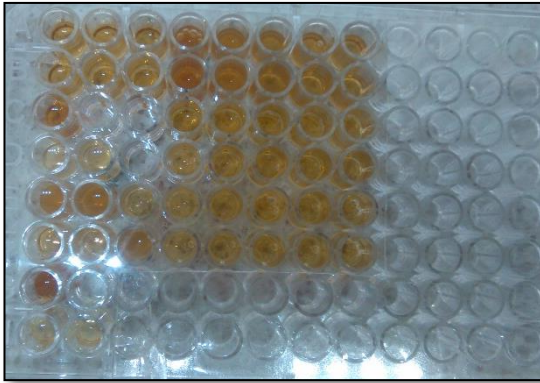
Medición de Halos de inhibición de crecimiento bacteriano.



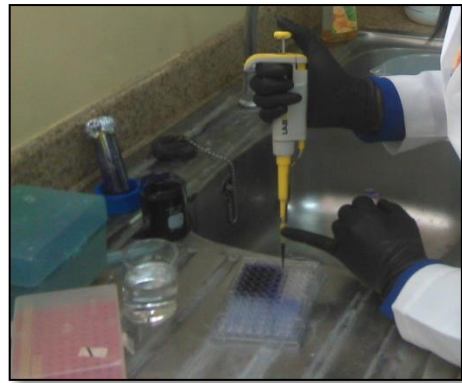
Efecto Bactericida 1:2



## ACTIVIDAD ANTI-BIOFILM



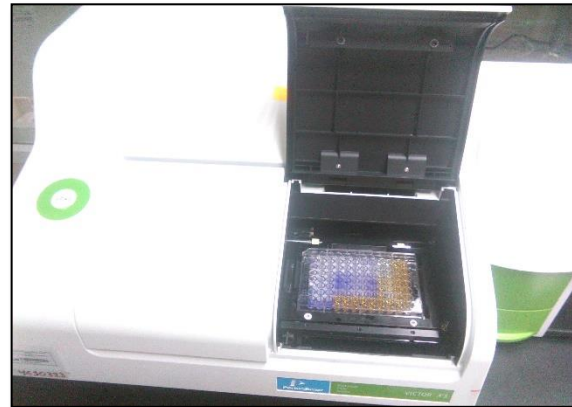
Luego de 24 h.



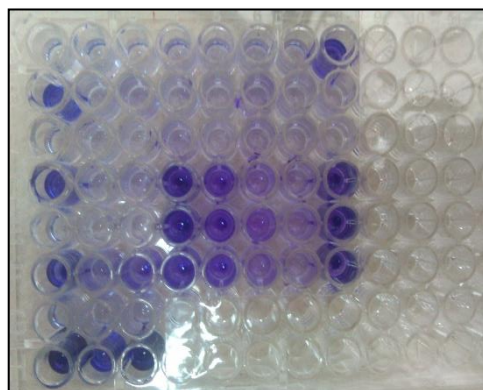
Colocación de cristal violeta 1%



Placa teñida lista para leer absorbancias



Lectura en equipo *Victor X3*



Verificación de actividad antibiofilm